Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum
Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
komm. Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Eckel

Charakteristik der renalen Galaktosemetabolit-Exkretion bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andrea Alejandra Stollwerck

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:	Dekan der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Peter Schadewaldt
Korreferent:	Prof. Dr. med. Thomas Höhn

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 2

1 Einleitung 3

1.1 Galaktose-Stoffwechsel 3
1.2 Galaktosämie 5
1.3 Zielsetzung der Arbeit 9

2 Material und Methoden 10

2.1 Patienten und Probanden 10
2.2 Chemikalien und Enzyme 12
2.3 Methoden 14
2.3.1 Probennahme 14
2.3.2 Analytik der Galaktosemetabolite 14
2.3.3 Messung der Enzymaktivität 20
2.3.4 Mutationsanalyse 21
2.3.5 Sonstige Analyseverfahren 22
2.4 Auswertung und Statistik 22
2.4.1 Berechnungen 22
2.4.2 Statistik 24

3 Ergebnisse 25

3.1 Biochemisch-molekulargenetische Charakterisierung 25
3.1.1 Biochemische Charakterisierung 25
3.1.2 Genotypisierung 29
3.2 Galaktosemetabolite in Plasma und Urin 33
3.2.1 Plasma 33
3.2.2 Urin 37
3.3 Renale Ausscheidung von Galaktosemetaboliten 42
3.3.1 Renale Clearance 42
3.3.2 Fraktionelle renale Exkretion und tubuläre Reabsorption 46

4 Diskussion 49

4.1 Untersuchungskollektive 49
4.2 Renale Ausscheidung von Galaktosemetaboliten 57
4.3 Bedeutung der renalen Elimination 66
4.4 Schlussfolgerung 67

5 Literaturverzeichnis 69

Danksagung 83

Curriculum vitae 84

Zusammenfassung 85

Abkürzungsverzeichnis

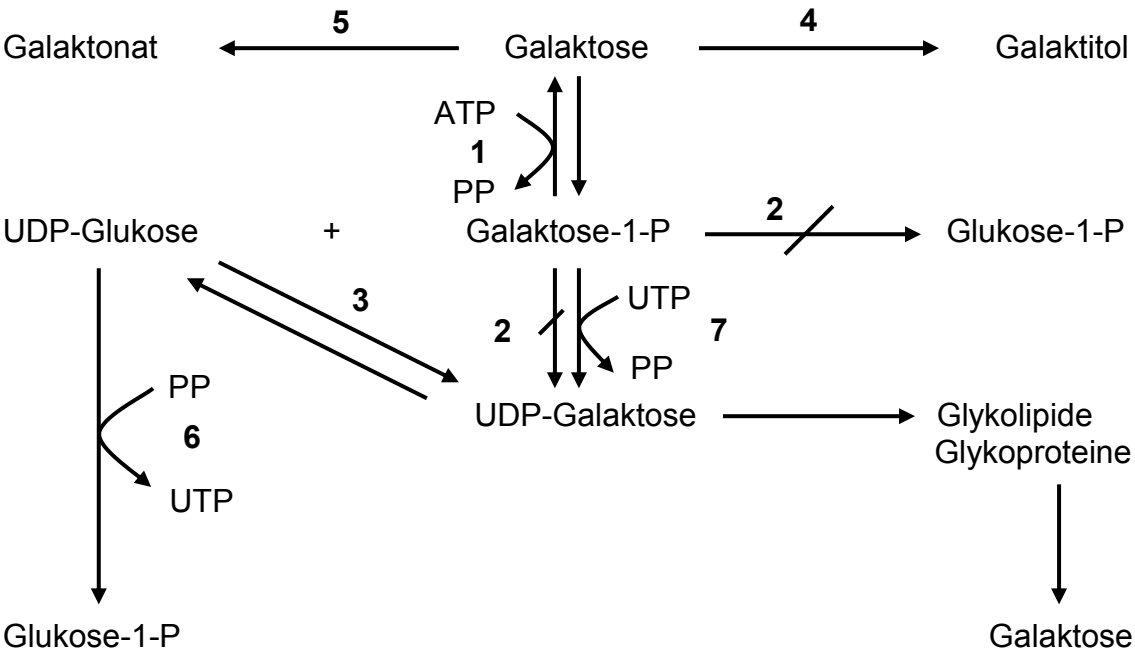
Ery	Erythrozyten
FRE	Fraktionelle renale Exkretion
GALE	UDP-Galaktose-4-Epimerase
GALK	Galaktokinase
GALT	Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase
Gal-1-P	Galaktose-1-Phosphat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GLUT	Glukose-Transporter
Hb	Hämoglobin
IEF	Isoelektrische Fokussierung
MIM	Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerasekettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SGLT	Sodium dependent Glucose Transporter
TR	Tubuläre Reabsorption

1 Einleitung

1.1 Galaktose-Stoffwechsel

In der menschlichen Nahrung wird D-Galaktose aus exogenen Quellen hauptsächlich in Form des Disaccharids Laktose aufgenommen. In der Laktose ist Galaktose β-glykosidisch mit Glukose verknüpft. Die β-glykosidische Bindung wird im Dünndarm durch eine in den Mikrovilli lokalisierte β-Glukosidase (Laktase; EC 3.2.1.108) gespalten. Die D-Galaktose wird im Dünndarm resorbiert und anschließend vor allem in der Leber weiter abgebaut.
Laktose kommt hauptsächlich in Milch und Milchprodukten vor. In 100 g Kuhmilch sind etwa 2.5 g D-Galaktose, in Muttermilch sogar 3.5 g enthalten (Hanus et al., 1992; Kunz et al., 1999). Die Aufnahme sowohl von freier als auch glykosidisch gebundener D-Galaktose erfolgt jedoch auch durch den Genuss von Getreide und Gemüse sowie von Fleisch (Acosta & Gross, 1995).
Neuere Untersuchungen von Berry et al. (2004) und Schadewaldt et al. (2004) bestätigten die Vermutung von Gitzelmann & Steinmann, dass auch endogen relevante Mengen an D-Galaktose gebildet werden (Gitzelmann & Steinmann, 1984).

Die Elimination freier D-Galaktose erfolgt in erster Linie über den so genannten Leloir-Stoffwechselweg (Leloir, 1951; vgl. Abbildung 1).
Die D-Galaktose wird zunächst durch das Enzym Galaktokinase (GALK, EC 2.7.1.6) unter ATP-Verbrauch zu D-Galaktose-1-Phosphat phosphoryliert. D-Galaktose-1-Phosphat wird durch die D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT; EC 2.7.7.12) mit UDP-Glukose zu D-Glukose-1-Phosphat und UDP-Galaktose umgesetzt.
Alternativ kann die UDP-Galaktose auch aus D-Galaktose-1-Phosphat durch Umsatz mit UTP entstehen. Diese Reaktion wird durch die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) katalysiert (Isselbacher, 1958). Die Kapazität dieses Alternativ-Stoffwechselweges ist jedoch äußerst gering.



Enzyme:
1 Galaktokinase (GALK)
2 Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase (GALT)
3 UDP-Galaktose-4-Epimerase (GALE)
4 Aldose-Reduktase
5 Galaktose-Oxidase/-dehydrogenase
6 UDP-Glukose-Pyrophosphorylase
7 UDP-Galaktose-Pyrophosphorylase

Abbildung 1: Stoffwechsel der D-Galaktose (Segal & Berry, 1995)

Die nukleotidaktivierte D-Galaktose kann zur Galaktosylierung von Proteinen oder Lipiden bei der Synthese von Glykoproteinen bzw. Glykolipiden verwendet werden. Hauptelimininationsweg der exogen zugeführten D-Galaktose ist jedoch die Einschleusung in den Stoffwechsel der D-Glukose. Dazu wird die UDP-Galaktose mit Hilfe der UDP-D-Galaktose-4-Epimerase (GALE, EC 5.1.3.2) reversibel zu UDP-Glukose epimerisiert. Die UDP-Glukose kann entweder direkt für die Glykogen-Synthese verwendet oder aber als Substrat in der GALT-Reaktion eingesetzt werden. Das freigesetzte D-Glukose-1-Phosphat wird schließlich in der Phosphogluko-Mutase-Reaktion (EC 5.4.2.2) in Glukose-6-Phosphat umgewandelt und im Rahmen der Glykolyse weiter abgebaut.

Neben dem Leloir-Stoffwechselweg existieren noch alternative Abbauwege. D-Galaktose kann zu Galaktitol reduziert werden. Galaktitol ist ein Endprodukt, welches nicht weiter verstoffwechselt werden kann und über die Niere ausgeschieden wird (Weinstein & Segal, 1968).
Eine weitere Möglichkeit des Galaktoseabbaus besteht in der Umwandlung von D-Galaktose zu Galaktonat (Cuatrecasas & Segal, 1966; Rancour et al., 1979). Das Galaktonat kann entweder renal ausgeschieden oder über β-Ketogalaktonat weiter zu CO_2 und Xylulose metabolisiert werden. Letzteres wird schließlich im Pentosephosphatzyklus verwertet. Allerdings dürfte dieser Abbauweg beim Menschen nur von sehr untergeordneter Bedeutung sein (Holton et al., 2001).

1.2 Galaktosämie

Die Galaktosämie ist eine angeborene, autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Bei der Erkrankung liegt ein Enzymdefekt im Galaktose-Stoffwechsel vor. Dabei kann eines der drei folgenden Enzyme betroffen sein: Die Galaktokinase (GALK), die D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT) oder die UDP-D-Galaktose-4-Epimerase (GALE).
Im Folgenden wird auf die Charakteristik des Galaktokinase-Mangels und des UDP-D-Galaktose-4-Epimerase-Mangels nur kurz eingegangen, da diese Enzymdefekte nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

Galaktokinase-Mangel

Der Galaktokinase-Mangel (MIM 230200) ist erstmals von Gitzelmann beschrieben worden (Gitzelmann, 1965). Die Angaben zur Inzidenz der Erkrankung variieren sehr stark und liegen im Bereich von 1:40.000 bis 1:1.000.000 (Mayes & Guthrie, 1968; Levy, 1980). Beim Galaktokinase-Mangel führt der enzymatische Block zu einer Konzentrationserhöhung von D-Galaktose und Galaktitol im Blut. Die erhöhten Galaktitol-Konzentrationen führen bei den Patienten häufig schon früh zur Kataraktbildung ("weißer

Schimmel"). Leber- und Nierenschädigungen oder kognitive Einschränkungen sind bei dieser Form der Galaktosämie nicht beobachtet worden. Die Behandlung erfolgt mit einer lebenslangen galaktosearmen Diät. Wird die Diät bereits in den ersten Lebenstagen begonnen, bleibt die Kataraktbildung aus (Gitzelmann, 1976; Bosch et al., 2002).

UDP-D-Galaktose-4-Epimerase-Mangel

Der UDP-D-Galaktose-4-Epimerase-Mangel (MIM 230350) wurde erstmals 1972 beobachtet (Gitzelmann, 1972). Die Inzidenz ist regional sehr unterschiedlich. Sie lag in einer japanischen Screening-Untersuchung bei etwa 1:23.000 (Misumi et al., 1981). Zabransky schätzte die Inzidenz in Deutschland auf 1:135.000 (Zabransky & Zabransky, 2004).

Bei den meisten Patienten liegt ein so genannter peripherer pGALE-Mangel vor, der auf Leukozyten und Erythrozyten beschränkt ist, während in Hautfibroblasten und Lebergewebe eine normale Enzymaktivität gemessen werden kann (Gitzelmann, 1976). Die Konzentration freier D-Galaktose im Plasma ist im Gegensatz zur erhöhten D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentrationen in den Erythrozyten normal (Gitzelmann & Steinmann, 1973). Der klinische Verlauf dieser Patienten ist milde, sie haben meist unspezifische und schwache Symptome und sind in der Regel nicht behandlungsbedürftig (Gitzelmann & Holton, 1980; Gitzelmann, 2000; Holton et al., 2001).

Sehr viel seltener kommt der generalisierte gGALE-Mangel vor, der vermutlich alle Organe betrifft und durch einen sehr schweren Krankheitsverlauf gekennzeichnet ist. Die Patienten leiden bereits kurz nach der Geburt an schweren Symptomen wie rezidivierendem Erbrechen mit Gewichtsverlust, Leberversagen mit Ikterus sowie Galaktosurie. Bisher sind mit einem gGALE-Mangel weltweit lediglich 5 Patienten in zwei Familien asiatischer Herkunft bekannt (Gitzelmann, 2000).

Nach Einleitung einer galaktosefreien Ernährung sistieren die Symptome, langfristig zeigen sich jedoch motorische und kognitive Defizite sowie auch Taubheit bei den betroffenen Patienten (Henderson et al., 1983; Holton et al.,

1980). Vorsorglich wird diesen Patienten 1-2 g D-Galaktose pro Tag mit der Nahrung zugeführt, um möglichen Defiziten an UDP-D-Galaktose bei der Synthese von Glykoproteinen und Glykolipiden vorzubeugen.

D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel

Als klassische Form der Galaktosämie wird der Mangel an D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase bezeichnet (MIM 230400). Der GALT-Mangel ist der häufigste Enzym-Defekt im Leloir-Stoffwechselweg und kommt weltweit mit einer Inzidenz von ca. 1:70.000 vor. In der Bundesrepublik tritt die klassische Form der Galaktosämie mit einer Häufigkeit von ca. 1:40.000 auf (Schweitzer-Krantz, 2003). Die Erstbeschreibung erfolgte bereits 1908 durch von Reuss. Die nächsten Fallbeschreibungen veröffentlichten Goppert im Jahr 1917 sowie Mason & Turner im Jahr 1935 (von Reuss, 1908; Goppert, 1917; Mason & Turner, 1935). Die Beschreibung der Ursache der Erkrankung erfolgte schließlich in den 50er Jahren durch Isselbacher (Isselbacher et al., 1956).
Das GALT-Gen ist seit 1991 bekannt und befindet sich auf dem Chromosom 9 an der Stelle p13 (Reichardt & Woo, 1991). Es besteht aus 11 Exons und 10 Introns (Leslie et al., 1992). Die Enzymaktivität der Patienten mit klassischer Galaktosämie, die in den Erythrozyten gemessen wird, ist typischerweise auf <2 % der Norm reduziert.

Klinik

Klinisch fallen Neugeborene mit einem GALT-Mangel durch schwere Krankheitssymptome nach Gabe von (Mutter-)Milch auf. Die Kinder nehmen rapide an Gewicht ab und leiden an rezidivierendem Erbrechen. Bereits in den ersten Lebenstagen zeigt sich ein toxisches Krankheitsbild: Die Kinder leiden an schwerer Leberfunktionsstörung mit Ikterus sowie an Nierenversagen. Die Ausbildung eines Hirnödems ist ebenfalls im Rahmen der akuten Krankheitsphase möglich. Als Ursache der Organschädigungen wird die schnelle Akkumulation von D-Galaktose-1-Phosphat und Galaktitol diskutiert (Belman et al., 1986; Holton et al., 2001).

Fast alle Patienten entwickeln in der akuten Krankheitsphase einen Katarakt, der auf eine hohe Aldose-Reduktase-Aktivität (EC 1.1.1.21) der Augenlinse und die konsekutive Akkumulation von Galaktitol zurückgeführt wird (van Heyningen, 1959).
Unbehandelt ist die Akutphase der Erkrankung aufgrund der Akkumulation der toxischen Metabolite Galaktose-1-Phosphat und Galaktitol lebensbedrohlich und kann rasch zum Tode führen. Wird jedoch unmittelbar nach der Diagnosestellung eine laktosefreie und weitgehend galaktosearme Diät begonnen, so sind die Leber- und Nierenfunktionsstörungen reversibel. Auch die Katarakt-Bildung ist weitgehend reversibel.
Eine schnelle Diagnosestellung ist aufgrund der Schwere der akuten Krankheitsphase mit potentiell tödlichem Ausgang von großer Bedeutung (Schweitzer, 1995). In Deutschland ist daher seit 1978 die Untersuchung der Neugeborenen auf Galaktosämie im Rahmen des Neonatalscreenings gesetzlich vorgeschrieben.

Auch bei diätetisch adäquat behandelten Patienten können dennoch langfristig Einschränkungen kognitiver und psychomotorischer Fähigkeiten auftreten. Der Zeitpunkt des Therapiebeginns ist hierbei, entgegen früherer Annahmen, nicht von Bedeutung (Schweitzer-Krantz, 2003).
Die irreversible Schädigung der Eierstöcke, die bei etwa 90% der Frauen mit klassischer Galaktosämie auftritt und die zu einem hypergonadotropen Hypogonadismus führt, ist unabhängig vom Beginn und der strikten Einhaltung einer galaktosearmen Diät. Patientinnen sind primär infertil. Der Pathomechanismus der Störung bei weiblichen Patientinnen ist bisher nicht geklärt. Die Akkumulation von D-Galaktose-1-Phosphat und anderen toxischen D-Galaktosemetaboliten wird auch in diesem Zusammenhang diskutiert. Männliche Patienten mit Galaktosämie zeigen keinerlei gonadale Dysfunktion (Kaufman et al., 1981; Kaufman et al., 1988).

Zur Kontrolle der Stoffwechseleinstellung bei Patienten mit Galaktosämie wird üblicherweise der Gehalt an D-Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten bestimmt.

Trotz strenger Diäteinhaltung persistieren jedoch deutlich erhöhte Metabolitspiegel. Es wurde vermutet, dass dies auf eine endogene Bildung von Galaktose z.B. im Rahmen des Abbaus von Glykoproteinen und -Lipiden zurückzuführen sein könnte. In der Literatur ist dazu bisher nur wenig publiziert. Eine altersabhängige, wachstumsabhängige endogene Galaktose-Bildung konnte jedoch schließlich durch *in vivo* Studien nachgewiesen und quantifiziert werden. Bei Patienten mit klassischer Galaktosämie wurden beträchtliche Mengen an Galaktose endogen gebildet, dabei war die auf das Körpergewicht bezogene Galaktose-Freisetzungsrate bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen um ein Vielfaches erhöht (Berry et al., 2004; Schadewaldt et al., 2004).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war, die Charakteristik der renalen Ausscheidung von Galaktose und ihren Metaboliten Galaktitol und Galaktonat bei Patienten mit klassischer Galaktosämie im Vergleich zu einem gesunden Kontroll-Kollektiv näher zu untersuchen. Hierzu wurden die renale Metabolit-Clearance, sowie die fraktionelle renale Exkretion und tubuläre Reabsorption von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat berechnet. Anhand der Ergebnisse konnte abgeschätzt werden, ob eine Reabsorption und möglicherweise eine Sekretion von Galaktose und ihren Metaboliten Galaktitol und Galaktonat in der Niere stattfindet.

Einen speziellen Aspekt stellte die Altersabhängigkeit der Metabolit-Ausscheidung dar. Zum Zeitpunkt der Probennahme war bereits bekannt, dass eine Altersabhängigkeit der Metabolit-Ausscheidung bei Patienten und auch bei Gesunden besteht. Nicht bekannt war jedoch, ob die erhöhten Urin-Konzentrationen bei Kleinkindern im Vergleich zu Erwachsenen auf altersbedingte Unterschiede in der Nierenfunktion zurückzuführen waren.

Zusätzlich zu den beiden o.g. Untersuchungsgruppen wurden vergleichend obligat heterozygote Eltern von Patienten mit klassischer Galaktosämie sowie eine Gruppe von Patienten mit varianten Formen der Galaktosämie untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Probanden

An der Studie nahmen Patienten mit diätetisch behandelter klassischer Galaktosämie (*n*=44), eine Gruppe von Varianten mit milderen Formen der Galaktosämie (*n*=9), phänotypisch gesunde heterozygote Probanden (*n*=44) und eine gesunde Kontrollgruppe (*n*=36) teil. Charakteristische anthropometrische Daten sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Für alle Patienten und Probanden geltende Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie waren die freiwillige Teilnahme und ein schriftliches Einverständnis nach entsprechender Aufklärung.

Allgemeine Ausschlusskriterien waren das Vorhandensein von akuten oder chronischen Erkrankungen (mit Ausnahme des Mangels an Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase).

Patienten

Neben den allgemeinen o.g. Einschlusskriterien war ein weiteres Einschlusskriterium für die Untersuchungsgruppe "Klassische Galaktosämie“ eine GALT-Aktivität in den Erythrozyten von <2% der Norm (<0.5 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1}).

Patienten, bei denen eine milde Form der Galaktosämie mit einer Enzymaktivität von >2 bzw. <25% (>0.5 bzw. <5 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1}) gemessen werden konnte, wurden gesondert betrachtet und als Patienten mit "varianter Galaktosämie" bezeichnet.

Die Genotypen waren bei der Auswahl der Patienten nicht von Bedeutung. Sie wurden jedoch zur Charakterisierung der Patienten mitbestimmt.

