

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie
Universitätsklinikum Düsseldorf
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Ertan Mayatepek

**Seltene komplexe Hypoglykämieerkrankungen durch
Störung der Insulinsekretion oder -wirkung**

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin
vorgelegt von Dr. med. Sebastian Kummer
Düsseldorf 2024

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	5
1.1. Management und Folgen transienter neonataler Hypoglykämien	5
1.2. Pathogenese des transienten Hyperinsulinismus und Hyperinsulinismus bei Frühgeborenen	7
1.3. Komplexe/syndromale und neue monogene Hypoglykämieerkrankungen durch Störungen der Insulinsekretion oder -wirkung	9
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit.....	10
2. Eigene Arbeiten.....	11
2.1. Kongenitaler Hyperinsulinismus beim Menschen und Insulinsekretionsstörung in der Maus durch biallelische <i>DNAJC3</i> Varianten	11
2.2. Hyperinsulinämische Hypoglykämien assoziiert mit einer Variante des CaV1.2 Calciumkanals mit gemischten Gain- und Loss-of-function Effekten	17
2.3. Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämien bei Kindern mit Rubinstein-Taybi syndrom.....	24
2.4. Vergleichende Metaanalyse des Kabuki-Syndroms mit und ohne hyperinsulinämische Hypoglykämien	26
2.5. Hypoinsulinämische hypoketotische Hypoglykämien durch aktivierende genetische Mosaik der Phosphoinositol-3-Kinase	28
2.6. Ein erweitertes klinisches Spektrum der hypoinsulinämischen hypoketotischen Hypoglykämien durch genetische Aktivierung des Post-Insulinrezeptor-Signalweges	32
3. Diskussion.....	35
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	42
5. Literaturverzeichnis	43
6. Danksagung.....	51

7. Der Habilitationsschrift zugrundeliegende Originalarbeiten

- 7.1. Congenital Hyperinsulinism in Humans and Insulin Secretory Dysfunction in Mice Caused by Biallelic DNAJC3 Variants. Welters A, Nortmann O, Wörmeyer L, Freiberg C, Eberhard D, Bachmann N, Bergmann C, Mayatepek E, Meissner T, Kummer S. *Int J Mol Sci* 2024, 25(2), 127053
- 7.2. Hyperinsulinemic Hypoglycemia Associated with a CaV1.2 Variant with Mixed Gain- and Loss-of-Function Effects. Kummer S, Rinné S, Seemann G, Bachmann N, Timothy K, Thornton P, Pillekamp F, Mayatepek E, Bergmann C, Meissner T, Decher N. *Int J Mol Sci* 2022, 23(15), 809766
- 7.3. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia in children with Rubinstein-Taybi syndrome. Welters A, Khairi R, Dastamani A, Bachmann N, Bergmann C, Gilbert C, Clement C, Hurst J, Quercia N, Wasserman J, Meissner T, Shah P*, Kummer S* (*geteilte Senior-Autorenschaft). *Eur J Endocrinol* 2019; 181(2)121-12883
- 7.4. Comparative meta-analysis of Kabuki syndrome with and without hyperinsulinemic hypoglycemia. Hoermann H, El-Rifai O, Schebek M, Lodefalk M, Brusgaard K, Bachmann N, Bergmann O, Roeper M, Welters A, Salimi Dafsari R, Blankenstein O, Mayatepek E, Christesen H, Meissner T, Kummer S. *Clin Endocrinol* 2020; 93(3) 346-35491
- 7.5. Hypoinsulinemic, hypoketotic hypoglycemia due to mosaic genetic activation of Class 1A PI3-Kinase. Leiter S, Parker V, Welters A, Knox R, Clark G, Payne F, Lotta L, Harris J, Guerrero-Fernández J, González-Casado I, García-Miñaur S, Wareham N, Martínez-Glez V, Barroso I, Meissner T, Davies S, Hussain K, Temple K, Barreda-Bonis A, Kummer S*, Semple RK* (*geteilte Senior-Autorenschaft). *Eur J Endocrinol* 2017; 177(2)175-186100
- 7.6. An expanded clinical spectrum of hypoinsulinaemic hypoketotic hypoglycaemia. Welters A, Leiter SA, Bachmann N, Bergmann C, Hoermann H, Korsch E, Meissner T, Payne F, Williams R, Hussain K, Semple RK*, Kummer S* (*geteilte Letztautorenschaft). *Orphanet J Rare Dis* 2023 18:360; doi: 10.1186/s13023-023-02954-5112

1. Einleitung und Zielsetzung

Hypoglykämien gehören zu den häufigsten metabolischen Erkrankungen im Kindesalter und weisen eine große Heterogenität hinsichtlich ihrer klinischen Manifestation und ihres Ursachenspektrums auf. Die häufigste Form sind die transienten neonatalen Hypoglykämien, welche eine vorübergehende Anpassungsstörung darstellen, die in der Regel innerhalb der ersten zwei bis drei Lebenstage spontan sistiert (Stanley et al., 2015). Hypoglykämien, die jenseits der Neonatalperiode auftreten bzw. persistieren, umfassen ein breites Spektrum an Differentialdiagnosen, z.B. endokrinologische Erkrankungen und angeborene Stoffwechselerkrankungen (Schlune et al., 2014), oder komplexe/syndromale Erkrankungen, bei denen Hypoglykämien nur eine Facette eines übergeordneten Krankheitsbildes darstellen (Zenker et al., 2023). Zudem gibt innerhalb der jeweiligen Krankheitsbilder unterschiedlichste Schweregrade von Hypoglykämiemanifestationen. Diese beinhalten schwere Hypoglykämieeigungen, die mit einem hohen Risiko für neurologische Schäden verbunden sind (Banerjee et al., 2019; Muukkonen et al., 2019; Roeper et al., 2020), bis hin zu milden Hypoglykämieeigungen, die nur in prägnanten Auslösesituationen klinisch symptomatisch werden (Metwalley & Farghaly, 2024; Wolfsdorf et al., 2024).

Aufgrund des vielfältigen Spektrums an Ursachen und klinischen Manifestationen existieren bis heute zahlreiche unbeantwortete Fragen rund um das Thema kindlicher Hypoglykämieerkrankungen. Diese eröffnen vielfältige Forschungsmöglichkeiten, mit denen wir uns als Gruppe bereits seit vielen Jahren intensiv beschäftigen, und welche in der folgenden Einführung zum Verständnis des Kontextes dargestellt seien. Schwerpunkt der hier vorgelegten Arbeit soll dann anschließend insbesondere die Beschreibung von neuen komplexen/syndromalen Hypoglykämieerkrankungen sein.

1.1. Management und Folgen transienter neonataler Hypoglykämien

Transiente Unterzuckerungen gehören zu den häufigsten Anpassungsstörungen der Neonatalperiode. Etwa ein Drittel der Neugeborenen weist Hypoglykämie-prädisponierende Risikofaktoren auf, z.B. Frühgeburtlichkeit, ein geringes Geburtsgewicht („small for gestational

age“, SGA), maternalen Diabetes in der Schwangerschaft, oder jegliche Form von perinatalem Stress (Infektion, Asphyxie, prolongierte/erschwerte Geburt, etc.). Von diesen Kindern mit Risikofaktoren manifestiert sich eine Hypoglykämie bei etwa 50%. Somit ist statistisch ca. 15% aller Neugeborenen von einer Hypoglykämie betroffen (Harris et al., 2012). Trotz dieser Häufigkeit gibt es bis heute nur eine begrenzte Evidenzbasis für die Festlegung standardisierter Managementkonzepte und Leitlinien, z.B. hinsichtlich Indikation, Häufigkeit und Grenzwerten für ein Blutzuckerscreening, oder Art, Intensität, und Blutzuckerzielwerten einer therapeutischen Intervention. Diese Herausforderungen haben wir 2022 in einem Review zusammengefasst (Roeper et al., 2023). So unterscheiden sich die Leitlinien zum Management der neonatalen Hypoglykämie weltweit zum Teil deutlich. In Deutschland gibt es bislang keinen formulierten Konsensus/keine Leitlinie zum Screening und Management von neonatalen Hypoglykämien außerhalb des spezifischen Kontextes eines maternalen Diabetes in der Schwangerschaft. Auch machen verschiedene internationale Leitlinien Entscheidungen zum Screening bzw. zur Therapie einer Hypoglykämie von der klinischen Symptomatik abhängig, jedoch konnten wir kürzlich zeigen, dass die klinische Symptomatik in hohem Maße unzuverlässig und damit weitestgehend ungeeignet zur Erkennung und Therapiestratifizierung von neonatalen Hypoglykämien ist (Hoermann, Mokwa, et al., 2022). Auch besteht weiterhin Unklarheit hinsichtlich geeigneter Cutoffs für die Erkennung und Therapie der neonatalen Hypoglykämie – nicht zuletzt mit Blick auf eine sinnvollen Balance gegenüber der Überbehandlung von wenig gefährdeten Neugeborenen. Während die bisherige Studienlage hinsichtlich den Folgen milder neonataler Hypoglykämien zwischen 36 und 45mg/dl uneinheitlich ist (McKinlay et al., 2017; Harris et al., 2016; Kaiser et al., 2015; Shah et al., 2022; Shah, Harding, Brown, & McKinlay, 2019; Shah, Harding, Brown, & Mckinlay, 2019; van Kempen et al., 2020), konnten wir kürzlich erstmals zeigen, dass Kinder welche transiente neonatale Hypoglykämien <30mg/dl erlitten haben, im Alter von 7-11 Jahren unter anderem einen 4,8 Punkte niedrigeren Gesamt-IQ aufwiesen als die Kontrollgruppe (Roeper et al., 2024). Diese Arbeit unterstreicht die Sinnhaftigkeit eines strukturierten Managements zur Verhinderung von zwar quantitativ geringen, aber eine Vielzahl von Neugeborenen

betreffenden potentiellen Hypoglykämiefolgen. Um zukünftig Managementkonzepte mit besserer Evidenzbasis entwickeln zu können, führen wir derzeit eine Studie mit insgesamt 678 Neugeborenen durch, in der wir ein strukturiertes neonatales Managementkonzept prospektiv evaluieren, einschließlich langfristiger Verfolgung der eingeschlossenen Probanden im Hinblick auf deren neurologische Entwicklung (Hoermann, Roeper, et al., 2022).

1.2. Pathogenese des transienten Hyperinsulinismus und Hyperinsulinismus bei Frühgeborenen

Die mit Abstand häufigste neonatale Hypoglykämiemanifestation stellen transiente, insulinvermittelte Hypoglykämien in den ersten 48-72 Lebensstunden dar (Stanley et al., 2015). Jedoch gibt es auch Kinder, bei denen die Hypoglykämieeigung sehr ausgeprägt ist und auch über Wochen als sogenannter transienter Hyperinsulinismus (THI) persistieren kann, der dann häufig einer medikamentösen Behandlung bedarf, i.d.R. mit Diazoxid. In einer Beobachtungsstudie an Säuglingen mit THI konnten wir zeigen, dass diese in der Regel prädisponierende Risikofaktoren aufweisen, und dennoch in einem relevanten Anteil erst mit Verzögerung und dann deutlich niedrigeren Blutzuckerwerten diagnostiziert werden, weil ein standardisiertes postnatales Screening derzeit in Deutschland noch nicht durchgängig stattfindet (Hoermann et al., 2021).

Neben einem maternalen Diabetes in der Schwangerschaft ist der wichtigste Prädispositionsfaktor für einen transienten Hyperinsulinismus perinataler Stress verschiedenster Ursachen (u.a. niedriges Geburtsgewicht = small for gestational age/SGA, Frühgeburtlichkeit, Infektion, Asphyxie etc.). Dies hat im angloamerikanischen Raum zur mittlerweile gebräuchlichsten Bezeichnung „perinatal stress-induced hyperinsulinism“ (PSHI) geführt. Bislang war unklar, mit welchem genauen Pathomechanismus der perinatale Stress zu einer gesteigerten Insulinausschüttung führt. Bislang publizierte Hypothesen zu dieser Frage (Stanescu & Stanley, 2022; Stanley et al., 2023) sind nur mit mäßiger Evidenz/sehr begrenzten Originaldaten belegt (Yang et al., 2021).

Jedoch gibt es umfangreiche Daten aus einem fetalen Schafmodell, welche einen direkten Einfluss von Katecholaminen auf Betazellen zeigen. So konnte insbesondere eine Insulinsuppression während einer pränatalen Katecholaminexposition gezeigt werden, gefolgt von einer hyperresponsiven Insulinsekretion nach Beendigung der Katecholaminexposition – die entsprechenden umfangreichen Originaldaten wurden von Limesand et al in einem Review zusammengefasst (Limesand & Rozance, 2017).

Basierend auf diesem Schafmodell haben wir eine Studie an humanen Neugeborenen durchgeführt, in der wir die Spiegel von Katecholaminen und Katecholaminmetaboliten in Nabelschnurblut und Amnionflüssigkeit von gesunden Neugeborenen und Neugeborenen mit verschiedenen Risikofaktoren für Unterzuckerungen gemessen haben, und diese mit den postnatalen Blutzuckerläufen korreliert haben (Hoermann et al., 2024). In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass neugeborene Kinder mit Risikofaktoren für Unterzuckerungen signifikant erhöhte Katecholaminspiegel im Nabelschnurblut und Fruchtwasser im Vergleich zu Neugeborenen ohne Risikofaktoren aufwiesen, und die Höhe der Katecholaminspiegel mit der Anzahl der postnatalen Hypoglykämien und deren Therapiebedarf korrelierte. Dies stellt den ersten Beleg für dieses Modell an humanen Neugeborenen dar.

Eine weitere Beobachtung, welche in diesem Zusammenhang stehen könnte, ist das teilweise ungewöhnlich verzögerte Auftreten eines transienten Hyperinsulinismus bei sehr kleinen Frühgeborenen (Hoermann et al., 2023). In der frühen Therapiephase sind kleine Frühgeborene i.d.R. relativ krank und bedürfen umfangreicher medizinischer Unterstützung, sodass relativ hohe endogene und ggf. auch iatrogene Katecholaminspiegel vorstellbar sind, welche zu einer Insulinsuppression in der frühen Behandlungsphase, mit anschließender hyperresponsiver Insulinsekretion und damit einhergehender Hypoglykämieeigung nach Stabilisierung jenseits der ersten Lebenswochen führen könnte. Dieser Hypothese gehen wir aktuell ebenfalls in einer Pilotstudie nach, in der wir prospektiv Katecholamine und Katecholaminmetabolite in regelmäßig gesammelten Urinproben von sehr kleinen Frühgeborenen (<1500g Geburtsgewicht/<32+0 Schwangerschaftswochen) bestimmen, und

unter anderem mit Urin-C-Peptidwerten und den Blutzuckerwerten korrelieren (DRKS00026230).

1.3. Komplexe/syndromale und neue monogene Hypoglykämieerkrankungen durch Störungen der Insulinsekretion oder -wirkung

Bis heute ist im klinischen Alltag ein relevanter Anteil an Patienten mit persistierenden, mutmaßlich genetischen Hypoglykämieerkrankungen durch eine Störung Insulinsekretion oder -wirkung genetisch nicht abschließend klärbar. Beispielsweise verbleiben Fälle mit Diazoxid-responsivem kongenitalem Hyperinsulinismus in über 50% ohne spezifische genetische Diagnose (Kapoor et al., 2013; Snider et al., 2013), obwohl diese mit größter Wahrscheinlichkeit genetisch bedingt sind.

Die mittlerweile breit verfügbare Exom- bis hin zu Genomsequenzierung kann in einem solchen Kontext extrem umfassende molekulargenetische Daten und damit Wissenszuwachs generieren. Beispielsweise wird hierdurch die genetische Heterogenität verschiedener Erkrankungen klarer, unter anderem hinsichtlich Überlappungen zwischen pathogenetisch oder phänotypisch verwandter Erkrankungen. Auch können genetische Befunde Hypothesen hinsichtlich übergeordneter Krankheitsbilder generieren, die unter Umständen zum Untersuchungszeitpunkt klinisch-phänotypisch noch gar nicht vermutet wurden bzw. bekannt sind. Auf diese Weise ist in der jüngeren Vergangenheit zunehmendes Wissen um komplexe und syndromale Ursachen genetisch bedingter Hypoglykämieerkrankungen entstanden (Kostopoulou et al., 2021; Zenker et al., 2023).

