

Diplomarbeit

**Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen
Aminosäuren- und Eisenstoffwechsel**

eingereicht von

Thomas Moro

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Klinischen Institut für Medizinische und Chemische

Labordiagnostik

unter der Anleitung von

Priv.-Doz. Dr.med.univ. MBA LL.M. Dietmar Enko

Priv.-Doz. Mag. Dr.scient.med. Andreas Meinitzer

Graz, am 13.04.2020

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 13.04.2020

Thomas Moro eh.

Danksagungen

Zuallererst möchte ich mich speziell bei meinem Betreuer Dietmar Enko bedanken, der mir von der Themenfindung bis zum Abschluss dieser Arbeit stets hilfsbereit mit zahlreichen Tipps, konstruktiven Ratschlägen und größter fachlicher Kompetenz zur Seite stand.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht und mich in allen Entscheidungen unterstützt haben. Einen besonderen Dank auch für die zahlreichen Korrekturlesungen und Änderungsvorschläge, die sie im Rahmen der Diplomarbeit eingebracht haben. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen beiden Brüdern bedanken, die mich während der gesamten Studienzeit stets motiviert und unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Großeltern bedanken. Sie konnten die Fertigstellung dieser Arbeit zwar nicht mehr miterleben, waren mir aber zeitlebens ein großer Rückhalt. Möget ihr in Frieden ruhen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen.....	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Glossar und Abkürzungsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	viii
Zusammenfassung.....	ix
Abstract.....	xi
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Eisenstoffwechsel	1
1.2.1 Eisenfunktion	1
1.2.2 Eisenspeicher	2
1.2.3 Eisenabsorption.....	3
1.2.4 Eisentransport im Blut.....	5
1.2.5 Eisenausscheidung.....	6
1.2.6 Eisenhomöostase	6
1.3 Aminosäuren - Grundlagen	8
1.3.1 Aufbau der Aminosäuren	8
1.3.2 Einteilung der Aminosäuren.....	8
1.3.3 Essentialität der Aminosäuren	10
1.4 Aminosäurestoffwechsel	12
1.4.1 Transaminierung.....	12
1.4.2 Desaminierung	13
1.4.3 Decarboxylierung.....	14
1.4.4 Harnstoffzyklus und Weg des Kohlenstoffgerüsts	14
1.5 Branched-chain amino acids	15
1.5.1 Metabolismus	15
1.5.2 Physiologische Funktionen	17
2 Patienten, Material, Methoden	19
2.1 Studienpopulation	19
2.2 Messung der Laborparameter	19

2.3	Auswertung und Interpretation der Daten	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Analyse der Patientenkohorte	21
3.2	Analyse der Laborparameter	21
3.3	Korrelationsanalyse.....	22
3.4	Regressionsanalyse	30
3.5	Statistische Testung der Aminosäuren bei Eisenmangel	30
3.6	Statistische Testung der Aminosäuren bei Anämie	33
4	Diskussion	36
5	Literaturverzeichnis	40

Glossar und Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µg/dL	Mikrogramm pro Deziliter
µg/L	Mikrogramm pro Liter
µmol/L	Mikromol pro Liter
4E-BP	eukaryotic initiation factor 4E-binding protein
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BCAA	branched-chain amino acid
BCAT	branched-chain amino acid aminotransferase
BCATc	cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase
BCATm	mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase
BCKA	branched-chain alpha-keto acid
BCKD	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase
BMI	Body-Mass-Index
CHr	Retikulozytenhämoglobin
CoA	Coenzym A
CRP	C-reaktives Protein
DMT1	divalenter Metalltransporter-1
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenion
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisenion
fl	Femtoliter
FPN1	Ferroportin-1
g/dl	Gramm pro Deziliter
g/L	Gramm pro Liter
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Hb	Hämoglobin
HCP1	heme carrier protein 1
IL-6	Interleukin-6
IQR	Inter-Quartile-Range
IRE	iron responsive element
IRP	iron responsive protein

kg	Kilogramm
kg/m ²	Kilogramm pro Quadratmeter
m	Meter
Max	Maximum
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
mg/L	Milligramm pro Liter
Min	Minimum
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
MW	Mittelwert
PALP	Pyridoxalphosphat
pg	Pikogramm
Q1	1. Quartil
Q3	3. Quartil
QQ-Diagramm	Quantil-Quantil-Diagramm
rpS6K1	ribosomal protein S6 kinase-1
SD	Standardabweichung
sTfR	löslicher Transferrinrezeptor
TfR1	Transferrin-Rezeptor-1
Tf-TfR1-Komplex	Transferrin-Transferrin-Rezeptor-1-Komplex
TMAO	Trimethylaminoxid
TSAT	Transferrinsättigung
y	Jahre
α	Alpha
β	Beta
β-Koeff.	standardisierter Beta-Koeffizient
γ	Gamma
ρ	Spearman' Korrelationskoeffizient

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Hämoglobin	2
Abbildung 2: Eisenresorption	4
Abbildung 3: Einfluss und Regulation von Heparin	7
Abbildung 4: Aufbau einer Aminosäure	8
Abbildung 5: Einteilung der Aminosäuren.....	9
Abbildung 6: Reaktionen der ALT und AST	13
Abbildung 7: Chemische Struktur der BCAAs.....	15
Abbildung 8: Katabolismus der BCAAs	17
Abbildung 9: Korrelationsanalyse Hb und Valin ($\rho = 0,382$).....	24
Abbildung 10: Korrelationsanalyse Hb und Leucin ($\rho = 0,350$)	24
Abbildung 11: Korrelationsanalyse Hb und Isoleucin ($\rho = 0,244$)	25
Abbildung 12: Korrelationsanalyse Hb und BCAAs ($\rho = 0,369$)	25
Abbildung 13: Korrelationsanalyse Ferritin und Valin ($\rho = 0,313$)	26
Abbildung 14: Korrelationsanalyse Ferritin und Leucin ($\rho = 0,262$).....	26
Abbildung 15: Korrelationsanalyse Ferritin und Isoleucin ($\rho = 0,183$)	27
Abbildung 16: Korrelationsanalyse Ferritin und BCAAs ($\rho = 0,289$).....	27
Abbildung 17: Korrelationsanalyse sTfR und Valin ($\rho = 0,152$).....	28
Abbildung 18: Korrelationsanalyse sTfR und Leucin ($\rho = 0,146$)	28
Abbildung 19: Korrelationsanalyse sTfR und Isoleucin ($\rho = 0,157$).....	29
Abbildung 20: Korrelationsanalyse sTfR und BCAAs ($\rho = 0,170$)	29
Abbildung 21: Konzentration von Valin anhand des Eisenstatus	32
Abbildung 22: Konzentration von Leucin anhand des Eisenstatus	32
Abbildung 23: Konzentration der BCAAs anhand des Eisenstatus	33
Abbildung 24: Konzentration von Valin anhand des Anämiestatus	35
Abbildung 25: Konzentration der BCAAs anhand des Anämiestatus	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Essentialität der Aminosäuren	11
Tabelle 2: Alter, Körpergröße, Gewicht und BMI der Patientenkohorte	21
Tabelle 3: Parameteranalyse der Patientenkohorte.....	22
Tabelle 4: Spearman-Rangkorrelationskoeffizient zwischen den Eisenparametern und den BCAAs	23
Tabelle 5: Univariate lineare Regressionsmodelle für Hb, Ferritin und sTfR.....	30
Tabelle 6: Konzentration der Aminosäureparameter anhand des Eisenstatus.....	31
Tabelle 7: Konzentration der Aminosäureparameter anhand des Anämiestatus...	34

Zusammenfassung

Hintergrund: Die branched-chain amino acids (BCAAs) Valin, Leucin und Isoleucin gehören zu den essentiellen Aminosäuren und erfüllen im menschlichen Körper eine Reihe an wichtigen Funktionen. Studien berichten derzeit auch über einen Einfluss der BCAAs auf die Erythropoese und den Eisenhaushalt. Allerdings fehlen noch größere Studienkohorten, bei welchen eine breite Palette an Laborwerten des Eisenstatus und die BCAAs gemessen wurden. Das Ziel dieser Arbeit ist die Erforschung möglicher Zusammenhänge zwischen den Blutkonzentrationen der BCAAs Valin, Leucin und Isoleucin und den Parametern des Eisenstoffwechsels.

Material und Methoden: Insgesamt wurden 430 Patientinnen und Patienten im Rahmen einer ambulanten Gesundheitsuntersuchung in die Studie eingeschlossen. In dieser Studienpopulation wurden die Blutkonzentrationen der Eisenparameter Hämoglobin (Hb), Ferritin, Transferrin, mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH), freies Eisen, Transferrinsättigung (TSAT), löslicher Transferrinrezeptor (sTfR), Retikulozytenhämoglobin (CHr) als auch die BCAAs Valin, Leucin und Isoleucin gemessen. Anschließend erfolgten eine Korrelations- sowie Regressionsanalyse zwischen den Eisenparametern und den BCAA-Werten. Weiters wurden die Konzentrationen der BCAAs von anämischen Personen mit denen von nicht-anämischen Personen verglichen und statistisch getestet. Auf diese Weise wurden auch die BCAA-Spiegel zwischen Personen mit Eisenmangel und ohne Eisenmangel untersucht.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass Hb, Ferritin und sTfR statistisch signifikant positiv mit allen drei BCAAs korrelierten. Die anschließend durchgeführte Regressionsanalyse stellte signifikant positive Effekte der BCAAs auf die Blutkonzentrationen von Hb und Ferritin fest. Somit waren niedrige BCAA-Werte mit niedrigen Blutspiegeln dieser Eisenbiomarker assoziiert. Des Weiteren wiesen Patientinnen und Patienten mit Anämie signifikant niedrigere BCAA-Werte verglichen mit Individuen ohne Anämie auf. Ebenso besaßen Personen mit Eisenmangel signifikant niedrigere BCAA-Konzentrationen verglichen mit Individuen ohne Eisenmangel.

Konklusion: Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Eisenstoffwechsel und dem BCAA-Metabolismus hin. Es sind

jedoch weitere Studien nötig, um ein besseres Verständnis über die genauen pathophysiologischen Vorgänge dieses beobachteten Zusammenhangs zu erlangen.

Abstract

Background: The branched-chain amino acids (BCAAs) valine, leucine and isoleucine are essential amino acids and fulfill a range of important functions in the human body. A limited number of studies reported that these amino acids have an impact on erythropoiesis and iron metabolism. However, large study cohorts, which comprise a broad spectrum of biomarkers of the iron status and the BCAAs, are still lacking. The aim of this thesis was the investigation of possible links between the blood levels of the BCAAs valine, leucine and isoleucine and the parameters of the human iron metabolism.

Methods: In total, 430 outpatients were included in the study due to a medical health check-up. In this study population the blood concentrations of the iron biomarkers hemoglobin, ferritin, transferrin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), serum iron, transferrin saturation (TSAT), soluble transferrin receptor (sTfR), reticulocyte hemoglobin content (CHr) as well as the BCAAs parameters valine, leucine and isoleucine were measured. Correlation and univariate regression analyses were carried out between these iron parameters and the BCAA concentrations. Moreover, the BCAA blood levels of anemic patients were compared with those of non-anemic individuals. In addition, the BCAA blood concentrations were investigated in the same manner between individuals with and without iron deficiency.

Results: The iron parameters hemoglobin, ferritin and sTfR showed a statistically significant positive correlation with all three BCAAs. The regression analysis demonstrated significant positive effects of the BCAAs on the blood levels of hemoglobin and ferritin. Low BCAA values were associated with low blood concentrations of these iron biomarkers. Furthermore, patients with anemia had significant lower BCAA values compared to individuals without anemia. Similarly, individuals with iron deficiency had significant lower BCAA levels compared to those without iron deficiency.

Conclusion: The results of this work suggest a possible link between the BCAA and the iron metabolism. However, further studies are necessary to obtain a better

understanding about the exact pathophysiological processes of this observed association.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Aminosäuren sind wichtige Bausteine für die Synthese von Proteinen im menschlichen Körper. Die branched-chain amino acids (BCAAs) Valin, Leucin und Isoleucin zählen zur Gruppe der essentiellen Aminosäuren und sind vor allem bei Kraftsportlern als Nahrungsergänzungsmittel für den Muskelaufbau bekannt. Die BCAAs, die auch verzweigtkettige Aminosäuren genannt werden, zeichnen sich durch einen einzigartigen Metabolismus aus (1). Insbesondere Leucin gilt zudem als potenter Aktivator des mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) (2). Dieser Multiproteinkomplex spielt über nachgeschaltete Signalkaskaden eine Schlüsselrolle in der Regulation von Proteintranslation, Gentranskription und Autophagie (2).

Ein möglicher Einfluss der BCAAs und des mTORC1 auf den Eisenstoffwechsel ist bisher kaum erforscht. Vereinzelt berichten Studien über mögliche Effekte der verzweigtkettigen Aminosäuren auf hämatologische Parameter, wie beispielsweise Hb, freies Serumeisen, Hämatokrit oder Erythrozytenzahl (3-5). Es fehlen jedoch noch Arbeiten mit großen Studienpopulationen, die diesen Kontext genauer untersuchen. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist auch von klinischer Bedeutung, denn weltweit leiden ca. zwei Milliarden Menschen an einem Eisenmangel bzw. einer Eisenmangelanämie und das, obwohl sich die Diagnostik und Behandlung dieser Mangelzustände in den letzten Jahrzehnten stark verbessert hat (6).

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen dem BCAA-Metabolismus und dem Eisenstoffwechsel durch Messung der Blutkonzentrationen der BCAAs und einem breiten Portfolio an Eisenparametern in einer großen Studienkohorte zu untersuchen.

1.2 Eisenstoffwechsel

1.2.1 Eisenfunktion

Eisen ist für den Menschen ein unverzichtbares Element, das eine Vielzahl von Aufgaben im Körper erfüllt. Bekannt ist es vor allem als zentraler Bestandteil des Porphyrinrings in Hb und Myoglobin, welche für den Sauerstofftransport im Blut bzw.

Muskel verantwortlich sind (6). Eine weitere wichtige Rolle spielt Eisen als Katalysator von Redoxreaktionen, da es sowohl Elektronen aufnehmen, als auch abgeben kann. Eisen fördert aber zugleich die Bildung freier Radikale, die Zellen und DNA beschädigen können. Aus diesem Grund unterliegt der Eisenhaushalt einer ständigen Regulation (7).

1.2.2 Eisenspeicher

Ca. 75% des sich im Körper befindlichen Eisens sind in Hb bzw. 5% in Myoglobin eingebaut. Die restlichen 20% entfallen auf intrazelluläres Ferritin bzw. Hämosiderin, welche vorwiegend in Leber, sowie im Knochenmark und Monozyten-Makrophagen-System gespeichert sind (6). Ca. 0,2% des Gesamteisens sind an Transferrin gebunden (8).

Hämoglobin: Hb besteht aus vier Untereinheiten, welche jeweils aus einer Hämgruppe und einer Globinkette bestehen. Die Hämgruppe bildet ein Protoporphyrinring mit einem Eisenatom, welches Sauerstoff reversibel bindet (6,9). Dadurch kann jedes Hb-Molekül insgesamt vier Sauerstoffatome aufnehmen. Die Globinketten des adulten Hb setzen sich jeweils aus zwei alpha- und zwei beta-Ketten zusammen (10).

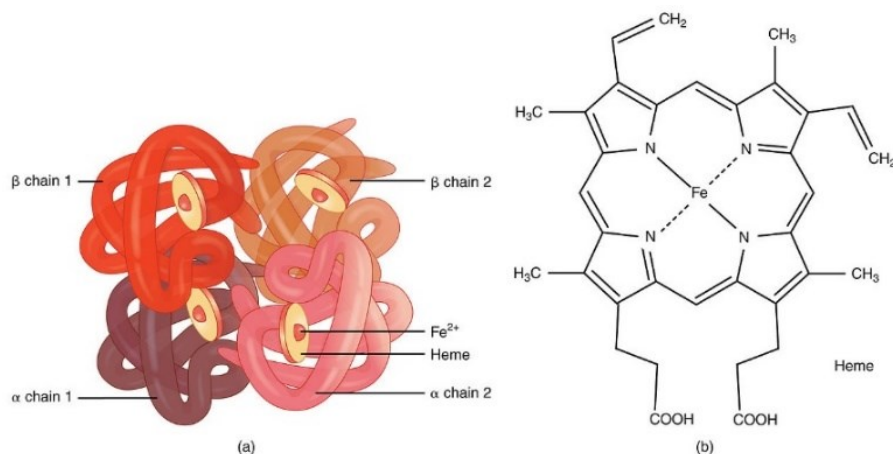


Abbildung 1: Struktur von Hämoglobin (11)

Quelle: Betts et al., *Anatomy and Physiology*, S. 794. Available at: <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>. Accessed Dec 13, 2019.

