

**Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum  
Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al - Hasani**

**Charakteristik der renalen Galaktitol-Ausscheidung  
bei Patienten mit klassischer Galaktosämie**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Miriam Wöffler**

**2011**

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Schadewaldt

Korreferent: Prof. Dr. med. Thomas Höhn

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Galaktose-Stoffwechsel	1
1.2	Angeborene Störungen des Galaktose-Stoffwechsels	3
1.3	Zielsetzung der Arbeit	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Patienten	8
2.2	Chemikalien und Enzyme	10
2.3	Methoden	11
2.3.1	Probensammlung	11
2.3.2	Analytik der Galaktose-Metaboliten	13
2.3.3	Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase	15
2.3.4	Sonstige Analyseverfahren	17
2.3.5	Genotypisierung	17
2.4	Auswertung und Statistik	17
2.4.1	Auswertung	17
2.4.2	Statistik	18
2.4.3	Modell der Galaktitol-Ausscheidung	19
3	Ergebnisse	21
3.1	Biochemisch-molekulargenetische Charakteristik der Patienten	21
3.1.1	Biochemische Charakterisierung	21
3.1.2	Genotypisierung	23
3.2	Altersabhängigkeit der Galaktitol-Ausscheidung bei Galaktosämie	24
3.2.1	Schätzung der Referenzbereiche	24
3.2.2	Ergebnisse des Stoffwechsel-Monitorings	31
3.2.3	Relation der Leitmetaboliten in Urin und Erythrozyten	33
4	Diskussion	37
4.1	Referenzkollektiv und Referenzbereiche für die Galaktitol-Ausscheidung im Urin bei klassischer Galaktosämie	37
4.1.1	Referenzkollektiv	37
4.1.2	Modell für Referenzbereiche	38
4.2	Biochemisches Monitoring bei klassischer Galaktosämie	40
4.2.1	Galaktitol im Urin	40
4.2.2	Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten	43
4.2.3	Differentielle Betrachtung der Monitoring-Parameter	45
4.3	Schlussfolgerung	50
5	Literaturverzeichnis	52
	Danksagung	57
	Curriculum vitae	58
	Zusammenfassung	59

# 1 Einleitung

## 1.1 Galaktose-Stoffwechsel

Kohlenhydrate, Proteine und Lipide sind die wesentlichen Energielieferanten in der menschlichen Nahrung. Die quantitativ bedeutendsten Monosaccharide sind dabei D-Glukose und D-Galaktose, das C-4 Epimer der D-Glukose.

Über die Nahrung wird D-Galaktose in erster Linie über das in Milch und Milchprodukten vorkommende Disaccharid Laktose, in dem Galaktose  $\beta$ -glykosidisch mit Glukose verknüpft ist, zugeführt. D-Galaktose kommt aber auch in freier und glykosidisch gebundener Form in vielen Obst- und Gemüsesorten sowie in Fleisch vor (Acosta & Gross, 1995).

Laktose wird durch eine epithelständige  $\beta$ -Glukosidase (Laktase; EC 3.2.1.108) im Dünndarm in die Monosaccharide D-Glukose und D-Galaktose gespalten. D-Galaktose wird im Dünndarm resorbiert und hauptsächlich in der Leber verstoffwechselt (Shirazi-Beechey, 1995; Ferraris & Diamond, 1997).

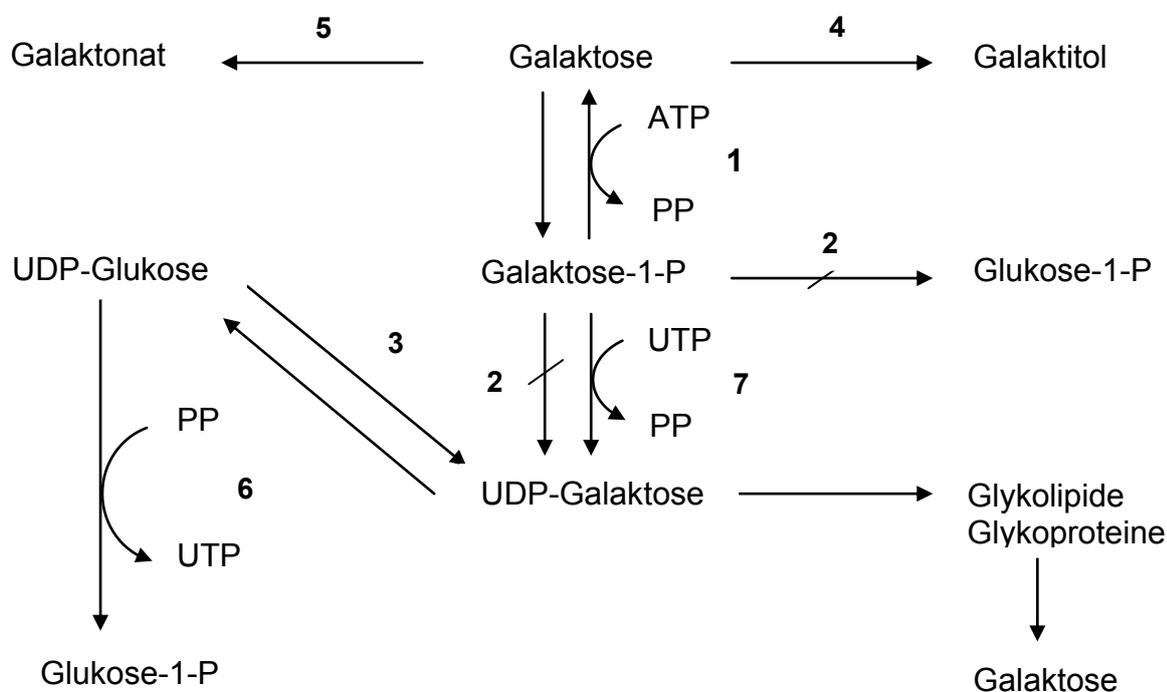
Neben der exogenen Zufuhr der D-Galaktose über die Nahrung hat die endogene Synthese freier D-Galaktose beim Abbau von Glykoproteinen und -lipiden im menschlichen Gewebe eine wichtige Bedeutung im Gesamtstoffwechsel der D-Galaktose (Gitzelmann & Steinmann, 1984; Berry et al., 2004; Schadewaldt et al., 2004).

In *in vivo* Studien konnte als ein wesentlicher Parameter der endogenen Galaktose-Bildung eine beträchtliche alters- und wachstumsabhängige Galaktose-Freisetzung aus endogenen Quellen in das Blutplasma nachgewiesen und quantifiziert werden. Dabei war die Galaktose-Freisetzungsraten bezogen auf das Körpergewicht bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen um ein Vielfaches höher und zeigte eine exponentielle Abnahme mit zunehmendem Alter. Dies lässt sich auf den erhöhten Umsatz von Glykoproteinen und -lipiden im Wachstum zurückführen.

Im Vergleich zu Gesunden weisen Patienten mit klassischer Galaktosämie erhöhte endogene Galaktose-Freisetzungsraten auf (Kamalanathan, 2005; Schadewaldt et al., 2004).

Der Abbau freier D-Galaktose erfolgt beim Gesunden fast ausschließlich über den Leloir-Stoffwechselweg (Leloir, 1951; vgl. Abbildung 1). Dabei wird D-Galaktose im ersten Schritt durch das Enzym Galaktokinase (GALK; EC 2.7.1.6) unter Verbrauch von ATP zu D-Galaktose-1-Phosphat phosphoryliert. Im zweiten Schritt wird D-

Galaktose-1-Phosphat mit UDP-D-Glukose durch die D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT; EC 2.7.7.12) zu UDP-D-Galaktose und D-Glukose-1-Phosphat umgesetzt.



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)

UDP-D-Galaktose kann alternativ auch aus dem Umsatz von D-Galaktose-1-Phosphat mit UTP durch die UDP-D-Galaktose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) hervorgehen (Isselbacher, 1958). Dieser Stoffwechselweg spielt aufgrund seiner geringen Kapazität im menschlichen Stoffwechsel jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Die entstandene UDP-D-Galaktose kann im weiteren Verlauf zur Synthese von Glykolipiden und -proteinen verwendet werden. Hauptsächlich jedoch wird sie im dritten Schritt des Leloir-Stoffwechselwegs durch die UDP-D-Galaktose-4-Epimerase (GALE; EC 5.1.3.2) zu UDP-Glukose epimerisiert, um dann über die Einschleusung in den D-Glukose-Stoffwechsel abgebaut zu werden. UDP-Glukose kann zum einen direkt zur Glykogen-Synthese verwendet werden oder zum anderen erneut als

Substrat für die D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase dienen. Das entstehende D-Glukose-1-Phosphat kann durch Umwandlung zu D-Glukose-6-Phosphat in der Phosphogluko-Mutase-Reaktion (EC 5.4.2.2) in die Glykolyse eingeschleust und so abgebaut werden.

Neben dem Leloir-Stoffwechselweg existieren noch alternative Stoffwechselwege.

D-Galaktose kann mit NADH durch das Enzym Aldosereduktase (EC 1.1.1.21) zu D-Galaktitol reduziert werden (Heyman & Kinoshita, 1965; Heyman et al., 1966). D-Galaktitol kann vom Organismus nicht weiter verstoffwechselt werden und wird daher unverändert renal ausgeschieden (Weinstein & Segal, 1968).

Ein weiterer Abbauweg der D-Galaktose, der beim Menschen wahrscheinlich nur von untergeordneter Bedeutung ist (Holton et al., 2001), wird durch die D-Galaktose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.48) katalysiert. Dabei wird die D-Galaktose zu D-Galaktonat oxidiert (Cuatrecasas & Segal, 1966). D-Galaktonat wird ebenfalls renal eliminiert oder über  $\beta$ -Ketoglutarat zu  $\text{CO}_2$  und D-Xylulose abgebaut. Die D-Xylulose kann schließlich in den Pentosephosphatzyklus einfließen.

## **1.2 Angeborene Störungen des Galaktose-Stoffwechsels**

### **Einführung**

Unter dem Begriff Galaktosämie werden drei angeborene Störungen des Galaktose-Metabolismus zusammengefasst, bei denen es aufgrund eines autosomal - rezessiv vererbten Mangels an Enzymaktivitäten zu einer gestörten Elimination von D-Galaktose kommt (Segal & Berry, 1995).

Von diesem Defekt können folgende drei Enzyme betroffen sein: die Galaktokinase (GALK), die D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT) oder die UDP-Galaktose-4-Epimerase (GALE).

Die mit einer Inzidenz von 1:40 000 in der Bundesrepublik Deutschland (Inouye et al., 1990; Schweitzer, 1995; Holton et al., 2001) häufigste Form der Galaktosämie beruht auf einer nahezu vollständig reduzierten D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität.

Ein Mangel an Galaktokinase oder UDP-D-Galaktose-4-Epimerase tritt deutlich seltener auf. Die Angaben zur Inzidenz des Galaktokinase-Mangels variieren stark und reichen von 1:40.000 bis 1:1.000.000 (Mayes & Guthrie, 1968; Levy, 1980).

Die Inzidenz für UDP-D-Galaktose-4-Epimerase-Mangel in Deutschland wird auf 1:135.000 geschätzt (Zabransky & Zabransky, 2004).

Die beiden letzteren Formen sind nicht Gegenstand der Arbeit, daher wird auf sie im Folgenden nur kurz eingegangen.

### **Galaktokinase- und UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangel**

Ein Mangel an Galaktokinase (MIM 230200) führt zu einem Anstieg der Konzentration von D-Galaktose und D-Galaktitol im Blut. In der Folge kommt zu einer Ablagerung des D-Galaktitols in Geweben, v.a. betroffen ist dabei die Augenlinse. Dies führt zur Ausbildung eines Kataraktes schon im Säuglingsalter.

Im Vergleich zur klassischen Galaktosämie werden toxische Verlaufsformen und neurologische Beeinträchtigungen bei den Patienten nicht beobachtet.

Die Therapie besteht in einer lebenslangen Restriktion der Galaktose-Zufuhr. Bei frühem Therapiebeginn in den ersten Lebenstagen kann damit eine Kataraktbildung verhindert werden (Gitzelmann, 1976; Bosch et al., 2002).

Der UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangel (MIM 230350) ist meist auf die Erythrozyten und Leukozyten beschränkt. Man bezeichnet ihn dann als so genannten peripheren pGALE-Mangel. Bei dieser Form liegt eine normale hepatische Enzymaktivität vor (Gitzelmann, 1976), die Plasmakonzentration freier D-Galaktose ist ebenfalls normal (Gitzelmann & Steinmann, 1973). Die Patienten sind meist asymptomatisch oder zeigen nur schwach ausgebildete, uncharakteristische Symptome. Eine Therapie ist meist nicht erforderlich.

Der sehr viel seltenere generalisierte gGALE-Mangel ist bisher nur bei fünf Patienten aus zwei Familien diagnostiziert worden (Gitzelmann, 2000) und geht bei diesen mit schweren Krankheitsbildern einher. Die Patienten werden bereits kurz nach der Geburt symptomatisch. Sie leiden unter anhaltendem Erbrechen, Gewichtsverlust, Ikterus infolge von Leberversagen sowie Galaktosurie. Durch Restriktion der Galaktose-Zufuhr können die akuten Symptome gemildert, die langfristigen neurologischen Defizite jedoch nicht verhindert werden (Holton et al., 1981; Henderson et al., 1983).

## Klassische Galaktosämie

Die häufigste und klinisch bedeutendste Form der Galaktosämie ist die so genannte klassische Galaktosämie (MIM 230400). Zugrunde liegt ein nahezu vollständiger Mangel an GALT-Aktivität. Typischerweise liegt die residuale Enzymaktivität in den Erythrozyten unter 2% der Norm ( $<0.5 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$ ).

Die klassische Galaktosämie wird autosomal - rezessiv vererbt. Das GALT-Gen liegt auf dem Chromosom 9 an der Stelle p13 (Reichardt & Woo, 1991) und besteht aus 11 Exons und 10 Introns (Leslie et al., 1992). Bisher wurden mehr als 150 Mutationen des GALT-Gens beschrieben (Tyfield et al., 1999). Die häufigste genetische Variante in der kaukasischen Bevölkerung ist die Mutation g.1466A>G (p. Q188R)<sup>1</sup> (Holton et al., 2001). Sie bewirkt einen nahezu völligen Ausfall der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (Fridovich-Keil & Jinks-Robertson, 1993; Fridovich-Keil et al., 1995).

Aufgrund des Stoffwechselblocks kommt es zu einer Akkumulation von D-Galaktose und Galaktose-1-Phosphat sowie zu einer gesteigerten Metabolisierung der D-Galaktose zu D-Galaktitol und D-Galaktonat über die alternativen Stoffwechselwege mit Akkumulation der potentiell toxischen Metaboliten.

An klassischer Galaktosämie erkrankte Neugeborene werden mit Beginn der Milchfütterung symptomatisch. Der Krankheitsverlauf ist gekennzeichnet durch Inappetenz, Diarrhoe, Erbrechen und in der Folge rapidem Gewichtsverlust. Die Kinder zeigen ein toxisches Krankheitsbild mit stark gestörter Leberfunktion und Ikterus sowie Nierenfunktionsstörungen bis hin zum Nierenversagen. In einigen Fällen treten in der akuten Phase auch Hirnödeme auf. Bei der überwiegenden Zahl der Patienten wird die Ausbildung von Katarakten bereits in den ersten Lebenstagen beobachtet.

Laborchemisch lassen sich erhöhte Konzentrationen von D-Galaktose und D-Galaktitol in Blut und Geweben sowie ein deutlich gesteigerter D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt der Erythrozyten nachweisen. Die renale Exkretion von D-Galaktose, D-Galaktitol und D-Galaktonat ist ebenfalls stark erhöht.

Als Ursache der Organschädigung wird die schnelle Akkumulation von D-Galaktose-1-Phosphat und D-Galaktitol in der akuten Krankheitsphase diskutiert (Belman, 1986; Holton et al., 2001). Die rasche Kataraktbildung wird auf die hohe Aldose-Reduktase-Aktivität (EC 1.1.1.21) in der Augenlinse und damit besonders stark ausgeprägter

---

<sup>1</sup> Im Folgenden werden zur Bezeichnung der genetischen Varianten die abgeleiteten Veränderungen auf genomischer DNA- und Proteinebene angegeben.

Akkumulation von D-Galaktitol zurückgeführt (van Heyningen, 1959). In unbehandelten Fällen kann der Verlauf in der Akutphase tödlich enden (Belman et al., 1986).

Aufgrund der raschen Entwicklung eines lebensbedrohlichen Krankheitsbildes ist eine möglichst schnelle Diagnosestellung unerlässlich (Schweitzer, 1995). In Deutschland wird daher bereits seit 1978 jedes Neugeborene innerhalb der ersten fünf Lebenstage im Rahmen des Neonatalscreenings auf das Vorliegen einer Galaktosämie getestet. So kann im Falle einer Erkrankung schnellstmöglich mit der Therapie begonnen werden. Diese besteht in einer lebenslangen, weitgehenden Restriktion der exogenen Galaktose-Zufuhr.

Nach der Diagnosestellung erfolgt die Kontrolle der diätetischen Compliance und Stoffwechseleinstellung aktuell über die Bestimmung des D-Galaktose-1-Phosphats in den Erythrozyten, also über ein Verfahren mit invasiver Probennahme. Kontrollen sollen regelmäßig, im ersten Lebensjahr alle 3 Monate, bis zum 14. Lebensjahr halbjährlich und anschließend jährlich durchgeführt werden (Walter et al., 1999).

Unter strenger Restriktion der exogenen Galaktose-Zufuhr lässt sich bei den Patienten ein Abfall der D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten beobachten. Aufgrund der beträchtlichen Menge endogen gebildeter Galaktose bleiben die Werte jedoch im Vergleich zu Gesunden weiterhin erhöht.

Der Behandlungszielwert für den D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten bei Patienten mit klassischer Galaktosämie liegt derzeit bei  $150 \mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$  (Walter et al., 1999), im Vergleich dazu ist bei Gesunden der D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt der Erythrozyten mit Werten von  $0-12 \mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$  sehr gering (Shin, 1991; Hutchesson et al., 1999).

Unter diätetischer Therapie kommt es schnell zu einer Rückbildung der initialen Symptome.

Im weiteren Verlauf treten jedoch trotz Restriktion der exogenen Galaktose-Zufuhr, also von der diätetischen Einstellung weitgehend unabhängig, langfristige Komplikationen auf. Dabei hat auch der Zeitpunkt des Therapiebeginns keinen Einfluss auf den langfristigen Verlauf der Erkrankung (Schweitzer-Krantz, 2003).

So zeigen die Patienten verschiedenste neurologische Symptome wie z.B. Ataxie und Tremor sowie Einschränkungen psychomotorischer und kognitiver Fähigkeiten, häufig in Form von Sprachstörungen und Rechenschwäche (Waggoner, 1990; Schweitzer et al., 1993).

Bei weiblichen Patientinnen kann es aus bisher noch ungeklärten Gründen zu einer irreversiblen Schädigung der Ovarien bereits in utero kommen, so dass diese durch einen hypergonadotropen Hypogonadismus auffällig werden und in der Regel primär infertil sind (Kaufmann et al., 1981).