Andererseits wird durch die breit angelegten molekulargenetischen Untersuchungstechniken die Auswertung solcher Datensätze, d.h. insbesondere die Bewertung der Krankheitsrelevanz von gefundenen Sequenz- oder Strukturveränderungen, zu einer immer größeren Herausforderung. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn Sequenzveränderungen bioinformatisch zwar plausibel auf eine Veränderung der Proteinfunktion schließen lassen, das betroffene Gen jedoch noch nicht als krankheitsursächlich im Zusammenhang mit dem Untersuchungsanlass vorbeschrieben ist. Diese Konstellation bietet wiederum eine Chance,

neue Krankheitsmechanismen zu identifizieren, bedarf jedoch weiterer wissenschaftlicher Aufarbeitung, um den ursächlichen Zusammenhang zu untermauern.

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der hier vorgelegten Habilitationsschrift ist die Darstellung von Herangehensweisen zur ursächlichen Klärung und näheren Charakterisierung seltener bzw. neuer komplexer Hypoglykämieerkrankungen. Hierzu kommen breit angelegte molekulargenetische Untersuchungen, ergänzt um verschiedene molekularbiologische Aufarbeitungen, und die systematische Identifizierung und Beschreibung weiterer Betroffener über internationale Kooperationen/Selbsthilfeorganisationen zur Anwendung. Die ersten beiden Arbeiten identifizieren neue genetische Ursachen für einen kongenitalen Hyperinsulinismus, deren molekulare Pathogenese durch ergänzende mechanistische Untersuchungen plausibilisiert wird. Die anschließenden beiden Arbeiten beschreiben seltene bzw. neue syndromale Hyperinsulinismusformen, während die letzten beiden Arbeiten ein neues Spektrum von hypoinsulinämischen Hypoglykämieerkrankungen durch Aktivierung des Post-Insulinrezeptor-Signalwegs darstellen.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Kongenitaler Hyperinsulinismus beim Menschen und Insulinsekretionsstörung in der Maus durch biallelische *DNAJC3* Varianten

Congenital Hyperinsulinism in Humans and Insulin Secretory Dysfunction in Mice Caused by Biallelic DNAJC3 Variants. Welters A, Nortmann O, Wörmeyer L, Freiberg C, Eberhard D, Bachmann N, Bergmann C, Mayatepek E, Meissner T, Kummer S. *Int J Mol Sci* 2024, 25(2), 1270

Beim kongenitalen Hyperinsulinismus (CHI, nach dem angloamerikanischen Congenital Hyperinsulinism) handelt es sich um eine Erkrankung, die sich durch eine unphysiologisch gesteigerte Insulinausschüttung auszeichnet. Infolge dessen kommt es zu einer teils erheblichen Neigung zu hypoketotischen, hyperinsulinämischen Hypoglykämien mit reduzierter Fastentoleranz und teilweise sehr hohem Kohlenhydratbedarf zur Vermeidung von Hypoglykämien (Stanley, 2016). Die bekannten genetischen Ursachen betreffen insbesondere kritische Signalwege innerhalb der pankreatischen Betazelle – z.B. den ATP-abhängigen Kaliumkanal (*ABCC8/KCNJ11*), oder andere Gene/Stoffwechselwege, welche direkt oder indirekt die intrazelluläre ATP-Konzentration und damit die Depolarisation der Betazelle beeinflussen (Galcheva et al., 2019). Diese wiederum führt zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (CaV1.2), und der Calciuminflux dann zur Insulinexozytose. Zudem gibt es auch Formen eines CHI, bei denen der CHI eine Facette eines übergeordneten/syndromalen Krankheitsbildes darstellt (Zenker et al., 2023) – bei Letzteren sind häufig Genveränderungen ursächlich, deren genaue Auswirkungen auf die Betazell-Physiologie zum Teil nur eingeschränkt oder gar nicht verstanden sind.

Die hier besprochene Arbeit leitete sich aus einer Studie aus dem Jahr 2014 ab, in der Patient:innen mit kongenitalem Hyperinsulinismus eine deutlich breiter angelegte genetische Diagnostik angeboten wurde als zum damaligen Zeitpunkt üblich (DRKS00006874). Diese umfasste unter anderem auch solche Gene, die damals nur im Zusammenhang mit einem monogenen Insulinmangel oder anderen Erkrankungen mit klinischer oder molekularer Überlappung zu kongenitalem Hyperinsulinismus beschrieben waren. Wissenschaftliches Ziel

war es, neue Krankheitsmechanismen/Ursachen für Hypoglykämieerkrankungen zu identifizieren, welche nicht Bestandteil der klinischen Routinediagnostik sind.

Beschrieben wird eine Patientin, welche an einem persistierenden CHI litt, welcher mit Diazoxid behandelt wurde. Zudem bestanden ein ausgeprägter Kleinwuchs und eine milde primäre Hypothyreose. Umfangreiche klinische Untersuchungen sowie diverse molekulargenetische Untersuchungen hatten zuvor keine kausale Erklärung für den Symptomkomplex erbracht.

Im Rahmen der Studie fanden sich zwei compound-heterozygote Varianten, c.83-2A>G und c.566delT (p.Trp186Glyfs*14), im *DNAJC3*-Gen, beide Eltern waren jeweils Träger einer der Varianten. Nach bioinformatischer Analyse ergibt sich aus der ersten Variante der Verlust einer Akzeptor-Splice-Site, während aus der zweiten Variante ein Stopcodon resultiert, welches einen Strangabbruch in der Proteinsynthese zur Folge hat. In der Zusammenschau ließen sich beide Varianten nach Kriterien des American College of Medical Genetics (ACMG) als pathogen klassifizieren (Richards et al., 2015). Zudem ist bei beiden Varianten bereits aus den genetischen Befunden ein *loss-of-function* hinsichtlich der Gen- bzw. Proteinfunktion abzuleiten (Splice-site Veränderung, und Stoppcodon mit Trunkierung des Proteins).

Jedoch war ein Funktionsverlust dieses Gens zum damaligen Zeitpunkt lediglich im Zusammenhang mit einem syndromalen monogenen Diabetes beschrieben worden (Synofzik et al., 2014). Erst parallel zum weiteren Projektverlauf wurden Einzelfallberichte publiziert, die ebenfalls im jungen Alter eine Hypoglykämieeigung aufwiesen (Ocansey et al., 2022; Ozon et al., 2020), sodass die Hypoglykämien ein systematisch auftretender Bestandteil des klinischen Phänotyps zu sein schienen.

Ein Pathomechanismus zum im Verlauf der Erkrankung auftretenden Diabetes sowie der progredienten neurodegenerative Komponente wurde bereits in weiteren experimentellen Studien beschrieben: *DNAJC3* codiert für ein das gleichnamige Protein DNAJC3 (Synonym ERj3), welches am endoplasmatischen Retikulum (ER) eine Rolle für den Schutz vor ER-Stress spielt, unter anderem indem es als Co-Chaperon gemeinsam mit dem Binding

Immunoglobulin Protein (BiP) zur korrekten Faltung von Proteinen beiträgt (Pauwels et al., 2022). Ein Knock-out dieses Proteins führt zu ER-Stress und Apoptose, spezifisch in der Betazelle zu einem progredienten apoptotischen Betazellverlust (Ladiges et al., 2005).

Ziel der Arbeit war es, zur Klärung des Pathomechanismus für die offensichtlich systematisch und insbesondere zu Beginn der Erkrankung auftretenden hyperinsulinämischen Hypoglykämien beizutragen. Zum Verständnis ist entscheidend, dass das ER-Lumen eine vielfach höhere Calciumkonzentration als das Cytosol aufweist (im Ruhezustand 100-800µM vs. 50-100nM). Dieser Gradient ist präzise reguliert, und Voraussetzung für ein korrektes Handling der intrazellulären Calciumhomöostase und damit von calciumassozierten Signalwegen. Hierfür spielt der Sec61-Kanal-Komplex in der Membran des ER eine wichtige Rolle. Dieser Kanal transportiert Polypeptide in das ER-Lumen, und fungiert außerdem als „Ca²⁺ leakage channel“, d.h. nach einem Proteintransport verliert das ER entlang des Konzentrationsgradienten Calcium ins Cytosol, bevor der Kanal vollständig schließt (Lang et al., 2011). Für einen korrekten Schließvorgang ist wiederum das vorgenannte BiP entscheidend (Schäuble et al., 2012), welches wiederum von der intakten Funktion zweier Co-Chaperone, unter anderem dem *DNAJC3*-codierten ERj6 abhängt (Schorr et al., 2015). So entstand also nach Publikation der Daten von Schorr im Jahr 2015 die Hypothese für unsere Studie, dass ein Funktionsverlust des *DNAJC3* zu einem gesteigerten Calcium-Leakage aus dem ER ins Cytosol führt, und die erhöhten cytosolischen Calciumspiegel wiederum zunächst im jungen Alter eine gesteigerte Insulinexozytose ganz unabhängig vom ATP-Gehalt der Betazelle und deren Depolarisation zur Folge hat. Später überwiegt dann mutmaßlich der progrediente Betazellverlust, sodass die Hypoglykämieeigung in einen Insulinmangel und damit Diabetes übergeht.

Für die Untersuchungen konnten wir heterozygote C57BL/6-Dnajc3^{tm8663Wcl}/Mmmh (P58^{IPK-}) Mäuse vom Mutant Mouse Resource and Research Centers beziehen, die dort mittels künstlicher Befruchtung aus kryokonservierten Spermien des originalen Mausstammes (Ladiges et al., 2005) hergestellt wurden. Nach Zucht der entsprechenden homozygoten P58^{IPK-} sowie Wildtyp (WT) Tiere erfolgten ab dem jüngstmöglichen Alter, welches unter

Tierschutzerwägungen möglich war, Fastentests und Glukosetoleranztests (Alter 3-8 Wochen). Außerdem wurden im Alter von 4-6 Wochen Pankreasinseln isoliert (Yesil et al., 2009), und Insulinsekretionsassays an den isolierten Inseln durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass bei den P58^{IPK}- Mäusen in vivo bereits im jungen Alter von 4 Wochen der Betazellverlust überwiegt, sichtbar an höheren Nüchternblutzuckern (Abbildung 1a), höheren Glukosewerten nach Glukosebelastung (Abbildung 1b), und niedrigeren Insulinspiegeln (Abbildung 1c).

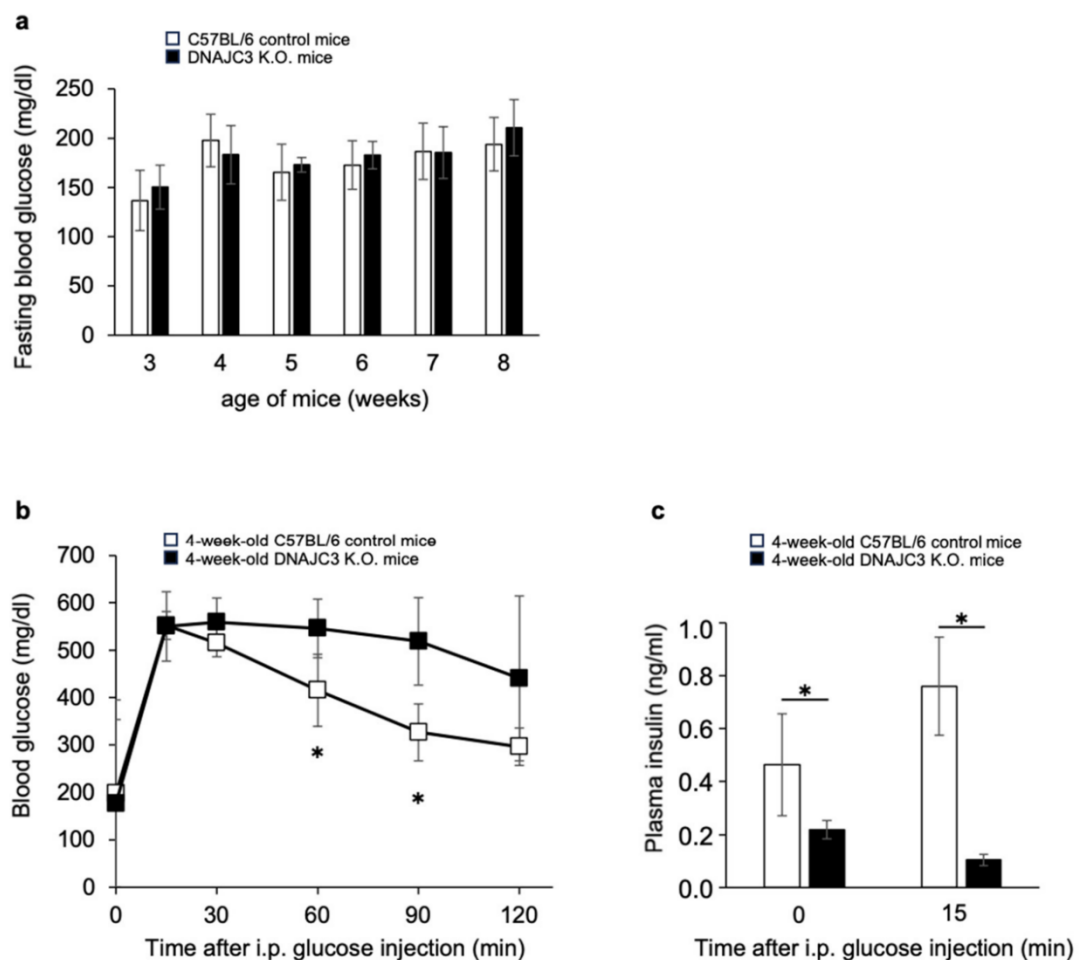


Abbildung 1: (a) Nüchternblutzucker nach 16h Fasten in 3-8 Wochen alten DNAJC3 knock-out (K.O.) Tieren im Vergleich zu C57BL/6 Kontrolltieren (je n=7). (b) Blutzuckerwerte im intraperitonealen (i.p.) Glukosetoleranztest (1,5mg/g⁻¹ body weight). (c) Plasma Insulinkonzentration während des i.p. Glukosetoleranztest. Signifikanztest mit zweiseitigem Student's t-test. Alle Angaben entsprechen Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. *p<0,05. Die Abbildung entspricht der unveränderten Figure 1 der Originalpublikation (Welters et al., 2024). Abdruck nicht genehmigungspflichtig (Open-Access-Publikation).

Die anschließenden in-vitro Untersuchungen an den aus jungen Tieren isolierten Inseln zeigten jedoch noch eine andere Facette, welche unsere Hypothese plausibilisieren. Zwar sehen auch die isolierten Inseln der K.O. Tiere morphologisch im Vergleich zu Inseln von Wildtyp-Tieren bereits mit 4-6 Wochen deutlich verändert aus (Abbildung 2a). Auch weisen die Inseln der DNAJC3 K.O. Mäuse weniger Gesamt-Insulin-Content auf als die Kontrollmäuse (Abbildung 2b).

Bemerkenswerterweise zeigte sich jedoch die Insulinsekretion normalisiert auf den Basalen Insulingehalt sowohl unter Stimulation mit 2mM als auch mit 20mM Glukosegehalt im Medium in K.O. Tieren deutlich höher als in Kontrollmäusen (Abbildung 2c und 2d).

