

Endogene Galaktose-Synthese bei Galaktosämie

Loganathan Kamalanathan

Düsseldorf

2005

Endogene Galaktose-Synthese bei Galaktosämie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Loganathan Kamalanathan
aus Colombo / Sri Lanka

Düsseldorf

2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Referent: Prof. Dr. P. Schadewaldt

2. Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2005

Abkürzungsverzeichnis

δ_{PDB}	Isotopenanreicherung bezogen auf den Pee Dee Belemniten-Standard
bp	Basenpaare
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GALK	Galaktokinase
GALT	Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase
GAL-1-P	Galaktose-1-Phosphat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Hb	Hämoglobingehalt
IRMS	Isotopen-Ratio-Massenspektrometrie
KG	Körpergewicht
OD	Optische Dichte
MPE	Isotopenanreicherung in Molprozent
MW	Mittelwert
n.a.	keine Proben vorhanden
n.d.	nicht bestimmt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RBC	rote Blutzellen
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SD	Standardabweichung
SID	Stabil-Isotopen Verdünnung
SIM	Selektives Ionen-Monitoring
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
VK	Variationskoeffizienten

Inhaltsverzeichnis

Seite

Teil I

Einführung

Kapitel 1

Galaktose-Stoffwechsel und Galaktosämie 3

Teil II

Analytische Methoden

Kapitel 2

Galaktose im Plasma 19

Kapitel 3

Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten 41

Kapitel 4

Galaktonat und Galaktitol im Urin 57

Kapitel 5

Genotypische Charakterisierung 73

Kapitel 6

Sonstige Methoden 83

Teil III
Endogene Galaktose-Bildung
bei Galaktosämie

Kapitel 7

Galaktose-Bildung bei Q188R-homozygoten Patienten
mit klassischer Galaktosämie 91

Kapitel 8

Galaktose-Bildung bei compound-heterozygoten Patienten
mit klassischer Galaktosämie 119

Kapitel 9

Bedeutung der residualen Enzymaktivität für die
endogene Galaktose-Freisetzung 141

Teil IV
Synopsis

Kapitel 10

Zur endogenen Galaktose-Bildung beim Menschen 159

Literatur

Teil I

Einführung

1 Galaktose-Stoffwechsel und Galaktosämie

1.1 Galaktose-Stoffwechsel

Zucker, oder Kohlenhydrate gehören zu den wichtigsten Biomolekülen. Die mengenmäßig bedeutendsten Monosaccharide in der Ernährung sind D-Glukose und D-Galaktose. Sie dienen im menschlichen Organismus hauptsächlich als Energielieferanten und - in Form von Glykogen - als Energiespeicher.

D-Galaktose ist das C-4 Epimer der D-Glukose, und wird vor allem mit Milch und Milchprodukten in Form des Disaccharids Laktose (β -D-Galaktopyranosyl-(1,4)-D-glukopyranose; s. Abb. 1.1) aufgenommen. Kuhmilch z.B. enthält pro 100 g etwa 2.4 g, Muttermilch ca. 3.5 g D-Galaktose (Hanus et al., 1992; Kunz et al., 1999).

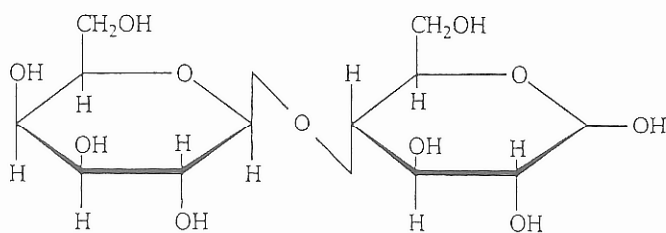


Abb. 1 Strukturformel der Laktose

In vielen Getreide- und Gemüse-Sorten sowie Früchten, aber auch in Fleisch, kommt, neben freier D-Galaktose, auch glykosidisch gebundene D-Galaktose vor (Acosta & Gross, 1995). Die Bindung der D-Galaktose kann α -1,6- (z.B. in Raffinose), β -1,3- oder β -1,4-glykosidisch (z.B. in Glykolipiden und Glykoproteinen) sein (Berry et al., 1993).

Die mit der Nahrung aufgenommene Laktose wird durch das Enzym β -Galaktosidase (Laktase, EC. 3.2.1.23), das auf der Oberfläche der Mikrovilli im Dünndarm lokalisiert ist, gespalten. Die freigesetzte D-Galaktose wird dann im Dünndarm über einen Natrium-gekoppelten Monosaccharid-Transporter, SGLT1 (sodium glucose transporter 1), resorbiert (Shirazi-Beechey, 1995; Ferraris &

Diamond, 1997). Anschließend wird die D-Galaktose vor allem in der Leber weiter verstoffwechselt.

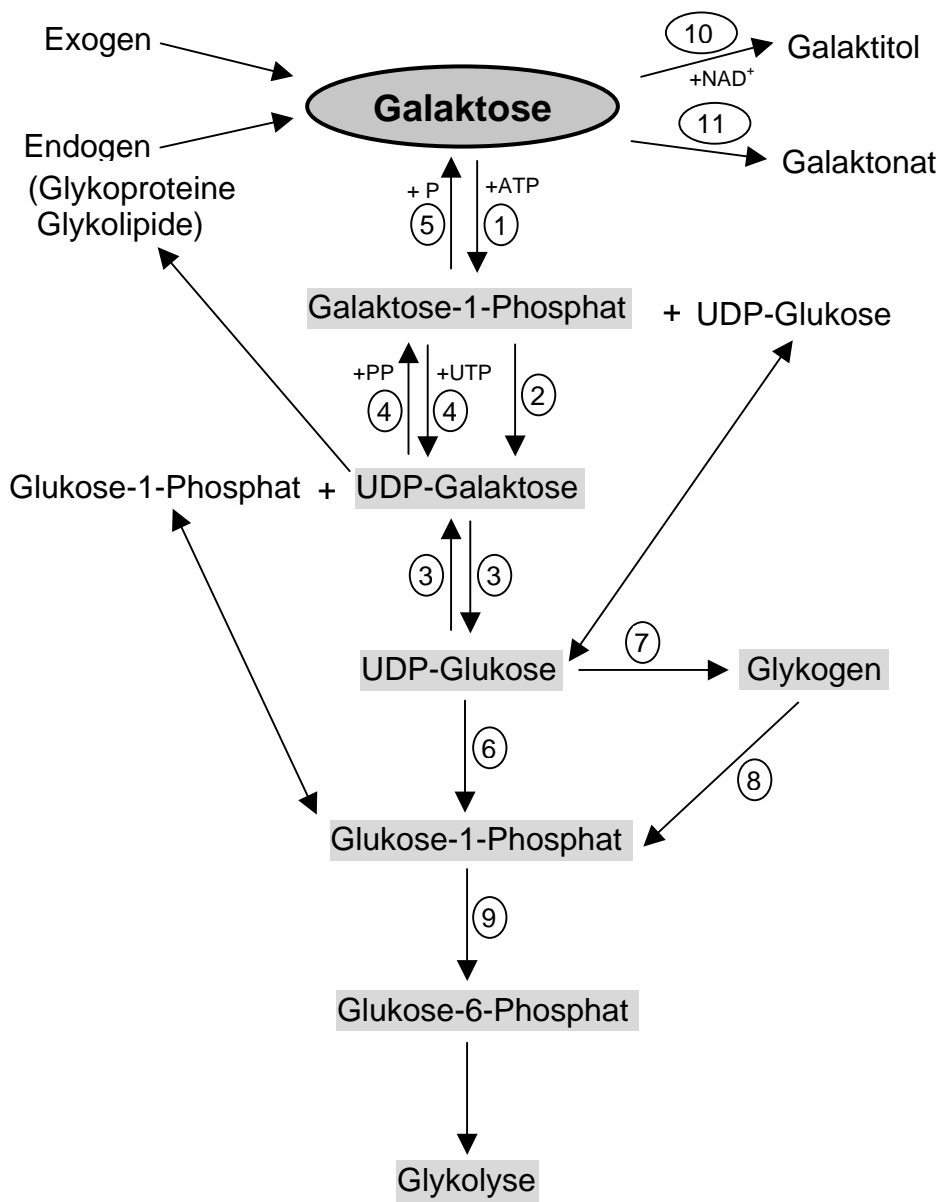


Abb.2: Schematische Darstellung des D-Galaktose-Stoffwechsels.

