Hereditäre Hämochromatose: Aktuelle Erkenntnisse und Kontroversen

Hereditary Haemochromatosis: New Data and Controversies

M. Steiner, P. Meier, P. Schuff-Werner

Zusammenfassung: Die hereditäre Hämochromatose (HH) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des Eisenstoffwechsels, die durch eine verstärkte intestinale Eisenresorption mit nachfolgender Ablagerung von Eisen in Geweben charakterisiert ist. Die molekulare Ursache liegt in den Mutationen C282Y und H63D im *HFE*-Gen. Einer außergewöhnlich häufigen genetischen Anlage in der europäischen Bevölkerung (Homozygotenfrequenz für *HFE* C282Y von bis zu 1 : 200) steht eine niedrige klinische Penetranz gegenüber, deren Ausmaß im Zentrum aktueller Kontroversen steht. Laboratoriumsdiagnostisch kann die phänotypische Ausprägung der Eisenüberladung durch Analysen der Transferrinsättigung und/oder Ferritinkonzentration erfaßt werden. Der Mutationsnachweis im *HFE*-Gen sichert die Diagnose HH. Ein Populationsscreening für die HH ist bei einer niedrigen Penetranz der Erkrankung aus Kosten- und medizinischen Gründen nicht vertretbar. Gezielte Screeningprogramme bei vorliegender Symptomatik und/oder auffälligen klinisch-chemischen Befunden sollten die molekulargenetische Abklärung einschließen.

Schlüsselwörter: hereditäre Hämochromatose; Diagnose; Screening.

Summary: Hereditary haemochromatosis (HH) is a common autosomal-recessive disorder of iron metabolism characterised by increased intestinal iron resorption and subsequent deposition in parenchymatous organs. The molecular defect underlying HH consists of two point mutations (C282Y, H63D) in the *HFE* gene. Recent studies have demonstrated a high frequency of the homozygous *HFE* mutation status, approaching up to 1 in 200 among the general population, as opposed to a low clinical penetrance of the disease. This is the subject of ongoing studies and scientific debate. In the clinical laboratory, iron overload is phenotypically assessed by the transferrin saturation rate and/or ferritin concen-

tration. The demonstration of the *HFE* gene mutations confirms the diagnosis at the genetic level. At the present time, a population screening of HH cannot be recommended due to the low penetrance of the disease. In contrast, a targeted genetic screening in patients presenting with laboratory evidence of iron overload and/or signs and symptoms known to be overrepresented in HH seems to be a promising approach. This review article attempts to present new data related to HH and to evaluate ongoing scientific controversy.

Keywords: hereditary haemochromatosis; diagnosis; screening.

Der Begriff Hämochromatose (griechisch: haima – Blut und chromatos – Farbe) wurde von dem Straßburger Pathologen Friedrich Daniel von Recklinghausen eingeführt. Im Tageblatt der Versammlungen Deutscher Naturforscher und Ärzte wird 1889 berichtet: „Unter der Bezeichnung ‚Hämochromatose‘ versucht v. Recklinghausen pathologische braune Färbungen der Organe zusammen zu fassen, welche vom Blutfarbstoff herrühren und trotz ihres häufigen Vorkommens und ihrer weiten Verbreitung bisher nur wenig beachtet wurden.“ [1]. Meilensteine im Verständnis der Hämochromatose, deren Pathologie, Klinik, Vererbbarkeit und molekulargenetischer Grundlagen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Der Wissensstand zur hereditären Hämochromatose wurde vor wenigen Jahren in einer umfangreichen Monographie zusammengefasst [5]. Der Schwerpunkt der vorliegenden Übersicht liegt auf aktuellen Erkenntnissen, die zum besseren Verständnis der Erkrankung beigetragen haben, aber auch Anlass zu neuen Kontroversen geben.

Klassifikation der hereditären Hämochromatose

Die Einteilung der hereditären Hämochromatose (HH) als vererbte Erkrankung des Eisenstoffwechsels erfolgt derzeit in 4 Typen [6, 7]. In der Klassifikation wird der klassische Typ 1, der auf Mutationen im *HFE*-Gen (meist *HFE* C282Y) zurückgeht, von drei weiteren Typen abgegrenzt, die nicht mit Veränderungen im

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Universität Rostock, Deutschland

Korrespondenz: Dr. med. Michael Steiner, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Universität Rostock, Ernst-Heydemann-Str. 6, 18057 Rostock, Deutschland.

Fax: +49/381/494 7672

E-mail: michael.steiner@med.uni-rostock.de

Tabelle 1 Hereditäre Hämochromatose: Historische Synopsis

1889:	Von Recklinghausen führt den Begriff Hämochromatose ein [1].
1935:	Sheldon veröffentlicht die klassische Hämochromatose-Monographie auf der Grundlage von Untersuchungen an über 300 Patienten und konstatiert, dass es sich um eine Erbkrankheit handelt, deren Pathologie sämtlich auf Eisenablagerungen im Gewebe zurückgeführt werden kann [2].
1977:	Simon und Mitarbeiter zeigen, dass die hereditäre Hämochromatose autosomal-rezessiv vererbt wird und mit der Region HLA-A3 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 eng assoziiert ist [3].
1996:	Feder und Mitarbeitern gelingt mittels positioneller Klonierung die Identifizierung des Hämochromatose-Gens <i>HLA-H</i> (später in <i>HFE</i> umbenannt) und dessen Mutationen, die bei 87 % der untersuchten Hämochromatose-Patienten gefunden werden [4].

Tabelle 2 Klassifikation der hereditären Hämochromatose mit Eintrag in die Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)

Typ 1	(OMIM 235 200):	<i>HFE</i> -Mutationen (Chromosom 6): meist <i>HFE</i> C282Y, H63D Autosomal-rezessiver Erbgang, häufig in europäischer Bevölkerung
Typ 2A	(OMIM 602 390):	Juvenile Hämochromatose (Chromosom 1) Autosomal-rezessiver Erbgang, selten [8, 9]
Typ 2B	(OMIM 606 464):	Juvenile Hämochromatose (Chromosom 19) Autosomal-rezessiver Erbgang, selten [10]
Typ 3	(OMIM 604 250):	<i>TFR2</i> -Mutationen (Transferrinrezeptor 2, Chromosom 7) Autosomal-rezessiver Erbgang, in Italien gehäuft [11–13]
Typ 4	(OMIM 606 069):	<i>SLC11A3</i> -Mutationen (Ferroportin 1, Chromosom 2) Autosomal-dominanter Erbgang, in Italien gehäuft [14, 15]

HFE-Gen assoziiert sind (Tabelle 2). Im deutschsprachigen Raum dominiert die klassische HH vom Typ 1.

Von den genetischen (primären) Formen der Hämochromatose werden die erworbenen (sekundären) Hämochromatosen und Häm siderosen abgegrenzt [16]. Im Vordergrund stehen chronisch-refraktäre, hämolytische und aplastische Anämien sowie Thalassämie-Syndrome. Weiterhin führen chronische Lebererkrankungen, wiederholte Transfusionen und die langfristige Eisentherapie in hoher Dosierung zur sekundären Eisenüberladung.

Epidemiologie der hereditären Hämochromatose

Phänotypische und genotypische Studien belegen übereinstimmend, dass es sich bei der HH um die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung in Populationen europäischer Abstammung und damit im deutschsprachigen Raum handelt.

