

Universität Ulm  
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Prof. Dr. med. K. - M. Debatin

---

**Hereditäres Diabetes-Syndrom mit urogenitalem  
Phänotyp. Analyse von HNF1beta und anderen  
Kandidatengen.**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Ulm

Katrina Olga Scholl  
Augsburg

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. K. - M. Debatin  
1. Berichterstatter: PD Dr. med. B. Karges  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Keller  
Tag der Promotion: 19.01.2007

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Diabetes im Kindes- und Jugendalter	7
1.2	Hereditäre Diabetesform: MODY	8
1.3	Verteilung und klinische Präsentation von MODY	11
1.4	Netzwerk der Transkriptionsfaktoren und Kandidatengene für MODY X	14
1.5	Fragestellung	17
<b>2</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Patientenauswahl	18
2.2	Spezielle Diabetesdiagnostik	18
2.3	Weitere klinische, funktionelle und morphologische Diagnostik	21
2.4	Polymerasekettenreaktion und Sequenzanalyse	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1	Klinische Präsentation der Patienten	27
3.2	Analyse des Glukosemetabolismus	29
3.3	Morphologische und funktionelle Charakteristika	33
3.4	Molekulargenetische Ergebnisse und Genotypisierung	36
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	Familiäres Diabetessyndrom mit Störung der Insulinsekretion	43
4.2	HNF1b-ähnlicher Phänotyp und familiäre Schilddrüsenzysten	44
4.3	Kandidatengenanalyse MODY X	45
4.4	Ausblick und klinische Relevanz	46
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>56</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropisches Hormon
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BETA2	Beta-Cell E-Box Transactivator 2
BMI	Body Mass Index
Bp	Basenpaare
BZ	Blutzucker
cDNA	Komplementäre DNA
CDS	Kodierende Sequenz
COUP-TF	Chicken-Ovalbumin-Upstream-Promoter Transcriptionfactor
ddNTP	Didesoxynukleotid
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Ex	Exon
fhGCKD	Familiäre hypoplastische glomerulozystische Nierenerkrankung
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
ft3	Freies Trijodthyronin
ft4	Freies Thyroxin
G6P	Glukose-6-Phosphat
GAD65	Glutamat-Decarboxylase, 65 kDa
GCK	Glukokinase
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GLUT2	Glukose-Transporter 2
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transferase
HbA1c	Glykosiliertes Hämoglobin A1c
HDL	High Density Lipoprotein
HNF	Hepatic (Hepytocyte) Nuclear Factor
HOMA	Homeostasis model assessment
HPLC	High performance liquid chromatography

IA-2	Tyrosin-Phosphatase
IAA	Insulin Autoantikörper
IAPP	Insel-Amyloid-Polypeptid
ICA	Inselzellantikörper
IFG	Gestörte Nüchtern glukose (Impaired Fasting Glucose)
IgA	Immunglobulin A
IGT	Gestörte Glukosetoleranz
IPF-1	Insulin Promoting Faktor 1
ISI(comp)	Composite whole body insulin sensitivity index
Da	Dalton (Molekularmasse)
LDL	Low Density Lipoprotein
LETf	Liver Enriched Transcription Factors
LH	Luteinisierendem Hormon
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NeuroD1	Neurogenic Differentiationfactor 1
OGTT	Oraler Glukose-Toleranz-Test
P	Perzentile
Prom	Promoter
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKL	Pyruvat-Kinase vom Typ L
POU-Domäne	DNA Bindungsmotiv; Initialien der Proteine Pit-1, Oct-1, Unc-86
PPIIns	Prä-Pro-Insulin
QMPSF	Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments
RIA	Radio Immuno Assay
T1D	Typ 1 Diabetes mellitus
T2D	Typ 2 Diabetes mellitus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAQ-Polymerase	Polymerase des Thermus aqaticus
TF	Transkriptionsfaktor
TgAK	Thyreoglobulin Antikörper
TPO-AK	Thyroid-Peroxidase Antikörper
TRAK	TSH-Rezeptor Antikörper
TSH	Thyreotropin
UTR	Untranslatierte Region
Var	Variante

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes im Kindes- und Jugendalter

Bei ca. 5% der Deutschen wurde bisher ein Diabetes mellitus diagnostiziert. Ca. 5% davon sind Kinder und Jugendliche, die v.a. an dem Typ 1 Diabetes (T1D) leiden (Spinas 2000). Der T1D zeichnet sich durch eine immunologisch vermittelte oder ideopathische Zerstörung der Betazellen mit einem daraus resultierenden absoluten Insulinmangel aus. Zur Zeit sind damit in Deutschland ca. 10.000 – 15.000 Kinder und Jugendliche im Alter von 0 bis 15 Jahren bzw. 21.000 – 24.000 im Alter von 0 bis 19 Jahren von einem T1D betroffen. Jährlich erkranken weitere ca. 2.200 Kinder und Jugendliche in Deutschland neu an T1D (Badenhoop u. Boehm 2004, Danne et al. 2004).

Seit einigen Jahren werden bei Kindern und Jugendlichen zunehmend auch andere Formen des Diabetes (Tabelle 1), wie z.B. der Typ 2 Diabetes (T2D) beobachtet. Diese Diabetesform wurde bisher vor allem als Krankheit des älteren Menschen betrachtet und ist durch eine Insulinresistenz bzw. Sekretionsstörung mit relativem Insulinmangel gekennzeichnet. Es wird geschätzt, dass derzeit ca. 1,57 pro 100.000, d.h. ca. 210 Kinder und Jugendliche im Alter von 5 bis 19 Jahren in Deutschland jährlich neu an T2D erkranken. Wie bei den Erwachsenen zeigt sich auch bei den Jugendlichen eine Assoziation zu Adipositas, Bewegungsmangel und weiteren Formen des sog. metabolischen Syndroms (Danne et al. 2004). Insbesondere konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die genetisch bedingten, nicht immunologischen Formen des Diabetes, wie der Maturity-Onset Diabetes of the Young, weit häufiger vorliegen, als bisher angenommen (Danne et al. 2004).

**Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus. In Anlehnung an (AmericanDiabetesAssociation 2004).**

Weitere Einteilung/ Charakteristika		
<b>I. Typ 1 Diabetes</b>	a. Immunologisch	Autoimmune B-Zell-Zerstörung mit absolutem Insulinmangel
	b. Idiopathisch	Beta-Zellverlust ohne Zeichen einer Immunreaktion
<b>II. Typ 2 Diabetes</b>	Insulinresistenz bis Insulinsekretionsdefekt mit relativem Insulinmangel.	
<b>III. Andere spezifische Diabetes-Typen</b>	Genetische Defekte der Beta-Zell-Funktion	z.B. monogen: Maturity-onset diabetes of the Young (MODY) mitochondrial
	Erkrankungen des exokrinen Pankreas	z.B. Pankreatitis, Trauma, Mukoviszidose
	Endokrine Erkrankungen	z.B. Cushing-Syndrom
	Medikamenteninduzierter Diabetes	z.B. durch Steroide
	Infektionen	z.B. kongenitale Röteln
	Andere seltene genetische Syndrome	z.B. Trisomie 21
<b>IV. Gestationsdiabetes</b>	Erstdiagnose einer Unterform von Diabetes während der Schwangerschaft	

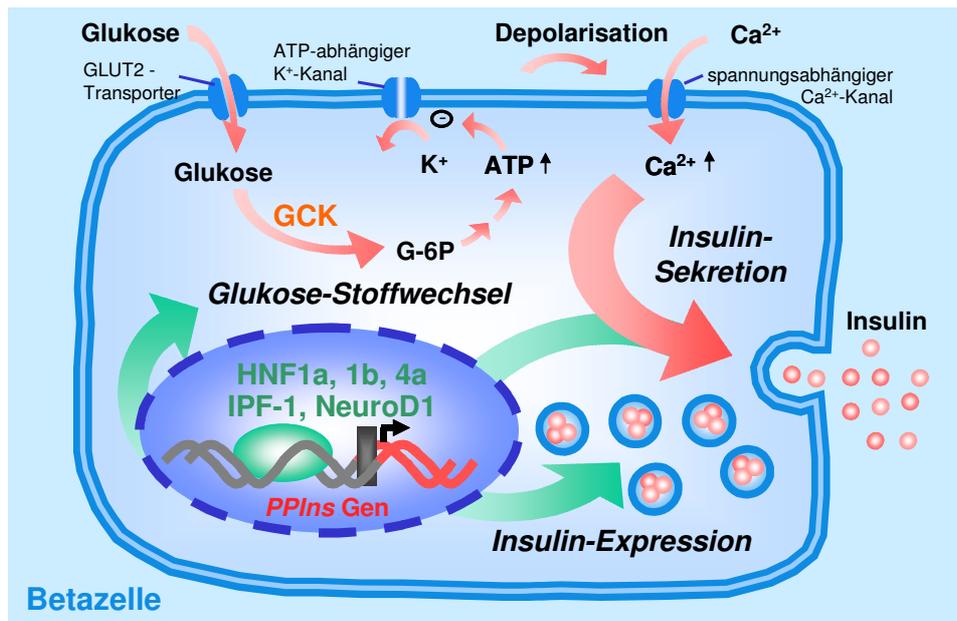
## 1.2 Hereditäre Diabetesform: MODY

Der Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) ist die häufigste genetische Form von Diabetes. Er zeichnet sich durch eine monogene, autosomal-dominant vererbte Betazellfunktionsstörung beim Jugendlichen und jungen Erwachsenen aus und ist charakterisiert durch eine glukoseinduzierte Insulinsekretionsstörung bei zunächst normaler Menge von Insulin (C-Peptid im Normbereich). Klinisch präsentiert sich der MODY eher wie ein T2D, allerdings bei jungen und in der Regel normalgewichtigen Personen. Daneben fehlen die für den T1D typische Ketoazidoseneigung und die diabetesspezifischen Antikörper (Tabelle 2) (Fajans et al. 2001).

**Tabelle 2: Differenzialdiagnostische Kriterien für MODY** in Abgrenzung zu Typ 1 und Typ 2 Diabetes. *Modifiziert nach (Fajans et al. 2001, Tillil et al. 1998). MODY Maturity-Onset Diabetes of the Young.*

	<b>MODY</b>	<b>Typ 1 Diabetes</b>	<b>Typ 2 Diabetes</b>
<b>Manifestationsalter</b>	Meist Jugend- und junges Erwachsenenalter	Meist Kindes- bis junges Erwachsenenalter	Meist mittleres und höheres Erwachsenenalter
<b>Auftreten/Beginn</b>	Eher schleichend	Akut bis subakut	Meist schleichend
<b>Symptome</b>	Häufig keine Beschwerden	Häufig Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, Müdigkeit	Häufig keine Beschwerden
<b>Körpergewicht</b>	Meist normalgewichtig	Meist normalgewichtig	Meist übergewichtig
<b>Ketoseneigung</b>	Fehlend	Ausgeprägt	Fehlend oder nur gering
<b>Insulinsekretion</b>	Gestört (v.a. nach Glukosereiz)	Vermindert bis fehlend	Subnormal bis hoch, qualitativ gestört
<b>Insulinresistenz</b>	Keine (oder nur gering)	Keine (oder nur gering)	Oft ausgeprägt
<b>Erbgang</b>	Monogen, autosomal-dominant	Multifaktoriell (polygen)	Multifaktoriell (polygen, heterogen)
<b>Diabetesassoziierte Antikörper</b>	Meist negativ	Ca. 90 - 95% bei Manifestation	Fehlen
<b>Stoffwechsel</b>	Stabil	Labil	Stabil
<b>Therapieoption</b>	Diät, orale Antidiabetika	Insulin	Orale Antidiabetika, später Insulin

Bisher sind sechs verschiedene Gene identifiziert worden, die eine Form von MODY verursachen können. Beim MODY 2 ist das Schlüsselenzym der Glykolyse in Leber und Pankreas, die Glukokinase (GCK) betroffen (Froguel et al. 1993). Sie ist außerdem verantwortlich für das sog. „Glukosesensing“ der Betazelle (Fajans et al. 2001). Die „hepatic nuclear factors“ HNF4alpha (HNF4a, MODY 1), HNF1alpha (HNF1a, MODY 3) und HNF1beta (HNF1b, MODY 5) gehören zu den sogenannten „liver enriched transcription factors“ (LETf) (Cereghini 1996). Sie wurden zunächst in der Leber identifiziert, werden aber nicht ausschließlich dort exprimiert (Ryffel 2001). Beim MODY 4 ist der „insulin promoting factor“ (IPF-1) und beim MODY 6 der „neurogenic differentiation factor 1“ (NeuroD1) funktionell gestört. All diese Transkriptionsfaktoren beeinflussen entscheidend die Entwicklung, Proliferation und Stoffwechselfunktion der Betazellen des Pankreas und regulieren dort die Expression und Sekretion von Insulin und anderer für die Glukosehomöostase wichtiger Gene (Fajans et al. 2001) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Regulation der Sekretion und Expression von Insulin und Metabolismus der pankreatischen Betazelle. Modifiziert nach (Fajans et al. 2001).** Bestimmte Transkriptionsfaktoren (grün) und die Glukokinase (orange) sind wichtige Regulatoren der Betazellfunktion. Beim MODY liegt eine Störung des intrapancreatischen Glukosemetabolismus der glukoseinduzierten Insulinfreisetzung vor. *ATP* Adenosin-Tris-Phosphat, *Ca<sup>2+</sup>* Calcium, *G6P* Glukose-6-Phosphat, *GLUT2* Glukose-Transporter 2, *HNF* Hepatic Nuclear Factor, *IPF-1* Insulin Promoting Factor 1, *NeuroD1* Neurogenic Differentiation Factor 1, *K<sup>+</sup>* Kalium, *PPIIns* Prä-Pro-Insulin.

*HNF1a* ist mit ca. 60% das am häufigsten betroffene MODY-Gen in Europa (Frayling et al. 2003). Es zählt zu den sog. „Homeodomain“-tragenden „helix-turn-helix“-Transkriptionsfaktoren und wird vor allem in Leber, Niere und im exokrinen wie endokrinen Pankreas exprimiert (Yamagata 2003). Dort reguliert es neben der Expression von Insulin v.a. die des Glukose-Transporter Typ 2 (GLUT2) und der Pyruvat-Kinase vom Typ L (PKL) (Wang et al. 2002). Die Funktion von *HNF1a* scheint im Pankreas besonders vulnerabel für Mutationen zu sein, da es beim MODY3 zwar zur Ausbildung eines Diabetes kommt, die Funktion in anderen Expressionsgeweben, wie z.B. der Leber, weiterhin intakt bleiben (Pearson et al. 2001).

*HNF1b* ist strukturell mit *HNF1a* verwandt und wird außer in der Leber vor allem im endokrinen Pankreas, den Nieren und Geschlechtsorganen exprimiert (Cereghini 1996, Yamagata 2003). Dort wirkt es als Homodimer oder zusammen mit *HNF1a* als Heterodimer auf seine Zielgene, wie z.B. Insulin. Tierversuche zeigten, dass die beiden

Gene trotz ihrer Gemeinsamkeiten sowohl während der Entwicklung als auch im reifen Gewebe zu unterschiedlichen Zeiten exprimiert werden, unterschiedliche Aufgaben übernehmen und die Funktion des anderen nicht kompensieren können (Ryffel 2001). Inaktivierung von HNF1b in Mäusen sind perinatal letal mit Fehldifferenzierung von parietalem und viszeralem Endoderm assoziiert (Ryffel 2001).

*HNF4a* ist ein Mitglied der Steroid-Hormon-Rezeptor Großfamilie und wird in der Leber, den pankreatischen Betazellen, Niere und Dünndarm exprimiert. Es bindet die DNA als Homodimer und aktiviert die Transkription von Insulin, GLUT2, PKL und weiterer für den Glukose- bzw. Lipidstoffwechsel entscheidender Gene (Wang et al. 2000, Yamagata 2003). Verschiedene Expressionsstudien haben gezeigt, dass zwischen HNF4a und HNF1a vor allem im Pankreas eine starke Wechselbeziehung besteht, die unter anderem die ähnliche klinische Präsentation von MODY1 bzw. MODY 3 erklären sollen (Odom et al. 2004, Yamagata 2003).

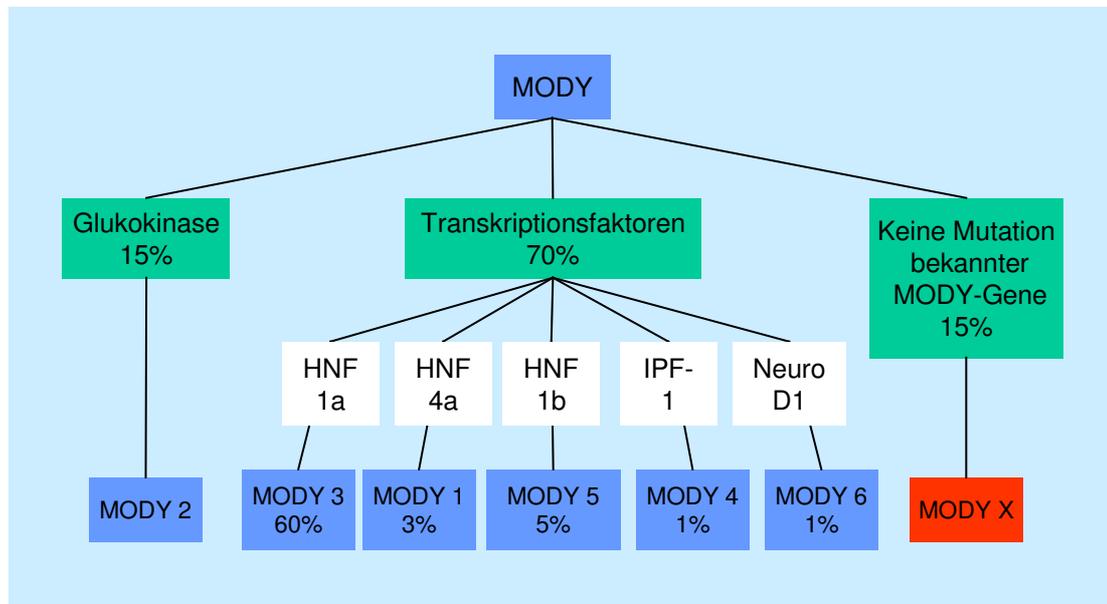
Das Homeodomain-Protein *IPF-1* ist entscheidend für die Entwicklung des Pankreas und die Aufrechterhaltung seiner Funktion (Servitja u. Ferrer 2004, Stoffers et al. 1997, Wang et al. 2002). Im reifen Organismus wird es fast ausschließlich in Betazellen exprimiert und die Expression von Insulin, der GCK, des Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) und des GLUT2 reguliert (Servitja u. Ferrer 2004).

