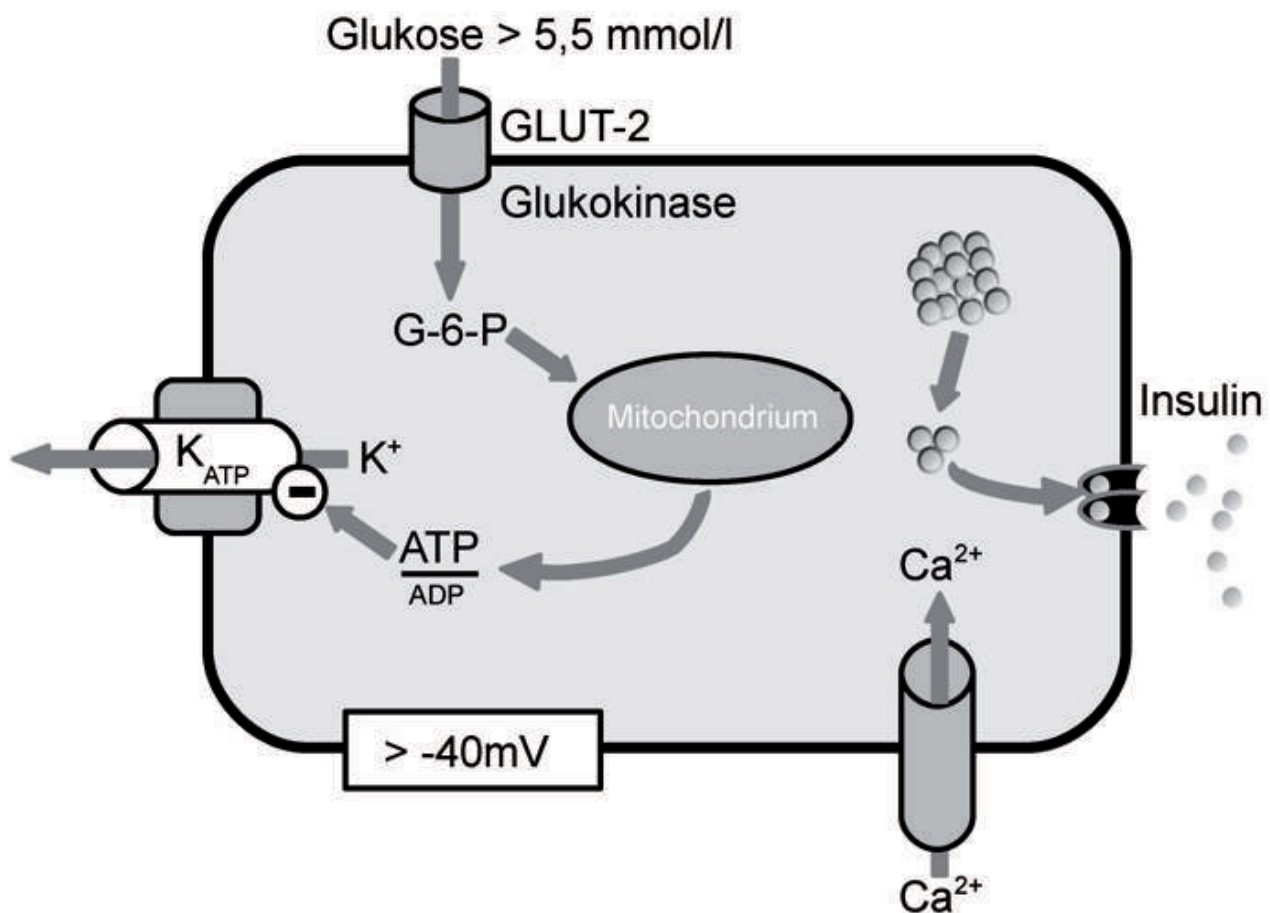

PHÄNOTYPISIERUNG VON PATIENTEN MIT EINER AKTIVIERENDEN MUTATION IM GLUCOKINASE-GEN



Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Sektion Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

**PHÄNOTYPISIERUNG VON PATIENTEN MIT EINER
AKTIVIERENDEN MUTATION IM GLUCOKINASE-GEN**

DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Anja Maria Feneberg
aus Erlangen

2009

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2010

Zugl.: Ulm, Univ., Diss., 2009

978-3-86955-369-6

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Wabitsch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Böhm