Im Vergleich zu den Patientinnen weisen männliche Patienten keine gonadalen Störungen auf (Kaufmann et al., 1981; Kaufmann et al., 1988).

Als Ursache für die langfristigen, ernährungsunabhängigen Komplikationen wurde eine Autointoxikation mit Galaktose-Metaboliten aufgrund der beträchtlichen endogenen Galaktose-Bildung bei den Patienten vermutet (Gitzelmann & Steinmann, 1984). Die bereits erwähnten *in vivo* Studien untermauern diese Annahmen (Kamalanathan, 2005; Schadewaldt et al., 2004).

Trotz früher Initialisierung einer Diät und guter Stoffwechseleinstellung treten bei einer Vielzahl der Patienten Langzeitkomplikationen auf. Daher werden, neben den üblichen laborchemischen Kontrollen, spezielle Begleituntersuchungen an Stoffwechselzentren zur Überwachung der körperlichen und geistigen Entwicklung der Patienten gefordert (Schweitzer et al., 1993; Walter et al., 1999). So werden z.B. Früherkennungsuntersuchungen zur Detektion von motorischen oder sprachlichen Entwicklungsstörungen anhand standardisierter neurologischer Protokolle bei allen Patienten empfohlen. Bei präpubertären Mädchen sollten zusätzlich hormonelle Untersuchungen zur Früherkennung eines hypergonadotropen Hypogonadismus durchgeführt werden.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Als Alternative zum bisher gebräuchlichen Parameter für die Beurteilung der Stoffwechseleinstellung, dem D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten, wird seit längerer Zeit die D-Galaktitol-Konzentration im Urin als möglicher Parameter im Stoffwechsel-Monitoring bei klassischer Galaktosämie diskutiert (Roe et al., 1973; Yamazaki et al., 1991; Berry et al., 1993; Hutchesson et al., 1999; Palmieri et al., 1999; Walter et al., 1999; Schadewaldt et al., 2003).

Bisher fehlen jedoch systematische Untersuchungen zur Eignung des D-Galaktitols als Stoffwechselkontrollparameter.

Daher war das Ziel dieser Arbeit zunächst die Charakterisierung der intraindividuellen Variabilität der D-Galaktitol-Ausscheidung im Urin von Patienten mit klassischer Galaktosämie. Die intraindividuelle Variabilität wurde hinsichtlich einer möglichen Alters- und Geschlechtsabhängigkeit untersucht und mit den Ergebnissen zum konventionellen Stoffwechsellkontrollparameter, dem D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten, verglichen.

Darauf aufbauend wurden altersabhängige Erwartungsbereiche für die Konzentration von D-Galaktitol im Urin für Patienten mit guter Compliance erstellt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Im Rahmen dieser Studie wurden zwei unterschiedliche Patientenkollektive mit klassischer Galaktosämie untersucht.

Im ersten Studienabschnitt erfolgte zur Bestimmung der intraindividuellen Variabilität und Erstellung von altersabhängigen Referenzbereichen der Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie zunächst eine kontrollierte Probensammlung bei einer phänotypisch und genotypisch definierten Gruppe von Patienten mit diätetisch gut eingestellter klassischer Galaktosämie.

Anschließend wurden zur Überprüfung der Anwendbarkeit der erstellten Referenzbereiche im Rahmen des Routine-Stoffwechsel-Monitorings gewonnene Zufallsurinproben einer zweiten Patientengruppe untersucht.

Die Patientengruppe der kontrollierten Probensammlung lieferte multiple Urinproben über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen (siehe Kapitel 2.3.1). Sie umfasste insgesamt 40 Patienten mit klassischer Galaktosämie. Weibliche und männliche Patienten waren dabei nach Alter gematched (weiblich n=21, männlich n=19). Die anthropometrischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 (siehe Kapitel 3.1) zusammengefasst.

Grundlage für die Aufnahme der Patienten in die Studie war das Vorliegen einer diätetisch gut eingestellten klassischen Galaktosämie mit einer residualen GALT-Aktivität in den Erythrozyten von weniger als 2% der Norm ( $<0,5 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$ ).

Neben den Angaben der Patienten und deren regelmäßiger Teilnahme an Stoffwechsellkontrolluntersuchungen, wurde die individuelle diätetische Compliance zu Beginn der Studie anhand der Bestimmung der D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten objektiviert.

Ausschlusskriterium für die Teilnahme an der Studie war das Vorhandensein von anderen akuten oder chronischen Erkrankungen. Weitere Teilnahmebedingung war eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten oder deren Eltern zur Freiwilligkeit der Teilnahme sowie zu Art und Umfang der Studie nach entsprechender Aufklärung.

Das Untersuchungskollektiv im zweiten Studienabschnitt, die Monitoring-Gruppe, umfasste 164 Patienten (Patientinnen n=85, Patienten n=79) mit klassischer Galaktosämie. Da bei dieser Untersuchungsgruppe die Mitteilung einer extern gesicherten klassischen Galaktosämie erfolgte, wurde auf eine Bestimmung der GALT-Aktivität verzichtet.

Die Patienten sandten Urin- und Blutproben lediglich zur Stoffwechselkontrolle mittels Bestimmung des D-Galaktitols im Urin und des D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalts in den Erythrozyten ein. Eine Genotypisierung dieser Patienten wurde daher nicht durchgeführt.

Aufgrund des individuell z.T. langen Beobachtungszeitraumes von bis zu sechs Jahren können die anthropometrischen Daten dieser Gruppe nicht sinnvoll analog zur ersten Untersuchungsgruppe dargestellt werden. Einzelheiten zur molekularbiologischen und/oder biochemischen Charakterisierung der Patienten folgen in Kapitel 3.1.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und befürwortet.

**Tabelle 1** Anthropometrische Daten der Patienten mit GALT-Mangel <sup>a</sup>

Patienten	Weiblich (n = 21)	Männlich (n = 19)
Alter (J)	18.2 ± 10.3 (16.9; 4.9 – 35.4)	14.5 ± 9.2 (11.5; 2.9 – 37.7)
Größe (cm)	146 ± 24 (160; 98 – 170)	148 ± 27 (150; 98 – 191)
Gewicht (kg)	41 ± 18 (45; 12 – 68)	42 ± 22 (34; 13 – 80)

<sup>a</sup> Referenzkollektiv des ersten Studienabschnittes bei Studienbeginn angeben sind Mittelwerte ± SD sowie Median und Bereich in Klammern

## 2.2 Chemikalien und Enzyme

Falls nicht anders vermerkt, stammen alle Chemikalien in der höchsten Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Die Ionenaustauscherharze (Dowex 50WX8, H<sup>+</sup>-Form, 100-200 mesh und Dowex 1X8, Cl<sup>-</sup>-Form, 200-400 mesh) wurden von Serva (Heidelberg) bezogen.

Die alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1, aus Kalbsdarm), β-D-Galaktose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.48, aus *Pseudomonas fluorescens*), Hpa II (aus *Haemophilus parainfluenzae*, 10 U/μL), Ava II (aus *Anabeana variabilis*, 5 U/μL) und DNA-Längenstandard VIII (0.25 U/μL) wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen, die Taq-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, rekombinant, E.coli, 5 U/μL) von Qiagen (Hilden).

Die synthetischen Oligonukleotide waren von MWG-Biotech (Ebersberg). D-Galaktose-1-Phosphat (Dikaliumsalz) und UDP-Glukose (Dinatriumsalz) wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. UDP-[U-<sup>14</sup>C]Galaktose-1-Phosphat (11 Gbq/mmol) war von Biotrend (Köln).

D-[1-<sup>13</sup>C]Galaktose (97% 1-<sup>13</sup>C; 3% natürlich markiert) und D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Galaktose-Standard (98.5% U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>; 1% natürlich markiert) kamen von Promochem (Wesel, Deutschland).

D-[U-<sup>13</sup>C]Galaktitol war nicht käuflich zu erwerben und wurde, wie von Jakobs et al. (1984) beschrieben, durch Reduktion von D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Galaktose mit NaBH<sub>4</sub> hergestellt. Die Reinheit des Produkts wurde mittels GC-MS-Analyse überprüft. Die D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Galaktitol-Präparation war rein (98.5% U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) und enthielt weniger als 0.2% nicht umgesetzte D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Galaktose.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Probensammlung

#### **Multiple Urinproben und Blutproben der kontrollierten Probensammlung**

Im ersten Studienabschnitt wurden die an der Studie teilnehmenden 40 Patienten mit klassischer Galaktosämie aufgefordert, jeweils 15 Nüchternurinproben zu sammeln. Diese sollten in Abständen von 2-3 Tagen nach einer Übernachtfastenperiode von mehr als 10 Stunden gewonnen und unmittelbar nach Probengewinnung bei -20°C eingefroren werden.

Die Patientinnen sammelten im Mittel  $15 \pm 1$  Proben (Median 15; Bereich 14 - 17) über einen Zeitraum von  $42 \pm 11$  (37; 26 - 66) Tagen in mittleren Intervallen von  $3 \pm 1$  (2; 1 - 24; 24 Einzelfall) Tagen. Die Patienten sammelten im Durchschnitt  $15 \pm 1$  (15; 15 - 16) Proben in einem Zeitraum von  $39 \pm 12$  (39; 16 - 69) Tagen in Abständen von  $3 \pm 1$  (2; 1 - 24; 24 Einzelfall) Tagen (bei den beiden Einzelfällen mit erheblichem Abstand der Probensammlung handelt es sich um ein Geschwisterpaar).

Die Urinproben wurden nach Abschluss der Sammeldauer gefroren in Kühlboxen per Eilversand mit einer Transportdauer von weniger als einem Tag zum Stoffwechsellabor transportiert und dort bis zur Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Insgesamt wurden 319 Proben von den weiblichen und 287 Proben von den männlichen Patienten eingesandt.

Während der Phase der Nüchternurinprobensammlung wurde von jedem Patienten zusätzlich eine EDTA-Blutprobe zur Analyse des Galaktose-1-Phosphat-Gehaltes in den Erythrozyten und, falls bisher noch nicht erfolgt, zur Bestimmung der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität entnommen.

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert (5 min, 3500 x g, 4°C) um die Erythrozyten vom Plasma zu trennen. Anschließend wurden die

Erythrozyten zweimal mit einem äquivalentem Volumen NaCl (0.154 mol/L) gewaschen und die gepackten Erythrozyten bis zur Analyse bei -20°C tiefgefroren.

### **Einzelurinproben und Blutproben der Monitoring-Gruppe**

Im zweiten Studienabschnitt wurden Zufallsurinproben im Rahmen des Routine-Stoffwechsel-Monitorings von 164 Patienten (weiblich n=85, männlich n=79) mit klassischer Galaktosämie unter diätetischer Therapie (Monitoring-Gruppe) gewonnen. Die Urinproben wurden im Stoffwechsellabor eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Insgesamt standen uns 503 Urinproben von Patienten mit klassischer Galaktosämie zur Verfügung. Davon stammten 243 Proben von weiblichen und 260 von männlichen Patienten.

40 weibliche und 29 männliche Patienten gaben jeweils eine Urinprobe ab. Bei 14 weiblichen und 15 männlichen Patienten konnten zwei Zufallsurinproben gewonnen werden. Bei 8 weiblichen und 6 männlichen Patienten wurden jeweils drei Urinproben gesammelt. 22 weibliche und 28 männliche Patienten gaben vier bis zehn Zufallsurinproben ab. Jeweils eine Patientin und ein Patient gaben mehr als zehn Urinproben ab.

Der Zeitabstand zwischen den gesammelten Zufallsurinproben eines individuellen Patienten war dabei sehr unterschiedlich und bei jüngeren Patienten tendenziell kürzer. Bei weiblichen Patienten mit >3 Proben lag das Intervall zwischen zwei aufeinanderfolgenden Proben im Mittel bei  $0.6 \pm 0.5$  (0.5; 0.1 - 3.3) Jahren, bei den männlichen Patienten mit >3 Proben lag es bei  $0.7 \pm 0.6$  (0.6; 0.1 - 3.6) Jahren. Der mittlere Beobachtungszeitraum war variabel und lag bei Sammlung von fünf oder mehr Proben bei  $4.0 \pm 1.1$  (4.1; 1.6 - 6.3) Jahren.

Von 99% der Patienten, die Zufallsurinproben schickten, standen ebenfalls EDTA-Blutproben aus dem Untersuchungszeitraum zur Verfügung. So wurden bei 475 der insgesamt 503 Zufallsurinproben parallel EDTA-Blutproben gewonnen. Diese wurden analog zu den Blutproben der Referenzgruppe nach der Entnahme vorbereitet und bis zur Analyse bei -20°C tiefgefroren.

## 2.3.2 Analytik der Galaktose-Metaboliten

In den Urinproben aller Patienten wurden die Konzentrationen von D-Galaktose, D-Galaktitol und Kreatinin bestimmt.

Aus den Blutproben wurden die D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten und bei den Proben der kontrollierten Probensammlung die GALT-Aktivität und der Genotyp bestimmt.

### 2.3.2.1 Probenvorbereitung und Extraktion

#### Urinproben

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentrationen von D-Galaktitol und D-Galaktose in den Urinproben wurde zunächst ein Testansatz aus 20  $\mu\text{L}$  Urin und 80  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  erstellt. Es wurden dann  $\text{HCl}$  (6 mol/L; 30  $\mu\text{L}$ ) und zur internen Standardisierung D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]Galaktose (10  $\mu\text{mol/L}$ ; 20  $\mu\text{L}$ ) und D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]Galaktitol (50  $\mu\text{mol/L}$ ; 100  $\mu\text{L}$ ) zugefügt. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie (siehe Kapitel 2.3.2.2).

#### Blutproben

Zur Bestimmung der D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration der Blutproben wurden gepackte Erythrozyten mit dem gleichen Volumen physiologischer  $\text{NaCl}$ -Lösung (0.154 mol/L) suspendiert. 100  $\mu\text{L}$  der Erythrozytensuspension wurden zur internen Standardisierung mit D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]Galaktose (50  $\mu\text{mol/L}$ ; 100  $\mu\text{L}$ ) und D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]Galaktitol (50  $\mu\text{mol/L}$ ; 10  $\mu\text{L}$ ) versetzt und für eine Minute im Ultraschallbad behandelt. Dann wurden 400  $\mu\text{L}$  Tris/ $\text{HCl}$  Puffer (0.5 mol/L, pH 8.6) hinzugefügt. Durch fünfminütiges Erhitzen im Wasserbad bei 95°C und anschließende Zentrifugation (10000 x g, 4°C, 5 min) wurde der Ansatz enteiweißt. Zur Hydrolyse des D-Galaktose-1-Phosphats wurden  $\text{MgCl}_2$  (0.5 mmol/L) und alkalische Phosphatase (90 kU/L) zu 500  $\mu\text{L}$  des Überstandes hinzugefügt und dann 2 Stunden bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 500  $\mu\text{L}$  des Inkubats mit 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und mit  $\text{HClO}_4$  (30%, v:v; 150  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugation (s.o.) entfernt. Der Überstand (1.4 mL) wurde mit  $\text{KHCO}_3$  (2.5 mol/L; 250  $\mu\text{L}$ ) neutralisiert und  $\text{KClO}_4$  durch Zentrifugation (s.o.) abgetrennt. Die

weitere Reinigung erfolgte mittels Ionenaustausch-Chromatographie (siehe Kapitel 2.3.2.2).

Zur Bestimmung der freien Galaktose wurden parallel Proben als Leerwert mitgeführt, die mit 50  $\mu\text{L}$  D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]Galaktose (50  $\mu\text{mol/L}$ ) versetzt und ohne alkalische Phosphatase aufgearbeitet wurden.

### **2.3.2.2 Aufreinigung und Derivatisierung**

#### **Aufreinigung**

Die weitere Aufreinigung der jeweiligen Extrakte aus Urin- und Blutproben erfolgte mittels Anionen- und Kationenaustausch-Chromatographie. Dazu wurden die Extrakte zunächst auf eine Dowex 1X8-Säule (200-400 mesh, Acetatform, 4 mL in konischen Poly-Prep-Einmal-Chromatographiesäulchen, Fa. Bio-Rad, München) aufgetragen und mit 250  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  nachgespült. Die Eluate wurden verworfen. D-Galaktose und D-Galaktitol wurden anschließend mit 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Dieses Eluat wurde auf eine Dowex 50WX8-Säule (100-200 mesh,  $\text{H}^+$ -Form, 4 mL, Säule wie oben) aufgetragen und das Eluat verworfen. Dann wurde wieder mit 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Von dem gewonnenen Eluat wurde ein Aliquot von 1 mL im Reactival (1 mL; Pierce) bei Raumtemperatur im  $\text{N}_2$ -Strom zur Trockene eingedampft.

#### **Derivatisierung zur Bestimmung von Galaktose und Galaktitol**

Zur Darstellung des Aldonitril-Pentaacetat-Derivats der Galaktose und des peracetylierten Derivats des Galaktitols wurde der trockene Rückstand mit 50  $\mu\text{L}$  Hydroxylamin-Hydrochlorid (0.3 mol/L in Pyridin) versetzt und verschlossen für 30 Minuten bei  $90^\circ\text{C}$  erhitzt. Nachdem die Proben wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde 50  $\mu\text{L}$  Acetanhydrid zugefügt und die Proben eine weitere Stunde bei  $90^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Acetylierung von Galaktose und Galaktitol und erneutem Abkühlen wurden die Proben im  $\text{N}_2$ -Strom eingetrocknet. Anschließend wurde der trockene Rückstand mit 200  $\mu\text{L}$  n-Hexan extrahiert. Der Extrakt wurde in einem konischen Mikroeinsatz (0.2 mL; Welabo, Düsseldorf) eingedampft. Der Rückstand wurde in 50  $\mu\text{L}$  Ethylacetat gelöst. Diese Proben wurden nun zur GC-MS-Analyse verwendet.

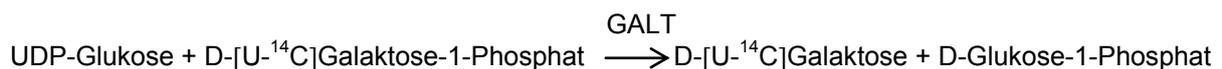
### 2.3.2.3 GC-MS-Analyse

Die Analyse der Proben erfolgte in einem HP 6890 Gas-Chromatographen (Hewlett-Packard, Waldbronn), ausgestattet mit einer DB-5 MS-Kapillarsäule (5% Phenylmethylpolysiloxan; Länge 30 m; i.d. 0.25 mm; Filmdicke 0.25  $\mu\text{m}$ ; J&W Scientific, Folrom, CA). Dieser war direkt an ein HP-MSD-Massenspektrometer angeschlossen (Hewlett-Packard, Waldbronn). Helium diente als Trägergas (0.9 mL  $\times$  min<sup>-1</sup>). Die Temperatur des Injektors und dessen Verbindung zum Spektrometer betrug 250°C. Es wurden jeweils 1.0  $\mu\text{L}$  der Probe injiziert. Dabei wurde die Kapillarsäule zunächst auf 125°C temperiert, nach 1.5 min wurde die Temperatur in Schritten von 20°C pro min auf 190°C erhöht. Dann wurde die Temperatur mit 2.5°C pro min auf 215°C erhöht und schließlich für weitere 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 einem Druck von 60 mPa betrieben. Zum selektiven Ionen-Monitoring der [MH-60]<sup>+</sup>-Ionen wurden die Intensitäten bei  $m/z$  375,  $m/z$  376 und  $m/z$  381 gemessen. Das entsprach den chromatographischen Peaks von 1-<sup>12</sup>C-, 1-<sup>13</sup>C und U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-markiertem Galaktitol. Die entsprechenden chromatographischen Peaks von 1-<sup>12</sup>C-, 1-<sup>13</sup>C und U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-markierter Galaktose wurden bei  $m/z$  328,  $m/z$  329 und  $m/z$  334 registriert.