Tabelle 1: Anthropometrische Daten der Patienten und Probanden [a,b]

Untersuchungsgruppe		Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)
klassische Galaktosämie	gesamt *n*=44	17 ± 10 (16; 2 – 39)	151 ± 26 (160; 89 – 189)	45 ± 20 (52; 12 – 77)
	♂ *n*=20	16 ± 9 (14; 2 – 38)	155 ± 28 (168; 89 – 189)	49 ± 22 (52; 12 – 77)
	♀ *n*=24	19 ± 10 (18; 4 – 39)	148 ± 23 (158; 98 – 172)	43 ± 18 (51; 13 – 65)
variante Galaktosämie	gesamt *n*=9	17 ± 12 (13; 8 – 40)	155 ± 18 (157; 131 – 181)	46 ± 18 (48; 26 – 78)
	♂ *n*=5	17 ± 13 (12; 8 – 40)	148 ± 21 (148; 131 – 181)	43 ± 22 (41; 26 – 78)
	♀ *n*=4	18 ± 11 (14; 12 – 34)	163 ± 10 (164; 152 – 173)	50 ± 12 (49; 37 – 67)
heterozygote Probanden	gesamt *n*=44	45 ± 9 (43; 29 – 74)	171 ± 9 (171; 153 – 194)	76 ± 19 (72; 52 – 120)
	♂ *n*=19	46 ± 7 (44; 38 – 59)	179 ± 6 (178; 170 – 194)	88 ± 18 (83; 67 – 120)
	♀ *n*=25	44 ± 10 (43; 29 – 74)	165 ± 7 (165; 153 – 175)	67 ± 16 (65; 52 – 112)
gesunde Probanden	gesamt *n*=36	28 ± 9 (25; 18 – 58)	176 ± 9 (176; 154 – 193)	69 ± 13 66; 47 – 108)
	♂ *n*=23	29 ± 10 (26; 18 – 58)	179 ± 7 (178; 168– 193)	74 ± 13 (71; 52 – 108)
	♀ *n*=13	28 ± 7 (25; 23 – 49)	172 ± 9 (172; 154 – 187)	61 ± 9 (62; 47 – 78)

[a] Gruppenzuordnung anhand der GALT-Aktivität in den Erythrozyten in µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1}:
klassische Galaktosämie: GALT <0.5
variante Galaktosämie: GALT >0.5 bis <5
heterozygote Probanden: GALT 9 -17
gesunde Probanden: GALT >20

[b] Die Werte sind angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung, Median und Bereich in Klammern

Probanden

Zu den phänotypisch gesunden Probanden der Studie zählten die Gruppe der Heterozygoten sowie eine Gruppe von gesunden Normalpersonen.

Das Einschlusskriterium für die Heterozygoten war eine auf ca. 50% der Norm reduzierte GALT-Aktivität (im Mittel 12 ± 2 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1}). Die Gruppe setzte sich aus Eltern der Galaktosämie-Patienten zusammen.

Einschlusskriterium für das gesunde Kontroll-Kollektiv war eine GALT-Aktivität in den Erythrozyten von >20 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1}.
Das Kollektiv bestand im Wesentlichen aus Mitarbeitern und Studenten des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Die Studie wurde durch das Ethikkomitee der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und genehmigt.

2.2 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in der höchsten Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Ionenaustauscher-Harze (Dowex 50WX8, H^+-Form, 100-200 mesh und Dowex 1X8, Cl^--Form, 200-400 mesh) wurden von Serva (Heidelberg) bezogen. Alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1, aus Kalbsdarm), ß-D-Galaktose-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.48, aus Pseudomonas fluorescens), HpaII (aus Haemophilus parainfluenzae, 10 U/7µL), Ava II (aus Anabeana varabilis, 5 U/µL) und DNA-Längenstandard VIII (0.25 µg/µL) wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) und die Taq-DNA-Polymerase (aus Thermus aquaticus, rekombinant, E.coli, 5 U/µL)) von Qiagen (Hilden) bezogen. Die synthetischen Oligonukleotide waren von MWG-Biotech (Ebersberg). D-Galaktose-1-Phosphat (Dikaliumsalz) und UDP-Glukose (Dinatriumsalz) waren von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen), das UDP-[U-^{14}C]-Galaktose-1-

Phosphat (11 Gbq/mmol) wurde über die Firma Biotrend (Köln) bezogen. D-[1-^{13}C]-Galaktose (97% 1-^{13}C; 3% natürlich markiert) und D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose-Standard (98.5% U-^{13}C; 1% natürlich markiert) kamen von Promochem (Wesel). ^{13}C-markiertes Galaktitol war nicht käuflich zu erwerben. Daher wurde das D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktitol aus D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose durch Reduktion mit $NaBH_4$ nach der Methode von Jakobs synthetisiert (Jakobs et al., 1984). Die Reinheit des Produkts wurde mittels GC-MS-Analyse überprüft. Die D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktitol-Präparation war rein (98.5% U-$^{13}C_6$) und enthielt weniger als 0.2% nicht umgesetzte D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose.

Da Galaktonolakton ebenfalls nicht käuflich zu erwerben war, wurde D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktono-1,4-Lacton nach Dahlqvist hergestellt (Dahlqvist A, 1983). D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose (10 mg) wurde in Tris/HCl-Puffer (1.8 mL, 0.25 mol/L, pH 8.7) gelöst. Dann wurde NAD^+ (70 mg) und β-D-Galaktose-Dehydrogenase (1.5 U, 60 µL) zugegeben und bei 25°C 10 h inkubiert. Zur Bildung des γ-Lactons wurde der Ansatz mit HCl (6 mol/L, 0.15 mL) angesäuert, bei 25°C über Nacht inkubiert und anschließend das D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktono-1,4-Lacton durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung des γ-Laktons wurde mittels inverser Isotopen-Verdünnung mit natürlich markiertem D-Galaktono-1,4-Lakton bestimmt. Die Ausbeute an U-^{13}C-markiertem γ-Lakton war 45%. Bei der Reinheitsprüfung mittels GC-MS wurde eine [U-$^{13}C_6$]-Anreicherung von 98.5% und weniger als 0.2% D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose gefunden.

2.3 Methoden

2.3.1 Probennahme

Die Probengewinnung bei den Galaktosämie-Patienten fand während einer *in vivo*-Stoffwechseluntersuchung zur endogenen Galaktose-Bildung oder anlässlich der halb- bzw. jährlichen Stoffwechsel-Kontroll-Untersuchung in der Düsseldorfer Universitäts-Kinderklinik statt.
Das Kollektiv der heterozygoten Probanden setzte sich hauptsächlich aus Eltern der Patienten zusammen, die sich im Rahmen der Untersuchung ihrer Kinder zu einer Blutabnahme und zur Urinabgabe bereit erklärten.
Alle Teilnehmer waren zum Zeitpunkt der Probennahme nüchtern (>10-stündiges Übernachtfasten).

Bei der Probennahme wurde venöses EDTA-Blut entnommen und unmittelbar anschließend Spontanurin gesammelt.
Das EDTA-Blut wurde sofort nach der Entnahme zentrifugiert (3500 x g, 5 min, 4°C) und die Zellen vom Plasma getrennt. Den Erythrozyten wurde anschließend ein äquivalentes Volumen physiologischer NaCl-Lösung zugefügt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal zur Reinigung der Erythrozyten von Plasma-Resten wiederholt.
Erythrozyten, Plasma und Urin wurden bis zur Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Zur Analyse genetischer Varianten wurde ein Aliquot EDTA-Blut asserviert und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -20°C eingefroren.

2.3.2 Analytik der Galaktosemetabolite

Im Plasma und Urin aller Studienteilnehmer wurden die Konzentration von Galaktose, Galaktitol und Kreatinin bestimmt. In den Erythrozyten wurde die Galaktose-1-Phosphat-Konzentration gemessen und die GALT-Aktivität bestimmt.

Bei den Patienten mit klassischer Galaktosämie wurde zusätzlich im Plasma und im Urin die Konzentration von Galaktonat gemessen.

2.3.2.1 Probenvorbereitung und Extraktion

Urin

Der Testansatz zur Metabolitbestimmung im Urin der Patienten enthielt 20 µL Urin verdünnt mit H_2O (80 µL). Der Testansatz für heterozygote und gesunde Probanden enthielt 100 µL unverdünnten Urin.

Zu allen Proben wurden HCl (6 mol/L; 30 µL) sowie zur internen Standardisierung D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose (50 µmol/L, 20 µL), D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktitol (50 µmol/L, 100 µL) und D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktonat (25 µmol/L, 20 µL) hinzugefügt. Die Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und es erfolgte die Cyclisierung von Galaktonat zu γ-Galaktonolakton. Anschließend wurde 700 µL H_2O hinzugefügt. Die Probe wurde durch Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie aufgereinigt und dabei 1000 µL Eluat gewonnen (siehe Kapitel 2.3.2.2).

Zwei Aliquots mit jeweils 500 µL Eluat wurden im N_2-Strom zur Trocknung eingedampft. Ein Aliquot wurde zu Bestimmung der Galaktose und des Galaktitols, das zweite Aliquot zur Bestimmung des Galaktonats weiter verwendet. Die Unterschiede in der nachfolgenden chemischen Derivatisierung für die zwei Aliquots sind in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben.

Plasma

Zur internen Standardisierung wurden 1:2 mit H_2O verdünnte Plasmaproben (1000 µL) der Patienten bzw. unverdünnte Plasmaproben der Heterozygoten und der gesunden Kontrollgruppe mit D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose (50 µmol/L, 20 µL) und D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktitol (50 µmol/L, 20 µL) versetzt. H_2O (210 µL) und $HClO_4$ (20%, v:v; 250 µL) wurden hinzugefügt und ergaben ein Gesamtvolumen von 1500 µL. Nach Zentrifugation (13 000 x g; 10 min; 4°C) wurden 1200 µL des Überstandes mit $KHCO_3$ (2.5 mol/L; 200 µL) und Kaliumphosphatpuffer

K_2HPO_4/H_3PO_4 (2.5 mol/L; pH 6.5; 100 µL) gemischt und ausgefallenes $KClO_4$ durch Zentrifugation (13 000 x g; 2 min; 4°C) entfernt. Zur Entfernung der D-Glukose aus den Proben wurden zu 1300 µL des Überstandes D-Glukose-Oxidase (10-15 U in 50 µL; 50 µL) und Katalase (65 kU in 50 µL; 50 µL) gegeben und der Ansatz wurde - mit Luft equilibriert - 90 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $HClO_4$ (30%; v:v; 150 µL) gestoppt und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation (13 000 x g; 2 min; 4°C) entfernt. Zu 1400 µL des Überstandes wurde $KHCO_3$ (2.5 mol/L; 250 µL) gegeben und ausgefallenes $KClO_4$ durch eine weitere Zentrifugation (13 000 x g; 1 min; 4°C) entfernt. 1500 µL Überstand wurden wie in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben aufgereinigt und anschließend derivatisiert.

Für die Bestimmung von Galaktonat im Patienten-Plasma wurden 500 µL Plasma mit 730 µL H_2O verdünnt und die Probe mit D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktonolakton (0.25 mmol/L, 20 µL) versetzt. Nach Hinzugabe von 250 µL $HClO_4$ (1.83 mol/L) ergab sich ein Gesamtvolumen von 1500 µL. Nach Zentrifugation (10 000 x g; 3 min; Raumtemperatur) wurden 1200 µL des Überstandes mit $KHCO_3$ (2.5 mol/L; 225 µL) gemischt. Nach Zugabe von KOH (1 mol/L; 50 µL) wurde die Probe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ausgefallenes $KClO_4$ durch Zentrifugation (10 000 x g; 1 min; Raumtemperatur) entfernt. Anschließend wurde die Probe wie in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben aufgereinigt und derivatisiert.

Erythrozyten

Bei Patienten, Heterozygoten und gesunden Probanden wurden gepackte Erythrozyten mit dem gleichen Volumen physiologischer NaCl-Lösung (0.9%) suspendiert. Zur internen Standardisierung wurden 100 µL der Erythrozytensuspension mit D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose (50 µmol/L, 20 µL) und D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktitol (50 µmol/L, 10 µL) versetzt und 2 min im Ultraschallbad behandelt. Tris/HCl-Puffer (0.4 mol/L; pH 8.6; 500 µL) wurde hinzugefügt, anschließend wurden die Proben zur Enteiweißung erhitzt (85°C; 5 min), auf

Raumtemperatur abgekühlt und der Überstand durch Zentrifugation (13 000 x g; 5 min; 4°C) gewonnen.
Zur Hydrolyse des Galaktose-1-Phosphats wurde der gewonnene Extrakt (500 µL) mit $MgSO_4$-Lösung (5 mmol/L; 50 µL) und alkalischer Phosphatase (50 kU/L; 1:3 verdünnt mit H_2O; 10 µL) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 300 µL H_2O hinzugefügt und die Proben aufgereinigt und anschließend derivatisiert (siehe Kapitel 2.3.2.2).

Zur Bestimmung der freien Galaktose wurden Parallelproben mitgeführt, deren Ansatz 50 µL D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose (50 µmol/L) enthielt und bei denen im Unterschied zu o.g. Proben zur Galaktose-1-Phosphat-Bestimmung lediglich der Hydrolyseschritt mit alkalischer Phosphatase nicht durchgeführt wurde.

2.3.2.2 Aufreinigung und Derivatisierung

Aufreinigung

Zur Aufreinigung erfolgte die Behandlung mit Anionen- und Kationenaustauscherharzen. Hierfür wurde der jeweilige Extrakt aus der Urin-, Plasma- und Erythrozyten-Aufarbeitung zunächst auf eine Dowex 1X8-Säule (200-400 mesh, Acetatform, 4 mL in konischen Poly-Prep-Einmal-Chromatographiesäulchen, Fa. Bio-Rad, München) gegeben und mit 250 µL H_2O nachgespült. Die Eluate wurden verworfen. Die D-Galaktose bzw. das D-Galaktitol wurden anschließend mit 2000 µL H_20 eluiert. Dieses Eluat wurde auf eine Dowex 50WX8-Säule (100-200 mesh, H^+-Form; 4 mL, Säule wie oben) aufgetragen und das Eluat verworfen. Danach wurde erneut mit 2000 µL H_20 eluiert. Das Eluat wurde gesammelt und ein Aliquot von 1000 µL im Reactivial (1000 µL, Pierce) bei Raumtemperatur im N_2-Strom zur Trocknung eingedampft.

Aufreinigung der Plasma-Galaktonat-Probe

Zur Aufreinigung wurde die Probe zur Bestimmung von Galaktonat im Plasma auf eine Anionenaustauschersäule (Dowex 1X8-Säule, 200-400 mesh, Chloridform, 2 mL in konischen Säulenkartuschen "Bio-Prep", Fa. Bio-Rad, München) gegeben und dreimal mit 3 mL H_2O nachgespült und das Eluat verworfen. Es wurden weiterhin 0.5 mL HCl (0.5 mol/L) aufgetragen und das Eluat ebenfalls verworfen. Das Galaktonat wurde mit 1 mL HCl (0.5 mol/L) eluiert und die Probe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Eluat wurde auf eine Kationenaustauschsäule Dowex 50WX8-Säule (100-200 mesh, H^+-Form; 2 mL, Säule wie oben) aufgetragen und mit 1 mL H_2O das Eluat gewonnen. Ein Aliquot von 400 µL des Eluats wurde zur Derivatisierung im Reactivial (1000 µL, Pierce) bei Raumtemperatur im N_2-Strom zur Trocknung eingedampft.

Derivatisierung zur Bestimmung von Galaktose und Galaktitol

Zur Darstellung des Aldononitril-Pentaacetat-Derivats der Galaktose und des peracetylierten Derivats des Galaktitols wurde der trockene Rückstand aus dem Arbeitsschritt der Aufreinigung (s.o.) mit Hydroxylamin-Hydrochlorid (0.3 mol/L in Pyridin; 50 µL) 30 min bei 90°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde 50 µL Essigsäureanhydrid zugesetzt und der Ansatz erneut 60 min bei 90°C inkubiert. Nach Acetylierung von Galaktose und Galaktitol wurden die Proben wiederum abgekühlt und bei Raumtemperatur im N_2-Strom zur Trocknung eingedampft. Der trockene Rückstand wurde mit 200 µL Hexan extrahiert. Der Extrakt wurde in einen konischen Mikroeinsatz (200 µL; Fa. Welabo, Düsseldorf) überführt und nochmals eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 µL Ethylacetat gelöst und dann zur GC-MS-Analyse verwendet.

Derivatisierung zur Bestimmung von Galaktonat

Zur Galaktonat-Bestimmung wurden dem trockenen Rückstand der Aliquots Butylamin/Pyridin (1/1; v/v; 100 µL) hinzugefügt und 30 min bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit N_2

eingedampft und anschließend mit Essigsäureanhydrid/Pyridin (1/1; v/v; 100 µL) 60 min bei 90°C inkubiert. Dabei wird N-(1-butyl)-Galaktonamid-Pentaacetat als Derivat gebildet. Nach erneutem Abkühlen wurden die Proben mit N_2 eingedampft und der trockene Rückstand wie oben mit Hexan extrahiert und gelöst in Ethylacetat für die GC-MS-Analyse verwendet.

2.3.2.3 GC-MS-Analytik

Zur Analyse wurde ein HP-6890-Gaschromatograph mit einer HP-5 MS-Kapillarsäule (5% Phenylmethylpolysiloxan; Länge 30 m, i.d. 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm; J&W Scientific, Folrom, CA) verwendet, die direkt an ein HP MSD-Massenspektrometer angeschlossen war (Hewlett-Packard, Waldbronn). Als Trägergas wurde Helium verwendet (0.9 mL x min^{-1}). 1 µL der Probe wurde injiziert. Der Injektor und dessen Verbindung zum Spektrometer wurden auf 250°C erwärmt. Die Anfangstemperatur der Kapillarsäule betrug 125°C. Nach 1.5 min erfolgte eine Temperaturerhöhung von 20°C/min auf 190°C und weiter mit 2.5°C/min auf 215°C. Anschließend wurde die Temperatur für 2 min auf 280°C angehoben. Die massenspektrometrische Detektion wurde mittels positiver chemischer Ionisierung mit Methan als Reaktandgas durchgeführt. Die Ionenquelle wurde bei 170°C und bei einem Druck von 60 mPa betrieben. Zum selektiven Ionen-Monitoring der $[MH-60]^+$-Ionen wurden die Intensitäten bei m/z 328, m/z 329 und m/z 334 gemessen, das entsprach den chromatographischen Peaks von 1-^{12}C-, 1-^{13}C und U-$^{13}C_6$-markierter Galaktose. Die entsprechenden chromatographischen Peaks der 1-^{12}C-, 1-^{13}C und U-$^{13}C_6$-markierten Galaktitol- bzw. Galaktonatspezies wurden bei m/z 375, m/z 376 und m/z 381, bzw. bei m/z 402, m/z 403 und m/z 408 analysiert.

2.3.3 Messung der Enzymaktivität

Die Messung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität in den Erythrozyten wurde nach Shin mit einigen Modifikationen bestimmt (Shin, 1991).
Das Prinzip des Nachweises ist die Bildung von UDP-[U-^{14}C]-Galaktose aus D-[U-^{14}C]-Galaktose-1-Phosphat nach folgender Reaktionsgleichung:

$$\text{UDP-Glukose} + \text{D-[U-}^{14}\text{C]-Galaktose-1-Phosphat} \xrightarrow{\text{GALT}} \text{UDP-[U-}^{14}\text{C]-Galaktose} + \text{D-Glukose-1-Phosphat}$$

Gepackte Erythrozyten wurden 1:8 mit H_20 verdünnt. 50 µL des Hämolysates wurden 1 min bei 25°C im Ultraschallbad behandelt, mit 50 µL GALT-Bestimmungspuffer gemischt und 40 min bei 32°C inkubiert. Der GALT-Bestimmungspuffer enthielt folgende Komponenten:

Glycin/NaOH-Puffer	(500 mmol/L, pH 8.7)
Cystein/HCl-Puffer	(40 mmol/L, pH 8.7)
D-Galaktose-1-Phosphat	(5 mmol/L)
D-[U-^{14}C]-Galaktose-1-Phosphat	(1 mCi/L)
UDP-Glukose	(2.5 mmol/L)

Zur Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze 4 min im Wasserbad gekocht. Danach wurde abgekühlt und zentrifugiert (13 000 x g, 5 min, 4°C). 70 µL Überstand wurde auf eine Dowex 1X8-Säule (200-400 mesh, Cl^--Form, 0.3 mL in Einmal-Filtersäulen; Mallinckrodt Baker, Griesheim) gegeben. Das nicht umgesetzte D-[U-^{14}C]-Galaktose-1-Phosphat wurde durch Waschen mit 3 mL HCl (25 mmol/L) entfernt. Die UDP-[U-^{14}C]-Galaktose wurde mit 1.6 mL HCl (500 mmol/L) in Szintillationsgefäße (Zinsser, Frankfurt) eluiert. Das Eluat wurde im Verhältnis 1:10 mit Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A; Zinsser, Frankfurt) gemischt. In einem Flüssigkeitsszintillationszähler (LS 6000; Beckmann, München) wurde dann die Radioaktivität gemessen.

Als Leerwerte wurden Hämolysatproben verwendet, die vor Zugabe des GALT-Bestimmungspuffers 4 min im Wasserbad gekocht worden waren. Als Kontroll-Proben wurden Hämolysate zweier gesunder Erwachsener mitgeführt.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{(\text{DPM in Probe} - \text{DPM in Leerwert}) \times (\frac{100\,\mu L}{70\,\mu L}) \times \text{Gal-1-P in } 50\,\mu L\,(0.25\,\mu mol)}{(\text{DPM in } 50\,\mu L\ \text{GALT-Bestimmungspuffer} \times \text{Inkubationszeit (h)} \times \text{Hb (g in } 12.5\,\mu l\ \text{Erys})}$$

A: Enzymaktivität in µmol/h pro g Hb
DPM: gemessene Radioaktivität in Zerfälle pro min

Die Methode zur Bestimmung des Hämoglobin-Gehaltes wird in Kapitel 2.3.5 erläutert.

2.3.4 Mutationsanalyse

Für die Analyse der genetischen Varianten wurde das Verfahren von Elsas angewandt (Elsas et al., 1995). Die Mutationen g.1466A>G(*p.Q188R*) in Exon 6 und g.2741A>G(*p.N314D*) in Exon 10 führen zu einer Schnittstelle für die Restriktionsenzyme HpaII bzw. Ava II. Beide genetische Varianten können durch PCR-Amplifikation des Exons 6 bzw. 10 und Analyse der RFLP nachgewiesen werden. Aufgrund der Häufigkeit beider genetischen Varianten wurden alle Patienten zuerst auf diese zwei Mutationen mit der PCR/RFLP-Methode untersucht. Der Nachweis erfolgte über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese.
Konnten die genetische Varianten mittels PCR/RFLP nicht nachgewiesen werden, so wurden alle 11 Exone des GALT-Gens mittels PCR vervielfältigt und durch direkte Sequenzierung die entsprechenden Mutationen charakterisiert.