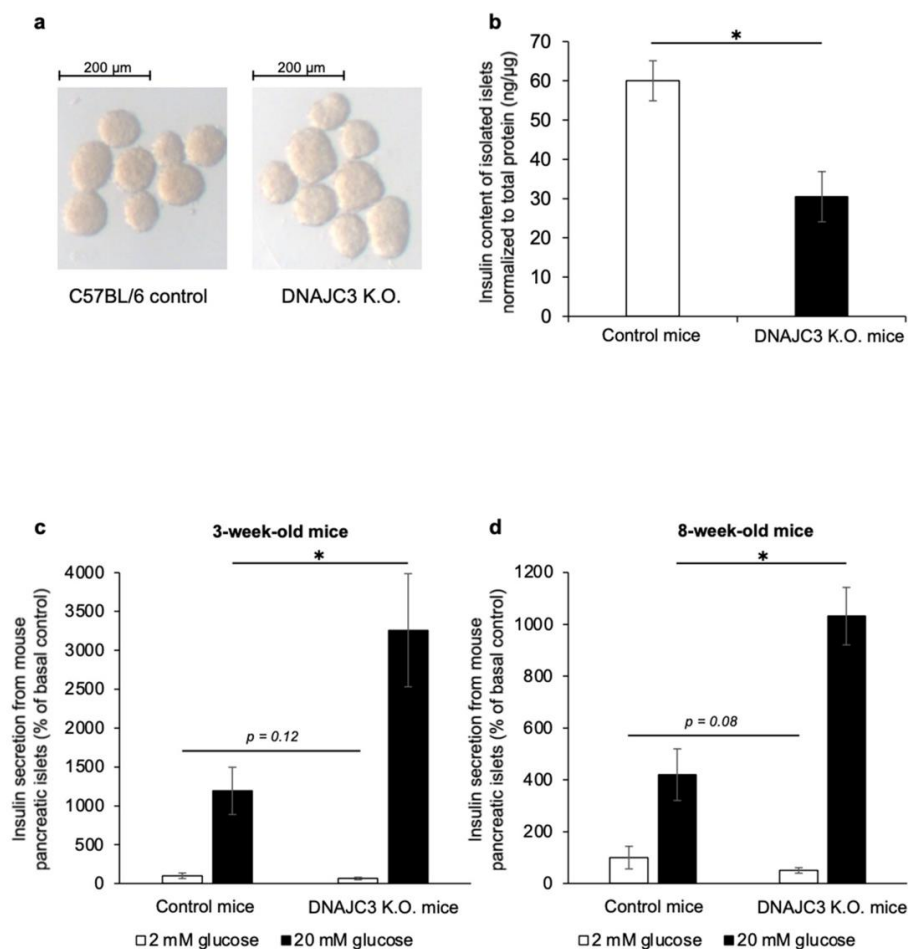


Abbildung 2: (a) Repräsentative lichtmikroskopische Abbildung von Pankreasinseln von 4-6 Wochen alten DNAJC3 K.O. Inseln im Vergleich zu Kontrollen. (b) Insulin content von isolierten Inseln aus 3 Wochen alten Tieren (jeweils n=5 Inseln). (c) und (d) Insulinsekretion aus Inseln von 3 bzw. 8 Wochen alten Tieren unter 2mM und 20mM Glukosegehalt im Medium. Signifikanztestung mit zweiseitigem Student's t-Test, Alle Angaben entsprechen Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. * $p < 0,05$. Die Abbildung entspricht der unveränderten Figure 2 der Originalpublikation (Welters et al., 2024). Abdruck nicht genehmigungspflichtig (Open-Access-Publikation).

In der Zusammenschau zeigen diese Daten also bereits sehr früh im Alter von 4 Wochen den einen Verlust an absoluter Insulinsekretionskapazität in vivo sowie an Insulincontent in isolierten Inseln – dies reflektiert in erster Linie den Verlust an kumulativer Betazellmasse durch Apoptose, wie dies auch bereits in den zuvor diskutierten Literaturstellen an älteren Tieren gezeigt wurde. Die Untersuchungen, welche die relative Sekretionsleistung der noch vorhandenen Betazellen abbilden, ergeben jedoch eine deutlich gesteigerte Insulinsekretion in Inseln der K.O. Tiere im Vergleich zu Inseln von Kontrolltieren.

Dieser Befund stützt die klinische Beobachtung und die Hypothese, dass der metabolische Phänotyp eines *DNAJC3*-Funktionsverlustes biphasisch ist. Die einzelne Betazelle zeigt eine gesteigerte Insulinsekretion, welche anfänglich bei noch großer absoluter Betazellmasse zu einer Hypoglykämieeigung in Form eines kongenitalen Hyperinsulinismus führt. Mit zunehmender Betazell-Apoptose überwiegt dann irgendwann der Betazellverlust und resultiert absolut gesehen in einem Insulinmangel. Die zwar hier experimentell nicht explizit gezeigte, jedoch naheliegende Erklärung liegt dabei in der gestörten intrazellulären Calciumhomöostase, d.h. einem gesteigerten Calcium-Leakage aus dem endoplasmatischen Retikulum, mit konsekutiv gesteigerter, calciumgetriggerten Insulinexozytose. Während alle bislang bekannten genetischen Hyperinsulinismusursachen hinsichtlich der Insulinfreisetzung im intrazellulären ATP-Gehalt bzw. Influx von extrazellulärem Calcium konvergieren, handelt es sich hier um die erste Hyperinsulinismusform, deren molekulare Ursache in einer gestörten intrazellulären Calciumbalance liegt, d.h. dem gesteigerten Efflux von Calcium aus dem ER ins Cytosol.

2.2. Hyperinsulinämische Hypoglykämien assoziiert mit einer Variante des CaV1.2

Calciumkanals mit gemischten Gain- und Loss-of-function Effekten

Hyperinsulinemic Hypoglycemia Associated with a CaV1.2 Variant with Mixed Gain- and Loss-of-Function Effects. Kummer S, Rinné S, Seemann G, Bachmann N, Timothy K, Thornton P, Pillekamp F, Mayatepek E, Bergmann C, Meissner T, Decher N. Int J Mol Sci 2022, 23(15), 8097

Auch die zweite vorgestellte Arbeit hat ihren Ausgangspunkt in einer Patientin mit einem kongenitalen Hyperinsulinismus, bei der eine Sequenzvariante im Kandidatengen *CACNA1C* gefunden wurde, deren biochemische Relevanz nun näher zu validieren war.

CACNA1C codiert für die Alpha 1 C-Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals Ca_v1.2. Er hat eine maßgebliche Rolle in der Regulation des Aktionspotentials des Kardiomyozyten. Aktivierende Mutationen im *CACNA1C* sind als Auslöser des Timothy Syndroms (TS) beschrieben. Hierbei kommt es durch eine verminderte Inaktivierung des Kanals und dadurch bedingt erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration zu kardialen Arrhythmien im Sinne eines Long-QT-Syndroms, aber auch weiteren syndromalen Aspekten wie kognitiven Einschränkungen, Autismus, Syndaktylien und Immunschwäche (Splawski et al., 2004). Auch wurden vereinzelt Hypoglykämien in diesem Kontext berichtet, jedoch weder klinisch näher beschrieben, noch ursächlich genauer zugeordnet.

Andererseits spielt der Ca_v1.2 Kanal eine wichtige Rolle in der Betazellphysiologie, und ist dort wesentlich am Calciuminflux als Trigger der Insulinsekretion beteiligt (Schulla et al., 2003; Tuluc et al., 2021). Insofern sind die für diesen Kanal codierenden Gene auch interessante Kandidatengene als Ursache für einen CHI.

In der Arbeit wird eine zum Zeitpunkt der Publikation 17-jährige Patientin besprochen, bei der im Säuglingsalter ein kongenitaler Hyperinsulinismus diagnostiziert wurde. Im Kontext der bereits zuvor erwähnten klinischen Studie (DRKS00006874) wurde bei ihr eine heterozygote Sequenzvariante c.1679T>C p.(Leu566Pro) im *CACNA1C* Gen gefunden. Typische klinische Befunde eines Timothy-Syndroms fanden sich bei ihr nicht, sondern lediglich ein prägnanter Hyperinsulinismus. Auch konnte die Sequenzvariante allein auf Basis der genetischen

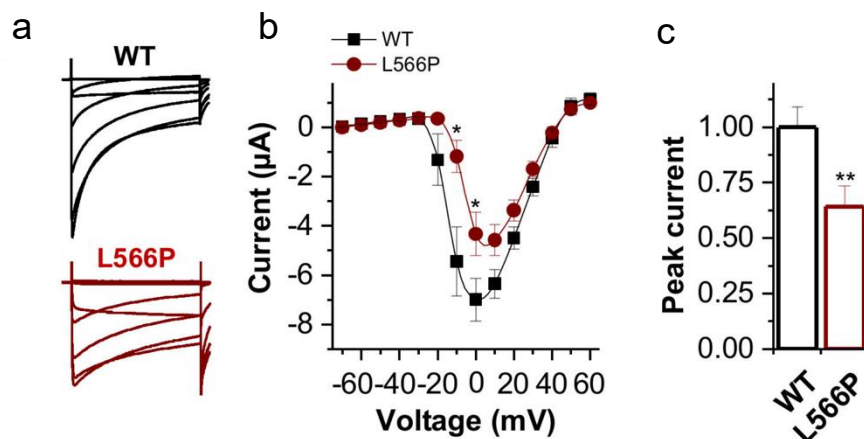
Befunde nicht als „pathogen“ oder „wahrscheinlich pathogen“ klassifiziert werden (Richards et al., 2015), sondern verblieb formal als „Variante unklarer Signifikanz“ (VUS).

Aufgrund der oben dargelegten Bedeutung des Gens in der Physiologie der Betazelle sowie der Beschreibungen von Hypoglykämien als bislang nicht genauer charakterisiertes Nebensymptom des klassischen Timothy Syndroms entschieden wir uns für eine genauere mechanistische Aufarbeitung der Sequenzvariante in-vitro. Dies erfolgte in Kooperation mit der Gruppe um Prof. Niels Decher in Marburg, der auch bereits die elektrophysiologischen Studien in der Erstbeschreibung des Timothy-Syndroms durchgeführt hatte. Die Messungen hat S. Rinné aus unserer Autorengruppe in Marburg durchgeführt.

Dabei wurden Wildtyp $Ca_v1.2^{WT}$ oder die mutierten $Ca_v1.2^{L566P}$ Kanäle zusammen mit deren β_2b und $\alpha_2\delta$ Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten coexprimiert und elektrophysiologisch charakterisiert. Die erhobenen Daten seien hier in Auszügen orientierend dargestellt.

Die mutierten Kanäle zeigten in einzelnen Aspekten einen Funktionsverlust (Loss-of-function), in Form einer verzögerten Inaktivierung (Abbildung 3a), reduzierten Spannungsamplitude (Abbildung 3b), und einer Reduktion der Peak-Spannung (Abbildung 3c).

Abbildung 3: (a) Spannungsverläufe der $Ca_v1.2^{WT}$ (schwarz) und $Ca_v1.2^{L566P}$ Kanäle von einem Ausgangspotential von -80mV, mit Spannungsstufen von 1s Dauer von -70 bis +60mV in 10mV



Steigerungen. (b) Current-Voltage Verhältnis von $n=19$ $Ca_v1.2^{WT}$ (schwarz) und $n=14$ $Ca_v1.2^{L566P}$ Kanälen, aufgezeichnet von 3 unabhängigen Batches von Oozyten. (c) Relative Peak-current Amplituden normalisiert auf $Ca_v1.2^{WT}$. ** $p<0,01$, * $p<0,05$. Die Abbildung entspricht den unveränderten Panels F, G, und H der Figure 1 der Originalpublikation (Kummer et al., 2022). Abdruck nicht genehmigungspflichtig (Open-Access-Publikation).

Andererseits fand sich ein Gain-of-function durch eine verzögerte spannungsabhängige Inaktivierung von $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ im Vergleich zu $\text{Ca}_v1.2^{\text{WT}}$. Abbildung 4a zeigt die durchschnittlichen Currents bei einer Spannung von +20mV, bei der die Inaktivierung $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ langsamer verläuft als in der WT-Variante. Auch gemessen über verschiedene Spannungsbereiche von +10 bis +40mV ist die Inaktivierung langsamer (Abbildung 4b).

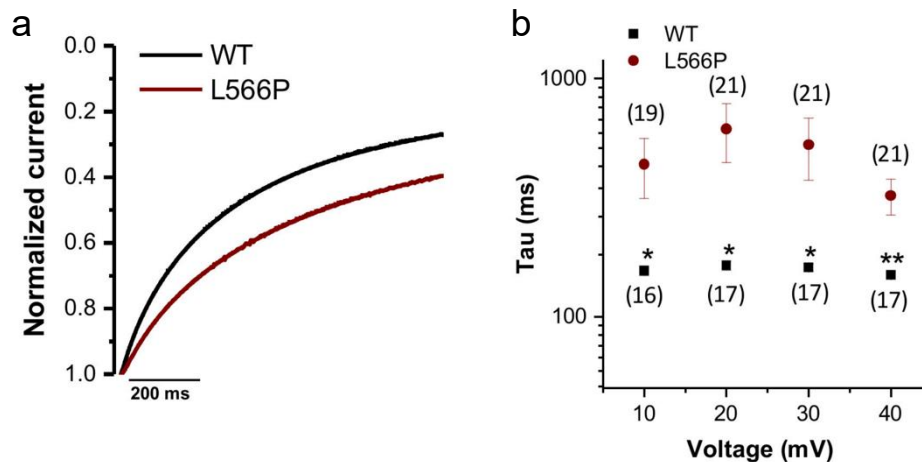


Abbildung 4: Kinetik der spannungsabhängigen Inaktivierung von $\text{Ca}_v1.2^{\text{WT}}$ (schwarz) und $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$. (a) Durchschnittliche Currents bei +20mV, aufgezeichnet von einem Ruhepotential von -80mV, getriggert mit Spannungsanstieg über 1s auf +20mV ($n=17$ $\text{Ca}_v1.2^{\text{WT}}$ (schwarz) und $n=21$ $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$). (b) Zeitkonstanten der Inaktivierung bei unterschiedlichen Aktionspotentialen während der ersten 200ms der Inaktivierung. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Die Abbildung entspricht den unveränderten Panels A und B der Figure 2 der Originalpublikation (Kummer et al., 2022). Abdruck nicht genehmigungspflichtig (Open-Access-Publikation).

Zudem fand sich ein Gain-of-function durch eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, und eine reduzierte Inaktivierung im Ruhezustand (hier nicht dargestellt).

In der Zusammenschau zeigt der $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ Kanal sowohl loss-of-function Aspekte (reduzierte peak current Amplituden), als auch verschiedene gain-of-function Merkmale (verminderte und verlangsamte spannungsabhängige Inaktivierung, veränderte Spannungsabhängigkeit, und reduzierte Steady-state-Inaktivierung).

Nun stellte sich die Frage, welche Relevanz diese spezifischen elektrophysiologischen Merkmale des Kanals für die Funktion von Betazelle und Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene haben. Die Konstruktion eines in-vitro Zellkulturmodells ist methodisch leider weder mittels Transfektion noch durch Knock-in mittels CRISPR/Cas9 gelungen. Deswegen entschieden wir uns als Surrogat für die Untersuchung in In-Silico-Modellen, d.h. die Auswirkungen der

elektrophysiologischen Kanaleigenschaften auf Zellebene durch etablierte Computersimulationsmodelle zu validieren. Zur Simulation der Betazelle verwendeten wir ein Modell von Riz et al. (Riz et al., 2014), zur Simulation des Kardiomyozyten ein Modell von ten Tusscher und Panfilov (ten Tusscher & Panfilov, 2006) – diese wurden umgesetzt von G. Seemann aus unserer Autorengruppe. Verglichen wurden jeweils die Auswirkungen der elektrophysiologischen Charakteristika der Wildtyp-Variante ($\text{Ca}_v1.2^{\text{WT}}$), der hier neu beschriebenen Variante ($\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$), sowie der häufigsten beim Timothy-Syndrom vorkommenden Variante ($\text{Ca}_v1.2^{\text{G406R}}$). Im Folgenden sind die wesentlichsten Befunde aus diesen Modellen in Auszügen zusammengefasst.

Das In-Silico-Modell der Betazelle zeigte, dass die elektrophysiologischen Charakteristika der $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ Variante in erster Linie bei Depolarisation zu einer leichter anregbaren und längeren Burst-Phase, das heißt Oszillationen des Membranpotentials nach Erregung (Abbildung 5a), mit konsekutiv erhöhtem intrazellulären Calciumniveau (Abbildung 5b) im Vergleich zur $\text{Ca}_v1.2^{\text{WT}}$ führte. Die klassische TS-Variante $\text{Ca}_v1.2^{\text{G406R}}$ zeigte diesbezüglich einen zwar ähnlichen, aber weniger ausgeprägten Effekt als die $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ Variante.

