

Aus dem
CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und
Humangenetik
Institut für experimentelle pädiatrische Endokrinologie
Direktor: Prof. Dr. med. Heiko Krude

Habilitationsschrift

Epigenetische und genetische Ursachen von Adipositas und Insulinsekretionsstörungen und neue Diagnostik- und Therapieoptionen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Kinderheilkunde

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Peter Kühnen

Eingereicht: Juli/ 2017
Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. G. Brabant
2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. T. Schöneberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Adipositas.....	5
1.2 Genetik der Regulation des Körpergewichtes.....	6
1.3 Proopiomelanokortin (POMC).....	7
1.4 Behandlung und Therapie von Adipositas.....	8
1.5 Epigenetik.....	9
1.6 Insulinsekretionsstörung.....	11
2. Eigene Arbeiten zu den Themen Adipositas und Störungen der Insulinsekretion	13
2.1 Epigenetische Regulation des Körpergewichtes.....	13
2.2 Neue Therapieoptionen für monogene Adipositasformen.....	35
2.3 Diagnostik und Therapie bei dem Vorliegen eines angeborenen Hyperinsulinismus	43
2.4 Genetische Ursachen für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1	67
3. Diskussion	76
3.1 Therapie von POMC defizienten Patienten mit einem MC-4R Agonist.....	76
3.2 POMC DNA Methylierung.....	77
3.3 Diagnostik und Therapie von kongenitalem Hyperinsulinismus	79
3.4 Genetische Ursachen für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1	80
4. Zusammenfassung	81
5. Literaturangaben	83
6. Danksagung	89
7. Erklärung	90

Abkürzungen:

ABCC8	ATP-binding cassette, subfamily C, member 8
ACTH	Adrenokortikotrophes Hormon
AMG	Arzneimittelgesetz
A ^{vy/a} Mausmodell	agouti-viable yellow Mausmodell
β-end-1-27	beta-endorphin 1-27
BMI	Body Mass Index
C1 Metabolismus	Kohlenstoff Metabolismus
CLIP	Corticotropin-like intermediate peptide
DNMT	DNA Methyltransferasen
DOTATOC	DOTA(0)-Phe(1)-Tyr(3)octreotid
GATA6	GATA binding protein 6
GCK	Glukokinase
GLP-1R	Glucagon-like peptide 1 receptor
GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1
GLUT1	Glucose Transporter 1
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HADH	3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
HNF4A	Hepatocyte-Nuclear-Factor-4alpha
IAP	intrazisternales A Partikel
INS	Insulin
KCNJ11	potassium channel, inwardly rectifying, subfamily J, member 11
LEP	Leptin
LEPR	Leptin Rezeptor
MC-1R	Melanokortin 1 Rezeptor
MC-3R	Melanokortin 3 Rezeptor
MC-4R	Melanokortin 4 Rezeptor
MCT-1	Monocarboxylic Acid Transporter Member 1
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
Mrd	Milliarden
PC1/2	Prohormonkonvertase1/2
PCBD1	6-pyruvol-tetrahydropterin synthase/ dimerization cofactor of hepatocyte factor 1 alpha
PCSK1	proprotein convertase subtilisin/ kexin type 1

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
POMC	Proopiomelanokortin
SNP	single nucleotide polymorphism
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

Die Erkrankungen Adipositas und Störungen der Insulinsekretion im Sinne eines Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 zählen zu den häufigsten endokrinen Erkrankungen. Es gibt jedoch auch seltenere Unterformen dieser Erkrankungen wie etwa die monogenen Adipositasformen, neonataler Diabetes mellitus oder angeborener Hyperinsulinismus. Abgesehen von Mutationen bei monogenen Erkrankungen können jedoch auch genetische Varianten in einem Kandidatengen, die nicht zu einem Verlust der Genfunktion führen, das Risiko für die Entwicklung einer häufigen Erkrankung wie beispielsweise Adipositas oder einer Störung des Glukosestoffwechsels erhöhen. Dabei sind neue Erkenntnisse über eine seltene Krankheitsform gegebenenfalls auch für die übergeordnete häufige Krankheit von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit sollen exemplarisch Beispiele hierfür aufgezeigt werden, die sich auf pathophysiologische Zusammenhänge, neue Möglichkeiten der Diagnostik und neue Therapieoptionen im Zusammenhang mit Adipositas bzw. monogenen Störungen der Insulinsekretion wie Diabetes mellitus Typ 1 bzw. angeborenen Hyperinsulinismus beziehen. Die Ergebnisse aus der Untersuchung von seltenen Erkrankungen können potentiell dabei für die häufige Krankheitsform von Bedeutung sein. Dies stellt den thematischen Rahmen der vorliegenden Arbeit dar. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse in Bezug auf (1) Adipositas, (2) angeborener Hyperinsulinismus und (3) Diabetes mellitus vorgestellt und diskutiert.

1.1 Adipositas

Ein großes weltweites gesundheitspolitisches Problem ist der Anstieg der Häufigkeit von Adipositas. Von Adipositas spricht man dabei laut Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ab einem Body-Mass-Index (BMI) von mehr als 30 kg/m^2 . Bei Kindern und Jugendlichen wird Adipositas ab einem BMI oberhalb der 97. Perzentile definiert. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht davon aus, dass jährlich etwa 2 Millionen Menschen an den direkten Folgen einer Fettleibigkeit weltweit versterben. Dabei beschränkt sich der Anstieg der Adipositasprävalenz nicht nur auf die Industriestaaten. Auch in den Entwicklungs- und Schwellenländern ist die

Prävalenz steigend. Dabei ist Adipositas ein bedeutender Risikofaktor für Sekundärerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskuläre Erkrankungen, Arthrose, Depression, nicht-alkoholische Steatohepatitis und bestimmte Tumore wie u.a. das Kolonkarzinom ¹.

Durch die notwendige medizinische Versorgung insbesondere der Folgeerkrankungen der Adipositas entstehen erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem. So wurden die direkten Kosten für die Behandlung von Adipositas und den damit verbundenen Sekundärerkrankungen 2008 in Deutschland auf 8,6 Mrd. Euro pro Jahr beziffert ².

Aus diesem Grunde ist es von großer Bedeutung die Ursachen der Entstehung von Adipositas zu verstehen, um dadurch eventuell neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

1.2 Genetik der Regulation des Körpergewichtes

In diversen Studien zeigte sich, dass monozygote Zwillingspaare eine hohe Konkordanz von bis zu 70 % in Bezug auf ihr Körpergewicht bzw. ihrem BMI aufweisen ³⁻⁵. Dies kann auf einen hohen genetischen Einfluss für die Regulation des Körpergewichtes hinweisen.

Ein Meilenstein für das Verständnis der Gewichtregulation war die Entdeckung des Hormons Leptin und die Identifizierung von Patienten mit Mutationen in wichtigen Genen für die Gewichtsregulation ⁶⁻¹⁴. Auf diese Weise wurde der sogenannte Leptin-Melanokortin Signalweg identifiziert (Abbildung 1). Dabei wird das Hormon Leptin vom Fettgewebe sezerniert. Dies erfolgt proportional zur Fettmasse. Leptin bindet an Leptin Rezeptoren u.a. im Nucleus arcuatus des Hypothalamus. Dadurch werden Proopiomelanocortin (POMC) exprimierende Neuronen aktiviert. Es kommt mit Hilfe einer Prohormonkonvertase 2 (PC2) zu der Bildung von α - und β -Melanozyten-stimulierenden Hormon (α -/ β -MSH)¹⁵. MSH ist in der Lage im Nucleus paraventricularis den G-Protein gekoppelten Melanokortin 4 Rezeptor (MC-4R) zu aktivieren. Dies führt zu einer Reduktion des Hungergefühls und reguliert den Energieumsatz. Mutationen in den entsprechenden Genen dieser einzelnen Schritte (*LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*, *MC4R*) führen beim Menschen und im Nagetiermodell zu einer frühmanifesten, massiven Adipositas¹⁶. Diese monogenen Ursachen für die Entstehung von Adipositas sind allerdings sehr selten. Man geht davon aus, dass

etwa 1-2% der Patienten mit frühmanifesten Adipositas Träger einer funktionell relevanten Mutation beispielsweise im *MC4R* Gen sind ¹⁷.

Abgesehen von seiner bedeutenden Rolle für die Gewichtsregulation, wirkt Leptin auch auf andere Gewebe, wie z.B. Beta-Zellen im Pankreas und hat immunmodulatorische Aufgaben ¹⁸⁻²⁰.