Eine ausführliche Darstellung der angewandten Verfahren ist in der Inauguraldissertation von L. Kamalanathan beschrieben (Kamalanathan, 2005). Die Analysen der genetischen Varianten wurden in enger kollegialer Zusammenarbeit mit L. Kamalanathan durchgeführt.

2.3.5 Sonstige Analyseverfahren

Kreatinin in Urin und Plasma wurde enzymatisch mit einem Hitachi 912 Analysegerät (Boehringer, Mannheim) bestimmt (Wahlefeld & Siedel, 1985).
Hämoglobin wurde mittels der Cyanmethämoglobin-Methode in einem KX-21 Analysator (Sysmex, Hamburg) gemessen.

2.4 Auswertung und Statistik

2.4.1 Berechnungen

Konzentrationen

Die Konzentrationen (C_{nat}, µmol/L) an natürlich markierter D-Galaktose, D-Galaktitol und D-Galaktonat in den Plasma- und Urin-Proben, die mit D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktose, D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktitol und D-[U-$^{13}C_6$]-Galaktonat zur internen Standardisierung versetzt wurden, wurden wie folgt berechnet:

$$C_{nat} = [R_1 \; x \; F_1 \; x \; (0.985 \; x \; S) - (0.015 \; x \; S)] \; x \; D \qquad (1)$$

R_1 steht für die Ratio der Ionen-Intensitätsrate in den chromatographischen Galaktose-Peaks (m/z 328) / (m/z 334), den Galaktitol-Peaks (m/z 375) / (m/z 381) bzw. den Galaktonat-Peaks (m/z 402) / (m/z 408). F_1 stellt einen Korrekturfaktor für die höheren Ionen-Intensitäten der U-$^{13}C_6$-markierten Galaktose und der Metabolite Galaktitol und Galaktonat im Vergleich zu den natürlich markierten Formen dar (1.068 für Galaktose und Galaktitol; 1.074 für Galaktonat).

0.985 war der Anteil der U-$^{13}C_6$-markierten Moleküle in den Standards. S steht für die Menge in µL an zugeführtem internen Standard (Galaktose 1 µmol; Galaktitol 5 µmol; Galaktonat 1 µmol) und D für die Verdünnung der Probe (Patienten: Urin D = 5, Plasma D = 2, Erythrozyten D = 2; Gesunde und Heterozygote: keine Verdünnung in Urin und Plasma, in Erythrozyten D = 2).

Renale Clearance

Die Renale Clearance von Galaktose, Galaktitol bzw. Galaktonat (CL_G in ml x min^{-1} x 1.73 m^{-2}) wurden mit Hilfe der Formeln zur Kreatinin-Clearance nach Schwartz sowie Cockroft & Gault ermittelt (Schwartz et al., 1976; Cockcroft & Gault, 1976;):

$$CL_G = CL_{CR} \; x \; 0.01 \; x \; FRE_G \qquad (2)$$

FRE_G steht für die fraktionelle renale Exkretion von Galaktose, Galaktitol oder Galaktonat und wird angegeben in % (siehe Formel Nr. 6). Die Kreatinin-Clearance (CL_{CR}) wurde anhand der unten stehenden Formeln für Kinder unter 15 Jahren (3), männliche (4) und weibliche (5) Patienten und Probanden älter als 15 Jahre in mg/dL abgeschätzt (Schwartz et al., 1976; Cockcroft & Gault, 1976):

$$CL_{CR} = 0.55 \; x \; KL \; / \; CR_P \qquad (3)$$

$$CL_{CR} = (140 - Alter) \; x \; KG \; / \; (72 \; x \; CR_P) \qquad (4)$$

$$CL_{CR} = 0.85 \; x \; (140 - Alter) \; x \; KG \; / \; (72 \; x \; CR_P) \qquad (5)$$

CR_P steht für die Kreatinin-Konzentration im Plasma und wird angegeben in mg/dL, KL steht für die Körperlänge in cm und KG für das Körpergewicht in kg.

Fraktionelle renale Exkretion und tubuläre Reabsorption

Die fraktionelle renale Exkretion stellt den Anteil der in den Nieren glomerulär filtrierten Substanz dar, die mit dem Urin ausgeschieden wird. Die FRE von

Galaktose, Galaktitol und Galaktonat (FRE_G in %) wird nach folgender Formel berechnet (Steiner, 1984):

$$FRE_G = G_U / G_P \; x \; CR_P / CR_U \; x \; 100 \qquad (6)$$

G_U ist die Konzentration von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat im Urin in µmol/L, G_P ist die Konzentration von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat im Plasma in µmol/L. Die Kreatinin-Konzentrationen im Urin und im Plasma (CR_U und CR_P) werden angegeben in mmol/L.

Die tubuläre Reabsorption entspricht dem Anteil der in den Nieren filtrierten Substanz, der von der Niere wieder rückresorbiert wird. Sie wird wie folgt berechnet:

$$TR_G = 1 - FRE_G \qquad (7)$$

Die Einheiten entsprechen den bereits oben genannten zur Berechnung der FRE_G.

2.4.2 Statistik

Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind alle Ergebnisse als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Median und Bereich stehen in Klammern.

Die Signifikanzprüfungen der Mittelwertvergleiche wurden mittels unverbundenem T-Test (Student-Test) bzw. univariater Varianz-Analyse (One-Way-ANOVA) in GraphPad Software Inc., San Diego CA, U.S.A. durchgeführt.

Die Abbildungen wurden mit SigmaPlot 9.0 von Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Biochemisch-molekulargenetische Charakterisierung

Die biochemische Charakterisierung erfolgte bei Patienten und heterozygoten Probanden durch Bestimmung der GALT-Aktivität sowie des Galaktose-1-Phosphat-Gehaltes in Erythrozyten. Im Rahmen der molekulargenetischen Charakterisierung wurde der Genotyp bestimmt.
Bei der gesunden Kontrollgruppe wurden die GALT-Aktivität und der Gehalt an Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten gemessen. Eine Genotypisierung erfolgte aufgrund der normwertigen GALT-Aktivitäten nicht.

3.1.1 Biochemische Charakterisierung

Die GALT-Aktivität sowie die Konzentration des Parameters Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten aller Untersuchungsgruppen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Normalpersonen und heterozygote Probanden
In der Gruppe der gesunden Normalpersonen (*n*=36) ergab sich für die GALT-Aktivität in Erythrozyten ein Mittelwert von 21.9 ± 3.3 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1}, für die Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in Erythrozyten nach Übernachtfasten ein Mittel von 2 ± 1 µmol/L_{Ery}.

Bei heterozygoten Probanden war die GALT-Aktivität in Erythrozyten im Mittel auf 53% der Norm reduziert (11.6 ± 1.9 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1}, *n*=44). Die Konzentration von Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten war wie erwartet normwertig (2 ± 1 µmol/L_{Ery}).

Tabelle 2: Biochemische Charakterisierung der Patienten und Probanden

Untersuchungs-gruppe	GALT-Aktivität (µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1})	GALT-Aktivität (% der Norm) [a]	Galaktose-1-P (µmol/L_{Ery})
klassische Galaktosämie (*n*=44)	**0.2** ± 0.1 (0.2; 0.1 - 0.3)	**0.9** ± 0.2 (0.9; 0.5 - 1.5)	**133** ± 38 (125; 76 - 246)
variante Galaktosämie (*n*=9) [b]			
Patient 1	0.4	2	37
Patient 2	0.7	3	12
Patient 3	0.9	4	6
Patient 4	1.0	5	7
Patient 5	1.8	8	3
Patient 6	2.8	13	n.b. [c]
Patient 7	4.5	21	5
Patient 8	5.0	23	4
Patient 9	5.2	24	n.b. [c]
heterozygote Probanden [d] (*n*=44)	**11.6** ± 1.9 (11; 9 - 17)	**53** ± 9 (52; 19 -78)	**2** ± 1 (2; 1 - 4)
gesunde Probanden (*n*=36)	**21.9** ± 3.3 (22;15 [e] - 28)	**100** ± 15 (100; 69 - 127)	**2** ± 1 (2; 1 - 3)

[a] bezogen auf den Mittelwert der GALT-Aktivität in Erythrozyten bei gesunden Probanden
[b] Aufgrund der Heterogenität der Gruppe Auflistung der einzelnen Patienten.
[c] n.b. = nicht bestimmt
[d] Die Galaktose-1-Phosphat-Konzentrationsbestimmung in Erythrozyten erfolgte bei *n*=29 Heterozygoten
[e] Bei einem Gesunden mit einer GALT-Aktivität in Erythrozyten von ca. 70% der Norm war eine Heterozygotie für den Duarte-D2-Genotyp nicht auszuschließen.

Patienten mit varianter Galaktosämie

Probanden, die eine GALT-Aktivität in den Erythrozyten von mehr als 2% der Norm aufwiesen, wurden als Patienten mit einer varianten Form der klassischen Galaktosämie bezeichnet. Aufgrund der Variabilität der Enzymaktivität (2 - 23% der Norm), ergab sich eine sehr heterogene Gruppe.

Die individuelle Auflistung der Patienten mit varianter Galaktosämie in Tabelle 2 ermöglichte die Betrachtung des Galaktose-1-Phosphat-Gehaltes in Erythrozyten jedes einzelnen Patienten sowie der zugehörigen residualen Enzymaktivität. Der Zusammenhang der beiden Parameter ist in Abbildung 2 dargestellt.

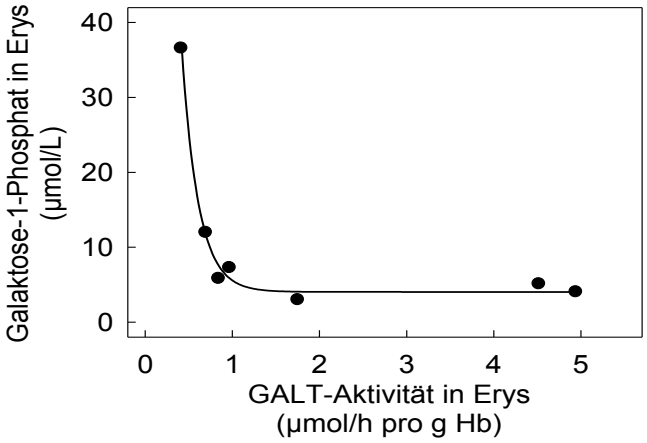


Abbildung 2: Abhängigkeit der Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in Erythrozyten von der GALT-Aktivität in Erythrozyten bei Patienten mit varianter Form der Galaktosämie (*n*=9).

Anpassung der experimentellen Daten an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0+a*\exp(-b*x)$. x = GALT-Aktivität in Erythrozyten, y = Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in Erythrozyten; Durchgezogene Linie: Regressionskurve. $y_0 = 4.0 \pm 0.7$; $a = 296 \pm 80$; $b = 5.2 \pm 0.7$; $R^2 = 0.995$, $p < 0.058$.

Je höher die restliche GALT-Aktivität in den Erythrozyten war, desto niedriger bzw. normnäher war die Konzentration von Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten. Ein normwertiger Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in Erythrozyten konnte bereits ab einer Enzymaktivität von etwa 1 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1} (ca. 5% der Norm) erreicht werden.

Die noch folgenden Ergebnisse und Berechnungen der Urin- und Plasma-Aufarbeitung zeigten, dass eine Gleichsetzung der Patienten mit varianter Galaktosämie aufgrund ihrer unterschiedlichen Enzymaktivitäten weder mit dem Kollektiv der Patienten mit klassischer Galaktosämie, noch mit heterozygoten

Probanden oder Normalpersonen möglich war. Dieses Patienten-Kollektiv wurde daher in der gesamten Arbeit als gesonderte Untersuchungsgruppe betrachtet.

Patienten mit klassischer Galaktosämie

Die Gruppe der Patienten mit der klassischen Form der Galaktosämie unter diätetischer Therapie war bezüglich der GALT-Aktivität in Erythrozyten sehr homogen. Die Enzymaktivität lag bei allen Patienten dieser Untersuchungsgruppe bei <2% der Norm.

Bezüglich der Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in Erythrozyten konnte bei Patienten mit klassischer Galaktosämie erwartungsgemäß eine Altersabhängigkeit bei allerdings beträchtlicher Streuungsbreite beobachtet werden. Aus Abbildung 3 lässt sich ableiten, dass der Stoffwechselparameter Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten bei Neugeborenen gegenüber erwachsenen Patienten im Mittel ca. 2- bis 3-fach erhöht ist.

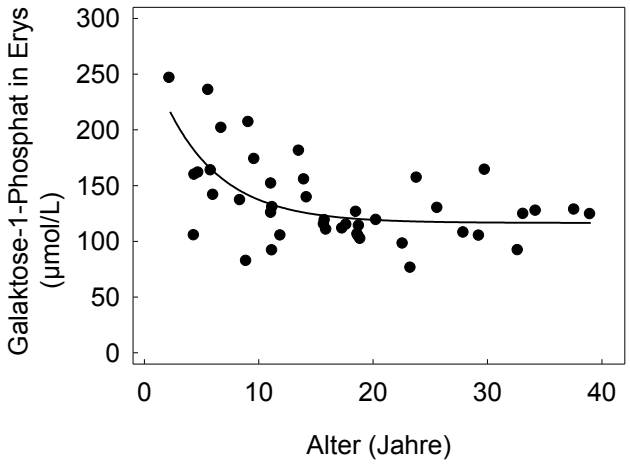


Abbildung 3: Altersabhängigkeit der Galaktose-1-Phosphat Konzentration in den Erythrozyten bei Patienten mit klassischer Galaktosämie unter Diät-Therapie (*n*=44).

Anpassung der experimentellen Daten an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0+a*\exp(-b*x)$. x = Alter, y = Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in Erythrozyten; Durchgezogene Linie: Regressionskurve. $y_0 = 117 \pm 8$; $a = 157 \pm 60$; $b = 0.2 \pm 0.1$; $R^2 = 0.949$, $p < 0.001$.

Zusätzlich zu den galaktosespezifischen Parametern im Blut wurden bei 14 Patienten mit klassischer und varianter Form der Galaktosämie Leberwerte

(GOT, GPT, γGT und AP), Nieren-Retentionswerte (Kreatinin und Harnstoff), Serum-Elektrolyte (Natrium, Kalium, Kalzium, Phosphat und Magnesium) sowie die Gerinnungs-Parameter Quick und pTT überprüft. Alle Ergebnisse waren normwertig. Es ergaben sich aus diesen Laborparametern keine Hinweise auf Elektrolyt-, Nieren- oder Leberfunktionsstörungen.
Eine Aminoazidurie wurde am Beispiel der Aminosäuren L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin, Methionin, Phenylalanin oder Tyrosin bei acht Patienten untersucht und konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

3.1.2 Genotypisierung

Bei allen Patienten sowie bei den heterozygoten Eltern wurden im Rahmen der molekulargenetischen Charakterisierung die Genotypen bestimmt. Es wurden insgesamt 25 verschiedene genetische Varianten im GALT-Gen gefunden.

3.1.2.1 Genetische Varianten und ihre Häufigkeiten

In Tabelle 3 sind die im untersuchten Kollektiv gefundenen 25 Mutationen mit den daraus abgeleiteten Änderungen im GALT-Protein aufgeführt, darunter auch die drei bisher in der Literatur nicht beschriebenen Mutationen g.965A>C(*p.H114P*), g.974T>G(*p.F117C*) und g.2362T>G(*p.S297P*). Im Folgenden wird zur molekulargenetischen Charakterisierung, wie zuvor bereits erwähnt, die Bezeichnung der abgeleiteten Veränderungen auf genomischer DNA sowie auf Proteinebene verwendet.

Tabelle 3: Äquivalenztabelle für die genetischen Varianten im GALT-Gen der untersuchten Patienten und heterozygoten Probanden

Exon	DNA-Ebene [a]	Proteinebene [b]	Aminosäuren-Austausch
2	82G>T	D28Y	Aspartat -Tyrosin
2	397T>A	I32N	Isoleucin - Asparagin
2	415A>C	Q38P	Glutamin - Prolin
2	501C>T	R67C	Arginin - Cystein
3	824_826delAAC	N97del	Asparagin - Deletion
4	965A>C	H114P	Histidin - Prolin
4	974T>G	F117C	Phenylalanin - Cystein
5	1163C>T	T138M	Threonin - Methionin
5	1175T>A	M142K	Methionin - Lysin
5	1192C>T	R148W	Arginin - Tryptophan
5	1202T>C	V151A	Valin - Alanin
6	1466A>G	Q188R	Glutamin - Arginin
7	1649T>C	L195P	Leucin - Prolin
8	2061C>T	R231C	Arginin - Cystein
8	2145C>T	R259W	Arginin - Tryptophan
9	2328G>T	K285N	Lysin - Asparagin
9	2362T>C	S297P	Serin - Prolin
10	2741A>G	N314D	Asparagin - Aspartat
10	2748G>A	W316X	Tryptophan - Stop
10	2749G>A	W316X	Tryptophan - Stop
10	2758C>A	H319Q	Histidin - Glutamin
10	2759G>A	A320T	Alanin - Threonin
10	2790C>T	A330V	Alanin - Valin
10	2849A>G	T350A	Threonin - Alanin
11	3743T>C	X380R	Stop - Arginin

[a] Der Kennzeichnung liegt die NCBI-Sequenz NC 0000009.2 des GALT-Gens zugrunde (A des ATG-Startcodon = Nucleotid 1)

[b] Aus der genetischen Variante im GALT-Gen abgeleitete Änderung in der Primärsequenz der GALT

In Tabelle 4 ist die Mutations-Häufigkeit bei Patienten mit klassischer Galaktosämie und bei den heterozygoten Probanden dargestellt. Bei den Patienten kommt die genetische Variante g.1466A>G(*p.Q188R*) mit 61% am häufigsten vor. Nächsthäufigere genetische Varianten sind g.2328G>T(*p.K285N*) und g.1649G>C(*p.L195P*) mit 13% und 8%.

Tabelle 4: Mutationshäufigkeit bei Patienten mit klassischer Galaktosämie und heterozygoten Probanden

genetische Variante [a]	Allel Häufigkeit (*n*)	relative Häufigkeit (%)	Homo-zygotie (*n*)	Allel Häufigkeit (*n*)	relative Häufigkeit (%)
	klassische Galaktosämie (*n*=44)			Heterozygote (*n*=40) [b]	
Q188R	54	61	20	27	68
K285N	11	13	1	3	7
L195P	7	8	1	3	7
R148W	2	2	0	1	2
H319Q	2	2	0	3	7
D28Y	1	1	0	0	0
Q38P	1	1	0	0	0
R67C	0	0	0	1	2
ΔN97	1	1	0	0	0
H114P	1	1	0	0	0
F117C	1	1	0	0	0
M142K	1	1	0	0	0
V151A	1	1	0	0	0
R231C	1	1	0	0	0
R259W	1	1	0	0	0
S297P	1	1	0	0	0
N314D	0	0	0	1	2
A320T	1	1	0	2	5
X380R	1	1	0	0	0

[a] Bezeichnung auf Proteinebene
[b] 4 von insgesamt 44 Heterozygoten nahmen nicht an der molekulargenetischen Untersuchung teil

3.1.2.1 Genotypen

Patienten mit klassischer Galaktosämie

Insgesamt 22 Patienten mit klassischer Galaktosämie hatten einen homozygoten Genotyp, darunter 20 mit Homozygotie für die Mutation g.1466A>G(*p.Q188R*) und jeweils ein Patient mit Homozygotie für g.1649G>C(*p.L195P*) und g.2328G>T(*p.K285N*). Bei 14 Patienten mit einem compound heterozygoten Genotyp war die genetische Variante g.1466A>G(*p.Q188R*) kombiniert mit g.2328G>T(*p.K285N*) (*n*=5), g.1649G>C(*p.L195P*) (*n*=3), g.1192C>T(*p.R148W*) (*n*=2), g.824_826delAAC(*p.*∆*N97*), g.2145C>T(*p.R259W*), g.2362T>G(*p.S297P*) oder g.3743T>C(*p.X380R*) (jeweils *n*=1).

Als weitere compound heterozygote Genotypen kamen vor:

g.82G>T(*p.D28Y*) / g.415A>C(*p.Q38P*),

g.965A>C(*p.H114P*) / g.2328G>T(*p.K285N*),

g.1175T>A(*p.M142K*) / g.2328G>T(*p.K285N*),

g.1202T>C(*p.V151A*) / g.2328G>T(*p.K285N*),

g.974T>G(*p.F117C*) / g.2758C>A(p.H319Q),

g.2758C>A(*p.H319Q*) / g.2061C>T(*p.R231C*),

g.2328G>T(*p.K285N*) / g.2758C>A(*p.H319Q*) und

g.2758C>A(*p.H319Q*) / g.2759G>A(*p.A320T*) (jeweils *n*=1).

Patienten mit varianter Galaktosämie

Die einzelnen Genotypen aller Patienten mit varianter Form der Galaktosämie sind in Tabelle 5 mit der entsprechenden GALT-Aktivität in Erythrozyten jedes Patienten dargestellt. Die drei Varianten mit der höchsten residualen Enzymaktivität von >20% der Norm (Patient 7-9) hatten einen compound heterozygoten Genotyp, bei dem die Mutation g.1466A>G(*p.Q188R*) mit der Duarte-D2-Mutation g.2741A>G(*p.N314D*) in Exon 10 plus einer 4 Basen-Deletion im Promotor (-119_-116delGTCA) des GALT-Gens kombiniert war.

Patient 1 hatte ebenfalls einen compound-heterozygoten Genotyp mit einer D2-Konstellation. Es ist nicht auszuschließen, dass die D2-Mutation hier einen zusätzlichen reduzierenden Effekt auf die GALT-Aktivität hat.