Das basic helix-loop-helix-Protein *NeuroD1*, auch bekannt als beta-cell E-box transactivator 2 (BETA2), ist ebenfalls ein entscheidender Faktor in der Entwicklung der Betazellen des Pankreas. Es reguliert die Expression des Insulin-Gens über die Bindung an ein kritisches E-box Motiv im Insulin-Promoter (Malecki et al. 1999). Außer im endokrinen Pankreas wird NeuroD1 im Darm und im Gehirn exprimiert und ist dort für die Differenzierung von enteroendokrinen Zellen und Neuronen verantwortlich (Naya et al. 1997).

### **1.3 Verteilung und klinische Präsentation von MODY**

Schätzungen zu Folge sind etwa 5% der Typ 2 Diabetiker einem MODY zuzuordnen (Danne et al. 2004, Yamagata 2003). MODY 2 und 3 stellen in Europa mit zusammen knapp 70% die häufigsten Unterformen von MODY dar (Lindgren et al. 2002). Trotz klinisch eindeutigem MODY können derzeit in Europa in etwa 15-20% der Fälle keine Mutationen in den bisher mit MODY assoziierten Genen nachgewiesen werden. Diese

Fälle werden auch als MODY X bezeichnet (Fajans et al. 2001, Frayling et al. 2001, Frayling et al. 2003). Insgesamt wird vermutet, dass weit mehr Patienten von einem MODY betroffen sind, als bisher angenommen (Bellanne-Chantelot et al. 2005).



**Abbildung 2: Verteilung der Genmutationen von MODY und MODY X.** Nach (Lindgren et al. 2002). In der Mehrzahl der Fälle von MODY sind sog. Transkriptionsfaktoren betroffen, mit MODY 3 als häufigste Form überhaupt. Es folgt der MODY 2 mit knapp 15%. Etwa 15% klinischer MODY-Fälle konnten bisher keinem Gen zugeordnet werden. *HNF* Hepatic Nuclear Factor, *MODY* Maturity Onset Diabetes of the Young, *IPF-1* Insulin Promoting Factor 1, *NeuroD1* Neurogenic Differentiation Factor 1.

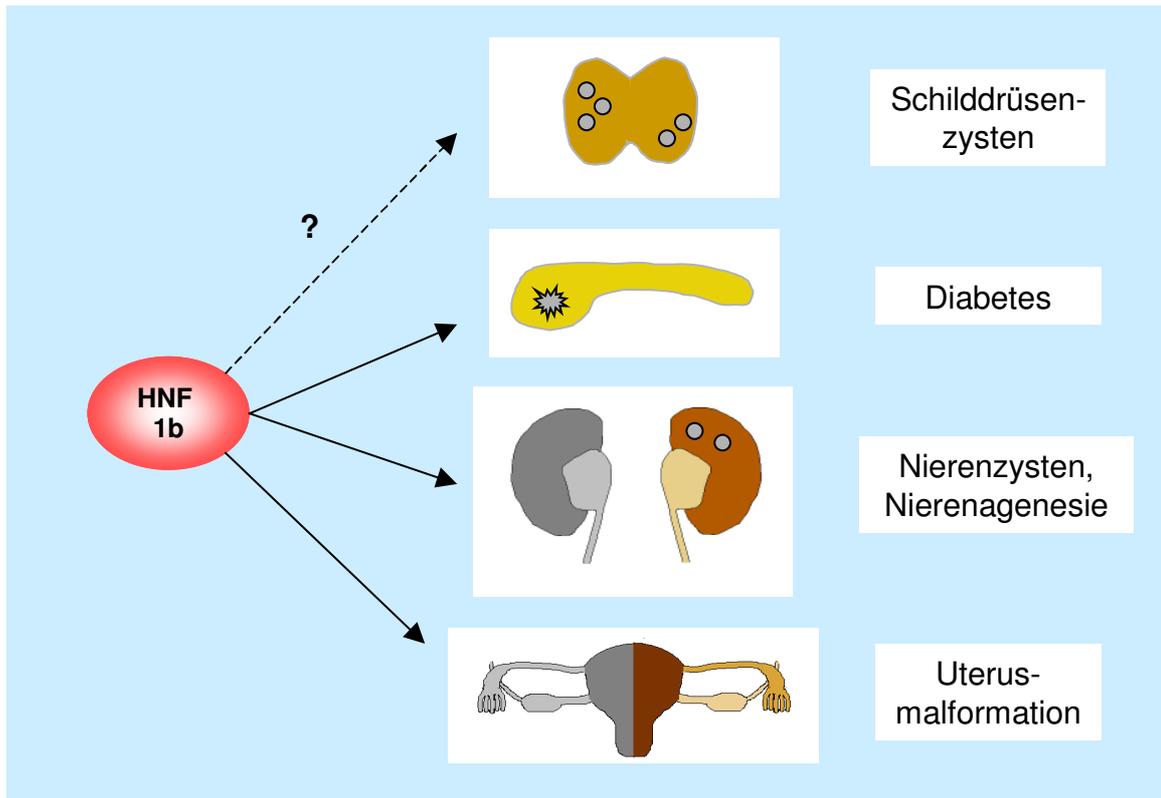
Klinisch unterscheiden sich die einzelnen Formen von MODY vor allem in der Schwere und Progression der Hyperglykämie sowie in ihren extra-pankreatischen Manifestationen (Tabelle 3). Mutationen im GCK-Gen äußern sich z.B. eher in einer milden, relativ stabilen Nüchternhyperglykämie. Dagegen kann der MODY 3 bei Manifestation bereits schwere Hyperglykämien verursachen, neigt zur Progression der Krankheit und birgt ein hohes Risiko zur Entwicklung diabetesbedingter Spätkomplikationen (Pearson et al. 2001). Außerdem kommt es beim MODY 3 schon früh zu einem Fanconi-ähnlichen Syndrom mit hohem renalen Verlust von Glukose, Aminosäuren und Proteinen (Pontoglio et al. 1996). Beim MODY 4 und 6 zeigt sich eine reduzierte Betazellmasse oder ein aplastisches Pankreas (Malecki et al. 1999, Stoffers et al. 1997).

**Tabelle 3: Subtypen des Maturity Onset Diabetes of the Young.**  
 Modifiziert nach (Fajans et al. 2001).

	MODY 2	MODY 1	MODY 3	MODY 4	MODY 5	MODY 6
<b>Betroffenes Gen/ Protein</b>	GCK	HNF4a	HNF1a	IPF-1	HNF1b	NeuroD1/ BETA2
<b>Funktion</b>	Enzym	Transkriptionsfaktoren				
<b>Chromosomale Lage</b>	7p15-13	20q12-13.1	12q24.2	13q12.1	17q-21.3	2q32
<b>Beginn der Hyperglykämie</b>	Bei Geburt	Jugend-/ junges Erwachsenenalter	Jugend-/ junges Erwachsenenalter	Junges Erwachsenenalter	Jugend-/ junges Erwachsenenalter	Jugend-/ junges Erwachsenenalter
<b>Verlauf der Hyperglykämie</b>	Mild, stabil	Schwer, progredient	Schwer, progredient	Progredient	Schwer, progredient	Progredient
<b>Extra-pankreatische Manifestationen</b>	Niedriges Geburtsgewicht	Plasma-Triglyceride und Lipoproteine ↓	Renale Glukosurie (Schwelle ↓), Fanconi-Syndrom	Pankreas-Agenesie bei Homozygoten	Urogenitale Malformation	Reduzierte Betazell-Masse
<b>Erstbeschreiber bezüglich MODY</b>	(Froguel et al. 1993)	(Yamagata et al. 1996a)	(Yamagata et al. 1996b)	(Stoffers et al. 1997)	(Horikawa et al. 1997)	(Malecki et al. 1999)

*BETA2* Beta-cell E-Box transactivator 2, *GCK* Glucokinase, *HNF* Hepatic Nuclear Factor, *IPF-1* Insulin Promoting Factor 1, *NeuroD1* Neurogenic Differentiation Factor1, ↓ reduziert.

Ein besonderes Charakteristikum der Mutationen im HNF1b-Gen ist die Assoziation zu verschiedenen Formen urogenitaler Fehlbildung (Abbildung 3). Renal reicht das Spektrum von singulären Zysten über zystische Nierendysplasie, familiärer hypoplastischer glomerulozystischer Nierenerkrankung (fhGCKD) (Bingham et al. 2000) zu Oligomeganephronie (Bohn et al. 2003). Weibliche Mutationsträger leiden zum Teil an gravierenden Formen der „Müllerschen Aplasie“, wie Vaginal- oder Uterusaplasie (Bellanne-Chantelot et al. 2004, Lindner et al. 1999).

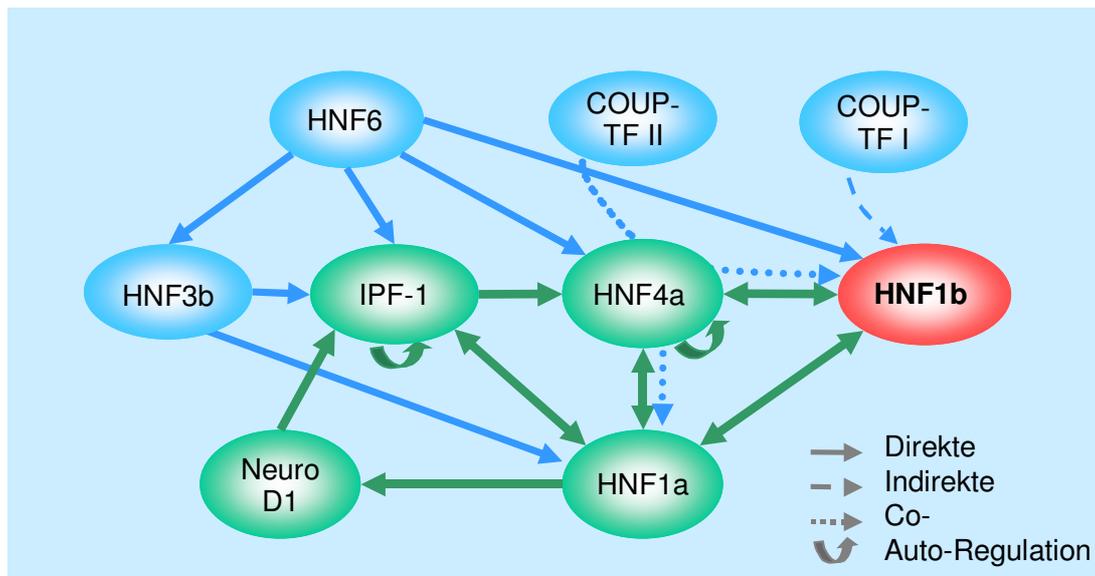


**Abbildung 3: Einfluß von HNF1b auf verschiedene Organsysteme.** Bei Mutationen im HNF1b-Gen bestehen neben Diabetes verschiedene Formen urogenitaler Fehlbildungen. Eine Assoziation zu familiären Schilddrüsenzysten wird hier diskutiert. *HNF* Hepatic Nuclear Factor.

## 1.4 Netzwerk der Transkriptionsfaktoren und Kandidatengene für MODY X

Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung und Funktion des Pankreas durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Duncan et al. 1998, Odom et al. 2004, Servitja u. Ferrer 2004). Insbesondere die mit MODY assoziierten Transkriptionsfaktoren scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen (Odom et al. 2004, Servitja u. Ferrer 2004) (Abbildung 4). IPF-1 z.B. gilt als der wichtigste Faktor der Pankreasentwicklung. Er wird durch HNF3b, HNF6, HNF1a und NeuroD1 aktiviert und reguliert HNF1a und HNF4a, sowie sich selbst (Servitja u. Ferrer 2004). HNF4a wird durch IPF-1 und HNF1b reguliert. Die positive Feedback-Verbindung zwischen HNF4a und HNF1a ist im Pankreas besonders stark ausgeprägt (Yamagata 2003).

Entscheidend für die Funktion dieses Netzwerkes sind aber noch weitere Gene, die deshalb als potentielle Kandidatengene des MODY X zählen. Das sind insbesondere die Hepatic Nuclear Factors HNF3beta (HNF3b) und HNF6 sowie die sog. Chicken-Ovalbumin-Upstream-Promoter Transcriptionfactor I und II (kurz COUP-TF I und II).



**Abbildung 4: Potentielle Kandidatengene für MODY X und ihre Interaktionen im Netzwerk von Transkriptionsfaktoren.** Die Betazellfunktion wird über ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert. Hervorgehoben sind die Interaktionen einiger MODY-Gene (grün), weitere Kandidatengene für MODY X (blau) und des Gens HNF1beta (rot). *COUP-TF* Chicken-Ovalbumin-Upstream-Promoter Transcription-Factor, *HNF* Hepatic Nuclear Factor, *IPF-1* Insulin Promoting Factor 1, *MODY* Maturity Onset Diabetes of the Young, *NeuroD1* Neurogenic Differentiation Factor1.

*HNF3b* gehört zu der Gruppe der „winged helix“ – Transkriptionsfaktoren und spielt eine entscheidende Rolle in der endodermalen Zellentwicklung (Levinson-Dushnik u. Benvenisty 1997). Im Pankreas ist es den Faktoren IPF-1, HNF1a und HNF4a übergeordnet und stimuliert indirekt deren Zielgene (Duncan et al. 1998). In einer finnische Linkage-Analyse wurde ein Zusammenhang zwischen T2D und HNF3b gefunden (Ghosh et al. 1999). Eine MODY-verursachende Mutation in HNF3b konnte bislang allerdings nicht sicher nachgewiesen werden (Abderrahmani et al. 2000, Hinokio et al. 2000).

**HNF 6** ist das erste Mitglied der sogenannten Onecut-Domain-Familie und reguliert neben Insulin und GLUT2 auch die 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase (Lemaigre et al. 1993, Lemaigre et al. 1996). Im endokrinen Pankreas ist HNF6 den Faktoren IPF-1, HNF4a, HNF1b und HNF3b übergeordnet (Maestro et al. 2003, Servitja u. Ferrer 2004) und beeinflusst so unter anderem die Entwicklung und Differenzierung des Pankreas (Jacquemin et al. 2000, Maestro et al. 2003). Bisher konnte eine Rolle von HNF6 bei MODY allerdings nicht sicher nachgewiesen werden (Jacquemin et al. 2000, Moller et al. 1999, Vaisse et al. 1997).

Die beiden Transkriptionsfaktoren **COUP-TF I** und **II** (Chicken-Ovalbumin-Upstream-Promoter Transcriptionfactors) werden nahezu ubiquitär exprimiert (Zhang et al. 2002) und zählen wie HNF4a zu der Großfamilie der Steroid-Hormon-Rezeptoren (Cereghini 1996). COUP-TF I stimuliert HNF1b indirekt über eine Protein-Protein-Interaktion (Power u. Cereghini 1996) und COUP-TF II aktiviert zusammen mit HNF4a die Transkription von HNF1a und HNF1b (Power u. Cereghini 1996, Suaud et al. 1999). Eine gezielte Entfernung von COUP-TF I oder II in Mäusen ist perinatal letal v.a. mit Malformation des Herzens, der Gefäße und diverser neurologischer Strukturen (Park et al. 2003). Mäuse, deren COUP-TF-II Expression speziell im Pankreas unterbunden wurde, zeigten eine gestörte Insulinsekretion nach Glukosestimulation und eine periphere Insulinresistenz (Bardoux et al. 2005).

## 1.5 Fragestellung

Mutationen der Hepatic Nuclear Factors (HNF) können im Rahmen des Maturity onset diabetes of the young (MODY) zur Bildung von Diabetes mellitus führen. Die einzelnen Subtypen unterscheiden sich v.a. in ihren extrapankreatischen Manifestationen, z.B. sind Mutationen im HNF1beta-Gen (MODY 5) mit urogenitale Fehlbildungen assoziiert.

An der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm wurde eine Familie mit hereditärem Diabetessyndrom, urogenitalen Fehlbildungen der Indexpatientin und familiären Schilddrüsenzysten identifiziert. Unter der Vorstellung, dass es sich hierbei entweder um eine klinische Variante eines bereits bekannten MODY-Gens oder um eine neue Form mit HNF1beta-ähnlichen Phänotyp und Zusatzphänomen handelt, wurde die Familie klinisch, funktionell und molekulargenetisch charakterisiert. Dazu wurde neben spezieller klinischer und funktioneller Diagnostik eine bidirektionale Sequenzanalyse von HNF1beta und weiteren Kandidatengen durchgeführt.

## **2 Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Patientenauswahl**

Bei der Indexpatientin wurde im 13. Lebensjahr ein Diabetes mellitus diagnostiziert. Ihr Vater und dessen Mutter waren ebenfalls an Diabetes erkrankt. Das übrige familiäre Umfeld galt als stoffwechselgesund. Die Familie wurde über das Ziel und Vorgehen der Untersuchung in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki informiert und erklärte ihr Einverständnis. Es wurde eine detaillierte Familienanamnese erhoben und durch Daten aus ärztlichen Befunden ergänzt. Blutproben der Familienmitglieder dienten der Blutglukosemessung, DNA-Extraktion und weiteren biochemischen Analysen.

### **2.2 Spezielle Diabetesdiagnostik**

#### **Diagnose- und Verlaufparameter**

Zur Ermittlung der Stoffwechselfunktion wurden Gelegenheits-Blutzuckerwerte im Plasma und Nüchtern-Blutzuckerwerte im Citratblut mittels Hexokinasemethode bestimmt. Als nüchtern galt mindestens achtstündiges Fasten. Die Diagnose eines Diabetes mellitus wurde nach den aktuellen Diagnoserichtlinien der American Diabetes Association gestellt (Tabelle 4). Das glykosilierte Hämoglobin A1c (HbA1c) wurden mit HPLC (Pharmacia, Freiburg) mit einem Referenzbereich von 3,2 bis 5,5 % bestimmt. Die Plasmainsulinwerte wurden mittels RIA (Pharmacia, Freiburg) und die Werte des C-Peptids durch ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Deutschland) ermittelt.