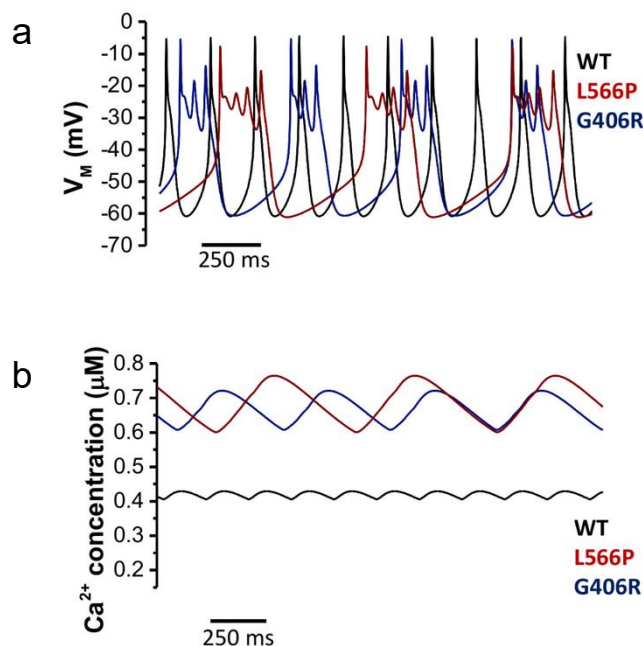


Abbildung 5: (a) Burst-Verhalten der nach Riz et al simulierten Betazellen in Abhängigkeit der entsprechenden Kanalvariante $\text{Ca}_v1.2^{\text{WT}}$, $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ und $\text{Ca}_v1.2^{\text{G406R}}$. (b) Korrespondierende Calciumoszillationen der jeweiligen Kanalvarianten. Die Abbildung entspricht den unveränderten Panels C und D der Figure 5 der Originalpublikation (Kummer et al., 2022). Abdruck nicht genehmigungspflichtig (Open-Access-Publikation).

Im In-silico-Kardiomyozyten-Modell fand sich als prägnantester Befund eine deutliche Verlängerung des simulierten Aktionspotentials für die „klassische“ Timothy-Syndrom $\text{Ca}_v1.2^{\text{G406R}}$ Kanalvariante, während die hier neu beschriebene $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ Kanalvariante eine deutlich geringere Verlängerung des Aktionspotentials zur Folge hatte (Abbildung 6a). Dies spiegelt sich dann auch in einem deutlich prägnanteren simulierten Calciuminflux für die $\text{Ca}_v1.2^{\text{G406R}}$ Variante, während der Calciuminflux der $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ Variante dem der Wildtypvariante ähnelte (Abbildung 6b).

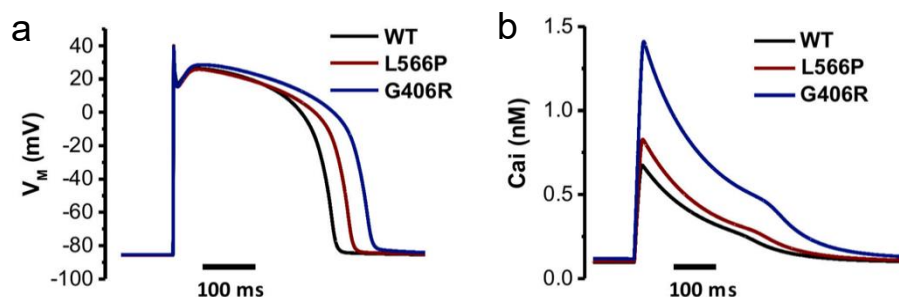


Abbildung 6: (a) In-silico-Modell mit Simulation des ventrikulären Aktionspotentials für $\text{Ca}_v1.2^{\text{WT}}$, $\text{Ca}_v1.2^{\text{G406R}}$ und $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$. (b) Simulation der korrespondierenden intrazellulären Calciumkonzentrationen während des ventrikulären Aktionspotentials in Zellen mit den jeweiligen $\text{Ca}_v1.2$ Kanalvarianten. Die Abbildung entspricht den unveränderten Panels B und C der Figure 4 der Originalpublikation (Kummer et al., 2022). Abdruck nicht genehmigungspflichtig (Open-Access-Publikation).

In der Zusammenschau zeigen also sowohl die elektrophysiologischen Studien auf Kanalebene als auch die In-silico-Simulationsmodelle auf zellulärer Ebene sehr spezifische Charakteristika der einzelnen Kanalvarianten, die sich untereinander klar unterscheiden, und bemerkenswert gut die klinischen Charakteristika der jeweiligen Patienten widerspiegeln.

So findet sich bei der hier neu beschriebenen Patientin, welche die $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ Kanalvariante trägt, eine prägnante Hypoglykämieeigung als Ausdruck der gesteigerten Insulinsekretion, damit vereinbar zeigt das In-silico-Betazellmodell basierend auf dieser Kanalvariante eine sehr prägnante Neigung zu „Bursts“ und leichter Erregbarkeit des Membranpotentials mit entsprechend prägnantem Calciuminflux. Die Betazell-Simulation für die „klassische“ $\text{Ca}_v1.2^{\text{G406R}}$ Timothy-Syndrom Kanalvariante zeigt sich diesbezüglich deutlich milder

verändert, passend zu lediglich sporadischen Hypoglykämien als Nebensymptom bei Patienten mit Timothy Syndrom.

Umgekehrte Ergebnisse zeigen sich dann für die In-silico-Modelle im Kardiomyozyten, wo die $\text{Ca}_v1.2^{\text{G406R}}$ Timothy-Syndrom Kanalvariante sehr deutlich verlängerte simulierte Aktionspotentiale mit entsprechend gesteigertem Calciumeinstrom zur Folge hat – passend zum ausgeprägten Long-QT-Syndrom dieser Patienten. Dagegen findet sich in der Simulation der hier neu berichteten $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ Kanalvariante eine deutlich geringere Verlängerung des Aktionspotentials, und eine allenfalls diskrete Steigerung des simulierten Calciumeinstroms – wiederum passend dazu, dass unsere Patientin kardiologisch keine krankheitsrelevanten Auffälligkeiten aufweist (allenfalls eine bemerkenswerterweise grenzwertig hoch-normale QTc-Zeit).

Eine Limitation unserer Arbeit ist das Fehlen von in-vitro Daten, die die Konsequenzen der $\text{Ca}_v1.2^{\text{L566P}}$ Kanalvariante in Betazellen, d.h. spezifisch den Hyperinsulinismus-Phänotyp, funktionell validieren – dies wurde in der Arbeit lediglich auf Basis eines Simulationsmodells gezeigt. Dennoch reflektieren die im Paper umfassend dargestellten Experimente einen sehr distinkten Phänotyp dieser spezifischen Kanalvariante, der sich deutlich von einer klassischen Timothy-Syndrom Kanalvariante und vom Wildtyp unterscheidet, und in den genutzten In-Silico-Modellen bemerkenswert hohe Übereinstimmung mit dem klinisch korrespondierenden Phänotyp hat. Insofern halten wir es für gerechtfertigt, *CACNA1C*-Genvarianten zukünftig in die Differentialdiagnose des kongenitalen Hyperinsulinismus einzubeziehen.

Zudem erscheint es sinnvoll, dass Hypoglykämien als ein potentiell Nebensymptom des Timothy Syndroms aufmerksam gescreent und verfolgt werden. Diesbezüglich haben wir als Ergänzung der mechanistischen Aufarbeitung in unserem Paper auch nach Patienten mit Hypoglykämien im Kontext eines klassischen Timothy-Syndroms gesucht. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Katherine Timothy, der Erstbeschreiberin des Syndroms, welche über ihre eigenen Kontakte nach Familien mit Hypoglykämien im Kontext eines Timothy Syndroms gesucht hat. Hierdurch konnten wir 5 Familien identifizieren, die uns z.T. extrem umfangreiche Behandlungsdokumentationsunterlagen zur Verfügung gestellt haben, die wir in einem

Supplementary Appendix unseres Papers in einigen Kernaspekten zusammengefasst haben. Hieraus ließen sich jedoch – bei zumeist nur begrenzter bis fehlender Aufarbeitung der Hypoglykämieepisoden – kaum belastbare Schlussfolgerungen insichtlich der metabolischen Situation ableiten. Bemerkenswert war jedoch, dass zwei der Patienten im Kontext einer Hypoglykämieepisode in eine kardiale Dekompensation gemündet und verstorben sind, dies also zumindest bei einigen Patienten relevant zur Morbidität und Mortalität beiträgt.

2.3. Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämien bei Kindern mit Rubinstein-Taybi syndrom

Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia in children with Rubinstein-Taybi syndrome. Welters A, Khairi R, Dastamani A, Bachmann N, Bergmann C, Gilbert C, Clement C, Hurst J, Quercia N, Wasserman J, Meissner T, Shah P, Kummer S* (*geteilte Senior-Autorenschaft). Eur J Endocrinol 2019; 181(2)121-128*

Gegenstand dieser Arbeit ist die Beschreibung einer neuen Assoziation einer syndromalen Erkrankung mit einem kongenitalen Hyperinsulinismus (CHI). Wie bereits diskutiert verbleibt trotz rasant wachsendem Wissen um genetische Zusammenhänge bis heute ein relevanter Anteil von Patienten mit einem CHI ohne sichere genetische Zuordnung. Eine Herausforderung stellt insbesondere auch die Diagnose von syndromalen Hyperinsulinismusformen dar - unter anderem, da häufig eine genetische Diagnostik bei Kindern mit CHI bereits im Säuglingsalter erfolgt, sich viele Merkmale syndromaler Erkrankungen erst im späteren Verlauf charakteristisch herausbilden. Insofern ist die klinische Zuordnung/Verdachtsstellung syndromaler Erkrankungen im Säuglings- oder jungen Kleinkindalter häufig noch deutlich erschwert. Andererseits ergeben sich heutzutage auch aus der molekulargenetischen Diagnostik Verdachtsdiagnosen, deren Plausibilität dann im Abgleich mit klinischen Features validiert werden muss („reverse Phänotypisierung“). So erfolgt mittlerweile insbesondere bei genetisch heterogenen Erkrankungen in der Regel keine Einzelgensequenzierung mehr, sondern eine Untersuchung auf Exom- (oder sogar Genom-) Basis, sodass je nach bioinformatischer Auswertestrategie z.T. auch „benachbarte“ Verdachtsdiagnosen, oder solche außerhalb der eigentlichen Untersuchungsindikation sichtbar werden können.

Ausgangspunkt für die hier zusammengefasste Arbeit ist ein klinischer Fall, bei dem eine molekulargenetische Diagnostik aufgrund eines zu diesem Zeitpunkt noch nicht näher klinisch zugeordneten syndromalen Hyperinsulinismus erfolgt ist. Hierbei fand sich zunächst unerwartet eine heterozygote de-novo c.4505C>T p.(Pro1502Leu) Variante im *EP300* Gen, klassifiziert als wahrscheinlich pathogen gemäß ACMG-Kriterien (Richards et al., 2015). Neben den häufigeren *CREBBP*-Genveränderungen sind Varianten im *EP300* Gen als seltene

Ursache für ein Rubinstein-Taybi-Syndrom (RSTS) beschrieben. Die reverse Phänotypisierung der Patientin zeigte sich dann hierzu überraschend gut passend, mit verschiedenen typischen Merkmalen dieser Erkrankung. Eine Literaturrecherche erbrachte zu diesem Zeitpunkt lediglich einen weiteren publizierten Fall mit RSTS, bei dem nebenbefundlich Hypoglykämien berichtet waren (Costain et al., 2018). Deshalb nahmen wir mit der internationalen Selbsthilfegruppe (CHI International) und anderen Hyperinsulinismuszentren weltweit auf, und konnten hierüber zwei weitere Patient:innen mit RSTS und einem CHI identifizieren, beide betreut im Great Ormond Street Hospital in London (einmal *EP300*-, einmal *CREBBP*-assoziiert). Außerdem kontaktierten wir die Familie und betreuenden Ärzte der bereits publizierten Patientin mit ebenfalls *EP300*-assoziiertem RSTS (betreut im Hospital For Sick Children, Toronto, Kanada).

Anhand der so international zusammengetragenen Fallserie konnten wir einige neue Erkenntnisse beschreiben. In Anbetracht der Seltenheit der beiden Diagnosen RSTS und CHI mit Inzidenzen von ca. 1:125.000 bzw. 1:40.000-50.000, (López et al., 2018; Stanley, 2016) übersteigt das gleichzeitige Auftreten bei vier Kindern sicherlich das statistisch erwartbare Maß eines zufälligen Zusammentreffens. Zudem ist bemerkenswert, dass die Erkrankung bei drei der vier Patient:innen molekular auf Varianten im *EP300*-Gen zurückzuführen ist, obwohl dies im Vergleich mit *CREBBP* die deutlich seltener molekulare Ursache darstellt (8% vs. 50-60%, (López et al., 2018)). Klinisch zeigte sich die Hypoglykämieeigung unterschiedlich responsiv auf die First-Line-Therapie mit Diazoxid – zwei Patienten zeigte ein gutes Ansprechen, während zwei auf andere Therapiemodalitäten zurückgreifen mussten.

Somit identifiziert Arbeit einen CHI als neue Facette des RSTS, und erweitert das Spektrum der syndromalen CHI-Formen im Sinne einer Assoziation. Seit unserer Veröffentlichung ist somit die Analyse der Gene *EP300* und *CREBBP* weitestgehend Standard in der Differentialdiagnostik des syndromalen CHI (Zenker et al., 2023).

2.4. Vergleichende Metaanalyse des Kabuki-Syndroms mit und ohne hyperinsulinämische Hypoglykämien

Comparative meta-analysis of Kabuki syndrome with and without hyperinsulinemic hypoglycemia. Hoermann H, El-Rifai O, Schebek M, Lodefalk M, Brusgaard K, Bachmann N, Bergmann O, Roeper M, Welters A, Salimi Dafsari R, Blankenstein O, Mayatepek E, Christesen H, Meissner T, Kummer S. *Clin Endocrinol* 2020; 93(3) 346-354

Das Kabuki-Syndrom (KS) ist eine seltene genetische Erkrankung, welche ursprünglich durch die fünf Leitsymptome Wachstumsretardierung, charakteristische Facies, Skelettanomalien, dermatoglyphische Abnormalitäten und intellektuelle Einschränkungen charakterisiert wurde (Niikawa et al., 1988). Mittlerweile sind 2 Gene als ursächlich für das KS beschrieben worden - *KMT2D* auf Chromosom 12 (Ng et al., 2010), und *KDM6A* auf dem X-Chromosom (Lederer et al., 2012). Auch haben sich internationale Konsensuskriterien zur Diagnose etabliert (M. P. Adam et al., 2019).

Auch endokrine Erkrankungen sind als Teil des Symptomspektrums beschrieben (M. Adam & Hudgins, 2005), unter anderem auch hyperinsulinämische Hypoglykämien bei 0,3-4% der Patient:innen mit KS (M. P. Adam et al., 2019; Geneviève et al., 2004) – dies ist deutlich häufiger als in der Normalbevölkerung. Auch in eigenen Beobachtungen im CHI-Kollektiv unseres und auch anderer Zentren fanden sich im Zuge der jüngst deutlich breiter angelegten genetischen Differentialdiagnostik überraschend häufig Diagnosen eines Kabuki-Syndroms – nicht selten auch als „Zufallsbefund“ aus der molekulargenetischen Diagnostik, z.B. bei Säuglingen, bei denen die klinischen Merkmale u.U. noch nicht charakteristisch auf diese spezifische syndromale Diagnose hinwiesen.

Andererseits bleiben die molekularen Erklärungen für diese Assoziation zwischen KS und CHI bislang noch ungeklärt, zum Beispiel ob die hyperinsulinämischen Hypoglykämien mit einem spezifischen molekularen Subtyp des KS assoziiert sind, oder in Anbetracht der X-chromosomalen Lokalisation des *KDM6A*-Gens mit einem bestimmten Geschlecht. Insofern entschieden wir uns, die in der Literatur vorbeschriebenen 17 Patienten mit KS und CHI mit der Beschreibung 7 bislang unpublizierten Patient:innen aus unserem sowie kooperierenden

Zentren in einer Metaanalyse zusammenzufassen, und mit einer großen Kohorte von n=373 KS Patient:innen (M. P. Adam et al., 2019) zu vergleichen.