### 2.3.3 Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase

Zur Bestimmung der GALT-Aktivität in den Erythrozyten wurde die Methode nach Shin (1991) modifiziert (Schadewaldt et al., 2003).

Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Bildung von UDP-[U-<sup>14</sup>C]Galaktose aus D-[U-<sup>14</sup>C]Galaktose-1-Phosphat nach folgender Reaktionsgleichung:



Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte aus venös entnommenem EDTA-Blut. Dieses wurde wie unter 2.3.2.1 beschrieben vorbereitet und aufbewahrt. Die aufgetauten Proben wurden 1:4 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Je 50  $\mu\text{L}$  des Hämolsats wurden

für 1 Minute bei 25°C in ein Ultraschallbad gegeben, anschließend mit 50 µL GALT-Bestimmungspuffer versetzt und bei 32°C für 40 Minuten inkubiert.

Der GALT-Bestimmungspuffer setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

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- <sup>14</sup> C]Galaktose-1-Phosphat	(1 mCi/L)
UDP-Glukose	(2.5 mmol/L)

Die Proben wurden zur Beendigung der Reaktion 4 Minuten im Wasserbad gekocht und nach dem Abkühlen für 5 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. 70 µL des Überstandes wurden auf eine Dowex 1X8-Säule (200-400 mesh, Cl<sup>-</sup>-Form, 0.3 mL in Einmal-Filterssäulen; Mallinckrodt Baker, Griesheim) aufgetragen. Durch Waschen mit 3 mL HCl (25 mmol/L) wurde das nicht umgesetzte D-[U-<sup>14</sup>C]Galaktose-1-Phosphat entfernt. Die UDP-[U-<sup>14</sup>C]Galaktose wurde mit 1.6 mL HCl (500 mmol/L) in Szintillationsgefäße (20 mL, Zinsser, Frankfurt) eluiert. Schließlich wurde dem Eluat Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A; Zinsser, Frankfurt) im Verhältnis 1:10 (v:v) zugefügt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (LS 6000; Beckmann, München) gemessen. Als Leerwert wurden Hämolyse-Proben verwendet, die vor Zugabe des GALT-Bestimmungspuffers 4 Minuten im Wasserbad gekocht wurden. Als Kontrollproben wurden die Hämolyse zweier gesunder Erwachsener mitgeführt.

Die Enzymaktivität berechnete sich nach folgender Formel:

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

A: Enzymaktivität in µmol/h pro g Hb

dpm: gemessene Radioaktivität in Zerfälle pro min

### 2.3.4 Sonstige Analyseverfahren

#### Hämoglobin-Bestimmung

Der Hämoglobingehalt in den Erythrozyten wurde mittels der Cyanmethämoglobin-Methode auf einem Analysator (KX-21; Sysmex, Hamburg) bestimmt.

#### Kreatinin-Bestimmung

Die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration im Urin erfolgte enzymatisch auf einem Hitachi 912 Analyzer (Boehringer, Mannheim) (Wahlefeld & Siedel, 1985).

### 2.3.5 Genotypisierung

Zur Analyse der Mutationen wurde zunächst die genomische DNA aus EDTA-Blut mittels QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurden die Exone 1 bis 11 des GALT-Gens mittels PCR amplifiziert und die Mutationen durch direkte Sequenzierung (Yang et al., 2002) charakterisiert. Die Analysen wurden in enger kollegialer Zusammenarbeit mit L. Kamalanathan durchgeführt. Die verwendeten Verfahren sind ausführlich in dessen Inauguraldissertation beschrieben (Kamalanathan, 2005).

## 2.4 Auswertung und Statistik

### 2.4.1 Auswertung

Die Konzentrationen ( $C_{nat}$ ,  $\mu\text{mol/L}$ ) von natürlich markiertem D-Galaktitol und D-Galaktose in den mit D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]Galaktitol und D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]Galaktose intern standardisierten Urinproben wurden mit folgender Formel berechnet:

$$C_{nat} = \left\{ (R_{nat} \times F_c \times A_{St} \times P_{St}) - [(1 - P_{St}) \times A_{St}] \right\} \times \frac{1}{V_{probe}}$$

Dabei steht  $R_{nat}$  für das Verhältnis der Ionen-Intensitätsraten ( $m/z$  375)/ ( $m/z$  381) in den chromatographischen Galaktitol-Peaks, bzw. ( $m/z$  328)/ ( $m/z$  334) in den chromatographischen Galaktose-Peaks.  $F_c$  (1.069 für Galaktose und 1.071 für

Galaktitol) wird als Korrekturfaktor in die Formel eingebracht, um die höhere Ionenintensität von U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-markierten Galaktose-Metaboliten im Vergleich zu natürlich markierten Formen auszugleichen. A<sub>St</sub> ist die Menge des U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-markierten internen Standards (in nmol). P<sub>St</sub> ist der Anteil der U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-markierten Moleküle in den Standards (0.985) und 1 – P<sub>St</sub> der Anteil der natürlich markierten Metaboliten, die durch die markierten Standards zugefügt wurden. V<sub>Probe</sub> ist das Probenvolumen (in mL). Die Konzentration der Galaktose-Metaboliten im Urin wird im Weiteren immer bezogen auf die Kreatinin-Konzentration angegeben.

Die Konzentration des Galaktose-1-Phosphats in den Erythrozyten wurde indirekt nach enzymatischer Umwandlung in Galaktose ermittelt. Sie berechnet sich aus der Differenz zwischen der Konzentration der totalen Galaktose (Summe aus freier Galaktose und Galaktose-1-Phosphat) nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase und der Konzentration der freien Galaktose ohne Zusatz von alkalischer Phosphatase.

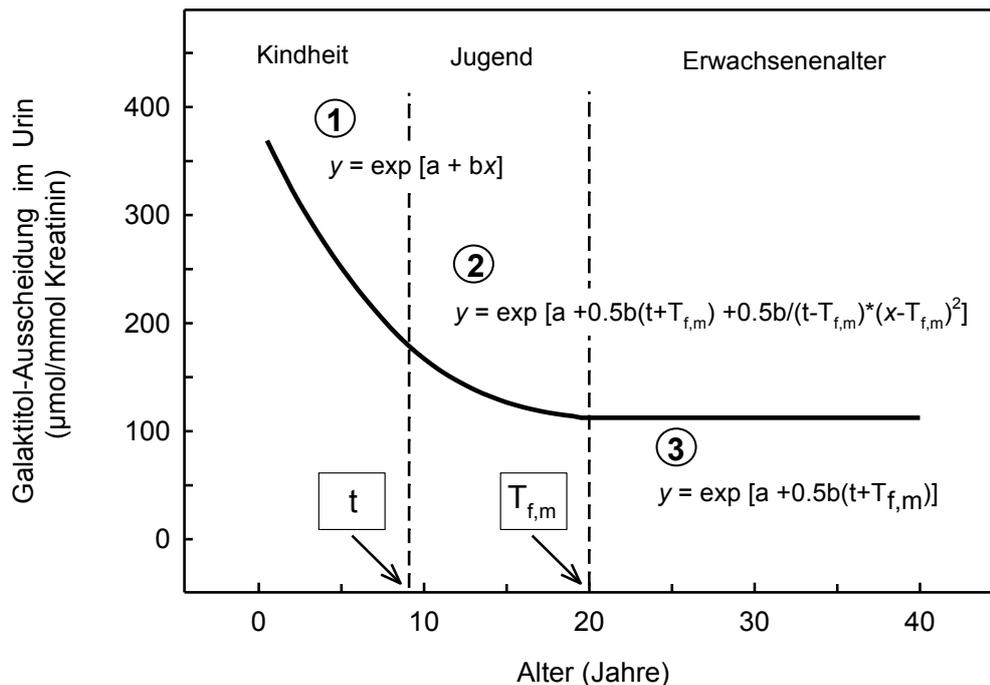
#### 2.4.2 Statistik

Soweit nicht anders vermerkt, werden alle Ergebnisse als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Median und Bereich stehen in Klammern. Korrelationen wurden mittels multipler linearer Regression (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) überprüft. Mittelwertdifferenzen wurden mit dem U-Test (Wilcoxon-Mann-Whitney) auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Die intraindividuelle Variabilität der Galaktose- und Galaktitol-Ausscheidung (CV<sub>int</sub>) wurde nach folgender Formel aus der Gesamtvariabilität (Abbildungen 3 und 4) unter Berücksichtigung der untersuchungsabhängigen Variabilität (CV Galaktose, 7.1%; CV Galaktitol, 3.1%; CV Kreatinin, 2.0%) berechnet.

$$CV_{int} = \sqrt{CV_{Total}^2 - CV_{Gal/Galaktitol}^2 - CV_{Kreatinin}^2}$$

### 2.4.3 Modell der Galaktitol-Ausscheidung

Zur Erstellung eines provisorischen Nomogramms der Altersabhängigkeit der Galaktitol-Ausscheidung im Nüchternurin bei diätetisch behandelten Patienten mit klassischer Galaktosämie wurde ein einfaches Wachstumsraten-Modell gewählt.



**Abbildung 2** Modell der Altersabhängigkeit der Galaktitol-Ausscheidung im Urin

Es wurde ein einfaches Wachstumsratenmodell verwendet, das einen exponentiellen Abfall (1) der Ausscheidungsrate während der Kindheit bis zum Alter  $t$  und eine fortschreitende Verlangsamung (2) des Abfalls während der Adoleszenz bis zum Alter  $T$  (modelliert durch einen quadratischen Spline) umfasst, und schließlich zu einer stabilen Ausscheidungsrate im Erwachsenenalter (3) führt. Es resultierte wie dargestellt eine stetige und differenzierbare Kurve. Schätzwerte für die Parameter  $a$ ,  $b$ ,  $t$  und  $T$  wurden durch die Anpassung der experimentellen Daten an das Modell mittels linearer Regressionsanalyse erhalten. Die Indizes  $f$  und  $m$  weisen auf die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Teilnehmern hin.

Das Modell in Abbildung 2 umfasst einen exponentiellen Abfall der Galaktitol-Ausscheidungsrate während der Kindheit (<8 Jahre), eine fortschreitende Verlangsamung des Abfalls während der Adoleszenz und weist schließlich eine stabile Ausscheidungsrate im Erwachsenenalter auf.

Für die Berechnung wurden die logarithmierten Werte der Galaktitol-Ausscheidung verwendet, um der Schiefe der Verteilung und der Altersabhängigkeit der intraindividuellen Streuung Rechnung zu tragen:

$$\ln[\text{Galaktitol}]_{p,i} = R_p + \text{Fit}(x) + \varepsilon_{p,i}$$

Galaktitol<sub>p,i</sub> = i-te Messung am Patienten p

$R_p$  = zufälliger Patienteneffekt  $R_p \sim N(0, \sigma^2_{\text{inter}})$  (random shift)

$\varepsilon_{p,i}$  = intraindividuelle Variabilität des Patienten  $\varepsilon_{p,i} \sim N(0, \sigma^2_{\text{intra}})$

Fit(x) war für die unterschiedlichen Phasen definiert als:

$$\text{Fit}(x) = \begin{cases} a + bx & \text{lineare Phase, } x < 8 \\ a + \frac{1}{2}b(x+T) + \frac{1}{2} \frac{b(x-T)^2}{8-T} & \text{Übergangsphase, } 8 \leq x \leq T \\ a + \frac{1}{2}b(8+T) & \text{konstante Phase, } x \geq T \end{cases}$$

Hierbei stehen die Parameter a und b für den Achsenabschnitt bzw. die Steigung der linearen Phase. T ist der Zeitpunkt ab dem die konstante Phase erreicht ist.

Die Übergangsphase wurde mit einem quadratischen Spline modelliert, so dass die entstehende Kurve stetig und differenzierbar ist.

Zur Schätzung der Modellparameter wurde ein nicht-lineares gemischtes Modell unter Nutzung nicht-linearer Regressionsanalyse (Methode der größten Wahrscheinlichkeit) verwendet, um die durch SAS Routine NLMIXED gewonnenen Daten anzupassen.

In einer ersten Berechnung stellte sich die Differenz der Schätzwerte für die Parameter a und b in der linearen Phase bei Männern und Frauen als nicht signifikant heraus. Daher wurde das Modell vereinfacht, in dem angenommen wurde, dass der Achsenabschnitt und die Steigung in der linearen Phase bei Männern und Frauen gleich sind. Unter Benutzung der Schätzwerte und der o.g. Definitionen wurden die prognostischen Wertebereiche für die Galaktitol-Ausscheidung ([Galaktitol]) zum Zeitpunkt x folgendermaßen berechnet:

$$[\text{Galaktitol}](q) = \exp(\text{Fit}(x)) \cdot \exp(0.1639 \cdot u(q))$$

wobei  $u(q)$  das q-Quantil der Standardnormalverteilung ist.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Biochemisch-molekulargenetische Charakteristik der Patienten

Zur biochemischen Charakterisierung der Patienten wurden bei den Patienten der Referenzgruppe mit kontrollierter Probensammlung die GALT-Aktivität und der D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten bestimmt.

Zur molekulargenetischen Charakterisierung erfolgte die Bestimmung des GALT-Genotyps.

Bei den Patienten der Monitoring-Gruppe erfolgte lediglich die Bestimmung des D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalts in den Erythrozyten (siehe Kapitel 2.1).

#### 3.1.1 Biochemische Charakterisierung

Die biochemischen Charakteristika der Patienten der Referenzgruppe sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

In dieser Untersuchungsgruppe ergab sich für die GALT-Aktivität in den Erythrozyten sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Patienten ein Mittelwert von  $0.2 \pm 0.1$  ( $0.2; 0.1 - 0.3$ )  $\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$ . Bei allen Patienten lag somit die residuale GALT-Aktivität in den Erythrozyten, den Teilnahmebedingungen an der Studie entsprechend, unter 2% der Norm.

Die D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten betrug bei den weiblichen Patienten im Mittel  $124 \pm 39$  ( $115; 73 - 236$ )  $\mu\text{mol}/\text{L}_{\text{Ery}}$  und bei den männlichen Patienten  $121 \pm 36$  ( $118; 66 - 227$ )  $\mu\text{mol}/\text{L}_{\text{Ery}}$ .

In der zweiten Untersuchungsgruppe betrug die mittlere D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten der weiblichen Patienten  $128 \pm 44$  ( $120; 38 - 460$ )  $\mu\text{mol}/\text{L}_{\text{Ery}}$  und  $132 \pm 56$  ( $126; 51 - 597$ )  $\mu\text{mol}/\text{L}_{\text{Ery}}$  bei den männlichen Teilnehmern. D-Galaktose-1-Phosphat-Werte in den Erythrozyten deutlich über dem oberen Behandlungszielwert zeigten sich lediglich bei einer Patientin und vier Patienten, alle in einem Alter von weniger als 8 Wochen.

Eine Bestimmung der GALT-Aktivität erfolgte nicht (siehe Kapitel 2.1), jedoch lassen diese Daten darauf schließen, dass alle im Rahmen des Stoffwechsel-Monitorings eingesandten Urinproben von Patienten mit stark herabgesetzter D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität stammen.

**Tabelle 2** Biochemische Charakterisierung der Patienten<sup>a</sup>

Patient	GALT-Aktivität <sup>b</sup> ( $\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$ )	Galaktose-1-Phosphat <sup>c</sup> ( $\mu\text{mol}/\text{L}_{\text{Ery}}$ )
1	0.1	73
2	0.2	236
3	0.2	121
4	0.3	157
5	0.2	111
6	0.1	157
7	0.2	161
8	0.2	138
9	0.1	80
10	0.2	145
11	0.2	107
12	0.1	128
13	0.2	66
14	0.2	91
15	0.3	116
16	0.3	115
17	0.1	150
18	0.1	118
19	0.1	145
20	0.1	111
21	0.2	104
22	0.1	182
23	0.3	227
24	0.1	85
25	0.3	96
26	0.1	81
27	0.2	125
28	0.1	161
29	0.2	118
30	0.3	118
31	0.2	129
32	0.2	95
33	0.2	91
34	0.4	81
35	0.2	101
36	0.2	154
37	0.2	105
38	0.2	120
39	0.1	92
40	0.1	116

<sup>a</sup> Patienten der kontrollierten Probensammlung

<sup>b</sup> Normbereich:  $23.8 \pm 3.8 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$  (Li et. al., 2010)

<sup>c</sup> Normbereich:  $1.9 \pm 0.5 \mu\text{mol}/\text{L}_{\text{Ery}}$  (Kamalanathan, 2005)

### 3.1.2 Genotypisierung

Zur molekulargenetischen Charakterisierung der Patienten wurden bei allen Patienten der Referenzgruppe die Genotypen bestimmt.

Insgesamt wurden 11 verschiedene Varianten des GALT-Gens und 12 verschiedene Genotypen gefunden. In Tabelle 3 sind die genetischen Variationen und die daraus resultierenden Änderungen im GALT-Protein der Patienten zusammengefasst. Dabei wurden zur molekulargenetischen Charakterisierung die Bezeichnung der abgeleiteten Veränderungen auf genomischer DNA- und Proteinebene angegeben.

**Tabelle 3** Äquivalenztabelle für die genetischen Varianten im GALT-Gen der Patienten<sup>a</sup>

Exon	DNA-Ebene <sup>b</sup>	Proteinebene <sup>c</sup>	Aminosäure-Austausch
3	824_826delAAC	N97del	Aspartat - Tyrosin
4	974T>G	F117C	Phenylalanin - Cystein
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	2145C>T	R259W	Arginin - Tryptophan
9	2328G>T	K285N	Lysin - Asparagin
10	2758C>A	H319Q	Histidin - Glutamin
10	2759G>A	A320T	Alanin - Threonin
11	3743T>C	X380R	Stop - Arginin

<sup>a</sup> Patienten der kontrollierten Probensammlung

<sup>b</sup> Der Kennzeichnung zugrunde liegt die NCBI-Sequenz NC 000009.2 des GALT-Gens (A des ATG-Startcodon = Nucleotid 1)

<sup>c</sup> Aus der genetischen Variante im GALT-Gen abgeleitete Änderung in der Primärsequenz der GALT

Tabelle 4 zeigt die Verteilung der genetischen Varianten im untersuchten Patientenkollektiv. Die Mutation g.1466A>G (p.Q188R) ist mit 70% am häufigsten vertreten. In 9% der untersuchten Allele wurde die Variante g.2328G>T (p.K285N) gefunden, in 3% der Allele lag die Variante g.1649G>C (p.L195P) vor.

Andere Allele kamen mit einer Häufigkeit von bis zu 2.5% vor.