**Table 4: Richtlinien zur Diagnose von gestörter Nüchtern glukose (IFG), gestörter Glukosetoleranz (IGT) und Diabetes mellitus (DM). Nach (AmericanDiabetesAssociation 2004).**

	Nüchtern-BZ* (mg/dl)	und/oder	OGTT-2h-BZ (mg/dl)
<b>IFG</b>	100 – 125	--	--
<b>IGT</b>	<126	und	140 – 199
<b>DM</b>	≥ 126	oder	≥ 200

BZ Blutzucker, OGTT-2h-BZ zwei Stunden nach oralen Glukosetoleranztest mit 75 mg Glukose, \* nach acht Stunden Fasten.

### Oraler Glukose Toleranz Test

Der orale Glukose Toleranz Test (OGTT) wurde bei den Geschwistern der Indexpatientin und ihrer Mutter mit 75g Glukose durchgeführt. Die Blutzuckerwerte sowie die Werte von Insulin und C-Peptid im Serum wurden vor sowie 30, 60, 90 und 120 min nach Glukosegabe, wie bereits beschrieben, gemessen.

### Kombinierter Glukose-Arginin-Stimulationstest

Die Insulin-Sekretion der Indexpatientin und ihrer Geschwister wurde nach intravenöser Gabe von Glukose und Arginin getestet. Es wurden zunächst 0,5g Glukose pro kg Körpergewicht über 3 min infundiert und die Werte von Blutzucker, Insulin und C-Peptid vor sowie 1, 3, 5, 10, 20 und 40 min nach Glukosegabe gemessen. Direkt anschließend wurden 0,5 g Arginin pro kg Körpergewicht über 30 min intravenös appliziert und die Blutzucker-, Insulin- und C-Peptid-Werte vor sowie 5, 15, 30, 45 und 60 min nach Beginn der Arginingabe bestimmt.

### Insulinresistenz und Insulinsensitivität

Die Insulinresistenz bzw. Insulinsensitivität der Patientinnen wurde mit dem HOMA-Index (Homeostasis model assessment) bzw. dem ISI(comp) (Composite whole body insulin sensitivity index) nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{HOMA-Index} = \frac{\text{BZ}_N \times \text{Ins}_N}{405}$$

$$\text{ISI(comp)} = \frac{10.000}{\sqrt{\text{BZ}_N \times \text{Ins}_N \times \overline{\text{BZ}}_{\text{OGTT}} \times \overline{\text{Ins}}_{\text{OGTT}}}}$$

**Abbildung 5: Berechnung von HOMA-Index und ISI(comp).** *Modifiziert nach (Heinze et al. 2002).* Anhand der Werte von Blutzucker und Insulin jeweils nüchtern bzw. während eines OGTT lässt sich mit dem HOMA-Index die Insulinresistenz und mit dem ISI(comp) die Insulinsensitivität von diabetischen Patienten bewerten. *BZ* Blutzucker in (mg/dl), *HOMA* Homeostasis model assessment, *Ins* Insulin in (μU/ml), *ISI(comp)* Composite whole body insulin sensitivity index, *N* nüchtern, *OGTT* oraler Glukosetoleranztest,  $\overline{X}$  Mittelwerte.

Als Grundlage für die Interpretation der berechneten Werte wurden die Ergebnisse der Originalarbeit zu HOMA und ISI(comp) verwendet (Heinze et al. 2002). Hierbei wurden 23 gesunde Kinder und Jugendliche mit 22 adipösen Patienten der gleichen Altersgruppe auf Insulinresistenz bzw. erniedrigter Insulinsensitivität untersucht (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Diagnostische Bereiche für HOMA-Index und ISI(comp).** *Modifiziert nach (Heinze et al. 2002).*

	Normal	Insulinresistenz ↑	Insulinsesitivität ↓
<b>HOMA-Index</b>	≤ 2	> 4	
<b>ISI(comp)</b>	> 4		< 2

### Diabetesspezifische Autoantikörper

Antikörper gegen Glutamat-Decarboxylase (GAD65) und Tyrosin Phosphatase (IA-2), sowie die Insulin Autoantikörper (IAA) wurden mittels RIA (Medipan Diagnostica,

Deutschland) bestimmt. Die Inselzellantikörper (ICA) wurden über indirekte Immunfluoreszenz von Kryoschnitten humaner Pankreata nach Inkubation bei 4°C über Nacht untersucht (Referenzbereich 5 - 20 JDF Einheiten). Beide Assays erhielten eine analytische Sensitivität und Spezifität von 100% im 13. ICA Workshop 1998. Die Ergebnisse für IAA, GAD65, IA-2 und ICA wurden in einem unabhängigen Referenzlabor mit abweichenden Testansätzen bestätigt (Dr. M. Schlosser, Universität Greifswald).

## **2.3 Weitere klinische, funktionelle und morphologische Diagnostik**

### **Herz-Kreislauf-System**

Die Struktur und Funktion des Herzens wurden elektro- und echokardiographisch untersucht. Der Blutdruck wurde über einen Zeitraum von 24 h zwanzigminütigen Intervallen oszillometrisch gemessen und mit alters- und geschlechtsspezifischen Normwerten verglichen (Soergel et al. 1997).

### **Leber**

Die Leberfunktion wurde anhand der Transaminasen GOT, GPT, der alkalische Phosphatase, Gamma-Glutamyl-Transferase, von Bilirubin, Albumin und Gesamteiweiß im Serum, sowie anhand der Gerinnungsparameter in Citratblut beurteilt. Größe und Struktur der Leber wurde sonographisch bestimmt.

### **Pankreas**

Im Ultraschall wurden Größe und Struktur des Pankreas evaluiert. Die exokrine Pankreasfunktion wurde anhand der Lipase im Serum und der Elastase im Stuhl bewertet. Bei der Indexpatientin wurde zum Ausschluss einer Mukoviszidose die Pilocarpinintoforese von Natrium und Chlorid durchgeführt. Die endokrine Pankreasfunktion wurde anhand der Nüchternwerte von C-Peptid und der oral bzw. intravenösen Toleranztests mit Glukose bzw. Glukose und Arginin (s.o.) bewertet.

## **Fettstoffwechsel**

Zur Beurteilung der Fettstoffwechselfunktion wurden Nüchternwerte von Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyceriden und Apolipoproteinen im Serum ermittelt und eine Elektrophorese der Lipoproteine durchgeführt.

## **Niere**

Größe und Struktur der Niere wurde mit Ultraschall untersucht. Die Nierenfunktion wurde anhand von Kreatinin, Harnsäure und Harnstoff in Serum und Urin sowie der Berechnung der endogenen Kreatininclearance beurteilt. Wiederholt wurden Albumin und Mikroalbumin quantitativ im Urin bestimmt und eine mikroskopische Analyse des quantitativen Urinsediments durchgeführt.

## **Nebenniere**

Die Funktion der Nebenniere wurde anhand eines Steroid-Profiles im 24-Stunden-Urin und der Werte für Kortisol im Serum sowie Aldosteron, Adrenocorticotropischem Hormon (ACTH), Renin, Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-Sulfat) und Testosteron im Plasma bestimmt.

## **Schilddrüse**

Größe und Struktur der Schilddrüse wurden sonographisch ermittelt. Die Funktion wurde anhand von fT3 und fT4 sowie TSH basal bewertet. Folgende Antikörper wurden mittels ELISA bestimmt: Thyroid-Peroxidase Antikörper (TPO-AK) (Parnacia, Freiburg), Thyreoglobulin Antikörper (TgAK) (Vita Diagnostica) und TSH-Rezeptor Antikörper (TRAK). Calcium, Phosphat, Parathormon und Calcitonin dienen der funktionellen Bewertung von Nebenschilddrüsen und C-Zellen.

## **Uterus und Ovarien**

Mittels Ultraschall wurden Größe und Struktur von Uterus und Ovarien bestimmt. Die Fehlbildung des Uterus der Indexpatientin wurde in einer Hysteroskopie bestätigt. Zykluskalender und die Werte von LH, FSH, Östrogen und Testosteron gaben Aufschluss über Funktion und endokrine Regulation der Gonaden.

## **Weitere Untersuchungen**

Die Fundoskopie wurde von einem versierten Ophthalmologen der Augenklinik der Universität Ulm durchgeführt. IgA-Antikörper gegen Gewebstransglutaminase (Pharmacia) und Parietalzell-Antikörper (Pharmacia) wurden mittels Elisa bestimmt. Nebennierenantikörper wurden über indirekte Immunfluoreszenz an Nebennierenschnitten von Affen bewertet (Binding Site, Birmingham, UK).

## **2.4 Polymerasekettenreaktion und Sequenzanalyse**

### **Polymerasekettenreaktion**

#### ***DNA-Isolierung***

Die DNA wurde aus Lymphozyten der Patienten und Familienmitgliedern unter Verwendung des QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen, Hilden, nach Herstellerangaben isoliert.

#### ***Primerauswahl und Primerdesign***

Die Sequenzanalyse der Kandidatengene wurden mit spezifischen Primerpaaren durchgeführt, die die gesamte kodierende Sequenz (CDS) und angrenzende Intronbereiche sicher abdeckten. Wenn möglich, wurden hierzu Angaben aus der Primärliteratur berücksichtigt (s. Anhang). Wie exemplarisch für die Variante b von HNF1b dargestellt (Abbildung 6), wurde in einigen Fällen passende Primer mit einer Länge von ca. 20 Nukleotiden, einem GC-Gehalt von möglichst 40-60% und mit Guanin (G) oder Cytosin (C) am 3' Ende ausgewählt. Der Senseprimer wurde mindestens 30 Nukleotide vor, der Antisenseprimer mindestens 30 Nukleotide nach dem eigentlichen Genabschnitt positioniert, um eine sichere Darstellung der gesuchten Sequenz zu gewährleisten. Als maximaler Abstand zwischen Sense- und Antisenseprimer wurde eine Produktgröße von 600 bp festgelegt. Sämtliche Primer wurden durch Thermo Electron, Ulm, bereitgestellt.

```

40261 agcettccat tctgcccacg gcccccttcat actcccaacc aagactgctg tgattg tgtg
40321 ttttgggcca agcaccaaca agtccccccg cccccctca ctcaccatct cccctccatc
40381 cattcccagg gcagaatgtt tgcagcgagg ggtgtcccc tccaaagccc acggcctggg
40441 ctccaacttg gtcactgagg tccgtgtcta caactggttt gcaaaccgca ggaaggagga
40501 ggcattcccg caaaagctgg ccatggacgc ctatagctcc aaccagactc acagcctgaa
40561 ccctctgctc tcccacggct ccccccacca ccagcccagc tcctctctc caaacaagct
40621 gtcaggtaag caaaggttgg gctcactgc ctgggcaacc caaccatcct ggttcttgcc
40681 acggatctta tctggtttaa gggttttcag aggagcaaac gcttttgaga tgatcctagg
40741 gccgctctct cattgccaga atatactcc ctggaaataa tgtgtggctc tgatcagttt
40801 cctccaactc ctggttcagc cattgccctg tgagggctca ctcggttcc agggagcct
40861 ttaccctatt tgtctccttc cctcttcttc tccctgtgtg gctgctgact cagcggctcat

```

**actg** Exonsequenz  
actg Intronsequenz  
**taa** Stop-Codon in Variante b  
**actg** (Anti-)Sense-Primer aus Primärliteratur  
**actg** Antisense-Primer Variante b, (20bp, GC-Gehalt: 55%)

**Abbildung 6: Primerdesign.** Die Variante b des HNF1b-Gens entsteht durch alternatives Splicing im Exon 4. Der Antisense-Primer der Variante b wurde nach oben beschriebenen Kriterien selbst ausgewählt. Ziffern beziehen sich auf die Referenzsequenz AC004132. *bp* Basenpaare.

### **Amplifikation**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde am Thermocycler GeneAmp PCR System 9600 bzw. System 2400 von Perkin Elmer, Weiterstadt, durchgeführt. Für das Reaktionsvolumen (25µl) wurden neben genomischer DNA, spezifischem Primerpaar und Wasser, 10-fach Puffer und TAQ-Polymerase (5 Units/µl) von Sigma Chemical Company, USA sowie dNTPs (je 2mM) von Pharmacia Biotech, Schweden nach Herstellerangaben verwendet. Zur Optimierung der PCR-Reaktion wurden in Einzelfällen die Zusätze Q-solution von Qiagen, Hilden, und das PCRx Enhancer-System von Invitrogen, Karlsruhe, mit den entsprechenden Reagenzien verwendet. Zur Kontrolle wurde jeweils ein kompletter PCR-Ansatz ohne DNA mitgeführt.

### **PCR-Bedingungen**

Für die PCR-Reaktion wurde eine erste Denaturierung über drei Minuten bei 94°C durchgeführt. Denaturierung und Extension der 38 Zyklen erfolgte bei 94°C bzw. 72° für jeweils 30 Sekunden. Die Annealingtemperatur X wurde für jedes Gen speziell etabliert (s: Anhang). Die Endextension erfolgte bei 72°C über fünf Minuten. In einzelnen Fällen wurde eine zyklische Denaturierungstemperatur von 96°C eingesetzt.

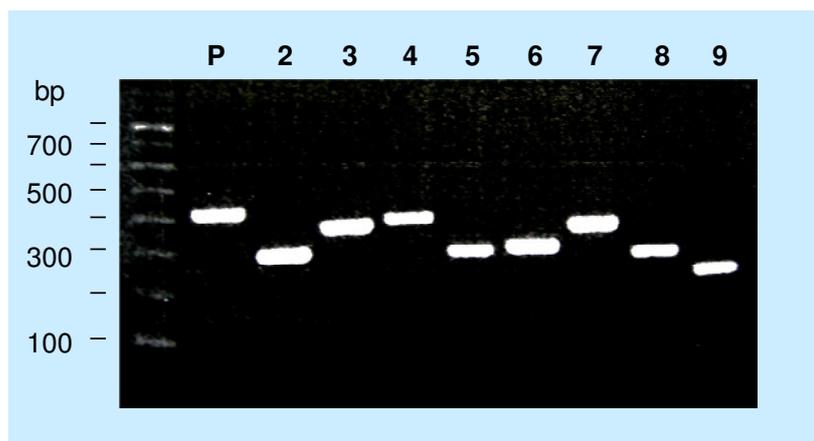
**Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die Polymerasekettenreaktion.** 96 °C für IPF-1, HNF6 Prom a, b und Ex1b, COUP-TF I, COUP-TF II außer Ex3b, HNF3b außer Promoter, HNF4a außer Ex P2 und var 3, NeuroD1, sonst 94 °C.

Schritt	Temperatur	Dauer
<b>1. Denaturierung</b>	94 °C	3 min.
<b>Zyklus 1 – 38:</b>		
Denaturierung	<b>94 °C/ 96 °C</b>	30 sec.
Annealing	<b>X °C</b>	30 sec.
Extension	72 °C	30 sec.
<b>Endextension</b>	72 °C	5 min.

X optimierte Annealing-Temperatur (s. Anhang).

### **Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung des PCR-Produktes**

Eine spezifische Darstellung und Kontrolle des amplifizierten DNA-Abschnitts wurde mittels der Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Abbildung 7). Für die Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels wurden 1,9 g Agarose, 125 ml TAE-Puffer und 4,25 µl Ethidiumbromid verwendet. Als Größenreferenz wurde der 100 bp Ladder von Amersham Pharmacia Biotech, USA, eingesetzt. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte nach Herstellerangaben mit dem PCR-Purification-Kit von Qiagen, Hilden.



**Abbildung 7: Gelelektrophorese von PCR-Amplifikons des HNF1b-Gens** nach Aufreinigung. Das Exon 1 wurde separat etabliert und ist deshalb nicht mit aufgeführt. bp Basenpaare, HNF Hepatic Nuclear Factor, P Promoter, PCR Polymerasekettenreaktion, 2-9 Exons.

## **Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde an einem ABI von Applied Biosystems durchgeführt. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden nach dem abgewandelten Kettenabbruch-Verfahren von Sanger (1979) mit anschließender Kapillargelelektrophorese und Darstellung der Gensequenz in Form von Chromatogrammen.

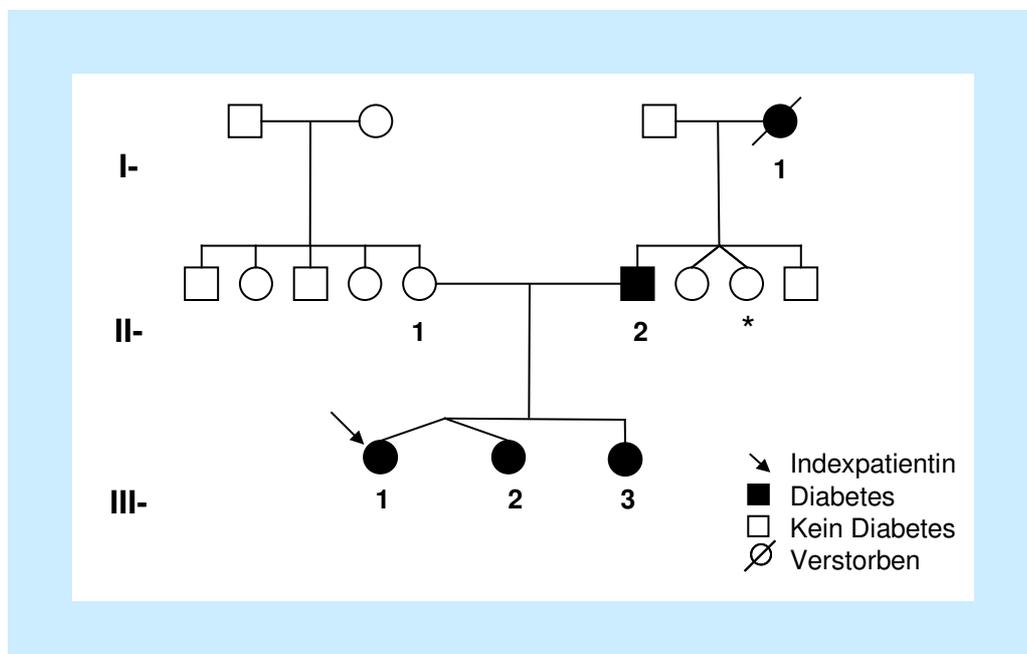
## **Auswertung der DNA-Sequenzanalyse**

Die Chromatogramme wurden mit dem Programm Sequence-Navigator von Perkin Elmer, Weiterstadt, ausgewertet. Als Referenzsequenz wurde entweder eine zu dem jeweiligen Gen veröffentlichte DNA-Sequenz oder der entsprechende Abschnitt aus der Contig-Sequenz des zugehörigen Chromosoms aus der NCBI-Datenbank ausgewählt (s. Anhang).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinische Präsentation der Patienten

Die Indexpatientin (III-1 in Abbildung 8) stellte sich im Alter von 13 Jahren und 5 Monaten mit rezidivierender Hyperglykämie (> 200 mg/dl) ohne Zeichen der Polyurie, Polydipsie oder eines Gewichtsverlust vor. Ihr body mass index (BMI) betrug 19,3 kg/m<sup>2</sup> (50.-75. Perzentile (P)) bei einem Gewicht von 44,5 kg (10.-25. P) und einer Größe von 153,5 cm (25.-50. P). Laboranalytisch zeigte sich ein Nüchternblutzucker von 221 mg/dl und ein glykosiliertes Hämoglobin A1c (HbA1c) von 6,9% (Referenzbereich 3,2 – 5,5%) bei einem normalen C-Peptid-Spiegel von 0,9 ng/ml (Referenzbereich 0,8 – 3,0 ng/ml). Die Patientin hatte eine starke Glukosurie ohne Ketonurie bei einem kapillaren Blut-pH von 7,35 und einer Osmolarität des Serums von 291 mosm/kg. Antikörper gegen Inselzellen (ICA), Insulin (IAA), Glutamatdecarboxylase (GAD 65) und Thyrosin-Phosphatase (IA-2) konnten bei der Indexpatientin nicht nachgewiesen werden (Tabelle 7).