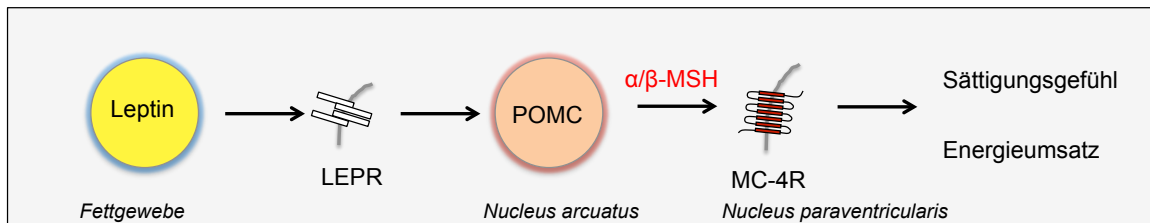


Abbildung 1: Leptin-Melanokortin Signalweg

1.3 Proopiomelanokortin (POMC)

Das Gen *POMC* (Proopiomelanokortin) wird u.a. im Hypothalamus, Hypophyse, Haut und Haarfollikeln exprimiert. Mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Pro-Hormonkonvertasen (PC1 und PC2) entstehen je nach Gewebe unterschiedliche Peptidhormone (Abbildung 2).

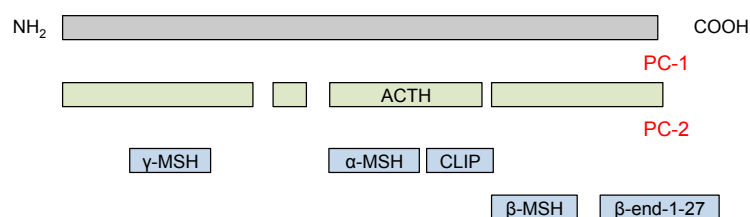


Abbildung 2: Darstellung der proteolytischen Prozessierung von POMC in der Hypophyse (grüne Balken) sowie im Hypothalamus und in der Haut (blaue Balken) modifiziert nach ²¹.

Die Prozessierung durch die Prohormonkonvertase 1 führt im vorderen Hypophysenlappen zu der Produktion von ACTH (Adrenokortikotrophes Hormon). In der Haut/ Haarfollikeln sowie im Nucleus arcuatus des Hypothalamus dagegen führt das Vorhandensein der Prohormonkonvertase 2 (PC2) zu der Entstehung von α-/β-MSH. MSH aktiviert in der Haut/ Haarfollikeln den Melanokortin 1 Rezeptor (MC-1R)

der Melanozyten und führt dadurch zu der Bildung von Eumelanin. Im Hypothalamus aktiviert MSH den Melanokortin 4 Rezeptor (MC-4R) und reguliert damit das Sättigungsgefühl. Bei Patienten mit einer homozygoten oder compound heterozygoten *POMC* Mutation kommt es deshalb zu der Trias einer frühmanifesten, schweren Adipositas (fehlende Aktivierung des MC-4R), ACTH Mangel mit sekundärem Hypokortisolismus (ACTH Mangel in der Hypophyse) sowie blassem Hautkolorit mit roten Haaren (fehlende Aktivierung des MC-1R) ¹⁰. Weltweit sind zur Zeit weniger als 100 Patienten mit einer Mutation im *POMC* Gen bekannt. Abgesehen von diesen Patienten mit einer homozygoten bzw. compound heterozygoten *POMC* Mutation wurde des weiteren beobachtet, dass Träger einer heterozygoten *POMC* Mutation ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung von Adipositas haben ^{22,23}.

1.4 Behandlung und Therapie von Adipositas

Es existieren die unterschiedlichsten Konzepte zur Behandlung von Adipositas. Grundsätzlich gibt es einen konservativen Ansatz, in dem vermehrte Bewegung und eine besonders abgestimmte Ernährung im Vordergrund stehen ^{24,25}. Davon abzugrenzen sind die chirurgischen Interventionsmöglichkeiten wie Magen-Band-Operation oder Magen-Bypass-Operation ²⁶. Medikamentöse Therapien wie beispielsweise mit dem Serotonin Rezeptor Agonisten Lorcaserin, oder dem GLP-1 Analog Liraglutide wurden in zahlreichen Studien analysiert ^{27,28}. Keines der bisher zugelassenen Medikamente zeigte allerdings eindeutige und langfristige Effekte in Bezug auf die Reduktion des Körpergewichtes. Eine Ausnahme stellt die Behandlung mit dem Botenstoff Leptin von Patienten mit einer Leptin Defizienz basierend auf einer Mutation im *Leptin* Gen dar. Hier führt eine Leptin Behandlung zu einer Normalisierung der initial bestehenden Hyperphagie und dadurch zu einer deutlichen Reduktion des Körpergewichtes ²⁹. Eine Leptin Behandlung von adipösen Patienten im Allgemeinen ist jedoch nicht erfolgreich ³⁰⁻³². Der Grund hierfür ist vermutlich die Entwicklung einer Leptin Resistenz in massiv adipösen Patienten ³³. Nach der Entdeckung der Bedeutung von MSH, haben zahlreiche Firmen versucht, MSH Peptide in der klinischen Prüfung zu testen. Es zeigte sich allerdings, dass diese Peptide entweder nicht wirksam waren oder zu schweren Nebenwirkungen – insbesondere hypertensiven Krisen – führten ^{34,35}.

1.5 Epigenetik

Wie bereits erwähnt weisen monozygote Zwillingspaare eine hohe Konkordanz in Bezug auf ihr Körpergewicht / BMI auf. Allerdings sind monogene Ursachen für die Entstehung von Adipositas sehr selten. In den letzten Jahren wurden aus diesem Grunde große genomweite Assoziationsstudien (GWAs) durchgeführt. Eine der bedeutendsten Varianten ist dabei ein SNP (single nucleotide polymorphism) im *FTO* Gen^{36,37}. Statistisch führt das Vorliegen des entsprechenden *FTO* SNPs zu einem BMI Anstieg von 0,39 kg/m² pro Allel³⁸. Allerdings erklärt die Gesamtheit der bisher gefundenen genetischen Varianten (SNPs) weniger als 25% der individuellen Körpergewichtsvariabilität³⁹. Dies steht im Gegensatz zu der hohen Gewichts- und BMI Konkordanz bei monozygoten Zwillingen. Diese Erklärungslücke wird auch als „missing heritability“ bezeichnet⁴⁰.

Aus diesem Grunde wird diskutiert, ob abgesehen von genetischen Veränderungen auch epigenetische Varianten die hohe Konkordanz in Zwillingstudien erklären könnten.

Epigenetik umfasst dabei post-translationale Modifikationen der DNA, die die Expression eines Gens beeinflussen ohne die Gensequenz selbst zu verändern. Dazu zählt man u.a. Histonveränderungen und DNA Methylierung^{41,42}. Beim Menschen kann das Cytosin – insbesondere wenn es vor einem Guanin als CpG Position vorkommt – an der fünften Position des Carbon-Ringes methyliert sein. Diese DNA Methylierung entsteht mit Hilfe von Methyltransferasen (DNMT1, 3a, 3b) und ist in sogenannten DNA Methylierungsmustern organisiert. Man geht davon aus, dass es unmittelbar nach der Befruchtung der Eizelle zu einer Demethylierung fast des gesamten Genoms kommt und im Anschluss daran – ungefähr zum Zeitpunkt der Implantation - durch die Methyltransferasen die DNA Methylierungsmuster neu gesetzt werden (Abbildung 3).

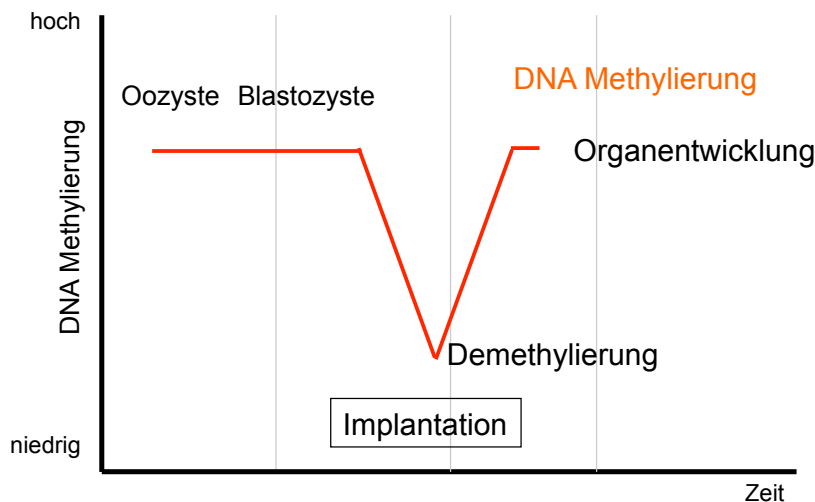


Abbildung 3: Regulation der DNA Methylierung *in-utero* (modifiziert nach ⁴³). Die rote Linie markiert den Verlauf der DNA Methylierungsintensität im Lauf der embryonalen Entwicklung.