In einer phänotypischen Screeningstudie (Transferrinsättigung, Ferritinkonzentration) wurden 6039 Arbeitnehmer und ambulante Patienten in der ärztlichen Grundversorgung hinsichtlich Eisenmangel bzw. Hämochromatose untersucht. 8,3 % zeigten erhöhte Ferritinkonzentrationen, bei 3,5 % lag eine erhöhte Transferrinsättigung vor und 0,9 % wiesen die Kombination beider

Befunde auf. Nach Bestätigungsanalysen wurde bei 34 Patienten (0,56 %) die Diagnose HH gestellt, davon bei 30 im präzirrhotischen Stadium [17]. Eine weitere Untersuchung von 2812 potentiellen Blutspendern ergab bei 7 Probanden (0,25 %) das Vorliegen einer Hämochromatose [18].

Nach der molekulargenetischen Aufklärung der HH [4] wurden in Deutschland, Österreich und der Schweiz mehrere Genotypisierungsstudien zur Populationsgenetik des *HFE*-Gens durchgeführt (Tabelle 3). Es kann für den deutschsprachigen mitteleuropäischen Raum mit hinreichender Sicherheit davon ausgegangen werden, dass in der Gesamtbevölkerung die genetische Anlage der HH mit einer Häufigkeit zwischen 1:100 und 1:400 (0,25–1,0 %) auftritt und die Heterozygotenfrequenz zwischen 4 und 10 % liegt. Ob im deutschsprachigen Raum ein isoliertes Nord-Süd-Gefälle in der Genfrequenz vorliegt oder sich dieses Phänomen als Teilaspekt der Genvarianz in eine europäische Nord-Süd-Betrachtung einzuordnen hat, lässt sich anhand der verfügbaren Daten nicht sicher beurteilen.

Populationen unterschiedlicher ethnisch-rassischer Herkunft weisen deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der veränderten *HFE*-Allele auf [27], auf die hier nicht näher eingegangen wird.

Tabelle 3 Populationsgenetik des *HFE*-Gens in Deutschland, Österreich und Schweiz

Probanden (Herkunft)	<i>HFE</i> C282Y		<i>HFE</i> H63D		Literatur
	Heterozygotie	Homozygotie	Heterozygotie	Homozygotie	
115 (Deutschland)	9* (7,8 %) *inkl. 1 Gemischtheterozygotie Allelfrequenz: 3,9 %	0	26 (22,6 %) Allelfrequenz: 13,0 %	4 (3,5 %)	[19]
157 (Deutschland)	15 (9,6 %) Allelfrequenz: 4,8 %	0	37 (23,6 %) Allelfrequenz: 13,0 %	2 (1,3 %)	[20]
153 (Deutschland)	8* (5,2 %) *inkl. 3 Gemischtheterozygotie Allelfrequenz: 2,6 %	0	31 (20,3 %) Allelfrequenz: 11,1 %	3 (2,0 %)	[21]
251 (Deutschland)	18* (7,2 %) *inkl. 3 Gemischtheterozygotie Allelfrequenz: 3,6 %	0	55 (21,9 %) Allelfrequenz: 12,9 %	5 (2,0 %)	[22]
205 (Deutschland)	13* (6,4 %) *inkl. 2 Gemischtheterozygotie Allelfrequenz: 3,2 %	0	ohne Angabe	ohne Angabe	[23]
126 (Deutschland)	6 (4,8 %) Allelfrequenz: 2,4 %	0	29 (23,0 %) Allelfrequenz: 13,9 %	3 (2,4 %)	[24]
271 (Österreich)	20 (7,4 %) Allelfrequenz: 4,1 %	1 (0,4 %)	54 (19,9 %) Allelfrequenz: 12,9 %	8 (3,0 %)	[25]
70 (Schweiz)	4* (5,7 %) *inkl. 1 Gemischtheterozygotie Allelfrequenz: 2,9 %	0	20 (28,6 %) Allelfrequenz: 17,1 %	2 (2,9 %)	[26]

Ätiologie und molekulare Pathogenese der hereditären Hämochromatose

Die Eisenbalance des menschlichen Körpers wird wesentlich durch die Resorption im proximalen Dünndarm reguliert [28, 29], die bei der HH erhöht ist. Daraus resultiert ein dauerhaft erhöhtes Eisenangebot und die pathologische Ablagerung in verschiedenen Geweben.

Bis zur Entdeckung des *HFE*-Gens war die molekulare Pathogenese der HH weitgehend unbekannt. Feder und Mitarbeiter konnten 1996 das für die HH verantwortliche Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 identifizieren [4]. Das initial als *HLA-H* bezeichnete Gen wurde später in *HFE* umbenannt. Das *HFE*-Gen verschlüsselt ein transmembranöses Glykoprotein von 343 Aminosäuren Länge, welches mit dem β 2-Mikroglobulin assoziiert ist. Bereits in der initialen Studie konnte gezeigt werden, dass bei 89 % der HH-Patienten eine homozygote Punktmutation G/A des Nukleotids 845 vorliegt, welche zum Austausch Cystein/Tyrosin der Aminosäure 282 (C282Y) führt und weitreichende funktionelle Konsequenzen hat. Eine weitere Mutation besteht in einem C/T-Austausch an Nukleotidposition

187, der einen Austausch Histidin/Asparaginsäure an der Aminosäureposition 63 (H63D) verursacht.

In der Folgezeit wurde das Konzept der molekularen Pathogenese der HH vollständig überarbeitet. Störungen in der apikalen Eisenaufnahme durch die Enterozyten, in deren intrazellulärer Speicherfunktion sowie in der Abgabe von Eisen in das Blutplasma und dessen Recycling vom Plasma in die Enterozyten sind potentielle pathogenetische Ansatzpunkte. Im Mittelpunkt scheint der gestörte Rücktransport von Eisen aus dem Plasma in die Enterozyten zu stehen. Der am basolateralen Enterozytenaspekt lokalisierte Transferrinrezeptor 1 (TfR1) ist für die Aufnahme von Eisen aus dem zirkulierenden Eisen-Transferrinkomplex verantwortlich [30]. Das *HFE*-Protein ist mit TfR1 und β 2-Mikroglobulin kolokalisiert [31, 32]. Das aufgrund der Mutation veränderte *HFE*-Protein bewirkt eine reduzierte Affinität von TfR1 zum Eisen-Transferrinkomplex und eine verminderte zelluläre Aufnahme von Eisen aus dem Komplex [33–36]. In einem Knockoutmodell konnte die führende pathogenetische Rolle des *HFE*-Proteins inklusive einer Gen-Dosis-Beziehung bestätigt werden [37]. Eine Reihe weiterer Transporter, Bindungspro-

teine und Rezeptoren sind in ihrem funktionellen Bezug zur HH Gegenstand aktueller zellbiologischer Untersuchungen [38, 39]. Unabhängig davon kann bei der HH von einem „molekularen Bremsversagen“ ausgegangen werden, welches die Eisenbalance dauerhaft in Richtung Mehraufnahme verschiebt. Ein zellbiologisches Modell der Eisenresorption ist stark vereinfacht in der Abbildung 1 dargestellt.