Tabelle 5: Genotypen und entsprechende GALT-Aktivität in Erythrozyten der Patienten mit varianter Form der Galaktosämie

Patient	Genotyp [a]	GALT-Aktivität ($\mu mol \times h^{-1} \times g_{Hb}^{-1}$)
1	R67C/N314D/W316X	0.4
2	Q188R/T138M	0.7
3	Q188R/A330V	0.9
4	Q188R/A330V	1.0
5	Q188R/T350A	1.8
6	Q188R/I32N	2.8
7	Q188R/N314D [b]	4.5
8	Q188R/N314D [b]	5.0
9	Q188R/N314D [b]	5.2

[a] Bezeichnung auf Proteinebene
[b] Duarte-D2-Genotyp mit 4-Basen-Deletion im Promotor (-119_-116delGTCA) des GALT-Gens

3.2 Galaktosemetabolite in Plasma und Urin

Im Plasma sowie im Urin aller Patienten und Probanden wurden die Konzentrationen von Galaktose und Galaktitol bestimmt, bei Patienten mit klassischer Galaktosämie zusätzlich der Metabolit Galaktonat.
Bei Normalpersonen, Heterozygoten und Patienten mit varianter Galaktosämie konnte Galaktonat aufgrund seiner geringen Konzentration im Plasma und Urin nicht quantifiziert werden.

Die Ergebnisse der Plasma- und Urin-Analysen waren Grundlage für nachfolgende Berechnungen zur renalen Clearance, fraktionellen renalen Exkretion und tubulären Reabsorption.

3.2.1 Plasma

Eine Übersicht über die Plasma-Konzentrationen von Galaktose und Galaktitol aller Untersuchungsgruppen sowie die von Galaktonat bei Patienten mit klassischer Galaktosämie gibt Tabelle 6.

Ein signifikanter geschlechts- oder altersabhängiger Konzentrationsunterschied der Galaktose und ihrer Metabolite im Plasma konnte in keiner der vier Gruppen festgestellt werden.

Es konnten keine Konzentrationsunterschiede für die Galaktose im Plasma bei Gesunden und Heterozygoten festgestellt werden. Ebenso wenig bestand ein Unterschied in der mittleren Galaktitol-Konzentration im Plasma zwischen Gesunden und heterozygoten Probanden. Die mittleren Plasma-Konzentrationen von Galaktose zu Galaktitol waren bei Normalpersonen und Heterozygoten nahezu 1:1.
Bei den Patienten mit klassischer Galaktosämie waren die mittleren Metabolit-Konzentrationen erwartungsgemäß im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv erhöht, die Galaktose im Mittel um den Faktor 10, Galaktitol sogar um den Faktor 50.

Die mittlere Galaktose-Konzentration im Plasma der Patienten mit varianter Galaktosämie war nahezu normwertig, die mittlere Galaktitol-Konzentration um den Faktor 10 gegenüber dem Normkollektiv erhöht.

Tabelle 6: Metabolit-Konzentrationen im Plasma [a]

Metabolit µmol/L		Untersuchungsgruppe			
		klassische Galaktosämie *n*=44 [b] (w: 24; m: 20)	variante Galaktosämie *n*=9 (w: 4; m: 5)	heterozygote Probanden *n*=44 (w: 25; m: 19)	gesunde Probanden *n*=36 (w: 15; m: 21)
Galaktose	gesamt	**2.7** ± 0.5 (2.7; 1.4 - 3.4)	**0.5** ± 0.4 (0.4; 0.3 - 1.5)	**0.3** ± 0.1 (0.3; 0.2 - 0.5)	**0.3** ± 0.1 (0.3; 0.2 - 0.5)
	♂	2.8 ± 0.4 (2.7; 1.7 - 3.3) *n* = 20	0.5 ± 0.5 (0.3; 0.3 - 1.5) *n* = 5	0.3 ± 0.1 (0.3; 0.2 - 0.5) *n* = 19	0.3 ± 0.1 (0.3; 0.2 - 0.5) *n* = 21
	♀	2.6 ± 0.5 (2.7; 1.4 - 3.4) *n*=24	0.5 ± 0.1 (0.5; 0.5 – 0.6) *n*=4	0.3 ± 0.1 (0.3; 0.2 – 0.4) *n*=25	0.3 ± 0.1 (0.3; 0.3 – 0.5) *n*=15
Galaktitol	gesamt	**11.1** ± 1.5 (11.2; 6.5 - 14.2)	**2.1** ± 3.0 (0.5; 0.1 - 9.4)	**0.2** ± 0.1 (0.2; 0.1 - 0.6)	**0.2** ± 0.1 (0.2; 0.1 - 0.3)
	♂	11.3 ± 1.6 (11.5; 8.0 - 14.2)	2.1 ± 4.0 (0.4; 0.1 - 9.4)	0.2 ± 0.1 (0.2; 0.1 - 0.4)	0.2 ± 0.1 (0.2; 0.1 - 0.3)
	♀	11.0 ± 1.3 (11.1; 6.5 - 13.1)	2.1 ± 1.5 (2.4; 0.2 - 3.4)	0.2 ± 0.1 (0.2; 0.1 - 0.6)	0.2 ± 0.1 (0.2; 0.1 - 0.3)
Galaktonat	gesamt	**2.4** ± 0.5 (2.4; 1.1 - 3.7)			
	♂	2.5 ± 0.6 (2.4; 1.7 - 3.7) *n*=19			
	♀	2.4 ± 0.4 (2.3; 1.1 - 3.0) *n*=21			

[a] Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD mit Median und Wertebereich in Klammern
[b] Galaktonat: *n*=40

Das Verhältnis der mittleren Konzentrationen von Galaktose und Galaktitol im Plasma war bei Patienten mit klassischer Galaktosämie sowie bei Patienten mit varianter Galaktosämie mit nahezu 1: 4 sehr ähnlich. Quantitativ war jedoch die Plasma-Konzentration des Galaktitols bei den Patienten mit klassischer Galaktosämie gegenüber Patienten mit varianter Galaktosämie etwa 5-fach erhöht.

Wurden die Plasma-Metabolit-Konzentrationen bei Patienten mit varianter Galaktosämie in Abhängigkeit der residualen GALT-Aktivität in Erythrozyten betrachtet (siehe Abbildung 4), so zeigte sich bereits ab einer Enzymaktivität von etwa 1 µmol/h pro g Hb (5% der Norm) eine normwertige Konzentration der Galaktose im Plasma.

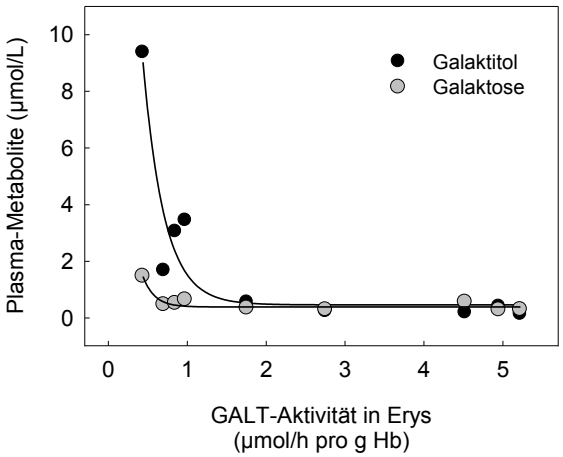


Abbildung 4: Konzentration der Plasma-Metabolite Galaktose und Galaktitol bei Patienten mit varianter Form der Galaktosämie in Abhängigkeit von der GALT-Aktivität in den Erythrozyten (*n*=9).

Anpassung der experimentellen Daten an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0+a*\exp(-b*x)$. x = GALT-Aktivität in Erythrozyten, y = Metabolit-Konzentration; Durchgezogene Linie: Regressionskurve. Galaktose: $y_0 = 0.4 \pm 0.1$; $a = 22 \pm 31$; $b = 7 \pm 3$; $R^2 = 0.966$, $p < 0.0007$. Galaktitol: $y_0 = 0.5 \pm 0.5$; $a = 44 \pm 24$; $b = 4 \pm 1$; $R^2 = 0.927$, $p < 0.0162$.

3.2.2 Urin

Eine Übersicht über die Variabilität der Metabolit-Konzentrationen im Morgenurin nach Übernachtfasten bei Patienten und Probanden gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Konzentration der Galaktosemetabolite im Urin [a]

	Untersuchungsgruppe			
Metabolit µmol/L	klassische Galaktosämie *n*=44 [b] (w: 24; m: 20)	variante Galaktosämie *n*=9 (w: 4; m: 5)	heterozygote Probanden *n*=44 (w: 25; m: 19)	gesunde Probanden *n*=36 (w: 15; m: 21)
Galaktose	**51** ± 35 (43; 5 - 130)	**14** ± 7 (16; 3 - 21)	**15** ± 7 (17; 1.4 - 33)	**11** ± 6 (11; 1 - 30)
Galaktitol	**1538** ± 932 (1462; 155 – 4296)	**221** ± 279 (61; 8 – 836)	**31** ± 16 (27; 5 – 88)	**27** ± 15 (24; 5 – 68)
Galaktonat	**374** ± 246 (338; 34 – 970)			

[a] Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD mit Median und Wertebereich in Klammern
[b] Galaktonat: *n*=40 (w: 21, m: 19)

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der auf Kreatinin normierte Gehalt von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat im Urin ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Metabolit-Konzentrationen im Urin normiert auf Kreatinin [a]

Metabolit µmol/ mmol Kreatinin		Untersuchungsgruppe			
		klassische Galaktosämie	variante Galaktosämie	heterozygote Probanden	gesunde Probanden
		n=44 [b] (w: 24; m: 20)	*n*=9 (w: 4; m: 5)	*n*=44 (w: 25; m: 19)	*n*=36 (w: 15; m: 21)
Galaktose	gesamt	**5.2** ± 2.1 (4.8; 1.6 – 10)	**1.4** ± 0.5 (1.3; 0.7 – 2.3)	**1.0** ± 0.4 (1.0; 0.4 – 1.8)	**0.7** ± 0.2 (0.6; 0.3 – 1.2)
	♂	5.5 ± 2.5 (4.8; 1.6 – 10)	1.3 ± 0.6 (1.0; 0.8 – 2.3)	1.0 ± 0.3 (0.9; 0.5 – 1.7)	0.7 ± 0.2 (0.7; 0.4 – 1.2)
	♀	4.9 ± 1.8 (4.8;1.9 – 9.3)	1.4 ± 0.6 (1.5; 0.7 – 2.1)	1.2 ± 0.5 (1.2; 0.5 – 1.8)	0.6 ± 0.2 (0.5; 0.3 – 0.9)
Galaktitol	gesamt	**162** ± 61 (148; 64 – 318)	**25** ± 33 (6.6; 1.6 – 100)	**2.1** ± 0.6 (2.0; 1.2 – 3.7)	**1.5** ± 0.4 (1.5; 0.9 – 2.5)
	♂	157 ± 71 (138; 64 – 318)	23 ± 43 (2.7; 1.6 – 100)	2.0 ± 0.6 (2.0; 1.2 – 3.2)	1.5 ± 0.4 (1.5; 1 – 2.6)
	♀	167 ± 52 (50;106 - 288)	28 ± 19 (32; 2.3 – 45)	2.2 ± 0,7 (2.1; 1.4 – 3.7)	1.5 ± 0.3 (1.5; 0.9 – 2.0)
Galaktonat	gesamt	**39** ± 15 (34; 17 – 70)			
	♂	39 ± 17 (31; 17 – 65)			
	♀	39 ± 14 (37; 20 – 70)			

[a] Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD, Median und Wertebereich in Klammern
[b] Galaktonat: *n*=40 (w: 21, m: 19)

Ein signifikanter Unterschied in den Metabolit-Konzentrationen der Normalpersonen und Heterozygoten zeigte sich im Urin ebenso wenig wie im Plasma.

Das Verhältnis Galaktose:Galaktonat:Galaktitol im Urin (normiert auf Kreatinin) lag bei Patienten mit klassischer Galaktosämie im Mittel bei etwa 1:8:31. Das Verhältnis Galaktose:Galaktitol bei Patienten mit varianter Form der Galaktosämie lag im Urin im Mittel bei 1:17, bei den Gesunden (Normalpersonen und Heterozygote) bei ca. 1:2.

Bei den Patienten waren die auf Kreatinin normierten Metabolit-Konzentrationen im Urin im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv erwartungsgemäß erhöht. Dabei lag die Galaktose- bzw. Galaktitol-Konzentration im Mittel bei Patienten mit klassischer Galaktosämie ca. 10- bzw. >100fach höher, bei Patienten mit varianter Form der Galaktosämie im Mittel 2- bzw. 16fach höher als bei Kontrollpersonen.

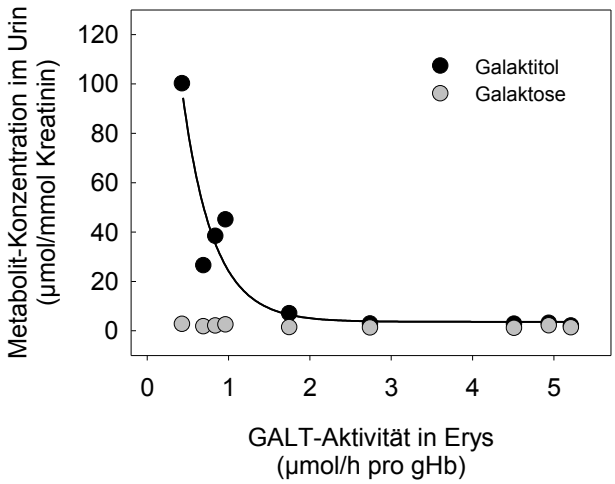


Abbildung 5: Galaktose- und Galaktitol-Konzentration im Urin in µmol/mmol Kreatinin in Abhängigkeit von der GALT-Aktivität in Erythrozyten bei Patienten mit varianter Form der Galaktosämie (*n* =9).

Anpassung der experimentellen Daten an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0+a*\exp(-b*x)$. x = GALT-Aktivität in Erythrozyten, y = Metabolit-Konzentration; Durchgezogene Linie: Regressionskurve Galaktitol: $y_0 = 4 \pm 6$; $a = 291 \pm 117$; $b = 2.7 \pm 0.8$; $R^2 = 0.9342$, $p < 0.0144$.

In Abbildung 5 ist anhand der Ergebnisse bei Patienten mit varianter Galaktosämie der Zusammenhang zwischen der Metabolit-Konzentration im Urin (normiert auf Kreatinin) und der GALT-Aktivität dargestellt. Eine Normalisierung der auf Kreatinin normierten Urin-Konzentration von Galaktitol konnte ab einer Enzymaktivität von etwa 1 µmol/h pro g Hb (5% der Norm) vermutet werden.

Bei den Patienten mit klassischer Galaktosämie wurde im Urin eine deutliche Altersabhängigkeit der Metabolit-Konzentrationen beobachtet (Abbildung 6). Die Metabolit-Konzentrationen fielen exponentiell vom Neugeborenen bis zum Erwachsenenalter ab. Dabei lag das Verhältnis der Konzentrationen bei Neugeborenen und Erwachsenen bei etwa 2:1 (Galaktose und Galaktonat) bzw. bei ca. 3:1 (Galaktitol).

Hier ist anzumerken, dass in vorangegangen Studien eine Altersabhängigkeit der Metabolit-Konzentrationen im Urin auch bei Gesunden und Heterozygoten gezeigt werden konnte (Schadewaldt et al., 2003).

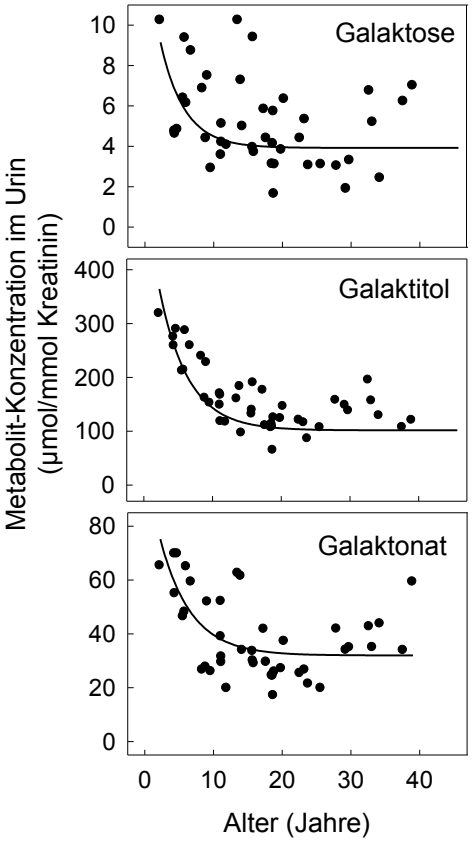


Abbildung 6: Altersabhängigkeit der Urin-Konzentration von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat (normiert auf mmol Kreatinin) bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (*n*=44).

Anpassung der Daten an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0+a*\exp(-b*x)$. x = Alter, y = Metabolit-Konzentration. Durchgezogene Linie: Regressionskurve. Galaktose: $y_0 = 3.9 \pm 0.5$; $a = 10 \pm 7$; $b = 0.3 \pm 0.2$; $R^2 = 0.8042$, $p < 0.0001$. Galaktitol: $y_0 = 102 \pm 13$; $a = 449 \pm 132$; $b = 0.2 \pm 0.1$; $R^2 = 0.8648$, $p < 0.0001$. Galaktonat: $y_0 = 32 \pm 3$; $a = 72 \pm 26$; $b = 0.2 \pm 0.1$; $R^2 = 0.9230$, $p < 0.0001$.

3.3 Renale Ausscheidung von Galaktosemetaboliten

Um die renale Ausscheidung von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat näher zu charakterisieren, wurden die renale Clearance sowie die fraktionelle renale Exkretion und die tubuläre Reabsorption mit Hilfe der zuvor gemessenen Metabolit-Konzentrationen berechnet und analysiert. Ziel der Berechnungen war, eine Aussage darüber treffen zu können, ob und in welchem Umfang Galaktose und ihre Metabolite in der Niere reabsorbiert bzw. sezerniert werden und ob sich eine Altersabhängigkeit zeigt.

Geschlechtsspezifische Unterschiede waren im vorigen Kapitel ausgeschlossen worden. Eine getrennte Darstellung erfolgte daher nicht mehr. Die Normalpersonen und die heterozygoten Probanden unterschieden sich hinsichtlich ihrer Metabolit-Konzentrationen im Plasma und Urin nicht und wurden aus diesem Grund zu einem phänotypisch gesunden Kontrollkollektiv zusammengefasst.

3.3.1 Renale Clearance

Bei 30 der 44 untersuchten Patienten mit klassischer Galaktosämie konnte die in einer *in vivo* Untersuchung von Schadewaldt zur endogenen Galaktose-Bildung direkt gemessene renale Clearance der Galaktosemetabolite mit der berechneten bzw. geschätzten renalen Clearance verglichen werden (Schadewaldt et al., 2004).

Der lineare Zusammenhang zwischen der gemessenen und der geschätzten Clearance bei den 30 Patienten ist in Abbildung 7 dargestellt.
Die geschätzte Clearance zeigte eine statistisch befriedigende Übereinstimmung mit der direkt gemessenen Clearance aus der *in vivo* Studie.

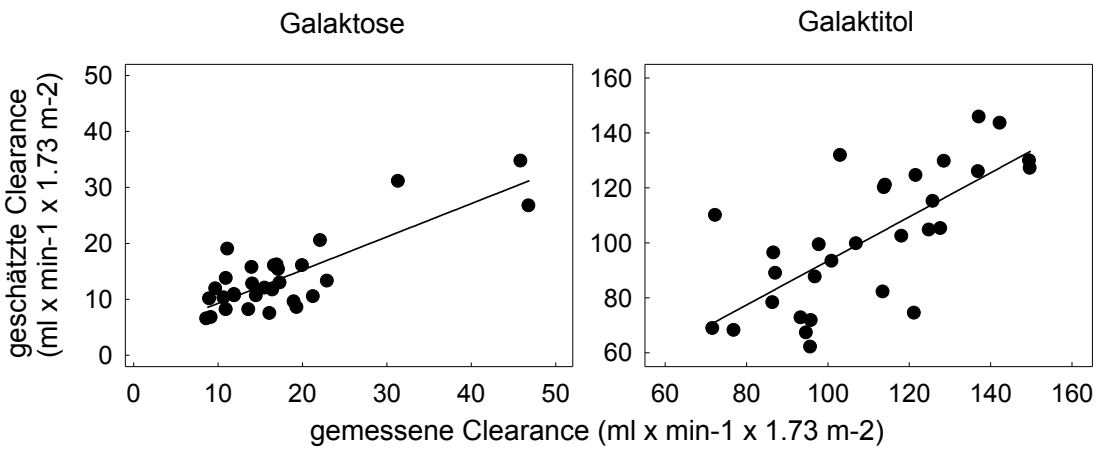


Abbildung 7: Korrelation zwischen tatsächlich gemessener renaler Clearance und geschätzter Clearance bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (*n*=30). Die Schätzung erfolgte anhand der Plasma- und Urin-Konzentrationen (siehe Kapitel 2.4.1.2).

Gleichung der Regressionsgeraden: y = a + b*x; x = gemessene Clearance in mL x min^{-1} x 1.73 m^{-2}, y = geschätzte Clearance in mL x min^{-1} x 1.73 m^{-2}; Galaktose: a = 3.4 ± 1.6; b = 0.6 ± 0.1; R^2 = 0.937, p < 0,0001. Galaktitol: a = 13 ± 17; b = 0.8 ± 0.1; R^2 = 0.973, p < 0,0001.

Die Mittelwerte sowie auch die entsprechenden Wertebereiche der Kreatinin-Clearance waren in den drei Untersuchungsgruppen altersentsprechend normal (siehe Tabelle 9).

Die Ergebnisse zur renalen Clearance der verschiedenen Metabolite zeigten im Mittel keine wesentlichen quantitativen Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Es war jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Clearance-Raten der Metabolite Galaktose und Galaktitol vorhanden.