Enzyme: 1: Galaktokinase, 2: Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase

3: UDP-Galaktose-4-Epimerase, 4: Galaktose-Pyrophosphorylase

5: Phosphatase, 6: Glukose-Pyrophosphorylase

7: Glykogen-Synthase, 8; Glykogen-Phosphorylase

9: Phosphogluco-Mutase, 10: Aldose-Reduktase

11: Galaktose-Oxidase/-dehydrogenase

Der Abbau freier D-Galaktose erfolgt beim Menschen vor allem über den sogenannten Leloir-Stoffwechselweg (Leloir, 1951; vgl. Abb. 2). Hierbei wird die D-Galaktose zunächst durch das Enzym Galaktokinase (GALK; EC 2.7.1.6) unter ATP-Verbrauch zu D-Galaktose-1-Phosphat phosphoryliert. D-Galaktose-1-Phosphat wird durch die D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT; EC 2.7.7.12) mit UDP-Glukose zu D-Glukose-1-Phosphat und UDP-Galaktose umgesetzt. Alternativ kann die UDP-Galaktose auch aus D-Galaktose-1-Phosphat durch Umsatz mit UTP entstehen. Diese Reaktion wird durch die UDP-Galaktose-Pyrophosphorylase katalysiert (Isselbacher, 1957). Die Kapazität dieses Weges ist beim Menschen jedoch äußerst gering. Der Haupt-Eliminationsweg der D-Galaktose ist die Einschleusung in den Stoffwechsel der D-Glukose. Dazu wird die UDP-Galaktose mit Hilfe der UDP-Galaktose-4-Epimerase (GALE; EC 5.1.3.2) reversibel zu UDP-Glukose epimerisiert. UDP-Glukose kann entweder durch die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) zu D-Glukose-1-Phosphat umgewandelt oder aber - im Sinne eines Metabolit-Cyclings - wieder als Substrat für die GALT-Reaktion eingesetzt werden. Es gibt Hinweise dafür, dass die UDP-Glukose auch direkt für die Glykogen-Synthese in der Reaktion der Glykogen-Synthase (EC 2.4.1.11) verwendet werden kann (Landau, 2001; Hellerstein et al., 1995). Das D-Glukose-1-Phosphat wird schließlich in der Phosphogluco-Mutase-Reaktion (EC 5.4.2.2) in D-Glukose-6-Phosphat umgewandelt und letzteres im Rahmen der Glykolyse weiter abgebaut.

Alternative Stoffwechselwege

Neben dem Leloir-Stoffwechselweg existieren noch alternative Stoffwechselwege. D-Galaktose kann einerseits mit NADH als Coenzym durch das Enzym Aldose-Reduktase (EC 1.1.1.21) zu D-Galaktitol reduziert werden (Heyman & Kinoshita, 1965; Heyman et al., 1966) und andererseits mit NAD⁺ durch D-Galaktose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.48) oxidativ zu D-Galaktonat umgewandelt werden (Rancour et al., 1979; Cuatrecasas & Segal, 1966). D-Galaktitol wird im menschlichen Körper nicht weiter metabolisiert und kann nur durch die Nieren eliminiert werden (Weinstein & Segal, 1968). Demgegenüber kann D-Galaktonat entweder renal ausgeschieden oder über β -Ketogalaktonat weiter zu CO₂ und D-Xylulose abgebaut und letzteres schließlich im Pentosephosphatzyklus verwertet

werden. Allerdings dürfte dieser Abbauweg beim Menschen nur von sehr untergeordneter Bedeutung sein (Holton et al., 2001).

Nukleotidaktivierte D-Galaktose (UDP-Galaktose) kann zur Galaktosylierung von Proteinen oder Lipiden bei der Synthese von Glykoproteinen und Glykolipiden verwendet werden. Dazu wird die UDP-D-Galaktose über den UDP-Galaktose-Transporters (UGT) in das Lumen des Golgi-Apparats transportiert (Sprong et al., 2003) und dann die Galaktosyleinheit der UDP-D-Galaktose vor allem durch das Enzym β -1,4-Galaktosyltransferase (EC 2.4.1.22) auf N- bzw. O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidkette übertragen (Guo et al., 2001).

Zum Abbau werden die Glykokonjugate letztlich in die Lysosomen aufgenommen und D-Galaktose hydrolytisch durch β -Galaktosidase (EC 3.2.1.23) aus den Oligosaccharid-Ketten freigesetzt (Durand & Seta, 2000). Auf diese Weise kann also endogen freie D-Galaktose entstehen und nachfolgend zu D-Galaktose-1-Phosphat, D-Galaktitol oder auch D-Galaktonat, umgewandelt werden.

1.2 Klassische Galaktosämie

Bei Galaktosämie ist aufgrund eines autosomal rezessiv vererbaren Mangels an Enzymaktivität der Abbau von D-Galaktose über den Leloir-Stoffwechselweg gestört.

Die häufigste und schwerste Form der Galaktosämie ist ein praktisch vollständiges Fehlen an Aktivität der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT). Diese Erkrankung ist in Bevölkerungen kaukasischer Herkunft mit einer Inzidenz von ca. 1:40 000 die häufigste und die klinisch schwerste Form der Galaktosämie. Sie wird auch als klassische Form der Galaktosämie bezeichnet. Dagegen treten der Galaktokinase-Mangel (Inzidenz etwa 1:350 000) und der UDP-D-Galaktose-4-Epimerase-Mangel (Inzidenz etwa 1:150 000) sehr viel seltener auf und die Krankheitszeichen sind milder als bei der klassischen Galaktosämie (Holton et al., 2001). Da sich diese Arbeit hauptsächlich mit dem GALT-Mangel beschäftigt, wird auf diesen im folgenden ausführlicher eingegangen. Bezüglich einer Darstellung der

beiden anderen Formen der Galaktosämie sei auf den Übersichtsartikel von Holton et al. (2001) verwiesen.

GALT-Mangel (MIM 230400; OMIM™ 2004)

Biochemie und Klinik

Weltweit tritt die klassische Form der Galaktosämie mit einer Inzidenz von etwa 1:70 000 auf. Die Häufigkeit ist regional sehr unterschiedlich. Die Inzidenz beträgt z.B. 1:30 000 in einigen Staaten der USA, 1:96 000 in Norwegen, 1:81 000 in Schweden, 1:44 000 in England und 1:23 000 in Irland. In der Bundesrepublik Deutschland liegt die Inzidenz bei ca. 1:40 000 (Inoue et al., 1990; Schweitzer, 1995; Holton et al., 2001)

Bei Patienten mit einem angeborenen Mangel an D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase ist die residuale GALT-Aktivität in den Erythrozyten und in anderen Geweben typischerweise auf unter 1 % der Norm reduziert. Dadurch kommt es bei Neugeborenen unter Milchfütterung zu einer Akkumulation von D-Galaktose und auch von D-Galaktose-1-Phosphat und D-Galaktitol, potentiell toxischen D-Galaktose-Metaboliten. Z.B. finden sich im Plasma von Neugeborenen mit GALT-Mangel D-Galaktose-Konzentrationen von 10 - 20 $\mu\text{mol/L}$ gegenüber einem Normwert von $< 0.15 \mu\text{mol/L}$, sowie D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentrationen in den Erythrozyten, die mit 5 - 20 $\text{mmol/L}_{\text{RBC}}$ auf das 100- bis 200fache der Norm erhöht sind (Segal & Berry, 1995). Unklar ist die Auswirkung der Störung auf den UDP-D-Galaktose-Gehalt. In den Erythrozyten von Patienten wurde sowohl ein Mangel an UDP-D-Galaktose gefunden (Shin et al., 1985; Ng et al., 1989) als auch normale Konzentrationen dieses Metaboliten festgestellt (Gibson et al., 1993; Kirkman, 1995).