Pathologie und Klinik der hereditären Hämochromatose

Die Pathologie und klinische Manifestation der HH wird von Eisenablagerungen in unterschiedlichen Geweben und deren Folgeschäden dominiert, die aus der dauerhaft erhöhten intestinalen Eisenaufnahme resultieren. Konsekutiv kommt es zum Anstieg des Gesamtkörper Eisens, Eisenablagerungen in Geweben, reversiblen und später irreversiblen Organschäden. Es muss jedoch betont werden, dass der natürliche Verlauf der HH sehr

variabel ist und neben dem Genstatus von weiteren Faktoren abhängt. Es kommt bei Männern meistens im vierten oder fünften Lebensjahrzehnt zur klinischen Manifestation, bei Frauen typischerweise etwa zehn Jahre später. Häufig stehen initial unspezifische Symptome wie generelles Krankheitsgefühl, vermehrte Müdigkeit und/oder abdominelle Schmerzen im Vordergrund, bevor sich Organschäden manifestieren.

Die Leber ist bevorzugt von der Eisenüberladung betroffen. Nach frühen Eisenablagerungen in den periportal Parenchymzellen kommt es mit fortschreitender Erkrankung zur perilobulären Fibrose und über weitere Ablagerungen in Gallengangsepithelien, Kupferzellen und Bindegewebssepten zur Leberzirrhose [40]. Patienten mit HH haben ein deutlich erhöhtes Risiko, an einem Leberzellkarzinom zu erkranken [41–43].

Es wurden wiederholt Assoziationen von *HFE*-Mutationen mit dem Auftreten und der klinischen Manifestation von weiteren Lebererkrankungen beschrieben. Bei der Porphyria cutanea tarda (PCT) finden sich bei etwa 40 % der Patienten *HFE*-Mutationen, die zu erhöhten

Abbildung 1 Synopsis der intestinalen Eisenresorption: vereinfachte Darstellung der Eisenaufnahme am apikalen Zellauspekt der Dünndarmzelle, der intrazellulären Transferprozesse und der Abgabe in das Blutplasma sowie des Recyclings am basolateralen Zellauspekt. Das aufgrund der *HFE*-Mutation(en) strukturell veränderte HFE-Protein hemmt den Recyclingmechanismus und führt zu einer dauerhaften gesteigerten Eisenaufnahme.

Ferritinkonzentrationen im Serum und leichten bis mäßigen Eisenablagerungen in der Leber beitragen können und im Risikofaktorenkonzept der Erkrankung angemessen Berücksichtigung finden sollten [44–46]. Untersuchungen des Eisenstoffwechsels und die *HFE*-Gendiagnostik sollten bei PCT-Patienten und deren Verwandten erster Ordnung durchgeführt werden, da in Analogie zur HH auch bei dieser Erkrankung die kontrollierte Phlebotomiebehandlung den klinischen Verlauf günstig beeinflussen kann.

Bei der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), der chronischen Hepatitis C und der alkoholtoxischen Hepatopathie wurden variabel erhöhte Proportionen von *HFE*-Mutationen gefunden, deren pathogenetische Relevanz nicht eindeutig geklärt ist [6].

Im Pankreasgewebe erfolgt die Eisenablagerung weitgehend spezifisch in den B-Zellen des Inselapparates, was über eine Insulinresistenz zum Hämochromatose-assoziierten Diabetes mellitus führen kann [47]. Eisenablagerungen in der Haut führten in der Kombination mit Diabetes mellitus zu der Bezeichnung „Bronzediabetes“. Die hyperpigmentierte Haut mit braun-grauen Koloritveränderungen ist ein charakteristisches Symptom der HH. Weitere Endokrinopathien werden beobachtet. Kardiale Störungen manifestieren sich als Kardiomyopathie und Herzrhythmusstörungen. Vernachlässigt wurde lange Zeit die Arthropathie im Rahmen der HH. Häufig kommt es zu recht typischen Veränderungen der Metakarpophalangealgelenke II und III, die nicht selten als Arthrose oder rheumatoide Arthritis fehlgedeutet werden [48]. Große Gelenke weisen Chondrokalzinosen auf. Die Gelenkveränderungen sind irreversibel.

Es wird zunehmend über Zusammenhänge zwischen *HFE*-Status und weiteren extrahepatischen Erkrankungen berichtet. Die Datenlage zum Zusammenhang von HH und extrahepatischen Malignomen ist kontrovers. Einzelne Studien vor der Einführung der Genotypisierung belegten einen solchen Zusammenhang [49–52], während in anderen Untersuchungen diese Assoziation nicht vorlag [41, 53]. Genotypisierungsstudien an kleineren Kohorten waren negativ für den Zusammenhang zwischen *HFE*-Mutationen und kolorektalen Karzinomen [54, 55], während in einer großen Studie *HFE*-Mutationen mit einem erhöhten Risiko eines Kolonkarzinoms assoziiert waren [56].

Assoziationen zwischen *HFE*-Genstatus und dem Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen wurden in epidemiologischen Studien beschrieben [57–59], bedürfen aber weiterer Untersuchungen, bevor sie in ein gültiges Risikofaktorenkonzept integriert werden können.

Kontroverse Daten liegen zur allgemeinen Lebenserwartung in Abhängigkeit vom *HFE*-Genstatus vor [60–62]. Weitere Studien müssen zukünftig zeigen, ob der homozygote *HFE* C282Y-Status in der europäischen Bevölkerung mit einer modifizierten Absterberate der Anlageträger assoziiert ist.

Diagnose der hereditären Hämochromatose

In der traditionellen klinisch-chemischen Diagnostik der HH werden Bestimmungen der Transferrinsättigung und/oder der Ferritinkonzentration bevorzugt verwendet. Die isolierte Analyse der Eisenkonzentration im Plasma/Serum kann dagegen für die Diagnostik der HH nicht empfohlen werden, da normale Eisenkonzentrationen eine HH nicht ausschließen und erhöhte Konzentrationen auch ohne Vermehrung des Speichereisens auftreten können. Der Nutzen routinemäßiger Eisenbestimmung wurde unlängst grundsätzlich angezweifelt und postuliert, dass darauf verzichtet werden kann, ohne Qualitätsminderungen in der Diagnostik in Kauf zu nehmen [63].

Für die Beurteilung des Eisenhaushaltes ist die Eisenbestimmung in Kombination mit der errechneten Transferrinsättigung sowie der Ferritinkonzentration dennoch ein weit verbreitetes Vorgehen. Intraindividuelle tageszeitlich bedingte und Tag-zu-Tag-Schwankungen [64, 65] müssen allerdings prä- und postanalytisch berücksichtigt werden. Wird die errechnete Transferrinsättigung zur Diagnostik der HH eingesetzt, hat sich die Analytik beim nüchternen Patienten bewährt, um falsch-positive Befunde zu verringern [66] bzw. wurde bei pathologischen Testresultaten eine Zweituntersuchung am Nüchternpatienten empfohlen [67]. Hervorzuheben ist weiterhin, dass eine erhöhte Transferrinsättigung ein relativ früher phänotypischer Befund im natürlichen Verlauf der HH ist [68].

Intraindividuelle Schwankungen der Ferritinkonzentration sind bei Abwesenheit interkurrenter Erkrankungen lediglich geringgradig, was in der Diagnostik der HH ein Vorteil ist. Der sehr hohen Sensitivität einer erhöhten Ferritinkonzentration steht allerdings eine bestenfalls mäßige Spezifität gegenüber [69].