Bemerkenswerterweise fielen die Hypoglykämien bei der überwiegenden Mehrzahl der Patient:innen mit KS und CHI bereits am ersten Lebenstag auf. Fast alle zeigten ein gutes klinisches Ansprechen auf Diazoxid, i.d.R. waren nur moderate Dosierungen von ca. 5-6mg/kg/d in der Dauertherapie notwendig. Jedoch trugen die übrigen Merkmale des KS relevant zur Morbidität bei, z.B. verschiedene perinatale Komplikationen, Ernährungsstörungen in der frühen Kindheit oder kardiovaskuläre Anomalien.

In der statistischen Analyse zeigte sich, dass Patient:innen mit *KDM6A*-assoziiertem KS signifikant wahrscheinlicher einen CHI entwickelten als Patient:innen *KMT2D*-assoziiertem KS (21,8% vs. 3,5%, $p < 0,001$). Anders ausgewertet hatten Patient:innen mit KS und CHI deutlich häufiger Varianten in *KDM6A* als Patient:innen mit KS ohne CHI (12/24 = 50%, vs. 43/373 = 11,5%, $p < 0,001$). Die sonstigen phänotypischen Merkmale unterschieden sich nicht nennenswert zwischen KS-Patient:innen mit und ohne CHI. Das mittlere Alter bei Diagnose des KS unterschied sich nicht signifikant zwischen *KDM6A* (32,9 Monate, Range 2-118) und *KMT2D*-assoziiertem KS (34,9 Monate, Range 6-168, $p = 0,497$).

In der Zusammenschau unserer Daten ist somit insbesondere die Häufung von X-chromosomalenen *KDM6A* Varianten in Patienten mit KS und CHI bemerkenswert. Auch betrifft dies überraschend häufig Mädchen, obwohl diese im Heterozygotenstatus ein zweites X-Chromosom mit einem intakten Allel aufweisen. Die phänotypische Relevanz erklärt sich in dieser Konstellation über das Muster der X-Inaktivierung, d.h. das Wildtyp-Allel des nicht-betroffenen X-Chromosoms muss entsprechend inaktiviert sein – dies konnte auch für einzelne Patienten unserer Kohorte belegt werden.

2.5. Hypoinsulinämische hypoketotische Hypoglykämien durch aktivierende genetische

Mosaik der Phosphoinositol-3-Kinase

Hypoinsulinemic, hypoketotic hypoglycemia due to mosaic genetic activation of Class 1A PI3-Kinase. Leiter S, Parker V, Welters A, Knox R, Clark G, Payne F, Lotta L, Harris J, Guerrero-Fernández J, González-Casado I, García-Miñaur S, Wareham N, Martínez-Glez V, Barroso I, Meissner T, Davies S, Hussain K, Temple K, Barreda-Bonis A, Kummer S, Semple RK* (*geteilte Senior-Autorenschaft). Eur J Endocrinol 2017; 177(2)175-186*

In den vorangegangenen Abschnitten sind bereits verschiedene syndromale Hyperinsulinismusformen dargestellt worden, die metabolisch durch prägnante hypoketotische, hyperinsulinämische Hypoglykämien charakterisiert sind. In den folgenden beiden Arbeiten wird eine neue Gruppe von Erkrankungen charakterisiert, welche durch eine genetische Aktivierung hinter dem Insulinrezeptor eine überlappende metabolische Signatur besitzt, jedoch nicht durch eine Hyperinsulinämie ausgelöst wird.

Ausgangspunkt für diese Projekte sind ebenfalls ungewöhnliche eigene Patienten, deren Erkrankungen durch vorbekannte Krankheitsentitäten bzw. genetische Erklärungsmodelle ursächlich nicht suffizient zuzuordnen waren.

Eine Patientin litt an einem segmentalen „Überwuchssyndrom“, d.h. dysproportioniert überschießendem Körperwachstum, sowie ausgeprägten hypoketotischen Hypoglykämien bis dahin ungeklärter Genese. Die Diagnostik in Hypoglykämie zeigte ein metabolisches Profil sehr ähnlich einem kongenitalen Hyperinsulinismus mit charakteristisch erniedrigte Ketonkörper, supprimierte freie Fettsäuren - d.h. typischen Anzeichen einer gesteigerten Insulinwirkung - jedoch ohne nachweisbar erhöhtes Insulin in Hypoglykämie.

Im Verlauf erschien ein Fallbericht, welcher zwei Patienten mit einem nahezu identischen klinischen Phänotyp beschrieb, bei denen aktivierende Mutationen im *AKT2*-Gen als Ursache gefunden werden konnten (Hussain et al., 2011). Hierbei handelt es sich um eine entscheidende Schnittstelle im Post-Insulinrezeptor-Signalweg, über die sowohl metabolische Wirkungen des Insulinsignalwegs vermittelt, als auch Wachstumsprozesse aktiviert werden (hypoketotische Hypoglykämien mit supprimierten freien Fettsäuren, und ein „segmental overgrowth“ in betroffenen Geweben). Diese Genveränderung war als somatisches Mosaik

nachgewiesen worden, d.h. sie ist post-zygotisch während der Embryonalentwicklung entstanden und betraf somit nicht alle Gewebe bzw. Lokalisationen des Körpers gleichmäßig, sondern nur die Gewebe, die im Verlauf der Embryonalentwicklung aus der genetisch veränderten Zelle entstanden.

Entsprechend haben wir mit der Autorengruppe um Robert Semple in Cambridge/UK Kontakt aufgenommen und eine entsprechende Diagnostik veranlasst. Dabei fand sich auch bei intensiver Suche einschließlich Auswertungen hinsichtlich Mosaikerkrankungen keine Veränderung im *AKT2*-Gen. Aufgrund des extrem ähnlichen phänotypischen Bildes hielten wir dennoch eine analoge Erkrankung aus dem gleichen Signalweg für wahrscheinlich, und untersuchten entsprechend weitere Gene des Signalweges. Dabei fand sich eine somatische Veränderung c.2176G>A p.Glu726Lys im *PIK3CA*-Gen. Dieses Gen codiert für eine katalytische Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), d.h. liegt im Signalweg zwischen Insulinrezeptor und dem vorbeschriebenen *AKT2*-Gen. Ergänzende Phosphorylierungsstudien, die in Cambridge an Fibroblasten unserer Patientin durchgeführt wurden, bestätigten eine gesteigerte AKT-Phosphorylierung an zwei verschiedenen Phosphorylierungsstellen im Signalweg unterhalb der PI3K als Ausdruck der Überaktivierung des Signalweges (Patient 1 in Abbildung 3A und 3B).

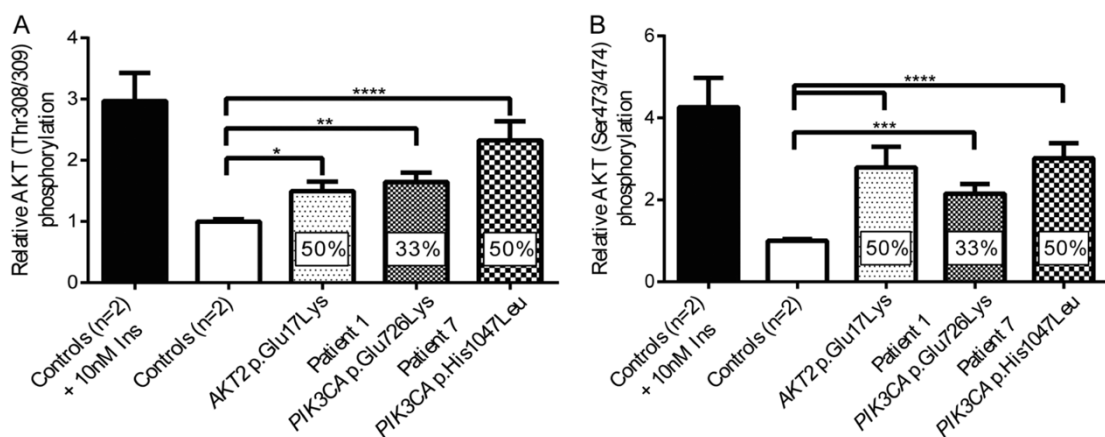


Abbildung 3: AKT-Phosphorylierung an den Bindungsstellen Thr307/309 (A) bzw. Ser473/474 (B) in Hautfibroblasten. Die Prozentzahlen in den Säulen stellen die Mutationslast der jeweiligen somatischen Genveränderung innerhalb der untersuchten Patientenzelllinie dar. Gepoolte, normalisierte Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. Signifikanztestung mittels One-way ANOVA und post hoc Dunnett's test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Die Abbildung entspricht den unveränderten Panels A und B der Figure 4 der Originalpublikation (Leiter et al., 2017). Abdruck nicht genehmigungspflichtig (Open-Access-Publikation).

Aktivierende Genveränderungen der PI3K sind bislang in erster Linie als Ursachen für Erkrankungen mit dem Leitsymptom eines „overgrowth“ verschiedenster Gewebe bekannt. Die zugrundeliegenden Genveränderungen treten in der Regel somatisch/postzygotisch auf, d.h. betreffen nicht alle Körperzellen, sondern nur einen begrenzten Anteil des Individuums je nach Zeitpunkt des Auftretens der Genveränderung in der Embryonalentwicklung. Deshalb ist die entsprechende klinische Erscheinung ausgesprochen heterogen, und umfasst verschiedene bislang vorwiegend klinisch charakterisierte Erkrankungen wie z.B. „Fibroadipose hyperplasia or Overgrowth“ (FAO), „Hemihyperplasia Multiple Lipomatosis“ (HHML), „Congenital Lipomatous Overgrowth“, „Scoliosis/Skeletal and Spinal (CLOVES) syndrome“, „Megalencephaly-Capillary Malformation“ (MCAP). Diese werden mit zunehmender Aufklärung der überlappenden genetischen Ursachen mittlerweile zumeist unter dem Begriff „PIK3CA-related overgrowth spectrum“ (PROS) zusammengefasst (Keppler-Noreuil et al., 2015; Kurek et al., 2012; Lindhurst et al., 2012).

Im Rahmen der Suche nach phänotypisch ähnlichen Patient:innen fanden sich im Verlauf zwei weitere Kinder, die neben den genannten syndromalen Charakteristika ebenfalls Hypoglykämien mit identischem metabolischem Profil aufwiesen. Bei einem konnte ursächlich ebenfalls eine Variante im *PIK3CA*-Gen gefunden werden (c.365G>A, p.Gly118Asp), bei einem weiteren eine Sequenzvariante c.1117G>A, p.Gly373Arg im *PIK3R1*-Gen, welches für die zweite, regulatorische Untereinheit der PI3K codiert.

Unsere Daten zeigen erstmals, dass es eine metabolische Facette dieser PI3K-assoziierten Erkrankungen mit Aktivierung des darunter liegenden Pathways gibt, die sich durch hypoketotische, hypoinsulinämische Hypoglykämien mit supprimierten freien Fettsäuren auszeichnet. Ergänzend haben wir anschließend insgesamt 22 Patienten mit lokalisierter, PIK3CA-assoziiierter Overgrowth-Erkrankung (PROS) orientierend metabolisch charakterisiert (Nüchternblutentnahme morgens), und konnten zumindest in den durchgeführten Untersuchungen und im jeweiligen Untersuchungsalter der Patienten keinen Anhaltspunkt für eine metabolische Facette bei diesen Patienten finden. Entsprechend scheint der

metabolische Phänotyp nur einen Teil der Patienten zu betreffen. Wir diskutieren in unserer Arbeit, dass dies am ehesten mit dem Verteilungsmuster und Ausprägungsgrad der genetischen Aktivierung zusammenhängt, d.h. insbesondere diejenigen Patient:innen betrifft, bei denen das genetische Mosaik insbesondere metabolisch relevante Gewebe wie z.B. die Leber einschließt, und dort beispielsweise die Glykogenolyse supprimiert.

2.6. Ein erweitertes klinisches Spektrum der hypoinsulinämischen hypoketotischen

Hypoglykämien durch genetische Aktivierung des Post-Insulinrezeptor-Signalweges

An expanded clinical spectrum of hypoinsulinaemic hypoketotic hypoglycaemia. Welters A, Leiter SA, Bachmann N, Bergmann C, Hoermann H, Korsch E, Meissner T, Payne F, Williams R, Hussain K, Semple RK, Kummer S* (*geteilte Letztautorenschaft). Orphanet J Rare Dis 2023 18:360; doi: 10.1186/s13023-023-02954-5*

Diese Arbeit stellt ein Folgeprojekt der zuvor dargestellten Publikation dar, in der wir erstmals einen sehr distinkten metabolischen Phänotyp von PI3K-assoziierten Erkrankungen gezeigt hatten. Seitdem haben wir gemeinsam mit den Kooperationspartnern weitere klinische Beispiele dieser Erkrankungen gesehen, die weitere Schlussfolgerungen erlauben und in der nachfolgend dargestellten Arbeit zusammengefasst wurden.

In den bislang publizierten Patienten/Fallserien war durchgängig das Symptom „Overgrowth“ das wesentliche Merkmal, welches in Richtung einer Dysregulation im PI3K-AKT-Signalweg aufmerksam machte, und somit gewissermaßen notwendige Voraussetzung war, überhaupt diesen Differentialdiagnosen nachzugehen.

Hier beschreiben wir nun erstmals Patienten, die keine relevanten syndromalen Charakteristika oder Overgrowth-Symptome aufwiesen (Individuen 1 und 2 des Artikels). Exemplarisch dargestellt sei hier ein Patient, den wir zur Zweitmeinung in unserem Zentrum gesehen haben, und der bislang als kongenitaler Hyperinsulinismus behandelt wurde (Individuum 1, I1). Ausgeprägte Hypoglykämien ab dem ersten Lebenstag waren anfangs nur schwer zu kontrollieren, auch zeigten die üblichen Therapien eines CHI weitestgehend wirkungslos (Diazoxid, Octreotid). Letztendlich erfolgte eine intensive Ernährungstherapie, dann kam es im Kleinkindalter zum weitestgehenden Sistieren der Hypoglykämieeigung. Eine von uns initiierte genetische Diagnostik erbrachte keine Veränderungen in den bekannten CHI-assoziierten Genen, jedoch eine heterozygote c.323G>A p.(Arg108His) Variante im *PIK3CA*-Gen. Zu dieser Aminosäure-Sequenzvariante gab es bereits publizierte funktionelle Analysen, welche eine Überaktivierung der PI3K-Aktivität durch diesen p.(Arg108His) Aminosäurechange gezeigt haben (Oda et al., 2008), sodass die Variante gemäß ACMG-Kriterien (Richards et al., 2015) als pathogen gewertet werden konnte.

Bei retrospektiver Durchsicht der auswärtigen Behandlungsunterlagen zeigte sich, dass in mehreren Blutentnahmen in Hypoglykämie im frühen Säuglingsalter zwar jedes Mal alle typischen Zeichen einer Insulinwirkung vorhanden waren (Hypoketose, supprimierte freie Fettsäuren), jedoch lediglich einmal ein mild erhöhtes Insulin von 3,9mU/l messbar war, während vier weitere Blutentnahmen in Hypoglykämie adäquat supprimierte Insulinwerte zwischen <0,1 und 0,8mU/l und C-Peptid-Werte von <0,3ng/ml zeigten – untypisch für einen CHI. Auch bei retrospektiver Durchsicht der Behandlungsunterlagen und genauer Untersuchung des Patienten in Kenntnis des genetischen Befundes fanden sich keinerlei Overgrowth-Aspekte, die auf eine Differentialdiagnose im Post-Insulinrezeptor-Pathways hingedeutet hätten.

Die genauere Auswertung der next-generation sequencing (NGS) Daten zeigte die detektierte *PIK3CA* Sequenzvariante in 50% von 597 Ablesungen, was für eine heterozygote Variante und gegen eine postzygotisch entstandene Mosaikvariante spricht.

Dieser Patient stellt somit den ersten berichteten Fall mit einer genetisch gesicherten, nicht-syndromalen, nicht-mosaikbedingten, post-Insulinrezeptor-Hypoglykämieerkrankung dar, welche mit Ausnahme der Insulinspiegel in Hypoglykämie exakt einem kongenitalen Hyperinsulinismus gleicht. Analog zur Terminologie in anderen endokrinologischen Systemen haben wir in unserem Paper für dieses Krankheitsbild die Bezeichnung „Pseudohyperinsulinismus“ vorgeschlagen.