Neugeborene mit klassischer Galaktosämie, die mit (Mutter-)Milch ernährt werden, entwickeln innerhalb weniger Tage schwere Krankheitssymptome mit Gewichtsabnahme und häufigem Erbrechen. Es entsteht ein toxisches Krankheitsbild mit schwer gestörter Leberfunktion (Nadler et al., 1969; Roschlau, 1969), gestörter Nieren(teil)funktion und Kataraktbildung. Bei unbehandelten Patienten kann die

Ausbildung einer hepatischen Enzephalopathie mit anschließendem Koma zum Tode führen (Belman et al., 1986). Die zur Zeit einzig verfügbare Therapie besteht in einer lebenslangen strikt laktosefreien und galaktosearmen Diät. Bei frühzeitig eingeleiteter Therapie kommt es rasch zu einem Rückgang der akuten klinischen Symptome, jedoch nicht zu einer vollständigen Normalisierung der D-Galaktose-Metabolite (Holton et al., 2001).

Um rechtzeitig diätetische Therapiemaßnahmen einleiten zu können und akute Fröhschäden zu vermeiden, muss die Erkrankung so früh wie möglich diagnostiziert werden. Seit 1978 ist daher in Deutschland die Untersuchung der Neugeborenen auf Galaktosämie vorgesehen. Diese wird heute i.d.R. am dritten Lebenstag im Rahmen des erweiterten Neugeborenen-Screenings durchgeführt.

Zur Kontrolle der Stoffwechseleinstellung wird allgemein der D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten bestimmt. Die derzeit empfohlene Obergrenze der D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration für Patienten mit klassischer Galaktosämie liegt bei $150 \mu\text{mol/L}_{\text{RBC}}$ (Walter et al., 1999).

Trotz frühzeitig begonnener und strikter Diät-Behandlung kommt es bei den meisten Patienten längerfristig zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Einschränkung der Entwicklung kognitiver Fähigkeiten. Dieser Verlauf kann sich bereits im Kindesalter manifestieren und scheint sich offenbar mit zunehmendem Alter zu verstärken (Donell et al., 1961; Komrower & Lee, 1970; Waggoner et al., 1990; Schweitzer et al., 1993; Cleary et al., 1995; Kaufmann et al., 1995).

Bei über 90% der betroffenen Frauen erfolgt bereits im Mutterleib eine irreversible Schädigung der Eierstöcke und es entwickelt sich ein hypergonadotropher Hypogonadismus (Kaufmann et al., 1981). Daher sind weibliche Patienten häufig primär infertil oder werden es sekundär nach der Geburt des ersten Kindes (Roe et al., 1971; Tedesco et al., 1972; Kaufmann et al., 1981). Die Ursachen für diesen hypergonadotrophen Hypogonadismus sind bisher nicht geklärt.

Da bei Patienten mit klassischer Galaktosämie trotz extrem galaktosearmer Diät Langzeitschäden feststellbar sind, wird seit langem vermutet, dass diese Schädigung durch eine chronische Autointoxikation aufgrund einer nicht unerheblichen endogenen Produktion von freier D-Galaktose verursacht werden könnte (Gitzelmann & Steinmann, 1984). In der Literatur liegen bisher jedoch keine zuverlässigen Daten zur endogenen D-Galaktose-Bildung beim Menschen vor (Berry et al., 1995; Schadewaldt et al., 2000).

Seit einiger Zeit steht eine knock-out-Maus mit fehlender D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität zur Verfügung. Diese Tieren weisen deutlich erhöhte Konzentrationen von D-Galaktose im Plasma und von D-Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten und anderen Körperzellen auf. Dagegen sind die D-Galaktitol-Konzentrationen nur geringfügig über die Norm erhöht. Bemerkenswert ist, dass diese knock-out-Mäusen phänotypisch gesund erscheinen und keinerlei Symptome auftreten, die typischerweise bei der (unbehandelten) Galaktosämie des Menschen zu beobachten sind. Die Ursache für diesen Speziesunterschied ist bisher nicht geklärt (Elsas et al., 1995).

Zur Molekularbiologie

Das humane GALT-Gen befindet sich auf dem Chromosom 9 an der Stelle p13. Die cDNA des menschlichen GALT-Gens wurde erstmalig 1988 kloniert (Reichard et al., 1988) und 1990 sequenziert (Flach et al., 1990). Die cDNA hat eine Länge von 1295 bp und kodiert eine Polypeptid mit 379 Aminosäuren. Das Gen-Produkt, die GALT, ist ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 88 kD.

Das gesamte GALT-Gen wurde von Leslie et al. (1992) kloniert und sequenziert (GenBank M96264). Es hat ein Molekulargewicht von nur 4 kb und besteht aus 11 Exons und 10 Introns (Leslie et al., 1992). Der Promotor-Bereich des GALT-Gens enthält keine TATA-Box, umfasst dafür aber zwei GC-reiche SP-1-Sequenzen, eine CCAAT-Sequenz und drei AP-1-Sequenzen (Leslie et al., 1992). Somit zeigt dieser Bereich des GALT-Gens eine große Ähnlichkeit mit den Regionen anderer "Housekeeping-Genes".

Beim Vergleich der Aminosäuresequenz der GALT bei verschiedenen Spezies ergab sich, dass die humane GALT-Sequenz eine 46%ige Homologie mit der GALT-Sequenz von *E. coli*, eine 39%ige Homologie zu dem Gal-7-Protein der Hefe und eine 87%ige Homologie zu dem GALT-Protein von der Maus aufwies. Außerdem zeigte der Vergleich, dass die von den Exons 6, 9 und 10 codierten Aminosäure-Sequenzen im Verlauf der Evolution sehr stark und die von den Exons 1, 2, 5 und 7 codierten nur wenig konserviert wurden (Holton et al., 2001).

Bisher wurden über 150 verschiedene Mutationen im humanen GALT-Gen beschrieben (Tyfield et al., 1999). Die weltweit häufigsten Mutationen sind Q188R und K285N. Bei Patienten afrikanischer Herkunft wurde die S135L-Mutation besonders häufig gefunden. Alle anderen Mutationen kommen selten oder nur vereinzelt vor (Holton et al., 2001).

Die Häufigkeit der Q188R-Mutation in der europäischen Bevölkerung liegt bei etwa 60 - 70% aller mutierten Allele (Holton et al., 2001). Bei dieser Mutation liegt am Nukleotid 563 der cDNA-Sequenz (Bereich Exon 6) eine Transition von Adenin zu Guanin vor. Diese führt an der Stelle 188 der Aminosäure-Sequenz zu einem Austausch von Glutamin gegen Arginin. Bei der *in vitro* Expression des humanen GALT-Gens mit der Q188R-Mutation in Hefe-Zellen wurde ein praktisch vollständiger Verlust der Enzymaktivität gefunden (Friedovich-Keil & Jinks-Robertson, 1993; Friedovich-Keil et al., 1995). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Berichten, dass bei Q188R-homozgoten Patienten keine GALT-Aktivität (in den Erythrozyten) nachzuweisen ist und dass heterozygote Überträger eine auf 50% des Normwertes reduzierte Enzymaktivität aufweisen (Holton et al., 2001).

Die Häufigkeit der K285N-Mutation liegt in Europa bei etwa 8% (Holton et al., 2001). Bei dieser Mutation liegt eine Transversion von Guanin zu Thymin am Nucleotid 855 der cDNA (Bereich Exon 9) vor. Dadurch kommt es an der Stelle 285 der Aminosäure-Sequenz zu einem Austausch von Lysin zu Asparagin. Die Auswirkung dieser Mutation auf die GALT-Aktivität wurde mittels *in vitro* Expressionsversuch untersucht (Riehmman et al., 2001). Die dabei gemessene GALT-Aktivität lag bei <

0.2% des Wild-Typs. Diese Mutation hat damit eine der Q188R-Mutation entsprechende Auswirkung.