**Tabelle 4** Molekularbiologische Charakterisierung der Patienten<sup>a</sup>

Genetische Variante <sup>b</sup>	Weiblich (n = 21)	Männlich (n = 19)
<u>Homozygot:</u>		
Q188R / Q188R	14	7
L195P / L195P	1	0
<u>Compound Heterozygot:</u>		
Q188R / K285N	2	7
Q188R / ΔN97P	1	0
Q188R / R148W	0	1
Q188R / L195P	0	1
Q188R / R259W	0	1
Q188R / X380R	0	1
L195P / F117C	1	0
K285N / V151A	1	0
K285N / H319Q	0	1
H319Q / A320T	1	0

<sup>a</sup> Patienten der kontrollierten Probensammlung

<sup>b</sup> Bezeichnung auf Proteinebene

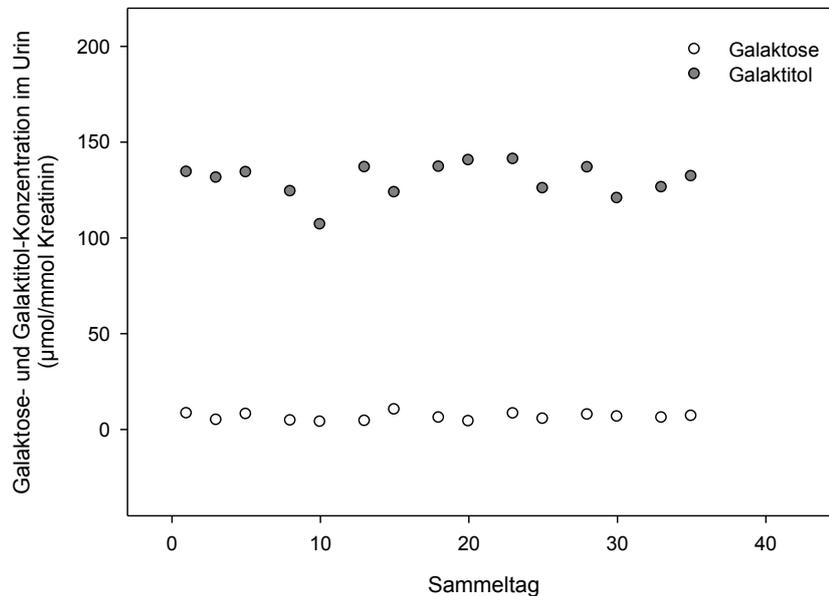
## 3.2 Altersabhängigkeit der Galaktitol-Ausscheidung bei Galaktosämie

### 3.2.1 Schätzung der Referenzbereiche

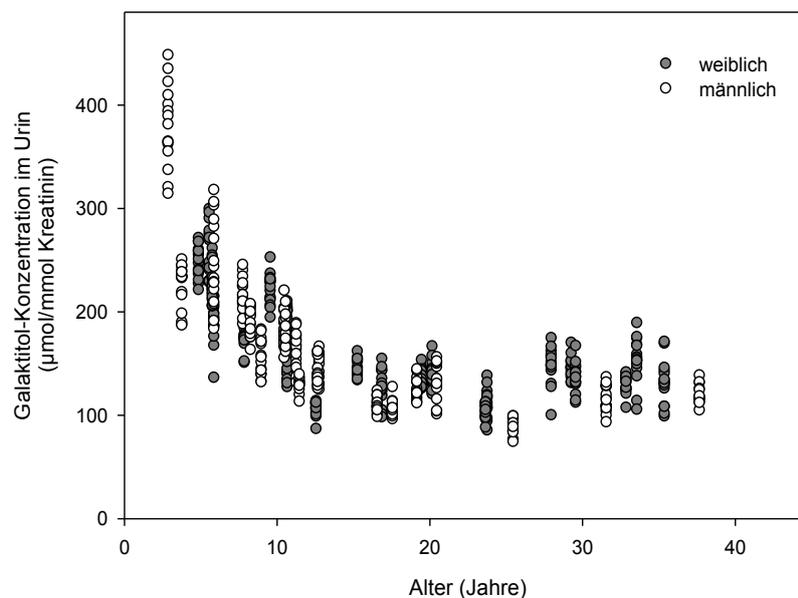
Um zu prüfen, ob D-Galaktitol im Urin für das metabolische Monitoring bei klassischer Galaktosämie verwendet werden kann, mussten zunächst Referenzbereiche für die D-Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie abgeschätzt werden. Dazu wurden die Altersabhängigkeit und die intraindividuelle Variabilität der D-Galaktitol-Ausscheidung in multiplen Nüchternurinproben bei ausgewählten weiblichen (n=21) und männlichen (n=19) Patienten im Alter von 4 - 37 Jahren untersucht (kontrollierte Probensammlung).

Die Patienten lieferten jeweils 15 Urinproben, gesammelt im Abstand von einigen Tagen, um die intraindividuelle Variabilität abzubilden. Die Proben wurden nach einer Übernachtfastenperiode gewonnen um ernährungsbedingte Interferenzen zu

vermeiden. Abbildung 3 gibt exemplarisch die Ergebnisse einer Patientin wieder, Abbildung 4 die Ergebnisse aller Patienten und Patientinnen. In Tabelle 5 sind die D-Galaktose- und D-Galaktitol-Konzentrationen der Nüchternurinproben, normiert auf die Kreatinin-Konzentration, angegeben.



**Abbildung 3** Mehrwöchiger Verlauf der Galaktose- und Galaktitol-Konzentration im Nüchternurin einer Patientin (Alter 32 Jahre) mit klassischer Galaktosämie und guter diätetischer Compliance



**Abbildung 4** Galaktitol-Konzentrationen im Urin aller Patienten mit klassischer Galaktosämie und guter diätetischer Compliance

Die aus den Analysen multipler Urinproben gewonnenen Daten eines individuellen Patienten der kontrollierten Probensammlung sind dem Alter bei Studienbeginn zugeordnet in Säulen dargestellt.

**Tabelle 5a** Galaktose- und Galaktitol-Konzentration<sup>a</sup> im Nüchternurin der Patientinnen<sup>b</sup>

Patientin	Alter <sup>c</sup> (Jahre)	Galaktitol ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Krea)	Galaktose ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Krea)
1	4,9	248 $\pm$ 16 (250; 221 - 271)	4 $\pm$ 1 (4; 3 - 5)
2	5,6	259 $\pm$ 25 (247; 228 - 299)	6 $\pm$ 1 (6; 4 - 9)
3	5,8	226 $\pm$ 17 (222; 205 - 261)	11 $\pm$ 2 (11; 9 - 17)
4	5,9	190 $\pm$ 20 (193; 136 - 215)	7 $\pm$ 1 (7; 5 - 10)
5	7,9	179 $\pm$ 16 (175; 150 - 207)	9 $\pm$ 4 (8; 6 - 18)
6	9,6	221 $\pm$ 15 (224; 194 - 252)	7 $\pm$ 2 (7; 5 - 12)
7	10,7	143 $\pm$ 13 (141; 127 - 181)	6 $\pm$ 1 (6; 4 - 9)
8	10,7	195 $\pm$ 12 (200; 167 - 210)	5 $\pm$ 0 (5; 4 - 5)
9	12,6	107 $\pm$ 7 (109; 86 - 113)	8 $\pm$ 2 (7; 5 - 13)
10	15,3	147 $\pm$ 8 (146; 134 - 161)	4 $\pm$ 2 (4; 1 - 6)
11	16,9	126 $\pm$ 17 (125; 98 - 154)	4 $\pm$ 1 (4; 3 - 7)
12	19,5	135 $\pm$ 8 (132; 125 - 153)	4 $\pm$ 1 (4; 2 - 5)
13	20,2	138 $\pm$ 13 (134; 120 - 166)	5 $\pm$ 1 (5; 4 - 7)
14	23,7	103 $\pm$ 7 (103; 88 - 112)	8 $\pm$ 2 (8; 5 - 11)
15	23,8	112 $\pm$ 14 (112; 85 - 138)	8 $\pm$ 2 (7; 5 - 11)
16	28	147 $\pm$ 18 (148; 100 - 174)	8 $\pm$ 2 (8; 5 - 12)
17	29,3	146 $\pm$ 10 (145; 131 - 170)	2 $\pm$ 0 (3; 1 - 3)
18	29,6	136 $\pm$ 15 (136; 112 - 167)	2 $\pm$ 1 (2; 1 - 3)
19	32,9	130 $\pm$ 9 (132; 107 - 141)	6 $\pm$ 2 (6; 4 - 10)
20	33,6	153 $\pm$ 21 (153; 105 - 189)	6 $\pm$ 2 (6; 4 - 12)
21	35,4	131 $\pm$ 21 (131; 99 - 171)	3 $\pm$ 1 (3; 0 - 4)

**Tabelle 5b** Galaktose- und Galaktitol-Konzentration<sup>a</sup> im Nüchternurin der Patienten<sup>b</sup>

Patient	Alter <sup>c</sup> (Jahre)	Galaktitol ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Krea)	Galaktose ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Krea)
1	2,9	380 $\pm$ 40 (381; 314 - 448)	13 $\pm$ 3 (13; 9 - 21)
2	3,8	224 $\pm$ 22 (233; 186 - 250)	8 $\pm$ 2 (8; 6 - 13)
3	5,9	247 $\pm$ 42 (238; 183 - 317)	7 $\pm$ 1 (7; 5 - 10)
4	7,8	217 $\pm$ 16 (216; 188 - 245)	7 $\pm$ 1 (7; 6 - 12)
5	8,3	190 $\pm$ 13 (192; 163 - 207)	5 $\pm$ 1 (4; 3 - 6)
6	9	156 $\pm$ 18 (156; 132 - 183)	4 $\pm$ 1 (4; 3 - 6)
7	10,5	185 $\pm$ 17 (183; 155 - 220)	7 $\pm$ 1 (7; 6 - 9)
8	10,6	179 $\pm$ 13 (179; 161 - 209)	8 $\pm$ 2 (7; 5 - 10)
9	11,3	163 $\pm$ 17 (165; 131 - 189)	5 $\pm$ 1 (5; 4 - 7)
10	11,5	129 $\pm$ 7 130; 113 - 139)	5 $\pm$ 1 (5; 3 - 7)
11	12,7	140 $\pm$ 12 (138; 126 - 161)	5 $\pm$ 1 (5; 4 - 7)
12	12,8	148 $\pm$ 13 (151; 124 - 166)	4 $\pm$ 1 (4; 3 - 6)
13	16,6	110 $\pm$ 7 (108; 98 - 123)	6 $\pm$ 1 (5; 4 - 7)
14	17,6	106 $\pm$ 8 (107; 96 - 127)	6 $\pm$ 1 (6; 5 - 8)
15	19,2	125 $\pm$ 10 (121; 111 - 144)	3 $\pm$ 0 (3; 2 - 3)
16	20,5	131 $\pm$ 18 (133; 101 - 156)	5 $\pm$ 2 (5; 3 - 9)
17	25,5	88 $\pm$ 8 (88; 74 - 99)	3 $\pm$ 1 (3; 2 - 4)
18	31,6	118 $\pm$ 13 (114; 93 - 136)	4 $\pm$ 2 (4; 2 - 9)
19	37,7	119 $\pm$ 9 (116; 104 - 138)	8 $\pm$ 1 (7; 6 - 10)

<sup>a</sup> Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD mit Median und Wertebereich in Klammern

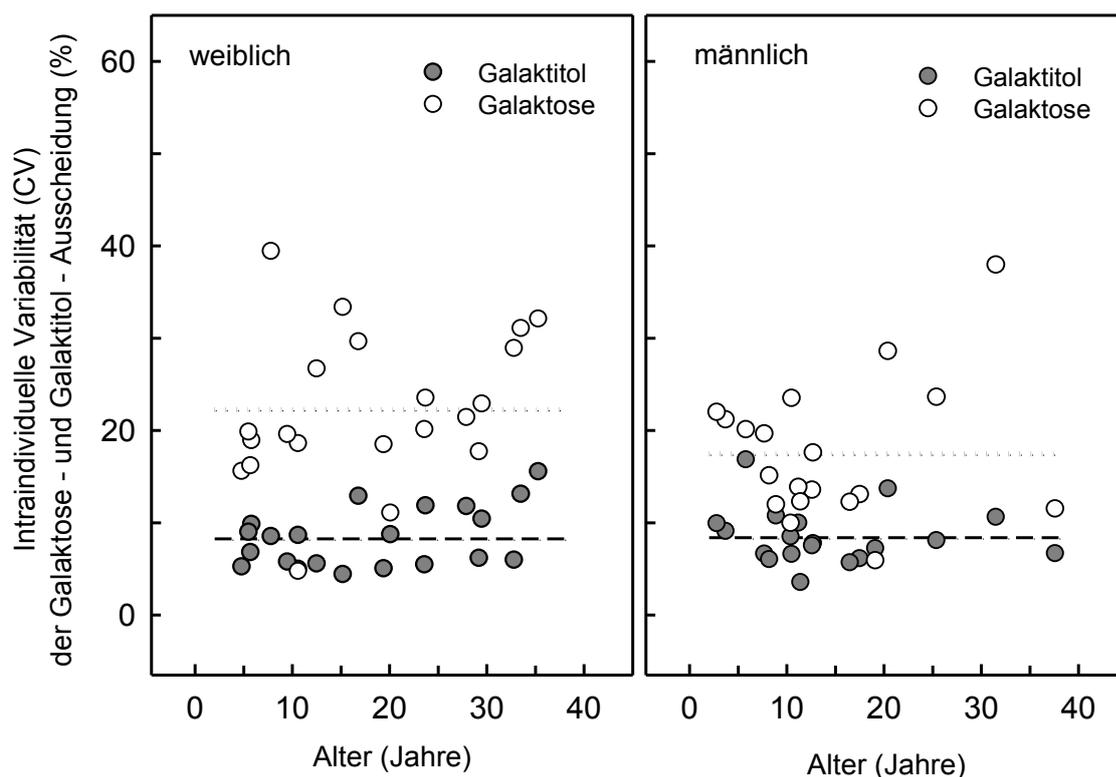
<sup>b</sup> Patienten der kontrollierten Probensammlung

<sup>c</sup> Alter bei Studienbeginn

Die Auswertung der Urinproben aller 40 Teilnehmer zeigt mit mittleren D-Galaktitol-Konzentrationen im Urin von mehr als 220  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  Kreatinin im Alter von unter sechs Jahren und weniger als 150  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  Kreatinin im Alter von mehr als 20 Jahren eine deutliche Altersabhängigkeit der D-Galaktitol-Ausscheidung (siehe Abbildung 4 und 7).

Zur Beurteilung der intraindividuellen Variabilität der D-Galaktitol-Ausscheidung im Urin wurden die Variationskoeffizienten (CV) der D-Galaktitol-Konzentration im Urin der einzelnen Patienten berechnet. Der mittlere Variationskoeffizient aller weiblichen Patienten betrug  $8.3 \pm 3.2$  (8.4; 4.3 - 15.5)%, der der Patienten war sehr ähnlich und betrug  $8.4 \pm 3.1$  (7.7; 3.5 - 16.7)%. Es lag weder eine Geschlechts- noch eine Altersabhängigkeit der intraindividuellen Variabilität vor (siehe Abbildung 5).

Die interindividuelle Variabilität war mit einem Variationskoeffizienten von 29% bei weiblichen und 41% bei männlichen Patienten jedoch vergleichsweise hoch.



**Abbildung 5** Variabilität der Galaktose-Metabolit-Konzentration im Urin bei Patienten mit klassischer Galaktosämie und guter diätetischer Compliance

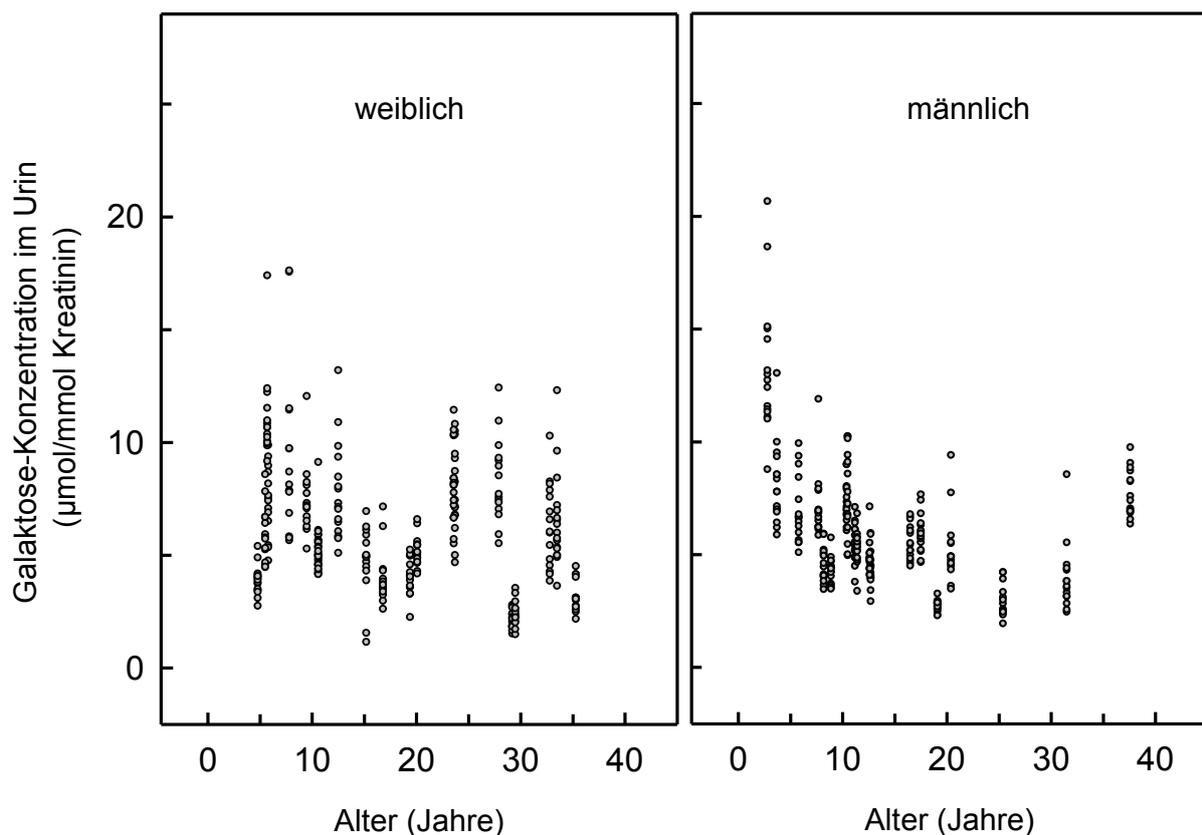
Die Koeffizienten der intraindividuellen Variabilität der Galaktitol- und Galaktose-Konzentration im Urin wurde aus den Daten aus Abbildung 6 und 7 unter Berücksichtigung der untersuchungsabhängigen Variabilität der Galaktitol-, Galaktose- und Kreatinin-Bestimmung berechnet. Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten des Kollektivs für die Galaktose- bzw. Galaktitol-Ausscheidung sind durch gestrichelte bzw. gepunktete Linien dargestellt.

Im Gegensatz zu der, im Vergleich zu Gesunden, beträchtlich erhöhten D-Galaktitol-Konzentration im Urin lag die D-Galaktose-Konzentration im Urin der Patienten mit klassischer Galaktosämie im normalen Wertebereich.