Ferritin: Ferritin ist das Hauptspeicherprotein für Eisen im menschlichen Körper und ist sowohl intra- als auch extrazellulär im Blutplasma anzutreffen (12). Ein einzelnes Ferritinmolekül besteht aus einer schützenden Proteinhülle und einem Hohlraum mit Eisenkern, der bis zu 4000 – 4500 Eisenatome fassen kann (13). Die Aufnahme von Eisen ins Ferritin erfolgt durch Kanäle in der Proteinhülle. Anschließend werden zweiwertige Eisenionen (Fe^{2+}) an Hämoxygenase-Zentren zu dreiwertigen Eisenionen (Fe^{3+}) oxidiert und nach Mineralisation als Eisenkern gespeichert (14). Das gespeicherte Eisen kann nach Reduktion in Fe^{2+} auch wieder aus Ferritin freigesetzt werden (6).

Hämosiderin: Hämosiderin macht im Gegensatz zu Ferritin nur einen sehr kleinen Anteil des intrazellulären Eisenspeichers aus (15). Es entsteht durch Speicherung des Ferritins in den Lysosomen der Makrophagen und bewahrt den Körper im Falle einer Eisenüberladung vor den toxischen Effekten des Eisens (15,16).

1.2.3 Eisenabsorption

Täglich werden ca. 1 – 2 mg Eisen aus der Nahrung aufgenommen. Diese Menge entspricht dem täglichen Eisenbedarf. Eisen liegt in der Nahrung in zwei verschiedenen Formen vor: Häm-Eisen und Nicht-Häm-Eisen (6). Beide Formen werden vorwiegend im Duodenum und im oberen Abschnitt des Jejunums resorbiert (17). Häm-Eisen, das vor allem als Hb in Fleisch oder Fisch vorkommt, macht in der Ernährung der westlichen Welt ca. 10% aus, ist aber aufgrund der besseren Bioverfügbarkeit für zwei Drittel des resorbierten Eisens verantwortlich (17,18). Nicht-Häm-Eisen, das hauptsächlich in Getreide, Hülsenfrüchten, Gemüse und Früchten enthalten ist, weist einen viel höheren Anteil in der Ernährung auf, verfügt aber über eine schlechtere Resorption als Häm-Eisen (17).

Nicht-Häm-Eisen liegt im Darm vorwiegend als Fe^{3+} vor. Weil der Dünndarm nur zweiwertiges Nicht-Häm-Eisen aufnehmen kann, wird Fe^{3+} an der Oberfläche des Bürstensaums des Darms durch die Ferrireduktase Duodenales Cytochrom B in Fe^{2+} reduziert. Natürliche Antioxidantien der Nahrung, wie z.B. Ascorbinsäure oder die Aminosäuren Cystein und Histidin unterstützen die Reduktion (19). Schließlich

wird Fe^{2+} durch den divalenten Metalltransporter-1 (DMT1) in den Enterozyten aufgenommen und kann dort einerseits als Fe^{3+} in Ferritin gespeichert werden oder ins Blut abgegeben werden (6). Bei Zweitem wird Fe^{2+} über das Eisentransportprotein Ferroportin-1 (FPN1), welches an der basolateralen Membran der Enterozyten lokalisiert ist, aus den Enterozyten ausgeschleust. Gleichzeitig reoxidieren die Ferrooxidasen Hephaestin und Coeruloplasmin Fe^{2+} zu Fe^{3+} , das schließlich ins Blut an Transferrin abgegeben wird (17).

Die Resorption von Häm-Eisen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich wird Häm-Eisen durch heme carrier protein 1 (HCP1) aufgenommen und das darin enthaltene Fe^{3+} durch Hämoxigenasen vom Häm getrennt und zu Fe^{2+} reduziert. Danach wird das Eisen wie im Nicht-Häm-Kreislauf durch Hephaestin wieder oxidiert und entweder in Ferritin gespeichert oder durch FPN1 ausgeschleust (20).

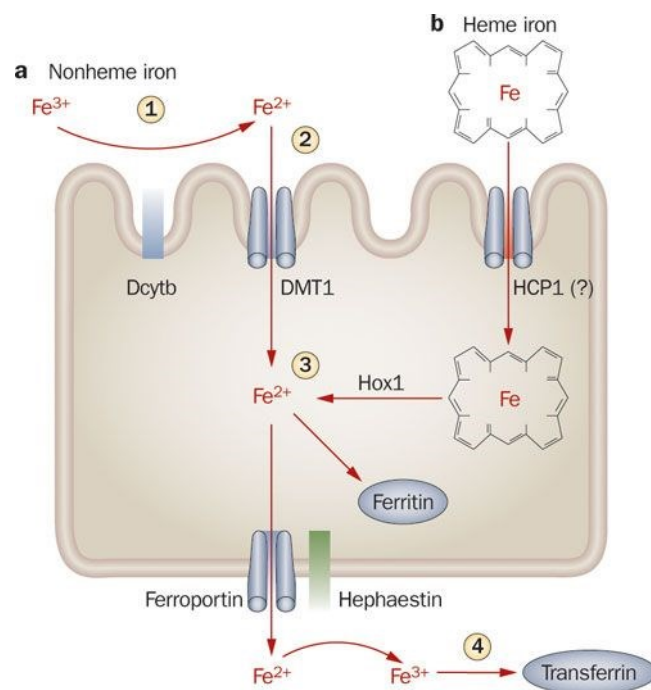


Abbildung 2: Eisenresorption (21)

Quelle: Stein et al., *Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD*, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, S. 601.

(Dcytb = Duodenal cytochrome B, Hox1 = Heme oxygenase 1)

1.2.4 Eisentransport im Blut

Transferrin: Verantwortlich für den Transport von Eisen im Blut ist das Glykoprotein Transferrin (22). Es wird in der Leber gebildet und besitzt zwei Strukturäste, an denen es jeweils ein Fe^{3+} binden kann. Lediglich 30% des Transferrins sind mit Eisen vollständig gesättigt, der Rest dient dem Abpuffern erhöhter Eisenkonzentrationen im Blut (23). Damit die Körperzellen das Eisen aus dem Blut aufnehmen können, geht das mit Eisen beladene Transferrin, auch Holo-Transferrin genannt, eine Verbindung mit dem auf Zelloberflächen exprimierten Transferrin-Rezeptor-1 (TfR1) ein (24).

Transferrin-Rezeptor-1: Der TfR1 kommt vor allem als transmembranes Glykoprotein auf blutzellbildenden Stammzellen im Knochenmark vor. Diese benötigen Eisen für die Hb-Synthese. Der TfR1 fungiert hier als Rezeptor für Transferrin (6,25). Nach der Bindung von Transferrin an den TfR1 wird der Transferrin-Transferrin-Rezeptor-1-Komplex (Tf-TfR1-Komplex) durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Anschließend wird das enthaltende Eisen durch den niedrigeren pH-Wert im Endosom aus dem Komplex in die Zelle freigesetzt. Der nun eisenfreie Tf-TfR1-Komplex gelangt zurück an die Zelloberfläche und das ungesättigte Transferrin, auch häufig als Apo-Transferrin bezeichnet, wird zurück ins Blut abgegeben (23).

Haptoglobin: Haptoglobin ist ein Akut-Phase-Protein, das hauptsächlich in der Leber gebildet wird und freies Hb (Häm) von lysierten Erythrozyten im Blut bindet (26). Der Hb-Haptoglobin-Komplex wird hauptsächlich von Kupfer-Zellen und Makrophagen der Leber durch den CD163-Rezeptor erkannt und aufgenommen (27). Das Eisen der Häm-Gruppe wird mithilfe von Hämoxigenasen abgespalten und in Ferritin gespeichert (26).

Damit hemmt Haptoglobin durch Recycling des Häms die Bildung von O_2 -Radikalen, die vor allem zu Schädigungen an den Nieren führen würden. Weiters ist Haptoglobin im klinischen Alltag als Routine-Laborwert zur Bestimmung einer Hämolyse etabliert (28).

1.2.5 Eisenausscheidung

Der menschliche Körper verfügt über keine Möglichkeit Eisen aktiv in größeren Mengen aus dem Körper auszuscheiden (29). Man verliert lediglich ca. 1 mg Eisen pro Tag durch Abschilferung von Epithelzellen der Haut, sowie des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts. Damit kein Eisenmangel entsteht, muss genau diese verlorene Eisenmenge täglich über die Nahrung wieder zugeführt werden (6). Frauen haben aufgrund der Monatsblutung, welche die häufigste Ursache eines Eisenmangels beim weiblichen Geschlecht darstellt, einen höheren Eisenverlust als Männer (17).

1.2.6 Eisenhomöostase

Da der Körper nur begrenzte Möglichkeiten hat Eisen zu verwerten, ist eine genaue Regulation des Eisens erforderlich (17). Grundsätzlich wird zwischen der zellulären und systemischen Eisenregulation unterschieden.

Zellulär: Die zellulären Hauptregulatoren sind die iron responsive proteins (IRPs), die durch Bindung an iron responsive elements (IREs) der messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) die Expression von TfR1, Ferritin, DMT1 und FPN1 beeinflussen (15,30). Je nach Lokalisation an der mRNA können sie die Translation der Zielproteine sowohl hemmen, als auch durch Stabilisierung der mRNA steigern (31).

Bei Eisenmangel in der Zelle sorgt die Bindung der IRPs an die IREs für eine gesteigerte Synthese von DMT1 und TfR1. Weiters kommt es auch zu einer Verminderung der Expression von Ferritin und FPN1. Das bewirkt einerseits eine vermehrte Eisenaufnahme in die Zelle (DMT1, TfR1), andererseits eine verminderte Speicherung (Ferritin) bzw. einen verminderten Eisenexport (FPN1) aus der Zelle (32).

Bei hohen intrazellulären Eisenkonzentrationen lösen sich die IRP/IRE-RNA-Komplexe voneinander ab und die Bildung von DMT1 und TfR1 wird gehemmt bzw. die Synthese von Ferritin und FPN1 gesteigert. Die Folge ist ein verminderter Eisenimport in die Zelle und eine gesteigerte Speicherung bzw. ein erhöhter Eisenausfluss aus der Zelle (32).

Systemisch: Das in der Leber gebildete Peptidhormon Hepcidin reguliert den systemischen Eisenhaushalt im Körper, indem es je nach Eisenkonzentration vermehrt oder vermindert gebildet wird (33,34). Wenn die Eisenspiegel im Blut steigen, bindet somit mehr Hepcidin an den Transporter FPN1, der vor allem an Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten zahlreich exprimiert wird (34). Dadurch wird der Eisenexporteur FPN1 anschließend in den Lysosomen abgebaut und infolgedessen der Übergang von Eisen ins Blut gehemmt (35,36). Damit sind die Eisenabsorption aus dem Darm und die Freisetzung von Speichereisen aus Leber und Makrophagen ins Blut blockiert (36). Neben Eisenüberladung führt auch Inflammation zu einer Erhöhung der Hepcidinproduktion (35). Folglich können chronische Entzündungen durch die permanent erhöhten Hepcidinwerte eine Anämie verursachen (37).

Umgekehrt wird bei niedriger Eisenkonzentration weniger Hepcidin gebildet, wodurch mehr Eisen aus Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten in die Blut-zirkulation freigesetzt wird (33). Neben niedriger Eisenspiegel stellen sowohl eine Anämie als auch eine Hypoxie weitere wichtige Suppressoren der Hepcidinregulation dar (35). Vor allem Anämien wirken stark supprimierend, weil der Körper aufgrund der gesteigerten Erythropoese auf mehr Eisen angewiesen ist (35,36).

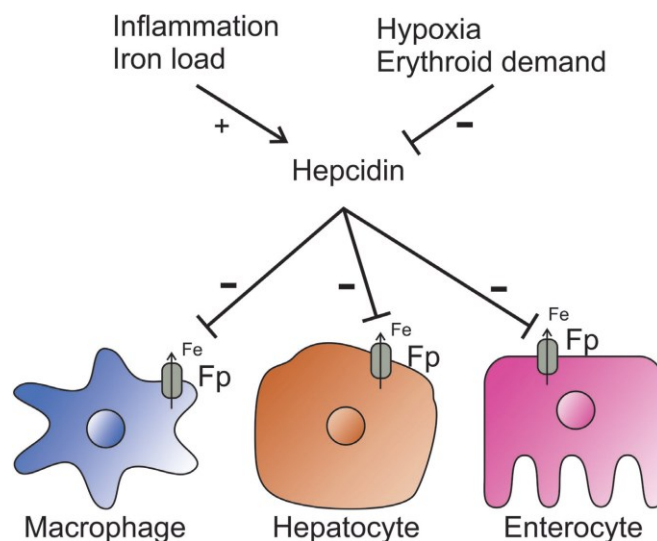


Abbildung 3: Einfluss und Regulation von Hepcidin (38)

Quelle: Miseta et al., *Hepcidin and its potential clinical utility*, *Cell Biology International*, S. 1192.

1.3 Aminosäuren - Grundlagen

Es wurden mittlerweile schon mehr als 300 Aminosäuren entdeckt, aber lediglich 20 werden für die Proteinsynthese in unserem Körper benötigt (39). Diese sogenannten proteinogenen Aminosäuren sind sowohl die Bausteine für die Protein- und Enzymbildung als auch die Gerüstbildner für stickstoffhaltige Verbindungen, wie Zytochrome, Häm, Hormone, Neurotransmitter und Nucleotide. Zugleich sind sie auch für den Energiehaushalt von wichtiger Bedeutung. Einerseits kann durch ihren Metabolismus Energie gewonnen werden, andererseits kann das Kohlenstoffgerüst zur Synthese von Glukose bzw. Fettsäuren herangezogen werden (40).

1.3.1 Aufbau der Aminosäuren

Chemisch betrachtet handelt es sich bei Aminosäuren um Aminocarbonsäuren (41). Jede Aminosäure besteht aus einem zentralem α -Kohlenstoffatom (42). Daran gebunden sind eine Carboxylgruppe (COOH), eine Aminogruppe (NH₂), ein Wasserstoffatom (H) und eine Seitenkette, die auch als Rest (R) bezeichnet wird. Die einzelnen Aminosäuren unterscheiden sich lediglich durch die Struktur ihrer Seitenketten, die zugleich für die verschiedenen chemischen Eigenschaften der Aminosäuren verantwortlich sind (43).

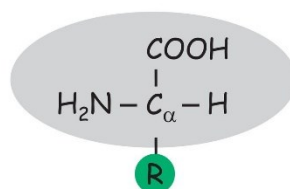


Abbildung 4: Aufbau einer Aminosäure (modifiziert nach (42))

Quelle: In Anlehnung an Horn, Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium, S. 64.

1.3.2 Einteilung der Aminosäuren

Aminosäuren können nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden. Die gebräuchlichste Einteilung erfolgt anhand ihrer funktionellen Eigenschaften (42).

Demnach unterscheidet man vier Gruppen: neutral apolare, neutral polare, saure und basische Aminosäuren (41).