Alternativ kann die latente (ungesättigte) Eisenbindungskapazität in einem direkten Testverfahren bestimmt werden [70]. In der Diagnostik der HH haben sich die Analysen der Transferrinsättigung bzw. der latenten Eisenbindungskapazität als gleichwertige Verfahren bewährt [71].

Im klinischen Alltag gelten Transferrinsättigungen über 55 % und/oder Ferritinkonzentrationen über 300 µg/l für Männer bzw. über 200 µg/l bei Frauen als sensitive Kriterien für eine mögliche HH, die eine weitere Abklärung erfordern [69, 72, 73]. Mittels spezieller biometrischer Verfahren wurden altersabhängige Referenzperzentilen mit einer besseren Diskriminationsfähigkeit für beide Parameter definiert, deren Anwendbarkeit allerdings auf die verwendeten Verfahren begrenzt ist [74]. Eine Alternative zu Cut-off-Werten unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität stellt ein einfaches Nomogramm dar, mit dessen Hilfe aus Ferritin und Transferrinsättigung eine Post-Test-Wahrscheinlichkeit für die HH ermittelt werden kann [75].

Die Bestimmung des löslichen Transferrinrezeptors ist in der Diagnostik der HH aufgrund von Überschnei-

dungen der Konzentrationen bei HH und normalem Eisenhaushalt den anderen klinisch-chemischen Kenngrößen des Eisenhaushaltes unterlegen [76, 77].

Resultate klinisch-chemischer Untersuchungen, die phänotypisch eine Eisenüberladung belegen, müssen abgeklärt werden. Differentialdiagnostisch stehen die HH, Hepatitiden infektiöser und nicht-infektiöser Genese, alkoholtoxische Hepatopathie und verschiedene hämatologische Erkrankungen im Vordergrund. Die *HFE*-Genotypisierung der beiden häufigsten Mutationen C282Y und H63D sichert die Diagnose HH bei Vorliegen der Homozygotie für das C282Y-Allel bzw. der Gemischtheterozygotie C282Y/H63D. Für die Genotypisierung stehen zahlreiche methodische Ansätze zur Verfügung. Beispielhaft seien die konventionelle Polymerasekettenreaktion mit nachfolgendem Restriktionsverdau, Allel-spezifische Amplifikation, Real-Time-PCR-Verfahren und SSCP mit Kapillarelektrophorese genannt [4, 24, 78, 79]. Exemplarisch ist in der Abbildung 2 die molekulargenetische Analyse der Mutation *HFE* C282Y bei Verwendung eines konventionellen PCR-RFLP-Verfahrens [80] dargestellt.

Bei Ausschöpfung der unter Routinebedingungen verfügbaren konventionellen und molekulargenetischen Untersuchungsverfahren kann die Ursache der phänotypischen Eisenüberladung bei ca. 90 % der Patienten abgeklärt werden. Wird der dringende Verdacht einer HH aufgrund fehlender Mutationen an den Positionen *HFE* 282 und 63 nicht bestätigt, sollten in Einzelfällen Sequenzierungen der Exonstrukturen inklusive der Exon-Intron-Übergänge des *HFE*-Gens durchgeführt werden, um seltene Genmutationen nachzuweisen [81]. Problematisch sind Patienten nicht-europäischer Abstammung, bei denen die typische Mutation *HFE* C282Y selten

oder nicht nachweisbar ist [27, 82]. Bei einem asiatischen Patienten mit phänotypisch gesicherter HH konnte eine neue Mutation in homozygoter Ausprägung an einem Exon-Intron-Übergang nachgewiesen werden [83], der möglicherweise in Südostasien eine Bedeutung für die ansonsten seltene HH zukommt [84].

Es gibt verschiedene invasive und nichtinvasive Verfahren zur direkten Bestimmung des Ausmaßes der Eisenüberladung. Die Leberbiopsie mit histologischer Untersuchung in Kombination mit der Eisenfärbung und biochemischer Quantifizierung der Eisenkonzentration im Lebergewebe ist eine invasive Methode, die ausschließlich mit strenger Indikationsstellung verwendet werden sollte. Für die Diagnosestellung einer HH ist die Leberbiopsie heute vollständig entbehrlich. Lediglich in der Beurteilung der hepatischen Gewebsschädigung hat die Leberbiopsie weiterhin ihre Berechtigung. Neue Studien belegen allerdings überzeugend, dass einfache klinische und Laboruntersuchungen (Hepatomegalie, Ferritin, ASAT, Thrombozytenzahl) weitgehend sicher negativ-prädiktiv für eine Leberfibrose bzw. positiv-prädiktiv für eine Leberzirrhose im Rahmen der HH sind [85, 86] und auch hier zunehmend die Leberbiopsie ersetzen können.

Im Rahmen wiederholter therapeutischer Aderlässe können ebenfalls Aussagen zum Gesamtspeichereisen gemacht werden (quantitative Phlebotomie). Nichtinvasive Verfahren wie Magnetresonananzuntersuchungen und SQUID-Biosuszeptometrie [87] stehen nur ausgewählten Zentren zur Verfügung. Es ist deshalb zu erwarten, dass die Analysen von Transferrinsättigung und/oder Ferritinkonzentration weiterhin die Methoden der Wahl für die phänotypische Beurteilung der Eisenüberladung bleiben werden.

Hämochromatose-Screening

Frühdiagnostik und -behandlung sind wertvolle Instrumentarien in der Erweiterung der als Intervention bei vorliegender Krankheitsmanifestation verstandenen medizinischen Praxis um sekundärpräventive Bereiche. Screening und Früherkennung im symptomlosen Stadium einer Krankheit eröffnen die Möglichkeit, durch geeignete Maßnahmen eine verzögerte Manifestation bzw. deren gänzliche Vermeidung zu erreichen.

Die Prinzipien des Populationsscreenings [88] haben grundsätzlich sowohl für phänotypische als auch für genotypische Screeningverfahren Gültigkeit. Wesentliche Eckpunkte sind die Bedeutung der Erkrankung für den Gesundheitszustand der Gesamtpopulation, die Verfügbarkeit effektiver Screeningverfahren, die Möglichkeit mit geeigneten Interventionen während der Latenzperiode die Manifestation zu vermeiden und eine möglichst günstige Kosten-Nutzen-Relation.

Kriterien, die ein genetisches Populationsscreening rechtfertigen, schließen konkret ein: relativ häufige und schwere Krankheit, Erfassbarkeit der häufigsten Mutationen, hohe Penetranz, definierter und einheitlicher na-

Abbildung 2 Nachweis der *HFE*-Mutation C282Y mittels Polymerasekettenreaktion und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (PCR-RFLP). Das PCR-Produkt des mutierten Allels weist eine zusätzliche Restriktionschnittstelle auf, welche die Genotypisierung erlaubt. L: DNA-Leiter (100 bp).

türlicher Krankheitsverlauf, effektive präventive und überwachende Interventionen, preiswerter Mutationsnachweis, Akzeptanz des Screeningverfahrens in der Population sowie Beratung vor und nach der Testung [89]. Im Unterschied zum Carrier-Screening bei autosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen mit dem Ziel einer genetischen Beratung im reproduktionsmedizinischen Sinne (z. B. zystische Fibrose, M. Gaucher) erfolgt ein Hämochromatose-Screening, um Individuen zu identifizieren, die selbst das Risiko einer späteren Krankheitsmanifestation tragen [90].