DNA Methylierung führt dabei in vielen Fällen zu einer Hemmung der Genexpression⁴¹. Kommt es zu einer Fehlregulation der DNA Methylierung, kann es zu der Entstehung von Tumoren und zu sogenannten Imprinting Erkrankungen kommen⁴⁴⁻⁴⁶.

Gegenstand einer kontroversen Diskussion ist die Frage, ob epigenetische Veränderungen und dabei insbesondere Unterschiede der DNA Methylierung auch bei der Entstehung von weiteren Erkrankungen wie z.B. Adipositas eine Rolle spielen könnten⁴⁷. Wichtig ist es darauf hinzuweisen, dass DNA Methylierung gewebespezifisch sein kann und es zum aktuellen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt ist, in welchem Ausmaß DNA Methylierung sich im Laufe des Lebens verändert bzw. unverändert bestehen bleibt⁴⁸. Daten, die das Vorliegen einer „epigenetischen Uhr“ nahelegen, weisen zumindest darauf hin, dass sich bestimmte CpG Positionen im Laufe des Lebens verändern könnten⁴⁹, während andere Regionen nahezu unverändert bleiben. Ein weiterer, kontrovers diskutierter Aspekt ist die inter- und transgenerationale Übertragung der epigenetischen Modifikationen. So weisen manche Studien darauf hin, dass es sowohl einen maternalen als auch einen paternalen Einfluss auf den Nachwuchs in Bezug auf das Risiko für die Entwicklung von Erkrankungen wie z.B. Adipositas im Laufe des Lebens gibt, der unabhängig von genetischen Varianten vorliegt ^{50,51}. Der Mechanismus für diese epidemiologischen und tierexperimentellen Beobachtungen ist bisher jedoch nicht geklärt. Allerdings wird postuliert, dass epigenetische Modifikationen hierbei eine Rolle spielen

könnten⁵².

1.6 Insulinsekretionsstörung

Die Beta-Zelle des endokrinen Pankreas spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des Blutzuckers durch die Sekretion von Insulin. Dabei gibt es u.a. zwei Insulinsekretionsstörungen, die aufgrund einer monogenen Ursache entstehen können. Beim kongenitalen Hyperinsulinismus wird unkontrolliert Insulin ausgeschüttet und es kommt zu rezidivierenden Hypoglykämien^{53,54}. Diese seltene Erkrankung tritt in etwa einer Häufigkeit von 1:50.000 auf und entsteht häufig aufgrund einer aktivierenden Mutation in einer der Untereinheiten des ATP abhängigen Kalium-Kanals der Beta-Zelle (Abbildung 4). Diese Mutationen in den Genen *ABCC8* bzw. *KCNJ11* führen zu einer Depolarisation der Zellmembran und dadurch zu einer unkontrollierten Ausschüttung von Insulin. Es kommt bei den betroffenen Patienten zu schweren Hypoglykämien, die unerkannt zum Tode führen. Man unterscheidet eine diffuse Form des kongenitalen Hyperinsulinismus (d.h. alle Beta-Zellen sind betroffen) von einer fokalen Form (nur ein umschriebener Bereich weist betroffene Beta-Zellen auf). Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Formen ist letztlich nur durch eine Pankreasbiopsie bzw. histologische Untersuchung sicher möglich. Seit etwa 10 Jahren steht jedoch auch eine bildgebende Diagnostik zur Verfügung, die Hinweise auf das Vorliegen einer diffusen bzw. fokalen Form geben kann⁵⁵. Die Darstellung der betroffenen Zellen kann hier mit Hilfe eines 18-F-DOPA PET CT erfolgen. Dieser PET Tracer reichert sich u.a. in Beta-Zellen an und wird als Maß für die Insulinsekretionsaktivität gewertet. Bei fokalen Formen – hier reichert sich der Tracer in einem umschriebenen Areal an - kann eine operative Resektion zu einer Heilung des Patienten führen. Bei diffusen Formen ist der Nutzen einer Operation nicht belegt. Aus diesem Grunde ist es wichtig, zwischen diesen beiden Formen sicher zu differenzieren. In diffusen Formen ist eine medikamentöse Einstellung des Blutzuckers notwendig. Dabei ist das Ansprechen der Patienten auf die unterschiedlichen verfügbaren Medikamente (Diaxozid, Octreotid, Glucagon, Sirolimus) sehr unterschiedlich⁵⁶.

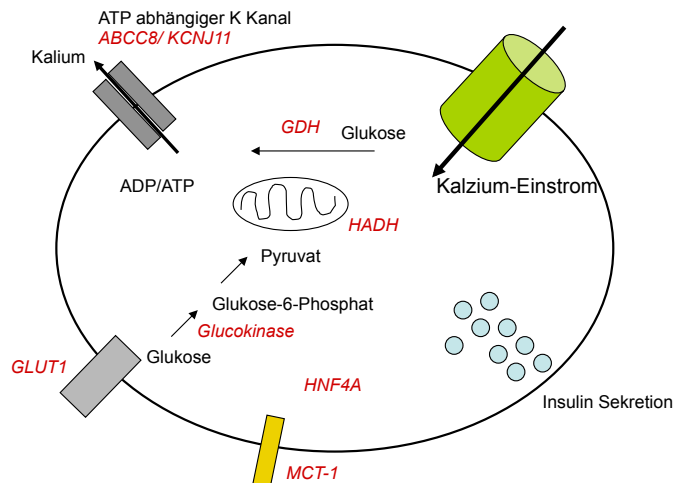


Abbildung 4: Regulation der Insulinsekretion über ATP abhängige Kalium Kanäle. Ein Anstieg der ATP Konzentration führt zum Schließen des Kaliumkanals und dadurch zur Depolarisation der Beta-Zelle und zum Kalzium Einstrom. Dies führt zur Exozytose der Insulin Vesikel. In rot sind die Gene gekennzeichnet in denen Mutationen beschrieben wurden, die zu einem angeborenem Hyperinsulinismus führen können (GSK=Glucokinase; HNF4A=Hepatocyte-Nuclear-Factor-4alpha; MCT-1=Monocarboxylic Acid Transporter Member 1; HADH=3-Hydroxyacly-CoA-Dehydrogenase; GLUT1=Glutamate dehydrogenase 1; GLUT1=Glucose Transporter 1).

Im Gegensatz zum kongenitalen Hyperinsulinismus kommt es bei Antikörper negativen Diabetes mellitus Typ 1 zu einer fehlenden bzw. unzureichenden Insulinsekretion und damit zu einem zu hohen Blutzuckerspiegel. Zahlreiche Gene sind inzwischen bekannt, die bei Funktionseinschränkung zu einem Diabetes mellitus Typ 1 führen⁵⁷. Dabei gibt es einige Gene wie z.B. *ABCC8* und *KCNJ11*, bei denen eine Mutation - je nach dem ob es sich um eine aktivierende oder inhibierende Mutation handelt - zu einem Hyperinsulinismus oder einem Diabetes mellitus Typ 1 führt⁵⁸. Bei den monogenen, Antikörper negativen Diabetes Formen unterscheidet man den neonatalen Diabetes mellitus von MODY Diabetes-Formen (Maturity Onset Diabetes of the Young). Man geht dabei von einem Vorkommen mit einer Häufigkeit von etwa 2-5:100.000 aus⁵⁷.

2. Eigene Arbeiten zu den Themen Adipositas und Störungen der Insulinsekretion

2.1 Epigenetische Regulation des Körpergewichtes

Ergebnisse aus großen genomweiten Assoziationsstudien weisen darauf hin, dass die hohe BMI und Gewichts-Konkordanz von eineiigen Zwillingen und die Ergebnisse großer Familienstudien vermutlich nicht nur durch genetische Varianten erklärt werden kann^{3,38,59,60}. Aus diesem Grunde wurde in den letzten Jahren nach epigenetischen Veränderungen gesucht, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Adipositas im Laufe des Lebens erklären könnten⁶¹. In zahlreichen Arbeiten wurden Unterschiede in Bezug auf die DNA Methylierung zwischen adipösen und normalgewichtigen Individuen, zwischen adipösen Patienten nach Intervention oder im Tiermodell beschrieben⁶²⁻⁶⁴. Dabei wird in vielen Studien besonders der Einfluss der Umgebung *in-utero* auf die DNA Methylierung und das Risiko für die Entwicklung von Adipositas untersucht. Allerdings sind die beobachteten Unterschiede häufig sehr klein und nicht reproduzierbar. Deshalb ist die Interpretation dieser Studien insgesamt schwierig. Dies hängt damit zusammen, dass in der Regel DNA, welche aus Blutzellen extrahiert wurde, verwendet wird. Dadurch wird der Aspekt der gewebespezifischen DNA Methylierung häufig vernachlässigt. Des Weiteren ist in vielen Fällen die DNA Methylierung vom Genotyp abhängig, und es sind zahlreiche Beispiele beschrieben worden in denen eine genetische Variante zu einer Veränderung der DNA Methylierung führt^{65,66}. Ein weiteres Problem stellt die intra- und interindividuelle Variabilität der DNA Methylierung dar^{48,67}. Auch diesbezüglich wurden selten Kontroll-Experimente in den publizierten Studien durchgeführt.