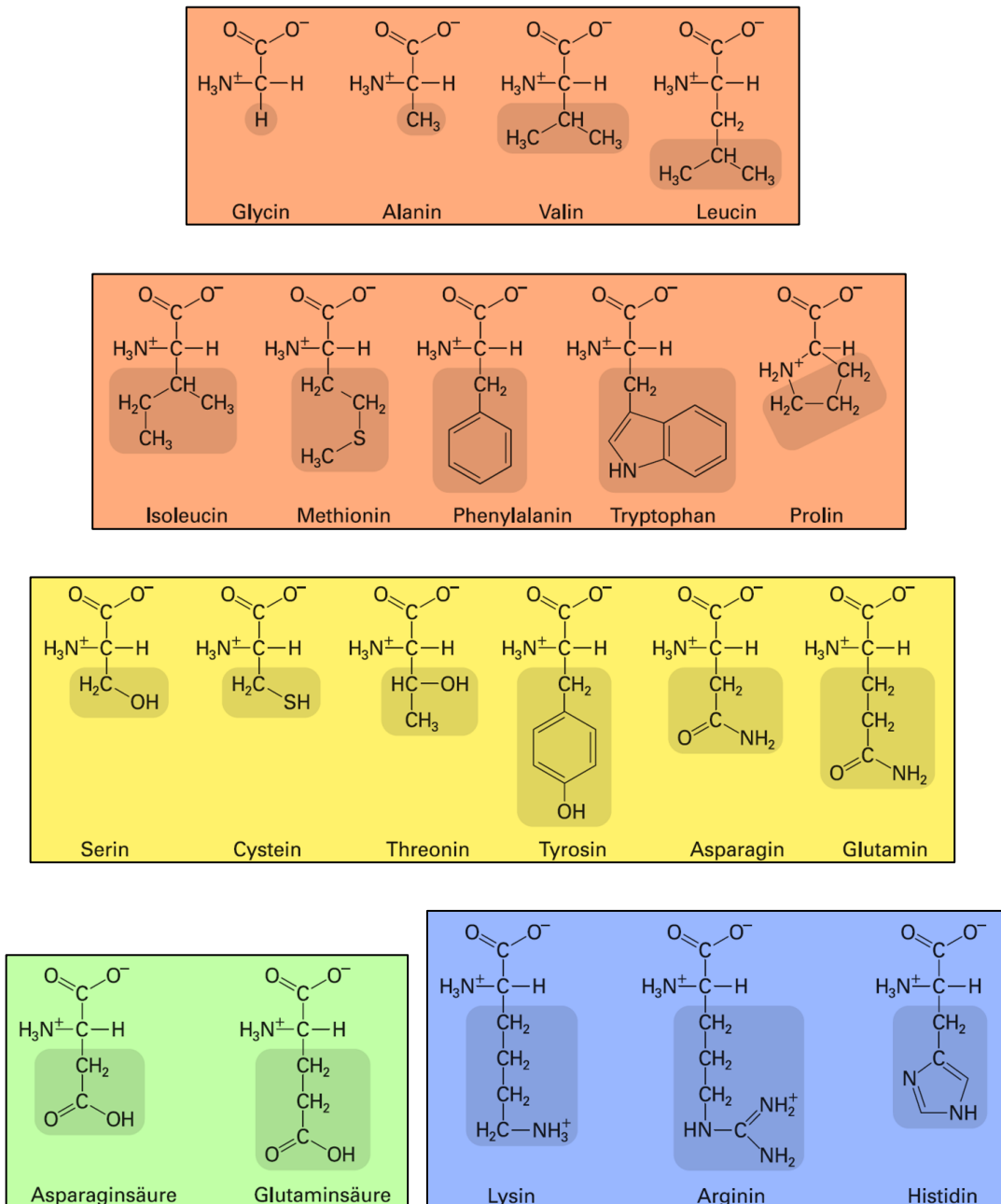


Abbildung 5: Einteilung der Aminosäuren mit neutral apolaren (rot), neutral polaren (gelb), sauren (grün) und basischen (blau) Seitenketten (modifiziert nach (41))

Quelle: In Anlehnung an Wachter et al., Chemie in der Medizin, S. 308-309.

Andere Einteilungen sind jedoch ebenfalls sehr verbreitet. Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan werden aufgrund ihrer zyklischen Seitenkette öfters auch als aromatische Aminosäuren bezeichnet. Außerdem werden Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin wegen ihrer lipophilen Seitenkette häufig den aliphatischen Aminosäuren zugeteilt (42). Zusätzlich können Valin, Leucin und Isoleucin aufgrund des gemeinsamen Verzweigungspunktes ihrer Seitenkette auch als verzweigtkettige Aminosäuren (branched-chain amino acids) klassifiziert werden (44). Cystein und Methionin werden infolge ihres Schwefelatoms auch als schwefelhaltige Aminosäuren bezeichnet (42).

1.3.3 Essentialität der Aminosäuren

Acht der 20 proteinogenen Aminosäuren zählen zu den essentiellen Aminosäuren, weil der Körper nicht in der Lage ist sie selbst zu synthetisieren. Deshalb müssen Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Threonin und Lysin über die Nahrung aufgenommen werden (42). Weiters findet man in der Literatur auch noch den Begriff der bedingt essentiellen Aminosäuren, welche vom Körper normalerweise in ausreichenden Mengen hergestellt werden können, aber in Zeiten gesteigerten Bedarfs, wie beispielsweise Schwangerschaft oder Wachstum, essentiell werden (39,42). Dieser Gruppe gehören Histidin und Arginin an (42).

Die Aminosäuren Cystein und Tyrosin nehmen eine besondere Stellung ein, da sie eigentlich zu den nicht essentiellen Aminosäuren gehören, aber für ihre Synthese auf essentielle Aminosäuren angewiesen sind (42). Wenn nämlich Methionin und Phenylalanin nicht vorhanden sind, werden auch Tyrosin und Cystein essentiell, wodurch sie gelegentlich auch als semi-essentiell bezeichnet werden (42,45). Nicht essentielle Aminosäuren können vom Organismus in ausreichenden Mengen selbst hergestellt werden. Es gilt jedoch zu beachten, dass alle proteinogenen Aminosäuren sowie ihre Metaboliten für eine normale Zellphysiologie und -funktion nötig sind (39).

Tabelle 1: Essentialität der Aminosäuren

Essentiell	Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Threonin, Lysin
Nicht essentiell	Glycin, Alanin, Prolin, Serin, Asparagin, Glutamin, Glutamat, Aspartat
Bedingt essentiell	Histidin, Arginin
Semi-essentiell	Tyrosin, Cystein

1.4 Aminosäurestoffwechsel

Aminosäuren werden im menschlichen Körper ständig synthetisiert, umgewandelt und abgebaut. Dafür stehen folgende chemische Reaktionen zur Verfügung: Transaminierung, Desaminierung und Decarboxylierung (46). Die Decarboxylierung sorgt durch Entfernung der Carboxylgruppe der Aminosäure für die Bildung biogener Amine. Transaminierung und Desaminierung leiten meist den Abbau der betroffenen Aminosäure ein und haben die Übertragung bzw. Entfernung der Aminogruppe zum Ziel. Am Ende des Abbaus stehen die Ausscheidung des überschüssigen Stickstoffs sowie die Energiegewinnung aus dem verbleibenden Kohlenstoffgerüst der entsprechenden Aminosäure im Mittelpunkt (47).

1.4.1 Transaminierung

Die Transaminierung von Aminosäuren erfolgt durch Transaminasen, die auch als Aminotransferasen bezeichnet werden. Dabei wird die Aminogruppe der Aminosäure abgespalten und auf eine α -Ketosäure übertragen. Aus der ursprünglichen α -Ketosäure wird somit die dazugehörige Aminosäure gebildet und die ursprüngliche Aminosäure wird zur α -Ketosäure abgebaut. Pyridoxalphosphat (PALP), die aktive Form des Vitamin B₆, fungiert bei der Transaminierungsreaktion als wichtiges Coenzym (47). Auf diese Weise ist der Körper in der Lage, fast alle Aminosäuren ineinander umzuwandeln. Die Aminosäure, die durch diesen Reaktionsvorgang am häufigsten gebildet wird, ist Glutamat. Das lässt sich dadurch erklären, dass α -Ketoglutarat die meisten Aminogruppen im Rahmen von Transaminierungsreaktionen aufnimmt (46).

Prinzipiell besitzt jede Aminosäure, die durch Transaminierung umgewandelt bzw. abgebaut werden kann, eine spezifische Aminotransferase. Die zwei wohl bekanntesten Vertreter sind die Alanin-Aminotransferase (ALT) und die Aspartat-Aminotransferase (AST) (47). Diese beiden Enzyme katalysieren die in Abbildung 6 beschriebenen Reaktionen.

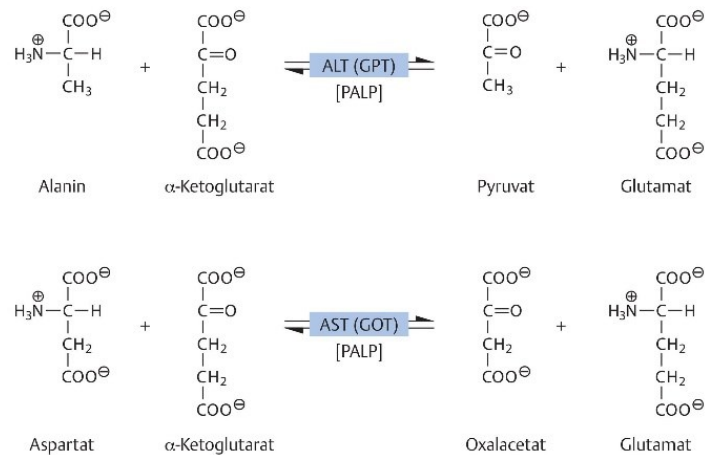


Abbildung 6: Reaktionen der ALT und AST (47)

Quelle: Königshoff et al., Kurzlehrbuch Biochemie, S. 104.

1.4.2 Desaminierung

Bei der Desaminierung wird die Aminogruppe von einer Aminosäure entfernt, jedoch in weiterer Folge nicht auf ein anderes Molekül übertragen. Dadurch kommt es zur Bildung freien Ammoniaks, welcher durch den Harnstoffzyklus in Harnstoff umgewandelt wird. Es gibt drei Arten der Desaminierung (46).

Oxidative Desaminierung: Im Rahmen der oxidativen Desaminierung wird die Aminogruppe der Aminosäure zuerst oxidiert, wodurch eine Imino-Gruppe entsteht. Die Imino-Gruppe wird nachfolgend hydrolytisch abgespalten und es entsteht die dazugehörige α -Ketosäure (46). Glutamat ist die einzige Aminosäure, die im menschlichen Körper durch oxidative Desaminierung abgebaut wird. Das Enzym, welches hierbei die Reaktion katalysiert, ist die Glutamatdehydrogenase (47). Im Organismus entsteht durch Transaminierungsprozesse derart viel Glutamat, dass die oxidative Desaminierung die wichtigste der drei Abbauarten darstellt (46).

Hydrolytische Desaminierung: Hier erfolgt die Desaminierung durch die hydrolytische Abspaltung der Aminogruppen aus den Carbonsäureamidbindungen (CONH_2) der Aminosäureseitenketten. Da nur zwei Aminosäuren solche Bindungen in ihrer Seitenkette besitzen, können ausschließlich Glutamin und Asparagin auf diese Weise abgebaut werden. Glutamin, dessen Abbau durch das Enzym Glutaminase katalysiert wird, weist die höchste Blutkonzentration aller Aminosäuren im

menschlichen Organismus auf und gilt somit als wichtiger Ammoniaktransporteur des Blutes (47).

Eliminierende Desaminierung: Die eliminierende Desaminierung ist die seltenste Desaminierungsform und spielt eine eher untergeordnete Rolle. Hierbei wird NH_3 von einer Aminosäure abgespalten, wodurch die zugehörige α -Ketosäure mit einer Doppelbindung zurückbleibt (46).

1.4.3 Decarboxylierung

Die Decarboxylierung wird durch Aminosäuredecarboxylasen katalysiert. Diese spalten die Carboxylgruppe der Aminosäure im Beisein von PALP ab und bilden in weiterer Folge ein biogenes Amin. Wichtige Vertreter dieser Stoffgruppe sind u.a. die γ -Aminobuttersäure (GABA), Histamin, Dopamin und Serotonin (47).

1.4.4 Harnstoffzyklus und Weg des Kohlenstoffgerüsts

Der Harnstoffzyklus stellt die wichtigste Entgiftungs- bzw. Entsorgungsmöglichkeit von Ammoniak und überschüssigem Stickstoff aus Aminogruppen beim Menschen dar. Dieser besteht aus mehreren enzymatischen Schritten, die einzig in der Leber vollständig ablaufen. Das Endprodukt des Zyklus ist Harnstoff, der aus den Substraten Ammoniak, Bikarbonat und Aspartat gebildet wird (48).

Das verbliebene Kohlenstoffskelett der Aminosäure wird zur Energiegewinnung weiterverarbeitet. Die Abbauprodukte der Aminosäuren können durch Zuführung in den Citratzyklus zu Wasser und Kohlenstoffdioxid abgebaut werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das Kohlenstoffgerüst der Aminosäure zur Gluconeogenese oder Lipogenese genutzt wird (47). Sogenannte glucogene Aminosäuren können zu Glukose und ketogene Aminosäuren zu Ketonkörpern bzw. Fettsäuren umgebaut werden. Die einzigen rein ketogenen Aminosäuren sind Leucin und Lysin. Manche Aminosäuren, beispielsweise Isoleucin, haben sowohl glucogene, als auch ketogene Abbauprodukte (49).

1.5 Branched-chain amino acids

Die branched-chain amino acids (BCAAs) Valin, Leucin und Isoleucin besitzen aliphatische Seitenketten, die einen Verzweigungspunkt aufweisen (siehe Abbildung 7) (44). Durch diese Eigenschaft werden sie in der deutschen Sprache auch als verzweigt-kettige Aminosäuren bezeichnet. Sie zählen zu den essentiellen Aminosäuren und müssen deshalb über die Nahrung aufgenommen werden. Sie machen ca. 35 – 40% der essentiellen Aminosäuren des Körperproteins aus und haben im Muskel einen Anteil von 14% gemessen an allen Aminosäuren (50). In der Nahrung machen sie ca. 20 – 25% der Proteine aus und sind vorwiegend in Fleisch, Fisch, Milchprodukten und Eiern enthalten (51,52).

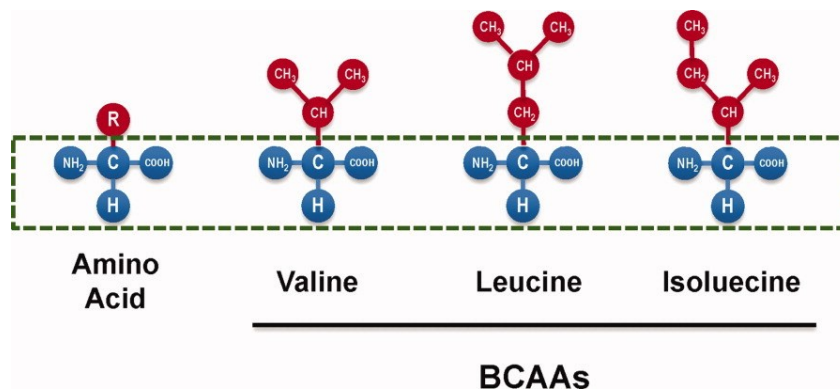


Abbildung 7: Chemische Struktur der BCAAs (44)

Quelle: Kawaguchi et al., *Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease*, *Hepatology*, S. 1064.

Die Hauptfunktion der drei proteinogenen Aminosäuren besteht in der Synthese von Proteinen. In der jüngeren Vergangenheit wurden aber weitere wichtige physiologische Funktionen entdeckt (53). Im nachfolgenden Teil der Arbeit wird aber zunächst näher auf den Stoffwechsel der verzweigt-kettigen Aminosäuren eingegangen, da sich dieser wesentlich vom Metabolismus anderer Aminosäuren unterscheidet.

1.5.1 Metabolismus

Die ersten zwei Schritte des Abbaus der BCAAs sind für Valin, Leucin und Isoleucin gleich (53). Das Enzym, welches den Katabolismus einleitet, ist die branched-chain

amino acid aminotransferase (BCAT). Die erste Reaktion findet im Gegensatz zu allen anderen Aminosäuren nicht in der Leber, sondern in den Muskeln statt, da dort die Aktivität des Enzyms viel höher ist (1). Darum steigt die BCAA-Konzentration nach der Nahrungsaufnahme im Blut schnell an und die Aminosäuren sind unmittelbar für den Metabolismus im Muskel verfügbar (54). Dieser Umstand macht die Verstoffwechslung der BCAAs einzigartig (1).