**Abbildung 8: Familie mit hereditärem Diabetes-Syndrom.** Außer der Indexpatientin sind die Geschwister, der Vater und die Großmutter väterlicherseits an Diabetes mellitus erkrankt. Die Konstellation spricht für einen autosomal-dominanten Erbgang. \* nicht untersucht.

Die Zwillingsschwester (Patientin III-2 in Abbildung 8) zeigte im Alter von 13 Jahren und 6 Monaten einen Gelegenheitsblutzucker von 231 mg/dl und ein HbA1c von 4,3%. Der BMI betrug 19,6 kg/m<sup>2</sup> (50. – 75. P) bei einem Gewicht von 49 kg (50. – 75. P) und einer Größe von 159,8 cm (50. – 75. P). Der Nüchternwert für Insulin war 5 µU/ml und für C-Peptid 1,8 ng/ml. Antikörper gegen Insulin, Inselzellen, GAD65 und IA2 konnten nicht nachgewiesen werden.

Bei der älteren Schwester (III-3 in Abbildung 8) wurde mit 19 Jahren ein Gelegenheitsblutzucker von 234 mg/dl und ein HbA1c von 4,9% gemessen. Ihr BMI betrug zu der Zeit 23,9 kg/m<sup>2</sup> (75. – 90. P) bei einem Gewicht von 65kg (75. – 90. P) und einer Größe von 165,1 cm (50. – 75. P). Der Nüchternwert für Insulin betrug 5 µU/ml, für C-Peptid 1,7 ng/ml. Antikörper gegen Insulin, Inselzellen, GAD65 und IA2 konnten nicht nachgewiesen werden.

**Tabelle 7: Klinische Daten der Indexpatientin und weiterer Familienmitglieder mit Diabetes.** Falls nicht anders angegeben, handelt es sich um Werte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

	Index- patientin	Zwillings- schwester	Ältere Schwester	Vater	Gross- mutter	Referenz/ Einheit
<b>Alter aktuell</b>	16	16	22	50	68, †	Jahre
<b>Alter bei DM-ED</b>	13 (5)	13 (6)	19	28	30	Jahre (Monate)
<b>BMI</b>	19,3	19,6	23,9	22,7	<20	kg/m <sup>2</sup>
<b>Glukose i.S., nüchtern</b>	167	132	123	100-140*	n.b.	55-100 mg/dl
<b>C-Peptid</b>	0,9	1,8	1,7	n.b.	n.b.	0,8 – 3 ng/ml
<b>HbA1c</b>	6,9 (6,1*)	4,3	4,9	7,8*	n.b.	3,2 – 5,5 %
<b>Autoantikörper</b>	neg.	neg.	neg.	neg.	n.b.	neg.
<b>DM-Therapie aktuell</b>	Glimepirid	Diät	Diät	Insulin, seit 10J	Glibenclamid	-

\* unter Therapie, *BMI* Body Mass Index, *DM* Diabetes mellitus, *ED* Erstdiagnose, *i.N.* im Normbereich, *i.S.* im Serum, *J* Jahre, *n.b.* nicht bekannt, † verstorben.

Bei dem Vater der Indexpatientin (II-2 in Abbildung 8), wurde die Diagnose Diabetes mellitus mit 28 Jahren bei dem sonst asymptomatischen Patienten im Rahmen einer Appendektomie gestellt. Im Alter von 40 Jahren wurde bei Nüchternglukosewerten zwischen 112 und 334 mg/dl und einem HbA1c von 12,6% eine Insulintherapie begonnen. Vier Jahre später wurde der Patient dialysepflichtig bei terminaler Niereninsuffizienz und v.a. diabetische Nephropathie. Antikörper gegen Insulin, Inselzellen, GAD65 und IA2 konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Großmutter väterlicherseits der Indexpatientin (I-1 in Abbildung 8) starb vor über 20 Jahren im Alter von 62 Jahren. Sie litt seit ihrem 30. Lebensjahr an Diabetes mellitus und wurde im Alter bei Verweigerung einer Insulintherapie mit Glibenclamid behandelt. Laut Angaben des Hausarztes war ihr Blutzucker bei Serumwerten um 300 mg/dl schlecht kontrolliert. Molekulargenetische Untersuchungen konnten bei dieser Patientin nicht durchgeführt werden.

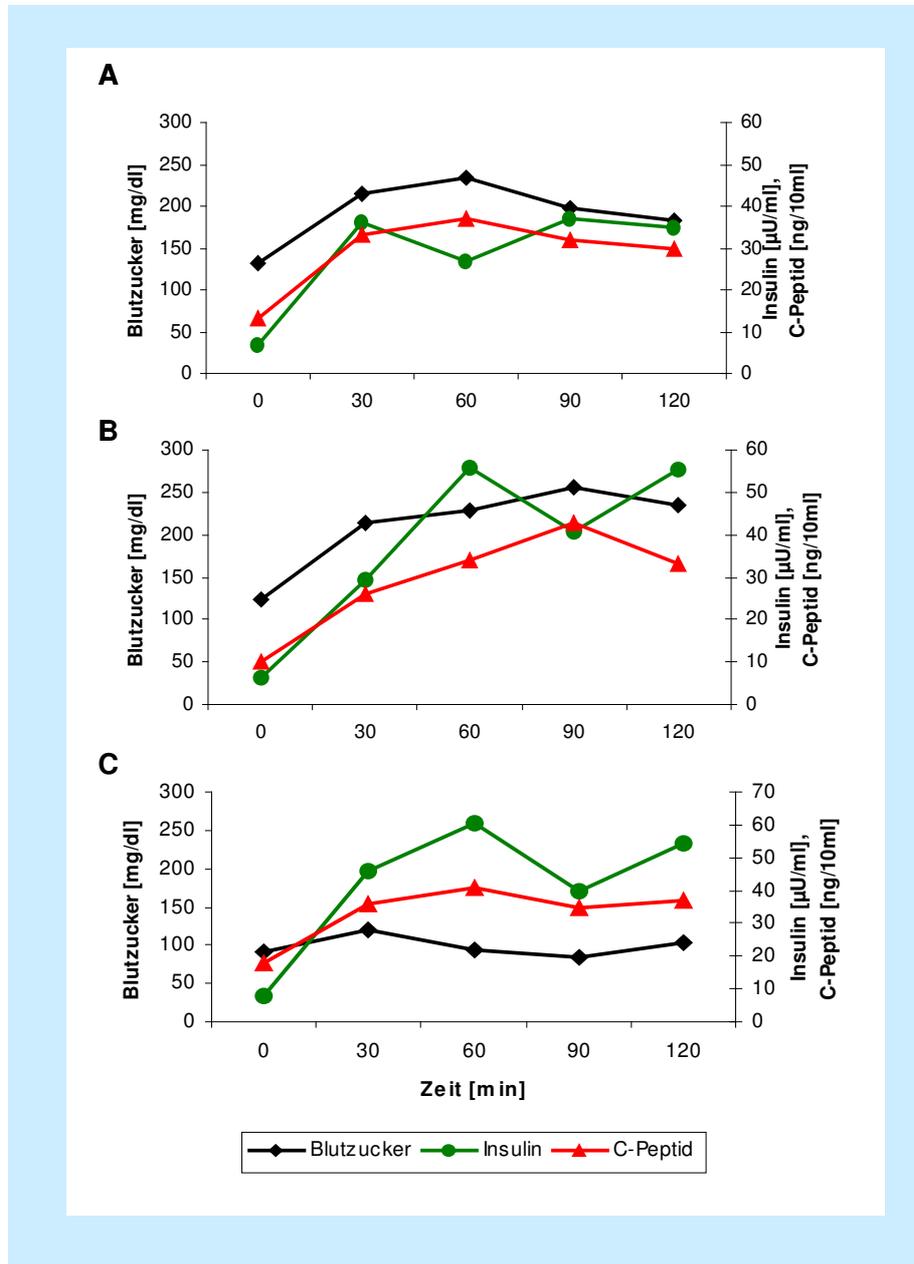
Die Mutter der Indexpatientin (II-1 in Abbildung 8) zeigte Normwerte für Blutzucker, Insulin und C-Peptid (Daten nicht aufgeführt). Anamnestisch ergab sich kein Anhalt für einen Gestationsdiabetes. Auch bei den übrigen Familienmitgliedern wurden Gelegenheits- bzw. Nüchternblutzucker gemessen, es konnte aber kein weiterer Betroffener identifiziert werden (Daten nicht aufgeführt).

## **3.2 Analyse des Glukosemetabolismus**

### **Diagnose von Diabetes mellitus bei den Geschwistern**

Bei den Schwestern und der Mutter der Indexpatientin wurde zur Ermittlung der Glukosetoleranz ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt (Abbildung 9). Die Zwillingsschwester zeigte bereits basal eine diabetische Hyperglykämie von über 126 mg/dl. Die ältere Schwester dagegen hatte eine gestörte Nüchternglukose zwischen 100 und 126 mg/dl. Der Anstieg des Insulins erfolgte bei beiden Schwestern biphasisch, begleitet von einem leicht verzögerten Anstieg des C-Peptids. Zwei Stunden nach Testbeginn zeigte sich bei der Zwillingsschwester eine noch gestörte Glukosetoleranz mit 182 mg/dl, die ältere Schwester hatte dagegen eine signifikante diabetische Hyperglykämie von über 200 mg/dl, sodass bei beiden Geschwistern die diagnostischen Kriterien eines Diabetes mellitus erfüllt waren. Bei der Mutter zeigte sich

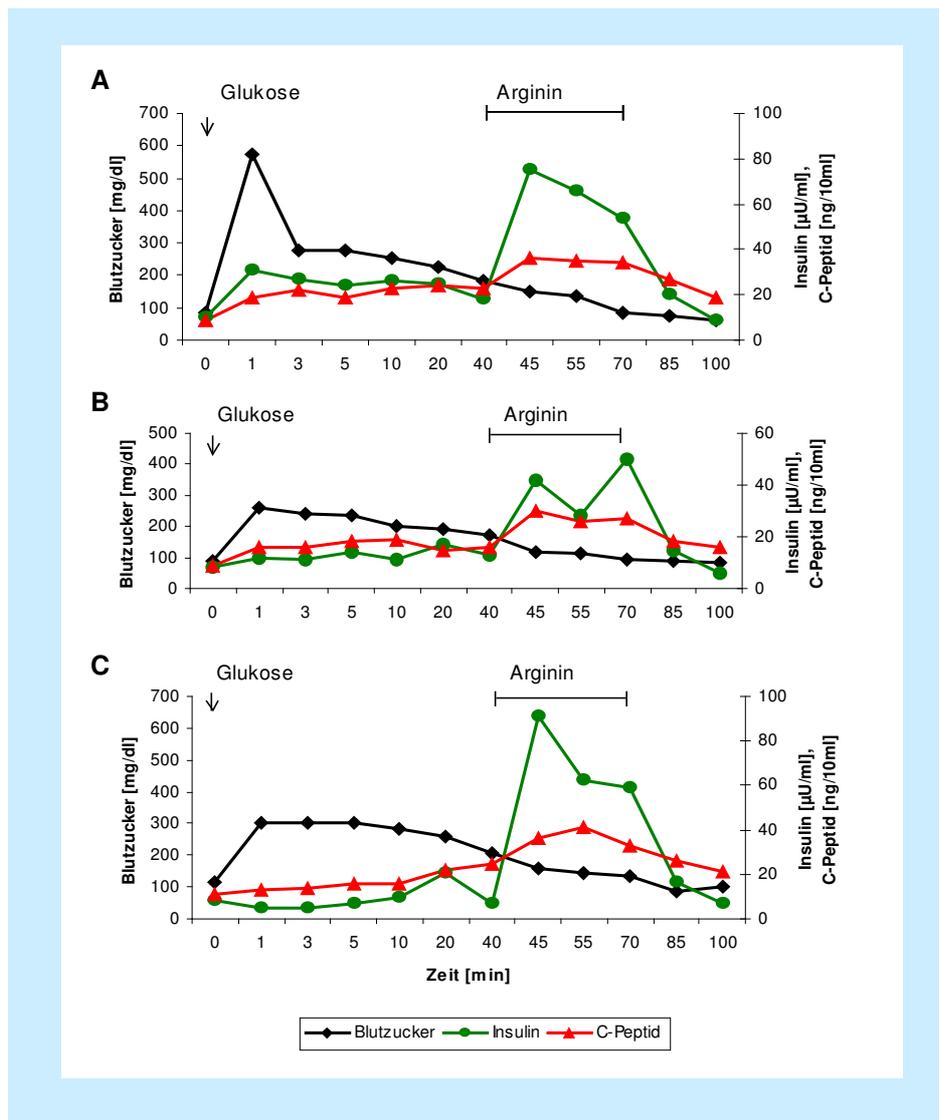
ein normaler Testverlauf mit normaler Nüchternglukose und suffizienter Blutzuckerregulation auch nach Glukosestimulation.



**Abbildung 9: Oraler Glukose-Toleranztest der Schwestern und der Mutter der Indexpatientin.** Bei der Zwillingsschwester (A) und der älteren Schwester (B) der Indexpatientin zeigten sich während des Tests diabetisch erhöhte Blutzuckerwerte. Bei der Mutter (C) dagegen konnte eine normale Glukosetoleranz nachgewiesen werden.

## Gestörte Insulinsekretion nach intravenöser Stimulation mit Glukose

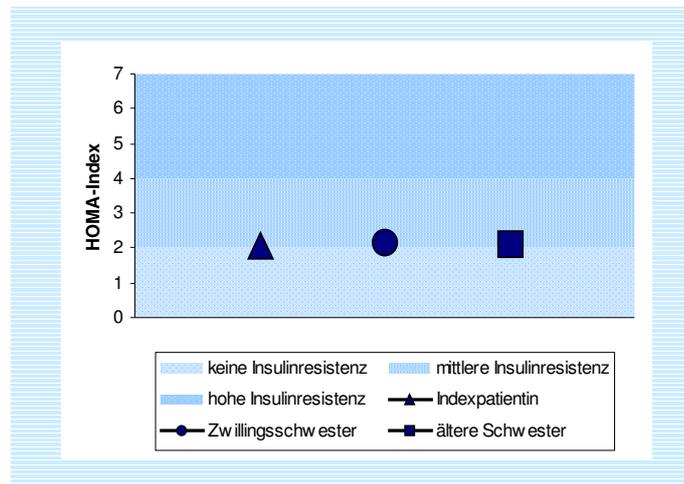
Nach intravenöser Gabe von Glukose zeigte sich bei der Indexpatientin und ihren Schwestern, ähnlich wie im OGTT, eine biphasische, jedoch unzureichende Freisetzung von Insulin und C-Peptid. Die anschließend durchgeführte intravenöse Gabe von Arginin führte dagegen unmittelbar zu signifikant höheren Konzentrationen von Insulin und C-Peptid, die in einer raschen Normalisierung des Blutzuckerspiegels resultierte (Abbildung 10).



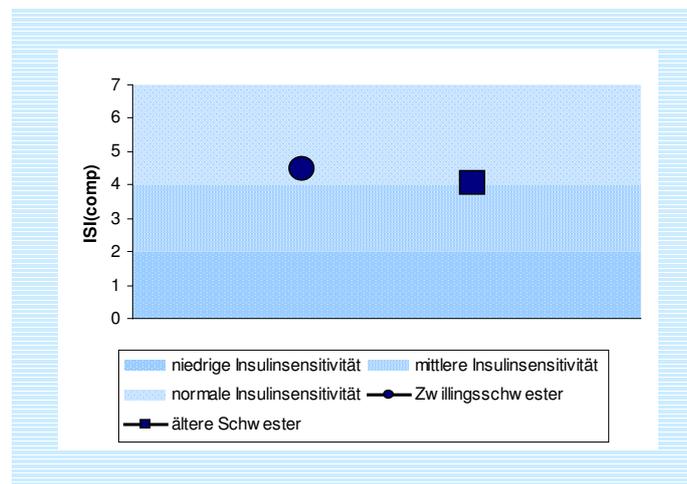
**Abbildung 10:** i.v. Glukose – Arginin – Belastungstest der Indexpatientin und ihrer Schwestern. Bei der Indexpatientin (A), ihrer Zwillingsschwester (B) und ihrer älteren Schwester (C) zeigt sich eine inadequate Insulinsekretion nach Glukosegabe, bei suffizientem Insulinanstieg und damit adäquater Stoffwechselkontrolle nach Arginin-Stimulation.

## Normwertige HOMA-Indices und ISI(comp)

Nach dem Homeostasis Model Assessment (HOMA) und Insulin-Sensitivity-Index (ISIcomp) zeigten die Indexpatientin und ihre Schwestern eine normale Insulinsensitivität ohne Anhalt für eine periphere Insulinresistenz.



**Abbildung 11: HOMA-Index der Indexpatientin und ihrer Schwestern.** Die Patientinnen zeigten normwertige HOMA-Indices und damit keine Insulinresistenz. *HOMA* Homeostasis Model Assessment.



**Abbildung 12: ISI(comp) der Schwestern der Indexpatientin.** Die Schwestern zeigten einen normwertigen ISI(comp) und damit eine gute periphere Insulinsensitivität. *ISI(comp)* Composite whole body Insulin Sensitivity Index.