Verglichen mit der D-Galaktose-Konzentration im Urin, war die D-Galaktitol-Konzentration im Urin bei den Patientinnen im Mittel um den Faktor  $33 \pm 17$  (27; 14 - 71) höher, bei den Patienten um das  $30 \pm 8$  (30; 16 - 47)-fache höher.

Der altersabhängige Abfall der D-Galaktose-Ausscheidung war weniger stark ausgeprägt (siehe Abbildung 6) als der der D-Galaktitol-Ausscheidung.

Die intraindividuelle Variabilität der D-Galaktose-Konzentration im Urin war deutlich höher als die der D-Galaktitol-Konzentration im Urin. Die Variationskoeffizienten lagen hier im Mittel bei  $22 \pm 8$  (20; 5 - 39)% bei den Patientinnen und bei  $17 \pm 8$  (15; 6 - 38)% bei den Patienten (siehe Abbildung 5).



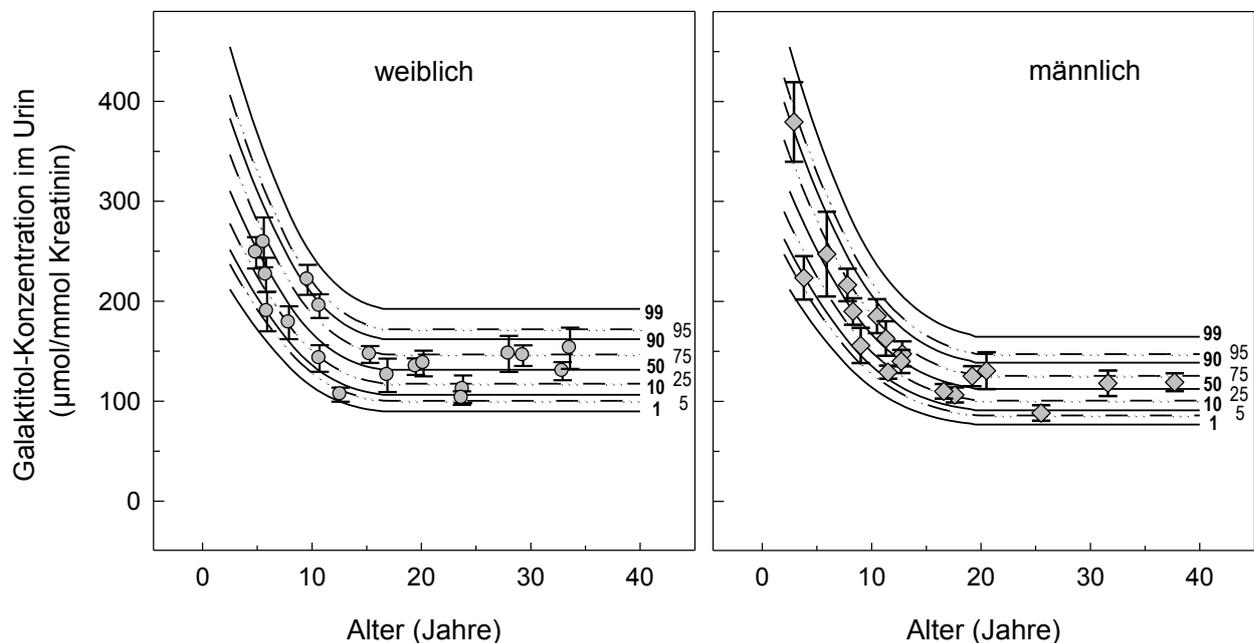
**Abbildung 6** Galaktose-Ausscheidung im Urin bei Patienten mit klassischer Galaktosämie und guter diätetischer Compliance

Die aus den Analysen multipler Urinproben gewonnenen Daten eines individuellen Patienten der kontrollierten Probensammlung sind dem Alter bei Studienbeginn zugeordnet in Säulen abgebildet.

Die experimentellen Daten der D-Galaktitol-Ausscheidung wurden schließlich dazu verwendet, ein vorläufiges Nomogramm der Ausscheidungsraten von nüchternen Patienten mit diätetisch behandelter klassischer Galaktosämie zu erstellen (siehe Abbildung 7 und Kapitel 2.4.3)

Auf der Basis des Wachstumsraten-bezogenen Modells (siehe Abbildung 2) wurden Schätzwerte der Parameter und asymptotische Standardfehler ermittelt, indem die Daten dem Modell mittels nicht-linearer Regressionsanalyse angepasst wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Differenz der Parameter a und b bei männlichen und weiblichen Patienten stellte sich als nicht signifikant heraus (p-Wert 0.73 bzw. 0.88), daher wurden die entsprechenden Daten beider Geschlechter zusammengefasst. Die Differenz der T-Werte war jedoch signifikant von Null verschieden (p-Wert 0.0018). Aus den Schätzwerten wurden Perzentile von 1% bis 99%, ausgehend von der Normalverteilung, erstellt.

Unabhängig vom Geschlecht lässt sich hier ein exponentieller Abfall der D-Galaktitol-Ausscheidung im Urin vom Kleinkind bis zum Jugendalter mit Übergang in ein konstantes Niveau im Erwachsenenalter feststellen (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7** Modellierung der Altersabhängigkeit der Galaktitol-Konzentration im Urin bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

Die Symbole stellen Mittelwerte $\pm$ SD der Analysen multipler Urinproben der kontrollierten Probensammlung dar (siehe Tabellen 1 und 5). Die gesammelten Daten wurden mittels einer gemischten, nicht linearen Regressionsmodellanalyse (SAS routine NLMIXED; Methode der höchsten Wahrscheinlichkeit) an das Wachstumsraten-bezogene Modell (Abbildung 2) angepasst. Die Zahlen geben die Perzentile des Modells an.

**Tabelle 6:** Modellerstellung der altersabhängigen Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

Parameter	Schätzwert	SE	p-Wert
a <sup>a</sup>	5,949	0,099	< 0,0001
b <sup>a</sup>	-0,0843	0,0116	< 0,0001
T <sub>weiblich</sub> <sup>b</sup>	17,4	1,7	< 0,0001
T <sub>männlich</sub> <sup>b</sup>	21,1	2,3	< 0,0001
$\sigma^2_{\text{inter}}$ <sup>c</sup>	0,0172	0,0040	0,0001
$\sigma^2_{\text{intra}}$ <sup>c</sup>	0,0096	0,0006	< 0,0001

<sup>a</sup> In der initialen In-linearen-Phase waren der Achsenabschnitt (a) und die Steigung (b) bei männlichen und weiblichen Patienten statistisch nicht signifikant unterschiedlich, daher wurden die entsprechenden Daten beider Geschlechter zusammengefasst.

<sup>b</sup> Die Parameter für den Beginn einer konstanten Galaktitol-Ausscheidung (im Modell äquivalent zum Erwachsenenalter) war signifikant unterschiedlich bei männlichen und weiblichen Patienten ( $p < 0,002$ )

<sup>c</sup> Inter- und intraindividuelle Varianz

### 3.2.2 Ergebnisse des Stoffwechsel-Monitorings

Nach Erstellung des vorläufigen Nomogramms wurde mit der Routine-Bestimmung der D-Galaktitol-Konzentration im Urin für das Stoffwechsel-Monitoring bei Patienten mit klassischer Galaktosämie begonnen.

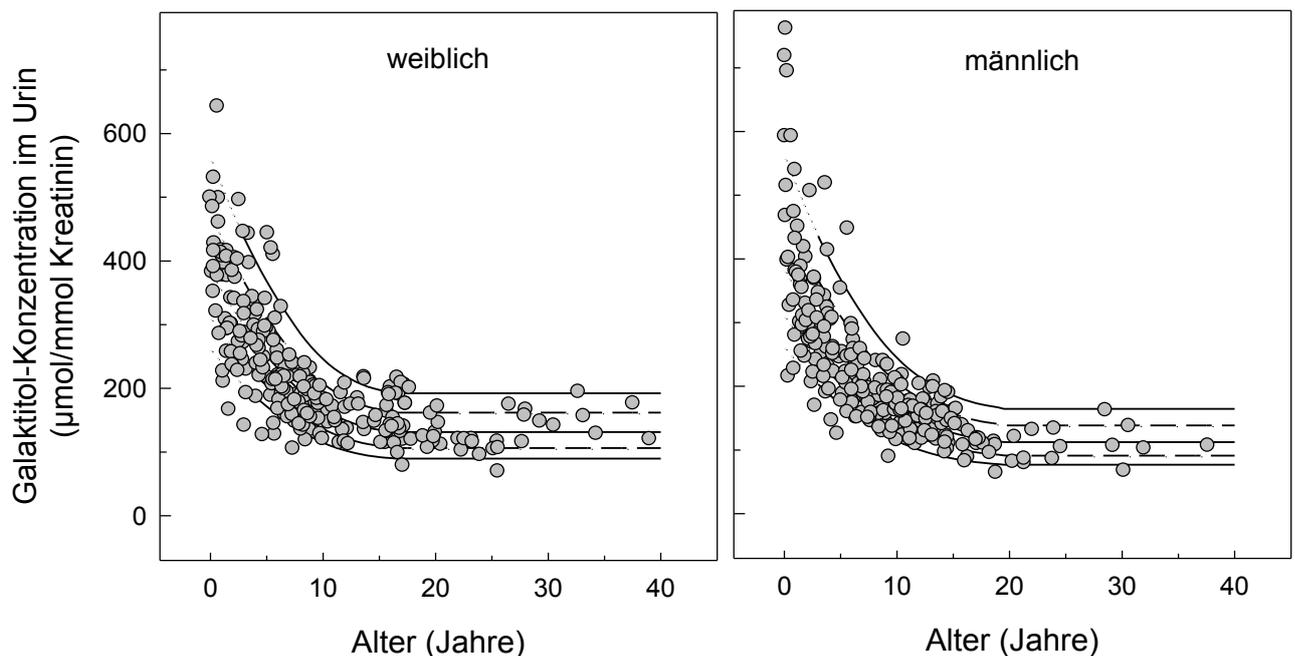
Dafür standen Datensätze von weit mehr als je 200 Proben von männlichen und weiblichen Patienten zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 auf dem Hintergrund der Perzentile des vorläufigen Nomogramms aus Abbildung 7 veranschaulicht.

Es wird deutlich, dass die Verteilung der hier gewonnenen Daten durch das Modell zufriedenstellend beschrieben wird (siehe Tabelle 7). So liegen bei weiblichen und männlichen Patienten 53 bzw. 55% der gemessenen Galaktitol-Werte im Urin unter der 50%-Perzentile und 88 bzw. 92% unter der 95%-Perzentile.

Allerdings zeigte eine genauere Analyse der Häufigkeitsverteilung, dass sowohl bei den weiblichen, als auch bei den männlichen Patienten die Anzahl der Werte unter der 1%-Perzentile und über der 99%-Perzentile größer als statistisch zu erwarten war (siehe Tabelle 7).

Während die Werte unter der 1%-Perzentile über das gesamte Altersspektrum verteilt zu sein scheinen, scheinen die Werte über der 99%-Perzentile in jüngeren Altersgruppen gehäuft aufzutreten (siehe Abbildung 8). Mögliche Gründe für diese Ergebnisse werden in der Diskussion erörtert.

In der Betrachtung der längerfristigen Entwicklung der Galaktitol-Ausscheidung eines Patienten zeigt sich ein Verlauf entlang einer Perzentile, so dass von einer weitgehenden Konstanz der Perzentilenwerte bei der Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie und guter diätetischer Compliance ausgegangen werden kann.



**Abbildung 8** Galaktitol-Konzentration in Zufalls-Urinproben von Patienten mit klassischer Galaktosämie

Dargestellt sind die Ergebnisse der Analysen von Zufalls-Urinproben der Monitoring-Gruppe auf dem Hintergrund der vorläufigen Perzentilenkurven aus Abbildung 7. Es wurden 243 Proben von 85 weiblichen Patienten und 260 Proben von 79 männlichen Patienten untersucht.

**Tabelle 7:** Verteilung der Galaktitol-Konzentration in Zufalls-Urinproben von Patienten mit klassischer Galaktosämie

Perzentile (%) <sup>a</sup>	Anzahl der Proben unter der Perzentile	
	weiblich (n = 243) <sup>b</sup>	männlich (n = 260) <sup>b</sup>
1	12 (5) <sup>c</sup>	13 (5)
5	31 (13)	41 (16)
10	42 (17)	52 (20)
50	128 (53)	142 (55)
90	201 (83)	224 (86)
95	213 (88)	238 (92)
99	228 (94)	247 (95)

<sup>a</sup> Bezogen auf die Perzentile aus dem vorläufigen Nomogramm dargestellt in Abbildung 7

<sup>b</sup> Gesamtzahl der analysierten Proben

<sup>c</sup> Prozentualer Anteil an der Gesamtzahl angegeben in Klammern

### 3.2.3 Relation der Leitmetaboliten in Urin und Erythrozyten

Bei 99% der Patienten waren neben den Urinproben auch EDTA-Blutproben zur Bestimmung des D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalts in den Erythrozyten verfügbar.

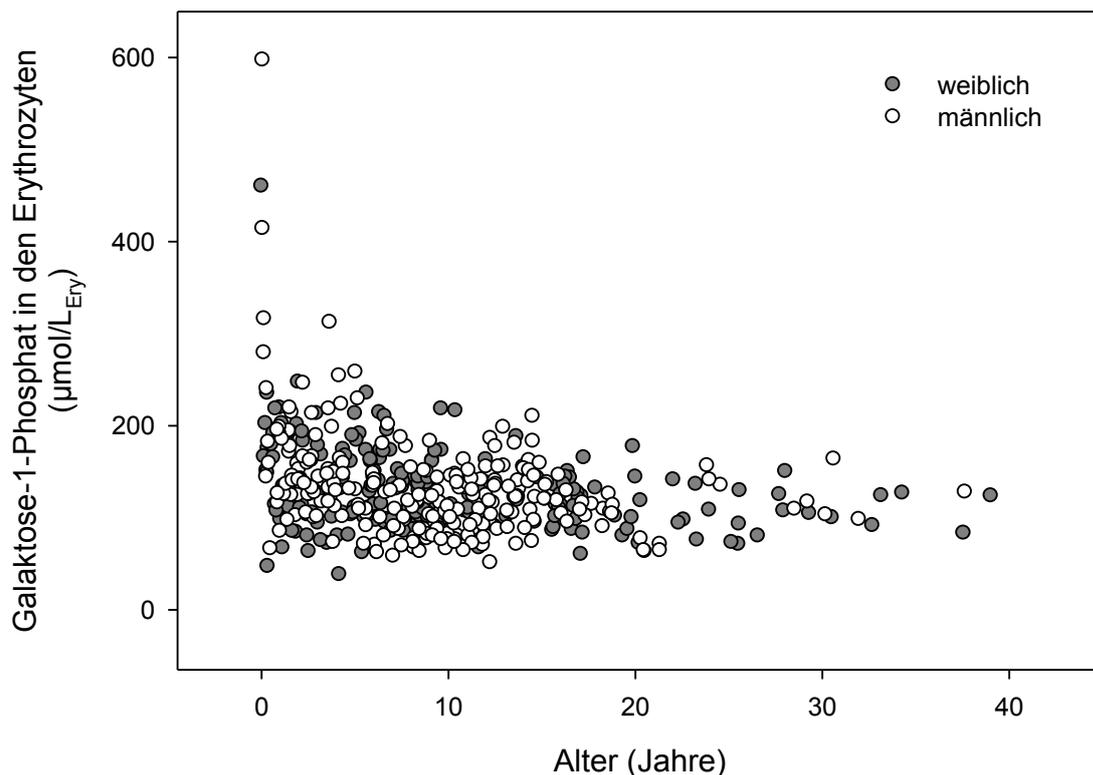
In Abbildung 9 sind die D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentrationen in den Erythrozyten der Patienten in Abhängigkeit vom Alter dargestellt.

Mit Ausnahme der ersten Lebenswochen, in denen eine diätetische Behandlung initiiert wird, ist bei beiden Geschlechtern gleichermaßen lediglich ein leichter Abfall der D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentrationen in den Erythrozyten mit zunehmendem Alter zu verzeichnen. Dies steht in deutlichem Kontrast zur ausgeprägten Altersabhängigkeit der D-Galaktitol-Konzentration im Urin.

Zur Beurteilung der intraindividuellen Variabilität der D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten der Patienten wurde der Variationskoeffizient von Patienten, die mehr als acht Blutproben zur Analyse abgaben, berechnet. Der mittlere Variationskoeffizient betrug  $18 \pm 4$  (18; 13 - 25)%. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

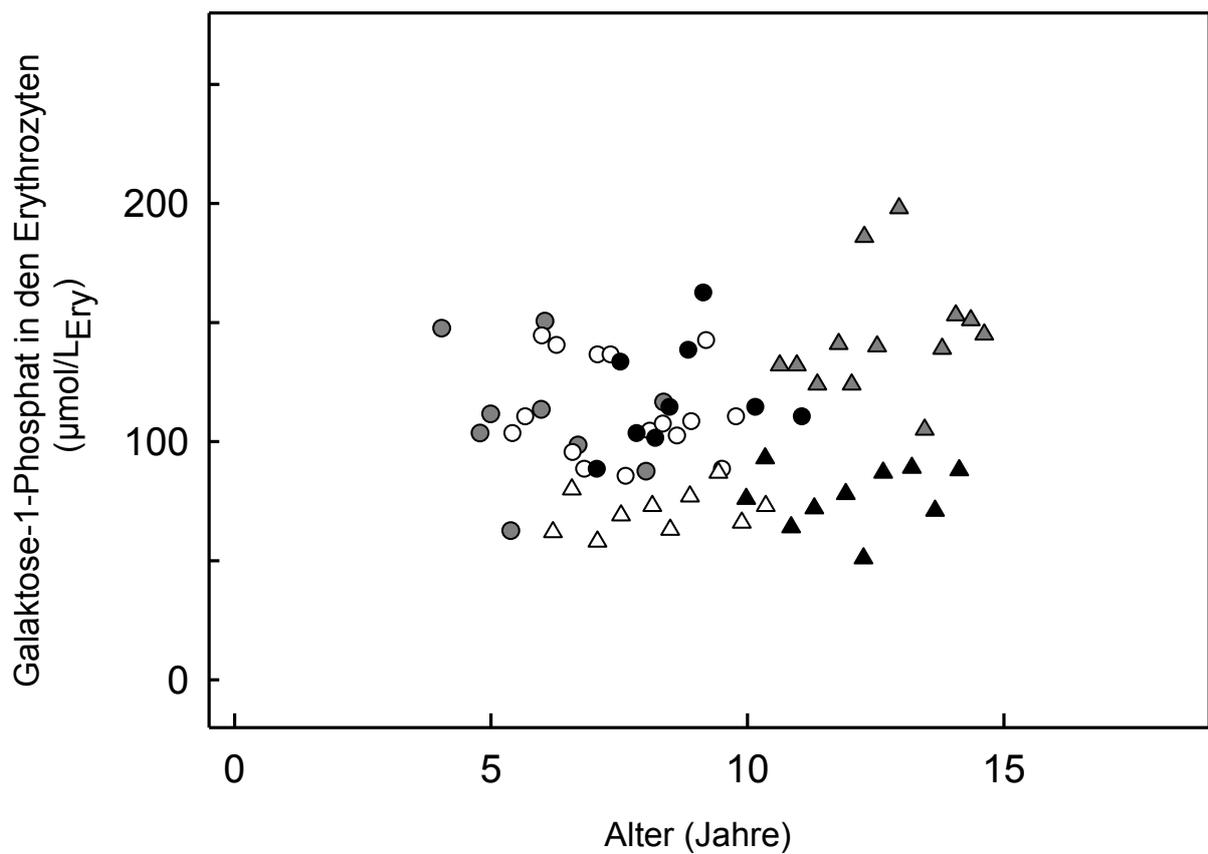
Im Vergleich zur D-Galaktitol-Konzentration im Urin weist die D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten somit eine signifikant höhere intraindividuelle Variabilität auf.