Es gibt zwei Isoformen der BCAT: Die mitochondriale BCAT (BCATm), welche so gut wie in jedem Gewebe des Körpers verteilt ist, und die zytosolische BCAT (BCATc), welche nur im Hirngewebe vorzufinden ist (55). Jedenfalls katalysiert die BCAT den reversiblen Transfer der Aminogruppe der BCAAs zu α -Ketoglutarat, wodurch die Aminosäure Glutamat gebildet wird. Aus den verzweigtkettigen Aminosäuren entstehen durch die Transaminierung die dazugehörigen α -Ketosäuren (BCKAs): α -Ketoisocaproat (\rightarrow Leucin), α -Keto- β -Methylvalerat (\rightarrow Isoleucin) und α -Ketoisovalerat (\rightarrow Valin). Das neu gebildete Glutamat ist ein Aminogruppenspender für Pyruvat zur Synthese von Alanin oder wird als Substrat zu Glutamin transaminiert (54). Demzufolge sind die BCAAs wichtige Stickstoffquellen für Alanin, Glutamat und Glutamin (56).

Beim zweiten Schritt katalysiert der branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase-Komplex (BCKD-Komplex) die irreversible, oxidative Decarboxylierung der BCKAs (57). Der mitochondriale BCKD-Komplex ist ein Enzymkomplex, der aus drei Untergruppen besteht: E1, E2 und E3. Der Komplex wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Die BCKD-Kinase führt zur Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung des Komplexes. Die BCKD-Phosphatase dephosphoryliert den Komplex mit anschließender Aktivierung desselben (58). Im Menschen hat der Komplex die größte Aktivität in Niere, Leber, Gehirn und Herz (57).

Die Produkte der Reaktion des BCKD-Komplexes sind verzweigtkettige Acyl-CoA-Derivate: Leucin ist ketogen und wird zu Acetoacetat bzw. Acetyl-CoA abgebaut, Valin ist glucogen und wird zu Succinyl-CoA katabolisiert und aus dem sowohl ketogenen, als auch glucogenen Isoleucin wird Acetyl-CoA bzw. Succinyl-CoA synthetisiert (59,60). In weiterer Folge werden die Endprodukte entweder im Tricarbonsäurezyklus zur Energiegewinnung weiterverarbeitet oder zur Lipo- bzw. Gluconeogenese herangezogen (60).

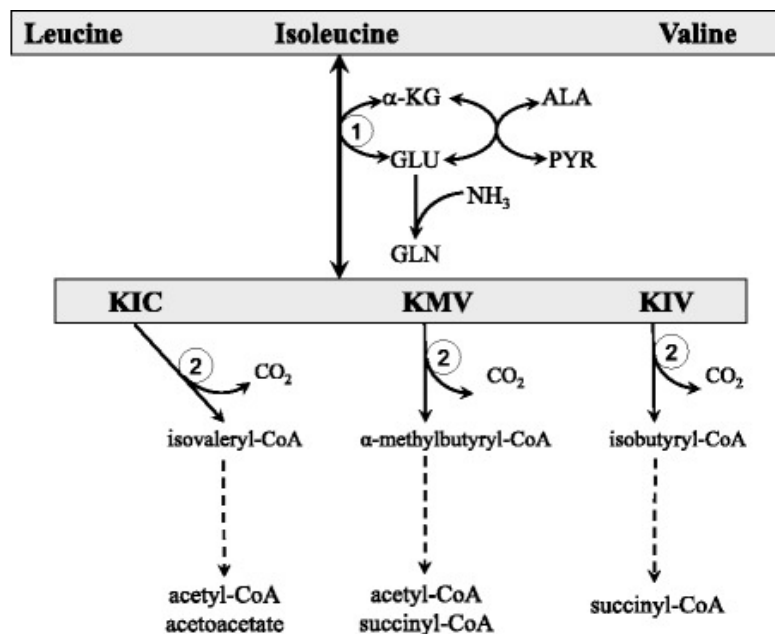


Abbildung 8: Katabolismus der BCAAs (modifiziert nach (54))

Quelle: In Anlehnung an Holecek, *Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements*, Nutrition & Metabolism, S. 2.

(α -KG = α -ketoglutarate, ALA = alanine, GLU = glutamate, GLN = glutamine, PYR = pyruvate, KIC = α -ketoisocaproate, KMV = α -keto- β -methylvalerate, KIV = α -ketoisovalerate, α -KG = α -ketoglutarate, 1 = BCAT, 2 = BCKD)

1.5.2 Physiologische Funktionen

Proteinbiosynthese: Die Hauptfunktion der BCAAs als Bausubstrat stellt die Synthese von Proteinen dar (53). Durch ihre hydrophoben Eigenschaften spielen sie ebenfalls eine besonders wichtige Rolle bei der Bildung von globulären Proteinen bzw. Membranproteinen. Die Hydrophobie der verzweigtkettigen Aminosäuren erhöht einerseits die Stabilität der gefalteten Proteine, andererseits schafft sie ein nichtwässriges Milieu. Dieses Milieu ist, beispielsweise bei der Bindung von Sauerstoff an Hb bzw. Myoglobin oder bei der Katalyse von Enzymen, bedeutend (52).

mTORC-Aktivierung: Neben der Synthese von Proteinen beeinflussen die BCAAs maßgeblich die Regulation von Signalwegen des Proteinmetabolismus. Insbesondere Leucin ist dabei durch Aktivierung des mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) von entscheidender Bedeutung (61). Der Multiproteinkomplex

mTORC1 ist der Hauptregulator für Zellwachstum, indem er Translation, Ribosomenbildung und Autophagie beeinflusst (62). Der aktivierte mTOR1-Komplex phosphoryliert eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins (4E-BPs) und die ribosomale Protein-S6-Kinase-1 (rpS6K1) (2). Beide Substrate werden durch die Phosphorylierung wiederum stimuliert und steigern u.a. die Translation von mRNA, die für Ribosomen und Transkriptionsfaktoren codiert ist, sowie die Bindung von Ribosomen an die mRNA (61,62). Damit sind die BCAAs, allen voran Leucin, durch Aktivierung von mTORC1 wichtige Stimulatoren der Proteinsynthese (53).

Neben der Rolle als zentraler Regulator der Proteinsynthese ist mTORC1 auch ein wichtiger Signalvermittler zwischen Aminosäuren und Insulin. Die Aktivierung von mTORC1 sorgt über eine Signalkaskade für den Abbau von Insulin-Rezeptor-Substrat-1. Dieser Mechanismus wird als eine der möglichen Ursachen für die Bildung einer Insulinresistenz bei erhöhten BCAA-Spiegeln diskutiert (63).

2 Patienten, Material, Methoden

2.1 Studienpopulation

In den Jahren 2015 – 2017 wurden bei insgesamt 430 ambulanten Patientinnen und Patienten die Aminosäure- und Eisenstoffwechselfparameter im Blut im Rahmen einer Pilotstudie am Landeskrankenhaus Steyr bestimmt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Teilnehmerinnen und Teilnehmern eingeholt. Die Speicherung der Daten erfolgte in pseudoanonymisierter Form. Neben den Eisen- und Aminosäureparametern wurden einige weitere Laborwerte (CRP, IL-6, TMAO...), welche in dieser Arbeit aber nicht berücksichtigt worden sind, bestimmt.

Einschlusskriterien waren ein Mindestalter von 15 Jahren und eine Nüchternphase bzw. Rauchkarenz von mindestens 12 Stunden vor der Blutabnahme. Jene Probandinnen und Probanden bei denen Blutparameter fehlten oder die eine Eisensubstitution in den letzten 12 Monaten erhielten, wurden von der Studie ausgeschlossen.

2.2 Messung der Laborparameter

Die Abnahme der nüchternen Blutproben erfolgte zwischen 8:00 und 10:00 Uhr vormittags. Die Blutkonzentrationen von Hb, MCV und MCH wurde photometrisch mit dem ADVIA® 2120i Hematology System (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) gemessen. Die Bestimmung der Retikulozyten und des CHr erfolgte durch Laserlichtstreuungsmessung nach isovolumetrischer Sphärierung von Oxazin 750-gefärbten Retikulozyten mit dem ADVIA® 2120i Hematology System.

Die Messung des Serumferritins wurde mit einem homogenen Sandwich-Chemilumineszenz-Immunoassay-Verfahren mithilfe des Dimension Vista® 1500-Systems (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) durchgeführt. Die Bestimmung des Serumeisens erfolgte durch eine bichromatische Endpunkt-Technik-Photometrie mit dem Dimension Vista® 1500-System. Transferrin wurde ebenso photometrisch mit diesem System bestimmt. Die Berechnung von TSAT erfolgte mit folgender Formel: $TSAT (\%) = \text{Serumeisen} (\mu\text{g/dL}) \times 70,9 / \text{Transferrin} (\text{mg/dL})$. Eine nephelometrische Messung zur Bestimmung vom sTfR wurde mit dem Dimension Vista® 1500-System (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH) durchgeführt. Der Ferritinindex

wurde mit folgender Formel berechnet: Ferritinindex = sTfR (mg/L) / log Ferritin ($\mu\text{g/L}$).

Zur Bestimmung der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin wurden chromatografische Methoden angewandt. Nach der Ausfällung des Serums mit Perchlorsäure und der Neutralisation des Überstandes mit Natriumcarbonat wurden die extrahierten Aminosäuren mit Ophthalaldehyd derivatisiert. Anschließend wurden die einzelnen kurzkettigen Aminosäuren mit einer Umkehrphasensäule durch Gradientenelution getrennt und durch die Verhältnisse der Fluoreszenzsignale zum internen Standard Norvalin quantifiziert.

2.3 Auswertung und Interpretation der Daten

Die statistische Auswertung der Patientenkohorte erfolgte mit IBM SPSS Statistics 25 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA). Zuerst erfolgte eine demografische Beschreibung der Patientenkohorte mittels einer explorativen Datenanalyse, um Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen, etc. zu ermitteln. Die Normalverteilung wurde sowohl graphisch durch Quantil-Quantil-Diagramme (QQ-Diagramme), als auch durch den Kolmogorow-Smirnow-Normalverteilungstest ermittelt ($p < 0,05$). Nicht normalverteilte Parameter wurden mit dem Median und dem Inter-Quartile-Range (IQR: 1. und 3. Quartile) dargestellt. Das Konfidenzintervall wurde bei allen Messungen auf 95% festgelegt und ein p-Wert von unter 0,05 als signifikant gewertet.

Da bis auf freies Eisen alle Eisen- bzw. Aminosäureparameter nicht normalverteilt waren, wurde der Spearman' Korrelationskoeffizient (ρ) zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen den Eisen- und Aminosäureparametern berechnet. Die signifikanten Korrelationen wurden mittels Streudiagrammen dargestellt. Nachfolgend wurden die abhängigen Variablen Hb, Ferritin und sTfR mithilfe einer univariaten linearen Regressionsanalyse aus den unabhängigen Variablen Valin, Isoleucin, Leucin und der Gesamtkonzentration der BCAAs berechnet.

Weiters wurde mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben untersucht, ob sich die Aminosäurekonzentrationen zwischen anämischen und

nicht-anämischen Patientinnen und Patienten statistisch unterscheiden. Mit derselben Vorgehensweise wurde auch überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen Personen mit und ohne Eisenmangel vorhanden sind.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Patientenkohorte

Von den insgesamt 430 Patientinnen und Patienten wurden 429 für die statistische Auswertung herangezogen. Eine Person wurde aufgrund eines nicht plausiblen BMI-Wertes (BMI = 7) ausgeschlossen. Der Mittelwert des Alters der Studienpopulation betrug $40,7 \pm 15,5$ Jahre. Insgesamt 289 Personen waren weiblich (67,4%) und 140 Personen männlich (32,6%). Minimum (Min), Median, Maximum (Max), Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) von Alter, Körpergröße, Gewicht und BMI der Patientenkohorte sind in der folgenden Tabelle veranschaulicht.

Tabelle 2: Alter, Körpergröße, Gewicht und BMI der Patientenkohorte

	Min	Median	Max	MW	SD
Alter (y)	15	39	82	40,7	15,5
Körpergröße (m)	1,39	1,69	1,98	1,7	0,09
Gewicht (kg)	39	71	149	73	16,9
BMI (kg/m²)	15	24,2	49	25,2	5,1

3.2 Analyse der Laborparameter

Die Eisen- und BCAA-Parameter wurden mittels QQ-Diagramm und dem Kolmogorow-Smirnow-Normalverteilungstest auf Normalverteilung überprüft. Bis auf freies Eisen waren alle übrigen Studienparameter nicht normalverteilt. Der Median und der IQR aller Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3: Parameteranalyse der Patientenkohorte

	Median (Q1 – Q3)
Hb (g/dl)	13,9 (13,3 – 14,7)
MCV (fl)	86,1 (83,3 – 88,5)
MCH (pg)	29,7 (28,7 – 30,6)
Ferritin (µg/L)	58,0 (27,5 – 105,5)
TSAT (%)	27,0 (20,0 – 35,0)
Eisen (µg/dL)	101,0 (76,0 – 128,0)
Transferrin (g/L)	2,6 (2,4 – 3,0)
sTfR (mg/L)	1,1 (1,0 – 1,3)
Ferritinindex	0,6 (0,5 – 0,8)
CHr (pg)	31,3 (30,2 – 32,3)
Valin (µmol/L)	198,6 (179,1 – 224,7)
Leucin (µmol/L)	118,3 (101,1 – 137,1)
Isoleucin (µmol/L)	56,3 (48,8 – 66,4)
BCAAs (µmol/L)	372,3 (331,2 – 426,5)

3.3 Korrelationsanalyse

Um das Maß der Stärke des Zusammenhanges zwischen den Eisen- und Aminosäureparametern zu ermitteln, wurde eine Spearman-Korrelationsanalyse durchgeführt. Es wurden signifikant positive Korrelationen zwischen Hb, Ferritin und sTfR mit Valin, Leucin, Isoleucin und der Gesamtkonzentration der BCAAs festgestellt. Das bedeutet, je höher die Konzentration der genannten Aminosäuren ist, desto höher ist die Konzentration der genannten Eisenparameter im Blut. Weiters korrelierten MCH, Eisen und TSAT schwach negativ mit Isoleucin. Zusätzlich gab es eine

signifikant schwach positive Korrelation zwischen TSAT und Valin. Die Korrelationskoeffizienten (ρ) und p-Werte der einzelnen Parameter sind in der folgenden Tabelle angeführt.

Tabelle 4: Spearman-Rangkorrelationskoeffizient zwischen den Eisenparametern und den BCAAs

	Valin	Leucin	Isoleucin	BCAAs
Hb	ρ : 0,382* p-Wert: <0,001	ρ : 0,350* p-Wert: <0,001	ρ : 0,244* p-Wert: <0,001	ρ : 0,369* p-Wert: <0,001
MCV	ρ : -0,045 p-Wert: 0,349	ρ : -0,009 p-Wert: 0,857	ρ : -0,057 p-Wert: 0,236	ρ : -0,029 p-Wert: 0,548
MCH	ρ : -0,048 p-Wert: 0,326	ρ : -0,085 p-Wert: 0,078	ρ : -0,171* p-Wert: <0,001	ρ : -0,092 p-Wert: 0,057
Ferritin	ρ : 0,313* p-Wert: <0,001	ρ : 0,262* p-Wert: <0,001	ρ : 0,183* p-Wert: <0,001	ρ : 0,289* p-Wert: <0,001
TSAT	ρ : 0,100* p-Wert: 0,038	ρ : 0,071 p-Wert: 0,143	ρ : -0,098* p-Wert: 0,043	ρ : 0,056 p-Wert: 0,247
Eisen	ρ : 0,068 p-Wert: 0,159	ρ : 0,058 p-Wert: 0,230	ρ : -0,139* p-Wert: 0,004	ρ : 0,027 p-Wert: 0,574
Transferrin	ρ : -0,069 p-Wert: 0,155	ρ : -0,048 p-Wert: 0,321	ρ : -0,063 p-Wert: 0,189	ρ : -0,066 p-Wert: 0,171
sTfR	ρ : 0,152* p-Wert: 0,002	ρ : 0,146* p-Wert: 0,002	ρ : 0,157* p-Wert: 0,001	ρ : 0,170* p-Wert: <0,001
Ferritin-index	ρ : -0,088 p-Wert: 0,070	ρ : -0,071 p-Wert: 0,140	ρ : -0,006 p-Wert: 0,899	ρ : -0,064 p-Wert: 0,184
CHr	ρ : 0,031 p-Wert: 0,523	ρ : 0,032 p-Wert: 0,508	ρ : -0,003 p-Wert: 0,951	ρ : 0,029 p-Wert: 0,552

*p-Wert < 0,05

Die signifikanten Korrelationen von Hb, Ferritin und sTfR mit Valin, Leucin, Isoleucin und der Gesamtkonzentration der BCAAs wurden in Streudiagrammen inklusive der Regressionsgeraden graphisch dargestellt.