Tag der Promotion: 24.06.2010

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2010

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2010

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-369-6

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Kongenitaler Hyperinsulinismus.....	1
1.2. Glucokinase.....	5
1.3. Aufgabenstellung.....	8
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1. Fallbericht der Indexpatientin bis zum Zeitpunkt der Diagnosestellung	10
2.1.1. Chronologische Krankengeschichte	10
2.1.2. Zusammenfassung der klinischen Symptome im Verlauf	18
2.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der diagnostischen Untersuchungen	20
2.1.4. Zusammenfassung der Laborbefunde für Glukose und Insulin	22
2.2. Stammbaum - Kurzbeschreibung weiterer untersuchter Familienmitglieder	23
2.3. GCK-Sequenzierung und Mutationsanalysen	24
2.4. Biochemische Charakterisierung der G68V-Glucokinase	25
2.5. Durchführung der Datenerhebung zu den Hypoglykämie- Symptomen	25
2.6. Oraler Glukose-Toleranz-Test	27
2.6.1. Ablauf des Tests.....	27
2.6.2. Bestimmungsmethoden.....	27
2.7. Fastentest und Glukagontest.....	28
2.7.1. Ablauf der Tests	28
2.7.2. Bestimmungsmethoden.....	28
2.8. Ernährungsprotokoll	28
3. ERGEBNISSE.....	30
3.1. Größen- und Gewichtsentwicklung und medikamentöse Therapie der Indexpatientin	30
3.2. Krankheitsverlauf der Indexpatientin ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung	34
3.3. Klinische Daten aus den Erhebungsbögen	35
3.4. Mutationsanalysen.....	43
3.5. Biochemischen Charakterisierung der G68V-Glucokinase	43
3.6. Strukturelle Untersuchungen der G68V-Glucokinase.....	44
3.7. Oraler Glukose-Toleranz-Test	44
3.8. Fastentest und Glukagontest.....	47

3.8.1. Fastentest	47
3.8.2. Glukagontest	48
3.9. Ernährungsprotokoll	49
3.9.1. Nährstoffverteilung	50
3.9.2. Gesamtenergiezufuhr	51
3.9.3. Verteilung der Kohlenhydratzufuhr über den Tag am Beispiel des betroffenen Bruders der Indexpatientin	52
4. DISKUSSION	55
4.1. Alter bei Symptombeginn und Diagnosestellung	61
4.2. Geburtsgewicht	62
4.3. BMI - Insulinspiegel	62
4.4. Blutfettwerte	65
4.5. Symptome und Krankheitsverlauf	66
4.6. Behandlung	68
4.7. Oraler Glukose-Toleranz-Test	70
4.8. Fastentest	71
4.9. Glukagontest	73
4.10. Ernährungsprotokoll	75
4.11. Zusammenfassung und Literaturvergleich	78
4.12. Erklärungsversuche für die Variabilität im Phänotyp – komplexe Regulation der Glukose-Homöostase	82
4.13. Ausblick - weiterführende Untersuchungsmöglichkeiten	84
5. ZUSAMMENFASSUNG	88
6. LITERATURVERZEICHNIS	90
ANHANG	96
A.1. Erhebungsbogen	96
A.2. Ernährungsprotokoll	98
B.1. Oraler Glukose-Toleranz-Test	99
B.2. Glukagontest	100

Abkürzungsverzeichnis

18F-L-DOPA	<u>18F-fluoro-l-dopamine</u>
ACE	<u>angiotensin-converting enzyme</u>
ACTH	<u>Adrenocorticotropes Hormon</u>
ADP	<u>Adenosindiphosphat</u>
ATP	<u>Adenosintriphosphat</u>
BG	<u>Blutglukose</u>
BMI	<u>Body-Mass-Index</u>
BZ	<u>Blutzucker</u>
cDNA	<u>complementary deoxyribonucleic acid</u>
CHI	<u>congenital hyperinsulinism</u>
DEF	<u>diagnostischer Elternfragebogen</u>
DNA	<u>deoxyribonucleic acid</u>
ECLIA	<u>Elektrochemilumineszenz Immunoassay</u>
EEG	<u>Elektroenzephalogramm</u>
EI	<u>exercised induced</u>
EKG	<u>Elektrokardiogramm</u>
ELISA	<u>enzyme linked immunosorbent assay</u>
EW	<u>Eiweiss</u>
GCK	<u>Glucokinase</u>
GDH	<u>Glutamatdehydrogenase</u>
GIP	<u>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</u>
GKRP	<u>Glucokinase regulatory protein</u>
GLP-1	<u>glucagon-like peptide-1</u>
Glu	<u>Glukose</u>
GLUT1	<u>Glukosetransporter 1</u>
GLUT2	<u>Glukosetransporter 2</u>
GSIR	<u>glucose-stimulated insulin release</u>
GST	<u>Glutathionyl-S-Transferase</u>
HDL	<u>high density lipoprotein</u>
HI	<u>Hyperinsulinismus</u>
HNO	<u>Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde</u>
i.m.	<u>intramuskulär</u>