Bei der Hämochromatose müssen eine Reihe spezifischer Faktoren angemessen berücksichtigt werden. Es handelt sich um eine Krankheit, die typischerweise im mittleren bis späten Erwachsenenalter zur Manifestation kommt, so dass ein genetisches Screening im symptomlosen Stadium ein Suszeptibilitätsscreening (Risikoscreening) darstellt. Der natürliche Verlauf der Hämochromatose ist sehr variabel mit einer kaum vorhersagbaren Alters-assoziierten Penetranz. Die medizinische Betreuung für symptomlose Anlageträger ist nicht hinreichend evaluiert und psychosoziale Aspekte der genetischen Testung müssen ernst genommen werden. Neben einem besseren Verständnis des Verlaufs der Hämochromatose von der genetischen Anlage über latente Krankheitsstadien bis zur Manifestation sind gesicherte Daten zu positiven und negativen prädiktiven Werten der gewählten Screeningverfahren zu fordern.

Bei der HH sind phänotypische, genotypische und kombinierte Screeningverfahren möglich. Screening von Populationen (z. B. Neugeborene) sowie gezielte Screeningverfahren (targeted screening) sind denkbar. Realistische Selektionskriterien sind typische Laborbefundkonstellationen sowie Symptome bzw. Symptombkombinationen mit einer auffälligen Assoziation zur Hämochromatose.

Populationsscreening

Vor der Identifizierung des *HFE*-Gens verwendeten mehrere große Hämochromatose-Screeningstudien mit der Ferritinkonzentration und/oder Transferrinsättigung phänotypische Methoden. In unselektierten Populationen wurde die HH bei 0,45 % [91] bzw. 0,36 % [92] gefunden.

Da etwa 5 von 1 000 weißen Nordamerikanern homozygote Anlageträger der HH sind, wurde vom College of American Pathologists bereits vor der Klonierung des *HFE*-Gens eine Empfehlung für ein Populationsscreening mit den Analysen von Eisen und Transferrinsättigung nach dem 20. Lebensjahr ausgesprochen [67].

Screeningstudien mit genotypischen Methoden wurden bereits kurze Zeit nach der Aufklärung der Hämochromatose-Mutationen durchgeführt. Die Untersuchung von 1660 unselektierten Neugeborenen vorwiegend europäischer Abstammung in Brisbane (Australien) identifizierte 8 (0,48 %) homozygote *HFE* C282Y-An-

lagen [93]. Aus dem Vergleich mit Phänotypisierungsstudien als historische Kontrollen ergab sich, dass mit der Genotypisierung homozygote Anlageträger erfasst werden, die keine phänotypische Ausprägung im Eisenstoffwechsel aufweisen. Vergleichbare Häufigkeiten der Homozygotie für *HFE* C282Y wurden in Populationsstudien in Neuseeland mit 0,47 % [94], in den USA mit 0,69 % [95], 0,41 % [96] bzw. 0,26 % [97], in Kanada mit 0,31 % [98], in England mit 0,68 % [99] und in den Niederlanden mit 0,38 % [100] gefunden. Den Studien ist gemeinsam, dass eine deutliche Diskrepanz zwischen den Prävalenzen der phänotypischen HH und des HH-Genstatus besteht.

In einer Leitlinienempfehlung (Centers for Disease Control and Prevention, National Human Genome Research Institute) sprach sich ein Expertengremium gegen ein genetisches Populationsscreening aus, da Prävalenz und Penetranz der *HFE*-Mutationen sowie die optimale Betreuung asymptomatischer Mutationsträger nicht geklärt schienen und deren Stigmatisierung und Diskriminierung für möglich gehalten wurde [101]. Dieses Votum blieb nicht unwidersprochen [102].

Im Mittelpunkt aktueller Untersuchungen und Kontroversen steht die Penetranz der HH, die sich als Prozentsatz der genetischen Anlageträger (Genotyp) definiert, der zur klinischen Manifestation (Phänotyp) gelangt. Diskrepanzen zwischen Genotyp und Phänotyp und eine extrem variable Penetranz monogener Erkrankungen gehören zu den zentralen Herausforderungen der molekularen Medizin [103]. Eine hohe Penetranz gehört zu den zentralen Voraussetzungen für die Empfehlung eines Populationsscreenings für HH [104]. Trotz unklarer Datenlage zur Penetranz wurde ein generelles Screening gefordert [105] und mit dem Argument, dass HH eine seltene Todesursache ist, umgehend wieder zurückgewiesen [106]. Die Präsenz homozygoter HH-Anlageträger in einer älteren männlichen Population [107] und ein geringer Prozentsatz von Lebererkrankungen unter homozygoten Anlageträgern [108] wurden als Hinweise auf eine niedrige Penetranz der Erkrankung interpretiert.

Im Rahmen der *HFE*-Genotypisierung von 41 038 kalifornischen Probanden gemischter rassisch-ethnischer Herkunft, die sich einer Gesundheitsuntersuchung unterzogen, konnten 152 homozygote HH-Anlageträger (0,37 %) und 616 Gemischtheterozygoten (1,50 %) identifiziert werden [109]. HH-Anlageträger zeigten weder eine Symptommhäufung noch Verschiebungen im Altersdurchschnitt, so dass eine sehr niedrige Penetranz (<1 %) geschlussfolgert wurde, die ein Populationsscreening völlig irrelevant machen würde. Diese Studie steht in einem klaren Widerspruch zu früheren Untersuchungen, die eine wesentlich höhere Penetranz gefunden hatten. Eine Meta-Analyse konstatierte eine Penetranz von etwa 50 % mit leichten Unterschieden in Abhängigkeit vom Geschlecht [110]. Ein Expertengremium ging sogar davon aus, dass 95 % der HH-Anlageträger nach dem 45. Lebensjahr klinische Manifestationen aufweisen [111].

Die Studie aus Kalifornien wurde wiederholt kommentiert und kritisiert. Auswahl und Zusammensetzung der kalifornischen Kohorte sind nicht problemlos auf andere Populationen übertragbar [112]. Weiterhin wurde die Unterscheidung zwischen der biochemischen Penetranz (phänotypische Expression bei pathologischen Resultaten der Analyse des Eisenhaushaltes) und einer klinischen Penetranz (Manifestation) der HH angemahnt [113], die möglicherweise in einem zeitlichen Zusammenhang stehen. Bei Verwendung pathologischer Resultate aus Laboranalysen als Kriterium fällt die Penetranz deutlich höher aus [114, 115].

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt bleibt dennoch festzustellen, dass die homozygote *HFE* C282Y-Anlage eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für die klinische Manifestation der HH ist. Wahrscheinlich modulieren genetische und Umweltfaktoren die Penetranz der Erkrankung in einem erheblichen Ausmaß, so dass es sich in Analogie zu anderen monogenen Erkrankungen um komplexe Krankheitsverläufe handelt [116–118], deren individuelle Prädiktion eine Herausforderung bleibt.

Neben der diskutierten Studie aus Kalifornien liegen derzeit nur begrenzt Daten zur Morbidität bei HH-Anlageträgern vor, die im Rahmen eines Populationsscreening identifiziert wurden. Eine Untersuchung aus Norwegen zeigt ebenfalls, dass sich der Gesundheitszustand der in einem Screeningprogramm identifizierten HH-Anlageträger nur in wenigen Punkten (Gelenksbeschwerden, Hypothyreoidismus) von einer Kontrollpopulation unterscheidet, was die Sinnfälligkeit eines unselektierten Screenings weiter in Frage stellt [119].