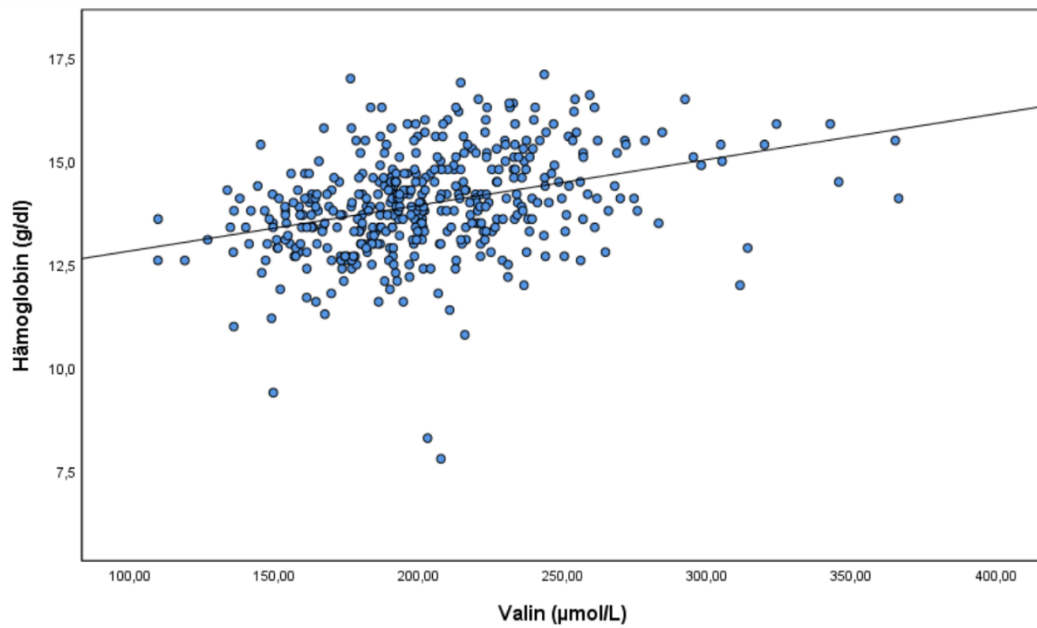


Abbildung 9: Korrelationsanalyse Hb und Valin ($\rho = 0,382$)

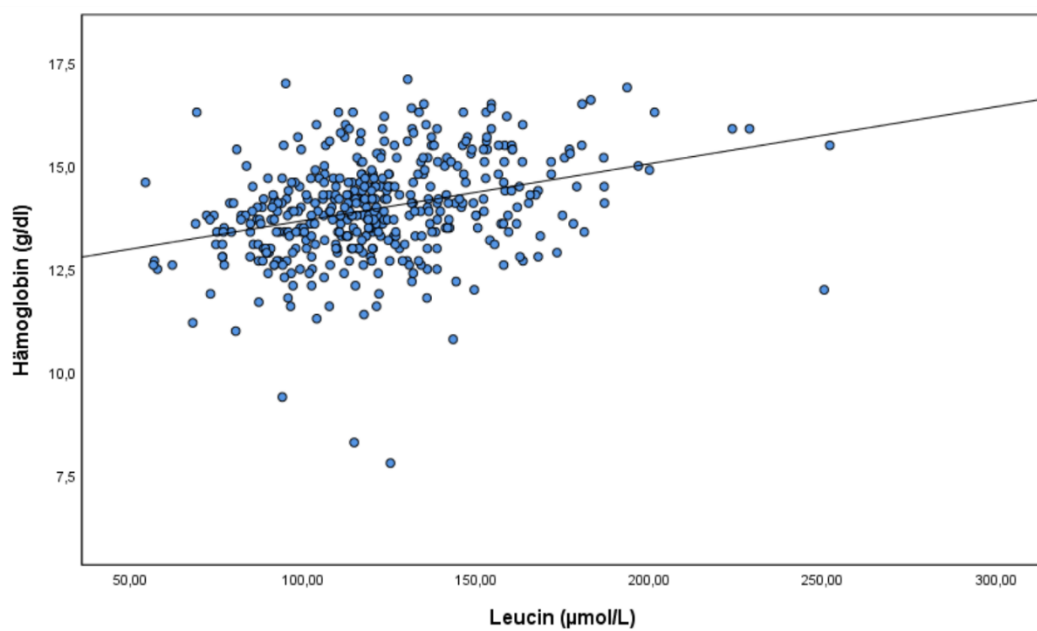


Abbildung 10: Korrelationsanalyse Hb und Leucin ($\rho = 0,350$)

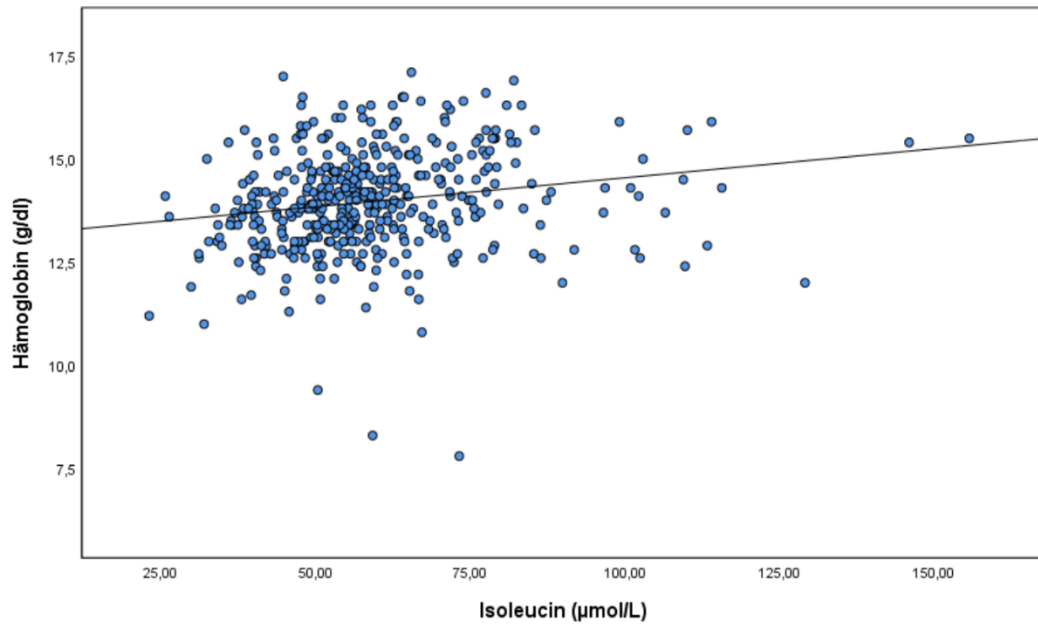


Abbildung 11: Korrelationsanalyse Hb und Isoleucin ($\rho = 0,244$)

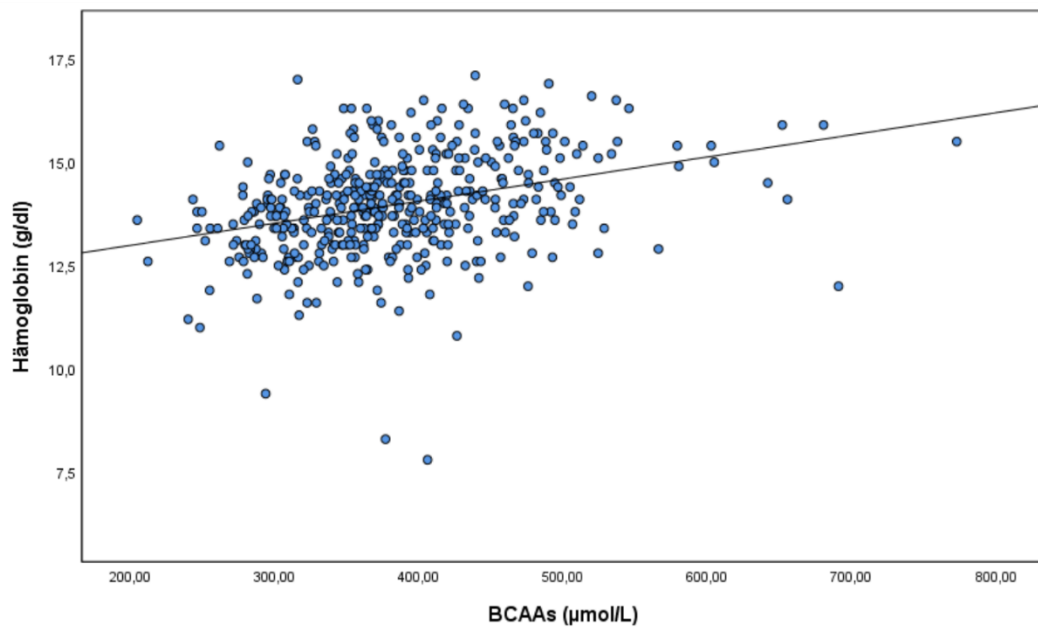


Abbildung 12: Korrelationsanalyse Hb und BCAAs ($\rho = 0,369$)

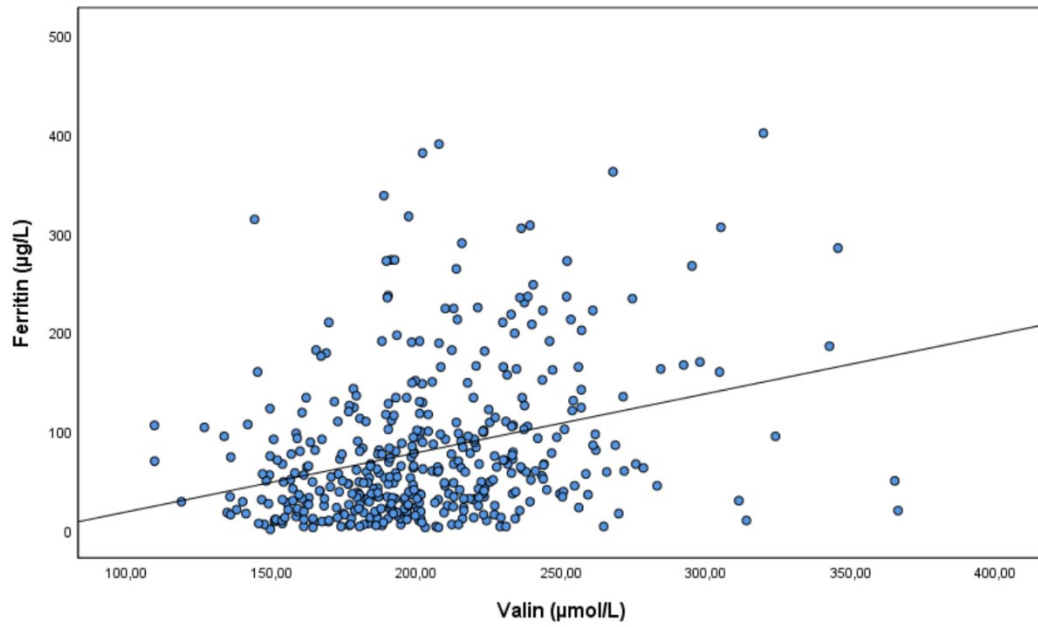


Abbildung 13: Korrelationsanalyse Ferritin und Valin ($\rho = 0,313$)

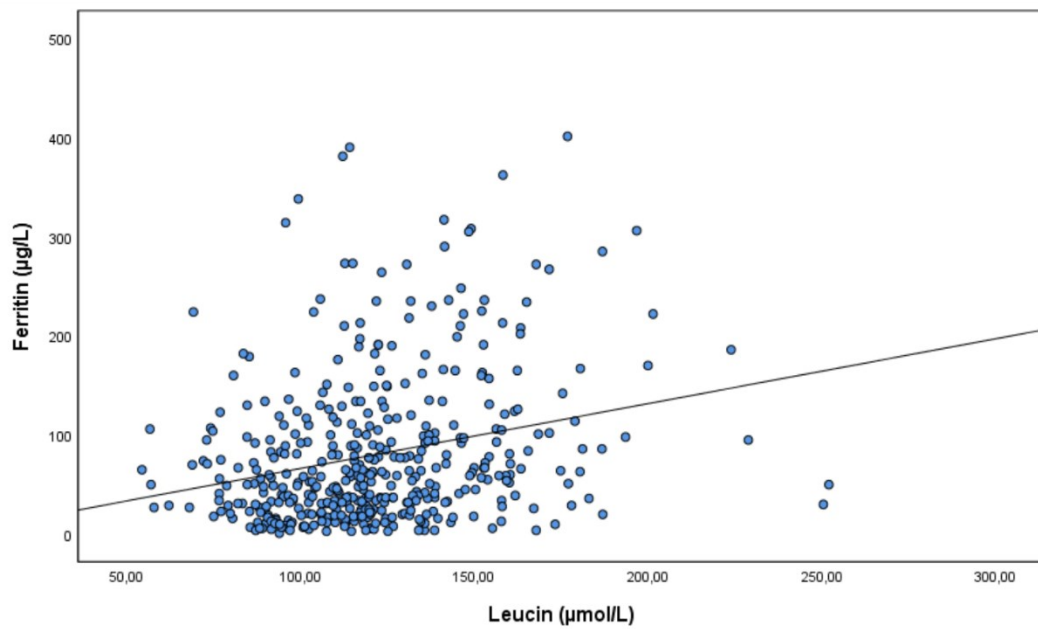


Abbildung 14: Korrelationsanalyse Ferritin und Leucin ($\rho = 0,262$)

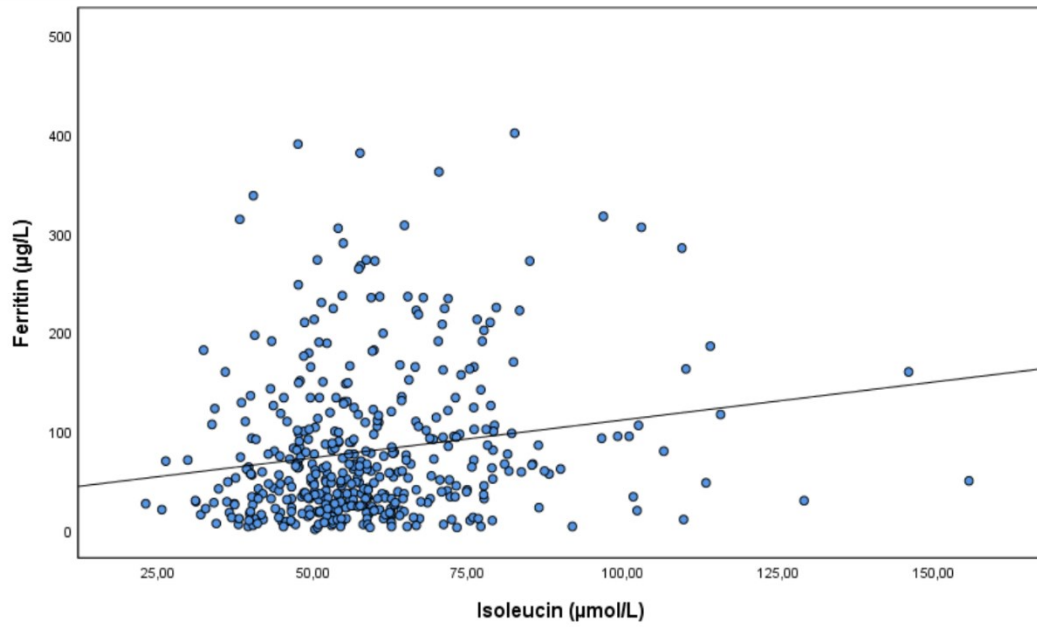


Abbildung 15: Korrelationsanalyse Ferritin und Isoleucin ($\rho = 0,183$)