In dem Kollektiv der 84 weiblichen und 78 männlichen Patienten, die im Rahmen des Stoffwechsel-Monitorings sowohl Urin- als auch Blutproben einsandten, zeigte sich kein überzeugender Zusammenhang zwischen der D-Galaktitol-Ausscheidung im Urin und dem D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten (siehe Abbildung 11). So war z.B. bei einer Korrelationsanalyse (lineare Korrelation) das Bestimmtheitsmaß im Bereich der D-Galaktitol-Ausscheidung unter 400  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  Kreatinin, der immerhin mehr als 90% der Probenpaare umfasst, bei den weiblichen Patienten lediglich  $R^2 = 0.0817$  ( $n=213$ ) und bei den männlichen Patienten  $R^2 = 0.1753$  ( $n=227$ ).



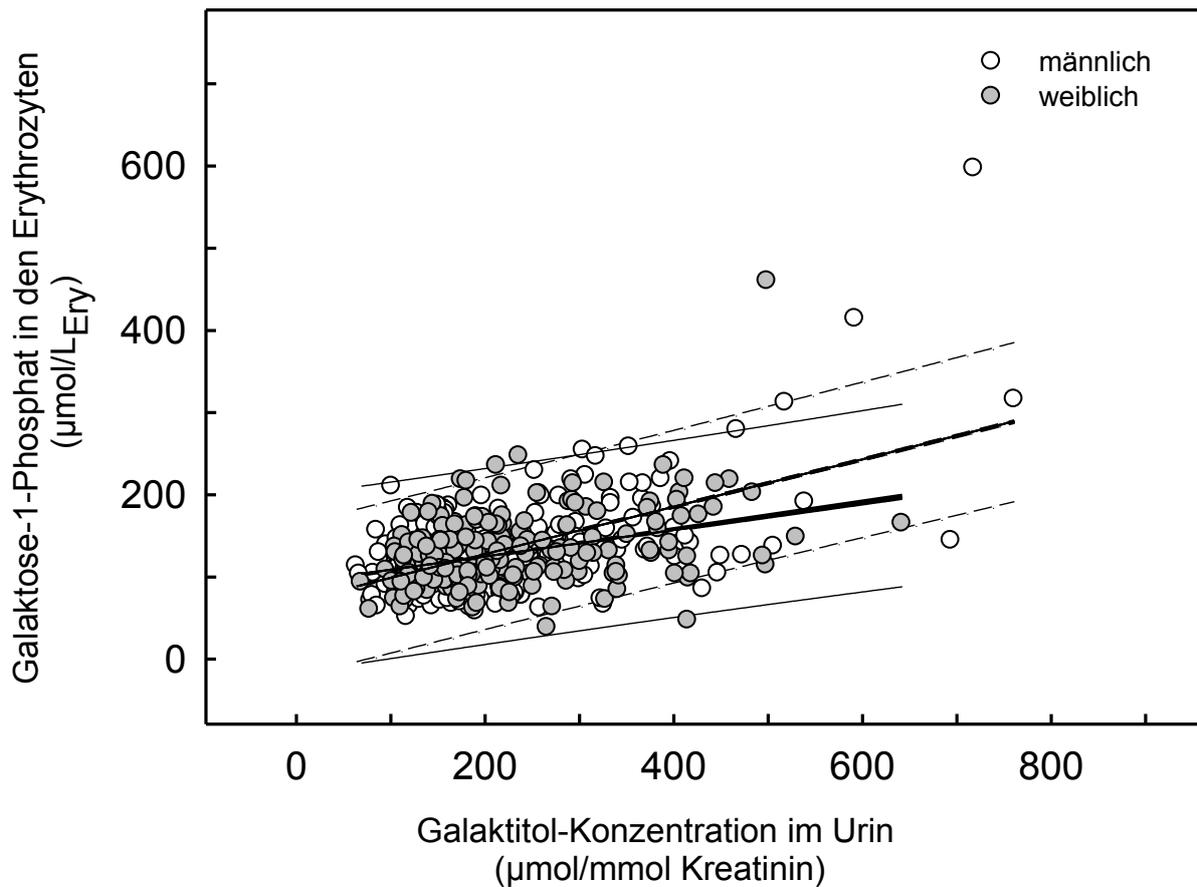
**Abbildung 9** Altersabhängigkeit des Galaktose-1-Phosphat-Gehaltes in den Erythrozyten bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Analysen der Blutproben der Monitoring-Gruppe. Es wurden 232 Proben von 84 weiblichen Patienten und 243 Proben von 78 männlichen Patienten analysiert. Die Proben wurden parallel zur Sammlung der Zufalls-Urinproben aus Abbildung 8 gewonnen.



**Abbildung 10** Intraindividuelle Variabilität der Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

Die untersuchten Blutproben von drei weiblichen und drei männlichen Patienten (Abgabe von min. 9 Blutproben) der Monitoring-Gruppe wurden parallel zur Abgabe der Urinproben in einem Beobachtungszeitraum von ca. 4 Jahren gewonnen. Die weiblichen Patienten gaben 9, 9 und 16 Proben ab, die männlichen 10, 10 und 13 Proben. Die Ergebnisse sind mit individuell unterschiedlicher Farbgebung für weibliche Patienten als Kreise dargestellt, die der männlichen Patienten als Dreiecke.



**Abbildung 11** Verhältnis der Galaktitol-Konzentration im Urin zum Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

Zum Vergleich wurden die Daten aus den Abbildungen 8 und 9 kombiniert. Es wurden 232 Proben von 84 weiblichen und 243 Proben von 78 männlichen Patienten verglichen.

Die eingefügten Linien sind Regressionskurven (linear, Methode der kleinsten Abweichungs-Quadrate, Koeffizienten  $\pm$  asymptotischer Standardfehler)

Durchgezogen: weiblich ( $y = 91 (\pm 7) + 0.17 (\pm 0.03)x$ ,  $R^2 = 0.1440$ ,  $s_{y/x} = 41$ )

Gestrichelt: männlich ( $y = 71 (\pm 7) + 0.29 (\pm 0.03)x$ ,  $R^2 = 0.3153$ ,  $s_{y/x} = 47$ )

## **4 Diskussion**

### **4.1 Referenzkollektiv und Referenzbereiche für die Galaktitol-Ausscheidung im Urin bei klassischer Galaktosämie**

#### **4.1.1 Referenzkollektiv**

Zur Erstellung von Referenzbereichen der Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie mit guter diätetischer Compliance wurde ein Kollektiv von 40 Patienten untersucht.

Bei Patienten mit klassischer Galaktosämie bleiben die biochemischen Kontrollparameter, wie das Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten und das Galaktitol im Urin, im Vergleich zu Gesunden selbst unter optimaler diätetischer Einstellung signifikant erhöht (Roe et al., 1973; Schwarz, 1960; Walter et al., 1999; Yamazaki et al., 1991). Daher konnten als Referenzkollektiv keine Gesunden herangezogen werden.

Aufgrund der mit etwa 1000 Patienten (davon ca. 600 in der Galaktosämie Initiative Deutschland e.V. engagiert) geringen Größe des Patientenkollektivs in Deutschland und der stringenten Einschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie konnte nur ein relativ kleines Referenzkollektiv mit 40 Teilnehmern rekrutiert werden.

Da aus früheren Untersuchungen eine Altersabhängigkeit der endogenen Galaktose-Bildung und der Galaktitol-Ausscheidung im Urin bekannt war (Berry et al., 2004; Hutchesson et al., 1999; Palmieri et al., 1999; Schadewaldt et al., 2003), wurden die Patienten so ausgewählt, dass ein möglichst breites Altersspektrum abgebildet werden konnte.

Das untersuchte Referenzkollektiv war ein hinsichtlich der biochemischen Charakteristik und metabolischen Einstellung der teilnehmenden Patienten homogenes Kollektiv. Die residuale GALT-Aktivität aller Patienten dieser Gruppe lag unter 2% der Norm und spricht somit für das Vorliegen einer klassischen Galaktosämie und einen vergleichbar stark ausgeprägten Stoffwechseldefekt bei allen Patienten.

Durch persönlichen Kontakt zu den teilnehmenden Patienten bzw. deren Eltern konnte die hohe Compliance unserer Patienten und die Einhaltung der üblichen Ernährungsgewohnheiten im Untersuchungszeitraum bestätigt werden. Zusätzlich

wurde die Compliance der Patienten und Ihre Stoffwechseleinstellung anhand des Galaktose-1-Phosphat-Gehalts in den Erythrozyten objektiviert. Mit Galaktose-1-Phosphat-Werten von 75 – 236  $\mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$  zeigte sich hier die gute Stoffwechseleinstellung der Patienten. Galaktose-1-Phosphat-Werte deutlich über dem oberen Behandlungszielwert von 150  $\mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$  traten lediglich bei einer Patientin und einem Patienten auf.

Bei sämtlichen Patienten dieser Untersuchungsgruppe erfolgte eine Genotypisierung. Die häufigste genetische Variante war mit einer Allelhäufigkeit von 70% die Variante g.1466A>G (p.Q188R), in 8% lag die Variante g.2328G>T (p.K285N) und in 3% die Variante g.1649G>C (p.L195P) vor. Andere Mutationen kamen in der Regel zu unter 2.5% vor. Die Verteilung der im Referenzkollektiv gefundenen Genotypen entspricht somit den in der Literatur für das europäische Patientenkollektiv beschriebenen Mutationshäufigkeiten (Leslie et al., 1992; Elsas et al., 1995; Holton et al., 2001).

Insgesamt ist das untersuchte Patientenkollektiv somit bezüglich seiner metabolischen Eigenschaften homogen und repräsentativ für das deutsche Gesamtkollektiv von Patienten mit klassischer Galaktosämie.

#### **4.1.2 Modell für Referenzbereiche**

Die Daten zur Galaktitol-Ausscheidung der Referenzgruppe wurden zur Erstellung eines Nomogramms verwendet, das die Referenzbereiche der Galaktitol-Ausscheidung von Patienten mit klassischer Galaktosämie in Form von Perzentilenkurven darstellt. Das auf einem einfachen Wachstumsraten-Modell basierende Nomogramm berücksichtigt die geschlechtsspezifischen Unterschiede und die Altersabhängigkeit der Galaktitol-Ausscheidung sowie die intraindividuelle Variabilität über einen kurzen bis mittleren Untersuchungszeitraum von ca. sechs Wochen.

Zur Beurteilung der Anwendbarkeit des Modells im Stoffwechsel-Monitoring von Patienten wurden die Daten zur Galaktitol-Ausscheidung eines Monitoring-Kollektivs herangezogen und ihre Übereinstimmung mit den Referenzbereichen des Modells überprüft. Dazu standen Daten von 164 der ca. 1000 an Galaktosämie erkrankten Patienten in Deutschland zur Verfügung. Dies repräsentiert ca. 15% der Patienten in Deutschland. Einzige Voraussetzung für die Aufnahme eines Patienten in das

Monitoring-Kollektiv war das extern gesicherte Vorliegen einer klassischen Galaktosämie.

Es zeigte sich hier eine große Kohärenz der im Stoffwechsel-Monitoring gewonnenen Daten mit dem Referenz-Modell. Bei beiden Geschlechtern traten jedoch Werte unter der 1%-Perzentile und über der 99%-Perzentile häufiger als statistisch erwartet auf. Ursächlich hierfür könnten geringfügige differentielle Unterschiede der residualen GALT-Aktivität sein, die in der Enzymaktivitätsanalyse nicht detektierbar sind, jedoch *in vivo* von pathophysiologischer Relevanz sein könnten.

Die Werte unter der 1%-Perzentile treten über das gesamte Altersspektrum verteilt auf. Dies könnte durch die außergewöhnlich restriktive Stoffwechseleinstellung dieser Patienten in der Monitoring-Gruppe erklärt werden.

Im Gegensatz dazu treten die Werte über der 99%-Perzentile in jüngeren Altersgruppen gehäuft auf. Eine Erklärung dafür könnte, neben individuellen metabolischen Eigenschaften der betroffenen Patienten, eine in jüngeren Altersgruppen noch nicht optimale diätetische Einstellung der einzelnen Patienten sein. Möglicherweise kann auch eine, aufgrund weniger verfügbarer Datenpunkte im jungen Kindesalter, schwächere Definition des jüngeren Altersbereichs im Referenzkollektiv ursächlich für diese Beobachtung sein. So wurden 26% der Proben des Monitoring-Kollektivs von Patienten im Alter von unter vier Jahren gewonnen, während im Referenzkollektiv lediglich 5% der Proben aus dieser Altersgruppe stammten.

Insgesamt jedoch wird auch das Monitoring-Kollektiv gut durch das erstellte Modell beschrieben. Dies lässt darauf schließen, dass das Modell im Stoffwechsel-Monitoring des Gesamtkollektivs anwendbar ist und zeigt zusätzlich, dass das Patientenkollektiv in Deutschland analog zur definierten Referenz-Gruppe insgesamt ein metabolisch gut eingestelltes Kollektiv ist. Dafür spricht auch die allgemeine Situation der Galaktosämie-Patienten in Deutschland.

Die Mehrzahl der Patienten mit klassischer Galaktosämie (ca. 600 der etwa 1000 Patienten in Deutschland) ist aktiv in die Galaktosämie Initiative Deutschland e.V. eingebunden und durch ein flächendeckendes Netz an Stoffwechselzentren engmaschig betreut. Neben einem intensiven Informationsaustausch und ständiger Fortbildung der Patienten über ihre Erkrankung führt das Engagement der Patienten zu einer hohen Compliance bei der diätetischen Einstellung und zur regelmäßigen Teilnahme an den Kontrolluntersuchungen.

## 4.2 Biochemisches Monitoring bei klassischer Galaktosämie

### 4.2.1 Galaktitol im Urin

Aus der Literatur waren bereits eine Altersabhängigkeit der Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie sowie eine im Vergleich zu Gesunden persistierend erhöhte Galaktitol-Ausscheidung unter guter diätetischer Einstellung bekannt (Roe et al., 1973; Schadewaldt et al., 2003; Stollwerck, 2009; Yamazaki et al., 1991). Unsere Untersuchungen bestätigen diese Befunde und beschreiben darüber hinausgehend den zunächst exponentiellen Abfall der Galaktitol-Ausscheidung und anschließenden Übergang in eine stabile Phase mit zunehmendem Alter unabhängig vom Geschlecht. Darauf aufbauend konnten erstmals altersabhängige Referenzbereiche der Galaktitol-Ausscheidung erstellt werden.

Zur Etablierung der Referenzbereiche der Galaktitol-Ausscheidung wurden von den einzelnen Patienten Nüchternurinproben über einen Zeitraum von ca. sechs Wochen analysiert, um neben der Altersabhängigkeit auch die intraindividuelle Variabilität über kurze bis mittlere Zeiträume zu untersuchen.

Im Rahmen des Stoffwechsel-Monitorings konnten ergänzend Individualverläufe und somit auch die intraindividuelle Variabilität über einen längeren Zeitraum von mehreren Jahren beobachtet werden.

Um die intraindividuelle Variabilität der Galaktitol-Ausscheidung möglichst unabhängig von ernährungsbedingten Interferenzen untersuchen zu können wurde vorausgesetzt, dass die Proben des Referenzkollektivs nach einer Übernachtfasten-Periode gewonnen wurden und alle Patienten während des Untersuchungszeitraumes ihre gewohnte Diät unverändert beibehielten. Dies konnte über einen engmaschigen persönlichen Kontakt zu den Patienten überprüft werden. Im Falle auffälliger Galaktitol-Werte im Urin erfolgte eine unmittelbare Rücksprache mit den Patienten über mögliche diätetische oder situative Besonderheiten vor der Probennahme. Somit kann die hier ermittelte intraindividuelle Variabilität als weitgehend unabhängig von extrinsischen Faktoren gelten. Als ursächlich für die intraindividuelle Variabilität müssen also intrinsische Faktoren und hier, neben individuellen metabolischen Eigenheiten, in erster Linie die endogene Galaktose-Bildung betrachtet werden.

In dem Referenzkollektiv war die intraindividuelle Variabilität mit einem mittleren Variationskoeffizienten von 8.3% bei Patientinnen und 8.4% bei Patienten deutlich geringer als bisher in der Literatur von Hutchesson et al. (1999) beschrieben. In dieser Studie wurde ein geschlechtsübergreifender Variationskoeffizient von 37% ermittelt, jedoch wurden im Gegensatz zu unseren Untersuchungen Zufalls-Urinproben analysiert, so dass hier die höhere intraindividuelle Variabilität wahrscheinlich auf Effekte der zufälligen Probengewinnung zurückzuführen ist. Daher scheint für das metabolische Monitoring eine präprandiale Probenahme zur Bestimmung der Galaktitol-Ausscheidung sinnvoller.

Die interindividuelle Variabilität der Galaktitol-Ausscheidung im Referenzkollektiv war mit Variationskoeffizienten von 29% bei den Patientinnen und 41% bei den Patienten beträchtlich. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Untersuchungen überein (Hutchesson et al., 1999). Aufgrund dessen scheint ein interindividueller Vergleich der Stoffwechseleinstellung anhand der Galaktitol-Ausscheidung im Urin ebenfalls nicht sinnvoll.

Im Stoffwechsel-Monitoring konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Galaktitol-Ausscheidung eines individuellen Patienten weitgehend entlang seiner Perzentile verläuft. Dies ermöglicht es, Zielwerte der Galaktitol-Ausscheidung für einzelne Patienten festzulegen, anhand derer ihre individuellen Stoffwechseleinstellungen im Langzeitverlauf eingeschätzt werden können.

Galaktitol im Urin kann demnach unter diesen Bedingungen ein geeigneter Monitoring-Parameter für die Beurteilung einer individuellen Gesamt-Stoffwechselsituation und der metabolischen Einstellung eines Patienten über einen längeren Zeitraum sein.

Da in dieser Studie Nüchternurinproben von diätetisch gut eingestellten Patienten untersucht wurden, können aus dieser Untersuchung keine ernährungsbedingten Effekte auf die Galaktitol-Ausscheidung beurteilt werden. Zur Klärung der Frage, ob Galaktitol im Urin ein geeigneter Parameter zur Überwachung speziell der diätetischen Compliance sein kann, sind weitere Studien erforderlich.