In den folgenden zwei Arbeiten wurden jedoch diese Aspekte berücksichtigt. Es erfolgte die Untersuchung der DNA Methylierung des *POMC* Gens, welches – wie beschrieben – eine bedeutende Rolle in der Regulation des Körpergewichtes spielt. Es wurde untersucht, ob epigenetische Veränderungen des *POMC* Gens eine Bedeutung in der Entwicklung von Adipositas spielen.

(Die folgende Publikation ist im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

An Alu element associated hypermethylation variant of the *POMC* gene is associated with childhood obesity

Kuehnen P, Mischke M (shared-first authorship), Wiegand S, Sers C, Horsthemke B, Lau S, Keil T, Lee YA, Grueters A, Krude H,

PLoS Genetics, March/2012, 8 (3)

Link: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002543>

(Die folgende Publikation ist im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity

Kühnen P, Handke D (shared-first authorship), Waterland RA, Hennig BJ, Silver M, Fulford AJ, Dominguez-Salas P, Moore SE, Prentice AM, Spranger J, Hinney A, Hebebrand J, Heppner FL, Walzer L, Grötzinger C, Gromoll J, Wiegand S, Grüters A, Krude H.

Cell Metabolism, Sept/2016, p. 502-9, 13;24(3)

Link: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.001>

2.2 Neue Therapieoptionen für monogene Adipositasformen

Monogene Adipositasformen sind selten und die betroffenen Gene stehen in der überwiegenden Mehrheit mit dem Leptin-Melanokortin Signalweg in Verbindung. Ein wichtiger Aspekt dieser Erkrankungen ist die deutliche Hyperphagie, die schon in den ersten Lebensmonaten bemerkbar ist. Eine Behandlung dieser Patienten mit konservativen Methoden (vermehrte Bewegung, Ernährungsberatung, psychologische Unterstützung) führt häufig nicht zu einer Stabilisierung des Körpergewichtes. Deshalb erfolgte in letzter Zeit bei immer mehr Patienten mit monogener Adipositas eine bariatrische Operation. Die Ergebnisse werden kontrovers diskutiert⁶⁸⁻⁷⁰. Aufgrund der publizierten Daten und den individuellen Verläufen (persönliche Kommunikation) zeichnet sich ab, dass eine bariatrische Operation bei Patienten mit homozygoter/ compound heterozygoter Mutation in den Genen *POMC* und *LEPR* in den meisten Fällen nicht erfolgreich ist. Die Patientin, bei der erstmalig eine *POMC* Mutation beschrieben wurde¹⁰ fragte, nachdem es für sie trotz intensiver Bemühung über mehr als 18 Jahre nicht möglich war das Gewicht längerfristig zu stabilisieren, ob man bei ihr trotzdem eine bariatrische Operation durchführen könnte. Da eine Operation für diese Patientin nicht in Frage kam wurde erwägt, ob eventuell eine medikamentöse Therapie eine Alternative darstellen könnte. Deshalb wurden alle Firmen – die jemals eine klinische Studie mit einem MSH Präparat durchgeführt hatten - mit der Frage angeschrieben, ob es eine Möglichkeit geben könnte, die Patientin mit einem MSH Analogon (MC-4R Agonisten) im Rahmen einer klinischen Prüfung zu behandeln. So entstand der Kontakt zu einer Firma, die ihr Präparat Setmelanotide (RM-493) gerade in Phase 1b/ Phase 2a Studien untersuchte.

Um das Präparat anzuwenden wurde deshalb eine „investigator initiated“, Phase II Studie nach AMG mit dem Melanokortin 4 Rezeptor Agonisten Setmelanotide (RM-493) in die Wege geleitet, und die Patientin konnte mit dieser Therapie im Rahmen der klinischen Prüfung beginnen (Sponsor: Charité Universitätsmedizin Berlin). Die Hoffnung bestand darin, dass man zumindest zum Teil das Hungergefühl und damit auch das Körpergewicht der Patientin reduzieren und ihre gesundheitliche Prognose verbessern könnte.

(Die folgende Publikation ist im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

Proopiomelanocortin Deficiency Treated with a Melanocortin-4 Receptor Agonist

Kühnen P, Clément K, Wiegand S, Blankenstein O, Gottesdiener K, Martini LL, Mai K, Blume-Peytavi U, Grüters A, Krude H.

The New England Journal of Medicine, July/2016, p.240-6, 21;375 (3)

Link: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512693>

2.3 Diagnostik und Therapie bei dem Vorliegen eines angeborenen Hyperinsulinismus

Die optimale nuklearmedizinische Darstellung der betroffenen Pankreasregion bei angeborenen Formen des Hyperinsulinismus stellt eine große Herausforderung dar. Dies hängt mit den unterschiedlichen Zielproteinen der verwendeten Tracer im PET zusammen. Das bisher verwendete 18-F-DOPA ist ein Signal für die Beta-Zell-Aktivität. Deshalb wäre es von großem Vorteil, Beta-Zell-Masse nicht nur Aktivität darstellen zu können. Dies wäre nicht nur positiv für die Diagnostik bei angeborenem Hyperinsulinismus, sondern könnte auch beispielsweise bei Patienten mit Diabetes mellitus eine sinnvolle Anwendung finden.

Eine Alternative zum 18-F-DOPA könnte der 68-Ga Somatostatin Rezeptor Tracer (DOTATOC = DOTA(0)-Phe(1)-Tyr(3)octreotid) sein, welcher ein Marker für die Beta-Zell-Oberfläche ist. Zwei Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschäftigen sich deshalb mit den limitierenden Faktoren für das 18-F-DOPA PET CT bzw. mit einer alternativen PET Diagnostik.

Absehen von der teilweise bestehenden Problematik mit den bildgebenden Verfahren, kann die medikamentöse Therapie der Patienten mit angeborenem Hyperinsulinismus komplex und anspruchsvoll sein. Gerade bei Patienten, die nicht kurativ operiert werden können bzw. bei denen eine diffuse Form vorliegt, ist eine medikamentöse Einstellung des Blutzuckers von großer Bedeutung. Bisher wurde insbesondere Diazoxid und Somatostatin für die längerfristige Behandlung verwendet. Auf Diazoxid sprechen nicht alle Patienten mit angeborenem Hyperinsulinismus an, weshalb häufig Somatostatin in Kombination mit speziell angereicherter Nahrung (z.B. mit Maltodextrin) angewendet wird. Die Somatostatin-Gabe erfolgt subkutan mit 3-4 Injektionen pro Tag oder über ein Pumpensystem. Dies stellt häufig für die Patienten und die Eltern eine große Belastung dar. Nach der Zulassung eines neuen langwirksamen Somatostatinpräparates Lanreotide bestand die Hoffnung, dass man mit einer Gabe des Medikamentes alle 4-6 Wochen, die Belastung für die Familien und Patienten reduzieren und somit eine Steigerung der Lebensqualität bewirken könnte. Die Wirkung des langwirksamen Somatostatinpräparates Lanreotide wurde deshalb bei Patienten mit angeborenem Hyperinsulinismus in einer Arbeit näher untersucht.

(Die folgende Publikation ist im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

Occurrence of giant focal forms of congenital hyperinsulinism with incorrect visualization by (18) F DOPA-PET/CT scanning

Kühnen P, Matthae R (shared-first authorship), Arya V, Hauptmann K, Rothe K, Wächter S, Singer M, Mohnike W, Eberhard T, Raile K, Lauffer LM, Jakoubov R, Hussain K, Blankenstein O.

Clinical Endocrinology, Dec/2014, 847-854, 81

Link: <https://doi.org/10.1111/cen.12473>

(Die folgende Publikation ist im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

Role of (68)Ga somatostatin receptor PET/CT in the detection of endogenous hyperinsulinaemic focus: an explorative study

Prasad V, Sainz-Esteban A, Arsenic R, Plöckinger U, Denecke T, Pape UF, Pascher A, **Kühnen P**, Pavel M, Blankenstein O.