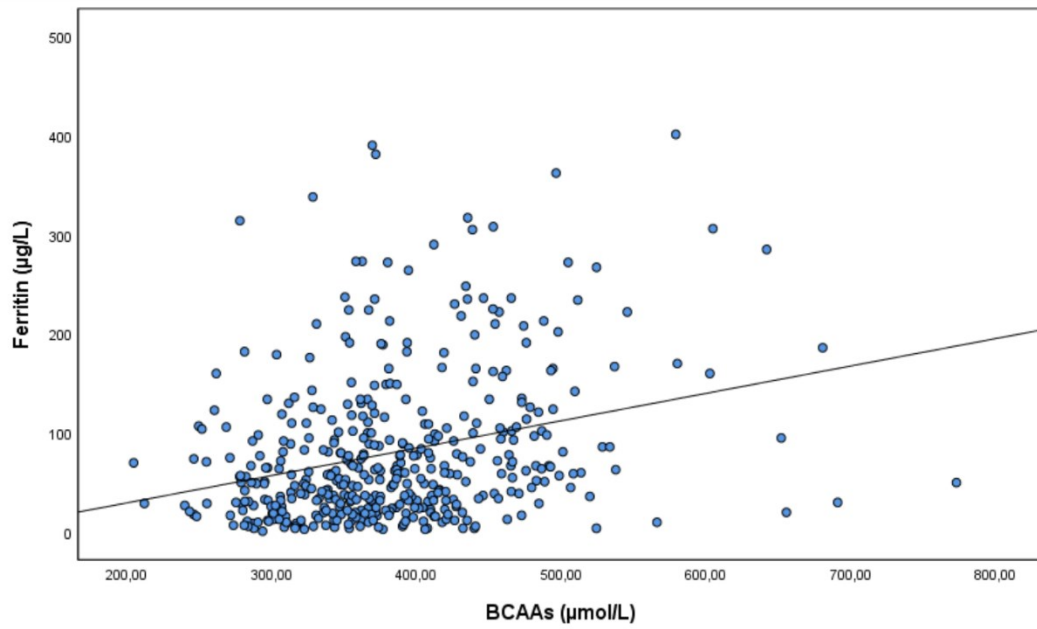


Abbildung 16: Korrelationsanalyse Ferritin und BCAAs ($\rho = 0,289$)

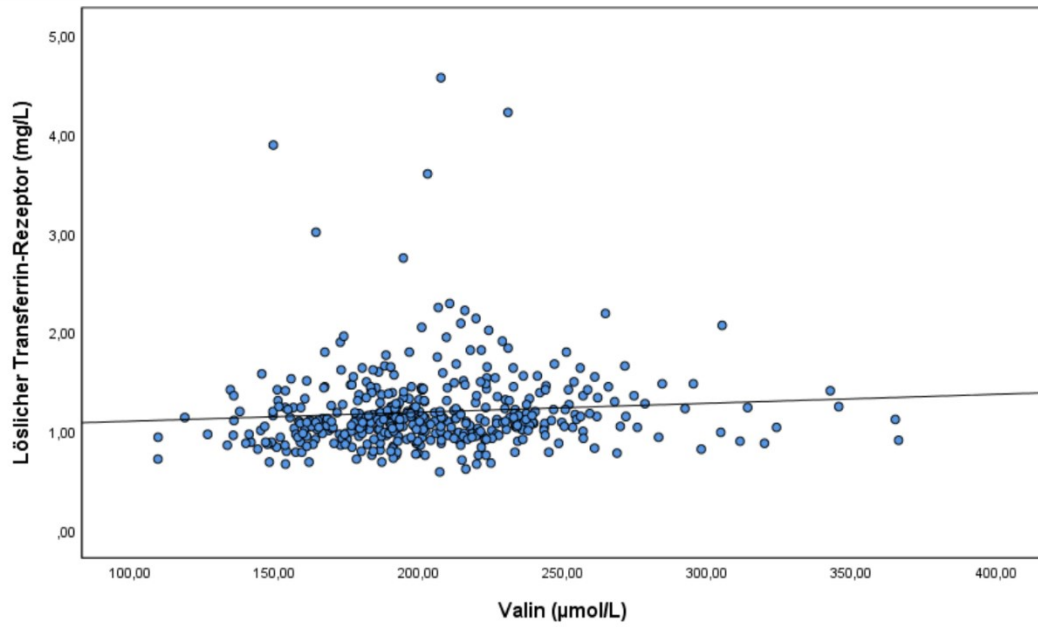


Abbildung 17: Korrelationsanalyse sTfR und Valin ($\rho = 0,152$)

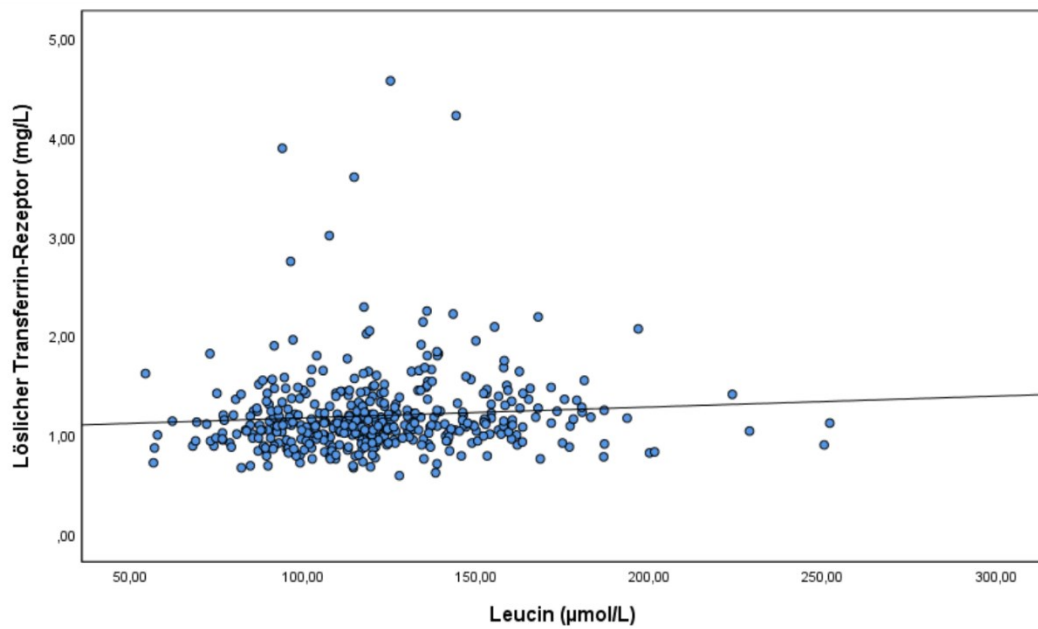


Abbildung 18: Korrelationsanalyse sTfR und Leucin ($\rho = 0,146$)

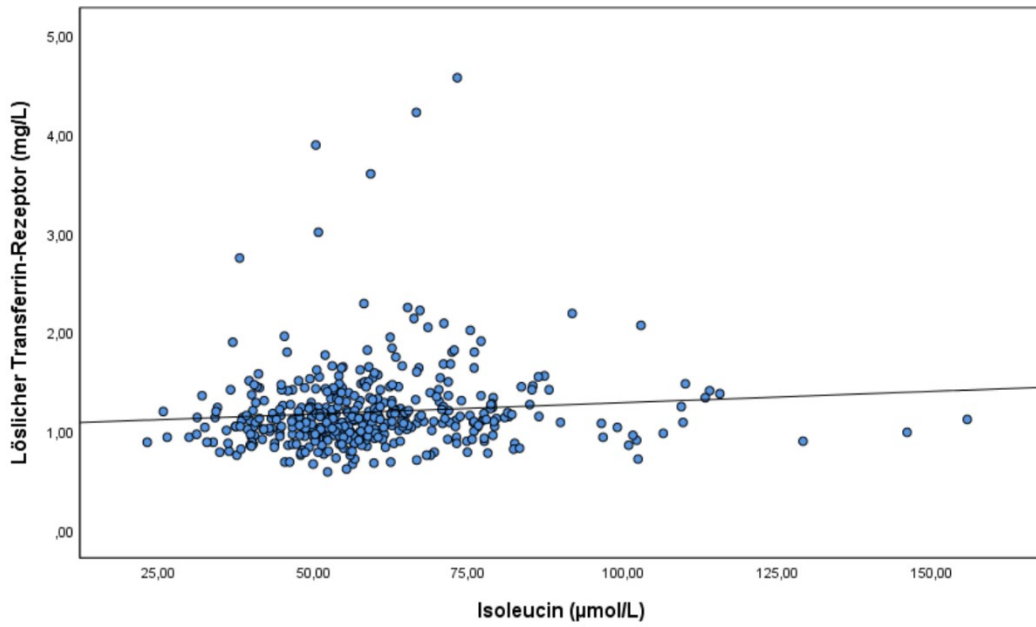


Abbildung 19: Korrelationsanalyse sTfR und Isoleucin ($\rho = 0,157$)

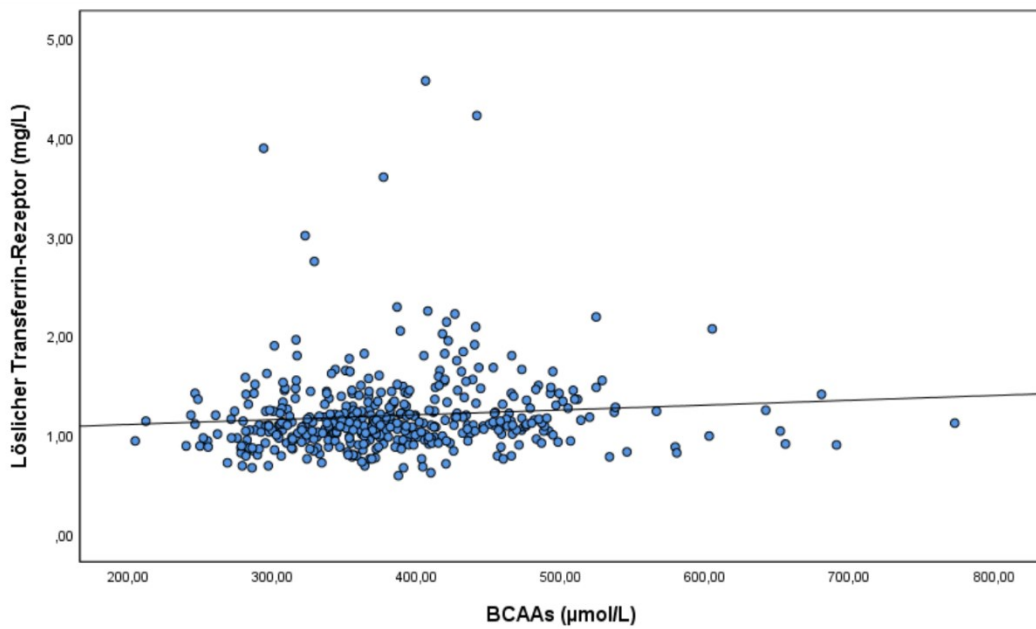


Abbildung 20: Korrelationsanalyse sTfR und BCAAs ($\rho = 0,170$)

3.4 Regressionsanalyse

Bei der univariaten linearen Regressionsanalyse waren anhand des standardisierten Beta-Koeffizienten (β -Koeff.) signifikant positive Effekte der Aminosäuren auf die Konzentration von Hb und Ferritin zu beobachten. Weiters hatte Isoleucin einen geringeren positiven Effekt auf Hb und Ferritin als die anderen verzweigtkettigen Aminosäuren. Kein signifikant positiver Effekt der Aminosäuren bestand beim sTfR.

Zur jeweiligen kurzkettigen Aminosäure sind der standardisierte Beta-Koeffizient und p-Wert von Hb, Ferritin und sTfR in der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 5: Univariate lineare Regressionsmodelle für Hb, Ferritin und sTfR

	Valin	Leucin	Isoleucin	BCAAs
Hb	β -Koeff.: 0,351* p-Wert: <0,001	β -Koeff.: 0,331* p-Wert: <0,001	β -Koeff.: 0,195* p-Wert: <0,001	β -Koeff.: 0,341* p-Wert: <0,001
Ferritin	β -Koeff.: 0,307* p-Wert: <0,001	β -Koeff.: 0,255* p-Wert: <0,001	β -Koeff.: 0,173* p-Wert: <0,001	β -Koeff.: 0,286* p-Wert: <0,001
sTfR	β -Koeff.: 0,084 p-Wert: 0,083	β -Koeff.: 0,077 p-Wert: 0,111	β -Koeff.: 0,093 p-Wert: 0,055	β -Koeff.: 0,091 p-Wert: 0,060

*p-Wert < 0,05

3.5 Statistische Testung der Aminosäuren bei Eisenmangel

In der Patientenkohorte wurde der Eisenstatus anhand der Konzentrationen von Ferritin und TSAT im Blut untersucht. Eine Person wurde der Eisenmangel-Gruppe zugeteilt, wenn die Konzentration von Ferritin < 30 μ g/L und/oder die TSAT < 20% war (15,64). Die Anzahl der Patientinnen und Patienten mit keinem Eisenmangel betrug 271 (63,2%), wovon 120 männlich und 151 weiblich waren. Insgesamt 158 Personen (36,8%), die sich aus 20 Männern und 138 Frauen zusammensetzten, wiesen einen Eisenmangel auf.

Der Median und der IQR von Valin, Leucin, Isoleucin sowie der Gesamtkonzentration der BCAAs waren in der Gruppe mit normalen Eisenstatus durchwegs höher als in der Eisenmangel-Gruppe. Die Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test für zwei Stichproben untersucht. Dieser ergab statistisch signifikante Unterschiede bei Valin, Leucin und der Gesamtkonzentration der BCAAs, jedoch nicht bei Isoleucin.

Tabelle 6: Konzentration der Aminosäureparameter anhand des Eisenstatus

	Eisenmangel	Median (Q1 – Q3)	p-Wert
Valin (µmol/L)	Pos	191,7 (169,8 – 216,1)	0,001
	Neg	201,6 (183,4 – 231,4)	
Leucin (µmol/L)	Pos	116 (96,2 – 131,5)	0,008
	Neg	120 (105,7 – 141,3)	
Isoleucin (µmol/L)	Pos	55,1 (46,6 – 64,4)	0,196
	Neg	56,6 (49,3 – 67,0)	
BCAAs (µmol/L)	Pos	364,2 (313,8 – 409,9)	0,004
	Neg	379,2 (341,1 – 437,4)	

Die folgenden Boxplots verdeutlichen graphisch die niedrigeren Blutkonzentrationen der signifikanten Aminosäureparameter in der Eisenmangel-Gruppe im Vergleich zur Gruppe mit normalem Eisenstatus.