### 3.3 Morphologische und funktionelle Charakteristika

#### Arterielle Hypertonie

Bei der Indexpatientin zeigte die 24-Stunden-Blutdruckmessung eine arterielle Hypertonie (Tabelle 8) bei Normwerten für Renin, Aldosteron, Cortisol und ACTH (Daten nicht aufgeführt). EKG und Echokardiographie der Indexpatientin waren unauffällig. Nach neun-monatiger Therapie mit 5 mg Enalapril pro Tag konnte bei ihr eine dauerhafte Blutdruck-Normalisierung erreicht werden.

Der Vater der Indexpatientin wurde bereits seit mehreren Jahren antihypertensiv behandelt. Anamnestisch war auch bei der Großmutter der Indexpatientin eine arterielle Hypertonie bekannt. Die Geschwister und die Mutter der Indexpatientin waren dagegen normotensiv.

**Tabelle 8: Weitere klinische Befunde im Überblick.**

	Indexpatientin	Zwillings-schwester	Ältere Schwester	Vater	Großmutter paternal
<b>Herz-Kreislauf</b>	Arterielle Hypertonie	o.p.B.	o.p.B.	Arterielle Hypertonie	Arterielle Hypertonie
<b>Nieren</b>	Nierenagenesie rechts	o.p.B.	Z.n. Nephrolithiasis	Diabetische Nephropathie, dialysepflichtig	n.b.
<b>Genitaltrakt</b>	Uterus unicornis links	o.p.B.	o.p.B.	o.p.B.	n.b.
<b>Schilddrüse</b>	Multiple Zysten	Mikrozysten	Singuläre Zyste	Singuläre Zyste	n.b.
<b>sonstiges</b>	-	-	-	Diabetische Retinopathie, pAVK	-

*n.b.* nicht bekannt, *o.p.B.* ohne pathologischen Befund, *pAVK* periphere arterielle Verschlusskrankheit, *Z.n.* Zustand nach.

#### Diabetische Folgekrankheiten beim Vater

Im Gegensatz zu den normalen Befunden bei der Indexpatientin und ihren Schwestern, zeigte die Fundoskopie bei deren Vater eine fortgeschrittene proliferative diabetische Retinopathie beidseits mit einer subtotalen Amaurosis rechts. Außerdem hatte der Vater multiple Manifestationen einer chronische periphere arterielle Verschlusskrankheit vierten Grades der unteren wie oberen Extremität (Tabelle 8).

## **Unilaterale Nierenagenesie der Indexpatientin**

Bei der Indexpatientin wurde sonographisch eine Nierenagenesie rechts bei kompensatorisch vergrößerter, sonst normaler Niere links festgestellt (Tabelle 8). Die Nierenfunktion zeigte sich bei normalem Serumkreatinin von 68  $\mu\text{mol/l}$  (Referenzbereich 58 – 96  $\mu\text{mol/l}$ ) und normaler Kreatininclearance von 98 ml/min (Referenz > 95 ml/min) ohne Nachweis von Mikroalbuminurie oder einer Störung von Exkretion und Rückresorption intakt (Daten nicht aufgeführt).

Die Zwillingsschwester der Indexpatientin zeigte eine intermittierende Albuminurie von 3,7 - 34,7  $\mu\text{g/min}$  und die ältere Schwester rezidivierende Calciumoxalat-Nephrolithiasis. Ansonsten konnte keine Abweichung der Nieren in Größe und Struktur von der Norm sowohl bei den beiden Schwestern der Indexpatientin festgestellt werden. Der Vater der Indexpatientin ist bei terminaler Niereninsuffizienz bei diabetischer Nephropathie seit mehreren Jahren dialysepflichtig. Sonographisch zeigte sich bei ihm eine Schrumpfniere rechts bei normal großer linker Niere.

## **Uterus unicornis bei der Indexpatientin**

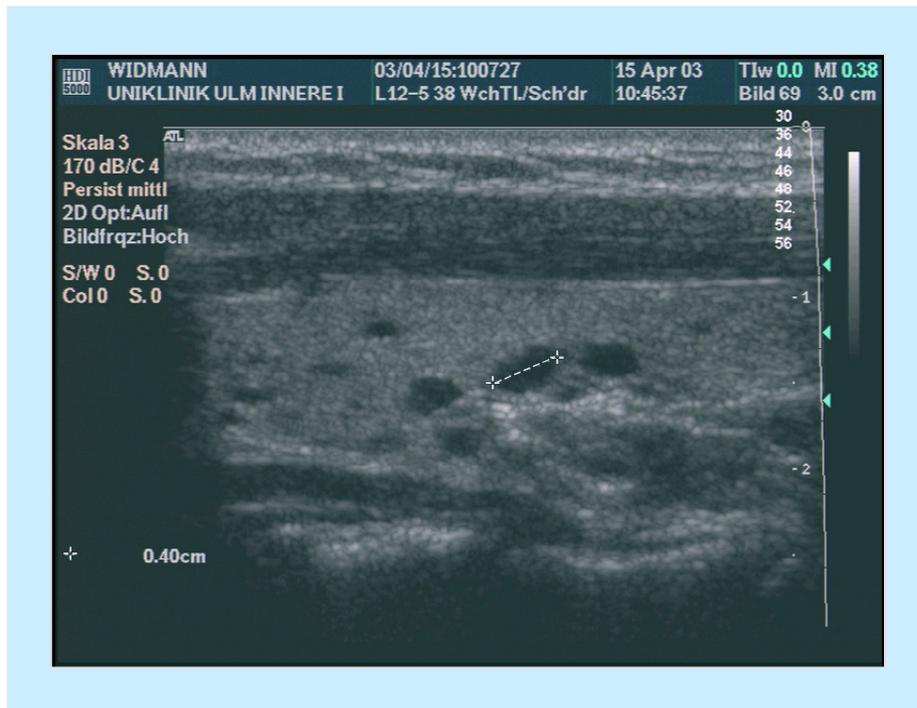
Bei der Indexpatientin wurde im Alter von 13 Jahren sonographisch und hysteroskopisch ein Uterus unicornis links mit aplastischem Cornu uteri rechts festgestellt (Tabelle 8). Die Pubertätsentwicklung der Indexpatientin verlief mit Einsetzen der Regelblutung im Alter von 12 Jahren und 6 Monaten bis dato normal. Es zeigten sich Normwerte für LH, FSH, Östradiol, Prolaktin, Testosteron und Dehydroepiandrosteron-Sulfat (Daten nicht aufgeführt).

Bei der Zwillingsschwester und der älteren Schwester der Indexpatientin stellte sich der Uterus sonographisch dagegen unauffällig dar. Die Pubertätsentwicklung verlief bei beiden Schwestern bis dato normal und es konnten keine sexual-hormonellen Abweichungen nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt).

## **Multiple Schilddrüsenzysten bei allen Betroffenen**

In der Schilddrüse der Indexpatientin zeigten sich sonographisch multiple echoarme und echofreie zystische Strukturen mit einem maximalen Durchmesser von 4 mm bei sonst normal Schilddrüsengröße und -struktur (Abbildung 13). Die Schilddrüsenfunktion war

mit Normwerten für Thyroxin (T4, 9,48 µg/dl), Trijodthyronin (T3, 153 ng/dl) und Thyreotropin (TSH, 4,3 µU/ml) intakt.



**Abbildung 13: Schilddrüsensonographie der Indexpatientin** mit multiplen, max. 4 mm großen Zysten in der gesamten Schilddrüse. Hier linker Schilddrüsenlappen, Längsschnitt.

Bei der Zwillingsschwester zeigten sich sonographisch Mikrozysten im rechten Schilddrüsenlappen, bei der älteren Schwester eine kleine Zyste im linken Schilddrüsenlappen bei sonst jeweils normaler Schilddrüsengröße und –funktion (Daten nicht aufgeführt). Beim Vater stellte sich eine kleine Zyste im linken Lappen bei bestehender Struma multinodosa Grad 2 (Gesamtvolumen: 60ml) bei Euthyreose dar.

Die Mutter der Indexpatientin hatte einen erhöhten TPO-Antikörper-Titer bei bekannter Autoimmunthyreoiditis ohne sonographischen Hinweis auf zystische Veränderungen der Schilddrüse. Bei der Indexpatientin, ihren Schwestern und ihrem Vater konnte keiner der Antikörper gegen Thyroxin-Peroxidase (TPO-AK), Thyreoglobulin (Tg-AK) oder TSH-Rezeptor (TRAK) nachgewiesen werden.

## **Weitere Ergebnisse**

Laborchemisch zeigten Blutbild, Leberfunktion, Gerinnung, Fettstoffwechsel, exokrine Pankreasfunktion und Calcium-Phosphat-Haushalt der drei Geschwister keine pathologischen Veränderungen. Die Pilocarpin-Iontophorese der Indexpatientin war mit 34 mmol/l NaCl-Äquivalent im Normbereich (< 60 mmol/l). Antikörper gegen die Nebenniere, das Parietal-Zell-Antigen und die Transglutaminase konnten bei keiner der drei Schwestern oder dem Vater nachgewiesen werden. Die übrigen Bauchorgane wie Leber, Pankreas und Milz der Indexpatientin, ihrer Schwestern und des Vaters waren sonographisch unauffällig. Sonographisch zeigten sich bei der Indexpatientin, ihren Schwestern und dem Vater normale Verhältnisse der Größe und Struktur der übrigen Bauchorgane wie Leber, Pankreas und Milz.

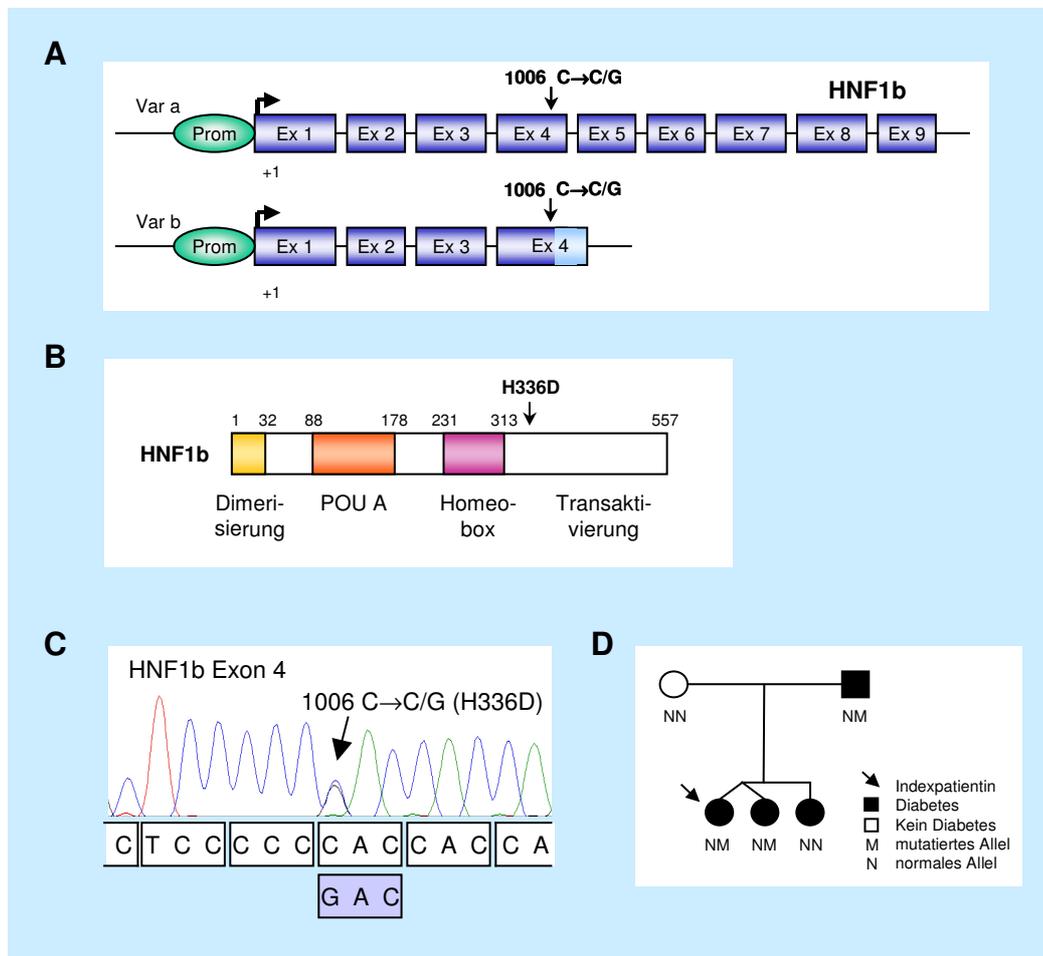
## **3.4 Molekulargenetische Ergebnisse und Genotypisierung**

### **Heterozygoter Polymorphismus H336D im Exon 4 des HNF1b-Gens**

Das HNF1b Gen galt in dieser Studie wegen des bei der Indexpatientin vorliegenden Phänotyps als Hauptkandidat der Sequenzanalyse. Von ihm existieren zwei alternative Transkripte, Variante a und Variante b, die beide zu einem festen Verhältnis in allen Ursprungsgeweben von HNF1b (Ringeisen et al. 1993) bzw. überwiegend im Pankreas exprimiert werden (Abbott et al. 1990). Die Variante a umfasst 9 Exons mit 58.635 Basen und kodiert für das 557 AS große Protein. Die Variante b dagegen entsteht durch alternatives Splicing im Intron 4 und kodiert für ein 44kDa großes Protein mit 399 AS. Funktionell besteht HNF1b aus einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne, einer „POU-A-Region“ und einer Homeobox als DNA-Bindungsdomänen sowie einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (Abbildung 14).

Von HNF1b wurden die Promoterstruktur, die 9 Exons der Variante a und die zusätzliche Intronsequenz der Variante b sequenziert und analysiert. Dabei zeigte sich bei der Indexpatientin eine heterozygote Mutation im Exon 4 Nukleotid 1006C>G, der zu einem AS-Tausch im Codon 336 von Histidin nach Aspartat (H336D) führt (Abbildung 14, A, C). Die Veränderung befindet sich im Bereich der hochkonservierten Transaktivierungsdomäne (Abbildung 14, B) und ist damit potentiell inaktivierend.

Außer in der in der Indexpatientin wurde diese Veränderung in der Zwillingschwester und ihrem Vater nachgewiesen, nicht jedoch in der älteren, ebenfalls betroffenen Nichtzwillingschwester (Abbildung 14, D).



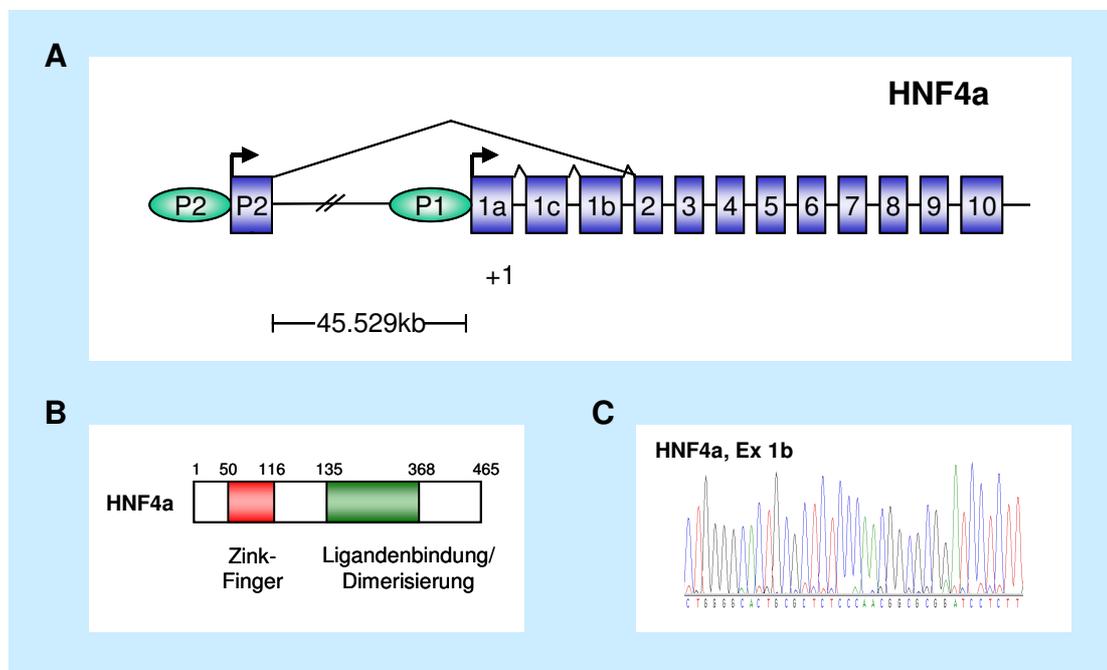
**Abbildung 14: Heterozygoter Polymorphismus H336D im Exon 4 des HNF1b-Gens.** **A, B:** Lokalisation der Mutation auf Gen- bzw. Proteinebene von HNF1b. *B in Anlehnung an (Ryffel 2001).* **C:** Genomische DNA-Sequenz der Indexpatientin mit Hervorhebung des heterozygoten Polymorphismus am Codon 336. **D:** Ergebnisse der Genotypisierung der Eltern und Geschwister der Indexpatientin. *Ex* Exon, *HNF* Hepatic Nuclear Factor, *NM* heterozygote Mutation, *NN* keine Mutation, *Prom* Promoter, *Var* Variante.

### Wildtypsequenz im HNF4a-Gen

Das HNF4a-Gen besteht aus 10 Exons, ist auf dem Chromosom 20 lokalisiert und kodiert für ein insgesamt 465 AS großes Protein. Funktionell setzt es sich aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, einer DNA-Bindungsdomäne mit Zink-Fingermotiv und einer

komplexen C-terminalen Region mit Liganden-Bindungs-, Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomäne zusammen. Es besitzt zwei separate Promoter (P1 und P2), wobei der proximale Promoter P1 vor allem in Hepatozyten, der distale Promoter P2 fast ausschließlich in Betazellen aktiv ist (Thomas et al. 2001, Yamagata 2003). Im Pankreas entsteht dabei die Variante HNF4a7, die über ein zusätzliches distales Exon P2 statt dem sonst in Hepatozyten exprimierte Exon 1a verfügt (Yamagata 2003).

Es wurden die Promoter P1 und P2, die Exons 1-10, das Exon P2, sowie die zusätzliche Intronsequenz der Variante 3 sequenziert und analysiert. Dabei zeigte sich keine Sequenzvariation im Vergleich zur Referenzsequenz AL132772 (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Sequenzanalyse von HNF4a.** **A:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von HNF4a mit leberspezifischem Promoter P1 und pankreasspezifischem Promoter P2 *in Anlehnung an (Yamagata 2003)*. **B:** Funktioneller Aufbau von HNF4a *in Anlehnung an (Ryffel 2001)*. **C:** Ausschnitt aus der genomischen DNA-Sequenz der Indexpatientin im Bereich des Exon 1b von HNF4a. *Ex* Exon, *HNF* Hepatic Nuclear Factor.