Dabei war erwartungsgemäß in allen drei Gruppen die mittlere renale Clearance von Galaktitol -und von Galaktonat bei Patienten mit klassischer Galaktosämie- im Vergleich zur Galaktose-Clearance deutlich erhöht. Bei Patienten mit klassischer Galaktosämie entsprach die mittlere Clearance von Galaktonat in etwa der mittleren Galaktitol-Clearance.

Tabelle 9: Renale Clearance von Kreatinin, Galaktose, Galaktitol und Galaktonat [a]

	Untersuchungsgruppe		
Metabolit mL x min^{-1} x 1.73 m^{-2}	klassische Galaktosämie *n* = 44	variante Galaktosämie *n* = 9	phänotypisch Gesunde [b] *n* = 80
Kreatinin	**161** ± 43 (155; 98 - 245)	**172** ± 36 (167; 120 - 216)	**126** ± 33 (121; 58 - 219)
Galaktose	**14** ± 7 [d] (12; 6 - 38)	**22** ± 10 [g] (22; 9 - 40)	**28** ± 19 [i] (24; 9 - 134)
Galaktitol	**100** ± 27 [e] (100; 55 - 154)	**89** ± 24 [h] (93; 45 - 117)	**78** ± 30 [j] (74; 11 - 153)
Galaktonat [c]	**111** ± 31 [f] (112; 60 - 174)		

[a] die Clearance wurde anhand der Plasma- und Urin-Konzentrationen geschätzt (Einzelheiten siehe Kapitel 2.4.1.2)
[b] heterozygote und gesunde Probanden wurden hier als ein phänotypisch gesundes Kollektiv zusammengefasst, *n*=80 (44 Heterozygote + 36 Normalpersonen)
[c] Galaktonat: *n*=40 (w: 21, m: 19)
[d-j] signifikante Unterschiede: d vs. e,f : $p < 0.001$; g vs. h : $p < 0.02$; i vs. j : $p < 0.0001$

Bei Patienten mit einer varianten Form der Galaktosämie waren die Galaktose- bzw. Galaktitol-Clearance statistisch nicht signifikant unterschiedlich zu denen der beiden anderen Untersuchungsgruppen ($p > 0.05$).

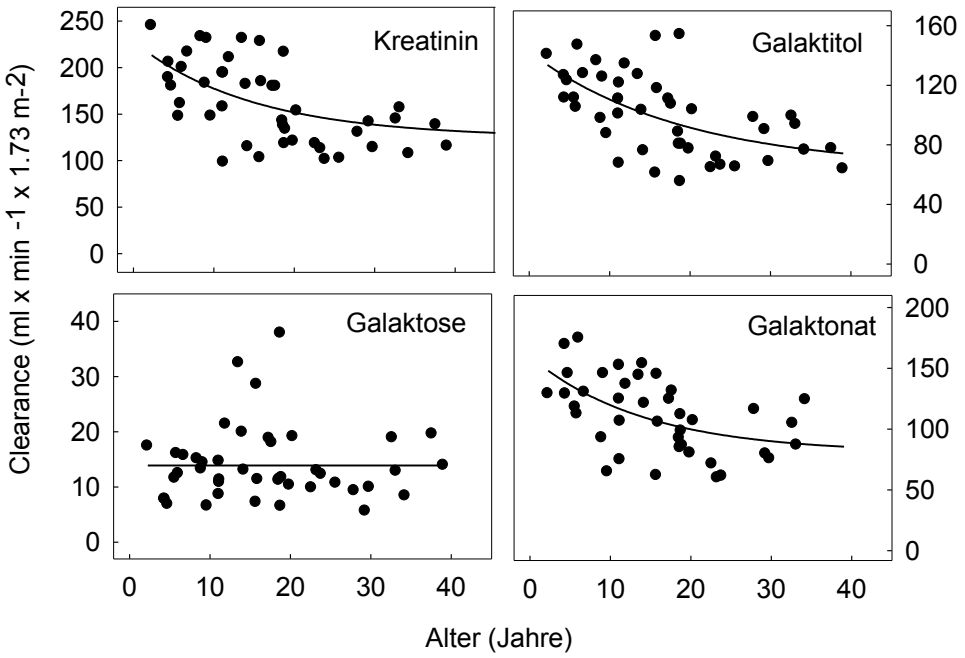


Abbildung 8: Altersabhängigkeit der Kreatinin- und Metabolit-Clearance bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (*n*=44, Galaktonat: *n*=40).

Anpassung der Clearance-Daten von Kreatinin, Galaktitol und Galaktonat an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0+a*\exp(-b*x)$; x = Alter, y = Metabolit-Clearance in mL x min^{-1} x 1.73m^{-2}. Durchgezogene Linie: Regressionskurve. Kreatinin: y_0 = 125 ± 26; a = 103 ± 24; b = 0.1 ± 0.1; R^2 = 0.9559, p < 0.0001. Galaktitol: y_0 = 64 ± 30; a = 78 ± 22; b = 0.1 ± 0.1; R^2 = 0.9562, p < 0.04. Galaktonat: y_0 = 80 ± 28; a = 79 ± 22; b = 0.1 ± 0.1; R^2 = 0.9490, p < 0.006. Für die Clearance von Galaktose ergab sich keine Anpassung an das Modell (Mittelwert 14 ± 7; 12, 6-38).

Bei Patienten mit klassischer Galaktosämie zeigte sich eine statistisch signifikante Altersabhängigkeit der Kreatinin-, Galaktitol- und Galaktonat-Clearance (siehe Abbildung 8). Dabei konnte trotz der beträchtlichen Streuung der Werte eine sehr ähnliche Charakteristik der Altersabhängigkeit der genannten Metabolite vermutet werden. Quantitativ stellte sich eine gute Übereinstimmung der Clearance-Raten von Galaktitol, Galaktonat und Kreatinin dar. Eine Altersabhängigkeit der Galaktose-Clearance konnte nicht festgestellt werden.

3.3.2 Fraktionelle renale Exkretion und tubuläre Reabsorption

Eine Übersicht über die Daten zur fraktionellen renalen Exkretion und tubulären Reabsorption der Galaktosemetabolite aller Untersuchungsgruppen gibt Tabelle 10.

Tabelle 10: Fraktionelle renale Exkretion (FRE) und tubuläre Reabsorption (TR) von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat [a]

		Untersuchungsgruppe		
Metabolit		klassische Galaktosämie *n* = 44 [b]	variante Galaktosämie *n* = 9	phänotypisch Gesunde *n* = 80 [c]
Galaktose	FRE	**9** ± 3 [d] (8; 4 - 18)	**14** ± 7 [g] (12; 6 - 27)	**22** ± 13 [i] (19; 6 - 78)
	TR	**91** ± 3 (92; 83 - 96)	**86** ± 7 (88; 73 - 94)	**78** ± 13 (81; 22 - 94)
Galaktitol	FRE	**62** ± 7 [e] (62; 47 - 76)	**53** ± 15 [h] (55; 30 - 86)	**60** ± 15 [j] (63; 19 - 92)
	TR	**38** ± 7 (37; 24 - 53)	**47** ± 15 (45; 14 - 70)	**39** ± 15 (37; 8 - 81)
Galaktonat	FRE	**69** ± 15 [f] (65; 44 - 116)		
	TR	**31** ± 15 (35;16 - 56)		

[a] Die fraktionelle renale Exkretion und tubuläre Reabsorption sind angegeben in %, Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD, Median und Wertebereich in Klammern

[b] Galaktonat: *n*=40 (w: 21, m: 19)

[c] heterozygote und gesunde Probanden wurden hier als ein phänotypisch gesundes Kollektiv zusammengefasst, *n*=80 (44 Heterozygote + 36 Normalpersonen)

[d-h] signifikante Unterschiede: i vs. j : $p < 0.0001$; d vs. e,f : $p < 0.001$; e vs. f : $p < 0.01$; g vs. h : $p < 0.025$

Wesentliche Unterschiede der fraktionellen renalen Exkretion und tubulären Reabsorption zwischen den drei Untersuchungsgruppen zeigten sich weder für

die Galaktose noch für das Galaktitol. Jedoch konnten signifikante quantitative Unterschiede zwischen den Metaboliten Galaktose und Galaktitol in allen Gruppen gesehen werden. Die fraktionelle renale Exkretion von Galaktitol war hierbei deutlich höher als die der Galaktose, die tubuläre Reabsorption signifikant niedriger.

Bei Patienten mit klassischer Galaktosämie entsprach die mittlere fraktionelle renale Exkretion und tubuläre Reabsorption von Galaktonat weitgehend der des Galaktitols, statistisch gesehen jedoch war der Unterschied zwischen der fraktionellen renalen Exkretion von Galaktitol und Galaktonat signifikant.

Da die fraktionelle renale Exkretion und tubuläre Reabsorption jeweils einen Quotienten aus der Kreatinin- und der Metabolit-Clearance darstellen, war eine Altersabhängigkeit hier nicht zu erwarten. In Abbildung 9 ist das Verhältnis der fraktionellen renalen Exkretion der verschiedenen Metabolite zueinander am Beispiel der Patienten mit klassischer Galaktosämie dargestellt.

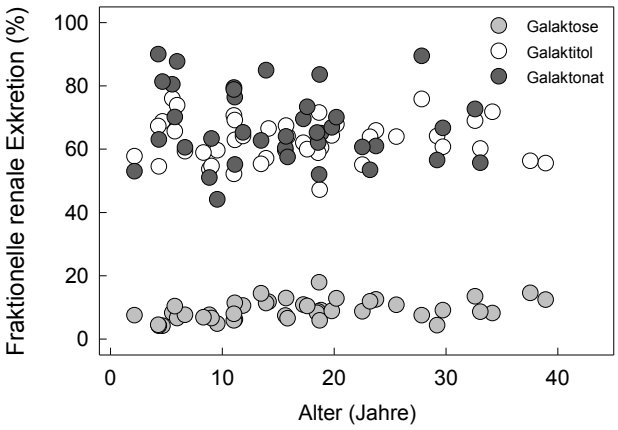


Abbildung 9: Fraktionelle renale Exkretion der Galaktose und ihrer Metabolite bei Patienten mit klassischer Galaktosämie.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Rückresorption der Galaktose in allen drei Untersuchungsgruppen im proximalen Tubulus mit ca. 80-90% wesentlich effektiver war als die des Galaktitols und des Galaktonats. Die beiden Metabolite wurden zu ca. 30-50% tubulär reabsorbiert.

Eine Sekretion von Galaktosemetaboliten im renalen Tubulus ist unwahrscheinlich, da die Clearance von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat jeweils nicht höher war als die des Kreatinins und die fraktionelle renale Exkretion nicht über 100% lag.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungskollektive

Patienten mit klassischer Galaktosämie

Das Kollektiv der in dieser Studie untersuchten Patienten mit klassischer Galaktosämie war eine hinsichtlich der residualen Enzymaktivität homogene Gruppe. Die GALT-Aktivität in den Erythrozyten lag bei allen Patienten < 2% der Norm. Bei vielen Patienten war bis zum Zeitpunkt dieser Untersuchung eine lediglich nicht messbare Enzymaktivität bekannt. Ähnlich wie in den *in vivo*-Untersuchungen von Schadewaldt et al. (2004), konnte im Rahmen dieser Studie aber bei jedem Patienten eine, wenn auch sehr geringe, residuale GALT-Aktivität gefunden werden.

Im Rahmen der Charakterisierung des Patienten-Kollektivs erfolgte für alle Patienten auch eine Genotypisierung. Dabei waren die Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen bzw. die relative Allelverteilung repräsentativ für die in der Literatur genannten Mutationshäufigkeiten der europäischen Bevölkerung (Leslie et al., 1992; Elsas et al., 1995; Tyfield et al., 1999; Bosch et al., 2005). Am häufigsten war die genetische Variante g.1466A>G(*p.Q188R*) mit einer Allelhäufigkeit von 61%, gefolgt von g.2328G>T(*p.K285N*) mit einer Häufigkeit von 13% und g.1649G>C(*p.L195P*) mit 8%. Durch *in vitro*-Expressionsversuche in Hefe-Zellen konnte für die genetische Variante g.1466A>G/p.Q188R belegt werden, dass eine Homozygotie mit einer sehr geringen, bzw. nicht messbaren, GALT-Aktivität in den Erythrozyten assoziiert ist (Fridovich-Keil & Jinks-Robertson, 1993; Tyfield et al., 1999).

Auch für die in diesem Patienten-Kollektiv vorkommenden genetischen Varianten g.1175T>A(*p.M142K*), g.1192C>T(*p.R148W*), g.1202T>C(*p.V151A*), g.1649T>C(*p.L195P*), g.2328G>T(*p.K285N*) und g.2758C>A(*p.H319Q*) liegen *in vitro*-Daten zur funktionellen Auswirkung auf die humane GALT-Aktivität vor. Sie sind mit deutlich erniedrigten bzw. nicht messbaren GALT-Aktivitäten assoziiert (Reichardt et al., 1992; Reichardt et al., 1993; Fridovich-Keil & Jinks-

Robertson, 1993; Fridovich-Keil et al., 1995; Tyfield et al., 1999; Riehman et al., 2001).

Sieben Varianten, nämlich g.82G>T(*p.D28Y*), g.415A>C(*p.Q38P*), g.824_826delAAC(*p.ΔN97*), g.2061C>T(*p.R231C*), g.2145C>T(*p.R259W*), g.2759G>A(*p.A320T*) und g.3743T>C(*p.X380R*) sind in der Literatur beschrieben (Elsas et al., 1995; Shin et al., 1996; Greber-Platzer et al., 1997; Tyfield et al., 1999) und sind mit klassischer Galaktosämie und praktisch vollständigem Aktivitätsverlust der GALT assoziiert. Allerdings stehen hier die *in vitro*-Nachweise, dass die jeweiligen Veränderungen auf DNA-Ebene auch tatsächlich zu einem nahezu vollständigen Verlust der GALT-Aktivität führen, noch aus.
Für die genetischen Varianten g.965A>C(*p.H114P*), g.974T>G(*p.F117C*) und g.2362T>G(*p.S297P*) ist bisher nicht bekannt, ob mit der jeweiligen Veränderung auf DNA-Ebene obligat ein nahezu vollständiger Verlust der GALT-Aktivität in den Erythrozyten einhergeht.
Abgesehen von dem compound heterozygoten Genotyp g.82G>T(*p.D28Y*) und g.415A>C(*p.Q38P*) waren in unserem Patienten-Kollektiv alle oben genannten Mutationen mit einer der schweren genetischen Varianten g.1466A>G(*p.Q188R*), g.2328G>T(*p.K285N*), g.1649G>C(*p.L195P*) oder g.2758C>A(*p.H319Q*) kombiniert. Aus den jeweiligen Genotypen resultierte eine GALT-Aktivität von < 2% der Norm. Eine funktionelle Auswirkung auf die GALT-Aktivität ist somit auch für die bisher nicht durch Expressionsversuche untersuchten genetischen Varianten sehr wahrscheinlich.

Im Rahmen der Genotypisierung wurden drei neue, bisher in der Literatur nicht beschriebene Mutationen g.965A>C(*p.H114P*), g.974T>G(*p.F117C*) und g.2362T>G(*p.S297P*) gefunden.
Für die genetischen Varianten g.965A>C(*p.H114P*) und g.974T>G(*p.F117C*) sind bereits am jeweiligen Genlocus die Mutationen g.965A>C(*p.H114L*) und g.974T>C(*p.F117S*) bekannt. Es ist anzunehmen, dass die funktionellen Auswirkungen, die die bereits bekannten genetischen Varianten auf die GALT-

Aktivität in den Erythrozyten haben, sehr ähnlich sein dürften. In unserem Kollektiv lagen diese Mutationen in compound heterozygoter Form in Kombination mit den Varianten g.2328G>T(*p.K285N*) bzw. g.1649G>C(*p.L195P*) vor und waren mit einer deutlich erniedrigten Enzymaktivität von < 2% der Norm assoziiert.
Für die bisher nicht beschriebene genetische Variante g.2362T>G(*p.S297P*) ist kein potentielles Äquivalent bekannt. Bei unserem Patienten war diese genetische Variante kombiniert mit g.1466A>G(*p.Q188R*) und mit einer GALT-Aktivität von <2% der Norm assoziiert.
Ob es sich bei den drei neuen Mutationen um Spontan-Mutationen oder um seltene genetische Varianten handelt, ist nicht bekannt. Die Genotypisierung beider Elternteile der jeweiligen Patienten wäre hierzu notwendig, jedoch stand hiefür kein Probenmaterial zur Verfügung. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine seltene genetische Variante handelt, ist allerdings weitaus höher.

Alle Patienten mit klassischer Galaktosämie dieser Studie waren diätetisch behandelt. Die Homogenität des Patienten-Kollektivs wurde auch anhand der metabolischen Parameter deutlich. Der Parameter zur Beurteilung der Patienten-Compliance, der Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten, zeigte mit 76 - 246 µmol/L_{RBC} (Referenz: 103 - 185 µmol/L_{RBC}, vgl. Holton et al., 2001; Schadewaldt, 2003) eine gute Stoffwechseleinstellung bei allen Patienten.

Die Konzentration von Galaktose im Urin lag bei den Patienten mit klassischer Galaktosämie in einem Bereich von 2 - 10 µmol/$mmol_{Kreatinin}$, der Bereich für Galaktitol lag bei 64 - 318 µmol/$mmol_{Kreatinin}$ und der für Galaktonat bei 17 - 70 µmol/$mmol_{Kreatinin}$.
Die Konzentration von Galaktose im Plasma lag bei den Patienten mit klassischer Galaktosämie bei 1 - 3 µmol/L, der Bereich für Galaktitol bei 7 - 14 µmol/L und der für Galaktonat bei 1 - 4 µmol/L. Die Metabolit-Konzentrationen im Urin und im Plasma sowie auch ihr Verhältnis zueinander stimmten gut mit den Angaben der Literatur bei diätetisch behandelten Patienten überein (Roboz

et al., 1984; Jakobs et al., 1995; Jansen et al., 1986; Wehrli et al., 1997; Palmieri et al., 1999; Kamalanathan, 2005).

Bei den Galaktosemetaboliten war die Konzentration von Galaktitol sowohl im Plasma als auch im Urin am höchsten, gefolgt von den Konzentrationen der Metabolite Galaktonat und Galaktose. Die Konzentration von Galaktitol war im Vergleich zum gesunden Kontroll-Kollektiv im Plasma im Mittel ca. 50fach und im Urin etwa 90fach erhöht. Dies entsprach den Beobachtungen anderer Autoren (Schweitzer et al., 1993; Palmieri et al., 1999; Ning & Segal, 2000).

Die Konzentrationen der Plasma-Metabolite waren bei den Patienten mit klassischer Galaktosämie nicht altersabhängig. Eine Altersabhängigkeit der Metabolit-Konzentrationen konnte lediglich im Urin gesehen werden, wobei der exponentielle Abfall der Galaktitol-Konzentration im Urin bei Patienten mit klassischer Galaktosämie im Vergleich zu Gesunden einen parallelen Kurvenverlauf zeigte, jedoch bei Patienten auf einem deutlich höheren Niveau (Schadewaldt et al., 2003).

Das Phänomen der Altersabhängigkeit der Metabolit-Konzentrationen im Urin sowie des Galaktose-1-Phosphat-Gehaltes in den Erythrozyten stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Studien überein, in denen bereits eine wesentlich höhere Metabolit-Konzentration im Urin und ein höherer Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten bei Säuglingen und Kindern im Vergleich zu Erwachsenen gemessen wurde (Gao et al., 1992; Schweitzer et al., 1993; Hutchesson et al., 1999; Palmieri et al., 1999; Schadewaldt et al., 2003). Von verschiedenen Autoren wurde vermutet, dass die Ursache für die Altersabhängigkeit vermutlich eine höhere endogene Galaktose-Bildung bei Säuglingen und Kindern sein könnte. Im Jahr 2004 konnte schließlich eine alters- und wachstumsabhängige endogene Galaktose-Bildung nachgewiesen und quantifiziert werden (Berry et al., 2004; Schadewaldt et al., 2004). Auf den Zusammenhang zwischen der endogenen Galaktose-Bildung in Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit wird in Kapitel 4.3 näher eingegangen.

Im Rahmen dieser Studie wurden bei einigen Patienten mit klassischer Galaktosämie zusätzlich zu den Metabolit-Konzentrationen im Urin und im Plasma Parameter der Leber- und Nierenfunktion sowie Gerinnungsparameter und Elektrolyte im Blut untersucht. Außerdem wurde die Aminosäurenausscheidung im Harn bestimmt, um das Vorhandensein einer Aminoazidurie als Folge einer tubulären Schädigung zu prüfen (Holzel et al., 1952; Cusworth et al., 1955). Eine Galaktosämie-bedingte Organschädigung, wie sie in der Akutphase der Erkrankung auftritt, oder auch pathologische Veränderungen im Sinne einer chronischen Erkrankung konnten anhand der Laborparameter ausgeschlossen werden. Es ergaben sich aus den Ergebnissen keine Hinweise auf eine Elektrolyt-, Nieren- oder Leberfunktionsstörung.

Zusammenfassend handelt es sich bei der Gruppe der Patienten mit klassischer Galaktosämie um ein genotypisch, enzymotypisch und metabolisch weitgehend homogenes und diätetisch gut eingestelltes Kollektiv.