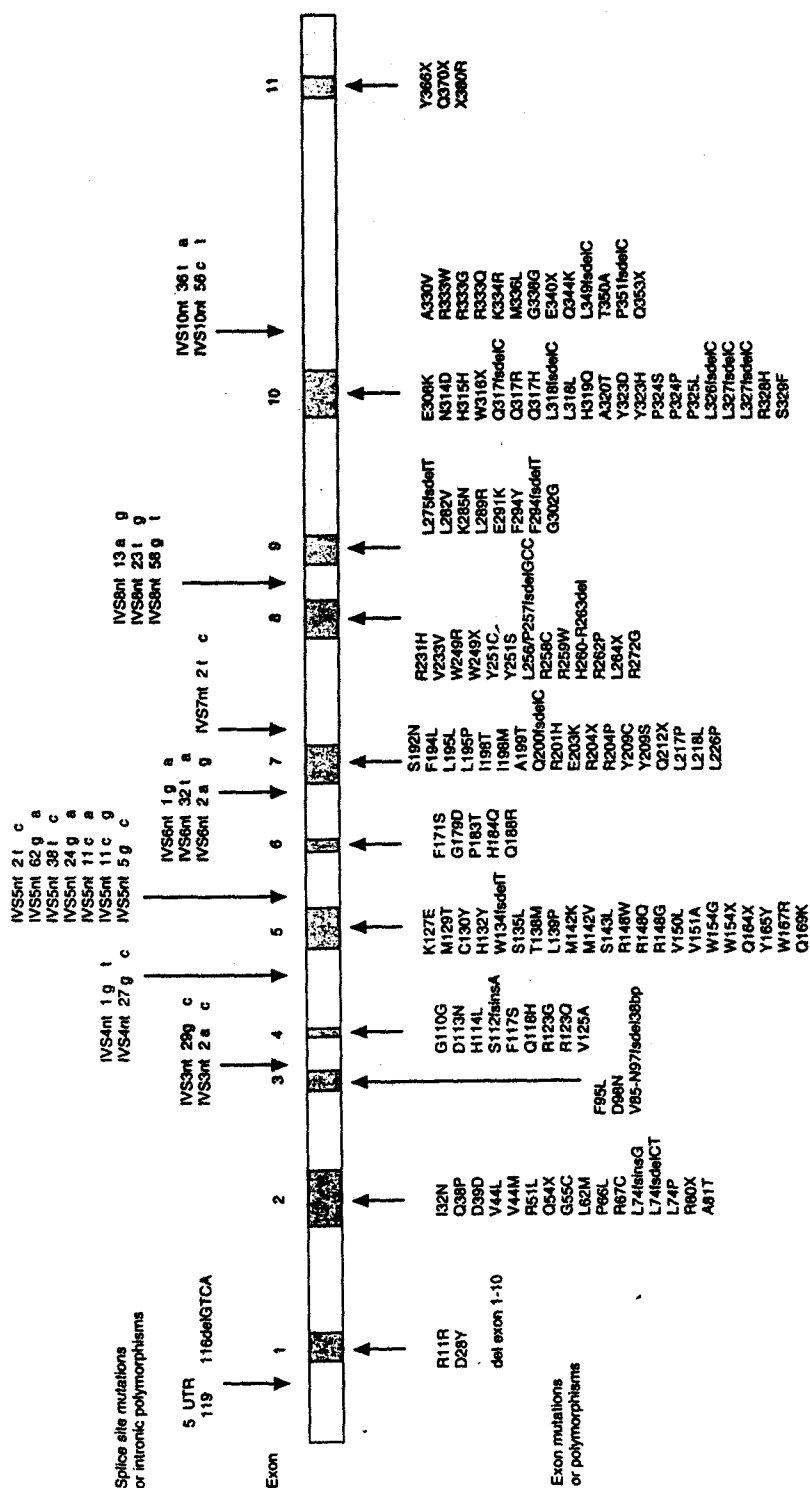


Abb. 3: Das GALT-Gen mit bisher identifizierten Mutationen (nach Holton et al., 2001)

Für weitere 13 der in der Literatur beschriebenen Mutationen liegen Daten zu funktionalen Auswirkungen auf die humane GALT-Aktivität (hGALT-Aktivität) vor, die mittels Expressions-Versuchen gewonnen wurden. Bei diesen Untersuchungen wurden neben Mutationen mit schwerwiegender Auswirkung wie die Q188R- und die K285N-Mutation auch mildere Mutationen im *in vitro*-System charakterisiert. Z.B. führte die L139P-Mutation zu einer residualen GALT-Aktivität von 2% des Wildtyps und die E291K-Mutation zu einer Restaktivität von 63% des Wildtyps. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den in den Erythrozyten der entsprechenden Patienten gefundenen residualen Enzymaktivitäten (Reichardt & Woo, 1991; Leslie et al., 1992; Reichardt et al., 1992; Fridovich-Keil & Jinks-Robertson, 1993; Reichardt et al., 1993; Elsas et al., 1995; Fridovich-Keil et al., 1995; Riehman et al., 2001).

In diesem Zusammenhang ist die N314D-Mutation (in Exon 10) besonders erwähnenswert. Diese Mutation wurde homozygot sowohl mit einer ca. 50% reduzierten (sog. Duarte-D2-Variante) wie auch mit praktisch unveränderter GALT-Aktivität (sog. Los-Angeles-Variante) assoziiert gefunden (Podskarbi et al., 1997; Podskarbi et al., 1996). *In vitro* Expressions-Versuche des humanen GALT-Gens mit der N314D-Mutation zeigen, dass diese Veränderung nicht zu einer Verminderung der GALT-Aktivität führt (Reichardt & Woo 1991; Friedovich-Keil et al., 1995). Dieser scheinbare Widerspruch konnte in weitergehenden Studien aufgelöst werden. Diese Untersuchungen zeigen, dass nur bei der Duarte-D2-Variante - nicht aber bei der Los-Angeles-Variante - zusätzlich zur N314D-Mutation im 5'-Promotor-Bereich des GALT-Gens eine Deletion von 4 Basen (5'UTR-119_-116delGTCA) vorkommt, die zu einer Verminderung der Transkriptionsrate und damit der verfügbaren mRNA für die GALT führt (Kozak et al., 1999; Elsas et al., 2001; Trbusek et al., 2001).

1.3 Zielsetzung

Wie bereits erwähnt persistieren bei den Patienten mit Galaktosämie auch bei strengster Diät deutlich über die Norm erhöhte Konzentrationen der D-Galaktose-

Metabolite und längerfristig kommen neurologische und kognitive Defizite zur Ausprägung. Schon früh vermuteten Gitzelmann & Steinmann (1984), dass dies möglicherweise als „Autointoxikation“ durch endogene D-Galaktose-Bildung gedeutet werden könnte. Allerdings sind bisher in der Literatur keine zuverlässigen Daten zur Bedeutung der endogenen Synthese von D-Galaktose beim Menschen publiziert worden.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war daher, die endogene D-Galaktose-Freisetzung vergleichend bei Gesunden und bei Patienten mit klassischer Galaktosämie quantitativ zu erfassen¹.

Das Verfahren der Wahl für *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen beim Menschen ist die stabil-Isotopen-Verdünnungsmethodik (Wolfe, 1992). Daher wurde für die *in vivo* Untersuchungen zum D-Galaktose-Stoffwechsel das primed continuous infusion (PCI) Verfahren (Wolfe, 1992) mit D-[1-¹³C]Galaktose als Substrat gewählt.

Entsprechend der Fragestellung gliedert sich die vorliegende Arbeit in zwei experimentelle Abschnitte:

- (1) Etablierung und Ausarbeitung der Methodik
und
- (2) *In vivo* D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen.