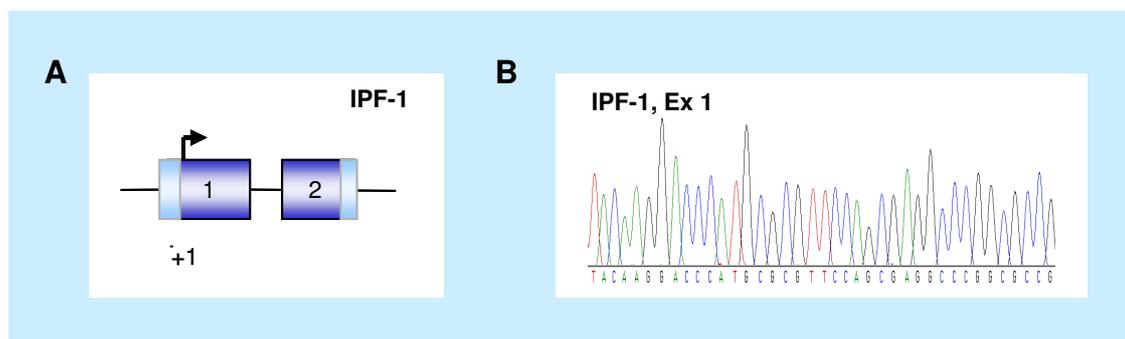
### Keine Mutationen im Glukokinase-Gen

Mutationen im Glukokinase-Gen sind die zweithäufigste Ursache für MODY in Europa. Das Gen ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und besteht aus 10 Exons, die für das 465 AS bzw. ca. 52kDa große Enzym kodieren. Die relevanten Genabschnitte der GCK

wurden sequenziert und analysiert, ohne dass dabei bisher mit MODY assoziierte Mutationen oder andere Polymorphismen nachgewiesen werden konnten.

### Wildtypsequenz im IPF-1-Gen

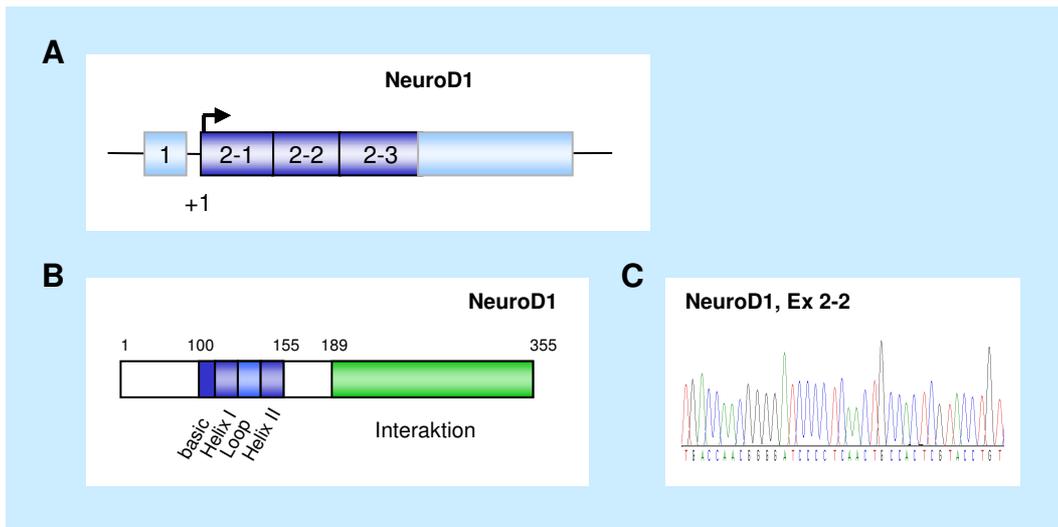
IPF-1 ist ein zentrales Element des Netzwerks von Transkriptionsfaktoren im Pankreas. Es ist auf dem Chromosom 13 (12q12.1) lokalisiert und besteht aus zwei Exons, die für 283 AS kodieren. Funktionell setzt es sich aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, einem DNA-bindenden Pentapeptid-Motiv und einer tripelhelikalen Homeodomäne zusammen, die das nukleäre Lokalisations-Signal enthält (Schwitzgebel et al. 2003). Bei der Sequenzanalyse der relevanten Genabschnitte zeigten sich keinerlei Veränderungen gegenüber dem Wildtyp (Referenzsequenz NT\_024524).



**Abbildung 16: Sequenzanalyse von IPF-1.** **A:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur. **B:** Ausschnitt aus der genomischen Sequenz der Indexpatientin im Bereich des Exon 1 des IPF-1 Gens. *Ex* Exon, *IPF-1* Insulin Promoting Faktor 1.

### Keine Sequenzabweichungen in NeuroD1

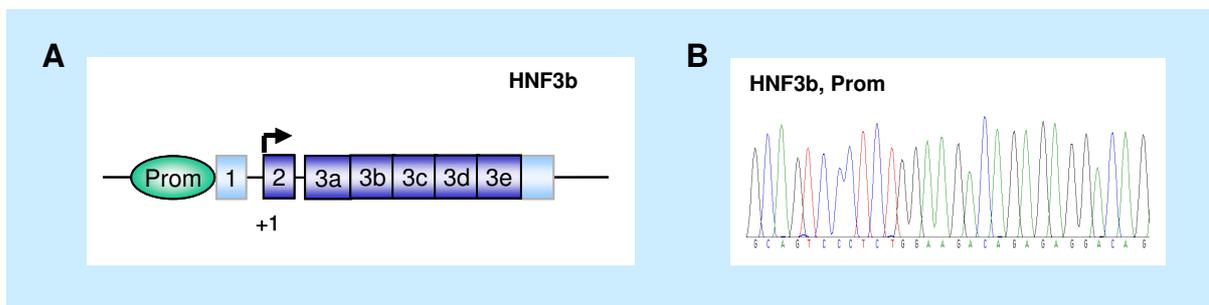
NeuroD1 ist auf dem Chromosom 2q32 lokalisiert und besteht aus 2 Exons. Das Exon 1 und ein Teil des Exon 2 bilden die 5'-untranslatierten Region (5'UTR), der Rest des Exon 2 kodiert für die 356 AS von NeuroD1. Funktionell besteht das Gen aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne mit basic-helix-loop-helix Motiv und einer Interaktionseinheit (Abbildung 7). Beide Exons wurden sequenziert und analysiert. Es konnten dabei keine Sequenzabweichungen gegenüber der Referenzsequenz NT\_005403 festgestellt werden.



**Abbildung 17: Sequenzanalyse von NeuroD1.** **A:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von NeuroD1. **B:** Funktioneller Aufbau von NeuroD1 mit charakteristischem basic-helix-loop-helix Motiv *modifiziert nach (Malecki et al. 1999)*. **C:** Ausschnitt aus der genomischen Sequenz der Indexpatientin im Bereich des Exon 2-2 von NeuroD1. *NeuroD1* Neurogenic Differentiationfactor 1.

### Wildtyp im HNF3b

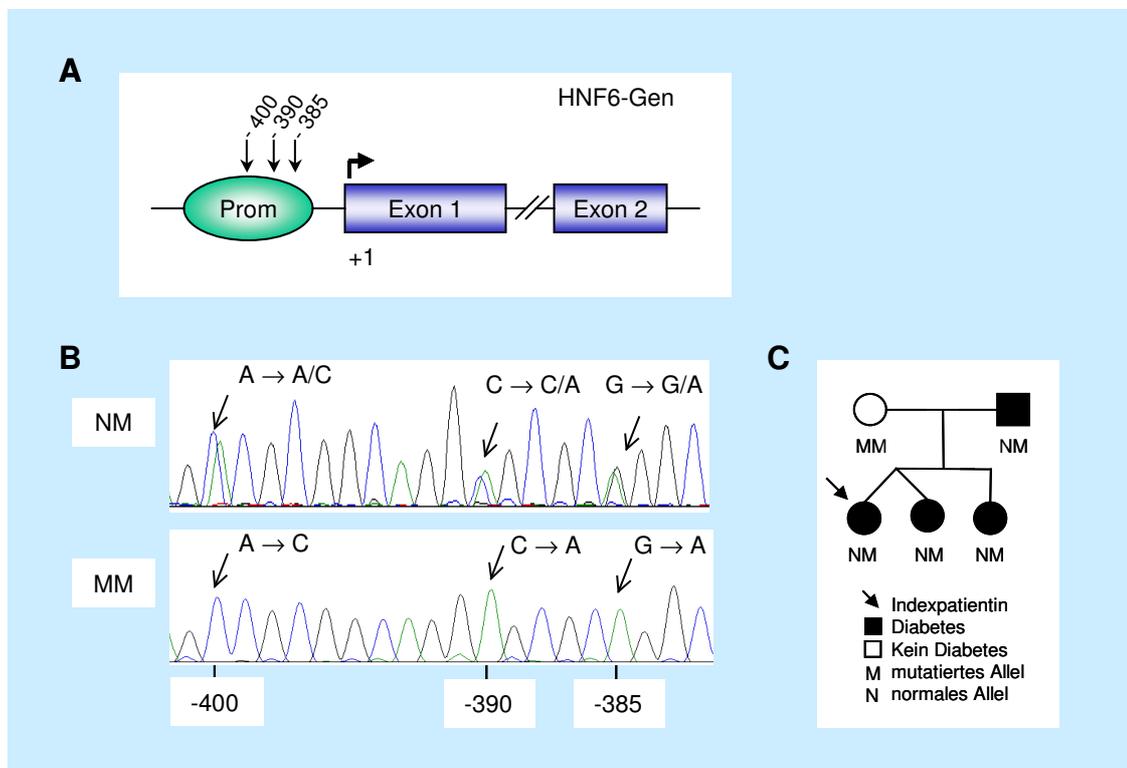
HNF3b ist auf dem Chromosom 20 lokalisiert und besteht aus 3 Exons, die für das 457 AS lange Protein kodieren (Yamada et al. 2000). Es erfolgte die Analyse der drei Exons und des Promoters von HNF3b. Dabei zeigte sich eine Wildtypsequenz ohne Abweichungen von der Referenzsequenz NT\_011387.



**Abbildung 18: Sequenzanalyse von HNF3b.** **A:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von HNF3b mit untranslatierten Bereichen (*hellblau*) und Promoterstruktur (*Prom, grün*). **B:** Ausschnitt aus der genomischen Sequenz der Indexpatientin im Bereich der Promoterstruktur von HNF3b. *HNF* Hepatic Nuclear Factor.

## Sequenzieller Polymorphismus in der Promoterstruktur von HNF6

HNF6 ist auf dem langen Arm des Chromosom 15 (15q21.1-21.2) lokalisiert und besteht aus 2 Exons bzw. 33023 Basen. Das zugehörige Protein ist aus 465 AS aufgebaut und hat eine Größe von 51 kDa (Vaisse et al. 1997). Es wurde neben den beiden Exons auch die ca. 750bp vor dem Transkriptionsstart liegende Promoterstruktur analysiert, in der sich bei der Indexpatientin, ihrer großen Schwester und ihrem Vater eine Folge von drei heterozygoten Veränderungen -400A>C, -390C>A und -385G>A (Abbildung 19) zeigte. Bei der nichtbetroffenen Mutter der Indexpatientin konnten diese Veränderungen in homozygoter Form nachgewiesen werden.



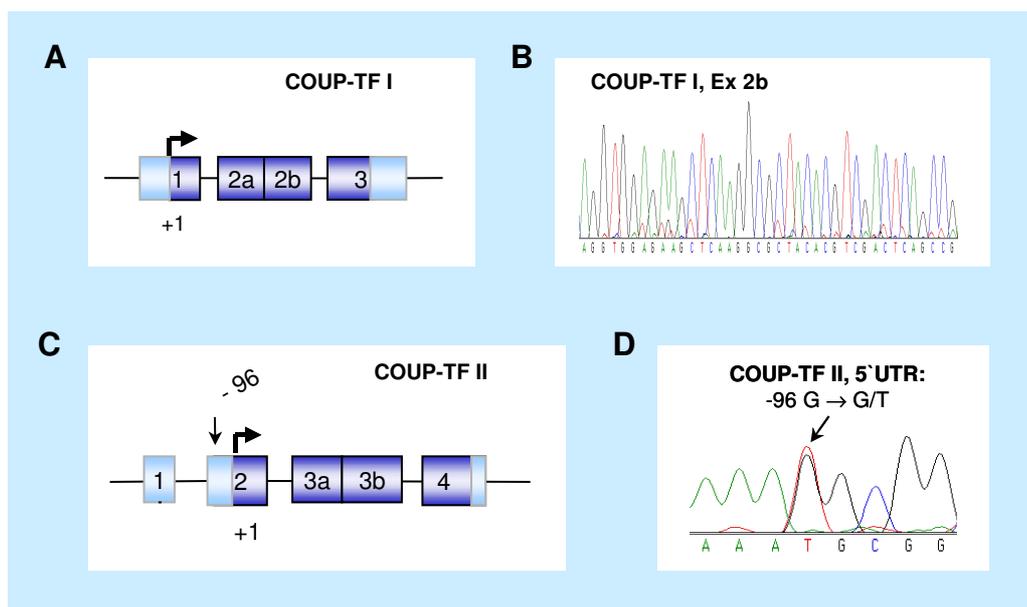
**Abbildung 19: Sequenzieller Polymorphismus im Promoter von HNF6.**

In der Promoterregion von HNF6 wurde eine Folge von drei Polymorphismen festgestellt. **A:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von HNF6 mit Promoterregion (*Prom*, grün) und Lokalisation der Polymorphismen (↓). **B:** Veränderter Abschnitt der genomischen Sequenz der Indexpatientin (exemplarisch für den heterozygoten Genotyp *NM*), sowie der Mutter (homozygoter Genotyp *MM*). **C:** Die Geschwister und der Vater der Indexpatientin wiesen ebenfalls einen heterozygoten Genotyp auf. *HNF* Hepatic Nuclear Factor.

## Wildtypsequenz bei COUP-TF-I und heterozygoter Polymorphismus in der 5'UTR von COUP-TF II

COUP-TF I liegt auf dem Chromosom 5q14 und besteht aus 3 Exons, die für den 423 AS bzw. 46,2 kDa großen Rezeptor kodieren. COUP-TF II dagegen liegt auf dem Chromosom 15q26 und ist aus 4 Exons aufgebaut, wobei nur die Exons 2-4 für das 414 AS bzw. 45,6 kDa große Protein kodieren. Beide Rezeptoren besitzen eine N-terminale regulative Domäne, einen zentral gelegenen Zink-Finger als DNA-Bindungs-Domäne und eine C-terminale Liganden-Bindungs-Domäne (Qiu et al. 1997).

Von COUP-TF I wurden die Exons 1 bis 3, von COUP-TF II die kodierenden Exons 2 bis 4 sequenziert. In COUP-TF I konnten dabei keine Sequenzvariationen festgestellt werden (Abbildung 20 A, B). Die Sequenzierung von COUP-TF II dagegen zeigte einen heterozygoten Polymorphismus (-96G>T) im 5' untranslatierten Bereich (5'UTR) des Exon 2 bei der Indexpatientin (Abbildung 20 C, D).



**Abbildung 20: Sequenzanalyse von COUP-TF I und heterozygoter Polymorphismus in COUP-TF II.** **A:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von COUP-TF I mit Indikation der untranslatierten Bereiche (*hellblau*). **B:** Ausschnitt der genomischen DNA-Sequenz der Indexpatientin im Bereich des Exon 2 von COUP-TF I. **C:** Genomischer Aufbau von COUP-TF II. **D:** Heterozygoter Polymorphismus -96G→T in der 5'-untranslatierten-Region (5'UTR) (*hellblau*) der genomischen DNA-Sequenz der Indexpatientin. *COUP-TF* Chicken-Ovalbumin-Upstream-Promoter Transkriptionfaktor.

## 4 Diskussion

### 4.1 Familiäres Diabetessyndrom mit Störung der Insulinsekretion

Das Diabetessyndrom der hier untersuchten Familie ist charakterisiert durch die Manifestation von Diabetes mellitus bei insgesamt fünf Familienmitgliedern in drei Generationen im Alter von 13 bis 30 Jahren. Neben der Indexpatientin sind ihre Zwillingschwester, ihre ältere Schwester, der Vater und die Großmutter väterlicherseits von Diabetes mellitus betroffen. Bei der Mutter der Indexpatientin und den übrigen Verwandten konnte ein Diabetes ausgeschlossen werden.

Bei Manifestation zeigten die Mädchen keine der typischen Symptome des T1D, wie Ketoazidose, Polyurie, Polydipsie und Gewichtsabnahme. Bei keinem der Betroffenen konnten diabetesspezifische Autoantikörper wie ICA, IAA, GAD65 oder IA-2 festgestellt werden. Die drei Patientinnen waren normalgewichtig, zeigten ein normales Lipidprofil und waren, bis auf die gut behandelbare passagere Hypertonie der Indexpatientin, normotensiv. Sekundäre Ursachen des Diabetes bei der Indexpatientin wie Cystische Fibrose oder Pankreatitis konnten ausgeschlossen werden.

Funktionell zeigten die Patientinnen bei normalen nüchtern-C-Peptid-Spiegeln einen verzögerten Insulin- und C-Peptidanstieg sowie eine persistierende Hyperglykämie nach oraler und intravenöser Glukosegabe. Nach Arginin-Infusion kam es dagegen zu einer prompten Insulinausschüttung mit rascher Wiederherstellung der Normoglykämie. HOMA-Index und ISI-comp waren im Normbereich und deuten auf eine gute periphere Insulinsensitivität ohne Nachweis einer Insulinresistenz hin. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die initiale Therapie mit Insulin (0,3 U/kg/d) bei der Indexpatientin und ihren Schwestern frühzeitig beendet werden und mit geringsten Dosen von Sulfonylharnstoffen (0,5 - 1,0 g/d Glimpirid) bzw. mit Diät allein eine gute Stoffwechselkontrolle erzielt werden.

Der Vater der Indexpatientin zeigte im Verlauf eine schlechte metabolische Kontrolle und ist nun seit ca. zehn Jahren insulinpflichtig. Neben massiven diabetesspezifischen Manifestationen der Makro- und Mikroangiopathie mit Gangränen der oberen und unteren Extremität, Retinopathie und arterieller Hypertonie leidet er seit

ca. sechs Jahren an einer dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz bei V.a. diabetischer Nephropathie.