Patienten mit einer varianten Form der Galaktosämie

Das Kollektiv der Patienten mit varianten Formen der Galaktosämie war keine anfänglich geplante Untersuchungsgruppe. Im Laufe der Untersuchungen wurde bei einigen Patienten entgegen den Vorbefunden eine GALT-Aktivität in den Erythrozyten von > 2% der Norm festgestellt. Ursächlich hierfür war vermutlich eine unzureichende differentialdiagnostische Abklärung bei Stellung der Erstdiagnose. Die Gruppe war mit insgesamt 9 Probanden klein und bezüglich der GALT-Aktivität und der biochemischen Parameter, im Gegensatz zu den Patienten mit klassischer Galaktosämie, sehr heterogen (GALT-Aktivität 2 - 23% der Norm bzw. 0.5 - 5 µmol x $h^{-1}xg_{Hb}^{-1}$). Da eine GALT-Aktivität von > 2% der Norm nicht dem Einschlusskriterium für das Kollektiv der Patienten mit der klassischen Form der Galaktosämie entsprach, wurden diese Patienten einer gesonderten Untersuchungsgruppe zugeteilt. Der Terminus der "varianten Form" der Galaktosämie wurde im Rahmen dieser Studie für das hinsichtlich der Enzymaktivität und der Stoffwechselsituation sehr heterogene Kollektiv von

Patienten mit einer residualen GALT-Aktivität von > 2% und < 25% der Norm verwendet.

Im Rahmen der Genotypisierung dieser Patienten mit varianter Form der Galaktosämie konnten schließlich zwei Subgruppen unterschieden werden. Die erste Subgruppe setzte sich aus fünf Patienten mit einer varianten Galaktosämie zusammen, die eine Enzymaktivität von <4 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1} und keinen Duarte-D2-Genotyp hatten.
Ein Patient der Gruppe der varianten Formen der Galaktosämie hatte einen compound heterozygoten Genotyp mit einer schweren Mutation g.501C>T(*g.R67C*) und einer Nonsense-Mutation g.2748G>A(*p.W316X*), die ausschließlich mit der Duarte-D2-Mutation g.2741A>G(*p.N314D*) und den Intron-Polymorphismen IVS4nt-27G>C/IVS5nt24G>A einhergeht. Dieser Patient hatte eine auf ca. 2% der Norm reduzierte Enzymaktivität.

Die zweite Subgruppe bestand aus drei Patienten mit einer Duarte-D2-Variante. Charakteristisch für die Duarte-D2-Genotypen ist eine auf etwa 25% der Norm reduzierte Enzymaktivität bei compound heterozygotem Genotyp mit einer schweren genetischen Variante. Die Patienten dieses Kollektivs hatten einen compound heterozygoten Genotyp mit der für die Duarte-D2-Mutation charakteristischen Trias g.2741A>G(*p.N314D*) in Exon 10, eine 4 Basen-Deletion im Promotor (-119_-116delGTCA) des GALT-Gens und dem Polymorphismus g.1387G>A kombiniert mit der Mutation g.1466A>G(*p.Q188R*). Die GALT-Aktivität lag bei diesen Patienten bei 4.5 - 5.2 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1}.

Für drei in der ersten Subgruppe der Varianten vorkommenden Mutationen konnten in der Literatur *in vitro*-Daten zur funktionellen Auswirkung auf die humane GALT-Aktivität gefunden werden. Dabei waren die genetischen Varianten g.1163C>T(*p.T138M*), g.2849A>G(*p.T350A*) und g.397T>A(*p.I32N*) jeweils mit einem milderen Phänotyp assoziiert (Elsas et al., 1995; Shin et al., 1996; Greber-Platzer et al., 1997). In dieser Studie waren die zuvor genannten genetischen Varianten bei allen drei Patienten mit der schweren Mutation

g.1466A>G(*p.Q188R*) kombiniert, woraus eine residuale Enzymaktivität von 3%, 8% und 13% der Norm resultierte.

In der Literatur finden Patienten mit einer gering erhöhten Enzymaktivität, die keinen Duarte-D2-Genotypen haben, bisher wenig Beachtung, da sie, gemessen an der Inzidenz der Patienten mit schwerer klassischer Galaktosämie, sehr selten vorkommen. Vermutet wurde nach bisheriger Erfahrung eine Inzidenz von etwa einem Zehntel der schweren Form der Galaktosämie, also etwa 1:400.000 (Kamalanathan, 2005). Vermutlich wurden diese Patienten mit einer GALT-Aktivität nahe 2% der Norm bisher meist unter "Klassische Galaktosämie“ subsumiert.

In den Ländern mit Neonatalscreening konnten in den letzten zehn Jahren viele Duarte-D2-Variante diagnostiziert werden, da sie nach der Geburt erhöhte Galaktose-1-Phosphat-Konzentrationen aufwiesen. Die Inzidenz der Duarte-D2-Varianten konnte auf ca. 1:4000 geschätzt werden. Diese Patienten kommen damit etwa zehnmal häufiger vor als Patienten mit schwerer klassischer Form der Galaktosämie (Ficicioglu et al., 2005). Früher wurden Patienten mit einer milderen Form der Galaktosämie selbst in Ländern mit Neugeborenen-Screening oft nicht diagnostiziert, da keine ausreichend sensitiven Methoden zur Diagnostik zur Verfügung standen und die meisten Patienten in der Neugeborenen-Periode klinisch unauffällig waren. Die initial erhöhten Metabolit-Konzentrationen normalisierten sich auch ohne eine Diät in der Regel nach wenigen Monaten (Beutler et al., 1965; Levy et al., 1978). Da bei Kindern die Galaktose-Toleranz niedriger als bei Erwachsenen ist, wird eine galaktosearme Diät bei Patienten mit einer Duarte-D2-Variante von manchen Autoren aber noch zumindest innerhalb des ersten Lebensjahres empfohlen (Ng et al., 1987).

Die Notwendigkeit eines Galaktosämie-Screenings bei Neugeborenen wurde aufgrund der geringen Inzidenz der klassischen Galaktosämie immer wieder diskutiert. Schweitzer (1995) vertritt die Meinung, dass durch ein frühes Screening Todesfälle durch Galaktosämie verhindert werden können.

Honeyman et al. hingegen vertreten die gegenteilige Meinung, da die Ergebnisse des Screenings in der Regel nicht innerhalb der ersten 4-5 Lebenstage vorliegen und somit frühe Todesfälle in den ersten Lebenstagen selbst durch ein Screening nicht verhindert werden können (Honeyman et al., 1993). Vergleichsdaten zwischen Ländern mit und ohne Screening (Schottland und Irland versus England und Wales) zeigen, dass die Diagnose einer Galaktosämie in der Gruppe der gescreenten Patienten früher gestellt werden konnte als in der nicht gescreenten Gruppe und somit die Dauer der Akutphase der Erkrankung durch den Beginn einer Diät verkürzt werden konnte. Da das Langzeit-Outcome der Patienten, entgegen früherer Meinungen, jedoch nicht vom Beginn einer Diät abhängt, ist ein Neonatalscreening aus diesem Grund aus Sicht von Honeyman et al. nicht erforderlich. Allerdings ist in Ländern ohne Screening eine entsprechende klinische Aufmerksamkeit der Pädiater unbedingt notwendig (Honeyman et al., 1993; Schweitzer-Krantz, 2003).

Diese Arbeit zeigt, dass eine differenzierte Betrachtung der heterogenen Gruppe der Varianten durchaus sinnvoll ist, da bereits eine geringfügige Erhöhung der residualen GALT-Aktivität zu signifikanten und auch klinisch relevanten Änderungen in der Stoffwechseleinstellung führt. In Kapitel 3 konnte gezeigt werden, dass bereits ab einer Enzymaktivität von >1 µmol x h^{-1} x g_{Hb}^{-1} (>5% der Norm) nahezu normwertige Galaktose- und Galaktitol-Konzentrationen im Plasma- und im Urin vorliegen. Aus klinischer Sicht kann dies bedeuten, dass diese Patienten vermutlich phänotypisch weitgehend gesund sind und lediglich einer nur sehr moderaten oder gar keiner diätetischen Behandlung bedürfen.
Die Patienten mit einer varianten Form der Galaktosämie, die keine Duarte-D2-Varianten sind, stellen somit offenbar, die Stoffwechselsituation betreffend, ein Übergangskollektiv von der klassischen schweren Form der Galaktosämie zur phänotypisch gesunden Duarte-D2-Variante mit einer GALT-Aktivität in den Erythrozyten von ca. 25% der Norm und schließlich zu den phänotypisch gesunden Heterozygoten mit einer Enzymaktivität von etwa 50% der Norm dar.

Obligat heterozygote Eltern und Normalpersonen

Die Ergebnisse zeigten, dass sich phänotypisch gesunde Heterozygote und Normalpersonen in ihren Metabolit-Konzentrationen im Plasma und im Urin nicht unterschieden. Aus diesem Grunde wurden Heterozygote und Normalpersonen in einer gesunden Kontrollgruppe zusammengefasst.

4.2 Renale Ausscheidung von Galaktosemetaboliten

Die primären Parameter zur Charakterisierung der renalen Ausscheidung von Galaktose und ihren Metaboliten stellten die fraktionelle renale Exkretion bzw. die tubuläre Reabsorption dar.

Eine Altersabhängigkeit dieser beiden Parameter konnte weder für die Galaktose noch für Galaktitol oder Galaktonat bei Patienten mit klassischer Galaktosämie festgestellt werden. Ebenso wenig konnte eine Altersabhängigkeit in der Gruppe der Patienten mit varianter Galaktosämie und bei gesunden Probanden gesehen werden.

Im Folgenden wird die Charakteristik der renalen Ausscheidung für jeden Metaboliten gesondert dargestellt und die möglichen Transportmechanismen für die Reabsorption von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat in der Niere diskutiert.

Galaktose

Die fraktionelle renale Exkretion von Galaktose bei Patienten mit klassischer Galaktosämie war mit im Mittel 9% sehr gering, der größte Teil der Galaktose wurde im proximalen Tubulus rückresorbiert (> 90%). Dabei unterschied sich die fraktionelle renale Exkretion und tubuläre Reabsorption von Galaktose bei Patienten mit klassischer Galaktosämie nicht signifikant von den Ergebnissen bei den beiden anderen Untersuchungsgruppen. Auch bei Patienten mit varianter Galaktosämie und Normalpersonen wurde der größte Teil der Galaktose (etwa 80%) im proximalen Tubulus rückresorbiert.

In Untersuchungen zum Zuckertransport in der Niere konnten die luminalen von den basolateralen Transportern unterschieden werden. Bei beiden Transportsystemen handelt es sich um einen gerichteten Transport jeweils in die Tubuluszelle und anschließend in das Plasma.

Eine Natrium-Abhängigkeit des luminalen Zuckertransportes sowohl für die Glukose als auch für die Galaktose wurde in den 60er und 70er Jahren von verschiedenen Autoren zunächst in Tierversuchen bei Hunden und Kaninchen postuliert (Kleinzeller et al., 1967; Kleinzeller & Kotyk, 1961; Silverman et al., 1970; Oulianova & Berteloot, 1996). Im Jahr 1987 wurden die Natrium-abhängigen Zucker-Transporter schließlich als Sodium dependent Glucose Transporter (SGLT) bezeichnet (Hediger et al., 1987).
In vielen Studien ist der Natrium-abhängige Glukose-Transport weiter charakterisiert und die Substrat-Spezifität näher untersucht worden (Semenza et al., 1984; Berteloot & Semenza, 1990; Silverman, 1991; Wright, 1993). Es konnten Transportmechanismen sowohl mit einer hohen als auch mit einer niedrigen Affinität für D-Glukose und D-Galaktose unterschieden werden (Moran et al., 1982).
Der luminale Transporter mit niedriger Affinität (SGLT2) wurde dabei vor allem im S1- und S2-Segment des proximalen Tubulus gefunden, die Transportrate war für beide Monosaccharide im Tierversuch bei Schweinen und Kaninchen sehr gering (Turner & Moran, 1982a; Turner & Moran, 1982b; Turner & Moran, 1982c; Mackenzie et al., 1994; Oulianova & Berteloot, 1996;).
Weder der humane SGLT2 noch der SGLT2 der Ratte konnten Galaktose transportieren (Rabito & Ausiello, 1980; Turner & Moran, 1982b; Moran et al., 1982; Kanai et al., 1994; Hediger et al., 1995; Oulianova & Berteloot, 1996).

Der luminale Transporter mit hoher Affinität (SGLT1) war hauptsächlich im S3-Segment des proximalen Tubulus lokalisiert. Die Affinität für D-Galaktose war im Tierversuch bei Ratten und Kaninchen ähnlich wie die Affinität für die D-Glukose (Birnir et al., 1991; Turner & Moran, 1982b; Hediger & Rhoads, 1994; Kanai et al., 1994; Oulianova & Berteloot, 1996). Diez-Sampedro et al. (2001)

und Wright et al. (2001) konnten schließlich auch für den SGLT1 beim Menschen eine Substrat-Spezifität für die Galaktose finden.
Ein weiterer Natrium-abhängiger Glukose-Transporter, der SGLT3 konnte im Tierversuch bei Schweinen keine Galaktose transportieren (Wright, 2001). Untersuchungen zur Substrat-Spezifität des SGLT3 beim Menschen sind bisher nicht publiziert.

Vorraussetzung für einen Zucker-Transport war eine D-Konfiguration der Monosaccharide (Silverman et al., 1970; Aronson & Sacktor, 1974; Silverman & Black, 1975). Ob auch eine Abhängigkeit der Zucker-Reabsorption zwischen dem α-Monomer oder dem β-Monomer, also eine Abhängigkeit von der Mutarotase besteht, ist bisher beim Menschen nicht untersucht worden. Im Tierversuch zeigten sich hierzu unterschiedliche Ergebnisse bei verschiedenen Spezies, so dass ein Rückschluss auf eine Mutarotase-Abhängigkeit beim Menschen nicht möglich ist (Bailey et al., 1969; Hill & Cowart, 1967; Elsas et al., 1970; Silverman et al., 1970).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Natrium-abhängige Galaktose-Transport an der luminalen Tubulusmembran beim Menschen nach aktuellem Kenntnisstand ausschließlich über den SGLT1 erfolgen dürfte.

Neben dem Natrium-abhängigen Glukose-Transport konnten auch nicht Natrium-abhängige Zucker-Transporter, die als GLUT (Glucose transporter) bezeichnet wurden, gefunden werden. GLUT sind im Gegensatz zu den SGLT keine aktiven Transporter. Der Zucker-Transport erfolgt über die erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. Die GLUT sind in der Niere ausschließlich an der basolateralen Membran der Tubuluszellen lokalisiert. Ein Vorkommen an der luminalen Bürstensaum-Membran wurde nicht gefunden (Thorens et al., 1990).
Von Silverman wurde schon im Jahr 1977 vermutet, dass an der basolateralen Tubulusmembran lediglich ein einziger Zucker-Transportmechanismus existiert. Abgesehen von der Familie der GLUT ist dort bisher auch kein anderer Zucker-

Transportmechanismus in der Literatur beschrieben. Mittlerweile sind über 10 verschiedene Isoformen des GLUT bekannt. Dabei werden die einzelnen GLUT jeweils in verschiedenen Geweben exprimiert und haben eine unterschiedliche Substrat-Spezifität, wobei einige aber noch nicht einmal Glukose als Substrat erkennen können.

Sowohl in der Niere von Säugetieren als auch beim Menschen gelang der Nachweis von GLUT1 sowie auch von GLUT2, GLUT3 und GLUT 5 (Fukumoto et al., 1988; Kayano et al., 1988; Bell et al., 1993; Olson & Pessin, 1996). Die Substrat-Spezifität der jeweiligen Transporter war sehr unterschiedlich. Ein Galaktose-Transport konnte dabei für den GLUT1, GLUT3 und den GLUT2 nachgewiesen werden (Gould et al., 1991; Bell et al., 1993; Colville et al., 1993). Letzterer transportierte neben Galaktose und Glukose auch Fruktose (Bell et al., 1993; Colville et al., 1993). Über die Affinität des GLUT2 für die Galaktose ist bisher nichts bekannt. Die Affinität für die Glukose ist gering.
Der GLUT5 wurde als reiner Fruktose-Transporter, der sowohl im Darm als auch in der Niere vorkommt, identifiziert (Burant et al., 1992; Davidson et al., 1992; Blakemore et al., 1995). Weder Glukose noch Galaktose wurden in nennenswerten Mengen vom GLUT5 transportiert (Burant et al., 1992; Bell et al., 1993; Miyamoto et al., 1994).
Ein Glukose- oder Galaktose-Transport konnte weder für den GLUT6 noch für den GLUT7 nachgewiesen werden. Es stellte sich im Verlauf heraus, dass es sich beim GLUT6 um ein Pseudogen handelt (Kayano et al., 1990). Der GLUT7 konnte von Burchell (1998) als ein Cloning-Artefakt identifiziert werden (Burchell, 1998).
Der GLUT9 ist bei Mäusen ebenso wie beim Menschen in der Niere lokalisiert und transportiert Glukose (Phay et al., 2000; Keembiyehetty et al., 2006). Eine Substrat-Spezifität für Galaktose ist bisher nicht beschrieben worden.
Der Glukose-Transport des GLUT10 wurde von Galaktose inhibiert, was darauf schließen lässt, dass auch Galaktose als Substrat erkannt wird (Dawson et al., 2001). Die Affinität des GLUT10 für die Glukose ist dabei höher als die von

GLUT4 und GLUT8, die zuvor als die Glukose-Transporter mit der höchsten Affinität beschrieben wurden. Die Affinität für Galaktose ist nicht bekannt.
Eine renale Expression des GLUT8 konnte nicht gefunden werden (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b), ebenso wenig kam der GLUT4 in der Niere vor (Fukumoto et al., 1989).

Von vielen Autoren wurden die Glukose-Transporter sowohl an der basolateralen als auch an der luminalen Tubulusmembran im Tierversuch daraufhin untersucht, welche Konfigurationen die Monosaccharide aufweisen mussten, um als Substrat erkannt zu werden. So konnte von Kolinska (1970) eine Interaktion des basolateralen Transporters bei der Ratte mit der OH-Gruppe an C2 eines Substrates gefunden werden, an der luminalen Membran war sowohl das Vorhandensein einer OH-Gruppe an C2 und C6 von Bedeutung (Kolinska, 1970). Dabei war die D-Konfiguration der OH-Gruppe an C2 für den natrium-abhängigen Transport essentiell wichtig (Ullrich et al., 1974; Ullrich & Papavassiliou, 1985). Auch der Pyranose-Ring mit den Hydroxyl-Gruppen an C2, C3 und C4 war wichtige Vorraussetzung für die tubuläre Reabsorption von Monosacchariden in der Niere (Silverman et al., 1970; Roigaard-Petersen et al., 1986). Die genannten Vorraussetzungen erfüllen sowohl die D-Glukose als auch die D-Galaktose.
Nach bisherigem Wissensstand stehen keine spezifischen Transporter in der Niere zur Verfügung, die ausschließlich D-Galaktose transportieren. Der einzige Weg der Reabsorption von Galaktose in der Niere geschieht somit aller Wahrscheinlichkeit nach ausschließlich über den SGLT1 an der luminalen Membran und über den GLUT 1-3 und den GLUT10 an der basolateralen Membran. Die Galaktose konkurriert im proximalen Tubulus an den Transport-Proteinen mit der Glukose, wobei eine vergleichbar hohe Affinität zumindest des SGLT1 für beide Monosaccharide beschrieben ist (Diez-Sampedro et al., 2001; Wright, 2001; Eskandari et al., 2005).

Galaktitol

Die fraktionelle renale Exkretion und die tubuläre Reabsorption von Galaktitol waren in allen drei Untersuchungsgruppen sehr ähnlich. Die fraktionelle renale Exkretion lag im Mittel mit etwa 60% signifikant höher als die der Galaktose. Es wurde demnach deutlich weniger Galaktitol als Galaktose in der Niere rückresorbiert. Dies war zu erwarten, da die renale Ausscheidung von Galaktitol, welches ein Stoffwechselendprodukt ist, die einzige Möglichkeit der Elimination dieses potentiell toxischen Metaboliten ist. Da aber dennoch eine geringe tubuläre Reabsorption von Galaktitol gefunden werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass Transportmechanismen in der Niere für die Rückresorption von Galaktitol vorhanden sein müssen.

Es sind verschiedene Untersuchungen von unterschiedlichen Autoren zum renalen Polyol-Transport durchgeführt worden. Allerdings konnte keine Publikation gefunden werden, die spezifisch den renalen Galaktitol-Transport untersucht hat. Zunächst werden daher die bekannten Polyol-Transporter aufgezeigt. Anhand ihrer Substrat-Spezifität wird die Möglichkeit eines Galaktitol-Transportes diskutiert.

Eine tubuläre Reabsorption von D-Galaktitol (und D-Glucitol) an der luminalen Tubulusmembran konnte sowohl für die bekannten Natrium-abhängigen Glukose-Transporter als auch für den myo-Inositol- (bzw. Scyllitol-)Transporter im Tierversuch ausgeschlossen werden (Kleinzeller et al., 1976; Takenawa & Tsumita, 1974a; Takenawa & Tsumita, 1974b; Kleinzeller et al., 1980). Entsprechend konnte auch keine Inhibierung der tubulären Reabsorption des Polyols 1,5-Anhydro-D-Glucitol und des myo-Inositols durch Galaktose nachgewiesen werden (Takenawa & Tsumita, 1974a; Takenawa & Tsumita, 1974b; Yamanouchi et al., 1996; Tazawa et al., 2005;).

Eine kompetitive Hemmung des natrium-abhängigen myo-Inositol-Transportes über den SMIT1 und SMIT2 durch Glukose konnte festgestellt werden, ebenso wurde Chiro-Inositol transportiert (Whiteside et al., 1991; Coady et al., 2002).

Galaktose wurde als Substrat nicht erkannt (Diez-Sampedro et al., 2001). Ob ein Galaktitol-Transport über die Natrium-abhängigen myo-Inositol-Transporter und den Protonen-abhängige HMIT erfolgt, ist nicht bekannt, da hierzu keine spezifischen Untersuchungen erfolgten (You et al., 1995; Coady et al., 2002).
Eine einfache Diffusion des Galaktitols oder der Transport per Endozytose erscheint als Mechanismus der Reabsorption unwahrscheinlich, da diese Möglichkeiten zumindest für das Sorbitol ausgeschlossen werden konnten (Siebens & Spring, 1989; Chatzilias & Whiteside, 1994).