Diese ausgesprochen prägnante metabolische Signatur eines Pseudohyperinsulinismus fand sich im Folgenden noch bei weiteren Individuen – teilweise mit der Hypoglykämieeigung als einzige klinische Auffälligkeit (I2), teilweise mit typischen Features einer Overgrowth-Erkrankung (I5 und I6). Jedoch fand sich bei diesen drei Betroffenen trotz umfangreichster genetischer Diagnostik keine eindeutige genetische Erklärung, obwohl der metabolische Phänotyp bei allen dreien, und der Overgrowth-Phänotyp bei I5 und I6 sehr prägnant auf eine Störung in diesem Signalweg hinweist.

Zuletzt berichten wir zwei Individuen (I3 und I4), welche wir als „mild-syndromalen Pseudohyperinsulinismus“ charakterisiert haben. I3 fiel zunächst über die syndromale Komponente im Sinne eines Megalencephaly-Capillary Malformation (MCAP)-Syndroms auf, die Hypoglykämieeigung war zu diesem Zeitpunkt nicht klinisch apparent, sondern wurde erst durch ein Blutzuckerscreening nach Stellung der syndromalen Verdachtsdiagnose detektiert. I4 fiel zunächst über eine symptomatische Hypoglykämieeigung auf, während die typischen syndromalen Features erst im Rahmen der Hypoglykämiediagnostik klinisch detektiert wurden. Bei I3 konnte ursächlich eine Mosaik-*PIK3CA*-Genvariante c.2740G>A p.(Gly914Arg) gefunden werden, bei I4 konnte keine sichere genetische Ursache zugeordnet werden.

Aus den hier berichteten Patienten können wir schlussfolgern, dass man Post-Insulinrezeptor-Pathway Erkrankungen auch über das Leitsymptom der hypoketotischen, hypoinsulinämischen Hypoglykämie im Sinne eines „Pseudohyperinsulinismus“ identifizieren und dann anhand der nichtmetabolischen Features weiter klassifizieren kann. Hierfür schlagen wir die Unterteilungen in „non-syndromic pseudohyperinsulinism“, „mildly syndromic pseudohyperinsulinism“ und „overgrowth-dominated or syndromic pseudohyperinsulinism“ vor.

Trotz einer sehr distinkten Klinik, die sehr suggestiv auf eine Störung im PI3K-AKT-Signalweg hinweist, bleiben einige dieser Patienten genetisch zum aktuellen Zeitpunkt unklar. Dies suggeriert, dass die Störungen in diesem Pathway in ihrer genetischen Grundlage offensichtlich komplexer sind als bislang bekannt, d.h. zum Beispiel Mechanismen umfasst, die mit den im Paper dargestellten Untersuchungsmethoden nicht gänzlich abbildbar sind (z.B. intronische oder epigenetische Veränderungen). Dennoch erscheint es sinnvoll und notwendig, diese metabolische und klinische Signatur auch ohne spezifische genetische Erklärung der Verdachtsdiagnose einer Erkrankung dieses Pathways zuzuordnen.

3. Diskussion

Die hier vorgelegten Arbeiten erbringen einen relevanten Erkenntnisgewinn hinsichtlich verschiedener komplexer Störungen der Insulinsekretion bzw. -wirkung.

Es werden zwei neue genetische Ursachen eines kongenitalen Hyperinsulinismus (CHI) dargestellt. Der CHI zeichnet sich durch einen sehr spezifischen metabolischen Phänotyp aus, und bei einer über die ersten Lebensmonate persistierenden Symptomatik besteht großer Konsens, dass es sich in der Regel um eine genetisch bedingte Erkrankung handelt (Stanley, 2016). Die Mehrzahl der bislang molekular geklärten Hyperinsulinismusursachen bzw. -mechanismen betreffen entweder den ATP-abhängigen Kaliumkanal (K_{ATP} -Kanal) der Betazelle, oder konvergieren über direkte oder indirekte Veränderung des intrazellulären Energiestoffwechsels in einem veränderten ATP-Gehalt, und damit ebenfalls im K_{ATP} -Kanal und einem veränderten Depolarisationsverhalten der Betazelle (Galcheva et al., 2019). Im Gegensatz dazu stellen die hier neu beschriebenen Mechanismen die ersten Beschreibungen molekularer Hyperinsulinismus-Ursachen dar, die mit einer unmittelbar gestörten zellulären Calciumhomöostase die Insulinsekretion triggern.

Besonders herauszuheben ist die Pathogenese der *DNAJC3*-assoziierten Erkrankung, bei der unserer Hypothese zufolge eine rein intrazellulär gestörte Calciumhomöostase vorliegt, d.h. ein vermehrter Calcium-Efflux aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Cytosol ursächlich für die Regulationsstörung ist, und nicht wie bei allen bekannten Formen des CHI ein Influx über membranständige Calciumkanäle. Bemerkenswert ist zudem, dass zwei ganz unterschiedliche molekulare Funktionen eines einzelnen Gens/Proteins in einem biphasischen Verlauf einer Erkrankung münden. Zum einen die Funktion als Co-Chaperon für eine korrekte Proteinfaltung (Pauwels et al., 2022), deren Störung langfristig zu einem progredienten apoptotischen Betazellverlust durch ER-Stress führt (Ladiges et al., 2005; Lytrivi et al., 2021). Zum anderen die Funktion zur Kontrolle eines Calcium-Leakage über Sec61-Kanäle aus dem endoplasmatischen Retikulum (Schorr et al., 2015), dessen Störung in den noch funktionsfähigen Betazellen eine gesteigerte Insulinsekretion hervorruft, solange in-vivo der apoptotische Betazellverlust noch nicht den glykämischen Phänotyp dominiert (in unserer

Arbeit gezeigt). Parallel zu unserer mechanistischen Aufarbeitung sind weitere Patientenbeispiele publiziert worden, die wir in unserer Arbeit zusammengefasst haben, sodass mittlerweile insgesamt 7 individuelle Patient:innen veröffentlicht sind, die hyperinsulinämische Hypoglykämien in Zusammenhang mit einem biallelischen Funktionsverlust von *DNAJC3* aufwiesen (Lytrivi et al., 2021; Ocansey et al., 2022; Ozon et al., 2020; Synofzik et al., 2014; Welters et al., 2024). Somit hat sich *DNAJC3* als ein neues Hyperinsulinismusgen etabliert, welches mittlerweile in neuen differentialdiagnostischen Genpanels bereits routinemäßig Berücksichtigung findet, da andere/spezifischere extrapankreatische *DNAJC3*-assoziierte Features bei Säuglingen/jungen Kleinkindern noch fehlen bzw. subtil sein können. Interessanterweise gibt es im Mausmodell mittlerweile Daten, dass eine Behandlung mit dem Chaperon 4-Phenylbutyrat (4-PBA) den Rückgang von Betazellmasse und -funktion in *DNAJC3*-Knock out Mäusen reduzieren kann (Han et al., 2015). Diese Substanz ist als Natriumphenylbutyrat zur Therapie von Harnstoffzyklusdefekten zugelassen. Insofern wären weitere klinische Studien erwägenswert, ob Natriumphenylbutyrat bei *DNAJC3*-Erkrankungen beim Menschen zu einem verzögerten Betazellabbau und ggf. sogar neurodegenerativen Phänotyp führt.

Bei der *CACNA1C*-assoziierten Erkrankung ist das Erklärungsmodell hervorzuheben, über welches die Organselektivität bzw. -präferenz des klinischen Phänotyps (Herz im Sinne eines Long-QT Syndroms vs. Pankreas im Sinne von hyperinsulinämischen Hypoglykämien) durch die unterschiedlichen molekularen Veränderungen eines Gens erklärbar werden. Wir konnten zeigen, dass zwei unterschiedliche Missense-Sequenzveränderungen im codierten Kanalprotein ganz distinkte elektrophysiologische Charakteristika hervorrufen. Diese führen übersetzt in in-silico Simulationen von Kardiomyozyten und Betazellen zu sehr unterschiedlichen, mutationsspezifischen zellulären Effekten, die wiederum gut die charakteristischen klinischen Merkmale der jeweils betroffenen Mutationsträger widerspiegeln. Diese mutationsspezifischen Effekte in unterschiedlichen Zellen bieten entsprechend ein Erklärungsmodell für unterschiedliche klinische Phänotypen infolge verschiedener genetischer Varianten in einem Kanalprotein, und stellen ein mögliches Erklärungsmodell dar, warum in

publizierten Fallserien nur ein Teil der Patienten mit einem klassischen Timothy-Syndrom wesentlich von Hypoglykämien betroffen ist (z.B. 36% in der Arbeit (Splawski et al., 2004)). Interessanterweise wurden mittlerweile auch Patienten mit hyperinsulininämischen Hypoglykämien assoziiert mit Varianten im *CACNA1D*-Gen publiziert, welches für eine Untereinheit des CaV1.3 Calciumkanals codiert (De Mingo Alemany et al., 2020; Flanagan et al., 2017). So etablieren sich zunehmend Gene, welche für Untereinheiten von pankreatischen Betazell-Calciumkanälen codieren, als Ursache eines kongenitalen Hyperinsulinismus.

Als Limitation ist festzustellen, dass beide Arbeiten (*DNAJC3* und *CACNA1C*) ihren Ursprung in klinischen Fällen haben, und der Umfang der mechanistischen Aufarbeitung derjenigen einer primär klinisch fokussierten Forschungsgruppe entspricht. Entsprechend plausibilisieren die erhobenen Daten die Hypothesen zum jeweiligen pathogenetischen Modell, stellen jedoch keinen definitiven Beweis des pathogenetischen Mechanismus in allen Facetten und auf allen Ebenen dar. So konnten wir in der *DNAJC3*-Arbeit die gesteigerte Insulinsekretion in isolierten Inseln eines Mausmodells zeigen, belegen jedoch nicht experimentell – z.B. durch Calcium-Imaging-Versuche - die gestörte intrazelluläre Calciumhomöostase. In der *CACNA1C*-Arbeit konnten wir sehr prägnante elektrophysiologische Charakteristika herausarbeiten, die Translation dieser Befunde in die Betazelle jedoch erfolgte in einem in-siliko-Modell, während die Entwicklung eines in-vitro Betazell-Modells nicht im Rahmen einer primär klinisch fokussierten Forschungsgruppe realisierbar war.

Beide Projekte spiegeln andererseits aber die Chancen wider, die sich aus der klinischen Forschung an Patienten mit seltenen Erkrankungen ergeben. Während die Entwicklung von Tiermodellen zur molekularen Aufklärung der Funktion von Genen oder Proteinen oft zeitlich und personell sehr umfangreicher Ressourcen bedürfen, ergibt sich durch Patient:innen mit definierten genetischen Erkrankungen bzw. Veränderungen die Chance, wertvolle Erkenntnisse über die biologische Relevanz bestimmter Gene, Proteine oder Pathways im humanen Setting zu gewinnen. Entsprechend verstehen wir Arbeiten wie die beiden vorgenannten Projekte mit Blick auf die molekularen Zusammenhänge eher als hypothesengenerierend, deren Alleinstellungsmerkmal und Wert sich jedoch aus der

Zusammenschau mit der klinischen Fallbeschreibung ergibt. Die wissenschaftliche Herangehensweise „bedside-to-bench“ setzt dabei die Kooperation mit Laborgruppen voraus, mit denen primär klinisch motivierte Fragestellungen bzw. Hypothesen in Form eines gut priorisierten, pragmatischen experimentellen Designs soweit plausibilisiert werden können, dass dies einen Erkenntnisgewinn hinsichtlich molekularer Zusammenhänge klinischer Phänomene ermöglicht.

Die anschließend diskutierten Arbeiten konnten durch internationale Kooperationen u.a. das Rubinstein-Taybi-Syndrom als neue syndromale Hyperinsulinismusform etablieren, und die größte Fallserie und Metaanalyse zu Patienten mit Kabuki-Syndrom und CHI zusammenstellen.

Beiden Arbeiten ist gemeinsam, dass in den von einem CHI betroffenen Kohorten die eigentlich seltenere genetische Ursache des jeweiligen Syndroms überrepräsentiert war. Drei von vier Kindern mit Rubinstein-Taybi Syndrom und CHI wiesen Varianten im *EP300*-Gen auf, welche in Kohorten mit Rubinstein-Taybi Syndrom ohne CHI nur für 8-10% der RST Fälle verantwortlich waren und häufig subtilere klinische Features aufweisen (Fergelot et al., 2016; López et al., 2018). Der genaue molekulare Zusammenhang zwischen *EP300* oder *CREBBP* und dem CHI bleibt bislang bislang spekulativ. Einerseits spielen die codierten Proteine p300 und CBP über eine Histonacetyltransferase-Aktivität als Koaktivatoren für transkriptionelle Vorgänge eine Rolle in der Betazellentwicklung, jedoch weisen Mäuse ohne P300 oder CBP-Aktivität eher reduzierte Alpha- und Betazellmassen und eine Glukoseintoleranz durch Hypoinsulinämie auf (Wong et al., 2018). Andererseits scheint der molekulare Mechanismus des Rubinstein-Taybi Syndroms insgesamt auf eine globale Störung von Transkriptionsmechanismen durch veränderte Histonmodifikationen zurückzuführen zu sein (Izumi, 2016), sodass auch indirekte Effekte auf die Betazellfunktion, d.h. vermittelt über andere Loci, als Erklärung für einen Hyperinsulinismus vorstellbar sind – dies erfordert noch weitere Studien.

Auch bei Kindern mit Kabuki Syndrom und CHI fanden sich deutlich häufiger Varianten in *KDM6A* als bei Kindern mit Kabuki-Syndrom ohne CHI. So konnten wir statistisch nachweisen, dass Patient:innen mit *KDM6A*-assoziiertem KS signifikant wahrscheinlicher einen CHI entwickelten als Patient:innen *KMT2D*-assoziiertem KS (21,8% vs. 3,5%, $p < 0,001$), was auf eine spezifische Relevanz des X-chromosomalen *KDM6A*-Gens für die Insulinsekretion hindeutet. Möglicherweise gibt es auch eine mechanistische Überschneidung mit der Beobachtung, dass auch beim Turner Syndrom (Fehlen eines X-Chromsoms = 45,X Karyotyps bei Mädchen) eine Assoziation mit einem Hyperinsulinismus beschrieben wurde, welche mit einer Haploinsuffizienz des *KDM6A*-Locus in Verbindung gebracht wurde (Gibson et al., 2018).

Die Arbeiten zum Rubinstein-Taybi Syndrom und zum Kabuki-Syndrom stellten zum Publikationszeitpunkt die jeweils größten Fallserien von Patienten der jeweiligen syndromalen Erkrankungen mit gleichzeitigem CHI dar, und sind somit die jeweils validesten Informationsquellen für Entscheidungsfindungen für deren Management. Auch zeigen beide Fallserien, dass sich nicht selten primär aus der genetischen Diagnostik die syndromale Verdachtsdiagnose ergeben hat – teilweise, weil die spezifischen Merkmale des jeweiligen Syndroms zum Zeitpunkt der genetischen Diagnostik noch nicht charakteristisch ausgebildet waren (z.B. im Säuglingsalter), oder aber nicht korrekt auf die jeweilige übergeordnete Erkrankung hingedeutet wurden. Dies unterstreicht die Relevanz gut durchdachter Sequenzierstrategien sowie einer guten Zusammenarbeit zwischen Genetikern und Klinikern für die Differentialdiagnostik seltener Blutzuckerregulationsstörungen.