Nach eigenen Untersuchungen an einem begrenzten Kollektiv von Patienten mit klassischer Galaktosämie und guter diätetischer Compliance (n=6) beträgt die täglich im Rahmen der normalen Diät aufgenommene Galaktose-Menge unter 2 mg/kg (Schadewaldt et al., 2009, unveröffentlichte Daten). Der Einfluss ernährungsbedingter Faktoren auf die Galaktitol-Ausscheidung unter darüber

hinausgehender exogener Galaktose-Zufuhr müsste in langfristigen Belastungsstudien experimentell untersucht werden.

Bisherige Studien zu diesem Thema zeigen, dass eine akute exogene Galaktose-Belastung dosisabhängig zu einer kurzfristigen Erhöhung der Galaktitol-Ausscheidung führt (Berry et al., 1993; Palmieri et al., 1999; Roe et al., 1973; Wehrli et al., 1997; Yamazaki et al., 1991). So hatten einmalige hohe Gaben (1.25 g/kg) von Galaktose eine signifikante Erhöhung der Galaktitol-Ausscheidung zur Folge. Das alte Niveau wurde nach mehr als zehn Tagen wieder erreicht. Demgegenüber fiel die kurzfristig erhöhte Galaktitol-Ausscheidung nach einmaliger geringerer Galaktose-Gabe (0.15 g/kg) schneller, nämlich innerhalb von 24 Stunden, auf den Ausgangswert (Yamazaki et al., 1991). In den ersten zwei Stunden nach oraler Galaktose-Belastung von 350 mg/kg wurden bereits 95% des vermehrt ausgeschiedenen Galaktitols im Urin gefunden (Sitzmann et al., 1977).

Bezüglich des Effektes einer längerfristig erhöhten Galaktose-Zufuhr sind unterschiedliche Ergebnisse publiziert, wobei in allen diesen Studien mit bis zu drei Patienten sehr kleine und somit wenig repräsentative Kollektive untersucht wurden. Eine hohe Galaktose-Supplementation von bis zu 30 g/d über fünf Tage führte zu einer signifikant erhöhten Galaktitol-Ausscheidung (Roe et al., 1973). Eine langfristige moderate Galaktose-Supplementation von 200 mg/d führte nach drei Wochen ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung des Galaktitols im Urin (Berry et al., 1993). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten in einer anderen Studie nach Gabe von ansteigenden Wochendosen von zunächst 200 mg/d und schließlich 600 mg/d über insgesamt sechs Wochen keine signifikante Veränderung der Galaktitol-Ausscheidung beobachtet werden (Bosch et al., 2004). Die Gründe für diese unterschiedlichen Studienergebnisse sind unbekannt.

Neben diesen Belastungsstudien konnte in Galaktose-Umsatzstudien gezeigt werden, dass Galaktitol im Urin nicht direkt aus exogen zugeführter, markierter Galaktose stammt, sondern aus endogenen Quellen freigesetzt wird (Kamalanathan, 2005; Schadewaldt et al., 2004). Ob dies ein Widerspruch zu den Ergebnissen der Belastungsstudien ist oder auf die im Vergleich zu den Belastungsstudien geringe Applikation von Galaktose in den Galaktose-Umsatzstudien zurückzuführen ist, bleibt unklar.

Diese Befunde lassen vermuten, dass Galaktitol im Urin geeignet sein könnte, eine dauerhaft erhöhte Galaktose-Zufuhr insgesamt anzuzeigen, während einmalige

Diätfehler aufgrund der raschen Normalisierung der Galaktitol-Ausscheidung der Detektion entgehen können. Ob das Galaktitol im Urin nach wiederholten Diätfehlern kumuliert und somit über periodische Messungen eine nachlässige Diätführung anzeigen kann, bleibt noch unklar. Dies müsste in einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden.

Ebenso müsste in Umsatzstudien mit höherer Galaktose-Zufuhr überprüft werden, welchen Einfluss eine exogene Galaktose-Zufuhr auf die endogene Galaktitol-Bildung und -Ausscheidung hat und ob es bei einer erhöhten exogenen Galaktose-Zufuhr zu einer Bildung von Galaktitol aus exogen zugeführter Galaktose kommt.

Unbekannt bleibt auch weiterhin, ob eine Korrelation zwischen dem Galaktitol im Urin und einer potentiellen Organschädigung besteht. Dies in Belastungsstudien näher zu untersuchen erscheint jedoch ethisch bedenklich.

Zusammenfassend liegen derzeit nur unzureichende Daten zur Beurteilung der langfristigen Effekte einer erhöhten exogenen Galaktose-Zufuhr auf die Galaktitol-Ausscheidung vor.

Ebenso existieren weder für das Galaktitol im Urin noch für das derzeit als Monitoring-Parameter verwendete Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten gesicherte Daten zur Beurteilung der Unbedenklichkeit oder des Gefährdungspotentials der beobachteten Metabolit-Spiegel.

#### **4.2.2 Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten**

Seit 1960 ist das Galaktose-1-Phosphat als Stoffwechselkontrollparameter bei Galaktosämie-Patienten etabliert (Schwarz et al., 1960).

In Deutschland gilt für alle Patienten einheitlich ein Galaktose-1-Phosphat-Wert von  $150 \mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$  als oberer Behandlungszielwert, wobei von einem zelltoxischen Wert des Galaktose-1-Phosphats erst bei ca.  $550 \mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$  ausgegangen werden muss (Schwarz et al., 1960). In der Literatur findet sich nicht sicher begründet, woran sich der obere Behandlungszielwert orientiert. So scheint dieser Wert in gewissem Sinne relativ willkürlich gesetzt und aus der Beobachtung der unter optimaler Diät erreichbaren Galaktose-1-Phosphat-Werte bei Galaktosämie-Patienten hervorgegangen zu sein.

Auch unter optimaler diätetischer Einstellung bleibt das Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten im Vergleich zu Gesunden erhöht (Holton et al., 2001).

Im Gegensatz zur Galaktitol-Ausscheidung im Urin findet sich bei dem Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten nach einem initialen Abfall bei Beginn der Diät eine weit weniger ausgeprägte Altersabhängigkeit. Dies lässt darauf schließen, dass der Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten nicht in dem Maße parallel zur endogenen Galaktose-Synthese verläuft wie das Galaktitol im Urin. Dies wiederum ließe vermuten, dass das Galaktose-1-Phosphat, weil unabhängiger von der individuellen endogenen Galaktose-Bildung, ein geeigneter Parameter zur Beurteilung der exogenen Galaktose-Zufuhr, also der diätetischen Compliance sein könnte.

In Studien konnte eine kurzfristige Erhöhung des Galaktose-1-Phosphats in den Erythrozyten nach hoher exogener Galaktose-Belastung von einmalig 2 g nachgewiesen werden (Donnell et al., 1963). Andererseits zeigten sich weder bei einer dauerhaften moderaten Galaktose-Belastung von täglich 200 mg über einen Zeitraum von drei Wochen noch bei ansteigenden Tagesdosen von anfänglich 200 mg täglich bis zu 600 mg täglich über einen Zeitraum von sechs Wochen messbare Effekte auf den Galaktose-1-Phosphat-Gehalt der Erythrozyten (Berry et al., 1993; Bosch et al., 2004).

Stoffwechselumsatz-Studien konnten eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung des Galaktose-1-Phosphats nach Infusion von  $^{13}\text{C}$ -markierter Galaktose nachweisen, jedoch nur in Einzelfällen konnte auch eine signifikante Erhöhung des gesamten Galaktose-1-Phosphats festgestellt werden (Kamalanathan, 2005; Schadewaldt et al., 2004). Nach einer oralen Galaktose-Belastung fallen die Galaktose-1-Phosphat-Werte innerhalb von 24 Stunden auf ihr altes Niveau (Walter et al., 1999), daher scheint dieser Parameter ungeeignet für das Langzeit-Monitoring der diätetischen Einstellung.

Auch beim Galaktose-1-Phosphat fehlen Aussagen zur Korrelation von Metabolitkonzentrationen und dem Beginn einer Organschädigung. So bleibt unklar, ob und in welchem Maße erhöhte Galaktose-1-Phosphat-Gehalte in den Erythrozyten mit Organschädigungen korrelieren und welche exogen zugeführten Galaktose-Mengen zu einer Schädigung führen könnten. (Schweitzer et al., 1993; Waggoner et al., 1990).

Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten, wie es derzeit in der klinischen Routine verwendet wird, kann nur als eine Art Absicherung verstanden werden. Solange Patienten Werte im Behandlungszielbereich aufweisen, kann eine schädigende exogene Galaktose-Zufuhr als unwahrscheinlich gelten. Bei dauerhafter Erhöhung der Galaktose-1-Phosphat-Werte kann eine Überlastung des metabolischen Systems drohen, es muss dann die Empfehlung zur Kontrolle der Diät ausgesprochen werden, bevor letztlich organschädigende Bereiche erreicht werden.

Derzeit wird ein Galaktose-1-Phosphat-Zielwert für alle Patienten verwendet. Sowohl altersabhängige als auch individuell unterschiedliche metabolische Toleranzen von exogen zugeführter Galaktose bleiben hier unberücksichtigt. Zur sinnvolleren Bewertung des Galaktose-1-Phosphats scheint die Einführung von altersabhängigen Galaktose-1-Phosphat-Zielwerten wünschenswert.

Da aus Studien bekannt ist, dass die intraindividuelle Variabilität des Galaktose-1-Phosphat mit einem Variationskoeffizienten von 36% hoch und das Verhältnis der intraindividuellen zur interindividuellen Variabilität mit einem Variationskoeffizienten von 61% niedrig ist, scheinen Einzelmessungen zur Beurteilung der Stoffwechseleinstellung genauso ungeeignet wie Vergleiche eines Individuums mit den Referenzwerten der Gesamtpopulation (Hutchesson et al., 1999). Wie auch für das Galaktitol im Urin sollte eine individuelle Langzeitbetrachtung dieses Monitoring-Parameters erfolgen.

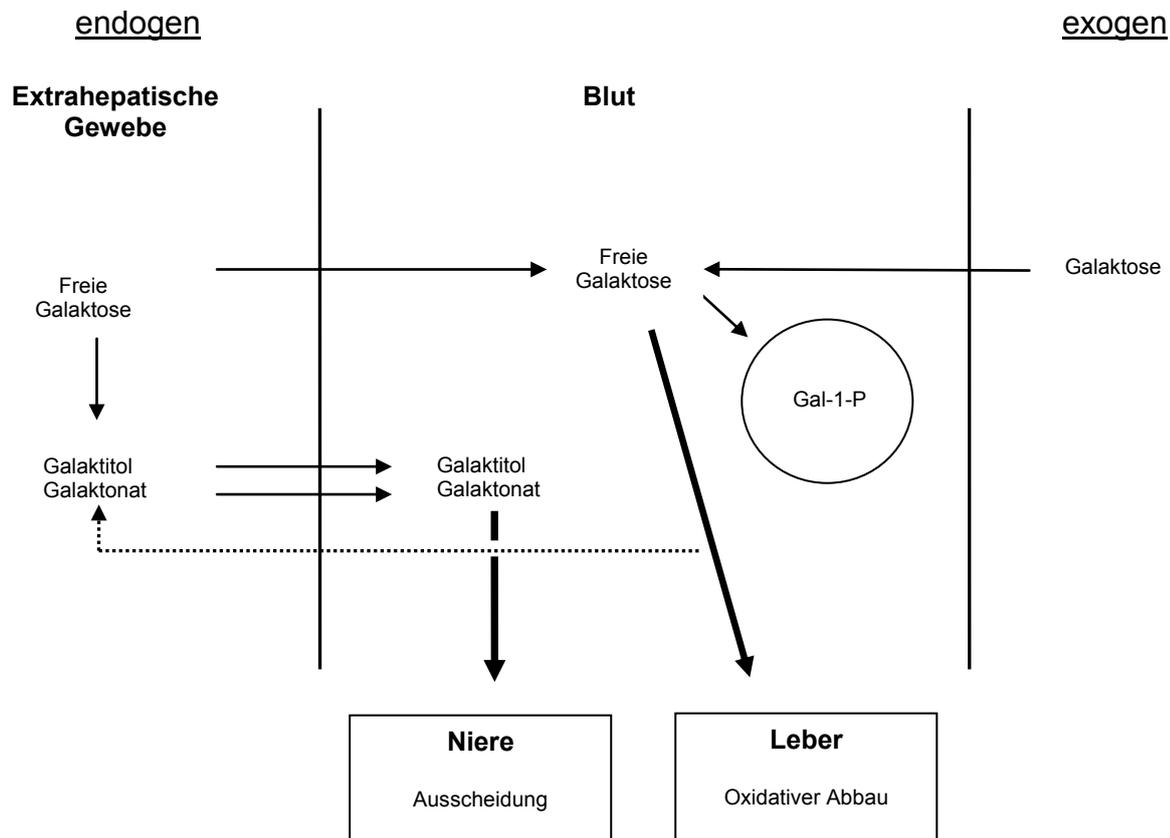
#### **4.2.3 Differentielle Betrachtung der Monitoring-Parameter**

Mittels linearer Regressionsanalyse konnte aus unseren Daten keine Korrelation zwischen der Galaktitol-Ausscheidung im Urin und dem Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten gefunden werden. Frühere Studien bestätigen diese Beobachtung (Hutchesson et al., 1999; Jakobs et al., 1995).

Das und die Tatsache, dass die beiden Parameter in unterschiedlichen Stoffwechselkompartimenten über verschiedene Stoffwechselwege entstehen, lassen darauf schließen, dass diese zwei Galaktose-Metaboliten unterschiedliche Aspekte des Galaktose-Stoffwechsels widerspiegeln.

Bei Patienten hat eine exogene Galaktose-Zufuhr zunächst Auswirkungen im Blut-Leber-Kompartiment. Im Blutplasma kommt es zu einem Anstieg der freien

Galaktose, in der Folge wird in den Erythrozyten nach Aufnahme der freien Galaktose vermehrt Galaktose-1-Phosphat, sowie in geringen Ausmaß auch Galaktitol und Galaktonat gebildet. Schließlich erfolgt im hepatischen Gewebe der oxidative Abbau der aufgenommenen Galaktose.



**Abbildung 12** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Stoffwechselwege endogen gebildeter und exogen zugeführter Galaktose

Endogen in den extrahepatischen Geweben gebildete Galaktose wird zu ca. 25% in Form freier Galaktose und nach Metabolisierung über die alternativen Stoffwechselwege zu 10% in Form von Galaktitol und Galaktonat an das Blutplasma abgegeben. Galaktitol und Galaktonat werden renal eliminiert. Exogen zugeführte Galaktose führt in erster Linie zu einem Anstieg der freien Galaktose im Plasma und konsekutiv zu einer vermehrten Aufnahme in die Erythrozyten und vermehrter Bildung von Galaktose-1-Phosphat. In der Leber erfolgt der oxidative Abbau der freien Galaktose. Bei Auslastung der Leberkapazität zum Abbau von Galaktose kommt es zu einer Aufnahme der Galaktose in die extrahepatischen Gewebe (dargestellt durch den gestrichelten Pfeil) und in der Folge gesteigerter Metabolisierung zu Galaktitol und Galaktonat.

Demgegenüber entsteht das renal ausgeschiedene Galaktitol aus endogen gebildeter Galaktose in den extrahepatischen Geweben über die alternativen Stoffwechselwege.

Der Großteil der in den extrahepatischen Geweben endogen gebildeten Galaktose wird noch vor Ort oxidativ abgebaut. Etwa 25% der gebildeten Galaktose werden als freie Galaktose an das Plasma abgegeben und schließlich hepatisch abgebaut. Ca. 10% der endogen entstandenen Galaktose werden in Form von Galaktitol und Galaktonat an das Plasma abgegeben und schließlich renal eliminiert (Schadewaldt et al., 2004).

Vorstellbar wäre also, dass eine erhöhte exogene Galaktose-Belastung des Organismus an erster Stelle das Blut- und Lebersystem beeinflusst und es daher zunächst zu einem Anstieg der Galaktose-Metaboliten, wie Galaktose, Galaktitol, Galaktonat und Galaktose-1-Phosphat im Blut kommt. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Studie bei Patienten mit einer Duarte-Variante (Ficiocioglu et al., 2010). Hier konnte eine signifikante Korrelation der exogenen Galaktose-Zufuhr im Rahmen der normalen Ernährung mit den Galaktose-Metaboliten Galaktose-1-Phosphat, Galaktitol und Galaktonat in den Erythrozyten ermittelt werden. Wobei diese für Galaktitol und Galaktonat stärker war als für Galaktose-1-Phosphat. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Korrelation der exogenen Galaktose-Zufuhr mit den Galaktose-Metaboliten in Plasma und Urin.

Bei Patienten mit klassischer Galaktosämie unter diätetischer Therapie kommt es nicht zur ungehinderten Akkumulation der Galaktose-Metaboliten, sondern zur Ausbildung eines steady-state der Galaktose-Metaboliten in den einzelnen Stoffwechselkompartimenten. Dies lässt darauf schließen, dass auch bei Patienten mit Galaktosämie metabolische Kapazitäten zum Abbau der Galaktose vorhanden sind.

Stoffwechsel-Umsatzstudien konnten zeigen, dass bei Patienten mit klassischer Galaktosämie exogen zugeführte Galaktose oxidativ abgebaut werden kann, jedoch in weit geringerem Ausmaß bzw. deutlich langsamer als dies bei Gesunden der Fall ist. So wurden nach exogener Zufuhr von 7 mg/kg Galaktose bei den Patienten in den ersten fünf Stunden zunächst nur ca. 4% der Galaktose oxidativ abgebaut (Berry et al., 1995). Allerdings zeigte sich, dass nach 24 Stunden etwa 60% der zugeführten Galaktose oxidativ abgebaut worden waren, während dies bei Gesunden in einem Fünftel der Zeit erfolgte (Berry et al., 2004). Dies ist zum einen auf die residuale

Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase, zum anderen aber auch auf die in geringem Umfang mögliche direkte Oxidation über die Bildung von Galaktonat zurückzuführen.

Während die Parameter im Blut, vor allem das Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten, somit unmittelbar auf eine exogene Galaktose-Zufuhr ansprechen, reagiert die Galaktitol-Ausscheidung offenbar erst verzögert auf eine Galaktose-Belastung des Organismus.

Erst wenn die metabolischen Kapazitäten von Blut und Leber zur Aufnahme und Verstoffwechslung von exogener Galaktose gesättigt sind, reagieren die extrahepatischen Gewebe auf die Galaktose-Belastung mit einer Galaktose-Aufnahme, einer erhöhten Bildung von Galaktitol und, in geringerem Umfang, von Galaktonat, Abgabe der Metaboliten an das Plasma und konsekutiv erhöhter Ausscheidung im Urin.

Möglicherweise geben zukünftig Befunde bei Patienten mit einer Duarte-Variante der Galaktosämie Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen, um die Rolle der unterschiedlichen Stoffwechselwege und Metaboliten besser zu verstehen.

Diese phänotypisch gesunden Patienten weisen eine residuale Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität von etwa 25% auf. Im Gegensatz zu Patienten mit klassischer Galaktosämie liegen die Galaktose-1-Phosphat-Werte bei allen Patienten mit einer Duarte-Variante im normalen Bereich. Bei einem Teil dieser Patienten liegen die Galaktose-Metaboliten der alternativen Stoffwechselwege, also Galaktitol und Galaktonat, in den Erythrozyten ebenfalls im normalen Wertebereich. Ein anderer Teil der Patienten zeigt jedoch analog zu Patienten mit klassischer Galaktosämie eine erhöhte Konzentration von Galaktitol und Galaktonat in den Erythrozyten. Bemerkenswerterweise konnte keine Korrelation der erhöhten Galaktose-Metaboliten in den Erythrozyten mit den Metabolit-Spiegeln im Plasma ermittelt werden. Die Ursachen für diese Befunde sind unklar, könnten letztlich aber auf unterschiedlichen erythrozytären Eigenschaften der beiden Patientengruppen beruhen.