i.v.	<u>i</u> ntrav <u>e</u> nös
IQ	<u>I</u> ntelligenz <u>q</u> uotient
KG	<u>K</u> örper <u>g</u> ewicht
KH	<u>K</u> ohlen <u>h</u> ydrat
KHK	<u>K</u> oronare <u>H</u> erz <u>k</u> rankheit
Kir6.2	<u>K</u> ⁺ -channel <u>i</u> nward- <u>r</u> ectifier <u>6.2c</u>
LDL	<u>l</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein
MODY	<u>m</u> aturity- <u>o</u> nset <u>d</u> iabetes of the <u>y</u> oung
MODY-2	<u>m</u> aturity- <u>o</u> nset <u>d</u> iabetes of the <u>y</u> oung - <u>2</u>
mRNA	<u>m</u> essenger <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
n.b.	<u>n</u> icht <u>b</u> estimmt
n.v.	<u>n</u> icht <u>v</u> erfügbar
nH	<u>H</u> ill <u>n</u> umber
NMR	<u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance
oGTT	<u>o</u> raler <u>G</u> lukose <u>t</u> oleranz <u>t</u> est
P	<u>P</u> erzentile
PAM3	<u>P</u> henylalanin <u>a</u> minom <u>u</u> tase 3
PCR	polymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PEG	perkutane <u>e</u> ndoskopische <u>G</u> astrostomie
PEJ	perkutane <u>e</u> ndoskopische <u>J</u> ejunostomie
PET	<u>P</u> ositronen- <u>E</u> missions- <u>T</u> omographie
PHHI	<u>p</u> ersistent <u>h</u> yperinsulinemic <u>h</u> ypoglycemia of <u>i</u> nfancy
PNDM	<u>p</u> ermanent <u>n</u> eonatal <u>d</u> iabetes <u>m</u> ellitus
s.c.	<u>s</u> ub <u>c</u> utan
SCHAD	<u>S</u> hort- <u>C</u> hain- <u>L</u> -3- <u>H</u> ydroxy <u>a</u> cyl- <u>C</u> oA- <u>D</u> ehydrogenase
SDS	<u>s</u> tandard <u>d</u> eviation <u>s</u> core
SSW	<u>S</u> chwangers <u>c</u> hafts <u>w</u> oche
SUR1	<u>s</u> ulfonyl <u>u</u> rea <u>r</u> eceptor <u>1</u>
TG	<u>T</u> riglyzeride
TORCH	<u>T</u> oxoplasmosis, <u>o</u> thers, <u>r</u> ubella, <u>c</u> ytomegalovirus, <u>h</u> erpes simplex virus
WT	<u>W</u> ildtyp

1. Einleitung

Hypoglykämien sind häufig zu beobachtende Stoffwechselentgleisungen und spielen gerade auch im Neugeborenenalter eine wichtige Rolle. Diese neonatalen Hypoglykämien können vorübergehend auftreten oder aber auch über einen langen Zeitraum persistieren. Sie können viele verschiedene Ursachen haben und unter anderem durch eine vermehrte Insulinsekretion bedingt sein. Ist diese vermehrte Insulinsekretion angeboren so spricht man vom kongenitalen Hyperinsulinismus, der die häufigste Ursache für persistierende Hypoglykämien im Säuglings- und Kindesalter darstellt und auch unter dem englischen Begriff „persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy“ (PHHI) bekannt ist. Im Folgenden soll nun ein kurzer Überblick über die verschiedenen Formen des kongenitalen Hyperinsulinismus bei Neugeborenen gegeben werden, wobei auch auf Klinik, Diagnose und Therapiestrategien dieser Erkrankung eingegangen wird.