Schüttert et al. beschrieben 2002 einen neuen Sorbitol-Transporter bei Ratten. Dieser neue Transporter kam in den interstitiellen Zellen des inneren Nierenmarkes vor und unterschied sich von der Sorbitol-Permease (Garty et al., 1991) und allen bisher bekannten Glukose-Transportern (sowohl SGLT als auch GLUT). Es zeigte sich eine Inhibierung des Transporters durch einige Zucker und Polyole. Neben Sorbitol (Hydroxyl-Gruppe) wurden auch Glukose (Aldose-Form) und Glukonsäure (Carbonsäuren) transportiert. Fruktose und Galaktose wurden nicht erkannt, ebenso wenig zyklische Substrate wie myo-Inositol (Schüttert et al., 2002). Ein möglicher Transport von Galaktitol und Galaktonat wurde nicht untersucht. Aufgrund der Konfiguration der Hydroxylgruppe an C4 ist ein Transport von Galaktitol und Galaktonat jedoch unwahrscheinlich. Bedauerlichweise konnte keine weitere Publikation der Arbeitsgruppe von Schüttert gefunden werden, die weitere Informationen über diesen Transporter lieferte. Es bleibt zu berücksichtigen, dass bisher keine Untersuchungen dieses Transporters beim Menschen durchgeführt wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum Galaktitol-Transport in der Niere und anderen Geweben in der Literatur bisher nichts bekannt ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass die bekannten Glukose-Transporter für die tubuläre Reabsorption von Galaktitol verantwortlich sind, ist aufgrund der bisherigen Untersuchungen sehr unwahrscheinlich.

Es konnte kein Nachweis für einen Galaktitol-Transport über den Sorbitol- oder die myo-Inositol-Transporter gefunden werden. Auch die Diffusion und Endozytose scheinen als Transportmechanismus nicht wahrscheinlich.
Weitere Untersuchungen zum renalen Galaktitol-Transport an der luminalen Tubulusmembran sind also in Zukunft notwendig.

Galaktonat

Auch für das Galaktonat wurde eine tubuläre Reabsorption von im Mittel etwa 30% gefunden, so dass Transport-Mechanismen zur Reabsorption dieses Metaboliten in der Niere vorhanden sein müssen. Es konnte jedoch keine Studie gefunden werden, in der ein Transporter, der ausschließlich Zuckersäuren als Substrat erkennt, beschrieben wurde. Auch im Rahmen der zahlreichen Studien zum Glukose-Transport wurden die SGLTs bzw. GLUTs nicht hinsichtlich eines Zuckersäure-Transportes untersucht. Aufgrund der strukturellen Substrat-Eigenschaften, die Voraussetzung für den luminalen und basolateralen Glukose-Transport sind, scheint ein Zuckersäuretransport über diese Mechanismen sehr unwahrscheinlich (Kolinska, 1970; Silverman et al., 1970; Roigaard-Petersen et al., 1986).

Der von Schüttert et al. (2002) beschriebene Sorbitol-Transporter hat im Tierversuch zumindest Glukonsäure transportiert. Ein Galaktonat-Transport ist jedoch aufgrund der Konfiguration der Hydroxylgruppe an C4 nicht wahrscheinlich.

Die Reabsorption von Galaktonat über tubuläre Anionen-Transporter oder Monocarboxylat-Transporter ist als weiterer Transportmechanismus vorstellbar.
Organische Anionen sind eine heterogene Substanzgruppe, bestehend aus einem Kohlenstoff-Atom-Gerüst und einer negativen Netto-Ladung bei physiologischem pH-Wert (Sekine et al., 2000). Die renalen Anionen-Transporter (organic anion transporter, OAT) spielen bei der Elimination von organischen Säuren eine große Rolle (Sweet et al., 2003). Die bekannten

renalen Anionen-Transporter beim Menschen, OAT1 bis OAT3, sind in erster Linie sekretorische Transporter, zum Teil Natrium-abhängig und ausschließlich in der basolateralen Tubulusmembran lokalisiert (Hosoyamada et al., 1999; Inui et al., 2000; Cha et al., 2001; Enomoto et al., 2002; Motohashi et al., 2002; Sweet et al., 2003; Hasannejad et al., 2004).

Ein luminaler Anionen-Transport konnte erst spät sowohl im Tierversuch (OAT-K2) als auch beim Menschen (OAT4) nachgewiesen werden, nachdem über die Funktionsweise und Substrat-Spezifität des luminalen Anionen-Transporters Anfang der 90er Jahren noch debattiert wurde (Pritchard & Miller, 1993). Sowohl eine Reabsorption als auch eine Sekretion über den OAT-K2 der Ratte konnte für verschiedene organische Anionen nachgewiesen werden (Masuda et al., 1999; Inui et al., 2000). Eine Reabsorption von Galaktonat über den luminalen OAT-K2 wurde zwar bisher nicht untersucht, ist aber durchaus vorstellbar. Beim Menschen konnte der OAT4 an der luminalen Membran nachgewiesen werden (Babu et al., 2002). Ob der OAT4 für den luminalen Transport von Galaktonat verantwortlich ist, ist bisher nicht untersucht worden.

Eine interessante Beobachtung konnte von Doege et al. (2000) gemacht werden. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass beim renalen Anionen-Transporter OAT1 in zwei transmembranären Helices Arginine an einer ähnlichen Stelle wie beim GLUT9 vorkommen (Sweet et al., 1997). Doege spekulierte daraufhin, dass der GLUT9 aufgrund dieser Eigenschaft ein Zucker-Anionen-Transporter sein könnte (Doege et al., 2000a). Weitere Untersuchungen zur Überprüfung dieser Hypothese konnten allerdings in der Literatur nicht gefunden werden.

Durch welche genauen Mechanismen oder Transporter die tubuläre Reabsorption von Galaktonat in der Niere geschieht ist, wie beim Galaktitol, bisher nicht genauer untersucht worden und bleibt offen.
Anhand von Abbildung 8 in Kapitel 3 könnte aufgrund der ähnlichen Charakteristik der fraktionellen renalen Exkretion von Galaktitol und Galaktonat zumindest vermutet werden, dass die beiden Metabolite durch denselben

Transportmechanismus reabsorbiert werden. Aufgrund der Ergebnisse der Literaturrecherche bleibt diese Vermutung jedoch letztendlich spekulativ.

4.3 Bedeutung der renalen Elimination

Der Stellenwert der renalen Elimination von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat soll nun, auch im Zusammenhang mit der endogenen Galaktose-Bildung, am Beispiel eines erwachsenen Patienten mit klassischer Galaktosämie dargestellt werden.

Die exogene Galaktose-Zufuhr beträgt unter einer galaktosearmen Diät noch etwa 5 µmol/kg Körpergewicht/Tag. Die totale endogene Galaktose-Bildung hingegen liegt mit etwa 240 µmol/kg Körpergewicht/Tag um ein Vielfaches höher (Schadewaldt et al., 2004; Kamalanathan, 2005).

Durch *in vivo*-Untersuchungen konnte abgeschätzt werden, dass bei erwachsenen Patienten mit klassischer Galaktosämie etwa zwei Drittel der gesamten extrahepatisch gebildeten Galaktose direkt durch die residuale GALT-Aktivität in den Geweben oxidativ verstoffwechselt werden konnten. Etwa 25% der endogen gebildeten Galaktose wurde in das Plasma-Kompartiment freigesetzt und schließlich in der Leber abgebaut. Nur etwa 10% wurden renal eliminiert (Schadewaldt et al., 2004). Diese Angaben stimmen sehr gut mit den Ergebnissen dieser Studie überein. Die renale Ausscheidung von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat konnte mit Hilfe der gemessenen Metabolit- und Kreatinin-Konzentrationen im Plasma und Urin in dieser Studie auf insgesamt etwa 27 µmol/kg Körpergewicht/Tag (etwa 10% der totalen endogen gebildeten Galaktose) geschätzt werden.

Die Galaktitol-Ausscheidung machte dabei mit ca. 21 µmol/kg Körpergewicht/Tag, also etwa 80% der Gesamt-Ausscheidung den größten Teil aus, gefolgt von Galaktonat mit etwa 5 µmol/kg Körpergewicht/Tag, entsprechend einem Anteil von 18%. Die Ausscheidung von Galaktose war im Vergleich dazu mit <1 µmol/kg Körpergewicht/Tag, entsprechend einem Anteil von 2% sehr gering.

Beim Galaktitol handelt es sich um ein Stoffwechselendprodukt, das nicht weiter abgebaut werden kann. Die renale Ausscheidung ist somit die einzige Möglichkeit, diesen potenziell toxischen Metaboliten zu eliminieren.
Die Bedeutung des oxidativen Abbaus von Galaktonat über den D-Galaktonat-Weg wird in der Literatur noch diskutiert, ist aber vermutlich von untergeordneter Bedeutung (Cuatrecasas & Segal, 1966; Holton et al., 2001). Auch für das Galaktonat ist die Ausscheidung über die Niere nach aktuellem Kenntnisstand die wesentliche Möglichkeit der Elimination.

Bei gesunden Erwachsenen ist die totale endogene Galaktosebildung höchstwahrscheinlich identisch mit der totalen endogenen Galaktosebildung bei den Patienten, jedoch ist die extrahepatische Galaktosefreisetzung bei Gesunden sehr viel niedriger als bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (Kamalanathan, 2005). Nur etwa 0.2 µmol/kg Körpergewicht/Tag der totalen endogen gebildeten Galaktose wurden als Galaktose und 0.4 µmol/kg Körpergewicht/Tag wurden in Form des Metaboliten Galaktitol ausgeschieden. Die endogen gebildete sowie die exogen durch Nahrung zugeführte Galaktose werden durch die Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase nahezu vollständig in der Leber oxidativ abgebaut (Kamalanathan, 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diätetisch behandelten Patienten die renale Elimination von Galaktose-Äquivalenten insgesamt nur von untergeordneter Bedeutung ist. Bei Gesunden hat die renale Elimination der Galaktose und ihrer Metabolite praktisch keine quantitative Bedeutung.

4.4 Schlussfolgerung

Bei der Gruppe der Patienten dieser Studie mit klassischer Galaktosämie handelte es sich um ein genotypisch, enzymotypisch und metabolisch weitgehend homogenes und diätetisch gut eingestelltes Kollektiv. Eine weitere Patientengruppe mit varianter Form der Galaktosämie war ein hinsichtlich der

GALT-Aktivität heterogenes Kollektiv. Heterozygote und gesunde Probanden konnten als eine Gruppe von phänotypisch Gesunden zusammengefasst werden.

Eine tubuläre Reabsorption von Galaktose, Galaktitol und Galaktonat konnte in allen drei Untersuchungsgruppen gefunden werden. Die tubuläre Reabsorption von Galaktose war dabei mit ca. 90% vergleichsweise hoch (Galaktitol 38%, Galaktonat 31%). Es zeigte sich für keinen Metaboliten eine Altersabhängigkeit der Exkretionsraten. Ebenso wenig konnten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen gefunden werden.

Die Reabsorption der Galaktose geschieht an der luminalen Büstensaummembran allein über den SGLT2, an der basolateralen Membran über die GLUT1 bis 3 und den GLUT10. Im Hinblick auf die Menge an endogen freigesetzter Galaktose spielt die renale Elimination von Galaktose bei Patienten mit klassischer Galaktosämie eine unterordnete Rolle.

Galaktitol und Galaktonat werden hauptsächlich renal ausgeschieden. Der Mechanismus der Reabsorption von Galaktitol und Galaktonat im proximalen Tubulus ist bisher nicht spezifisch untersucht worden und bleibt unklar. Ein Transport über die Glukose-Transport-Proteine ist unwahrscheinlich. Es bleibt ebenso offen, warum eine Reabsorption der Metabolite erfolgt, da es sich primär um Stoffwechselendprodukte handelt.

Die Bedeutung der renalen Elimination von Galaktosemetaboliten bei Patienten mit klassischer Galaktosämie unter Diättherapie liegt bei etwa 10% der gesamten Galaktose-Belastung und ist somit quantitativ von eher untergeordneter Bedeutung.

5 Literaturverzeichnis

1. Acosta PB, Gross KC (1995) Hidden sources of galactose in the environment. Eur J Pediatr 154 (Suppl 2): 87-92.

2. Aronson PS, Sacktor B (1974) Transport of D-glucose by brush border membranes isolated from the renal cortex. Biochim Biophys Acta 356: 231-243.

3. Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, Cha SH, Sekine T, Sakthisekaran D, Endou H (2002) Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. Biochim Biophys Acta 1590: 64-75.

4. Bailey JM, Fishman PH, Mulhern S (1969) Studies on mutarotases. IV. Mutarotase in kidneys of saltwater versus freshwater fish. Proc Soc Exp Biol Med 131: 861-863.

5. Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW (1993) Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. J Biol Chem 268: 19161-19164.

6. Belman AL, Moshe SL, Zimmerman RD (1986) Computed tomographic demonstration of cerebral edema in a child with galactosemia. Pediatrics 78: 606-609.

7. Berry GT, Moate PJ, Reynolds RA, Yager CT, Ning C, Boston RC, Segal S (2004) The rate of de novo galactose synthesis in patients with galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. Mol Genet Metab 81: 22-30.

8. Berteloot A, Semenza G (1990) Advantages and limitations of vesicles for the characterization and the kinetic analysis of transport systems. Methods Enzymol 192: 409-437.

9. Beutler E, Baluda MC, Sturgeon P, Day R (1965) A new genetic abnormality resulting in Galactose-1-phosphate Uridyltransferase Deficiency. Lancet 1: 353-354.

10. Birnir B, Loo DD, Wright EM (1991) Voltage-clamp studies of the Na+/glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine. Pflugers Arch 418: 79-85.

11. Blakemore SJ, Aledo JC, James J, Campbell FC, Lucocq JM, Hundal HS (1995) The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. Biochem J 309: 7-12.

12. Bosch AM, Bakker HD, van Gennip AH, van Kempen JV, Wanders RJ, Wijburg FA (2002) Clinical features of galactokinase deficiency: a review of the literature. J Inherit Metab Dis 25: 629-634.

13. Bosch AM, Ijlst L, Oostheim W, Mulders J, Bakker HD, Wijburg FA, Wanders RJ, Waterham HR (2005) Identification of novel mutations in classical galactosemia. Hum Mutat 25: p502.

14. Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO (1992) Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. J Biol Chem 267: 14523-14526.

15. Burchell A (1998) A re-evaluation of GLUT 7. Biochem J 331: p973.

16. Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, Devaskar SU, Moley KH (2000) GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. Proc Natl Acad Sci USA 97: 7313-7318.

17. Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, Endou H (2001) Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. Mol Pharmacol 59: 1277-1286.

18. Chatzilias AA, Whiteside CI (1994) Cellular mechanisms of glucose-induced myo-inositol transport upregulation in rat mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol 267: 459-466.

19. Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG, Lapointe JY (2002) Identification of a novel Na+/myo-inositol cotransporter. J Biol Chem 277: 35219-35224.

20. Cockcroft DW, Gault MH (1976) Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 16: 31-41.

21. Colville CA, Seatter MJ, Jess TJ, Gould GW, Thomas HM (1993) Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in Xenopus oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. Biochem J 290: 701-706.

22. Cuatrecasas P, Segal S (1966) Galactose conversion to D-xylulose: an alternate route of galactose metabolism. Science 153: 549-551.

23. Cusworth DC, Dent CE, Flynn FV (1955) The amino-aciduria in galactosaemia. Arch Dis Child 30: 150-154.

24. Dahlqvist A (1983) D-Galaktose-1-Phosphat. In: Methods of Enzymatic Analysis. Editors: Bergmeyer HU, Grassl M. Verlag Chemie, Weinheim: pp 297-303.

25. Davidson NO, Hausman AM, Ifkovits CA, Buse JB, Gould GW, Burant CF, Bell GI (1992) Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. Am J Physiol Cell Physiol 262: 795-800.

26. Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW (2001) Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. Mol Genet Metab 74: 186-199.

27. Diez-Sampedro A, Wright EM, Hirayama BA (2001) Residue 457 controls sugar binding and transport in the Na(+)/glucose cotransporter. J Biol Chem 276: 49188-49194.

28. Doege H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A (2000a) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. Biochem J 350:771-776.

29. Doege H, Schurmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG (2000b) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. J Biol Chem 275: 16275-16280.

30. Elsas LJ, Hillman RE, Patterson JH, Rosenberg LE (1970) Renal and intestinal hexose transport in familial glucose-galactose malabsorption. J Clin Invest 49: 576-585.

31. Elsas LJ, Langley S, Steele E, Evinger J, Fridovich-Keil JL, Brown A, Singh R, Fernhoff P, Hjelm LN, Dembure PP (1995) Galactosemia: A Strategy to identify new biochemical Phenotypes and Molecular Genotypes. Am J Hum Genet 56: 630-639.

32. Enomoto A, Takeda M, Shimoda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Yamamoto T, Sekine T, Cha SH, Niwa T, Endou H (2002) Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. J Pharmacol Exp Ther 301: 797-802.

33. Eskandari S, Wright EM, Loo DD (2005) Kinetics of the reverse mode of the Na+/glucose cotransporter. J Membr Biol 204: 23-32.

34. Ficicioglu C, Yager C, Segal S (2005) Galactitol and galactonate in red blood cells of children with the Duarte/galactosemia genotype. Mol Genet Metab 84: 152-159.

35. Fridovich-Keil JL, Jinks-Robertson S (1993) A yeast expression system for human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA 90: 398-402.

36. Fridovich-Keil JL, Langley SD, Mazur LA, Lennon JC, Dembure PP, Elsas JL (1995) Identification and functional analysis of three distinct mutations in the human galactose-1-phosphate uridyltransferase gene associated with galactosemia in a single family. Am J Hum Genet 56: 640-646.

37. Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. J Biol Chem 264: 7776-7779.

38. Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Bell GI (1988) Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. Diabetes 37: 657-661.

39. Gao G, Eguchi T, Matsumoto T, Sakura N, Ueda K (1992) Estimation of the urinary galactitol level in children by capillary gas chromatography. Hiroshima J Med Sci 41: 61-64.

40. Garty H, Furlong TJ, Ellis DE, Spring KR (1991) Sorbitol permease: an apical membrane transporter in cultured renal papillary epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 260: 650-656.

41. Gitzelmann R (1972) Deficiency of uridine diphosphate galactose 4-epimerase in blood cells of an apparently healthy infant. Preliminary communication. Helv Paediatr Acta 27: 125-130.

42. Gitzelmann R (2000) Disorders of galactose metabolism. In: Inborn metabolic Diseases. Editors: Fernandes J, Saudubray J-M, Van den Berghe G; 3rd edn: pp102-109.

43. Gitzelmann R (1965) Deficiency of erythrocyte galactokinase in a patient with galactose diabetes. Lancet 2: 670-671.

44. Gitzelmann R (1976) Screening of newborns for inborn errors of galactose metabolism. Methods and results. Monatsschr Kinderheilkd 129: 654-657.

45. Gitzelmann R, Holton JB (1980) Galactose metabolism, hereditary defects and their clinical significance. In: Inherited disorders of carbohydrate metabolism. Editors: Burman D., Holton J.B., Pennock C.A. MTP Press, Lancaster: pp61-101.

46. Gitzelmann R, Steinmann B (1984) Galactosemia: how does long-term treatment change the outcome? Enzyme 32: 37-46.

47. Gitzelmann R, Steinmann B (1973) Uridine diphosphate galactose 4-epimerase deficiency. II. Clinical follow-up, biochemical studies and family investigation. Helv Paediatr Acta 28: 497-510.

48. Goppert F (1917) Galaktosurie nach Milchzuckergabe bei angeborenem, familiärem chronischen Leberleiden. Klin Wschr 54: 473-477.

49. Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI (1991) Expression of human glucose transporters in Xenopus oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. Biochemistry 30: 5139-5145.

50. Greber-Platzer S, Guldberg P, Scheibenreiter S, Item C, Schuller E, Patel N, Strobl W (1997) Molecular heterogeneity of classical and Duarte galactosemia: mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. Hum Mutat 10: 49-57.

51. Hanus O, Zvackova I, Gencurova V, Gabriel B (1992) Relation of lactose levels in milk and indicators of mammary gland health in the first third of lactation. Vet Med (Praha) 37: 595-604.

52. Hasannejad H, Takeda M, Taki K, Shin HJ, Babu E, Jutabha P, Khamdang S, Aleboyeh M, Onozato ML, Tojo A, Enomoto A, Anzai N, Narikawa S, Huang XL, Niwa T, Endou H (2004) Interactions of human organic anion transporters with diuretics. J Pharmacol Exp Ther 308: 1021-1029.

53. Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na+/glucose co-transporter. Nature 330: 379-381.

54. Hediger MA, Kanai Y, You G, Nussberger S (1995) Mammalian ion-coupled solute transporters. J Physiol 482: 7-17.

55. Hediger MA, Rhoads DB (1994) Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. Physiol Rev 74: 993-1026.

56. Henderson MJ, Holton JB, MacFaul R (1983) Further observations in a case of uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency with a severe clinical presentation. J Inherit Metab Dis 6: 17-20.

57. Hill JB, Cowart DS (1967) Mutarotase and glucose anomers I. The contribution of various organs to the in vivo mutarotation of exogenous glucose and the clearance of glucose anomers by the kidney of the anesthetized dogs. Biochem Med 1: 62-88.

58. Holton JB, Gillett MG, MacFaul R, Young R (1981) Galactosemia. A new severe variant due to uridine diphosphate Galactose-4-epimerase deficiency. Arch Dis Child 56: 885-887.

59. Holton JB, Walter JH, Tyfield L (2001) Galactosemia. In: The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Diseases. Editors: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D, Childs D, Kinzler KW, Vogelstein B; 8th Edition McGraw Hill, New York: pp1553-1587.