Zu (1): Eine ausführliche Recherche ergab, dass in der Literatur bisher keine geeigneten und/oder ausreichend sensitiven Methoden zur Bestimmung der Konzentration und ¹³C-Anreicherung der D-Galaktose-Metabolite in Zellen und Körperflüssigkeiten zur Verfügung standen. Daher wurde für die Bestimmungen aller relevanten Metabolite, i.e. D-Galaktose (Kapitel 2), D-Galaktose-1-Phosphat (Kapitel 3), D-Galaktitol und D-Galaktonat (Kapitel 4) jeweils spezielle gaschromatographisch-massenspektrometrische Analysenverfahren mittels der

¹ Von allen Patienten (bzw. deren Eltern) und Probanden wurde eine schriftliche Einverständniserklärung über die Teilnahme an der Untersuchung eingeholt.

stabil-Isotopen-Verdünnungstechnik ausgearbeitet und evaluiert. In diesem Rahmen wurde auch die Anwendbarkeit des PCI-Verfahrens als steady-state-Ansatz für die Galaktose-Umsatzmessungen *in vivo* validiert.

Für die Mutationsanalyse und für die Bestimmung von Enzymaktivität konnte im Wesentlichen auf publizierte Methoden zurückgegriffen werden (Kapitel 5 und 6).

Zu (2): Zunächst wurde bei gesunden Erwachsenen die Freisetzung von D-Galaktose und D-Galaktose-Metaboliten aus endogenen Quellen bestimmt und Referenzbereiche erstellt. Dann wurden entsprechende Untersuchungen an einem genotypisch homogenen Kollektiv von Q188R-homozygoten Patienten (GALT-Aktivität in den Erythrozyten $< 1\%$ der Norm) durchgeführt. Hierbei wurden bewusst Patienten vom Kleinkind- bis zum Erwachsenenalter (4 - 37 Jahre) eingeschlossen, um auch zu klären, ob die endogene D-Galaktose-Bildung mit dem Wachstum - und dem damit einhergehenden größeren Umsatz bei Glykoproteinen und Glykolipiden - korreliert ist (Kapitel 7).

Danach wurde untersucht, inwieweit die bei Q188R-homozygoten Patienten erhobenen Daten für das gesamte Kollektiv der Patienten mit klassischer Galaktosämie repräsentativ sind. Dazu wurden bei einem genotypisch heterogenen Kollektiv compound heterozygoter Patienten im Alter zwischen 4 und 34 Jahren mit vergleichbar niedriger GALT-Aktivität ($< 1\%$ der Norm) *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen durchgeführt (Kapitel 8).

Bei allen untersuchten Patienten mit klassischer Galaktosämie war eine sehr geringe, aber noch nachweisbare GALT-Enzymaktivität in den Erythrozyten vorhanden. Bei allen Patienten war auch eine geringe *in vivo* D-Galaktose-Oxidation nachweisbar. Dies ließ vermuten, dass ein Teil der D-Galaktose direkt am (extrahepatischen) Entstehungsort abgebaut wurde und daher analytisch nicht erfassbar war. Die tatsächliche totale endogene D-Galaktose-Bildung bei klassischer Galaktosämie dürfte also höher liegen, als die bei Stoffwechselumsatzmessungen gemessene D-Galaktose-Freisetzung. Um diese Vermutung zu prüfen wurden vergleichende *in vivo*

Stoffwechselumsatzmessungen mit Patienten durchgeführt, die einen vollständigen Ausfall des D-Galaktose-Abbaus auf der Stufe der Galaktokinase aufwiesen (Kapitel 7).

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass Patienten mit klassischer Galaktosämie D-Galaktose oxidativ verstoffwechseln können. Daher war zu vermuten, dass bereits geringfügig erhöhte GALT-Aktivitäten die Gesamtkapazität der D-Galaktose-Elimination *in vivo* deutlich verbessern sollten. Daher wurde abschließend bei Patienten mit klassischer Galaktosämie und bei Patienten mit milderer varianten Formen (GALT-Aktivität > 1.5% bis 25% der Norm) *in vivo* D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen durchgeführt und untersucht, inwieweit die endogene D-Galaktose-Freisetzung von der residualen GALT-Aktivität abhängt (Kapitel 9).

Hinweis: Die einzelnen Aspekte dieser Arbeit sind in eigenständigen Kapiteln abgehandelt. Daher können sich vor allem in Einleitung und Diskussion gewisse Überschneidungen ergeben.

Teil II

Analytische Methoden

Kapitel 2

Galaktose im Plasma

Zusammenfassung. Für die sensitive Bestimmung der Konzentration von D-Galaktose im Humanplasma wurde eine Stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode etabliert. Dazu wurden Plasmaproben mit U-¹³C₆-markiertem D-Galaktose-Standard versetzt. Störende D-Glukose wurde durch Behandlung mit D-Glukose-Oxidase entfernt und die Probe durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse wurden die Aldonitril-Pentaacetat-Derivate verwendet. Zur massenspektrometrischen Detektion von 1-¹²C-, 1-¹³C- und U-¹³C₆-markierter D-Galaktose mittels positiver chemischer Ionisation wurden die Intensitäten der [MH-60]⁺-Ionen bei m/z 328, m/z 329 und m/z 334 bestimmt. Die Konzentration der D-Galaktose wurde anhand des U-¹³C₆-markierten internen Standards quantifiziert. Die Methode war linear (Bestimmungsbereich: 0.1 - 5 μmol × L⁻¹) und sowohl in niedrigeren wie in höheren Konzentrationsbereichen gut reproduzierbar (VK's in der Serie und von Tag zu Tag < 15%). Die Bestimmungsgrenze lag bei 0.02 μmol × L⁻¹. Messungen in Plasmen postabsorptiver Probanden ergaben bei gesunden Erwachsenen (n=16), Patienten mit Diabetes mellitus (n=15), Patienten mit klassischer Form der Galaktosämie (n=5) und deren heterozygoten Eltern (n=5) Werte von (Mittelwert ± SD) 0.12 ± 0.03, 0.11 ± 0.04, 1.44 ± 0.54 und 0.17 ± 0.07 μmol × L⁻¹. Diese Werte waren deutlich niedriger (4-18fach) als die mit einer konventionellen enzymatischen Methode ermittelten Daten. Diese neue Methode wurde auch erfolgreich bei *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen mit D-[1-¹³C]Galaktose zur Bestimmung der endogenen D-Galaktose-Bildung eingesetzt. Die Befunde zeigen erstmals, dass im Humanplasma die aus endogenen Quellen freigesetzte D-Galaktose quantitativ erfasst werden kann. Sie weisen außerdem darauf hin, dass bei Anwendung enzymatischer Methoden falsch hohe Konzentrationen von D-Galaktose im Plasma bestimmt werden.

2.1 Einleitung

Bei Patienten mit klassischer Form der Galaktosämie (MIM230400; OMIM™ 2004) ist der Abbau von D-Galaktose aufgrund eines angeborenen Mangels an D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität (EC 2.7.7.12) stark beeinträchtigt. Bei Neugeborenen mit klassischer Galaktosämie entwickelt sich bei uneingeschränkter Laktose-Zufuhr ein lebensbedrohliches organ-toxisches Syndrom, vermutlich bedingt durch den Anstieg der (intrazellulären) Konzentrationen potentiell toxischer D-Galaktose-Metabolite (D-Galaktose-1-Phosphat, D-Galaktitol). Sofortige Unterbrechung jeglicher D-Galaktose-Zufuhr wirkt hier lebensrettend und führt zu einem raschen Rückgang der klinischen Symptomatik. Als Therapie der klassischen Galaktosämie wird derzeit eine lebenslange und weitgehende Restriktion der D-Galaktose-Zufuhr mit der Nahrung empfohlen (Übersicht bei Segal & Berry, 1995).