1.1. *Kongenitaler Hyperinsulinismus*

Der kongenitale Hyperinsulinismus (CHI) kann durch verschiedene genetische Defekte bedingt sein und zeigt sich folglich auch in sehr unterschiedlichen Ausprägungen und Formen. Allen Formen gemeinsam ist eine gestörte Insulinsekretion in der beta-Zelle des Pankreas mit rezidivierenden Hypoglykämien.

Normalwerte für die nüchtern-Glukose Konzentrationen im Kleinkindes-, Kindes- und Erwachsenenalter liegen zwischen 70 und 100 mg/dl. Bei Neugeborenen ist die untere Grenze etwas tiefer angesetzt (Stanley, 2003). Von schweren Hypoglykämien spricht man definitionsgemäß bei Blutzuckerspiegeln unter 40 mg/dl. Dies ist laut Sperling et al. auch die klassische Grenze für eine Hypoglykämie im Neugeborenenalter (Sperling und Menon, 2004). Da aber neurophysiologische Symptome auch bei Blutzuckerspiegeln von 50-70 mg/dl auftreten können, gibt es Bestrebungen, diese Grenze eher bei einem Glukosewert von unter 60 mg/dl anzusetzen, damit die Glukoseversorgung des Gehirns sichergestellt ist (Stanley und Baker, 1999). In diesen hypoglykämischen Phasen findet man bei Kindern mit einem kongenitalen Hyperinsulinismus charakteristischerweise Insulinkonzentrationen, die bezogen auf die Glukosekonzentration zu hoch sind. Ein wichtiger Aspekt dabei ist, ob die Insulinsekretion noch reguliert, dass heißt in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration stattfindet oder nicht.

Eine weitere Differenzierung kann histologisch erfolgen. Hierbei wird eine fokale von einer diffusen Pankreasveränderung abgegrenzt, was auch klinisch von entscheidender Bedeutung ist. Neue Studien versuchen diese Unterscheidung durch eine nicht-invasive Diagnostik zu ersetzen. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Untersuchungen des Pankreas mit 18-F-fluoro-L-DOPA waren in dieser Hinsicht bereits erfolgreich (Ribeiro et al., 2005).

Was die Pathogenese angeht, so sind mittlerweile verschiedene Gendefekte bekannt, die auch als Grundlage für die aktuelle Klassifikation des CHI herangezogen werden. Die häufigste Ursache sind hierbei Defekte im ATP-sensitiven Kaliumkanal, der aus zwei Untereinheiten besteht, dem Sulfonylharnstoff-Rezeptor SUR1 und dem Ionenkanal Kir6.2. Für beide Untereinheiten sind Gendefekte bekannt. Des Weiteren können Mutationen im Glutamatdehydrogenase-Gen (GDH) und im Glucokinase-Gen (GCK) zu einer vermehrten Insulinsekretion führen. Letztere steht im Mittelpunkt dieser Arbeit und wird weiter unten noch näher beschrieben. Sehr selten kann auch ein Mangel an Short-Chain-L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (SCHAD) oder eine anaerobe körperliche Belastung („Exercised induced“, EI) zu einem Hyperinsulinismus führen (Meissner und Mayatepek, 2005).

Ergänzend sei noch erwähnt, dass eine angeborene vermehrte Insulinsekretion mit Hypoglykämien auch bei bestimmten Syndromen vorliegen kann, so z.B. beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom, Perlman-Syndrom oder selten auch beim Sotos-Syndrom (Giurgea et al., 2006). Vorübergehend können außerdem neugeborene Kinder diabetischer Mütter im Rahmen einer Fetopathia diabetica eine vermehrte Insulinsekretion aufweisen.

Klinisch zeigen sich beim kongenitalen Hyperinsulinismus vor allem Zeichen der Unterzuckerung wie Krampfanfälle, Apnoen, Hypotonie, Zitterigkeit, Zyanose und Schwitzen. Pränatal kann eine Makrosomie vorliegen, im Säuglingsalter stehen vor allem Krampfanfälle und andere neurologische Symptome im Vordergrund. (Meissner und Mayatepek, 2005). Eine Übersicht der Hypoglykämie-Symptome und eine separate Auflistung der Häufigkeit dieser Symptome auch in Abhängigkeit vom Manifestationsalter findet sich bei (Meissner et al., 2003), wo Daten von 114 Patienten mit kongenitalem Hyperinsulinismus zusammengetragen sind. Neben oben genannten Symptomen werden hier auch irreguläre Atmung, Lethargie, schlechtes Trinkverhalten an der Brust, Reizbarkeit und Bradykardien aufgelistet. Bei neonataler Manifestation fielen die meisten

Kinder durch Krampfanfälle, Apnoen, Hypotonie und Zitterigkeit auf, während bei späterer Manifestation vor allem die Krampfanfälle im Vordergrund stehen.