60. Holzel A, Komrower GM, Wilson VK (1952) Amino-aciduria in galactosaemia. Br Med J 1: 194-195.

61. Honeyman MM, Green A, Holton JB, Leonard JV (1993) Galactosaemia: results of the British Paediatric Surveillance Unit Study, 1988-90. Arch Dis Child 69: 339-341.

62. Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H (1999) Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. Am J Physiol Renal Physiol 276: 122-128.

63. Hutchesson AC, Murdoch-Davis C, Green A, Preece MA, Allen J, Holton JB, Rylance G (1999) Biochemical monitoring of treatment for galactosaemia: biological variability in metabolite concentrations. J Inherit Metab Dis 22: 139-148.

64. Inui KI, Masuda S, Saito H (2000) Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. Kidney Int 58: 944-958.

65. Isselbacher KJ (1958) A mammalian uridinediphosphate galactose pyrophosphorylase. J Biol Chem 232: 429-444.

66. Isselbacher KJ, Anderson EP, Kurahashi K, Kalckar HM (1956) Congenital galactosemia, a single enzymatic block in galactose metabolism. Science 123: 635-636.

67. Jakobs C, Schweitzer S, Dorland B (1995) Galactitol in galactosemia. Eur J Pediatr 154 (Suppl 2): 50-52.

68. Jakobs C, Warner TG, Sweetman L, Nyhan WL (1984) Stable isotope dilution analysis of galactitol in amniotic fluid: an accurate approach to the prenatal diagnosis of galactosemia. Pediatr Res 18: 714-718.

69. Jansen G, Muskiet FA, Schierbeek H, Berger R, van der SW (1986) Capillary gas chromatographic profiling of urinary, plasma and erythrocyte sugars and polyols as their trimethylsilyl derivatives, preceded by a simple and rapid prepurification method. Clin Chim Acta 157: 277-293.

70. Kamalanathan L (2005) Endogene Galaktose-Synthese bei Galaktosämie. Inauguraldissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

71. Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, Hediger MA (1994) The human kidney low affinity Na+/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. J Clin Invest 93: 397-404.

72. Kaufman FR, Kogut MD, Donnell GN, Goebelsmann U, March C, Koch R (1981) Hypergonadotropic hypogonadism in female patients with galactosemia. N Engl J Med 304: 994-998.

73. Kaufman FR, Xu YK, Ng WG, Donnell GN (1988) Correlation of ovarian function with galactose-1-phosphate uridyl transferase levels in galactosemia. J Pediatr 112: 754-756.

74. Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Shows TB, Seino S, Bell GI (1990) Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). J Biol Chem 265: 13276-13282.

75. Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. J Biol Chem 263: 15245-15248.

76. Keembiyehetty C, Augustin R, Carayannopoulos MO, Steer S, Manolescu A, Cheeseman CI, Moley KH (2006) Mouse glucose transporter 9 splice variants are expressed in adult liver and kidney and are up-regulated in diabetes. Mol Endocrinol 20: 686-697.

77. Kleinzeller A, Dubyak GR, Mullin JM (1976) Renal sugar transport in the winter flounder. II. Galactose transport system. Am J Physiol 231: 608-613.

78. Kleinzeller A, Kolinska J, Benes I (1967) Transport of glucose and galactose in kidney-cortex cells. Biochem J 104: 843-851.

79. Kleinzeller A , Kotyk A (1961) Cations and transport of galactose in kidney-cortex slices. Biochim Biophys Acta 54:367-369.

80. Kleinzeller A, McAvoy EM, McKibbin RD (1980) Active renal hexose transport. Structural requirements. Biochim Biophys Acta 600: 513-529.

81. Kolinska J (1970) Kinetics of sugar transport in rabbit kidney cortex, in vitro: movement of D-galactose, 2-deoxy-D-galactose and alpha-methyl-D-glucoside. Biochim Biophys Acta 219: 200-209.

82. Kunz C, Rudloff S, Schad W, Braun D (1999) Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. Br J Nutr 82: 391-399.

83. Leloir LF (1951) The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. Arch Biochem 33: 186-190.

84. Leslie ND, Immerman EB, Flach JE, Florez M, Fridovich-Keil JL, Elsas LJ (1992) The human galactose-1-phosphate uridyltransferase gene. Genomics 14: 474-480.

85. Levy HL (1980) Screening for Galactosemia. In: Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism. Editors: Burman D, Holton JB, Pennocl CA. MTP Press, Lancaster: pp133-139.

86. Levy HL, Sepe SJ, Walton DS, Shih VE, Hammersen G, Houghton S, BEUTLER E (1978) Galactose-1-phosphate uridyl transferase deficiency due to Duarte/galactosemia combined variation: clinical and biochemical studies. J Pediatr 92: 390-393.

87. Mackenzie B, Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Lever JE, Wright EM (1994) SAAT1 is a low affinity Na+/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation. J Biol Chem 269: 22488-22491.

88. Mason HH, Turner ME (1935) Chronic galactosemia: report of case with studies on carbohydrates. Am J Dis Child 50: 359-374.

89. Masuda S, Ibaramoto K, Takeuchi A, Saito H, Hashimoto Y, Inui KI (1999) Cloning and functional characterization of a new multispecific organic anion transporter, OAT-K2, in rat kidney. Mol Pharmacol 55: 743-752.

90. Mayes JS, Guthrie R (1968) Detection of heterozygotes for galactokinase deficiency in a human population. Biochem Genet 2: 219-230.

91. Misumi H, Wada H, Kawakami M, Ninomiya H, Sueishi T, Ichiba Y, Shohmori T (1981) Detection of UDP-galactose-4-epimerase deficiency in a galactosemia screening program. Clin Chim Acta 116: 101-105.

92. Miyamoto K, Tatsumi S, Morimoto A, Minami H, Yamamoto H, Sone K, Taketani Y, Nakabou Y, Oka T, Takeda E (1994) Characterization of the rabbit intestinal fructose transporter (GLUT5). Biochem J 303: 877-883.

93. Moran A, Handler JS, Turner RJ (1982) Na^+-dependent hexose transport in vesicles from cultured renal epithelial cell line. Am J Physiol Cell Phys 243: 293-298.

94. Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukatsu A, Ogawa O, Inui K (2002) Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. J Am Soc Nephrol 13: 866-874.

95. Ng WG, Lee JS, Donnell GN (1987) Transferase-deficiency galactosemia and the Duarte variant. JAMA 257: 187-188.

96. Ning C, Segal S (2000) Plasma galactose and galactitol concentration in patients with galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency galactosemia: determination by gas chromatography/mass spectrometry. Metabolism 49: 1460-1466.

97. Olson AL, Pessin JE (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. Annu Rev Nutr 16: 235-256.

98. Oulianova N, Berteloot A (1996) Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric Protein? 1. Glucose transport studies. J Membr Biol 153: 181-194.

99. Palmieri M, Mazur A, Berry GT, Ning C, Wehrli S, Yager C, Reynolds R, Singh R, Muralidharan K, Langley S, Elsas L, Segal S (1999) Urine and plasma galactitol in patients with galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency galactosemia. Metabolism 48: 1294-1302.

100. Phay JE, Hussain HB, Moley JF (2000) Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). Genomics 66: 217-220.

101. Pritchard JB, Miller DS (1993) Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. Physiol Rev 73: 765-796.

102. Rabito CA, Ausiello DA (1980) Na+-dependent sugar transport in a cultured epithelial cell line from pig kidney. J Membr Biol 54: 31-38.

103. Rancour NJ, Hawkins ED, Wells WW (1979) Galactose oxidation in liver. Arch Biochem Biophys 193: 232-241.

104. Reichardt JK, Belmont JW, Levy HL, Woo SL (1992) Characterization of two missense mutations in human galactose-1-phosphate uridyltransferase: different molecular mechanisms for galactosemia. Genomics 12: 596-600.

105. Reichardt JK, Novelli G, Dallapiccola B (1993) Molecular characterization of the H319Q galactosemia mutation. Hum Mol Genet 2: 325-326.

106. Reichardt JK, Woo SL (1991) Molecular basis of galactosemia: mutations and polymorphisms in the gene encoding human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA 88: 2633-2637.

107. Riehman K, Crews C, Fridovich-Keil JL (2001) Relationship between genotype, activity, and galactose sensitivity in yeast expressing patient alleles of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. J Biol Chem 276: 10634-10640.

108. Roboz J, Kappatos DC, Greaves J, Holland JF (1984) Determination of polyols in serum by selected ion monitoring. Clin Chem 30: 1611-1615.

109. Røigaard-Petersen H, Jacobsen C, Sheikh MI (1986) Characteristics of D-galactose transport systems by luminal membrane vesicles from rabbit kidney. Biochim Biophys Acta 856: 578-584.

110. Schadewaldt P, Kamalanathan L, Hammen HW, Wendel U (2004) Age dependence of endogenous galactose formation in Q188R homozygous galactosemic patients. Mol Genet Metab 81: 31-44.

111. Schadewaldt P, Killius S, Kamalanathan L, Hammen HW, Strassburger K, Wendel U (2003) Renal excretion of galactose and galactitol in patients with classical galactosaemia, obligate heterozygous parents and healthy subjects. J Inherit Metab Dis 26: 459-479.

112. Schüttert JB, Fiedler GM, Grupp C, Blaschke S, Grunewald RW (2002) Sorbitol transport in rat renal inner medullary interstitial cells. Kidney Int 61: 1407-1415.

113. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Jr., Spitzer A (1976) A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. Pediatrics 58: 259-263.

114. Schweitzer S (1995) Newborn mass screening for galactosemia. Eur J Pediatr 154 (Suppl 2): 37-39.

115. Schweitzer S, Shin Y, Jakobs C, Brodehl J (1993) Long-term outcome in 134 patients with galactosaemia. Eur J Pediatr 152: 36-43.

116. Schweitzer-Krantz S (2003) Early diagnosis of inherited metabolic disorders towards improving outcome: the controversial issue of galactosaemia. Eur J Pediatr 162 (Suppl 1): 50-53.

117. Segal S, Berry GT (1995) Disorders of galactose metabolism. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Editors: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D. McGraw Hill. 7th edn: pp967-1000.

118. Sekine T, Cha SH, Endou H (2000) The multispecific organic anion transporter (OAT) family. Pflugers Arch 440: 337-350.

119. Semenza G, Kessler M, Hosang M, Weber J, Schmidt U (1984) Biochemistry of the Na+, D-glucose cotransporter of the small-intestinal brush-border membrane. The state of the art in 1984. Biochim Biophys Acta 779: 343-379.

120. Shin YS (1991) Galactose metabolites and disorders of galactose metabolism. In: Techniques in diagnostic human biochemical genetics. Editor: Hommes FA. New York: Wiley-Liss: pp267-283.

121. Shin YS, Gathof BS, Podskarbi T, Sommer M, Giugliani R, Gresser U (1996) Three missense mutations in the galactose-1-phosphate uridyltransferase gene of three families with mild galactosaemia. Eur J Pediatr 155: 393-397.

122. Siebens AW, Spring KR (1989) A novel sorbitol transport mechanism in cultured renal papillary epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 257: 937-946.

123. Silverman M (1991) Structure and function of hexose transporters. Annu Rev Biochem 60:757-94: 757-794.

124. Silverman M, Aganon MA, Chinard FP (1970) Specificity of monosaccharide transport in dog kidney. Am J Physiol 218: 743-750.

125. Silverman M, Black J (1975) High affinity phlorizin receptor sites and their relation to the glucose transport mechanism in the proximal tubule of dog kidney. Biochim Biophys Acta 394: 10-30.

126. Steiner RW (1984) Interpreting the fractional excretion of sodium. Am J Med 77: 699-702.

127. Sweet DH, Chan LM, Walden R, Yang XP, Miller DS, Pritchard JB (2003) Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na+ gradient. Am J Physiol Renal Physiol 284: 763-769.

128. Sweet DH, Wolff NA, Pritchard JB (1997) Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. J Biol Chem 272: 30088-30095.

129. Takenawa T, Tsumita T (1974a) Myo-inositol transport in plasma membrane of rat kidney. Biochim Biophys Acta 373: 106-114.

130. Takenawa T, Tsumita T (1974b) Properties of scyllitol transport in rat kidney slices. Biochim Biophys Acta 373: 490-494.

131. Tazawa S, Yamato T, Fujikura H, Hiratochi M, Itoh F, Tomae M, Takemura Y, Maruyama H, Sugiyama T, Wakamatsu A, Isogai T, Isaji M (2005) SLC5A9/SGLT4, a new Na+-dependent glucose transporter, is an

essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose. Life Sci 76: 1039-1050.

132. Thorens B, Cheng ZQ, Brown D, Lodish HF (1990) Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. Am J Physiol Cell Physiol 259: 279-285.

133. Turner RJ, Moran A (1982c) Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity. J Membr Biol 70: 37-45.

134. Turner RJ, Moran A (1982a) Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border membrane D-glucose transporter. J Membr Biol 67: 73-80.

135. Turner RJ, Moran A (1982b) Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. Am J Physiol Renal Physiol 242: 406-414.

136. Tyfield L, Reichardt J, Fridovich-Keil J, Croke DT, Elsas LJ, Strobl W, Kozak L, Coskun T, Novelli G, Okano Y, Zekanowski C, Shin Y, Boleda MD (1999) Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene. Hum Mutat 13: 417-430.

137. Ullrich KJ, Papavassiliou F (1985) Contraluminal transport of hexoses in the proximal convolution of the rat kidney in situ. Pflugers Arch 404: 150-156.

138. Ullrich KJ, Rumrich G, Kloss S (1974) Specificity and sodium dependence of the active sugar transport in the proximal convolution of the rat kidney. Pflugers Arch 351: 35-48.

139. van Heyningen R (1959) Formation of polyols by the lens of the rat with "sugar" cataracts. Nature 184: 194-195.

140. von Reuss A (1908) Zuckerausscheidung im Säuglingsalter. Wien Med Wochenschr 58: p799.

141. Wahlefeld AW, Siedel J (1985) Creatine and creatinine. In: Methods of enzymatic analysis. Editors: Bergmeyer J.; Große M. 3. ed. Vol. VII: pp488-506.

142. Wehrli SL, Berry GT, Palmieri M, Mazur A, Elsas L, III, Segal S (1997) Urinary galactonate in patients with galactosemia: quantitation by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Pediatr Res 42: 855-861.

143. Weinstein AN, Segal S (1968) The metabolic fate of [I-^{14}C]galactitol in mammalian tissue. Biochim Biophys Acta 156: 9-16.

144. Whiteside CI, Thompson JC, Ohayon J (1991) Myo-inositol and D-glucose transport in rat glomerular and cultured mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol 260: 138-144.

145. Wright EM (1993) The intestinal Na+/glucose cotransporter. Annu Rev Physiol 55: 575-589.

146. Wright EM (2001) Renal Na(+)-glucose cotransporters. Am J Physiol Renal Physiol 280: 10-18.

147. Yamanouchi T, Shinohara T, Ogata N, Tachibana Y, Akaoka I, Miyashita H (1996) Common reabsorption system of 1,5-anhydro-D-glucitol, fructose, and mannose in rat renal tubule. Biochim Biophys Acta 1291: 89-95.

148. You G, Lee WS, Barros EJ, Kanai Y, Huo TL, Khawaja S, Wells RG, Nigam SK, Hediger MA (1995) Molecular characteristics of Na(+)-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. J Biol Chem 270: 29365-29371.

149. Zabransky S, Zabransky M (2004) Jahresstatistik 1996-2002. http://www.neoscreening.de/DGNS/screening/Scr_Statistik.htm

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. P. Schadewaldt für die Überlassung des Themas und die stets sehr engagierte Beratung und intensive Betreuung sowohl während der Laboranalysen als auch beim Verfassen der Arbeit. Seine wertvollen und konstruktiven Anregungen, Ratschläge und die zahlreichen Diskussionen habe ich immer sehr geschätzt. Trotz der zuletzt großen räumlichen Distanz war jederzeit telefonisch oder elektronisch ein reger Kontakt möglich, der den Fortgang der Arbeit sehr positiv beeinflusst hat.

Herrn Prof. Dr. med. U. Wendel möchte ich für seine Unterstützung bei der Untersuchung der Patienten und der Probensammlung sehr herzlich danken.

Herrn Dr. rer. nat. L. Kamalanathan und Herrn Dipl.-Biol. H.-W. Hammen danke ich für ihr großes Engagement, ihre Geduld und die hervorragende kollegiale Zusammenarbeit im Labor.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Gisela und Klaus Nagel, sowie meinen Geschwistern Claudia, Carsten-Ole und Ann-Cathrin, für ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und ihre immerwährende konstruktive Unterstützung.

Meinem Mann Peter danke ich für seinen unermüdlichen liebevollen Rückhalt, mit dem er die Höhen und Tiefen während des Verfassens der Arbeit mitgetragen hat.

Meiner Freundin Steffi danke ich für eine gemeinsame und ereignisreiche Zeit im DDFI.

Ebenso möchte ich mich bei den Patienten und ihren Eltern sowie bei den gesunden Probanden ganz herzlich für die Teilnahme an der Studie bedanken.

Curriculum vitae

A. Alejandra Stollwerck, geb. Nagel

Geburtsdatum:	18.10.1978
Geburtsort:	Düsseldorf
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	Deutsch
Konfession:	evangelisch
Eltern:	Klaus Nagel, Diplom-Kaufmann Gisela Nagel, geb. Appel, Hausfrau drei Geschwister

Schullaufbahn:

1985 - 1987	Grundschule Mettmann-Metzkausen
1987 - 1990	Deutsche Schule Paris, Frankreich
1990 - 1997	Schloß-Gymnasium Benrath, Düsseldorf Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Abitur

Studium:

Frühjahr 1998	Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
3. Staatsexamen:	Herbst 2004
Ärztliche Approbation:	16.12.2004

Berufserfahrung:

Februar 2005 - Juni 2007	Assistenzärztin der Klinik für Innere Medizin, Evangelisches Jung-Stilling-Krankenhaus, Siegen Chefarzt Prof. Dr. Joachim Labenz
seit August 2007	Assistenzärztin der Klinik für Innere Medizin, Klinikum Neustadt, Neustadt in Holstein Chefarzt Prof. Dr. Boris Bätge

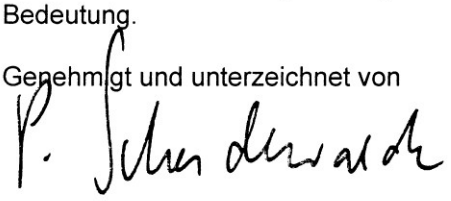
Zusammenfassung

Charakteristik der renalen Galaktosemetabolit-Exkretion bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

A. Alejandra Stollwerck

Fragestellung: Ziel der Arbeit war, die renalen Ausscheidung von Galaktosemetaboliten (Galaktose, Galaktitol, Galaktonat) bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase-Mangel) und gesunden Kontrollen vergleichend zu untersuchen.
Methodik: An der Studie nahmen 44 diätetisch behandelte Patienten mit enzymologisch, metabolisch und genotypisch vergleichbarem Schweregrad der Erkrankung sowie 44 obligat heterozygote Eltern und 36 Normalpersonen teil. Nach Übernachtfasten wurden Plasma- und Urinproben gesammelt und darin die Konzentrationen von Galaktose-metaboliten mit dem Stabilisotopen-Verdünnungsverfahren gaschromatographisch-massenspektrometrisch bestimmt. Anhand der Daten wurden dann die fraktionelle renale Exkretion (FRE) sowie die tubuläre Reabsorption (TR) als Parameter zur Beurteilung der renalen Metabolit-Ausscheidung berechnet. Bei phänotypisch Gesunden lag die Konzentration des Galaktonats im Plasma unter der Quantifizierungsgrenze, so dass hier FRE und TR nicht abgeschätzt werden konnten.
Ergebnisse: Obligat Heterozygote und Normalpersonen wiesen sehr ähnliche Ergebnisse auf. Sie wurden daher zu einer phänotypisch gesunden Kontrollgruppe zusammengefasst. Bei den Patienten war die Galaktose-Konzentration im Plasma und Urin etwa 10fach, die Galaktitol-Konzentration im Plasma etwa 50fach und die Galaktitol-Konzentration im Urin >100fach gegenüber den Kontrollen erhöht. FRE und TR der Metabolite waren weder bei Patienten noch bei Kontrollen altersabhängig. Trotz teilweise deutlich ausgeprägter quantitativer Unterschiede in der totalen täglichen Exkretionsrate ergaben sich bei FRE und TR keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen. Bei den Patienten mit klassischer Galaktosämie lag die TR für Galaktose im Mittel bei etwa 90%, die TR des Galaktitols und des Galaktonats lag mit etwa 35% deutlich niedriger.
Interpretation: Der größte Teil der renal filtrierten Galaktose wird sowohl bei Patienten mit klassischer Galaktosämie als auch bei Gesunden tubulär reabsorbiert. Der Transport der Galaktose im proximalen Tubulus wird luminal durch den SGLT2 und basolateral durch den GLUT1 bis 3 sowie den GLUT10 gewährleistet. Galaktitol und Galaktonat werden zum überwiegenden Teil mit dem Urin ausgeschieden. Die Mechanismen des transmembranären Transports dieser Metabolite im proximalen Tubulus sind bisher nicht spezifisch untersucht worden und bleiben unklar. Eine Beteiligung der Glukose-Transporter jedenfalls ist praktisch auszuschließen. Offen bleibt auch, warum bei Galaktitol und Galaktonat eine Reabsorption erfolgt, da es sich hier primär um Stoffwechselendprodukte handeln dürfte.
Quantitativ ist der Beitrag der renalen Ausscheidung an der Elimination von Galaktosemetaboliten bei Patienten mit klassischer Galaktosämie unter Diättherapie mit etwa 10% der endogen insgesamt gebildeten Menge von eher untergeordneter Bedeutung.

Genehmigt und unterzeichnet von



Prof. Dr. Peter Schadewaldt (Referent)