Bei diesen Patienten ist, anders als bei Patienten mit klassischer Galaktosämie, die Galaktonat-Konzentration in den Erythrozyten höher als die Galaktitol-Konzentration und sogar höher als die Galaktonat-Konzentration bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (Ficicioglu et al., 2005). Die Galaktitol-Galaktonat-Ratio ist bei Gesunden und Patienten mit einer Duarte-Varianten kleiner Eins, während sie bei

Patienten mit klassischer Galaktosämie größer Eins ist. Die Gründe dafür sind ebenfalls noch unklar und müssten in Zukunft näher untersucht werden.

Betrachtet man die renale Ausscheidung der Galaktose-Metaboliten, so zeigt sich bei Patienten mit einer Duarte-Variante im Vergleich zu Gesunden eine zweifach höhere Galaktonat-Ausscheidung, während die Galaktitol-Ausscheidung jedoch im normalen Referenzbereich lag (Yager et al., 2006). Dabei konnte keine Korrelation der Metabolit-Spiegel im Urin zur exogenen Galaktose-Zufuhr festgestellt werden (Ficiocioglu et al., 2010). Möglicherweise jedoch könnte die Relation der Galaktose-Metaboliten im Urin zueinander ein Parameter sein, der durch eine exogene Galaktose-Zufuhr deutlicher beeinflusst wird, als die individuelle Rate der Metabolit-Ausscheidung. Dies müsste zukünftig in Belastungsstudien untersucht werden.

Auch bei diesen Patienten konnte weder eine Korrelation des Galaktose-1-Phosphats in den Erythrozyten zu dem Galaktitol im Urin, noch eine Korrelation beider Parameter zum klinischen Outcome der Patienten, die allesamt phänotypisch gesund sind, gefunden werden.

Bei Patienten mit einer Duarte-Variante wurde aber eine signifikante Relation der exogenen Galaktose-Zufuhr zu dem Galaktitol und Galaktonat in den Erythrozyten ermittelt. Die Ursachen für diese Beobachtung sind unklar (Ficiocioglu et al., 2010). Eine Übertragbarkeit dieser Befunde auf Patienten mit klassischer Galaktosämie und eine mögliche Eignung dieser Parameter im Stoffwechsel-Monitoring in Zukunft genauer untersucht werden sollte.

Insgesamt betrachtet haben beide Parameter, das Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten und das Galaktitol im Urin, einen eigenen Stellenwert im Stoffwechsel-Monitoring bei Patienten mit klassischer Galaktosämie.

Das Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten scheint eher ein sensitiver Parameter für eine akute hohe Galaktose-Belastung des Blut-Leber-Systems zu sein.

Im Sinne eines Frühwarnsystems kann ein steigender Galaktose-1-Phosphat-Gehalt der Erythrozyten eine exogene Belastung des Organismus anzeigen, wobei aber unklar bleibt wie groß der Spielraum zu einer drohenden Organschädigung ist.

Das Galaktitol im Urin spiegelt vielmehr die Stoffwechselsituation in den extrahepatischen Geweben wieder. Nach Ausschöpfung der metabolischen Kapazität des Blut-Leber-Systems kann eine steigende Galaktitol-Ausscheidung eine zunehmende Belastung der extrahepatischen Gewebe und damit eine dauerhafte

Überlastung des steady-state des Galaktose-Metabolismus anzeigen. Galaktitol im Urin kann somit der Beurteilung der gesamten Galaktose-Homöostase eines Organismus dienen.

### **4.3 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend lässt sich aus den bisherigen Untersuchungen nicht endgültig beantworten, ob einer der beiden betrachteten biochemischen Parameter besser zur Beurteilung der Stoffwechselsituation eines Patienten geeignet ist.

Aufgrund der Nicht-Korrelation der beiden Metaboliten kann der bisherige Monitoring-Parameter Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten nicht durch das Galaktitol im Urin ersetzt werden.

Da sie vermutlich unterschiedliche Stoffwechsel-Aspekte widerspiegeln, ergänzen sich die beiden Parameter im Stoffwechsel-Monitoring und legen eine gemeinsame Betrachtung im Routine-Monitoring von Galaktosämie-Patienten nahe.

In Zukunft müssten weitere Belastungsstudien erfolgen, um die Effekte einer langfristig erhöhten exogenen Galaktose-Zufuhr auf beide Parameter näher zu charakterisieren.

Die in dieser Untersuchung erstellten Referenzwerte der Galaktitol-Ausscheidung können die betreuenden Ärzte bei der Beurteilung der Galaktitol-Ausscheidung ihrer Patienten unterstützen und einer langfristigen Verlaufsbeurteilung der Stoffwechsel-Situation der Patienten dienen.

Für eine sinnvollere Beurteilung der Galaktose-1-Phosphat-Werte in den Erythrozyten wären die Etablierung altersabhängiger Zielwerte und eine individuellere Betrachtung der Galaktose-1-Phosphat-Werte im Langzeitverlauf wünschenswert.

Ob die wiederholte Messung anderer Galaktose-Metaboliten wie z.B. Galaktitol in Erythrozyten oder Plasma ergänzende Informationen zur Stoffwechsel-Situation liefern können, bleibt derzeit noch unbeantwortet und müsste in weiteren Studien untersucht werden.

Unabhängig von ihrer Eignung als Stoffwechselmonitoring-Parameter konnte in Studien gezeigt werden, dass keiner der möglichen Monitoring-Parameter mit dem Auftreten oder dem Ausmaß von langfristigen Komplikationen korreliert (Schweitzer

et al., 1993). Anhand der biochemischen Kontrollparameter ist daher eine Prognose des langfristigen klinischen Outcomes der Patienten nicht möglich.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Acosta PB, Gross KC (1995) Hidden sources of galactose in the environment. *Eur J Pediatr* 154 (Suppl 2): 87-92.
2. Belman AL, Moshe SL, Zimmerman RD (1986) Computed tomographic demonstration of cerebral edema in a child with galactosemia. *Pediatrics* 78: 606-609.
3. Berry GT, Palmieri M, Gross KC, Acosta PB, Henstenburg JA, Mazur A, Reynolds R, Segal S (1993) The effect of dietary fruits and vegetables on urinary galactitol excretion in galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 16: 91-100.
4. Berry GT, Nissim I, Mazur AT, Elsas LJ, Singh RH, Klein PD, Gibson JB, Lin Z, Segal S (1995) In vivo oxidation of [<sup>13</sup>C]galactose in patients with galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *Biochem Mol Med* 56:158-165.
5. Berry GT, Reynolds RA, Yager CT, Segal S (2004) Extended [<sup>13</sup>C]galactose oxidation studies in patients with galactosemia. *Mol Genet Metab* 82: 130-136.
6. 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.
7. 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.
8. Bosch AM, Bakker HD, Wenniger-Prick LJ, Wanders RJ, Wijburg FA (2004) High tolerance for oral galactose in classical galactosaemia: dietary implications. *Arch Dis Child* 89: 1034-1036.
9. Cuatrecasas P, Segal S (1966) Galactose conversion to D-xylulose: an alternate route of galactose metabolism. *Science* 153: 549-551.
10. Donnell GN, Bergren WR, Perry G, Koch R (1963) Galactose-1-phosphate in galactosemia. *Pediatrics* 31: 802-810.
11. 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
12. Ferraris RP, Diamond J (1997) Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev* 77: 257-302.

13. 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.
14. Ficicioglu C, Hussa C, Gallagher PR, Thomas N, Yager C (2010) Monitoring of biochemical status in children with Duarte galactosemia: utility of galactose, galactitol, galactonate and galactose-1-phosphate. *Clin Chem* 56: 1177-1182.
15. Fridovich-Keil JL, Jinks-Robertson S (1993) A yeast expression system for human galactose-1-phosphate uridyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 398-402.
16. 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.
17. Galaktosämie Initiative Deutschland e.V.  
<http://www.galid.de/pages/startseite.php>
18. Gitzelmann R (1976) Screening of newborns for inborn errors of galactose metabolism. Methods and results. *Monatsschr Kinderheilkd* 129: 654-657.
19. 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.
20. 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.
21. Gitzelmann R, Steinmann B (1984) Galactosemia: how does long-term treatment change the outcome? *Enzyme* 32: 37-46.
22. 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.
23. Heyman S, Kinoshita JH (1965) Isolation and properties of lens aldose reductase. *J Biol Chem* 240: 877-880.
24. Heyman S, Lou M, Kinoshita JH (1966) Aldose reductase activity in the lens and other tissues. *Biochim Biophys Acta* 128: 474.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. Inoue B, Hata M, Ichiba Y, Wada H, Misumi H, Mori T (1990) Results of newborn screening for galactose metabolic disorders. *J Inherit Metab Dis* 13: 93-101
29. Isselbacher KJ (1958) A mammalian uridinediphosphate galactose pyrophosphorylase. *J Biol Chem* 232: 429-444.
30. Jakobs C, Schweitzer S, Dorland B (1995) Galactitol in galactosemia. *Eur J Pediatr* 154 [Suppl 2]: 50-52
31. Kamalanathan L (2005) Endogene Galaktose-Synthese bei Galaktosämie. Inauguraldissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: pp105-107.
32. 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.
33. 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.
34. Leloir LF (1951) The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch Biochem* 33: 186-190.
35. 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.
36. Levy HL (1980) Screening for galactosemia. In: *Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism*. Editors: Burman D, Holton JB, Pennoel CA. MTP Press, Lancaster: pp133-139.
37. Li Y, Ptolemy AS, Harmonay L, Kellogg M, Berry GT (2010) Quantification of galactose-1-phosphate uridyltransferase enzyme activity by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 56: 772-780.
38. Mayes JS, Guthrie R (1968) Detection of heterozygotes for galactokinase deficiency in a human population. *Biochem Genet* 2: 219-230.

39. 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 uridylyltransferase deficiency galactosemia. *Metabolism* 48: 1294-1302.
40. 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.
41. Roe TF, Ng WG, Bergren WR, Donnell GN (1973) Urinary galactitol in galactosemic patients. *Biochem Med* 7: 266-273.
42. Schadewaldt P, Killius S., Kamalanathan L, Hammen HW, Straßburger K, Wendel U (2003) Renal excretion of galactose and galactitol in patients with classical galactosemia, obligate heterozygous parents and healthy subjects. *J Inherit Metab Dis* 26: 459-479.
43. 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.
44. Schwarz V. (1960) The value of galactose phosphate determinations in the treatment of galactosemia. *Arch Dis Child* 35: 428-432.
45. Schweitzer S (1995) Newborn mass screening for galactosemia. *Eur J Pediatr* 154 (Suppl 2): 37-39.
46. Schweitzer S, Shin Y, Jakobs C, Brodehl J (1993) Long-term outcome in 134 patients with galactosemia. *Eur J Pediatr* 152: 36-43.
47. Schweitzer-Krantz S (2003) Early diagnosis of inherited metabolic disorders towards improving outcome: the controversial issue of galactosaemia. *Eur J Pediatr* 162 (Suppl1): 50-53.
48. 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 New York. 7th Edition: pp967-1000.
49. Shin YS (1991) Galactose metabolites and disorders of galactose metabolism. In: Hommes FA (ed) *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual*: Wiley-Liss, Inc New York, pp267-283.
50. Shirazi-Beechey SP (1995) Molecular biology of intestinal glucose transport. *Nutr Res Rev* 8: 27-41.
51. Sitzmann FC, Schmid R.D, Kaloud H (1977) Excretion of galactitol in the urine of heterozygotes of both forms of galactosemia. *Clin Chim Acta* 75:313-319.
52. Stollwerck AA (2009) Charakteristik der renalen Galaktosemetabolit-Exkretion bei Patienten mit klassischer Galaktosämie. Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: pp37-41.

53. 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 uridyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 13: 417-430.
54. van Heyningen R (1959) Formation of polyols by the lens of the rat with "sugar" cataracts. *Nature* 184: 194-195.
55. Waggoner DD, Buist NR, Donnell GN (1990) Long-term prognosis in galactosemia: results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis* 13: 802-818.
56. Wahlefeld AW, Siedel J (1985) Creatine and creatinine. In: *Methods of enzymatic analysis*. Editors: Bergmeyer J.; Große M. 3. Ed. Vol. VII: pp488-506.
57. Walter JH, Collins JE, Leonard, JV (1999) Recommendations for the management of galactosemia. *Arch Dis Child* 80: 93-96.
58. 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.
59. Weinstein AN, Segal S (1968) The metabolic fate of [1-<sup>14</sup>C]galactitol in mammalian tissue. *Biochim Biophys Acta* 156: 9-16.
60. Yager C, Wehrli S, Segal S (2006) Urinary galactitol and galactonate quantified by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 366: 216-24.
61. Yamazaki T, Mino M, Hayashi M (1991) Urinary and serum galactitol in galactosemic patients. *Acta Paediatr Jpn* 33: 61-70.
62. Yang YP, Corley N, Garcia-Heras J (2002) Molecular analysis in newborns from Texas affected with galactosemia. *Hum Mutat* 19:82-83.
63. Zabransky S, Zabransky M (2004) Jahresstatistik 1996-2002 [http://www.neoscreening.de/DGNS/screening/Scr\\_Statistik.htm](http://www.neoscreening.de/DGNS/screening/Scr_Statistik.htm)

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. P. Schadewaldt für die Überlassung des Themas sowie seine hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Seine anhaltende Diskussionsbereitschaft und seine stets konstruktive Kritik waren mir bei der Erstellung der Arbeit sehr wertvoll.

Herrn Prof. Dr. med. U. Wendel möchte ich für die Unterstützung bei der Patientengewinnung und – betreuung danken.

Herrn Dr. rer. nat. L. Kamalanathan und Herrn Dipl.-Biol. H.-W. Hammen danke ich sehr für ihre Einweisung in die Methoden, ihre geduldige und hilfsbereite Betreuung meiner Arbeiten sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Bei Herrn Dr. rer. nat. K. Straßburger möchte ich mich für seine große Hilfe bei der Statistik der Arbeit bedanken.

Ich danke herzlich Frau Dr. med. A. Stollwerck, die mir im Verlauf der Arbeit immer wieder aufmunternd mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Mein ganz herzlicher Dank gilt den Patienten und ihren Eltern für ihre Teilnahme an der Studie und ihrem damit verbundenen Aufwand bei der Sammlung, der Aufbewahrung und dem Versand der Proben.

Der Galaktosämie Initiative Deutschland e.V. danke ich für ihre Förderung der Untersuchungen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, die mich mit ihrer Unterstützung und Motivierung durch alle Phasen der Arbeit begleitet hat.

## Curriculum vitae

### Miriam Wöffler

**Geburtsdatum:** 17.02.1979  
**Geburtsort:** Haan  
**Eltern:** Dagmar Borm, Michael Wöffler  
**Geschwister:** Gunnar Wöffler

### Schullaufbahn:

1985-1989 Grundschole Parkschole Wülfrath  
 1989-1998 Städtisches Gymnasium Wülfrath  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Abitur

### Studium:

1998-2005 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
 Studium der Humanmedizin  
 25.04.2005 3. Staatsexamen  
 09.05.2005 Approbation als Ärztin

### Berufliche Laufbahn:

November 2005 -März 2009 Assistenzärztin der Abteilung für Gynäkologie und  
 Geburtshilfe, St. Josefshospital Uerdingen, Chefarzt  
 Dr. med. R. Becker

Seit April 2009 Assistenzärztin der Frauenklinik, Sana-Kliniken  
 Düsseldorf, Krankenhaus Benrath, Chefärztin PD  
 Dr. med. B. Karbowski

## Zusammenfassung

### Charakteristik der renalen Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

Miriam Wöffler

**Fragestellung:** Ziel der Arbeit war, die renale Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie im Hinblick auf eine mögliche Eignung als Stoffwechselmonitoring-Parameter systematisch zu untersuchen und mit dem konventionellen Stoffwechselmonitoring-Parameter, dem Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten zu vergleichen. Dazu sollte eine Charakterisierung der intraindividuellen Variabilität und Erstellung von altersabhängigen Referenzwerten erfolgen.

**Methodik:** Zur Bestimmung der intraindividuellen Variabilität und Erstellung von altersabhängigen Referenzbereichen für die Galaktitol-Ausscheidung im Urin wurden von einem molekularbiologisch und biochemisch homogenem Referenzkollektiv von 40 Patienten mit klassischer Galaktosämie und guter diätetischer Einstellung Nüchternurinproben über einen Zeitraum von ca. sechs Wochen gesammelt und darin die Konzentration des Galaktitols mit dem Stabilisotopen-Verdünnungsverfahren gaschromatographisch-massenspektrometrisch bestimmt. Anhand eines einfachen Wachstumsraten-Modells wurde aus den Ergebnissen ein Nomogramm der altersabhängigen Galaktitol-Ausscheidung erstellt. Zur Beurteilung der Anwendbarkeit des Modells wurden in einem Monitoring-Kollektiv 503 Nüchternurinproben von 164 Patienten hinsichtlich ihrer Galaktitol-Konzentration analysiert und die Kohärenz der Daten mit dem Modell überprüft.

**Ergebnisse:** Die Galaktitol-Ausscheidung im Urin des Referenzkollektivs zeigte eine geschlechtsunabhängige Altersabhängigkeit mit einem zunächst exponentiellen Abfall während der Kindheit, einer fortschreitenden Verlangsamung des Abfalls während der Adoleszenz und schließlich einer stabilen Ausscheidungsrate im Erwachsenenalter.

Zur Beurteilung der intraindividuellen Variabilität der Galaktitol-Ausscheidung wurden die Variationskoeffizienten berechnet, bei weiblichen Patienten betrug er  $8.3 \pm 3.2 \%$  und bei männlichen Patienten  $8.4 \pm 3.1\%$ . Die intraindividuelle Variabilität war alters- und geschlechtsunabhängig.

Die Verteilung der Daten des Stoffwechsel-Monitorings wurde gut durch das Modell beschrieben. Dies zeigt die Anwendbarkeit des Modells im Gesamtkollektiv der Patienten.

Es konnte keine Korrelation der Galaktitol-Ausscheidung mit dem Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten ermittelt werden.

**Interpretation:** Bei Patienten mit klassischer Galaktosämie sind Galaktitol im Urin und Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten nicht miteinander korreliert und scheinen unterschiedliche Aspekte des Galaktose-Stoffwechsels widerzuspiegeln, daher kann der eine den anderen Parameter im Stoffwechsel-Monitoring nicht ersetzen, sondern sie sollten gemeinsam betrachtet werden. Die erstellten altersabhängigen Referenzwerte der Galaktitol-Ausscheidung ermöglichen es, die individuelle Gesamt-Stoffwechselsituation der Patienten im Langzeitverlauf zu beurteilen und individuelle Zielwerte für die Galaktitol-Ausscheidung festzulegen.