In einer Untersuchung an 100 000 Probanden unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit (HEIRS-Studie) wird derzeit ein HH-Screening im Rahmen der ärztlichen Grundversorgung geprüft [120].

Gezieltes Screening

Im diagnostischen Alltag unter ambulanten und stationären Bedingungen gehören klinisch-chemische Analysen des Eisenhaushaltes zu den häufigen Laborleistungen. Daraus resultiert ein nicht unerheblicher Patientenanteil mit Hinweisen einer phänotypischen Eisenüberladung. Bei diesen Patienten sollte mit der *HFE*-Genotypisierung gezielt eine HH ausgeschlossen bzw. bestätigt werden. Es handelt sich um selektierte Kohorten und der Anteil der genetisch gesicherten HH ist erwartungsgemäß hoch. Bei der genetischen Untersuchung von 150 Patienten mit klinisch-chemisch gesicherter Eisenüberladung wurde die HH bei 25 % gefunden, in der Häufigkeit gefolgt von Hepatitis C, dysmetabolischen Syndromen, Alkoholismus und malignen Grunderkrankungen [121].

Bei Patienten mit fibrotisch-zirrhatischen Lebererkrankungen unklarer Genese sollte der Ausschluss einer HH ebenfalls grundsätzlich erfolgen [23, 122, 123]. Patienten mit klinischen Symptomen oder Symptomkom-

binationen, die eine auffällige Assoziation mit der HH zeigen, sollten initial mittels klinisch-chemischer Analysen phänotypisiert werden. Bei bestehender Indikation wird nachfolgend die Genotypisierung empfohlen [124].

Familiencreening

Verwandten erster Ordnung von Patienten mit HH sollte eine Familienuntersuchung angeboten werden, um eine Früherkennung der Erkrankung zu ermöglichen [7, 125]. Hier besteht ebenfalls die Möglichkeit phänotypischer bzw. genotypischer Analysen. Bevor Kinder von homozygoten Indexpatienten genetisch untersucht werden, sollte die genetische Analyse des anderen Elternteils vorgenommen werden, um im Falle des Nichtvorliegens der Allele *HFE* C282Y und H63D auf die Untersuchung der Kinder verzichten zu können [126].

Literatur

1. Von Recklinghausen FD. Ueber Hämochromatose. Tageblatt der Versammlungen Deutscher Naturforscher und Aerzte 1889;62:324–5.
2. Sheldon JH. Haemochromatosis. London, Oxford University Press, 1935.
3. Simon M, Bourel M, Genetet B, Fauchet R. Idiopathic hemochromatosis. Demonstration of recessive transmission and early detection by family HLA typing. *N Engl J Med* 1977;297:1017–21.
4. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399–408.
5. Barton JC, Edwards CQ (eds.). Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis, and treatment. Cambridge University Press, 2000.
6. Harrison SA, Bacon BR. Hereditary hemochromatosis: update for 2003. *J Hepatol* 2003;38:S14–S23.
7. Niederau C. Hereditäre Hämochromatose. *Internist* 2003;44:191–207.
8. Roetto A, Totaro A, Cazzola M, et al. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1999;64:1388–93.
9. De Gobbi M, Roetto A, Piperno A, et al. Natural history of juvenile haemochromatosis. *Br J Haematol* 2002;117:973–9.
10. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003;33:21–2.
11. Camaschella C, Roetto A, Cali A, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000;25:14–5.
12. Roetto A, Totaro A, Piperno A, et al. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* 2001;97:2555–60.
13. Girelli D, Bozzini C, Roetto A, et al. Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene. *Gastroenterology* 2002;122:1295–302.
14. Montosi G, Donovan A, Totaro A, et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 2001;108:619–23.
15. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 2001;28:213–4.
16. Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. *Hae-matologica* 1998;83:447–55.

17. Niederau C, Niederau CM, Lange S, et al. Screening for hemochromatosis and iron deficiency in employees and primary care patients in Western Germany. *Ann Intern Med* 1998;128:337–45.
18. Nielsen P, Benn HP, Peters C, et al. Iron status in prospective blood donors. *Infusionsther Transfusionsmed* 1995;22(S1):142–4.
19. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997;34:275–8.
20. Nielsen P, Carpinteiro S, Fischer R, Cabeda JM, Porto G, Gabbe EE. Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br J Haematol* 1998;103:842–5.
21. Gottschalk R, Seidl C, Löffler T, Seifried E, Hoelzer D, Kaltwasser JP. HFE codon 63/282 (H63D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic hemochromatosis. *Tissue Antigens* 1998;51:270–5.
22. Gottschalk R, Seidl C, Schilling S, et al. Iron-overload and genotype expression of HFE mutations H63D/C282Y and transferrin receptor *Hin6I* and *BanI* polymorphism in German patients with hereditary haemochromatosis. *Eur J Immunogenet* 2000;27:129–34.
23. Höhler T, Leininger S, Köhler HH, Schirmacher P, Galle PR. Heterozygosity for the hemochromatosis gene in liver diseases – prevalence and effects on liver histology. *Liver* 2000;20:482–6.
24. Hellerbrand C, Bosserhoff AK, Seegers S, et al. Mutation analysis of the HFE gene in German hemochromatosis patients and controls using automated SSCP-based capillary electrophoresis and a new PCR-ELISA technique. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1211–6.
25. Datz C, Lalloz MR, Vogel W, et al. Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic haemochromatosis. *J Hepatol* 1997;27:773–9.
26. Himmelmann A, Bortoluzzi L, Jansen S, Fehr J. Häufigkeit der HFE-Genmutationen und Genotyp-Phänotyp-Beziehungen bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose in der Schweiz. *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130:1112–9.
27. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGe review. *Human Genome Epidemiology*. *Am J Epidemiol* 2001;154:193–206.
28. Uchida T. Overview of iron metabolism. *Int J Hematol* 1995;62:193–202.
29. Testa U. Recent developments in the understanding of iron metabolism. *Hematol J* 2002;3:63–89.
30. Anderson GJ, Powell LW, Halliday JW. Transferrin receptor distribution and regulation in the rat small intestine. Effect of iron stores and erythropoiesis. *Gastroenterology* 1990;98:576–85.
31. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, et al. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2534–9.
32. Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, et al. Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1579–84.
33. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, 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.
34. Roy CN, Penny DM, Feder JN, Enns CA. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem* 1999;274:9022–8.
35. Salter-Cid L, Brunmark A, Li Y, 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.
36. Ikuta K, Fujimoto Y, Suzuki Y, et al. Overexpression of hemochromatosis protein, HFE, alters transferrin recycling process in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Acta* 2000;1496:221–31.
37. Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, et al. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2492–7.
38. Fleming RE, Sly WS. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol* 2002;64:663–80.
39. Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 2002;51:290–5.
40. Bosserhoff AK, Hellerbrand C, Buettner R. Klinische und genetische Aspekte der hereditären Hämochromatose. *Pathologe* 2001;22:191–6.
41. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985;313:1256–62.
42. Yang Q, McDonnell SM, Khoury MJ, Cono J, Parrish RG. Hemochromatosis-associated mortality in the United States from 1979 to 1992: an analysis of multiple-cause mortality data. *Ann Intern Med* 1998;129:946–53.
43. Cauza E, Peck-Radosavljevic M, Ulrich-Pur H, et al. Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003;98:442–7.
44. Roberts AG, Whatley SD, Morgan RR, Worwood M, Elder GH. Increased frequency of the hemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet* 1997;349:321–3.
45. Tannapfel A, Stölzel U, Köstler E, et al. C282Y and H63D mutation of the hemochromatosis gene in German porphyria cutanea tarda patients. *Virchows Arch* 2001;439:1–5.
46. Egger NG, Goeger DE, Payne DA, Miskovsky EP, Weinman SA, Anderson KE. Porphyria cutanea tarda: multiplicity of risk factors including HFE mutations, hepatitis C, and inherited uroporphyrinogen decarboxylase deficiency. *Dig Dis Sci* 2002;47:419–26.
47. Pinsky LE, Imperatore G, Burke W. Diabetes and HFE mutations: cause or coincidence? *West J Med* 2002;176:114–5.
48. Gottschalk R, Neeck G, Wigand R, Vogtherr B, Kaltwasser JP. Die hämochromatotische Arthropathie: eine frühe Manifestation genetischer Hämochromatose. *Z Rheumatol* 1997;56:156–62.
49. Ammann RW, Muller E, Banský J, Schuler G, Hacki WH. High incidence of extrahepatic carcinomas in idiopathic hemochromatosis. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:733–6.
50. Tiniakos G, Williams R. Cirrhotic process, liver cell carcinoma and extrahepatic malignant tumors in idiopathic hemochromatosis. Study of 71 patients treated with venesection therapy. *Appl Pathol* 1988;6:128–38.
51. Fargion S, Mandelli C, Piperno A, et al. Survival and prognostic factors in 212 Italian patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1992;15:655–9.
52. Hsing AW, McLaughlin JK, Olsen JH, Møller M, Wacholder S, Fraumeni JF Jr. Cancer risk following primary hemochromatosis: a population-based cohort study in Denmark. *Int J Cancer* 1995;60:160–2.
53. Bradbear RA, Bain C, Siskind V, et al. Cohort study of internal malignancy in genetic hemochromatosis and other chronic nonalcoholic liver diseases. *J Natl Cancer Inst* 1985;75:81–4.
54. Altes A, Gimferrer E, Capella G, Barcelo MJ, Baiget M. Colorectal cancer and HFE gene mutations. *Haematologica* 1999;84:479–80.
55. Macdonald GA, Tarish J, Whitehall VJ, et al. No evidence of increased risk of colorectal cancer in individuals heterozygous for the Cys282Tyr haemochromatosis mutation. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:1188–91.
56. Shaheen NJ, Silverman LM, Keku T, et al. Association between hemochromatosis (HFE) gene mutation carrier status and the risk of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:154–9.
57. Tuomainen TP, Kontula K, Nyyssönen K, Lakka TA, Helio T, Salonen JT. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation: a prospective cohort study in men in Eastern Finland. *Circulation* 1999;100:1274–9.