European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Aug/2016, p.1593-600, 43(9)

Link: <https://doi.org/10.1007%2Fs00259-016-3331-7>

(Die folgende Publikation ist im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

Long-term lanreotide treatment in six patients with congenital hyperinsulinism

Kühnen P, Marquard J, Ernert A, Meissner T, Raile K, Wannemacher G,
Blankenstein O

Hormone Research in Paediatrics, Aug/2012, p.106–112, (78)

Link: <https://doi.org/10.1159/000341525>

2.4 Genetische Ursachen für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1

Monogene Diabetesformen treten sehr selten auf (Häufigkeit: etwa 2-5 auf 100.000 untersuchte Fälle)⁵⁷. Dabei ist die Kenntnis über die molekulargenetische Ursache bei Patienten mit neonatalen Diabetes Formen von Bedeutung. So können Patienten mit einer Mutation im *ABCC8* Gen auf eine orale medikamentöse Therapie mit Sulfonylharnstoffen eingestellt werden und benötigen in der Regel keine Insulin Therapie⁷¹⁻⁷³.

Davon abgesehen ist das Wissen um die potentiell genetische Ursache des Diabetes mellitus bei den Patienten wichtig, um das Risiko der übrigen Familienmitglieder zu beurteilen und ggf. die DNA der Familienmitglieder zu untersuchen. Falls die entsprechende Mutation schon bekannt sein sollte, ist es eventuell bis zu einem gewissen Grade möglich, den weiteren Verlauf der Erkrankung ggf. abzuschätzen⁷⁴. Die Identifikation der genetischen Ursache sowie die Phänotyp Charakterisierung kann dabei zu neuen Erkenntnissen über die Regulation der Beta-Zelle und der Insulinsekretion führen. In der folgenden Arbeit wurden Mutationen in einem Gen *PCBD1* identifiziert, die zu einem Antikörper negativen Diabetes mellitus Typ 1 führen, näher charakterisiert.

(Die folgende Publikation ist im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

Recessive mutations in PCBD1 cause a new type of early-onset diabetes

Simaite D, Kofent J, Gong M, Rüschen-dorf F, Jia S, Arn P, Bentler K, Ellaway C,

Kühnen P, Hoffmann GF, Blau N, Spagnoli FM, Hübner N, Raile K

Diabetes, Oct/2014, p.3557-64, 63(10)

Link: <https://doi.org/10.2337/db13-1784>

3. Diskussion

Die Entwicklung von Adipositas sowie Störungen der Insulinsekretion gehören zu den häufigsten Stoffwechselerkrankungen und spielen eine besondere Rolle für das Gesundheitssystem und als Todesursache. Aus diesem Grunde ist die Aufklärung von pathophysiologischen Zusammenhängen und Entwicklung neuer Diagnostikmethoden und Therapieoptionen relevant.

3.1 Therapie von POMC defizienten Patienten mit einem MC-4R Agonist

Mutationen im *POMC* Gen führen zu frühmanifestester, extremer Adipositas. Ein Problem für diese Patienten besteht darin, dass sowohl konservative Behandlungsmethoden (vermehrte Bewegung und reduzierte Kalorienzufuhr) als auch eine bariatrische Operation nicht zu einer längerfristigen Gewichtsabnahme führen, da die omnipräsente Hyperphagie immer wieder zu einem Anstieg des Körpergewichtes führt. Aus diesem Grunde erfolgte die Behandlung von zwei POMC defizienten Patientinnen mit dem MC-4R Agonisten Setmelanotide (RM-493) im Rahmen einer „investigator initiated“, Phase II Studie. Diese Therapie führte zu einer Normalisierung des Hungergefühls, zu einer Verbesserung der Stoffwechselsituation und zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität. Das Medikament wurde gut vertragen und es kam bisher zu keinen schweren Nebenwirkungen. Allerdings führte die Aktivierung des MC-1 Rezeptors durch das Medikament zu einer vermehrten Hautpigmentierung und zu einer Veränderung der Haarfarbe.

Der Effekt dieser Behandlung ist vergleichbar mit der Leptin Behandlung von Leptin defizienten Patienten²⁹. In beiden Fällen wird im Prinzip der fehlende Botenstoff (Leptin bzw. MSH) ersetzt. Dadurch wird das durch die Genmutation eingeschränkte System des Leptin-Melanokortin Signalweges wieder funktionsfähig. Nach der Beschreibung der Leptin Behandlung vor etwa 20 Jahren wurde die Hoffnung geäußert, dass Leptin eine medikamentöse Therapie auch für andere Adipositasformen darstellen könnte^{75,76}. Diese Erwartungen wurden nicht erfüllt. Der Grund hierfür ist die Beobachtung, dass Leptin proportional zur Fettmasse produziert wird und dementsprechend hohe Leptinkonzentrationen bei den adipösen Patienten auf die Leptin Rezeptoren im Hypothalamus wirken. Man postuliert, dass sich auf diese Weise eine Leptin Resistenz entwickelt^{77,78}. Eine zusätzliche Gabe von Leptin

führt deshalb nicht zu einer vermehrten Aktivierung des Leptin Rezeptors. Seit wenigen Jahren wurden im Tiermodell Medikamente zur Verbesserung der Leptin Signalisierung getestet. In den publizierten Arbeiten führte beispielsweise die Gabe von Celastrol zu einer Reduktion des Gewichtes im Mausmodell^{79,80}. In wie weit derartige Medikamente auch bei adipösen Patienten eingesetzt werden können, ist Gegenstand von klinischen Studien.

Abgesehen davon bedeutet bei adipösen Individuen die Entwicklung einer Leptin Resistenz, dass die Signalisierung des Leptin Rezeptors und damit auch die Aktivierung der POMC Neurone und die Produktion von MSH eingeschränkt sein sollte. Dies würde dazu führen, dass sowohl bei Leptin resistenten Personen als auch Patienten mit einer Leptin Rezeptor Mutation ein partieller MSH Mangel vorliegen könnte. Wenn diese Hypothese stimmt, dann kämen diese Patienten und auch die Patienten mit einer eingeschränkten POMC Funktion basierend auf einer POMC Hypermethylierung (siehe 3.2), als mögliche Probanden für eine medikamentöse Therapie mit dem MC-4R Agonisten Setmelanotide in Frage. Zum aktuellen Zeitpunkt werden im Rahmen der klinischen Prüfung nach AMG drei Patienten mit einer Mutation im Leptin Rezeptor behandelt. Diese und zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob der MC-4 Rezeptor Agonist wirksam und sicher auch bei anderen Adipositasformen angewendet werden kann.

3.2 POMC DNA Methylierung

Das *POMC* Gen spielt eine bedeutende Rolle für die Regulation des Körpergewichtes. Bereits in Tiermodellen wurden Veränderungen der POMC DNA Methylierung mit der Entwicklung von Adipositas in Verbindung gebracht⁸¹⁻⁸³. In zwei vorliegenden Arbeiten^{84,85} wurde eine vermehrte DNA Methylierung in einer bestimmten Region des *POMC* Gens (Intron 2 – Exon 3 Übergang) sowohl in DNA aus Blutzellen als auch in MSH positiven Neuronen des Hypothalamus bei adipösen Kindern bzw. Erwachsenen identifiziert. Es zeigte sich, dass diese *POMC* Genregion die Kriterien für ein sogenanntes metastabiles Epiallel erfüllt. Metastabile Epiallele sind sowohl bei Nagetieren als auch beim Menschen identifiziert worden⁸⁶. Es handelt sich um Regionen, in denen die DNA Methylierung stochastisch im Laufe der Embryonalentwicklung entsteht. Sie können von dem Vorhandensein von transposablen Elementen abhängen, einem paternalen oder maternalen Einfluss

unterliegen und eine große inter-individuelle Variabilität aufweisen, wobei sich die DNA Methylierung nicht im Laufe des Lebens verändert. Darüber hinaus wurde eine Abhängigkeit von dem C1 Metabolismus intrauterin beschrieben. Einer der bekanntesten Beispiele für die biologische Relevanz dieser metastabilen Epiallele ist das *A^{vy/a}* Mausmodell^{87,88}. In diesem Mausstamm liegt ein transposables Element (IAP = intrazisternales A Partikel) im Promoter des *Agouti* Gens. Je nach Methylierungsintensität dieses transposablen Elementes kommt es zu einer Überexpression des *Agouti* Gens und somit zu der Entwicklung von Adipositas und einer hellen Fellfarbe. Diese Befunde weisen Parallelen zu den Daten über die POMC Methylierung auf. Auch hier gibt es eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von transposablen Elementen (in diesem Fall Alu Elemente) und der DNA Methylierung. Des Weiteren zeigt sich eine Abhängigkeit vom C1 Metabolismus und eine Stabilität des DNA Methylierungsmusters nach der Geburt.