Anhand des klinischen Erscheinungsbildes kann nur schwer auf die verschiedenen molekulargenetischen Ursachen geschlossen werden. Man konnte allerdings beobachten, dass Patienten mit autosomal dominant vererbten Formen des Hyperinsulinismus, wie es bei der aktivierenden Mutation im Glucokinase-Gen und einer Mutation im Glutamatdehydrogenase-Gen der Fall ist, in der Regel kein erhöhtes Geburtsgewicht aufweisen. Außerdem scheinen diese im Gegensatz zu den autosomal rezessiv vererbten oder sporadischen Formen nicht sofort nach der Geburt, sondern erst drei bis neun Monate postnatal auffällig zu werden und auch besser auf eine medikamentöse Therapie anzusprechen (Sperling und Menon, 2004). Zur weiteren Veranschaulichung zeigt die Tabelle 1 eine vereinfachte Gegenüberstellung der klinischen Beobachtungen bei den autosomal dominant vererbten aktivierenden Mutationen im Glucokinase-Gen (GCK-HI) im Gegensatz zu den klinischen Charakteristika der Patienten mit autosomal rezessiv vererbter Mutation im K_{ATP} -Kanal (SUR1/Kir6.2-HI). Genaue Angaben dazu finden sich bei (Gloyn et al., 2003).

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Patienten mit Glucokinase bedingtem Hyperinsulinismus (GCK-HI) im Vergleich zu Patienten mit durch einen Defekt im SUR1- bzw. Kir6.2-Gen bedingten Hyperinsulinismus (SUR1/Kir6.2-HI).

Klinische Charakteristika	GCK-HI	SUR1/Kir6.2-HI
Geburtsgewicht	Normal	erhöht
Glukose-Spiegel	niedrig, eher gleichmäßig	niedrig, eher schwankend
Insulin-Spiegel	relativ zu hoch, reguliert	hoch, nicht reguliert
Pankreas-Histologie	Normal	hypertrophe beta-Zellen, verschiedenen große Langerhans-Inseln
Behandlung mit Diazoxid	bei 9/11 erfolgreich	i.d.R. schlechtes Ansprechen

Diagnosekriterien und einen Algorithmus zum therapeutischen Vorgehen finden sich bei (Meissner und Mayatepek, 2005). Die Diagnose kann bei milden Formen schwierig sein. Das liegt auch daran, dass zum Teil eine große klinische Variabilität vorhanden ist. Neben Symptomen der Unterzuckerung und erhöhter Insulinspiegel im Blut kann ein Glukagontest oder Fastentest hilfreich sein. Eine Sicherung der Diagnose erfolgt molekulargenetisch.

Therapieprinzip ist eine Vermeidung von Hypoglykämien durch häufige Mahlzeiten, Glukoseinfusionen, Maltodextringabe und eventuell auch eine kontinuierliche Sondierung zur Kohlenhydratzufuhr. Bei einer fokalen Pankreasveränderung kann eine Pankreasteilresektion zur Besserung der Symptome führen, jedoch muss hier die Gefahr eines sich später entwickelnden Diabetes mellitus berücksichtigt werden (Meissner et al., 2003, Meissner und Mayatepek, 2005). Medikamentöse Therapieansätze ergeben sich aus der Regulation der Insulinsekretion in der beta-Zelle des Pankreas. Diese ist weiter unten erläutert und in Abbildung 1 dargestellt. Eine Hemmung der Insulinfreisetzung und eine Verbesserung der Hypoglykämie können somit erfolgen, indem zum Beispiel durch Diazoxid der K_{ATP} -Kanal geöffnet wird oder über Somatostatin-Analoga wie Octreotid der Calcium-Einstrom gehemmt wird.