58. Roest M, van der Schouw YT, de Valk B, et al. Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular death in women. *Circulation* 1999;100:1268–73.
59. Rasmussen ML, Folsom AR, Catellier DJ, Tsai MY, Garg U, Eckfeldt JH. A prospective study of coronary heart disease and the hemochromatosis gene (*HFE*) C282Y mutation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2001;154:739–46.
60. Bathum L, Christiansen L, Nybo H, et al. Association of mutations in the hemochromatosis gene with shorter life expectancy. *Arch Intern Med* 2001;161:2441–4.
61. Van Aken MO, De Craen AJ, Gussekloo J, et al. No increase in mortality and morbidity among carriers of the C282Y mutation of the hereditary haemochromatosis gene in the oldest old: the Leiden 85-plus study. *Eur J Clin Invest* 2002;32:750–4.
62. Carru C, Pes GM, Deiana L, et al. Association between the HFE mutations and longevity: a study in Sardinian population. *Mech Ageing Dev* 2003;124:529–32.
63. Heimpel H, Riedel M, Wennauer R, Thomas L. Die Plasma-eisenbestimmung – nützlich, unnötig oder irreführend? *Med Klinik* 2003;98:104–7.
64. Costongs GM, Janson PC, Bas BM, Hermans J, van Wersch JW, Brombacher PJ. Short-term and long-term intra-individual variations and critical differences of clinical chemical laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;23:7–16.
65. Dale JC, Burritt MF, Zinsmeister AR. Diurnal variation of serum iron, iron-binding capacity, transferrin saturation, and ferritin levels. *Am J Clin Pathol* 2002;117:802–8.
66. Edwards CQ, Carroll M, Bray P, Cartwright GE. Hereditary hemochromatosis. Diagnosis in siblings and children. *N Engl J Med* 1977;297:7–13.
67. Witte DL, Crosby WH, Edwards CQ, Fairbanks VF, Mitros FA. Practice guideline development task force of the College of American Pathologists. Hereditary hemochromatosis. *Clin Chim Acta* 1996;245:139–200.
68. McLaren CE, McLachlan GJ, Halliday JW, et al. Distribution of transferrin saturation in an Australian population: relevance to the early diagnosis of hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998;114:543–9.
69. Adams PC, Chakrabarti S. Genotypic/phenotypic correlations in genetic hemochromatosis: evolution of diagnostic criteria. *Gastroenterology* 1998;114:319–23.
70. Hickman PE, Hourigan LF, Powell LW, et al. Automated measurement of unsaturated iron binding capacity is an effective screening strategy for C282Y homozygous haemochromatosis. *Gut* 2000;46:405–9.
71. Murtagh LJ, Whitley M, Wilson S, Tran H, Bassett ML. Unsaturated iron binding capacity and transferrin saturation are equally reliable in detection of HFE hemochromatosis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2093–9.
72. Lyon E, Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the *HFE* gene. *Clin Chem* 2001;47:1147–56.
73. Press RD. Hereditary hemochromatosis: impact of molecular and iron-based testing on the diagnosis, treatment, and prevention of a common, chronic disease. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:1053–9.
74. Koziol JA, Ho NJ, Felitti VJ, Beutler E. Reference centiles for serum ferritin and percentage of transferrin saturation, with application to mutations of the *HFE* gene. *Clin Chem* 2001;47:1804–10.
75. McGrath JS, Deugnier Y, Moirand R, Jouanolle AM, Chakrabarti S, Adams PC. A nomogram to predict C282Y hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 2002;140:6–8.
76. Khumalo H, Gomo ZA, Moyo VM, et al. Serum transferrin receptors are decreased in the presence of iron overload. *Clin Chem* 1998;44:40–4.
77. Vernet M, Doyen C. Assessment of iron status with a new fully automated assay for transferrin receptor in human serum. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:437–42.
78. Mullighan CG, Bunce M, Fanning GC, Marshall SE, Welsh KI. A rapid method of haplotyping *HFE* mutations and linkage disequilibrium in a Caucasoid population. *Gut* 1998;42:566–9.
79. Bernard PS, Ajoika RS, Kushner JP, Wittwer CT. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridisation probes. *Am J Pathol* 1998;153:1055–61.
80. Lynas C. A cheaper and more rapid polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for the detection of the HLA-H gene mutations occurring in hereditary hemochromatosis. *Blood* 1997;90:4235–6.
81. Pointon JJ, Wallace D, Merryweather-Clarke AT, Robson KJ. Uncommon mutations and polymorphisms in the hemochromatosis gene. *Genet Test* 2000;4:151–61.
82. Cullen LM, Gao X, Eastale S, Jazwinska EC. The hemochromatosis 845 G/A und 187 C/G mutations: prevalence in non-Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 1998;62:1403–7.
83. Steiner M, Ocran K, Genschel J, et al. A homozygous HFE gene splice site mutation (IVS5+1 G/A) in a hereditary hemochromatosis patient of Vietnamese origin. *Gastroenterology* 2002;122:789–95.
84. Pointon JJ, Viprakasit V, Miles KL, et al. Hemochromatosis gene (*HFE*) mutations in South East Asia: a potential for iron overload. *Blood Cells Mol Dis* 2003;30:302–6.
85. Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, et al. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998;115:929–36.
86. Beaton M, Guyader D, Deugnier Y, Moirand R, Chakrabarti S, Adams P. Noninvasive prediction of cirrhosis in C282Y-linked hemochromatosis. *Hepatology* 2002;36:673–8.
87. Brittenham GM, Badman DG. Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop. *Blood* 2003;101:15–9.
88. Wilson JM, Jungner G. Principles and practice of screening for disease. *Public Health Papers no. 34*. Geneva: World Health Organization, 1968.
89. Grody WW. Molecular genetic risk screening. *Annu Rev Med* 2003;54:473–90.
90. Khoury MJ, McCabe LL, McCabe ER. Population screening in the age of genomic medicine. *N Engl J Med* 2003;348:50–8.
91. Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D, Drummond C, Skolnick MH, Kushner JP. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med* 1988;318:1355–62.
92. Leggett BA, Halliday JW, Brown NN, Bryant S, Powell LW. Prevalence of haemochromatosis amongst asymptomatic Australians. *Br J Haematol* 1990;74:525–30.
93. Cullen LM, Summerville L, Glassick TV, Crawford DH, Powell LW, Jazwinska EC. Neonatal screening for the hemochromatosis defect. *Blood* 1997;90:4236–7.
94. Burt MJ, George PM, Upton JD, et al. The significance of hemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut* 1998;43:830–6.
95. Bradley LA, Johnson DD, Palomaki GE, Haddow JE, Robertson NH, Ferrie RM. Hereditary haemochromatosis mutation frequencies in the general population. *J Med Screen* 1998;5:34–6.
96. McDonnell SM, Hover A, Gloe D, Ou CY, Cogswell ME, Grummett-Straun L. Population-based screening for hemochromatosis using phenotypic and DNA testing among employees of Health Maintenance Organizations in Springfield, Missouri. *Am J Med* 1999;107:30–7.
97. Steinberg KK, Cogswell ME, Chang JC, et al. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the hemochromatosis (*HFE*) gene in the United States. *JAMA* 2001;285:2216–22.