Zuletzt wurden zwei Arbeiten dargestellt, welche ein breites Spektrum an Hypoglykämieerkrankungen durch eine konstitutive Aktivierung des Post-Insulinrezeptor-Signalweges beschreiben. Nach unserer ersten Veröffentlichung von 2017 konnten unsere Beobachtungen mittlerweile auch in weiteren Kohorten bzw. Patienten mit *PIK3CA*-assoziierten Erkrankungen reproduziert werden (McDermott et al., 2018; Stutterd et al., 2018). Hypoglykämien scheinen dabei insbesondere Patient:innen mit diffus verteilten genetischen Mosaiken zu betreffen, während bei Patienten mit lokal sehr begrenzten Mosaiken und zum

Teil mit sehr entstellendem Überwuchs insbesondere der Extremitäten bislang keine relevanten metabolische Folgen beschrieben wurden. Entsprechend reflektiert der metabolische Phänotyp wahrscheinlich, ob bzw. wie umfangreich metabolisch relevante Gewebe in das genetische Mosaik einbezogen sind. Die teilweise sehr kurze Fastentoleranz einiger Patienten lässt beispielsweise auf eine fehlende Mobilisierbarkeit von Glykogenvorräten in Fastensituationen schließen, d.h. deutet auf eine Einbeziehung der Leber in das genetische Mosaik mit konstitutiver Suppression der Glykogenolyse hindeutet. Die niedrigen freien Fettsäuren und Ketonkörper in Hypoglykämie wiederum reflektieren die supprimierte Lipolyse durch ein konstitutives Insulinsignal, sodass in solchen Fällen das Einbeziehung weiterer Teile des Fettgewebes in das genetische Mosaik anzunehmen ist. In der Zwischenzeit wurden auch weitere Berichte von Hypoglykämien bei Patienten mit wiederum anderen genetischen Erkrankungen aus dem post-Insulinrezeptor-Signalweg publiziert, beispielsweise *PTEN* und *PPP2R5D* (Maines et al., 2021).

Während diese Erkrankungen bislang ausschließlich als ultra-seltene, komplex-syndromale Krankheitsbilder im Kontext somatischer Genveränderungen des Pathways beschrieben waren, konnten wir in unserer zuletzt diskutierten Arbeit erstmals auch nicht-syndromale Patienten mit Keimbahnmutationen als Ursache beschreiben, und solche mit identischer metabolischer und klinischer Signatur, aber ohne identifizierbare molekulare Veränderungen in dem Signalweg. So erscheint eine beschreibende klinische Diagnose auf Basis der metabolischen Signatur eines „Pseudohyperinsulinismus“ sinnvoll, um diese Patienten klar von einem kongenitalen Hyperinsulinismus abzugrenzen, denen sie teilweise – abgesehen vom Insulinspiegel – frappierend ähneln können, und insofern ein hohes Risiko für Fehldiagnosen aufweisen. Die korrekte Zuordnung dieser Patienten könnte zukünftig auch zunehmende therapeutische Relevanz bekommen, da mittlerweile auch erste Berichte zur erfolgreichen Therapie von *PIK3CA*-assoziierten Hypoglykämien mit dem PI3K-Inhibitor Alpelisib existieren (Nasomyont et al., 2023). Mit zunehmendem Verständnis dieser molekularen Zusammenhänge wurden mittlerweile sogar erfolgreiche Therapieversuche mit Alpelisib für Hypoglykämieerkrankungen hochrangig publiziert, welche bei

Insulinrezeptoraktivierung im Kontext eines Hyperinsulinismus oder IGF2-vermittelten „Non-islet-cell tumor“ Hypoglykämien durch Blockade des Post-Insulinrezeptor-Pathways eine Verbesserung der Hypoglykämieeigung erreichen konnten (Cahn et al., 2023; Dauleh et al., 2024). Diese Entwicklungen verdeutlichen, wie schnell sich der rasante Wissenszuwachs der letzten Jahre, ausgehend vom molekularen Verständnis sehr seltener Erkrankungen, auch unmittelbar in verbesserten Therapiekonzepten widerspiegelt.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend definieren die hier dargestellten Forschungsvorhaben eine Reihe neuer Erkrankungen aus dem Spektrum komplexer Hypoglykämieerkrankungen durch Störungen der Insulinsekretion bzw. -wirkung. Sie verdeutlichen den Stellenwert klinischer Forschung, die von seltenen Patienten bzw. ungewöhnlichen Krankheitsentitäten ausgeht, und durch enge Kooperationen mit grundlagenwissenschaftlich arbeitenden Gruppen die Relevanz von Genen, Proteinen oder Pathways am humanen Modell verdeutlichen kann. Die so im Kontext einer klinisch fokussierten Forschung gewonnen Erkenntnisse können wiederum Hypothesen bzw. Ideen für weitere grundlagenwissenschaftlich orientierte Arbeiten oder Gruppen hervorbringen. Andererseits zeigen die Arbeiten den Stellenwert von engen internationalen und interdisziplinären Kooperationen in der Forschung zu seltenen Erkrankungen, bei denen der Erkenntnisgewinn häufig aus der Aggregation seltener Patienten bzw. klinischer Befunde resultiert, welche die Beschreibung systematischer Phänomene ermöglicht.

Die im Rahmen der dargestellten Projekte aufgebauten Netzwerke und Kompetenzen sind wiederum für unsere Forschungsgruppe auch zukünftig eine wertvolle Facette und Plattform, die universitäre Medizin eines überregional ausgewiesenen Spezialbereichs/Referenzzentrums nachhaltig mit akademischem Fortschritt und wissenschaftlichem Erkenntnisgewinn zu verbinden.

5. Literaturverzeichnis

- Adam, M., & Hudgins, L. (2005). Kabuki syndrome: a review. *Clinical Genetics*, 67(3), 209–219.
- Adam, M. P., Banka, S., Bjornsson, H. T., Bodamer, O., Chudley, A. E., Harris, J., Kawame, H., Lanpher, B. C., Lindsley, A. W., Merla, G., Miyake, N., Okamoto, N., Stumpel, C. T., & Niikawa, N. (2019). Kabuki syndrome: international consensus diagnostic criteria. *Journal of Medical Genetics*, 56(2), 89–95.
- Banerjee, I., Salomon-Estebanez, M., Shah, P., Nicholson, J., Cosgrove, K. E., & Dunne, M. J. (2019). Therapies and outcomes of congenital hyperinsulinism-induced hypoglycaemia. *Diabetic Medicine*, 36(1), 9–21.
- Cahn, A., Shoyhet-Smoilovsky, H., Fischer, M., Zick, A., Riahi, Y., Levenberg, S., & Leibowitz, G. (2023). Alpelisib in Intractable Non-Islet-Cell Tumor Hypoglycemia. *New England Journal of Medicine*, 388(20), 1911–1913.
- Costain, G., Kannu, P., & Bowdin, S. (2018). Genome-wide sequencing expands the phenotypic spectrum of EP300 variants. *European Journal of Medical Genetics*, 61(3), 125–129.
- D McKinlay, C. J., Alsweiler, J. M., Anstice, N. S., Burakevych, N., Chakraborty, A., Geoffrey Chase, J., Gamble, G. D., Harris, D. L., Jacobs, R. J., Jiang, Y., Paudel, N., San Diego, R. J., Thompson, B., Wouldes, T. A., & Harding, J. E. (2017). Association of Neonatal Glycemia With Neurodevelopmental Outcomes at 4.5 Years Supplemental content. *JAMA Pediatr*, 171(10), 972–983.
- Dauleh, H., Amin, R., Pasha, M., & Hussain, K. (2024). Adjuvant Alpelisib Therapy for Congenital Hyperinsulinism. *New England Journal of Medicine*, 390(4), 379–380.
- De Mingo Alemany, M. C., Mifsud Grau, L., Moreno Macián, F., Ferrer Lorente, B., & León Cariñena, S. (2020). A de novo CACNA1D missense mutation in a patient with congenital hyperinsulinism, primary hyperaldosteronism and hypotonia. *Channels*, 14(1), 175–180.
- Fergelot, P., Van Belzen, M., Van Gils, J., Afenjar, A., Armour, C. M., Arveiler, B., Beets, L., Burglen, L., Busa, T., Collet, M., Deforges, J., de Vries, B. B. A., Dominguez Garrido, E., Dorison, N., Dupont, J., Francannet, C., Garcíá-Minaúr, S., Gabau Vila, E., Gebre-Medhin, S., ... Hennekam, R. C. (2016). Phenotype and genotype in 52 patients with Rubinstein–Taybi syndrome caused by EP300 mutations. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 170(12), 3069–3082.
- Flanagan, S., Vairo, F., Johnson, M., Caswell, R., Laver, T., Lango Allen, H., Hussain, K., & Ellard, S. (2017). A CACNA1D mutation in a patient with persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia, heart defects, and severe hypotonia. *Pediatric Diabetes*, 18(4), 320–323.

- Galcheva, S., Demirbilek, H., Al-Khawaga, S., & Hussain, K. (2019). The genetic and molecular mechanisms of congenital hyperinsulinism. *Frontiers in Endocrinology*, 10:111, doi: 10.3389/FENDO.2019.00111
- Geneviève, D., Amiel, J., Viot, G., Le Merrer, M., Sanlaville, D., Urtizberea, A., Gérard, M., Munnich, A., Cormier-Daire, V., & Lyonnet, S. (2004). Atypical findings in Kabuki syndrome: Report of 8 patients in a series of 20 and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 129A(1), 64–68.
- Gibson, C. E., Boodhansingh, K. E., Li, C., Conlin, L., Chen, P., Becker, S. A., Bhatti, T., Bamba, V., Adzick, N. S., De Leon, D. D., Ganguly, A., & Stanley, C. A. (2018). Congenital Hyperinsulinism in Infants with Turner Syndrome: Possible Association with Monosomy X and KDM6A Haploinsufficiency. *Hormone Research in Paediatrics*, 89(6), 413–422.
- Han, J., Song, B., Kim, J., Kodali, V. K., Pottekat, A., Wang, M., Hassler, J., Wang, S., Pennathur, S., Back, S. H., Katze, M. G., & Kaufman, R. J. (2015). Antioxidants Complement the Requirement for Protein Chaperone Function to Maintain β -Cell Function and Glucose Homeostasis. *Diabetes*, 64(8), 2892–2904.
- Harris, D. L., Alsweiler, J. M., Ansell, J. M., Gamble, G. D., Thompson, B., Wouldes, T. A., Yu, T.-Y., Harding, J. E., Ansell, J., Bevan, C., Brosnanhan, J., Campbell, E., Crawford, T., Fredell, K., Frost, K., Gamble, G., Gsell, A., Hahnhaussen, C., Hossin, S., ... Hess, R. (2016). Outcome at 2 Years after Dextrose Gel Treatment for Neonatal Hypoglycemia: Follow-Up of a Randomized Trial. *The Journal of Pediatrics*, 170, 54-59.e2.
- Harris, D. L., Weston, P. J., & Harding, J. E. (2012). Incidence of neonatal hypoglycemia in babies identified as at risk. *Journal of Pediatrics*, 161(5), 787–791.
- Hoermann, H., Mokwa, A., Roeper, M., Salimi Dafsari, R., Koestner, F., Hagenbeck, C., Mayatepek, E., Kummer, S., & Meissner, T. (2022). Reliability and Observer Dependence of Signs of Neonatal Hypoglycemia. *The Journal of Pediatrics*, 245, 22-29.e2.
- Hoermann, H., Roeper, M., Dafsari, R. S., Koestner, F., Schneble, D., von Zezschwitz, D., Mayatepek, E., Kummer, S., & Meissner, T. (2022). Protecting against brain damage by improving treatment in neonates with hypoglycaemia: ProBrain-D—a study protocol of a prospective longitudinal study. *BMJ Open*, 12(8), e063009.
- Hoermann, H., Roeper, M., Salimi Dafsari, R., Koestner, F., Reinauer, C., Mayatepek, E., Meissner, T., & Kummer, S. (2021). Challenges in management of transient hyperinsulinism – a retrospective analysis of 36 severely affected children. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 34(7), 867–875.
- Hoermann, H., Roeper, M., Welters, A., Baertling, F., Mayatepek, E., Meissner, T., & Kummer, S. (2023). Delayed-Onset Transient Hyperinsulinism in Infants with Very Low and Extremely Low Birth Weights: A Cohort Study. *The Journal of Pediatrics*, 258, 113399.

- Hoermann, H., van Faassen, M., Roeper, M., Hagenbeck, C., Herebian, D., Muller Kobold, A. C., Dukart, J., Kema, I. P., Mayatepek, E., Meissner, T., & Kummer, S. (2024). Association of Fetal Catecholamines With Neonatal Hypoglycemia. *JAMA Pediatrics*, 178(6), 577–585.
- Hussain, K., Challis, B., Rocha, N., Payne, F., Minic, M., Thompson, A., Daly, A., Scott, C., Harris, J., Smillie, B. J. L., Savage, D. B., Ramaswami, U., De Lonlay, P., O’Rahilly, S., Barroso, I., & Semple, R. K. (2011). An activating mutation of AKT2 and human hypoglycemia. *Science*, 334(6055):474.
- Izumi, K. (2016). Disorders of Transcriptional Regulation: An Emerging Category of Multiple Malformation Syndromes. *Molecular Syndromology*, 7(5), 262–273.
- Kaiser, J. R., Bai, S., Gibson, N., Holland, G., Lin, T. M., Swearingen, C. J., Mehl, J. K., & ElHassan, N. O. (2015). Association Between Transient Newborn Hypoglycemia and Fourth-Grade Achievement Test Proficiency. *JAMA Pediatrics*, 169(10), 913–921.
- Kapoor, R. R., Flanagan, S. E., Arya, V. B., Shield, J. P., Ellard, S., & Hussain, K. (2013). Clinical and molecular characterisation of 300 patients with congenital hyperinsulinism. *European Journal of Endocrinology*, 168(4), 557–564.
- Keppler-Noreuil, K. M., Rios, J. J., Parker, V. E. R., Semple, R. K., Lindhurst, M. J., Sapp, J. C., Alomari, A., Ezaki, M., Dobyns, W., & Biesecker, L. G. (2015). PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 167(2), 287–295.
- Kostopoulou, E., Dastamani, A., Güemes, M., Clement, E., Caiulo, S., Shanmugananda, P., Dattani, M., Gilbert, C., Hurst, J. A., & Shah, P. (2021). Syndromic Forms of Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia—A 15-year follow-up Study. *Clinical Endocrinology*, 94(3), 399–412.
- Kummer, S., Rinné, S., Seemann, G., Bachmann, N., Timothy, K., Thornton, P. S., Pillekamp, F., Mayatepek, E., Bergmann, C., Meissner, T., & Decher, N. (2022). Hyperinsulinemic Hypoglycemia Associated with a CaV1.2 Variant with Mixed Gain- and Loss-of-Function Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8097.
- Kurek, K. C., Luks, V. L., Ayturk, U. M., Alomari, A. I., Fishman, S. J., Spencer, S. A., Mulliken, J. B., Bowen, M. E., Yamamoto, G. L., Kozakewich, H. P. W., & Warman, M. L. (2012). Somatic Mosaic Activating Mutations in PIK3CA Cause CLOVES Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 90(6), 1108–1115.
- Ladiges, W. C., Knoblaugh, S. E., Morton, J. F., Korth, M. J., Sopher, B. L., Baskin, C. R., MacAuley, A., Goodman, A. G., LeBoeuf, R. C., & Katze, M. G. (2005). Pancreatic β -Cell Failure and Diabetes in Mice With a Deletion Mutation of the Endoplasmic Reticulum Molecular Chaperone Gene P58IPK. *Diabetes*, 54(4), 1074–1081.

- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalie, A., & Zimmermann, R. (2011). Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels*, 5(3), 228–235.
- Lederer, D., Grisart, B., Digilio, M. C., Benoit, V., Crespin, M., Ghariani, S. C., Maystadt, I., Dallapiccola, B., & Verellen-Dumoulin, C. (2012). Deletion of KDM6A, a Histone Demethylase Interacting with MLL2, in Three Patients with Kabuki Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 90(1), 119–124.
- Leiter, S. M., Parker, V. E. R., Welters, A., Knox, R., Rocha, N., Clark, G., Payne, F., Lotta, L., Harris, J., Guerrero-Fernández, J., González-Casado, I., García-Miñaur, S., Gordo, G., Wareham, N., Martínez-Glez, V., Allison, M., O’Rahilly, S., Barroso, I., Meissner, T., ... Semple, R. K. (2017). Hypoinsulinaemic, hypoketotic hypoglycaemia due to mosaic genetic activation of PI3-kinase. *European Journal of Endocrinology*, 177(2), 175–186.
- Limesand, S. W., & Rozance, P. J. (2017). Fetal adaptations in insulin secretion result from high catecholamines during placental insufficiency. *Journal of Physiology*, 595(15), 5103–5113.
- Lindhurst, M. J., Parker, V. E. R., Payne, F., Sapp, J. C., Rudge, S., Harris, J., Witkowski, A. M., Zhang, Q., Groeneveld, M. P., Scott, C. E., Daly, A., Huson, S. M., Tosi, L. L., Cunningham, M. L., Darling, T. N., Geer, J., Gucev, Z., Sutton, V. R., Tziotzios, C., ... Semple, R. K. (2012). Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nature Genetics*, 44(8), 928–933.
- López, M., García-Oguiza, A., Armstrong, J., García-Cobaleda, I., García-Miñaur, S., Santos-Simarro, F., Seidel, V., & Domínguez-Garrido, E. (2018). Rubinstein-Taybi 2 associated to novel EP300 mutations: Deepening the clinical and genetic spectrum. *BMC Medical Genetics*, 19(1), 1–8.
- Lytrivi, M., Senée, V., Salpea, P., Fantuzzi, F., Philippi, A., Abdulkarim, B., Sawatani, T., Marín-Cañas, S., Pachera, N., Degavre, A., Singh, P., Derbois, C., Lechner, D., Ladrière, L., Igoillo-Esteve, M., Cosentino, C., Marselli, L., Deleuze, J. F., Marchetti, P., ... Cnop, M. (2021). DNAJC3 deficiency induces β -cell mitochondrial apoptosis and causes syndromic young-onset diabetes. *European Journal of Endocrinology*, 184(3), 455–468.
- Maines, E., Franceschi, R., Martinelli, D., Soli, F., Lepri, F. R., Piccoli, G., & Soffiati, M. (2021). Hypoglycemia due to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway defects: two novel cases and review of the literature. *Hormones*, 20(4), 623–640.
- McDermott, J. H., Hickson, N., Banerjee, I., Murray, P. G., Ram, D., Metcalfe, K., Clayton-Smith, J., & Douzgou, S. (2018). Hypoglycaemia represents a clinically significant manifestation of PIK3CA- and CCND2-associated segmental overgrowth. *Clinical Genetics*, 93(3), 687–692.
- Metwalley, K. A., & Farghaly, H. S. (2024). Idiopathic ketotic hypoglycemia in children: an update. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 29(3), 152–155.

- Muukkonen, L., Männistö, J., Jääskeläinen, J., Hannonen, R., & Huopio, H. (2019). The effect of hypoglycaemia on neurocognitive outcome in children and adolescents with transient or persistent congenital hyperinsulinism. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 61(4), 451–457.
- Nasomyont, N., Rutter, M. M., & Backeljauw, P. F. (2023). Successful Treatment of Hypoglycemia With Alpelisib in Pediatric Patients With PIK3CA -Related Overgrowth Spectrum. *JCEM Case Reports*, 1(2): 1-5.
- Ng, S. B., Bigham, A. W., Buckingham, K. J., Hannibal, M. C., McMillin, M. J., Gildersleeve, H. I., Beck, A. E., Tabor, H. K., Cooper, G. M., Mefford, H. C., Lee, C., Turner, E. H., Smith, J. D., Rieder, M. J., Yoshiura, K., Matsumoto, N., Ohta, T., Niikawa, N., Nickerson, D. A., Shendure, J. (2010). Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nature Genetics*, 42(9), 790–793.
- Niikawa, N., Kuroki, Y., Kajii, T., Matsuura, N., Ishikiriya, S., Tonoki, H., Ishikawa, N., Yamada, Y., Fujita, M., Umemoto, H., Iwama, Y., Kondoh, I., Fukushima, Y., Nako, Y., Matsui, I., Urakami, T., Aritaki, S., Hara, M., Suzuki, Y., ... Reynolds, J. F. (1988). Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: A study of 62 patients. *American Journal of Medical Genetics*, 31(3), 565–589.
- Ocansey, S., Pullen, D., Atkinson, P., Clarke, A., Hadonou, M., Crosby, C., Short, J., Lloyd, I. C., Smedley, D., Assunta, A., Shah, P., & McEntagart, M. (2022). Biallelic DNAJC3 variants in a neuroendocrine developmental disorder with insulin dysregulation. *Clinical Dysmorphology*, 31(1), 11–17.
- Oda, K., Okada, J., Timmerman, L., Rodriguez-Viciana, P., Stokoe, D., Shoji, K., Taketani, Y., Kuramoto, H., Knight, Z. A., Shokat, K. M., & McCormick, F. (2008). PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. *Cancer Research*, 68(19), 8127–8136.
- Ozon, Z. A., Alikasifoglu, A., Kandemir, N., Aydin, B., Gonc, E. N., Karaosmanoglu, B., Celik, N. B., Eroglu-Ertugrul, N. G., Taskiran, E. Z., Haliloglu, G., Oguz, K. K., Kiper, P. O., Yalnizoglu, D., Utine, G. E., & Alikasifoglu, M. (2020). Novel insights into diabetes mellitus due to DNAJC3-defect: Evolution of neurological and endocrine phenotype in the pediatric age group. *Pediatric Diabetes*, 21(7), 1176–1182.
- Pauwels, E., Provinciael, B., Camps, A., Hartmann, E., & Vermeire, K. (2022). Reduced DNAJC3 Expression Affects Protein Translocation across the ER Membrane and Attenuates the Down-Modulating Effect of the Translocation Inhibitor Cyclotriazadisulfonamide. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 584.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the

- American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424.
- Riz, M., Braun, M., & Pedersen, M. G. (2014). Mathematical Modeling of Heterogeneous Electrophysiological Responses in Human β -Cells. *PLoS Computational Biology*, 10(1), e1003389.
- Roeper, M., Hoermann, H., Körner, L. M., Sobottka, M., Mayatepek, E., Kummer, S., & Meissner, T. (2024). Transitional Neonatal Hypoglycemia and Adverse Neurodevelopment in Midchildhood. *JAMA Network Open*, 7(3), e243683.
- Roeper, M., Hoermann, H., Kummer, S., & Meissner, T. (2023). Neonatal hypoglycemia: lack of evidence for a safe management. *Frontiers in Endocrinology*, 14:1179102.
- Roeper, M., Salimi Dafsari, R., Hoermann, H., Mayatepek, E., Kummer, S., & Meissner, T. (2020). Risk Factors for Adverse Neurodevelopment in Transient or Persistent Congenital Hyperinsulinism. *Frontiers in Endocrinology*, 11:580642.
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, Ö., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., Paton, A. W., Paton, J. C., Cavalié, A., & Zimmermann, R. (2012). BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca^{2+} leakage from the ER. *The EMBO Journal*, 31(15), 3282–3296.
- Schlune, A., Kummer, S., & Meissner, T. (2014). Hypoglykämien im Kindesalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 162(9), 811–825.
- Schorr, S., Klein, M. C., Gamayun, I., Melnyk, A., Jung, M., Schäuble, N., Wang, Q., Hemmis, B., Bochen, F., Greiner, M., Lampel, P., Urban, S. K., Hassdenteufel, S., Dudek, J., Chen, X. Z., Wagner, R., Cavalié, A., & Zimmermann, R. (2015). Co-chaperone specificity in gating of the polypeptide conducting channel in the membrane of the human endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), 18621–18635.
- Schulla, V., Renström, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjnovci, A., Jing, X. J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M. A., Obermüller, S., Olofsson, C. S., Salehi, A., Wendt, A., Klugbauer, N., Wollheim, C. B., Rorsman, P., & Hofmann, F. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in β cell-selective $\text{CaV}1.2$ Ca^{2+} channel null mice. *The EMBO Journal*, 22(15), 3844–3854.
- Shah, R., Dai, D. W. T., Alsweller, J. M., Brown, G. T. L., Chase, J. G., Gamble, G. D., Harris, D. L., Keegan, P., Nivins, S., Wouldes, T. A., Thompson, B., Turuwheua, J., Harding, J. E., McKinlay, C. J. D., Feldman, H., Hay, W., Hess, R., Wilson, D., Rogers, J., ... Wilson, J. (2022). Association of Neonatal Hypoglycemia With Academic Performance in Mid-Childhood. *JAMA*, 327(12), 1158–1170.
- Shah, R., Harding, J., Brown, J., & McKinlay, C. (2019). Neonatal Glycaemia and Neurodevelopmental Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neonatology*, 115(2), 116–126.

- Shah, R., Harding, J., Brown, J., & Mckinlay, C. (2019). Neonatal Glycaemia and Neurodevelopmental Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neonatology*, 115(2), 116–126.
- Snider, K. E., Becker, S., Boyajian, L., Shyng, S. L., MacMullen, C., Hughes, N., Ganapathy, K., Bhatti, T., Stanley, C. A., & Ganguly, A. (2013). Genotype and phenotype correlations in 417 children with congenital hyperinsulinism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(2), 355–363.
- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., Sanguinetti, M. C., & Keating, M. T. (2004). CaV1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. *Cell*, 119(1), 19–31.
- Stanescu, D. L., & Stanley, C. A. (2022). Advances in Understanding the Mechanism of Transitional Neonatal Hypoglycemia and Implications for Management. *Clinics in Perinatology*, 49(1), 55–72.
- Stanley, C. A. (2016). Perspective on the Genetics and Diagnosis of Congenital Hyperinsulinism Disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(3), 815–826.
- Stanley, C. A., Rozance, P. J., Thornton, P. S., De Leon, D. D., Harris, D., Haymond, M. W., Hussain, K., Levitsky, L. L., Murad, M. H., Simmons, R. A., Sperling, M. A., Weinstein, D. A., White, N. H., & Wolfsdorf, J. I. (2015). Re-Evaluating “Transitional Neonatal Hypoglycemia”: Mechanism and Implications for Management. *The Journal of Pediatrics*, 166(6), 1520-1525.e1.
- Stanley, C. A., Thornton, P. S., & De Leon, D. D. (2023). New approaches to screening and management of neonatal hypoglycemia based on improved understanding of the molecular mechanism of hypoglycemia. *Frontiers in Pediatrics*, 11, 1071206.
- Stutterd, C., McGillivray, G., Stark, Z., Messazos, B., Cameron, F., White, S., Mirzaa, G., & Leventer, R. (2018). Polymicrogyria in association with hypoglycemia points to mutation in the mTOR pathway. *European Journal of Medical Genetics*, 61(12), 738–740.
- Synofzik, M., Haack, T. B., Kopajtich, R., Gorza, M., Rapaport, D., Greiner, M., Schönfeld, C., Freiberg, C., Schorr, S., Holl, R. W., Gonzalez, M. A., Fritsche, A., Fallier-Becker, P., Zimmermann, R., Strom, T. M., Meitinger, T., Züchner, S., Schüle, R., Schöls, L., & Prokisch, H. (2014). Absence of BiP Co-chaperone DNAJC3 Causes Diabetes Mellitus and Multisystemic Neurodegeneration. *The American Journal of Human Genetics*, 95(6), 689–697.
- ten Tusscher, K. H. W. J., & Panfilov, A. V. (2006). Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(3), H1088–H1100.

- Tuluc, P., Theiner, T., Jacobo-Piqueras, N., & Geisler, S. M. (2021). Role of High Voltage-Gated Ca²⁺ Channel Subunits in Pancreatic β -Cell Insulin Release. From Structure to Function. *Cells*, 10(8), 2004.
- van Kempen, A. A. M. W., Eskes, P. F., Nuytemans, D. H. G. M., van der Lee, J. H., Dijksman, L. M., van Veenendaal, N. R., van der Hulst, F. J. P. C. M., Moonen, R. M. J., Zimmermann, L. J. I., van 't Verlaat, E. P., van Dongen-van Baal, M., Semmekrot, B. A., Stas, H. G., van Beek, R. H. T., Vlietman, J. J., Dijk, P. H., Termote, J. U. M., de Jonge, R. C. J., de Mol, A. C., ... Boluyt, N. (2020). Lower versus Traditional Treatment Threshold for Neonatal Hypoglycemia. *New England Journal of Medicine*, 382(6), 534–544.
- Welters, A., Nortmann, O., Wörmeyer, L., Freiberg, C., Eberhard, D., Bachmann, N., Bergmann, C., Mayatepek, E., Meissner, T., & Kummer, S. (2024). Congenital Hyperinsulinism in Humans and Insulin Secretory Dysfunction in Mice Caused by Biallelic DNAJC3 Variants. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1270.
- Wolfsdorf, J. I., Derks, T. G. J., Drachmann, D., Shah, P., Thornton, P. S., & Weinstein, D. A. (2024). Idiopathic Pathological Ketotic Hypoglycemia: Finding the Needle in a Haystack. *Hormone Research in Paediatrics*, 1–12. Online ahead of print. doi: 10.1159/000538483
- Wong, C. K., Wade-Vallance, A. K., Luciani, D. S., Brindle, P. K., Lynn, F. C., & Gibson, W. T. (2018). The p300 and CBP Transcriptional Coactivators Are Required for β -Cell and α -Cell Proliferation. *Diabetes*, 67(3), 412–422.
- Yang, J., Hammoud, B., Li, C., Ridler, A., Yau, D., Kim, J., Won, K. J., Stanley, C. A., Hoshi, T., & Stancescu, D. E. (2021). Decreased KATP Channel Activity Contributes to the Low Glucose Threshold for Insulin Secretion of Rat Neonatal Islets. *Endocrinology*, 162(9) bqab121. doi: 10.1210/endo/bqab121.
- Yesil, P., Michel, M., Chwalek, K., Pedack, S., Jany, C., Ludwig, B., Bornstein, S. R., & Lammert, E. (2009). A new collagenase blend increases the number of islets isolated from mouse pancreas. *Islets*, 1(3), 185–190.
- Zenker, M., Mohnike, K., & Palm, K. (2023). Syndromic forms of congenital hyperinsulinism. *Frontiers in Endocrinology*, 14:1013874.

6. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf diesem langen und herausfordernden Weg begleitet haben.

In aller erster Linie danke ich meiner Familie – Anja, unseren Kindern Tim und Nils, meinen Eltern, meinem Bruder und seiner Familie, die meine beruflichen Ambitionen und Interessen seit vielen Jahren unterstützen. Verständnis für einen durchaus arbeitsreichen Alltag haben. Rückschläge auffangen, aufmuntern und Erfolge mitfeiern. Immer ein offenes Ohr für mich haben, und wegen zahlloser Dienste, Kongresse, Überstunden, „ich muss nur noch gerade...“-Situationen geduldig zurückstecken und dies respektieren. Mich nicht zuletzt immer wieder erinnern, was das Leben außer Arbeit zu bieten hat. Ohne ihre Geduld, ihren Rückhalt und ihre positive Verstärkung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt außerdem dem gesamten Team der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, wo in den letzten 18 Jahren viele Menschen auf die eine oder andere Weise zu meiner wissenschaftlichen und klinischen Entwicklung beigetragen haben.

Ich danke Professor Mayatepek, der mich seit 18 Jahren an dieser Klinik in meiner akademischen Laufbahn kontinuierlich unterstützt, und auch in herausfordernden Zeiten stets für einen Rahmen gesorgt hat, in dem ich meine klinischen und wissenschaftlichen Interessen und Ziele entwickeln, verfolgen und ausbauen konnte. Er hat mir an allen entscheidenden Stellen immer wieder Perspektiven ermöglicht, die zu einer klinisch und wissenschaftlich extrem erfüllenden Tätigkeit beigetragen haben.

Ich danke Professor Thomas Meissner, der mich quasi mein ganzes „Endokrinologenleben“ lang begleitet und gefördert hat, immer eine offene Tür und ein offenes Ohr hatte, mich mit Rat und Tat unterstützt hat, wenn ich Unterstützung brauchte, aber auch Freiräume und eigenständige Entwicklung ermöglicht und gefördert hat, wo immer es sinnvoll war. Und nicht zuletzt hat er über viele Jahre alles dafür getan, gemeinsam ein Team in der Kinder-Endokrinologie und -Diabetologie aufzubauen, wie man es sich besser nicht wünschen könnte. Nicht nur anlässlich dieser Habilitation, sondern jeden einzelnen Tag bin ich dankbar, Teil eines großartigen Teams zu sein, das sich mit so viel Engagement für die Patient:innen, das Fach und die Wissenschaft einsetzt – daran hat jede und jeder Einzelne einen großen Anteil.

Der Abdruck der folgenden Originalarbeiten erfolgt mit freundlicher Genehmigung der jeweiligen Verlage, bzw. bedarf keiner gesonderten Genehmigung (Open-Access-Publikationen).