Trotz einer extrem strengen Diät sind aber Langzeitschäden zu beobachten, wie z.B. eine verlangsamte Intelligenz-Entwicklung und das Auftreten neurologischer Symptome. Bei den meisten Frauen kommt es zur Unfruchtbarkeit durch eine irreversible Schädigung der Eierstöcke (Segal & Berry, 1995). Gitzelmann & Steinmann (1984) vermuteten, dass die Ursache für die Langzeitkomplikationen in einer „Autointoxikation“ der Patienten durch die endogene Bildung von D-Galaktose liegen könnte. Ergebnisse einer ersten *in vivo* Stoffwechseluntersuchungen, die an einer begrenzten Anzahl erwachsener Patienten und Normalpersonen durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass relevante Mengen an D-Galaktose bei beiden Untersuchungsgruppen endogen produziert werden könnten (Berry et al., 1995b).

Für die rationale Beurteilung der Wertigkeit einer lebenslangen Diät bei klassischer Galaktosämie ist die Kenntnis der quantitativen Bedeutung der endogenen D-Galaktose-Bildung wesentliche Voraussetzung. Daher erscheint es wichtig zu prüfen, ob bei klassischer Galaktosämie eine Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Freisetzung besteht. Die Methode der Wahl für diese Untersuchungen sind *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen bei postabsorptiven

Probanden unter Verwendung von ^{13}C -markierter D-Galaktose (Berry et al., 1995b).

Bei der Planung einer entsprechenden Studie ergab sich, dass zwar zahlreiche enzymatische, GC- und HPLC-Methoden zur Bestimmung von D-Galaktose veröffentlicht worden sind (Sweeley et al., 1963; Dahlquist, 1983; Fujimura, 1983; Schwarz et al., 1985; Jansen et al., 1986; Murakami et al., 1986; Watanabe & Kawasaki, 1987; Pudeck et al., 1990; Gross & Acosta, 1991; Shin, 1991; Diepenbrock et al., 1992; Tang & Hu, 1992; Yuh et al., 1998), dass aber keine dieser Methoden sensitiv genug ist, um eine zuverlässige Bestimmung der ^{13}C -Anreicherung oder der Konzentration von D-Galaktose im Plasma von postabsorptiven Normalpersonen und Patienten zu erlauben. Henderson et al. (1982) fanden mit einer enzymatisch-fluorimetrischen Methode D-Galaktose-Konzentrationen im Humanplasma in einem Bereich von etwa $5 - 100 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$. Allerdings ist bekannt, dass enzymatische Messungen in Plasmaproben störanfällig sind und es gibt Hinweise, dass die D-Galaktose-Konzentration, insbesondere bei niedrigeren Plasma-Konzentrationen, überbestimmt werden kann (Watanabe & Kawasaki, 1987, Pudek et al., 1990, Yuh et al., 1998).

Das vermutlich sensitivste Verfahren wurde von Watanabe & Kawasaki (1987) veröffentlicht. Bei dieser HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion liegt die Bestimmungsgrenze bei $2.2 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$. Watanabe & Kawasaki konnten mit ihrer Methode in Plasmaproben postabsorptiver Personen keine freie D-Galaktose nachweisen und stellten fest: „Absence of free galactose in human plasma is usually the case unless deliberately added or infused“ (Watanabe & Kawasaki, 1987).

Im folgenden wird eine stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode zur sensitiven und zuverlässigen Bestimmung freier D-Galaktose im Humanplasma unter Verwendung von $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ -markierter D-Galaktose als internem Standard beschrieben. Das größte Problem bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung der D-Galaktose, i.e. die Anwesenheit von D-Glukose im vielfachen Überschuss, wurde gelöst, indem D-Glukose enzymatisch

aus den Proben entfernt wurde. Diese neue Methode ermöglichte erstmals die Bestimmung der freien D-Galaktose im Plasma von postabsorptiven Probanden. Außerdem wird gezeigt, dass die Methode für Bestimmung der ^{13}C -Isotopenanreicherung in der Plasma-D-Galaktose nach i.v. Infusion von D-[1- ^{13}C]Galaktose geeignet ist.

2.2 Material und Methoden

Probanden und Patienten

Zur Bestimmung postabsorptiver D-Galaktose-Konzentrationen im Plasma wurden Proben von EDTA-Blut zwischen 7 Uhr und 9 Uhr bei gesunden erwachsenen Probanden (4 Frauen und 12 Männer; Alter 33 ± 8 Jahre (Mittelwert \pm SD), Gewicht 72 ± 6 kg, Größe 180 ± 8 cm), Patienten mit Diabetes mellitus (8 Frauen, 8 Männer; Alter 55 ± 12 Jahre, Gewicht 86 ± 13 kg, Größe 166 ± 9 cm), Patienten mit klassischer Form der Galaktosämie (6 weiblich, 4 männlich; Alter 17 ± 10 Jahre, Gewicht 44 ± 19 kg, Größe 147 ± 25 cm; GALT-Aktivität in Erythrozyten (s. Kap. 6.2) $< 2\%$ der Kontrolle) und deren obligat heterozygoten Eltern (2 Frauen, 3 Männer; Alter 43 ± 16 Jahre, Gewicht 78 ± 29 kg, Größe 174 ± 10 cm; GALT: $49 \pm 5\%$ der Kontrolle) venös entnommen. Alle Probanden wurden in postabsorptivem Zustand nach Übernachtfasten von ≥ 10 Stunden untersucht. Plasmaproben wurden durch Zentrifugation der Blutproben ($3000 \times g$, 5 min, 4°C) gewonnen.

Galaktoseumsatz-Studie

Dazu wurde - in Anlehnung an die Angaben von Berry et al. (1995b) - ein „primed-continuous-infusions“-Test unter Ruhebedingungen durchgeführt (vgl. Kap. 7.2): Ein gesunder männlicher Proband (25 Jahre) erhielt gegen 9 Uhr einen einmaligen intravenösen Bolus von D-[1- ^{13}C]Galaktose ($5.5 \mu\text{mol/kg KG}$, „priming dose“). Danach wurde über 6 Stunden kontinuierlich D-[1- ^{13}C]Galaktose ($0.8 \mu\text{mol/h pro (kg KG)}$) durch eine Venenverweilkanüle in eine geeignete Vene eines Armes infundiert. Zusätzlich wurde D-Glukose intravenös ($11 \mu\text{mol/min pro kg KG}$) von etwa 8 Uhr bis zum Ende des Versuchs infundiert. EDTA-Blutproben wurden aus einer Venenverweilkanüle entnommen, die im kontralateralen Arm gelegt war.

Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Ionenaustauscherharze (Dowex 50WX8, H⁺-Form, 100-200 mesh und Dowex 1X8, Cl⁻-Form, 200-400 mesh) wurden von Serva, Heidelberg, bezogen. Katalase (E.C. 1.11.1.6, aus Rinderleber), D-Galaktose-Dehydrogenase (E.C.1.1.1.48, aus *Pseudomonas fluorescens*), D-Glukose-Oxidase (E.C. 1.1.3.4, aus *Aspergillus niger*), D-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49, aus Hefe), Hexokinase (E.C. 2.7.1.1, aus Hefe) und Coenzyme waren von Roche, Mannheim.

D-[1-¹³C]Galaktose (Herstellerangaben: 1-¹³C, 99%) und D-[U-¹³C₆]Galaktose (Herstellerangaben: U-¹³C₆, 99%) waren Produkte der Firma Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA, und wurden von der Firma Promochem, Wesel, geliefert. Die Reinheit dieser markierten Substanzen wurde mittels GC-MS-Analyse überprüft. Dabei wurde in der D-[1-¹³C]Galaktose-Präparation eine ¹³C-Anreicherung von $97 \pm 0.1\%$ gefunden (n=14, Doppelmessungen an 7 verschiedenen Arbeitstagen). Die Reinheit der uniform markierten D-Galaktose betrug $98.5 \pm 0.2\%$ (n=6 an 2 verschiedenen Arbeitstagen).