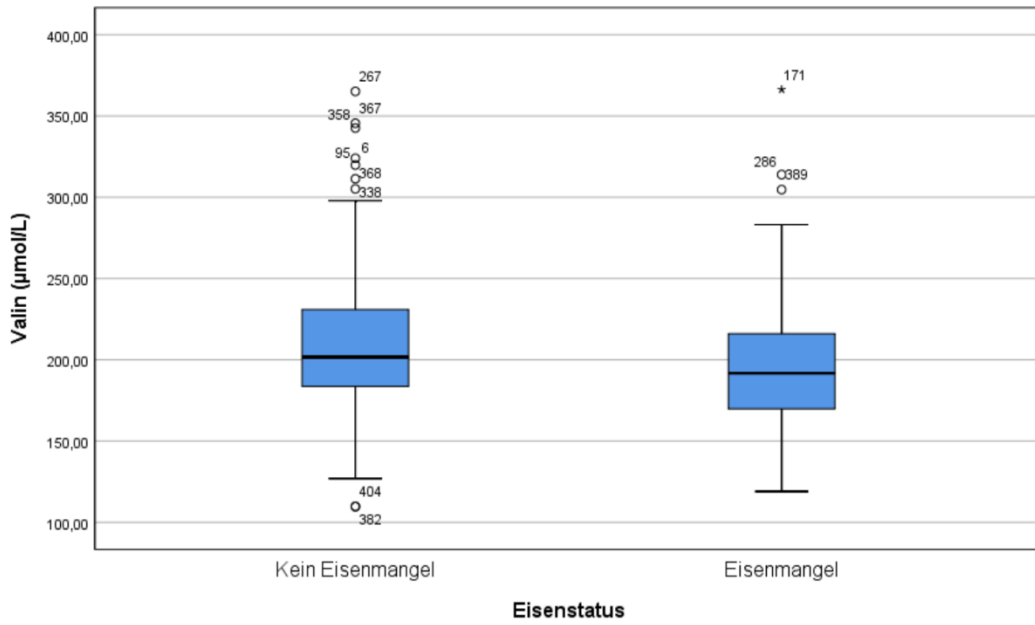


Abbildung 21: Konzentration von Valin anhand des Eisenstatus

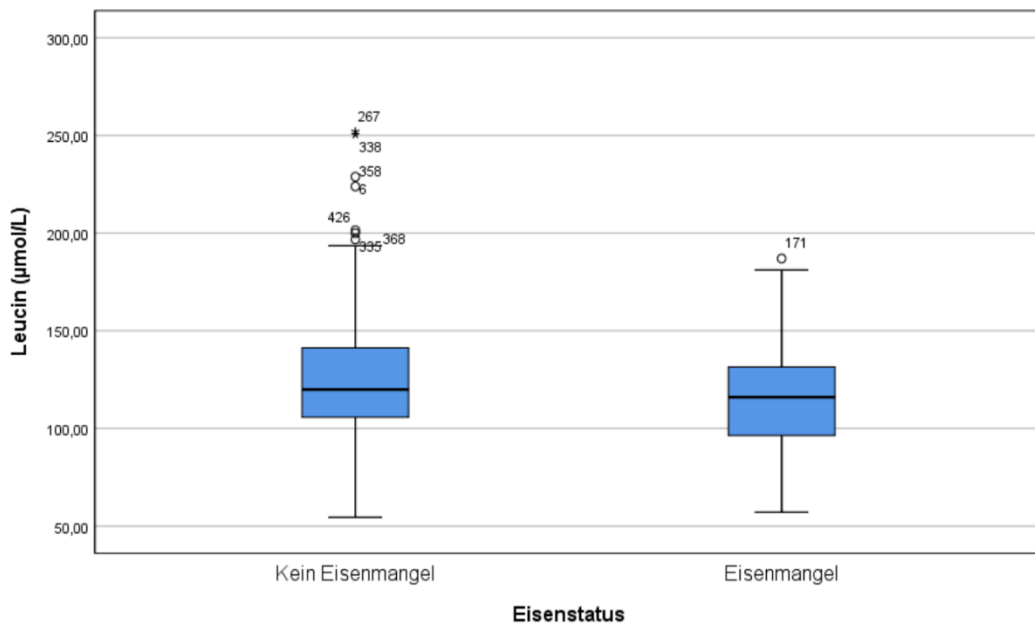


Abbildung 22: Konzentration von Leucin anhand des Eisenstatus

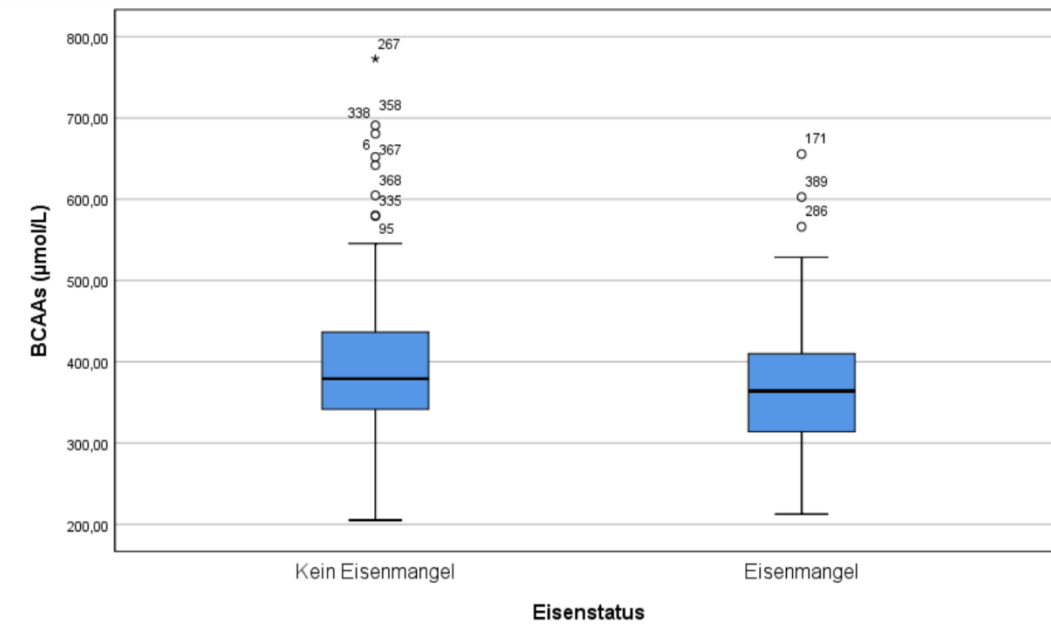


Abbildung 23: Konzentration der BCAAs anhand des Eisenstatus

3.6 Statistische Testung der Aminosäuren bei Anämie

Es wurde bei den Männern ein Hb-Wert < 13 g/dl und bei den Frauen < 12 g/dl als Anämie-Referenzwert angenommen (65-67). Von den 429 Patientinnen und Patienten waren insgesamt 412 Personen (96%) nicht-anämisch und insgesamt 17 Personen (4%), darunter 2 Männer und 15 Frauen, anämisch.

Beide Gruppen unterschieden sich in der Höhe der Konzentrationen der verzweigt-kettigen Aminosäuren insofern, dass der Median und der IQR in der nicht-anämischen Gruppe höher waren als in der anämischen Gruppe. Der anschließend durchgeführte Mann-Whitney-U-Test zwischen den beiden Anämie-Gruppen ergab statistisch signifikante Unterschiede bei Valin und der Gesamtkonzentration der BCAAs, jedoch nicht bei Leucin und Isoleucin.

Tabelle 7: Konzentration der Aminosäureparameter anhand des Anämiestatus

	Anämie	Median (Q1 – Q3)	p-Wert
Valin (µmol/L)	Pos	186,1 (156,7 – 207,3)	0,031
	Neg	199,0 (179,7 – 226,3)	
Leucin (µmol/L)	Pos	107,6 (90,6 – 123,6)	0,084
	Neg	118,8 (102,1 – 138,1)	
Isoleucin (µmol/L)	Pos	50,8 (38,8 – 66,0)	0,177
	Neg	56,4 (49,2 – 66,4)	
BCAAs (µmol/L)	Pos	329,1 (291,0 – 396,3)	0,047
	Neg	373,3 (335,2 – 428,0)	

Von den signifikanten Parametern Valin und der Gesamtkonzentration der BCAAs wurden zur graphischen Verdeutlichung der Konzentrationsunterschiede beider Gruppen Boxplots erstellt.

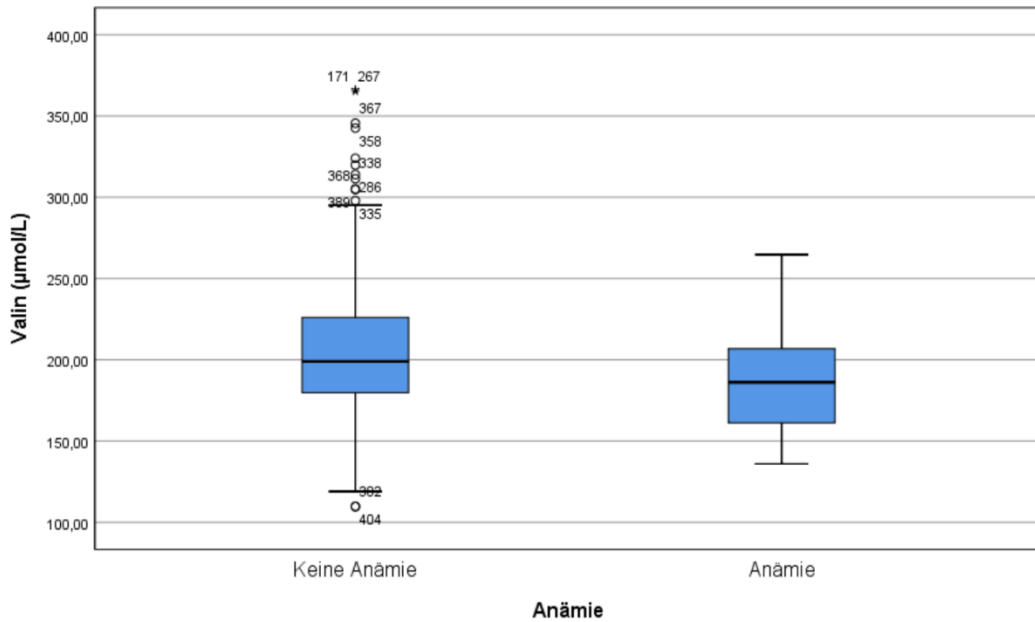


Abbildung 24: Konzentration von Valin anhand des Anämiestatus

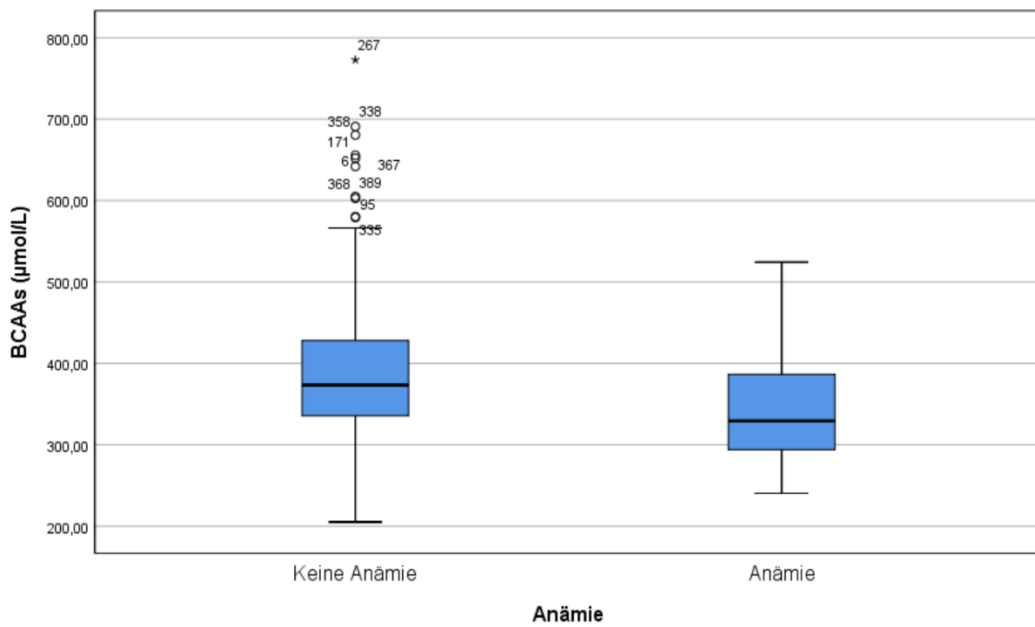


Abbildung 25: Konzentration der BCAAs anhand des Anämiestatus

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen den BCAAs Valin, Leucin und Isoleucin und verschiedenen Parametern des Eisenstoffwechsels besteht. Die verzweigtkettigen Aminosäuren korrelierten signifikant positiv mit Hb, Ferritin und sTfR. Anschließend durchgeführte univariate lineare Regressionsmodelle zeigten signifikant positive Assoziationen zwischen allen BCAAs und den Eisenparametern Hb und Ferritin. Dementsprechend gingen niedrige Konzentrationen der BCAAs mit niedrigen Werten von Hb einher.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten von Chung et al.(68), welche feststellten, dass hämatopoetische Stammzellen eine erhöhte Aufnahme von BCAAs für die Hämoglobinsynthese benötigen. Demzufolge geht eine unzureichende Aufnahme der BCAAs mit einer verminderten Produktion des roten Blutfarbstoffs einher (68). Eine Schlüsselrolle als Regulator in hämatologischen Stammzellen nimmt hierbei der Proteinkomplex mTORC1 ein (69). Dieser überwacht als intrazellulärer Sensor die Verfügbarkeit von Aminosäuren und steuert über nachgeschaltete 4E-BPs die Produktion von Hämoglobin (70).

Valin zeigte in unserer Studie die stärkste Korrelation mit Hämoglobin. Bei Taya et al.(71) wurde berichtet, dass die essentielle Aminosäure Valin unverzichtbar für die Proliferation und Hämostase hämatologischer Stammzellen ist. In Kultur befindliche hämatologische Stammzellen von Mäusen und Menschen waren nicht in der Lage sich unter valinarmen Bedingungen zu vermehren (71). In einer weiteren Studie mit 24 mangelernährten Patientinnen und Patienten korrelierten niedrige Valin- bzw. Leucinkonzentrationen stark positiv mit niedrigen Hämoglobinwerten ($\rho_{\text{Valin}} = 0,52$; $p_{\text{Valin}} < 0,05$; $\rho_{\text{Leucin}} = 0,61$; $p_{\text{Leucin}} < 0,01$) (72). Diese Resultate unterstützen die Hypothese, dass eine verminderte Zufuhr von BCAAs über die Nahrung zu einer Verminderung des Hbs im Blut führen könnte.

Weiters stellte sich in unserer Arbeit heraus, dass anämische Personen signifikant niedrigere BCAA-Blutkonzentrationen verglichen mit Personen ohne Anämie hatten. Mehrere Studien bestätigen, dass die Behandlung mit der verzweigtkettigen Aminosäure Leucin die Anämie des kongenitalen Diamond-Blackfan Syndroms und des erworbenen Myelodysplastischen Syndroms des Typs 5q- verbessert (73-76).

Die Anämien beider Syndrome werden vermutlich durch eine Haploinsuffizienz ribosomaler Proteingene, die zu einer Beeinträchtigung der mRNA-Translation in Erythroblasten führt, verursacht (77). Es bestehen mehrere Hinweise, dass Leucin als potenter Aktivator von mTORC1 die Translation hämatologischer Stammzellen steigert und somit zur Verbesserung der Anämie beider Syndrome führen kann (73,77,78). Weiters zeigten Ito et al. in einer kürzlich publizierten Arbeit (79), dass die absolute Retikulozytenzahl als Parameter der hämatopoetischen Funktionalität bei Patientinnen und Patienten mit myelodysplastischem Syndrom nach zehnwöchiger oraler Applikation von Leucin anstieg (79).

Des Weiteren bestand in unserer Studienpopulation eine signifikant positive Korrelation zwischen den BCAAs und dem Eisenspeicherprotein Ferritin. Eine schwach signifikante Korrelation wurde auch zwischen den BCAAs und dem sTfR festgestellt. Schlussfolgernd waren niedrige BCAA-Konzentrationen mit niedrigen Ferritin und sTfR-Werten assoziiert. Zwei ältere Studien zeigten, dass alle drei BCAAs in Apoferritin, der Proteinhülle von Ferritin, im menschlichen Individuum enthalten sind (80,81). Auch im sTfR wurden Valin, Leucin und Isoleucin als Bestandteile in der Aminosäuresequenz des Glykoproteins gefunden (82,83). Diese Ergebnisse implizieren, dass die verzweigtkettigen Aminosäuren wichtige Bausteine für die Synthese von Ferritin und sTfR darstellen.

Valin, Leucin und Isoleucin sind essentielle Aminosäuren und müssen über die Nahrung aufgenommen werden. Im menschlichen Körper sind sie damit für die Herstellung verschiedenster Proteine unverzichtbar. Mehrere Studien belegen einen möglichen Zusammenhang zwischen den verzweigtkettigen Aminosäuren und hämatologischen Parametern, die mit dem Eisenstoffwechsel verknüpft sind (3-5). Es wurde gezeigt, dass bei Sportlern eine einmonatige Aminosäuresupplementation, die u.a. alle drei BCAAs enthielt, zu einer signifikanten Erhöhung des Hb-Wertes, der Erythrozytenzahl und des Hämatokrits führte ($p < 0,05$). Zusätzlich steigerte hier die tägliche Aminosäurezufuhr auch die Konzentration des Eisenspeicherproteins Ferritin (3). Ähnliche Resultate brachte eine weitere Patientenkohorte mit 23 Sportlern, die eine BCAA-Mixtur über 90 Tage eingenommen hatten, hervor (4). Eine weitere Arbeit untersuchte die Auswirkungen von Zwischenprodukten des BCAA-

Metabolismus auf die Erythropoese und demonstrierte, dass jene Intermediate die Synthese von fetalem Hb in Erythrozyten induzieren (5).

Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese, dass die BCAAs Einfluss auf die Erythropoese und den Eisenstoffwechsel haben könnten. Es besteht eine solide Studienlage, dass verzweigt-kettige Aminosäuren durch mTORC1-Aktivierung die Anämien des Diamond-Blackfan-Syndroms und des Myelodysplastischen Syndroms des Typs 5q- verbessern (73,77,78). Darüber hinaus leiden fast zwei Milliarden Menschen an einem Eisenmangel, welcher als häufigste Ursache einer Anämie gilt. Vor allem Frauen im gebärfähigen Alter sind aufgrund des erhöhten Eisenverlustes durch die Monatsblutung häufiger betroffen. In diesen Fällen ist die Substitution von Eisen die Therapie der Wahl, um die verminderten Eisenspeicher wieder aufzufüllen (6). Neben dieser etablierten Behandlung könnte die zusätzliche Substitution von BCAAs eine mögliche Ergänzung in der Therapie des Eisenmangels bzw. der Eisenmangelanämie darstellen.

Der Hauptfortschritt unserer aktuellen Publikation ist, dass die BCAAs und Eisenparameter in einer gut charakterisierten, großen Studienkohorte von insgesamt 429 Personen gemessen wurden. Dessen ungeachtet bildet unsere Studie aufgrund des Designs einer Querschnittsstudie Messdaten nur zu einem punktuellen Zeitpunkt ab und ist dementsprechend limitiert. Außerdem handelt es sich bei der Studienpopulation um kein schwererkranktes Patientengut, sondern um ambulante Patientinnen und Patienten, die sich einer medizinischen Gesundheitsuntersuchung unterzogen haben. Somit sind die Ergebnisse nicht eins zu eins auf schwererkrankte Personen übertragbar. Da in der bisherigen Literatur aber so gut wie keine vergleichbaren Arbeiten zu finden sind, könnte unsere Studie die Grundlage für darauf aufbauende Forschungsarbeiten bilden. Hierbei sollten besonders die genauen pathophysiologischen Prozesse und Mechanismen der BCAAs auf die Erythropoese bzw. den Eisenmetabolismus untersucht werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die BCAAs Valin, Leucin und Isoleucin signifikant positiv mit den Eisenparametern Hb, Ferritin und sTfR korrelierten. Erniedrigte BCAA-Spiegel gingen mit erniedrigten Hb- bzw. Ferritinwerten einher. Ferner wiesen Patientinnen und Patienten mit Anämie signifikant niedrigere BCAA-Blutkon-

zentrationen im Vergleich zu Personen ohne Anämie auf. Damit weisen unsere Resultate auf einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen dem BCAA- und dem Eisenstoffwechsel hin.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Shimomura Y, Yamamoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N, et al. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J Nutr* 2006 Feb;136(2):529S-532S.
- (2) Dodd KM, Tee AR. Leucine and mTORC1: a complex relationship. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012 Jun 1;302(11):E1329-42.
- (3) Ohtani M, Maruyama K, Suzuki S, Sugita M, Kobayashi K. Changes in hematological parameters of athletes after receiving daily dose of a mixture of 12 amino acids for one month during the middle- and long-distance running training. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001 Feb;65(2):348-355.
- (4) Ohtani M, Maruyama K, Sugita M, Kobayashi K. Amino acid supplementation affects hematological and biochemical parameters in elite rugby players. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001 Sep;65(9):1970-1976.
- (5) Karkashon S, Raghupathy R, Bhatia H, Dutta A, Hess S, Higgs J, et al. Intermediaries of branched chain amino acid metabolism induce fetal hemoglobin, and repress SOX6 and BCL11A, in definitive erythroid cells. *Blood Cells Mol Dis* 2015 Aug;55(2):161-167.
- (6) Horn F. Der Eisenstoffwechsel. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 6. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2015. p. 565-571.
- (7) Lane DJ, Bae DH, Merlot AM, Sahni S, Richardson DR. Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. *Nutrients* 2015 Mar 31;7(4):2274-2296.
- (8) Clenin GE. The treatment of iron deficiency without anaemia (in otherwise healthy persons). *Swiss Med Wkly* 2017 Jun 14;147:w14434.
- (9) Marengo-Rowe AJ. Structure-function relations of human hemoglobins. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2006 Jul;19(3):239-245.
- (10) Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008 Nov 15;112(10):3927-3938.
- (11) Betts JG, Young KA, Wise JA, Johnson E, Poe B, Kruse DH, et al. Erythrocytes. *Anatomy and Physiology*. Houston, Texas: OpenStax; 2013. p. 791-798. Available at: <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>. Accessed Dec 13, 2019.
- (12) Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life* 2017 Jun;69(6):414-422.

- (13) WHO. Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.2); Available at: http://www.who.int/vmnis/indicators/serum_ferritin.pdf. Accessed Nov 20, 2019.
- (14) Bradley JM, Le Brun NE, Moore GR. Ferritins: furnishing proteins with iron. *J Biol Inorg Chem* 2016 Mar;21(1):13-28.
- (15) Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 2009 Oct 7;15(37):4617-4626.
- (16) Saito H. Metabolism of Iron Stores. *Nagoya J Med Sci* 2014 Aug;76(3-4):235-254.
- (17) Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 2014 Feb;19(2):164-174.
- (18) Zhang C, Rawal S. Dietary iron intake, iron status, and gestational diabetes. *Am J Clin Nutr* 2017 Dec;106(Suppl 6):1672S-1680S.
- (19) Sharp P, Srai SK. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol* 2007 Sep 21;13(35):4716-4724.
- (20) Silbernagl S, Despopoulos A. Eisenstoffwechsel, Erythropoese. *Taschenatlas Physiologie*. 8. Auflage ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2012. p. 94-95.
- (21) Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010 Nov;7(11):599-610.
- (22) Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 2004 Feb 20;116(4):565-576.
- (23) Luck AN, Mason AB. Transferrin-mediated cellular iron delivery. *Curr Top Membr* 2012;69:3-35.
- (24) Kleven MD, Jue S, Enns CA. Transferrin Receptors TfR1 and TfR2 Bind Transferrin through Differing Mechanisms. *Biochemistry* 2018 Mar 6;57(9):1552-1559.
- (25) Kohgo Y, Niitsu Y, Kondo H, Kato J, Tsushima N, Sasaki K, et al. Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood* 1987 Dec;70(6):1955-1958.
- (26) Shih AW, McFarlane A, Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation. *Am J Hematol* 2014 Apr;89(4):443-447.
- (27) Bertaggia E, Scabia G, Dalise S, Lo Verso F, Santini F, Vitti P, et al. Haptoglobin is required to prevent oxidative stress and muscle atrophy. *PLoS One* 2014 Jun 24;9(6):e100745.

- (28) Nielsen MJ, Moestrup SK. Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. *Blood* 2009 Jul 23;114(4):764-771.
- (29) Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014 Aug 15;307(4):G397-409.
- (30) Wang F, Lv H, Zhao B, Zhou L, Wang S, Luo J, et al. Iron and leukemia: new insights for future treatments. *J Exp Clin Cancer Res* 2019 Sep 13;38(1):406-019-1397-3.
- (31) Zhang DL, Ghosh MC, Rouault TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol* 2014 Jun 13;5:124.
- (32) Theil EC. Iron homeostasis and nutritional iron deficiency. *J Nutr* 2011 Apr 1;141(4):724S-728S.
- (33) Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2017 Dec;106(Suppl 6):1559S-1566S.
- (34) Pagani A, Nai A, Silvestri L, Camaschella C. Hepcidin and Anemia: A Tight Relationship. *Front Physiol* 2019 Oct 9;10:1294.
- (35) Saneela S, Iqbal R, Raza A, Qamar MF. Hepcidin: A key regulator of iron. *J Pak Med Assoc* 2019 Aug;69(8):1170-1175.
- (36) Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012 Sep;1823(9):1434-1443.
- (37) Rishi G, Wallace DF, Subramaniam VN. Hepcidin: regulation of the master iron regulator. *Biosci Rep* 2015 Mar 31;35(3):10.1042/BSR20150014.
- (38) Miseta A, Nagy J, Nagy T, Poor VS, Fekete Z, Sipos K. Hepcidin and its potential clinical utility. *Cell Biol Int* 2015 Nov;39(11):1191-1202.
- (39) Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009 May;37(1):1-17.
- (40) Aliu E, Kanungo S, Arnold GL. Amino acid disorders. *Ann Transl Med* 2018 Dec;6(24):471.
- (41) Wachter H, Hausen A, Reibnegger G. Aminosäuren, Peptide und Proteine. *Chemie in der Medizin*. 10. Auflage ed. Berlin, Boston: Walter de Gruyter GmbH; 2014. p. 305-317.
- (42) Horn F. Aminosäuren. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 6. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2015. p. 64-70.

- (43) Pasini E, Aquilani R, Dioguardi FS. Amino acids: chemistry and metabolism in normal and hypercatabolic states. *Am J Cardiol* 2004 Apr 22;93(8A):3A-5A.
- (44) Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR, Sata M. Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. *Hepatology* 2011 Sep 2;54(3):1063-1070.
- (45) Hoffer LJ. Human Protein and Amino Acid Requirements. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2016 May;40(4):460-474.
- (46) Horn F. Strategien des Aminosäurestoffwechsels. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 6. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2015. p. 215-219.
- (47) Königshoff M, Brandenburger T. Der Aminosäurestoffwechsel. *Kurzlehrbuch Biochemie*. 4. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2018. p. 101-120.
- (48) Walker V. Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle. *Diabetes Obes Metab* 2009 Sep;11(9):823-835.
- (49) Elmadfa I. Proteine. *Ernährungslehre*. 2. Auflage ed. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co.; 2009. p. 80-91.
- (50) Manoli I, Venditti CP. Disorders of branched chain amino acid metabolism. *Transl Sci Rare Dis* 2016 Nov 7;1(2):91-110.
- (51) White PJ, Newgard CB. Branched-chain amino acids in disease. *Science* 2019 Feb 8;363(6427):582-583.
- (52) Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr* 2006 Jan;136(1 Suppl):207S-11S.
- (53) Shimomura Y, Kitaura Y, Kadota Y, Ishikawa T, Kondo Y, Xu M, et al. Novel Physiological Functions of Branched-Chain Amino Acids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2015;61 Suppl:S112-4.
- (54) Holecek M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr Metab (Lond)* 2018 May 3;15:33-018-0271-1. eCollection 2018.
- (55) Platell C, Kong SE, McCauley R, Hall JC. Branched-chain amino acids. *J Gastroenterol Hepatol* 2000 Jul;15(7):706-717.
- (56) Nie C, He T, Zhang W, Zhang G, Ma X. Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism. *Int J Mol Sci* 2018 Mar 23;19(4):10.3390/ijms19040954.
- (57) Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 1998 Jul;68(1):72-81.

- (58) Adeva-Andany MM, Lopez-Maside L, Donapetry-Garcia C, Fernandez-Fernandez C, Sixto-Leal C. Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans. *Amino Acids* 2017 Jun;49(6):1005-1028.
- (59) Schütz LM. *Verzweigt-kettige Aminosäuren und Sport*. Hamburg: Bedey Media GmbH; 2009. Available at: <https://www.diplom.de/document/228601>. Accessed Nov 21, 2019.
- (60) Sperringer JE, Addington A, Hutson SM. Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. *Neurochem Res* 2017 Jun;42(6):1697-1709.
- (61) Gran P, Cameron-Smith D. The actions of exogenous leucine on mTOR signalling and amino acid transporters in human myotubes. *BMC Physiol* 2011 Jun 25;11:10-6793-11-10.
- (62) Averous J, Lambert-Langlais S, Carraro V, Goubeyre O, Parry L, B'Chir W, et al. Requirement for lysosomal localization of mTOR for its activation differs between leucine and other amino acids. *Cell Signal* 2014 Sep;26(9):1918-1927.
- (63) Lu J, Xie G, Jia W, Jia W. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids. *Front Med* 2013 Mar;7(1):53-59.
- (64) Jimenez K, Lang M. Diagnostic approach to iron deficiency anemia. *Wien Med Wochenschr* 2016 Oct;166(13-14):402-410.
- (65) Joosten E. Iron deficiency anemia in older adults: A review. *Geriatr Gerontol Int* 2018 Mar;18(3):373-379.
- (66) Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet* 2016 Feb 27;387(10021):907-916.
- (67) Goodnough LT, Maniatis A, Earnshaw P, Benoni G, Beris P, Bisbe E, et al. Detection, evaluation, and management of preoperative anaemia in the elective orthopaedic surgical patient: NATA guidelines. *Br J Anaesth* 2011 Jan;106(1):13-22.
- (68) Chung J, Bauer DE, Ghamari A, Nizzi CP, Deck KM, Kingsley PD, et al. The mTORC1/4E-BP pathway coordinates hemoglobin production with L-leucine availability. *Sci Signal* 2015 Apr 14;8(372):ra34.
- (69) Kalaitzidis D, Sykes SM, Wang Z, Punt N, Tang Y, Ragu C, et al. mTOR complex 1 plays critical roles in hematopoiesis and Pten-loss-evoked leukemogenesis. *Cell Stem Cell* 2012 Sep 7;11(3):429-439.
- (70) Nathan DG. Amino acid uptake in erythropoiesis. *Sci Signal* 2015 Apr 14;8(372):fs9.
- (71) Taya Y, Ota Y, Wilkinson AC, Kanazawa A, Watarai H, Kasai M, et al. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science* 2016 Dec 2;354(6316):1152-1155.

- (72) Young GA, Hill GL. Evaluation of protein-energy malnutrition in surgical patients from plasma valine and other amino acids, proteins, and anthropometric measurements. *Am J Clin Nutr* 1981 Feb;34(2):166-172.
- (73) Payne EM, Virgilio M, Narla A, Sun H, Levine M, Paw BH, et al. L-Leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q) MDS by activating the mTOR pathway. *Blood* 2012 Sep 13;120(11):2214-2224.
- (74) Jaako P, Debnath S, Olsson K, Bryder D, Flygare J, Karlsson S. Dietary L-leucine improves the anemia in a mouse model for Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012 Sep 13;120(11):2225-2228.
- (75) Pospisilova D, Cmejlova J, Hak J, Adam T, Cmejla R. Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine. *Haematologica* 2007 May;92(5):e66-7.
- (76) Narla A, Payne EM, Abayasekara N, Hurst SN, Raiser DM, Look AT, et al. L-Leucine improves the anaemia in models of Diamond Blackfan anaemia and the 5q-syndrome in a TP53-independent way. *Br J Haematol* 2014 Nov;167(4):524-528.
- (77) Boultonwood J, Yip BH, Vuppusetty C, Pellagatti A, Wainscoat JS. Activation of the mTOR pathway by the amino acid (L)-leucine in the 5q- syndrome and other ribosomopathies. *Adv Biol Regul* 2013 Jan;53(1):8-17.
- (78) Yip BH, Vuppusetty C, Attwood M, Giagounidis A, Germing U, Lamikanra AA, et al. Activation of the mTOR signaling pathway by L-leucine in 5q- syndrome and other RPS14-deficient erythroblasts. *Leukemia* 2013 Aug;27(8):1760-1763.
- (79) Ito K, Hayashi T, Inaguma Y, Terazawa T, Ando M, Ando Y, et al. Effect of L-Leucine Therapy on Hematopoietic Function in Elderly Myelodysplastic Syndrome Patients. *Biol Pharm Bull* 2019 Oct 1;42(10):1651-1657.
- (80) Wustefeld C, Crichton RR. The amino acid sequence of human spleen apoferitin. *FEBS Lett* 1982 12/13; 2019/12;150(1):43-48.
- (81) Addison JM, Fitton JE, Lewis WG, May K, Harrison PM. The amino acid sequence of human liver apoferritin. *FEBS Lett* 1983 Nov 28;164(1):139-144.
- (82) Schneider C, Owen MJ, Banville D, Williams JG. Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* 1984 Oct 18-24;311(5987):675-678.
- (83) McClelland A, Kuhn LC, Ruddle FH. The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* 1984 Dec;39(2 Pt 1):267-274.