98. Adams PC, Kertesz AE, McLaren CE, Barr R, Bamford A, Chakrabarti S. Population screening for hemochromatosis: a comparison of unbound iron-binding capacity, transferrin saturation, and C282Y genotyping in 5,211 voluntary blood donors. *Hepatology* 2000;31:1160–4.
99. Jackson HA, Carter K, Darke C, et al. *HFE* mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol* 2001;114:474–84.
100. Njajou OT, Houwing-Duistermaat JJ, Osborne RH, et al. A population-based study of the effect of the *HFE* C282Y and H63D mutations on iron metabolism. *Eur J Hum Genet* 2003;11:225–31.
101. Burke W, Thomson E, Khoury MJ, et al. Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population-based screening. *JAMA* 1998;280:172–8.
102. Beaudet AL. 1998 ASHG presidential address. Making genomic medicine a reality. *Am J Hum Genet* 1999;64:1–13.
103. Beutler E. Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. *Blood* 2001;98:2597–602.
104. Haddow JE, Bradley LA. Hereditary haemochromatosis: to screen or not to screen. Conditions are not yet fulfilled. *BMJ* 1999;319:531–2.
105. Allen K, Williamson R. Screening for hereditary haemochromatosis should be implemented now. *BMJ* 2000;320:183–4.
106. Willis G, Fellows IW, Wimperis JZ. Deaths attributed to haemochromatosis are rare in Britain. *BMJ* 2000;320:1146.
107. Willis G, Wimperis JZ, Smith KC, Fellows IW, Jennings BA. Haemochromatosis gene C282Y homozygotes in an elderly male population. *Lancet* 1999;354:221–2.
108. Willis G, Wimperis JZ, Lonsdale R, et al. Incidence of liver disease in people with *HFE* mutations. *Gut* 2000;46:401–4.
109. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845 G/A (C282Y) *HFE* hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211–8.
110. Bradley LA, Haddow JE, Palomaki GE. Population screening for haemochromatosis: a unifying analysis of published intervention trials. *J Med Screen* 1996;3:178–84.
111. Adams P, Brissot P, Powell LW. EASL International Consensus Conference on haemochromatosis. *J Hepatol* 2000;33:485–504.
112. Cox T, Rochette J, Camaschella C, Walker A, Robson K. Clinical haemochromatosis in *HFE* mutation carriers. *Lancet* 2002;360:412.
113. Bassett ML, Wilson SR, Cavanaugh JA. Penetrance of *HFE*-related hemochromatosis in perspective. *Hepatology* 2002;36:500–3.
114. Poullis A, Moodie SJ, Maxwell JD. Clinical haemochromatosis in *HFE* mutation carriers. *Lancet* 2002;360:411–2.
115. Allen KJ, Warner B, Delatycki MB. Clinical haemochromatosis in *HFE* mutation carriers. *Lancet* 2002;360:412–3.
116. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999;15:267–72.
117. Beutler E. The *HFE* Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood* 101:3347–50.
118. Ajioka RS, Kushner JP. Clinical consequences of iron overload in hemochromatosis homozygotes. *Blood* 2003;101:3351–4.
119. Asberg A, Hveem K, Krüger O, Bjerve KS. Persons with screening-detected haemochromatosis: as healthy as the general population? *Scand J Gastroenterol* 2002;37:719–24.
120. McLaren CE, Barton JC, Adams PC, et al. Hemochromatosis and iron overload screening (HEIRS) study design for an evaluation of 100,000 primary care-based adults. *Am J Med Sci* 2003;325:53–62.
121. Altes A, Remacha AF, Sureda A, et al. Patients with biochemical iron overload: causes and characteristics of a cohort of 150 cases. *Ann Hematol* 2003;82:127–30.
122. Niederau C, Strohmeyer G. Strategies for early diagnosis of haemochromatosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:217–21.
123. Moodie SJ, Ang L, Stenner JM, et al. Testing for haemochromatosis in a liver clinic population: relationship between ethnic origin, *HFE* gene mutations, liver histology and serum iron markers. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:223–9.
124. Cadet E, Capron D, Perez AS, et al. A targeted approach significantly increases the identification rate of patients with undiagnosed haemochromatosis. *J Intern Med* 2003;253:217–24.
125. Nelson RL, Persky V, Davis F, Becker E. Risk of disease in siblings of patients with hereditary hemochromatosis. *Digestion* 2001;64:120–4.
126. El-Serag HB, Inadomi JM, Kowdley KV. Screening for hereditary hemochromatosis in siblings and children of affected patients. A cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med* 2000;132:261–9.