Man könnte deshalb die Hypothese vertreten, dass durch die Integration der Alu Elemente in diese *POMC* Region es zu einer vermehrten DNA Methylierung im *POMC* Intron-Bereich kommt, um die Aktivität der Alu Elemente zu hemmen. Ein derartiger Zusammenhang zwischen den transposablen Elementen und der DNA Methylierung wurde bereits beschrieben⁸⁹. Es wurde auch eine Erkrankung identifiziert, in der - ganz ähnlich wie bei dem postulierten Szenario - durch die Integration von Alu Elementen im Bereich des *TAF1* Gens es zu einer Veränderung der DNA Methylierung kommt und dadurch die Funktion dieses Gens verändert wird. Es entsteht dadurch eine syndromale Erkrankung mit Dystonien⁹⁰.

Vermutlich regulieren verschiedene Faktoren die DNA Methylierung des *POMC* Gens. Es finden sich Hinweise auf stochastische Einflüsse, Abhängigkeiten vom C1 Metabolismus und ein paternaler Einfluss. Diese Faktoren führen zu einer hohen inter-individuellen Variabilität der DNA Methylierung an diesem *POMC* Intron2-Exon3 Übergang. Eine vermehrte DNA Methylierung führt dabei nicht als einzige Ursache zu Adipositas, sondern erhöht das individuelle Risiko für die Entwicklung von Adipositas im Laufe des Lebens. Weitere *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen sind notwendig, um diese Hypothese näher zu untersuchen. Neue Techniken, wie beispielsweise die Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC), könnten hierbei hilfreich sein.

Letztlich kann ein derartiger Pathomechanismus auch bei anderen Krankheiten eine

Rolle spielen. Transposable Elemente spielen eine bedeutende Rolle in der Evolution und machen einen sehr hohen Anteil des humanen Genoms aus^{91,92}. Man könnte daher postulieren, dass es weitere Regionen gibt, in denen beispielsweise durch das Vorliegen eines metastabilen Epiallels auch geringe Unterschiede in der DNA Methylierung zu einer individuellen Risikosteigerung für die Entwicklung häufig vorkommender Erkrankungen führen könnten.

3.3 Diagnostik und Therapie von kongenitalem Hyperinsulinismus

Die Darstellung der betroffenen Region sowie die medikamentöse Einstellung des Blutzuckers von Patienten mit einem angeborenem Hyperinsulinismus stellt eine große Herausforderung dar. Bis zur Etablierung des 18-F-DOPA PET bei angeborenem Hyperinsulinismusformen war es nicht möglich, sicher und präzise die Lokalisation eines Fokus zu bestimmen⁵⁵. Aber – wie beschrieben – kann zwar mit einer hohen Spezifität und Sensitivität das 18-F-DOPA PET zwischen fokaler und diffuser Hyperinsulinismus Form unterscheiden⁹³, aber in Bezug auf die Ausdehnung des Fokus kann es zu Fehleinschätzungen kommen⁹⁴. Dies hängt damit zusammen, dass das 18-F-DOPA PET bei Patienten mit angeborenem Hyperinsulinismus Sekretionsaktivität der Beta-Zellen darstellt und nicht Beta-Zell Masse⁹⁵. Somit kann es sein, dass ein Fokus mit großer Ausdehnung nicht in seiner Gesamtheit detektiert wird. Aus diesem Grunde kommen im Prinzip auch andere Tracer zur bildgebenden Diagnostik bei angeborenem Hyperinsulinismus in Frage. Ein Marker für die Beta-Zell Oberfläche ist ein 68-Ga Somatostatin Rezeptor Tracer (DOTATOC). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass dieser Tracer zumindest bei Insulinomen von Nutzen in der Diagnostik sein kann⁹⁶. Weitere Studien werden zeigen, ob dieser Tracer auch bei Formen eines angeborenem Hyperinsulinismus eingesetzt werden kann und damit eine Alternative zum etablierten 18-F-DOPA PET darstellt.

Abgesehen von der Bildgebung ist die medikamentöse Therapie, falls eine Operation nicht möglich ist, teilweise sehr komplex. Ein etabliertes Medikament ist Somatostatin⁹⁷. Allerdings bedarf es mehrmals täglich subkutaner Injektionen, um den Blutzucker zu stabilisieren. Ein Fortschritt war deshalb die Entwicklung des Somatostatin Depot-Präparates Lanreotide, das bei Patienten mit angeborenem Hyperinsulinismus wirksam ist^{98,99} und in etwa alle 4-6 Wochen verabreicht werden muss. Auch wenn

sich in den letzten Jahren durch eine Verbesserung der Diagnostik und neuen Medikamenten zur Blutzuckereinstellung die Prognose für Patienten mit dieser seltenen Erkrankung des endokrinen Pankreas deutlich verbessert hat, so besteht doch nach wie vor die Notwendigkeit diese neuen Methoden und Therapien zu optimieren.

3.4 Genetische Ursachen für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1

Antikörper negative Formen des Diabetes mellitus Typ 1 gehören zu den seltenen Erkrankungen. In den letzten Jahren hat man diverse Mutationen in zahlreichen Genen identifiziert, die zu einem Diabetes mellitus Typ1 führen^{57,100}. In den in dieser Arbeit eingeschlossenen Arbeiten wurden bei Patienten mit Antikörper negativem Diabetes mellitus Typ 1 Mutationen in dem Gen *PCBD1* nachgewiesen und funktionell charakterisiert¹⁰¹. Durch die Charakterisierung und Identifizierung der Patienten erhofft man sich neue Einblicke in die Funktion dieser Gene im endokrinen Pankreas zu gewinnen. Darüber hinaus können die Ergebnisse auch Hinweise auf die pathophysiologischen Zusammenhänge bei anderen Insulinsekretionsstörungen geben. So wurden Varianten in den Kandidatengenen (u.a. *GATA6* und *INS*) in großen genomweiten Assoziationsstudie im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben^{102,103}.

Ein weiterer Grund, weshalb man die molekularen Ursachen für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1 erkennen möchte, ist die Hoffnung eventuell auch neue Therapieansätze zu finden. Ein Beispiel hierfür ist die Identifizierung von Patienten mit *ABCC8* bzw. *KCNJ11* Mutationen. Träger dieser Mutationen, die zu neonatalem Diabetes mellitus führen, können mit Sulfonylharnstoffen behandelt werden und bedürfen nicht zwingend einer Insulin Substitutionstherapie⁷³. Auch wenn diese Beispiele – wie auch die Therapie mit einem MC-4R Agonist bei Patienten mit einer *POMC* Mutation – selten sind, so zeigen sie doch auf, dass es im Interesse der Patienten ist, weiter nach den molekularen Ursachen zu suchen.

4. Zusammenfassung

Adipositas und Störungen der Insulinsekretion sind zwei bedeutende endokrine Erkrankungen.

In Bezug auf die Regulation des Körpergewichtes konnte eine epigenetische Variante im *POMC* Gen als metastabiles Epiallel bei adipösen Patienten detektiert werden, die mit einem erhöhten individuellen Risiko für die Entwicklung von Adipositas im Laufe des Lebens assoziiert ist. Des Weiteren wurde im Rahmen einer „investigator initiated“ Phase II Studie die Behandlung von *POMC* defizienten Patienten mit einem MC-4R Agonisten durchgeführt. Die Behandlung führte zu einer Reduktion des Körpergewichtes von mehr als 50 kg innerhalb eines Jahres und zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität in den bisher behandelten Patienten. Basierend auf diesen Daten wird eine Zulassungsstudie für dieses Präparat begonnen werden.

Abgesehen von der medikamentösen Therapie von Patienten mit monogener Adipositas, wurde darüber hinaus das neue Somatostatin-Depotpräparat Lanreotide bei Patienten mit einem angeborenen Hyperinsulinismus untersucht. Es zeigte sich, dass Lanreotide zu einer Stabilisierung des Blutzuckers führte und das Risiko für Hypoglykämien senkte. Des Weiteren wurden die bildgebenden Techniken für fokale Formen eines angeborenen Hyperinsulinismus näher untersucht und aufgezeigt, dass bei großen Fokusformen keine sichere Darstellung gewährleistet ist. Als Alternative scheint ein Tracer in Frage zu kommen, der an die Somatostatin Rezeptoren auf der Beta-Zelle bindet und somit Beta-Zell Masse darstellen könnte (DOTATOC). Dieses Prinzip wurde bei Patienten mit einem Insulinom untersucht.