Enzymatische Bestimmung von Galaktose und Glukose

Für die Bestimmung der D-Galaktose wurde das von Fujimura (1983) beschriebene Verfahren modifiziert. Drei Plasma-Aliquots von je 0.2 mL wurden zur Erstellung von Eichstandards mit 0.025 mL H₂O bzw. $10 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ und $50 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ D-Galaktose-Standardlösung versetzt. Zur Enteiweißung wurde Perchlorsäure (10%, v:v; 0.1 mL) zugesetzt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (2 min, $13\,000 \times g$, 4 °C). 0.25 mL des sauren Überstandes wurde abgenommen, mit KHCO₃ ($2.5 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$; 50 μL) neutralisiert und ausgefallenes KClO₄ durch eine weitere Zentrifugation (s.o.) entfernt. Der neutralisierte Extrakt (0.25 mL) wurde mit Tris/HCl-Puffer ($1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$, pH 8.7; 0.6 mL) und NAD⁺-Lösung ($5 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$; 0.25 mL) gemischt. Nach der Bestimmung des Fluoreszenz-Leerwertes (λ_{ex} 340 nm, λ_{em} 450 nm; Fluorimeter 650-40, Perkin/Elmer, Überlingen) wurde die Reaktion durch Zugabe von D-Galaktose-Dehydrogenase-Lösung (0.25 U in 10

μL) gestartet. Nach etwa 60 min erfolgte keine weitere Erhöhung der Fluoreszenz mehr. Die D-Galaktose-Konzentration in der nicht mit D-Galaktose-Lösung versetzten Probe wurde dann anhand der Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten in den Proben, die mit D-Galaktose-Standard versetzt worden waren, berechnet. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden Plasmapools verwendet, denen D-Galaktose zugesetzt worden war ($2.5 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$). Leerwerte wurden aus authentischen Plasmapoolproben angesetzt.

Die D-Glukose-Konzentration wurde absorptionsspektrophotometrisch in einem gekoppelten enzymatischen Test mit Hexokinase und D-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase nach Kunst et al. (1983) bestimmt.

Plasma-Extraktion und Glukose-Entfernung

Zur internen Standardisierung wurden Plasmaprobe (1 mL) der Galaktosämie-Patienten (1:2 verdünnt mit H_2O) sowie Plasmaprobe der heterozygoten Eltern, gesunder Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus mit D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktose-Lösung ($50 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$; 20 μL) versetzt. Dann wurde H_2O (0.23 mL) sowie HClO_4 (20%, v:v; 0.25 mL) zugesetzt. Nach einer Zentrifugation ($13\,000 \times g$, 5 min, 4°C) wurde 1.2 mL des Überstandes mit KHCO_3 ($2.5 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$; 0.2 mL) und Kaliumphosphat-Puffer ($2.5 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$, pH 6.5; 0.1 mL) gemischt und ausgefallenes KClO_4 durch Zentrifugation (s.o.) entfernt. Zur Entfernung der D-Glukose wurde Katalase (65 kU in 50 μL) und D-Glukose-Oxidase (10 - 15 U in 50 μL) zu 1.3 mL gepuffertem Extrakt gegeben. Der Ansatz wurde - mit Luft equilibriert - 90 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von HClO_4 (30%, v:v; 0.15 mL) gestoppt und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation (s.o.) entfernt. Zu 1.4 mL Überstand wurde 0.25 mL KHCO_3 ($2.5 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$) gegeben und KClO_4 durch eine weitere Zentrifugation (s.o.) entfernt. Der Extrakt wurde schließlich durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt (s.u.).

Reinigung und Derivatisierung

Der obige Extrakt (1.5 mL) wurde auf eine Dowex 1X8-Säule (200-400 mesh, Acetatform, 4 mL in konischen Poly-Prep-Einmal-Chromatographiesäulchen, Fa. Bio-Rad, München) gegeben und mit 0.25 mL H_2O nachgespült. Die Eluate

wurden verworfen. Die D-Galaktose wurde anschließend mit 2 mL H₂O eluiert. Dieses Eluat wurde auf eine Dowex 50WX8-Säule (100-200 mesh, H⁺-Form; 4 mL, Säule wie oben) aufgetragen und das Eluat verworfen. Danach wurde mit 2 mL H₂O eluiert. Das Eluat wurde gesammelt und ein Aliquot von 1 mL im Reaktivial (1 mL, Pierce) bei Raumtemperatur im N₂-Strom zur Trockene eingedampft.

Zur Darstellung der Aldononitril-Pentaacetat-Derivate wurde der trockene Rückstand mit 50 µL Hydroxylamin-Hydrochlorid (0.3 mol × L⁻¹ in Pyridin) 30 min bei 90 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde 50 µL Acetanhydrid zugesetzt und der Ansatz 60 min bei 90 °C inkubiert. Die Probe wurde wiederum abgekühlt und bei Raumtemperatur im N₂-Strom zur Trockene eingedampft. Der trockene Rückstand wurde mit 0.2 mL Hexan extrahiert. Der Extrakt wurde in einem konischen Mikroeinsatz (0.2 mL; Welabo, Düsseldorf) eingedampft (s.o.). Der Rückstand wurde in 50 µL Ethylacetat gelöst und dann zur GC-MS-Analyse verwendet.

GC-MC-Analyse

Die GC-MS-Analyse wurde mit einem HP-6890-Gaschromatographen (Hewlett-Packard, Waldbronn) durchgeführt. Zur Trennung wurde eine HP-5 MS-Kapillarsäule (5% Phenylmethylpolysiloxan, Länge 30 m, i.d. 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm) verwendet, die direkt mit einem massenselektiven Detektor (HP-MSD, Hewlett-Packard) verbunden war. Helium wurde als Trägergas verwendet. Der splitlose Injektionseinlaß und das Verbindungsstück zum Massenspektrometer wurden auf 250 °C gehalten. Injiziert wurde 1 µL Probe bei einer Anfangs-Säulentemperatur von 125 °C. Nach 1.5 min wurde die Temperatur mit 20 °C × min⁻¹ auf 190 °C gebracht und weiter mit 2.5 °C × min⁻¹ auf 215 °C gebracht und dann noch für 2 min auf 280 °C erhöht. Die massenspektrometrische Detektion wurde mittels positiver chemischer Ionisierung mit Methan als Reaktandgas durchgeführt. Die Ionenquelle wurde bei 170 °C und bei einem Druck von 60 mPa betrieben. Es wurde im „selected-ion-monitoring“ (SIM) Modus gearbeitet und die Intensität der [MH-60]⁺-Ionen im gaschromatographischen D-Galaktose-Peak bei

m/z 328, m/z 329 und m/z 334 gemessen, um die jeweiligen Galaktosespezies, nämlich $1\text{-}^{12}\text{C}$ -, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -, sowie $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ -markierte D-Galaktose, zu bestimmen.

Berechnungen

Die Konzentration der natürlich markierten D-Galaktose (C_{nat} in $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) in den Proben wurde aus dem Ionenintensitätsverhältnis $R_{\text{nat}} = (\text{m/z } 328)/(\text{m/z } 334)$, wie folgt berechnet:

$$C_{\text{nat}} = \left\{ (R_{\text{nat}} \times F_C \times A_{\text{St}} \times P_{\text{ST}}) - [(1 - P_{\text{St}}) \times A_{\text{St}}] \right\} \times \frac{1}{V_{\text{Plasma}}} \quad (1)$$

Mit dem Faktor F_C wird berücksichtigt, dass die Ionen m/z 328 für natürlich markierte und m/z 334 für die $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ -markierte D-Galaktose einen unterschiedlichen Anteil an zugehörigen Ionencluster aufweisen. Das Signal von m/z 328 hat nämlich einen Anteil von 83.5% am gesamten Massenspektrum, während m/z 334 einen Anteil von 89.2% hat. F_C ergibt sich damit zu $0.892/0.835 = 1.069$. A_{St} ist die Menge des $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ -markierten internen Standards (in nmol) und P_{St} der Anteil der $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ -markierten Moleküle in den Standards (=0.985). $1-P_{\text{St}}$ ist der Anteil der natürlich markierten Metabolite, die durch die markierten Standards zugefügt wurde. V_{Plasma} ist das Probevolumen des Plasmas (in L).