Ziel jeder Therapie sollte sein, eine durch rezidivierende Hypoglykämien bedingte Entwicklungsverzögerung, bzw. die Entstehung von neurologischen Defiziten zu vermeiden, die leider bei 44% aller Kinder mit kongenitalem Hyperinsulinismus zu beobachten sind. Besonders gefährdet sind hierbei Kinder, die nicht sofort nach der Geburt, sondern erst später auffällig werden (Meissner et al., 2003).

Nachdem ein kurzer Überblick über Klassifikation, Klinik, Diagnose und Therapiestrategien des kongenitalen Hyperinsulinismus gegeben wurde, konzentriert sich der folgende Teil dieser Arbeit auf den Subtyp mit aktivierender Mutation im Glucokinase-Gen. Eine aktuelle, groß angelegte Studie von Christesen et al. schätzt die Prävalenz dieses Subtyps innerhalb des Kollektivs der Kinder mit kongenitalem Hyperinsulinismus, die nicht an einem Syndrom leiden, auf 1,2 %. Nimmt man daraus die Untergruppe, bei der kein Defekt im K_{ATP} -Kanal besteht, erhöht sich diese Zahl auf 4,6 %. Berücksichtigt man zusätzlich nur die Kinder, die auf eine medikamentöse Therapie ansprechen, so kommt man auf eine Häufigkeit von 6,9 % (Christesen et al., 2008).

Um die Komplexität dieser genetischen Veränderungen gut erfassen zu können und auch ein genaues Verständnis über die Folgen dieser Mutation für den gesamten Stoffwechsel zu bekommen, sollen hier zunächst einige Grundlagen zu diesem Enzym abgehandelt werden. Dazu gehören sowohl die kinetischen Eigenschaften des Enzyms, als auch die genetische Ebene, die Regulation der Enzym-Aktivität und sonstige Einflussfaktoren auf die GCK, aber auch ihr Vorkommen und ihre Funktion in den verschiedenen Organen.

1.2. Glucokinase

Die Glucokinase, manchmal auch als humane Hexokinase IV, Hexokinase D oder ATP:D-Hexose 6-Phosphotransferase bezeichnet ist ein Enzym, das folgende Reaktion katalysiert:



Magnesium ist als Cofaktor beteiligt. Außerdem können neben Glukose auch andere Hexosen wie Mannose, Fruktose und Glukosamine von der Glucokinase auf diese Weise verstoffwechselt werden.

Die Glucokinase ist ein monomeres Protein bestehend aus 465 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 50 kD und besitzt ein aktives Zentrum, das Glukose und Mg-ATP bindet und ein allosterisches Zentrum, dessen endogener Aktivator bisher noch nicht bekannt ist. Jedoch haben Grimsby et al. 2003 einen pharmakologischen Aktivator gefunden, der einen wichtigen Ansatzpunkt für die Diabetes-Therapie darstellt (Grimsby et al., 2003)

Die besonderen kinetischen Eigenschaften der Glucokinase im Vergleich zu den anderen Hexokinasen bestehen zum einen in der geringeren Affinität zu Glukose ($S_{0,5} \sim 7,5 \text{ mM}$), das heißt die Reaktion kann nur ablaufen, wenn die Konzentration an Glukose hoch genug ist, und zum anderen in der fehlenden Inhibition durch das Endprodukt Glukose-6-Phosphat. Außerdem ist die Glucokinase das bislang einzige monomere Enzym mit einem kooperativen Effekt, in diesem Fall für Glukose ($n_H \sim 1,7$) (Pilkis, 1968, Gloyn et al., 2005). Da auf diese Weise die katalysierte Reaktion nicht abhängig von der Konzentration an Glukose-6-Phosphat ist, sondern von der Menge der zur Verfügung stehenden Glukose, wird die GCK auch als Glukose-Sensor bezeichnet. In der beta-Zelle des Pankreas ist sie somit wesentlich an der Bildung des Schwellenwerts für die Glukose-Konzentration, der für die Glukose-induzierte Insulinsekretion (GSIR) nötig ist, beteiligt. Diese Schwelle liegt ungefähr bei einer Glukose-Konzentration von 5 mmol/l (Gloyn et al., 2004).

Mit diesen kinetischen Eigenschaften nimmt die GCK eine zentrale Rolle in der Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels ein. Die am besten untersuchte Aufgabe der GCK ist dabei die eben erwähnte Regulation der Insulinfreisetzung in der beta-Zelle des Pankreas, deren Mechanismus in der Abbildung 1 schematisch dargestellt ist.