Schließlich wurden Mutationen in dem Gen *PCBD1* bei Patienten mit Antikörper negativen Diabetes mellitus Typ 1 Formen identifiziert. Es erfolgte eine funktionelle Charakterisierung der gefunden genetischen Varianten, und es wurden so neue Erkenntnisse über die Regulation der Beta-Zelle gewonnen.

Mutationen in bestimmten Genen wie z.B. bei dem *POMC* Gen führen zu einem eindeutigen Phänotyp mit frühmanifestester Adipositas. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Modifikationen der Genexpression, wie beispielsweise durch epigenetische Varianten, zu einer teilweise eingeschränkten Funktion des Gens und damit zu einem milden Phänotyp führen können, wie das Beispiel der *POMC* Hypermethylierung von adipösen Patienten aufzeigt. Des Weiteren ergeben sich aus

neuen Therapieoptionen von seltenen Erkrankungen – wie die Behandlung von POMC defizienten Patienten mit einem MC-4R Agonisten – möglicherweise neue Behandlungsmöglichkeiten für ähnliche Erkrankungen. So wurden beispielsweise Patienten mit einer *LEPR* Mutation in die Studie zur Behandlung mit dem MC-4R Agonisten eingeschlossen.

Letztlich implizieren die vorgestellten Ergebnisse, dass die hier beschriebenen Beobachtungen auch für die häufig auftretenden Erkrankungen (Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2) von Bedeutung sein könnten. Es ergibt sich beispielsweise die Frage, wie viele adipöse Patienten eine POMC Hypermethylierung aufweisen und ob auch allgemein Leptin resistente, adipöse Patienten von einer Behandlung mit dem MC-4R Agonisten Setmelanotide profitieren könnten. Darüber hinaus könnte der DOTATOC Tracer, der hier bei Insulinomen eine Anwendung gefunden hat, auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 2 ggf. die Masse der noch vorhandenen Beta-Zellen darstellen. Ein ähnliches Prinzip wird zur Zeit mit einem Tracer Exendin-4 gegen den GLP-1 Rezeptor untersucht¹⁰⁴. „*From rare to common*“ als Prinzip für eine individualisierte Diagnostik und Therapie von Patienten könnte in den kommenden Jahren eventuell zu einer Verbesserung der Versorgung und der Prognose der Patienten führen.

5. Literaturangaben

1. Bhaskaran, K., *et al.* Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. *Lancet* **384**, 755-765 (2014).
2. Lehnert, T., Streltchenia, P., Konnopka, A., Riedel-Heller, S.G. & König, H.H. Health burden and costs of obesity and overweight in Germany: an update. *Eur J Health Econ* **16**, 957-967 (2015).
3. Maes, H.H., Neale, M.C. & Eaves, L.J. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* **27**, 325-351 (1997).
4. Stunkard, A.J., Foch, T.T. & Hrubec, Z. A twin study of human obesity. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **256**, 51-54 (1986).
5. Stunkard, A.J., Harris, J.R., Pedersen, N.L. & McClearn, G.E. The body-mass index of twins who have been reared apart. *The New England journal of medicine* **322**, 1483-1487 (1990).
6. Halaas, J.L., *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**, 543-546 (1995).
7. Pellemounter, M.A., *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**, 540-543 (1995).
8. Montague, C.T., *et al.* Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **387**, 903-908 (1997).
9. Clement, K., *et al.* A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**, 398-401 (1998).
10. Krude, H., *et al.* Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* **19**, 155-157 (1998).
11. Jackson, R.S., *et al.* Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* **16**, 303-306 (1997).
12. Yeo, G.S., *et al.* A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* **20**, 111-112 (1998).
13. Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B. & Froguel, P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* **20**, 113-114 (1998).
14. Zhang, Y., *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994).
15. Stevens, A. & White, A. ACTH: cellular peptide hormone synthesis and secretory pathways. *Results Probl Cell Differ* **50**, 63-84 (2010).
16. van der Klaauw, A.A. & Farooqi, I.S. The hunger genes: pathways to obesity. *Cell* **161**, 119-132 (2015).
17. Stutzmann, F., *et al.* Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. *Diabetes* **57**, 2511-2518 (2008).
18. Friedman, J. 20 years of leptin: leptin at 20: an overview. *J Endocrinol* **223**, T1-8 (2014).
19. Conde, J., *et al.* An update on leptin as immunomodulator. *Expert Rev Clin Immunol* **10**, 1165-1170 (2014).
20. Chehab, F.F. 20 years of leptin: leptin and reproduction: past milestones, present undertakings, and future endeavors. *J Endocrinol* **223**, T37-48 (2014).

21. Smith, A.I. & Funder, J.W. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrine reviews* **9**, 159-179 (1988).
22. Krude, H., *et al.* Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 4633-4640 (2003).
23. Farooqi, I.S., *et al.* Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes* **55**, 2549-2553 (2006).
24. Appelhans, B.M., Moss, O.A. & Cerwinski, L.A. Systematic review of paediatric weight management interventions delivered in the home setting. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **17**, 977-988 (2016).
25. Spear, B.A., *et al.* Recommendations for treatment of child and adolescent overweight and obesity. *Pediatrics* **120 Suppl 4**, S254-288 (2007).
26. Ells, L.J., *et al.* Surgery for the treatment of obesity in children and adolescents. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD011740 (2015).
27. Valsamakis, G., Konstantakou, P. & Mastorakos, G. New Targets for Drug Treatment of Obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **57**, 585-605 (2017).
28. Mead, E., *et al.* Drug interventions for the treatment of obesity in children and adolescents. *The Cochrane database of systematic reviews* **11**, CD012436 (2016).
29. Farooqi, I.S., *et al.* Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* **341**, 879-884 (1999).
30. Paz-Filho, G., Mastronardi, C.A. & Licinio, J. Leptin treatment: facts and expectations. *Metabolism: clinical and experimental* **64**, 146-156 (2015).
31. Hukshorn, C.J., *et al.* Weekly subcutaneous pegylated recombinant native human leptin (PEG-OB) administration in obese men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**, 4003-4009 (2000).
32. Heymsfield, S.B., *et al.* Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* **282**, 1568-1575 (1999).
33. Myers, M.G., Cowley, M.A. & Munzberg, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* **70**, 537-556 (2008).
34. Krishna, R., *et al.* Potent and selective agonism of the melanocortin receptor 4 with MK-0493 does not induce weight loss in obese human subjects: energy intake predicts lack of weight loss efficacy. *Clinical pharmacology and therapeutics* **86**, 659-666 (2009).
35. Fani, L., Bak, S., Delhanty, P., van Rossum, E.F. & van den Akker, E.L. The melanocortin-4 receptor as target for obesity treatment: a systematic review of emerging pharmacological therapeutic options. *Int J Obes (Lond)* **38**, 163-169 (2014).
36. Frayling, T.M., *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* **316**, 889-894 (2007).
37. Dina, C., *et al.* Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature genetics* **39**, 724-726 (2007).
38. Loos, R.J. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**, 211-226 (2012).
39. Locke, A.E., *et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* **518**, 197-206 (2015).

40. Eichler, E.E., *et al.* Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet* **11**, 446-450 (2010).
41. Singal, R. & Ginder, G.D. DNA methylation. *Blood* **93**, 4059-4070 (1999).
42. Jenuwein, T. & Allis, C.D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080 (2001).
43. Reik, W., Dean, W. & Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093 (2001).
44. Baylin, S.B. & Jones, P.A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nature reviews. Cancer* **11**, 726-734 (2011).
45. Horsthemke, B. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **154C**, 321-328 (2010).
46. Horsthemke, B. In brief: genomic imprinting and imprinting diseases. *J Pathol* **232**, 485-487 (2014).
47. Cordero, P., Li, J. & Oben, J.A. Epigenetics of obesity: beyond the genome sequence. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **18**, 361-366 (2015).
48. Talens, R.P., *et al.* Variation, patterns, and temporal stability of DNA methylation: considerations for epigenetic epidemiology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 3135-3144 (2010).
49. Horvath, S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* **14**, R115 (2013).
50. Jaeger, K., Saben, J.L. & Moley, K.H. Transmission of Metabolic Dysfunction Across Generations. *Physiology (Bethesda)* **32**, 51-59 (2017).
51. Ng, S.F., *et al.* Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* **467**, 963-966 (2010).
52. Ost, A., *et al.* Paternal diet defines offspring chromatin state and intergenerational obesity. *Cell* **159**, 1352-1364 (2014).
53. Vora, S., Chandran, S., Rajadurai, V.S. & Hussain, K. Hyperinsulinemic Hypoglycemia in Infancy: Current Concepts in Diagnosis and Management. *Indian Pediatr* **52**, 1051-1059 (2015).
54. Rozenkova, K., Guemes, M., Shah, P. & Hussain, K. The Diagnosis and Management of Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* **7**, 86-97 (2015).
55. Otonkoski, T., *et al.* Noninvasive diagnosis of focal hyperinsulinism of infancy with [18F]-DOPA positron emission tomography. *Diabetes* **55**, 13-18 (2006).
56. Hussain, K. Diagnosis and management of hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Hormone research* **69**, 2-13 (2008).
57. Vaxillaire, M. & Froguel, P. Monogenic diabetes: Implementation of translational genomic research towards precision medicine. *J Diabetes* **8**, 782-795 (2016).
58. Gloyn, A.L., Siddiqui, J. & Ellard, S. Mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat* **27**, 220-231 (2006).
59. Elks, C.E., *et al.* Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**, 29 (2012).
60. Yang, J., *et al.* Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index. *Nature genetics* **47**, 1114-1120 (2015).
61. van Dijk, S.J., Tellam, R.L., Morrison, J.L., Muhlhausler, B.S. & Molloy, P.L. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clin Epigenetics* **7**, 66 (2015).