Insgesamt zeigt sich ein autosomal-dominantes Diabetessyndrom vom Typ MODY mit Manifestation im Jugend- bzw. jungen Erwachsenenalter mit glukoseinduzierter Insulinsekretionsstörung und Neigung zur Progredienz bei intakter Insulinexpression und intakter Insulinsensitivität ohne Zeichen einer peripheren Insulinresistenz.

## **4.2 HNF1b-ähnlicher Phänotyp und familiäre Schilddrüsenzysten**

Renale und genitale Malformationen können isoliert oder als Teil eines Syndroms auftreten (Pohl et al. 2002). Im Zusammenhang mit Diabetes sind urogenitale Malformationen v.a. mit Mutationen im HNF1b-Gen beschrieben (Bingham et al. 2002). Dabei kann der Phänotyp sowohl zwischen als auch innerhalb der Familien stark variieren. Die „Müllerschen Anomalien“ insbesondere scheinen keine vollständige Penetranz zu haben, d.h. sie sind nicht bei allen Mutationsträgern ausgeprägt (Bingham et al. 2000, Bingham et al. 2002, Bingham u. Hattersley 2004). Bei der Indexpatientin wurde eine Nierenagenesie rechts und ein Uterus unicornis links bei sonst normaler Nierenfunktion, normalem Hormonstatus und normaler Pubertätsentwicklung festgestellt. Sonst konnte bei keiner der übrigen weiblichen betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern eine urogenitale Malformation nachgewiesen werden. Beim Vater stellte sich sonographisch eine Schrumpfniere rechts bei terminaler Niereninsuffizienz und V.a. diabetische Nephropathie dar.

Bei der Indexpatientin und ihren Schwestern wurden mehrere kleine Schilddrüsenzysten bei sonst intakter Schilddrüsenfunktion festgestellt. Bei ihrem Vater zeigte sich eine Mikrozyste bei bestehender Struma multinodosa. Sonst ergab sich bei den Betroffenen ein unauffälliger Organbefund. Die nichtdiabetische Mutter zeigte keinen Anhalt für Schilddrüsenzysten bei bekannter Autoimmunthyroiditis. Meistens werden Schilddrüsenzysten im Zusammenhang mit familiärem kongenitalen Hypothyroidismus beschrieben (Leger et al. 2002). In normal entwickelten Schilddrüsen mit intakter Funktion seien Zysten dagegen extrem selten (Leger et al. 2002, Marinovic et al. 2003). Die hier vorliegende scheinbare Kosegregation mit Diabetes sowie die Assoziation von MODY zu zystischen Veränderungen z.B. der Nieren lässt einen

Zusammenhang vermuten. Es handelt sich demnach klinisch um einen HNF1b-ähnlichen Phänotyp der Indexpatientin bei familiärem Diabetessyndrom vom Typ MODY mit dem Zusatzphänomen von Schilddrüsenzysten aller Betroffenen.

### **4.3 Kandidatengenanalyse MODY X**

Bei der durchgeführten Kandidatengenanalyse wurden neben dem HNF1b-Gen die übrigen fünf MODY-Gene und vier weitere Kandidatengene untersucht. Die Sequenzanalyse des HNF1b-Gens ergab den heterozygoten Polymorphismus H336D in der Indexpatientin, ihrer Zwillingsschwester und ihrem Vater, nicht jedoch in der ebenfalls betroffenen älteren Schwester. Er ist damit wahrscheinlich nicht als krankheitsverursachend anzusehen. In den Genen für GCK, HNF4a, IPF-1 und NeuroD1 konnten keine Abweichungen von der Referenzsequenz festgestellt werden.

Bei der Analyse vier weitere Kandidatengene mit putativer Rolle in der Pathogenese des MODY X konnte in der Promoterregion des HNF6-Gens eine Folge von drei Polymorphismen in heterozygoter Form bei der Indexpatientin, ihren Schwestern und ihrem Vater festgestellt werden. Bei der nichtdiabetischen Mutter fand sich die identische Folge der Polymorphismen in homozygoter Form. Es ist damit anzunehmen, dass es sich bei der gefundenen Veränderung in der Promotersequenz des HNF6-Gens um einen zumindest familiären Polymorphismus handelt. Außerdem wurde in der 5'-untranslatierten Region (5'UTR) des Exons 2 des COUP-TF-II-Gens der heterozygote Polymorphismus -96G>T gefunden. Veränderungen soweit vor dem Transkriptionsstart sind bisher allerdings nicht als relevant beschrieben worden. In den Genen HNF3b und COUP-TF I konnte keine Sequenzvariation festgestellt werden.

Es handelt sich demnach bei dem vorliegenden Krankheitsbild um eine Form des genetisch vermittelten Diabetes mit HNF1b-ähnlichem Phänotyp mit Zusatzphänomen ohne Nachweis einer krankheitsassoziierten Mutation in HNF1b, fünf weiteren bekannten MODY-Genen, sowie den Genen HNF3b, HNF6 und COUP-TF I und II. Aus der klinischen Beobachtung lässt sich vermuten, dass möglicherweise ein anderer Transkriptionsfaktor als die hier untersuchten, betroffen ist, der neben der Funktion in der Betazellregulation zumindest zeitweise eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Niere, Genitaltrakt und Schilddrüse hat.

## 4.4 Ausblick und klinische Relevanz

Als Standardmethode zur Genanalyse bei MODY gilt die bidirektionale Sequenzanalyse, mit der in etwa 80% der Fälle eine Mutation in einem von sechs bisher mit MODY assoziierten Genen nachgewiesen werden können (Fajans et al. 2001, Froguel et al. 1993). Die übrigen 15-20% werden unter dem Begriff des sogenannten MODY X zusammengefasst. Nach einer Beobachtung von (Bellanne-Chantelot et al. 2004) ist es bei Patienten, die klinisch an einem MODY5 leiden, sogar in ca. 60% der Fälle nicht möglich, eine Mutation im HNF1b-Gen nachzuweisen. Es ist also möglich, dass der hier vorliegende Gendefekt der untersuchten Familie mit der Standardmethode der direkten Sequenzanalyse nicht erkannt werden konnte.

Diesbezüglich neue Möglichkeiten scheint die quantitative multiplex PCR kurzer fluoreszierender Fragmente (QMPSF) zu bieten. In einer aktuellen Studie von Bellanne-Chantelot konnte mit dieser Methode in einer Gruppe von 40 MODY-X-Patienten mit HNF1b-ähnlichem Phänotyp bei 28 Patienten, d.h. bei ca. 70%, doch eine Mutation im HNF1b-Gen nachgewiesen werden (Bellanne-Chantelot et al. 2005). In neun Fällen handelte es sich dabei um eine heterozygote Deletion von ca. 1,2 Megabasen, sog. großen genomischen Rearrangements, die den kompletten Verlust eines Allels bedingte.

Trotz der relativen Seltenheit, ist die Kenntnis und korrekte Diagnose von MODY entscheidend. Wie bei dem Vater der Indexpatientin zu sehen, besteht die Gefahr der Entwicklung von Langzeitkomplikationen. Für eine Verbesserung der Lebensqualität und Compliance ist daher die Therapieoptimierung durch die frühe Gabe von oralen Antidiabetika oder diätetischer Beratung und damit die Verzögerung der Insulinabhängigkeit zentral.

Die genaue Erforschung von MODY wird auch in Zukunft nicht nur für die MODY-Patienten hilfreich sein, sondern über die Erkenntnisse in der Regulation der Betazellfunktion auch zum besseren Verständnis anderer Diabetestypen beitragen.

## 5 Zusammenfassung

Zu den genetischen Ursachen des Diabetes mellitus vom Typ des Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) zählen inaktivierende Mutationen der Hepatic Nuclear Factors (HNF), die funktionell an der Regulation der Insulingentranskription in der Betazelle beteiligt sind. Patienten mit heterozygoten Mutationen von HNF1beta weisen einen familiären Diabetes (MODY5) mit Anlageanomalien des Urogenitaltraktes auf.

An der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm wurde eine Familie mit einer solchen klinischen Diabetesform identifiziert. Bei der Indexpatientin wurde im 13. Lebensjahr ein Diabetes mellitus bei unilateraler Nierenagenesie und Uterus unicornis diagnostiziert. Eine Zwillingschwester, eine weitere Schwester, der Vater und die Großmutter väterlicherseits waren ebenfalls an einem Diabetes erkrankt. Die diabetesspezifischen Antikörper gegen Inselzellen (ICA), Tyrosin Phosphatase (IA-2) und Glutamat-Decarboxylase (GAD65) konnten bei keinem der betroffenen Individuen nachgewiesen werden. Im i.v.-Glukose-Arginin-Test zeigte sich bei ihnen eine reduzierte glukoseabhängige Insulinsekretion bei intakter Sekretion nach Arginin-Applikation. Nebenbefundlich zeigten alle Betroffenen zystische Veränderungen der Schilddrüse bei euthyreoter Stoffwechsellage.

Die Analyse von HNF1beta in genomischer DNA (Desoxyribonukleinsäure) der Indexpatientin ergab eine potentiell pathogene Mutation mit Aminosäurentausch im Exon 4 (Codon 336 CAC nach GAC, Histidin nach Aspartat). Diese konnte auch bei der Zwillingschwester und dem Vater, nicht jedoch bei der ebenfalls betroffenen älteren Schwester nachgewiesen werden. Allein kann diese Mutation das vorliegende Krankheitsbild jedoch nicht erklären. Es folgte daher die Analyse neun weiterer Kandidatengene mit gesicherter und putativer Störung der Insulingentranskription, bei der sich verschiedene Sequenzvariationen, allerdings ohne sicheren Krankheitswert zeigten.

Insgesamt konnte ein MODY5-ähnliches hereditäres Diabetes-Syndrom ohne Mutation im HNF1beta-Gen bei allen Betroffenen beschrieben werden. Weitere Kandidatengenanalysen oder alternative Screeningmethoden sollen in zukünftigen Experimenten die genetische Grundlage dieses Phänotyps klären.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abbott C, Piaggio G, Ammendola R, Solomon E, Povey S, Gounari F, De Simone V, Cortese R: Mapping of the gene TCF2 coding for the transcription factor LFB3 to human chromosome 17 by polymerase chain reaction. *Genomics* 8: 165-167 (1990)
2. Abderrahmani A, Chevre JC, Otabe S, Chikri M, Hani EH, Vaxillaire M, Hinokio Y, Horikawa Y, Bell GI, Froguel P: Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor-3beta gene (HNF3B) does not contribute to maturity-onset diabetes of the young in French Caucasians. *Diabetes* 49: 306-308 (2000)
3. AmericanDiabetesAssociation: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27 Suppl 1: S5-S10 (2004)
4. Badenhoop K, Boehm BO: Genetic susceptibility and immunological synapse in type 1 diabetes and thyroid autoimmune disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112: 407-415 (2004)
5. Bardoux P, Zhang P, Flamez D, Perillou A, Lavin TA, Tanti JF, Hellemans K, Gomas E, Godard C, Andreelli F, Buccheri MA, Kahn A, Le Marchand-Brustel Y, Burcelin R, Schuit F, Vasseur-Cognet M: Essential role of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II in insulin secretion and insulin sensitivity revealed by conditional gene knockout. *Diabetes* 54: 1357-1363 (2005)
6. Beards F, Frayling T, Bulman M, Horikawa Y, Allen L, Appleton M, Bell GI, Ellard S, Hattersley AT: Mutations in hepatocyte nuclear factor 1beta are not a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 47: 1152-1154 (1998)
7. Bellanne-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, Dubois-Laforgue D, Clauin S, Beaufils S, Wilhelm JM, Boitard C, Noel LH, Velho G, Timsit J: Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med* 140: 510-517 (2004)
8. Bellanne-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D, Collin P, Daumont M, Douillard C, Dubois-Laforgue D, Dusselier L, Gautier JF, Jadoul M, Laloï-Michelin M, Jacquesson L, Larger E, Louis J, Nicolino M, Subra JF, Wilhem JM, Young J, Velho G, Timsit J: Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta

(TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes* 54: 3126-3132 (2005)

9. Bingham C, Ellard S, Allen L, Bulman M, Shepherd M, Frayling T, Berry PJ, Clark PM, Lindner T, Bell GI, Ryffel GU, Nicholls AJ, Hattersley AT: Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 beta. *Kidney Int* 57: 898-907 (2000)
10. Bingham C, Ellard S, Cole TR, Jones KE, Allen LI, Goodship JA, Goodship TH, Bakalinova-Pugh D, Russell GI, Woolf AS, Nicholls AJ, Hattersley AT: Solitary functioning kidney and diverse genital tract malformations associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Kidney Int* 61: 1243-1251 (2002)
11. Bingham C, Hattersley AT: Renal cysts and diabetes syndrome resulting from mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2703-2708 (2004)
12. Bohn S, Thomas H, Turan G, Ellard S, Bingham C, Hattersley AT, Ryffel GU: Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1beta gene that lead to defective kidney development. *J Am Soc Nephrol* 14: 2033-2041 (2003)
13. Cereghini S: Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *Faseb J* 10: 267-282 (1996)
14. Danne T, Beyer P, Holl RW, Kiess W, Kordonouri O, Lange K, Lepler R, Marg W, Neu A, Petersen M, Ziegler R: Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus im Kindes- und Jugendalter. Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinie DDG. *Diabetes und Stoffwechsel* 13, Suppl. 2: (2004)
15. Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M: Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281: 692-695 (1998)
16. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS: Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 345: 971-980 (2001)
17. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT: beta-cell genes and diabetes:

molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 50 Suppl 1: S94-100 (2001)

18. Frayling TM, Lindgren CM, Chevre JC, Menzel S, Wishart M, Benmezroua Y, Brown A, Evans JC, Rao PS, Dina C, Lecoeur C, Kanninen T, Almgren P, Bulman MP, Wang Y, Mills J, Wright-Pascoe R, Mahtani MM, Prisco F, Costa A, Cognet I, Hansen T, Pedersen O, Ellard S, Tuomi T, Groop LC, Froguel P, Hattersley AT, Vaxillaire M: A genome-wide scan in families with maturity-onset diabetes of the young: evidence for further genetic heterogeneity. *Diabetes* 52: 872-881 (2003)
19. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, et al.: Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328: 697-702 (1993)
20. Ghosh S, Watanabe RM, Hauser ER, Valle T, Magnuson VL, Erdos MR, Langefeld CD, Balow J, Jr., Ally DS, Kohtamaki K, Chines P, Birznieks G, Kaleta HS, Musick A, Te C, Tannenbaum J, Eldridge W, Shapiro S, Martin C, Witt A, So A, Chang J, Shurtleff B, Porter R, Kudelko K, Unni A, Segal L, Sharaf R, Blaschak-Harvan J, Eriksson J, Tenkula T, Vidgren G, Ehnholm C, Tuomilehto-Wolf E, Hagopian W, Buchanan TA, Tuomilehto J, Bergman RN, Collins FS, Boehnke M: Type 2 diabetes: evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finnish affected sib pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2198-2203 (1999)
21. Heinze E, Horn T, Wabitsch M, Wody S, Sorgo W, Homoki J: Bestimmung von Insulinresistenz und Insulinsensitivität bei Kindern und Jugendlichen. *Monatsschr Kinderheilkd* 150: 1095 - 1100 (2002)
22. Hinokio Y, Horikawa Y, Furuta H, Cox NJ, Iwasaki N, Honda M, Ogata M, Iwamoto Y, Bell GI: Beta-cell transcription factors and diabetes: no evidence for diabetes-associated mutations in the hepatocyte nuclear factor-3beta gene (HNF3B) in Japanese patients with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes* 49: 302-305 (2000)
23. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI: Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17: 384-385 (1997)

24. Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, Madsen OD, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D, Rousseau GG, Lemaigre FP: Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene ngn3. *Mol Cell Biol* 20: 4445-4454 (2000)
25. Leger J, Marinovic D, Garel C, Bonaiti-Pellie C, Polak M, Czernichow P: Thyroid developmental anomalies in first degree relatives of children with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 575-580 (2002)
26. Lehto M, Bitzen PO, Isomaa B, Wipemo C, Wessman Y, Forsblom C, Tuomi T, Taskinen MR, Groop L: Mutation in the HNF-4alpha gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes* 48: 423-425 (1999)
27. Lemaigre FP, Durviaux SM, Rousseau GG: Liver-specific factor binding to the liver promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J Biol Chem* 268: 19896-19905 (1993)
28. Lemaigre FP, Durviaux SM, Truong O, Lannoy VJ, Hsuan JJ, Rousseau GG: Hepatocyte nuclear factor 6, a transcription factor that contains a novel type of homeodomain and a single cut domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9460-9464 (1996)
29. Levinson-Dushnik M, Benvenisty N: Involvement of hepatocyte nuclear factor 3 in endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 17: 3817-3822 (1997)
30. Lindgren CM, Widen E, Tuomi T, Li H, Almgren P, Kanninen T, Melander O, Weng J, Lehto M, Groop LC: Contribution of known and unknown susceptibility genes to early-onset diabetes in scandinavia: evidence for heterogeneity. *Diabetes* 51: 1609-1617 (2002)
31. Lindner TH, Njolstad PR, Horikawa Y, Bostad L, Bell GI, Sovik O: A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum Mol Genet* 8: 2001-2008 (1999)
32. Maestro MA, Boj SF, Luco RF, Pierreux CE, Cabedo J, Servitja JM, German MS, Rousseau GG, Lemaigre FP, Ferrer J: Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene

network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum Mol Genet* 12: 3307-3314 (2003)

33. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS: Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 23: 323-328 (1999)
34. Marinovic D, Garel C, Czernichow P, Leger J: Additional phenotypic abnormalities with presence of cysts within the empty thyroid area in patients with congenital hypothyroidism with thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1212-1216 (2003)
35. Moller AM, Ek J, Durviaux SM, Urhammer SA, Clausen JO, Eiberg H, Hansen T, Rousseau GG, Lemaigre FP, Pedersen O: Hepatocyte nuclear factor-6: associations between genetic variability and type II diabetes and between genetic variability and estimates of insulin secretion. *Diabetologia* 42: 1011-1016 (1999)
36. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ: Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11: 2323-2334 (1997)
37. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA: Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303: 1378-1381 (2004)
38. Park JI, Tsai SY, Tsai MJ: Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med* 52: 174-181 (2003)
39. Pearson ER, Velho G, Clark P, Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Froguel P, Hattersley AT: beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations. *Diabetes* 50 Suppl 1: S101-107 (2001)
40. Pohl M, Bhatnagar V, Mendoza SA, Nigam SK: Toward an etiological classification of developmental disorders of the kidney and upper urinary tract. *Kidney Int* 61: 10-19 (2002)

41. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M: Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84: 575-585 (1996)
42. Power SC, Cereghini S: Positive regulation of the vHNF1 promoter by the orphan receptors COUP-TF1/Ear3 and COUP-TFII/Arp1. *Mol Cell Biol* 16: 778-791 (1996)
43. Qiu Y, Pereira FA, DeMayo FJ, Lydon JP, Tsai SY, Tsai MJ: Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. *Genes Dev* 11: 1925-1937 (1997)
44. Rastegar M, Rousseau GG, Lemaigre FP: CCAAT/enhancer-binding protein-alpha is a component of the growth hormone-regulated network of liver transcription factors. *Endocrinology* 141: 1686-1692 (2000)
45. Ringeisen F, Rey-Campos J, Yaniv M: The transactivation potential of variant hepatocyte nuclear factor 1 is modified by alternative splicing. *J Biol Chem* 268: 25706-25711 (1993)
46. Ryffel GU: Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol* 27: 11-29 (2001)
47. Schwitzgebel VM, Mamin A, Brun T, Ritz-Laser B, Zaiko M, Maret A, Jornayvaz FR, Theintz GE, Michielin O, Melloul D, Philippe J: Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4398-4406 (2003)
48. Servitja JM, Ferrer J: Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia* 47: 597-613 (2004)
49. Soergel M, Kirschstein M, Busch C, Danne T, Gellermann J, Holl R, Krull F, Reichert H, Reusz GS, Rascher W: Oscillometric twenty-four-hour ambulatory blood pressure values in healthy children and adolescents: a multicenter trial including 1141 subjects. *J Pediatr* 130: 178-184 (1997)
50. Spinass G: Pathogenese des Typ 1 Diabetes. In: Böhm BO, Palitzsch KD, Rosak C, Spinass GA (Hrsg.): *Klinische Diabetologie*. Springer-Verlag, Berlin, 17. Auflage, 13-24 (2000)

51. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF: Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17: 138-139 (1997)
52. Suaud L, Hemimou Y, Formstecher P, Laine B: Functional study of the E276Q mutant hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  found in type 1 maturity-onset diabetes of the young: impaired synergy with chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II on the hepatocyte nuclear factor-1 promoter. *Diabetes* 48: 1162-1167 (1999)
53. Thomas H, Jaschkowitz K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell SM, Roosen S, Lingott-Frieg A, Tack CJ, Ellard S, Ryffel GU, Hattersley AT: A distant upstream promoter of the HNF-4 $\alpha$  gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet* 10: 2089-2097 (2001)
54. Tillil H, Nick O, Kobberling J: [Modern diagnosis and classification of diabetes mellitus]. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 92: 456-466 (1998)
55. Vaisse C, Kim J, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Stoffel M: Pancreatic islet expression studies and polymorphic DNA markers in the genes encoding hepatocyte nuclear factor-3 $\alpha$ , -3 $\beta$ , -3 $\gamma$ , -4 $\gamma$ , and -6. *Diabetes* 46: 1364-1367 (1997)
56. Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB: Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 275: 35953-35959 (2000)
57. Wang Y, Zhang Y, Hillgartner FB: Chicken ovalbumin upstream-promoter transcription factor and E-box-binding proteins enhance thyroid-hormone responsiveness of the malic enzyme gene in avian hepatocytes. *Biochem J* 361: 391-400 (2002)
58. Yamada S, Zhu Q, Aihara Y, Onda H, Zhang Z, Yu L, Jin L, Si YJ, Nishigori H, Tomura H, Inoue I, Morikawa A, Yamagata K, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Takeda J: Cloning of cDNA and the gene encoding human hepatocyte nuclear factor (HNF)-3 $\beta$  and mutation screening in Japanese subjects with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 43: 121-124 (2000)

59. Yamagata K: Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocr J* 50: 491-499 (2003)
60. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384: 458-460 (1996a)
61. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384: 455-458 (1996b)
62. Zhang P, Bennoun M, Gogard C, Bossard P, Leclerc I, Kahn A, Vasseur-Cognet M: Expression of COUP-TFII in metabolic tissues during development. *Mech Dev* 119: 109-114 (2002)

## 7 Anhang

**Tabelle A - 1: Primer, Produktgröße und PCR-Bedingungen von *HNF1b*.**  
Referenzsequenzen: AC004132, NT\_078100, NM\_000458, NM\_006481, AH006912. Primer aus (Beards et al. 1998).

Abschnitt	Primer		Produkt (bp)	PCR-Bedingung		
	Senseprimer (5' – 3')	Antisenseprimer (5' – 3')		MgCl <sub>2</sub> (mM)	X (°C)	Zusatz
Promoter	CATGAACCCCGAAGAGTGGTG	GCCTCCAGACACCTGTTACT	420	1,5	58	-
Exon 1	GGGTGGAGGGGTTCTGGAT	CGGGCGCAGTGTCACTCAGG	528	1,5	61	#
Exon 2	CTCCCACTAGTACCCTAACC	GAGAGGGCAAAGGTCACTTCAG	291	1,5	60	-
Exon 3	AGTGAAGGCTACAGACCCTATC	TTCCTGGGTCTGTGTACTTGC	365	1,5	60	-
Exon 4	TGTGTTTTGGGCCAAGCACCA	AACCAGATAAGATCCGTGGC	381	1,5	60	-
Exon 5	TGCCGAGTCATTGTTCCAGG	CCTCTTATCTTATCAGCTCCAG	276	1,5	64	-
Exon 6	CTGCTCTTTGTGGTCCAAGTCC	GAGTTTGAAGGAGACCTACAG	288	1,25	58	-
Exon 7	ATCCACCTCTCCTTATCCCAG	ACTTCGAGAAAAGTTCAGACC	341	1,5	60	-
Exon 8	TTTGCTGTGTATGCACCTTG	GCCGAGTCCATGCTTGCCAC	258	1,5	60	-
Exon 9	CTTTGCTGGTTGAGTTGGGC	TTCCATGACAGCTGCCAGAG	208	1,5	60	-
var b	TGTGTTTTGGGCCAAGCACCA	TCACAGGGCAATGGCTGAAC <sup>1</sup>	517	1,5	60	-

<sup>1</sup> selbst ausgewählt, # Qiagen Q-Solution, *bp* Basenpaar, *PCR* Polymerasekettenreaktion, X optimierte Annealing-Temperatur.

**Tabelle A - 2: Primer, Produktgröße und PCR-Bedingungen von *NeuroD1*.**  
Referenzsequenzen: U508322, NT\_005403, AF045152, AB018693. Primer aus (Malecki et al. 1999).

Abschnitt	Primer		Produkt (bp)	PCR-Bedingung	
	Senseprimer (5' – 3')	Antisenseprimer (5' – 3')		X (°C)	Zusatz
Exon2-1	CAAGCATTGTACAGGTTTAG	CTCCAGGCGAGCCTTAGTCATC	407	60	-
Exon2-2	CCTCGAAGCCATGAACGCAG	GCTGTCCATGGTACCGTAAG	583	60	-
Exon2-3	CCTGCAACTCAATCCTCGGAC	CTGTAAGCACAGTGGGTTTCG	561	60	-

*bp* Basenpaar, *PCR* Polymerasekettenreaktion, X optimierte Annealing-Temperatur.

**Tabelle A - 3: Primer, Produktgröße und PCR-Bedingungen von *HNF4a*.**  
Referenzsequenzen: AL132772, NT\_011362. Primer aus (Lehto et al. 1999).

Abschnitt	Primer		Produkt (bp)	PCR-Bedingung	
	Senseprimer (5' – 3')	Antisenseprimer (5' – 3')		X (°C)	Zusatz
Promoter					
1-1	TCCCAGAACAAGGATCCAGAAG	GGGTGCTAATTACAACCTGCTGG	322	62	-
Promoter					
1-2	AGTGCCCGTGAGTCATGATGCC	TCGCATTCTCCCTGCCTCCAC	373	67	-
Exon1a	GGGCACTGGGAGGAGGCAGT	GCCTGTAGGACCAACCTACC	340	67	-
Exon1b	TCTGGTGTGCACGACTGCAC	CTGGAGCTGCAGCCTCATAC	357	60	-
Exon1c	CACAGGTGTTGCCAAGTGAAGC	CACCGAGAAATGCGGTTATGTC	325	60	-
Exon 2	AAGGCTCCCTTAGATGCCTG	CCACTCAGGGAGAAGACAGACCT	321	60	-
Exon 3	CCTAGTTCTGTCTAAGAGG	GTCATAAAGTGTGGCTACAG	253	60	-
Exon 4	CCACCCCTACTCCATCCCTGT	CCCTCCCGTCAGCTGCTCCA	271	60	-
Exon 5	GTGCAGGGGACAGAGAATGC	AATCAAGCCAGTCCACGGCTAT	322	60	-
Exon 6	GCCCAGCGTCACTGAGTTGGCCA	TTGCCTGGGTGAGTGCCATG	234	60	-
Exon 7	GCACCAGCTATCTTGCCAAC	AGGAGAAGTCTGGCAGAGCG	315	60	-
Exon 8	TCCCTGAATCCTTGTGCCAC <sup>2</sup>	ATAGACCATTGCCTTGTCCCA <sup>2</sup>	549	65	-
Exon 9	TGGTTGATTGGCCACGCCTG	ATCCTGGTCTACCTTCTAG	341	60	-
Exon 10	CATTTACTCCCACAAAGGCT	GATCACGTGATCACCAGGTG	277	60	-
Exon P2	TTCTGCTCCGGCCCTGTC <sup>1</sup>	AAGCTGACCGCAGTCCCG <sup>1</sup>	452	60	-
var 3	CTTGGAGGACTACATCAACGAC	CCACGCATCCATACATACTC <sup>2</sup>	478	60	-

<sup>1</sup> aus (Thomas et al. 2001), <sup>2</sup> selbst ausgewählt, *bp* Basenpaar, *PCR* Polymerasekettenreaktion, *X* optimierte Annealing-Temperatur.

**Tabelle A - 4: Primer, Produktgröße und PCR-Bedingungen von *IPF-1*.**  
Referenzsequenzen: NT\_024524, AF035259.1, AF035260.1. Primer aus (Schwitzgebel et al. 2003).

Abschnitt	Primer		Produkt (bp)	PCR-Bedingung	
	Senseprimer (5' – 3')	Antisenseprimer (5' – 3')		X (°C)	Zusatz
Exon 1	TCAGTGCGGAGCTGTCAAAG <sup>1</sup>	TGGGAGCGCTTGGAGGTAAG <sup>1</sup>	611	63	*
Exon 2	GCCCTGTGTCGCCCGCAG	TTGAAGCCCCTCAGCCAG	498	63	*

<sup>1</sup> selbst ausgewählt, \* 1-fach Enhancer, *bp* Basenpaar, *PCR* Polymerasekettenreaktion, *X* optimierte Annealing-Temperatur.

**Table A - 5: Primer, Produktgröße und PCR-Bedingungen von *HNF3b*.**  
Referenzsequenzen: AF176110, NT\_011387, AL121722. Primer aus (Yamada et al. 2000).

Abschnitt	Primer		Produkt (bp)	PCR-Bedingung	
	Senseprimer (5' – 3' )	Antisenseprimer (5' – 3' )		X (°C)	Zusatz
Promoter	TGCATTCTCTGTGTCTGAGG <sup>1</sup>	GAGGCTGAGATTTGTCTCTG <sup>1</sup>	431	62	-
Exon 1	GGGCACCTCGGTTGTGACTG	AAAGCCGGATTTATTTATGCCG	389	59	-
Exon 2	TGGTCGTTTTGTTGTGGCTGTTA	AAAAAAGAGACCCATTTGATTCCAA	289	55	-
Exon 3a	AACAGACTCGGAGTCCGGAGACTG	TGGAGTTCATGTTGGCGTAG	483	55	#
Exon 3b	TGAACATGTCGTCGTACGTG	CCATGGTGATGAGCGAGATGT	324	55	#
Exon 3c	CCTACGCCAACATGAACTCCATGAG	GCGCTCGAGTGAGGCGACTCGGTG	547	63	#
Exon 3d	AGAAGCGCTTCAAGTGCAGAGAAG	AGTGCATCACCTGTTCTAGGCCTTG	477	55	#
Exon 3e	ATCAACAACCTCCTGTCTCTCGG	TGAAGAAGACTGCTGTCTTGG	407	63	-

<sup>1</sup> selbst ausgewählt, # Qiagen Q-Solution, *bp* Basenpaar, *PCR* Polymerasekettenreaktion, X optimierte Annealing-Temperatur.

**Table A - 6: Primer, Produktgröße und PCR-Bedingungen von *HNF6*.**  
Referenzsequenzen: AF035580, AF035581, NT\_010194. Primer aus (Moller et al. 1999).

Abschnitt	Primer		Produkt (bp)	PCR-Bedingung	
	Senseprimer (5' – 3' )	Antisenseprimer (5' – 3' )		X (°C)	Zusatz
Prom a	GCCCTTTAAGCAATCTGCAC <sup>1</sup>	ACTGTTACAGACTCTGTGGC <sup>1</sup>	572	60	*
Prom b	TCCTTCATTTGTACCGGGAC <sup>1</sup>	CGGACACAACATCGATGTGG <sup>1</sup>	584	60	*
Exon1a	AGACAGAGCCCCACAGTGAG	TGCTGCCAGACCGGAGCTG	704	62	*
Exon1b	CTACCACAAGGACGTGGCCG	GCTTTCGTGTACCTTATCTC	654	56	-
Exon 2	TGAGCTCTGTCTTTCTACTC	CTGCTATCTTGAGGTCCTGG	447	62	-

<sup>1</sup> in Anlehnung an (Rastegar et al. 2000) selbst ausgewählt, \* 1-fach Enhancer, *bp* Basenpaar, *PCR* Polymerasekettenreaktion, X optimierte Annealing-Temperatur.

**Table A - 7: Primer, Produktgröße und PCR-Bedingungen von COUP-TF I.** Referenzsequenz: NT\_023148. Primer selbst ausgewählt.

Abschnitt	Primer		Produkt (bp)	PCR-Bedingung	
	Senseprimer (5' – 3')	Antisenseprimer (5' – 3')		X (°C)	Zusatz
Exon 1	CTCGGCGAGCAGCTCGGCTC	GGGGAGAGAAGCAGAGAAG	539	59	*
Exon 2a	GAGCTTCTGCATTGTGTTGG	TGGTCGGTGATCTGCAGATC	374	59	*
Exon 2b	ATGGGCATCGAGAACATCTG	AGGCTCAGTGCCAGCGAG	485	59	*
Exon 3	GCTATTTGTCAGCCTAACCG	TGGGTCCTCTGAGTCTCTAG	397	59	*

\* 1-fach Enhancer, *bp* Basenpaar, *PCR* Polymerasekettenreaktion, *X* optimierte Annealing-Temperatur.

**Table A - 8: Primer, Produktgröße und PCR-Bedingungen von COUP-TF II.** Referenzsequenz: NT\_010274. Primer selbst ausgewählt.

Abschnitt	Primer		Produkt (bp)	PCR-Bedingung	
	Senseprimer (5' – 3')	Antisenseprimer (5' – 3')		X (°C)	Zusatz
Exon 2	TCTTGACCCCTCGCACACAC	CTTCTTGCCTTACCCAGAG	650	58	**
Exon 3a	CTGGTTCTTGCCTGCTCAG	TGGTCCGTGATCTGCAGGTC	401	60	-
Exon 3b	TGCAGCCCAACAACATCATG	GTTGCACTCAACAGTTTGGC	493	60	-
Exon 4	GTGCACACACCTCATGTGAC	AGTTGTTCTGACCGACACAG	629	59	*

\* 1-fach Enhancer, \*\* 2-fach Enhancer, *bp* Basenpaar, *PCR* Polymerasekettenreaktion, *X* optimierte Annealing-Temperatur.

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. med. K. – M Debatin und der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universität Ulm, möchte ich mich für die Aufnahme als Doktorandin und die Möglichkeit zur Erhebung der klinischen Daten bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. G. Adler und Herrn Prof. Dr. med. B. O. Böhm der Klinik für Innere Medizin I, Universität Ulm, danke ich sehr für die Überlassung der Räume der Sektion Endokrinologie zur Durchführung der molekulargenetischen Experimente.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. B. Karges und Herrn Prof. Dr. med. W. Karges für die hervorragende Betreuung und Unterstützung in allen Entstehungsphasen meiner Doktorarbeit, sowie die vielen Anregungen und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Andrea Wissmann für die professionelle labortechnische Einführung und die stets herzliche, motivierende und effektive Zusammenarbeit bedanken.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Geburtsdatum/ -ort: 11.03.1980, Augsburg

## Schulbildung:

09/ 1990 – 06/ 1999 Gymnasium A.-B. von Stettensches Institut, Augsburg

## Hochschulbildung:

### *Studiengang Humanmedizin*

10/ 1999 – 08/ 2002 Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald

10/ 2002 – 09/ 2003 Università degli studi di Padova, Italien

10/ 2003 – 05/ 2006 Universität Ulm

05/ 2006 Approbation

### *Famulatur*

02 – 03/ 2002 Vincentinum, Augsburg (Innere)

01 – 02/ 2003 Universitätspoliklinik, Padova, Italien (Chirurgie)

08 – 09/ 2003 Universitätspoliklinik, Padova, Italien (Anästhesie)

06 – 07/ 2004 UIC Medical Hospital, Chicago, USA (Innere)

### *Praktisches Jahr*

04/ 2005 – 03/ 2006 Ostalbklinikum Aalen, Lehrkrankenhaus Universität Ulm  
(Anästhesie, Teiltertial Innere, Chirurgie)

08 – 10/ 2005 Northwestern Memorial Hospital, Northwestern University,  
Chicago, USA (Teiltertial Innere)

### *Promotion*

10/ 2004 – 01/2007 Hereditäres Diabetessyndrom mit urogenitalem Phänotyp.  
Analyse von HNF1beta und anderen Kandidatengenen.  
(Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universität Ulm)

Poster-Präsentation: 40. Jahrestagung DDG 2005, Berlin

19.01.2007 Tag der Promotion

## Berufstätigkeit:

Seit 06/ 2006 Assistenzärztin der Inneren Medizin am Ostalbklinikum Aalen,  
Lehrkrankenhaus der Universität Ulm