62. Radford, E.J., *et al.* In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science* **345**, 1255903 (2014).
63. Zheng, J., *et al.* Maternal and post-weaning high-fat, high-sucrose diet modulates glucose homeostasis and hypothalamic POMC promoter methylation in mouse offspring. *Metab Brain Dis* **30**, 1129-1137 (2015).
64. Crujeiras, A.B., *et al.* Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: a translational study. *Regul Pept* **186**, 1-6 (2013).
65. Birney, E., Smith, G.D. & Greally, J.M. Epigenome-wide Association Studies and the Interpretation of Disease -Omics. *PLoS Genet* **12**, e1006105 (2016).
66. Lienert, F., *et al.* Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nat Genet* **43**, 1091-1097 (2011).
67. Levesque, M.L., *et al.* Genome-wide DNA methylation variability in adolescent monozygotic twins followed since birth. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **9**, 1410-1421 (2014).
68. Hatoum, I.J., *et al.* Melanocortin-4 receptor signaling is required for weight loss after gastric bypass surgery. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **97**, E1023-1031 (2012).
69. Moore, B.S., *et al.* Long-term weight-loss in gastric bypass patients carrying melanocortin 4 receptor variants. *PloS one* **9**, e93629 (2014).
70. Hainerova, I.A. & Lebl, J. Treatment options for children with monogenic forms of obesity. *World review of nutrition and dietetics* **106**, 105-112 (2013).
71. Pearson, E.R., *et al.* Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* **362**, 1275-1281 (2003).
72. Stanik, J., *et al.* Prevalence of permanent neonatal diabetes in Slovakia and successful replacement of insulin with sulfonylurea therapy in KCNJ11 and ABCC8 mutation carriers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 1276-1282 (2007).
73. Pearson, E.R., *et al.* Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *The New England journal of medicine* **355**, 467-477 (2006).
74. Hattersley, A.T. & Patel, K.A. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. *Diabetologia* **60**, 769-777 (2017).
75. Walder, K., Hanson, R.L., Kobes, S., Knowler, W.C. & Ravussin, E. An autosomal genomic scan for loci linked to plasma leptin concentration in Pima Indians. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**, 559-565 (2000).
76. Bray, G.A. & Tartaglia, L.A. Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature* **404**, 672-677 (2000).
77. Konner, A.C. & Bruning, J.C. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell metabolism* **16**, 144-152 (2012).
78. Munzberg, H. Leptin-signaling pathways and leptin resistance. *Forum of nutrition* **63**, 123-132 (2010).
79. Liu, J., Lee, J., Salazar Hernandez, M.A., Mazitschek, R. & Ozcan, U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell* **161**, 999-1011 (2015).
80. Lee, J., *et al.* Withaferin A is a leptin sensitizer with strong antidiabetic properties in mice. *Nature medicine* **22**, 1023-1032 (2016).
81. Plagemann, A., *et al.* Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of physiology* **587**, 4963-4976 (2009).

82. Stevens, A., *et al.* Epigenetic changes in the hypothalamic proopiomelanocortin and glucocorticoid receptor genes in the ovine fetus after periconceptual undernutrition. *Endocrinology* **151**, 3652-3664 (2010).
83. Marco, A., Kisliouk, T., Tabachnik, T., Weller, A. & Meiri, N. DNA CpG Methylation (5-Methylcytosine) and Its Derivative (5-Hydroxymethylcytosine) Alter Histone Posttranslational Modifications at the Pomc Promoter, Affecting the Impact of Perinatal Diet on Leanness and Obesity of the Offspring. *Diabetes* **65**, 2258-2267 (2016).
84. Kuehnen, P., *et al.* An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. *PLoS Genet* **8**, e1002543 (2012).
85. Kuehnen, P., *et al.* Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity. *Cell Metab* **24**, 502-509 (2016).
86. Rakyant, V.K., Blewitt, M.E., Druker, R., Preis, J.I. & Whitelaw, E. Metastable epialleles in mammals. *Trends Genet* **18**, 348-351 (2002).
87. Waterland, R.A. & Jirtle, R.L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* **23**, 5293-5300 (2003).
88. Morgan, H.D., Sutherland, H.G., Martin, D.I. & Whitelaw, E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* **23**, 314-318 (1999).
89. Friedli, M. & Trono, D. The developmental control of transposable elements and the evolution of higher species. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**, 429-451 (2015).
90. Makino, S., *et al.* Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *American journal of human genetics* **80**, 393-406 (2007).
91. Ule, J. Alu elements: at the crossroads between disease and evolution. *Biochem Soc Trans* **41**, 1532-1535 (2013).
92. Ichihyanagi, K. Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements, SINEs. *Genes Genet Syst* **88**, 19-29 (2013).
93. Mohnike, K., *et al.* Proposal for a standardized protocol for 18F-DOPA-PET (PET/CT) in congenital hyperinsulinism. *Hormone research* **66**, 40-42 (2006).
94. Kuehnen, P., *et al.* Occurrence of giant focal forms of congenital hyperinsulinism with incorrect visualization by (18) F DOPA-PET/CT scanning. *Clin Endocrinol (Oxf)* **81**, 847-854 (2014).
95. Ismail, D. & Hussain, K. Role of 18F-DOPA PET/CT imaging in congenital hyperinsulinism. *Rev Endocr Metab Disord* **11**, 165-169 (2010).
96. Prasad, V., *et al.* Role of (68)Ga somatostatin receptor PET/CT in the detection of endogenous hyperinsulinaemic focus: an explorative study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **43**, 1593-1600 (2016).
97. Kapoor, R.R., James, C. & Hussain, K. Advances in the diagnosis and management of hyperinsulinemic hypoglycemia. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **5**, 101-112 (2009).
98. Modan-Moses, D., Koren, I., Mazor-Aronovitch, K., Pinhas-Hamiel, O. & Landau, H. Treatment of congenital hyperinsulinism with lanreotide acetate (Somatuline Autogel). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **96**, 2312-2317 (2011).
99. Kuehnen, P., *et al.* Long-term lanreotide treatment in six patients with congenital hyperinsulinism. *Hormone research in paediatrics* **78**, 106-112 (2012).

100. Flannick, J., Johansson, S. & Njolstad, P.R. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. *Nature reviews. Endocrinology* **12**, 394-406 (2016).
101. Simaite, D., *et al.* Recessive mutations in PCBD1 cause a new type of early-onset diabetes. *Diabetes* **63**, 3557-3564 (2014).
102. Fuchsberger, C., *et al.* The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature* **536**, 41-47 (2016).
103. Taneera, J., *et al.* A systems genetics approach identifies genes and pathways for type 2 diabetes in human islets. *Cell metabolism* **16**, 122-134 (2012).
104. Zhang, Y. & Chen, W. Radiolabeled glucagon-like peptide-1 analogues: a new pancreatic beta-cell imaging agent. *Nucl Med Commun* **33**, 223-227 (2012).

6. Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Familie Theda Wessel, Pontus, Florens und Eva Kühnen sowie bei meinen Eltern Hanne und Gerd Kühnen und meiner Tante Maria van Aerssen für ihre Unterstützung bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Rita Oeltjen, Prof. Heike Biebermann und PD Dr. Klemens Raile sowie dem gesamten Team des Instituts für experimentelle pädiatrische Endokrinologie. Wichtig ist mir der Dank an Dr. Oliver Blankenstein, PD Dr. Susanna Wiegand und Prof. Dr. Annette Grüters für Ihre Unterstützung, die wunderbare Zusammenarbeit und der eröffneten Möglichkeiten. Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Heiko Krude für seine Unterstützung, sein Vertrauen und die Möglichkeit zur anregenden Diskussion bedanken.

7. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, 07.07.2017

.....

Datum

.....

Unterschrift