Die Konzentration der $1\text{-}^{13}\text{C}$ markierten D-Galaktose in den Proben (C_{13} in $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) wurde aus dem Ionenintensitätsverhältniss $R_{13} = (\text{m/z } 329)/(\text{m/z } 334)$ wie folgt berechnet:

$$C_{13} = (R_{13} - R_0 \times R_{\text{nat}}) \times F_C \times A_{\text{ST}} \times A_{\text{ST}} \times \frac{1}{V_{\text{Plasma}}} \quad (2)$$

Zur Bestimmung der natürlichen ^{13}C -Anreicherung in den Hexosen des Plasmas wurden die Ionintensitäten bei m/z 328 und m/z 329 im chromatographischen Peak von D-Galaktose und D-Glukose in einer repräsentativen Anzahl von authentischen, d.h. nicht mit ^{13}C -markiertem Standard versetzten, Plasmaproben gemessen. Bei beiden Hexosen wurde für das mittlere Verhältnis $R_0 = (\text{m/z } 329)/(\text{m/z } 328)$ ein Wert von 0.158 (SD \pm 0.003; n=20) gefunden und dieses für die

weiteren Berechnungen verwendet. $R_0 \times R_{nat}$ berücksichtigt den Anteil der natürlich markierten Spezies in der Ionenintensität bei m/z 329, zur Erfassung der $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Markierung. Der Korrekturfaktor F_C ergibt sich zu $0.892/0.844 = 1.057$ (vgl. oben)

Die Konzentration der exogen zugeführten, infundierten D-Galaktose (natürliche und $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierte; C_{exo} in $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) ist gegeben durch:

$$C_{exo} = 1.031 \times C_{13} \quad (3)$$

Die Konzentration der D-Galaktose, die auf Freisetzung aus endogenen Quellen zurückzuführen ist (C_{endo} , in $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$), wurde bei dem „primed continuous infusions“-Test wie folgt berechnet:

$$C_{endo} = C_{nat} - (0.031 \times C_{13}) \quad (4)$$

Die Konzentration der gesamten D-Galaktose (C_{tot} , i.e. die Summe der endogenen und der infundierten D- $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ Galaktose, in $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) wurde wie folgt berechnet:

$$C_{tot} = C_{endo} + C_{exo} \quad (5)$$

Die Freisetzungsrates der endogenen D-Galaktose in das Plasma, unter apparenten steady state Bedingungen (R_a , in $\mu\text{mol}/\text{h}$ pro kg KG) wurde aus dem Verhältnis der $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten zur gesamten D-Galaktose, der Infusionsrate (Inf , in $\mu\text{mol}/\text{h}$ kg KG) und unter Berücksichtigung der natürlich markierten D-Galaktose in dem Infusat wie folgt berechnet:

$$R_a = 0.97 \times Inf \times \frac{C_{tot}}{C_{13}} - Inf \quad (6)$$

Die Isotopenanreicherung („mol percent enrichment, MPE) der $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Markierung in der D-Galaktose des Plasmas wurde nach folgender Formel berechnet:

$$MPE = \frac{C_{13}}{C_{nat} + C_{13}} \times 100 \quad (7)$$

Statistik

Im Allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm SD (Anzahl der unabhängigen Bestimmungen in Klammern) angegeben. Korrelationen wurden mit linearer Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) überprüft. Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen Stichproben wurde der Mann-Whitney U - Test verwendet.

2.3 Ergebnisse

Effektivität der Entfernung von D-Glukose

Zur Überprüfung der Effektivität der enzymatischen Entfernung von D-Glukose wurden zwei Plasmapools mit 7.0 ± 0.1 bzw. 18.2 ± 0.5 mmol D-Glukose pro L ($n=7$) mit je $10 \mu\text{mol}$ D-Galaktose pro L angereichert und mit D-Glukose-Oxidase/Katalase behandelt. Am Ende der 90minütigen Inkubationsperiode war die D-Glukose weitgehend vollständig abgebaut und die D-Glukose-Konzentrationen auf 0.020 ± 0.002 bzw. 0.058 ± 0.019 mmol \times L⁻¹ reduziert (s. Abb.1).

Die Effektivität des enzymatischen D-Glukose-Abbaus war damit $99.77 \pm 0.03\%$ bzw. $99.71 \pm 0.08\%$ ($n=7$). Demgegenüber blieb die Konzentration der D-Galaktose mit 10.1 ± 0.5 bzw. $9.8 \pm 0.2 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ ($n=7$) unverändert. Somit wurde in den Plasmapools der ursprüngliche Überschuss der D-Glukose gegenüber der D-Galaktose von etwa 700:1 bzw. 1800:1 um mehr als das 300fache auf 2:1 bzw. 6:1 reduziert.

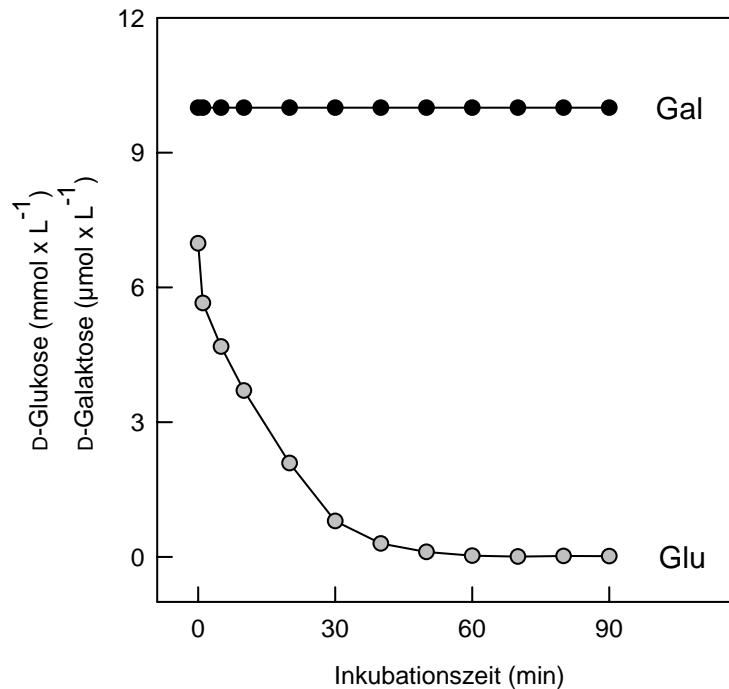


Abb. 1 Zeitlicher Verlauf und Spezifität der Entfernung von D-Glukose aus Plasmaproben mittels D-Glucose-Oxidase/Katalase-Behandlung. Proben von humanem Plasma mit 7 mmol D-Glukose pro L wurden mit D-Galaktose ($10 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) angereichert, enteiweißt und der gepufferte Extrakt (pH 6.5) mit D-Glucose-Oxidase ($10 \text{kU} \times \text{L}^{-1}$) und Katalase ($50 \text{MU} \times \text{L}^{-1}$) behandelt (25°C). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus Ansatz entnommen und die D-Galaktose- und D-Glukose-Konzentration bestimmt.

Zur Überprüfung der Wiederfindung wurden jeweils 1 mL Plasmaprobe aus einem geeigneten Plasmapool mit 5 nmol D-Galaktose angereichert und, wie bei Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet. Nach der Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie wurde in den Proben $2.3 \pm 0.2 \mu\text{mol}$ D-Galaktose wiedergefunden ($n=11$). Unter Berücksichtigung der unvermeidlichen Verluste an Probenvolumen bei den einzelnen Arbeitsschritten entsprach dies einer Ausbeute von $81 \pm 7\%$.

Die Auswirkung der D-Glucose-Oxidase-Behandlung auf die gaschromatographische Trennung wurde an authentischen humanen Plasmaproben geprüft.

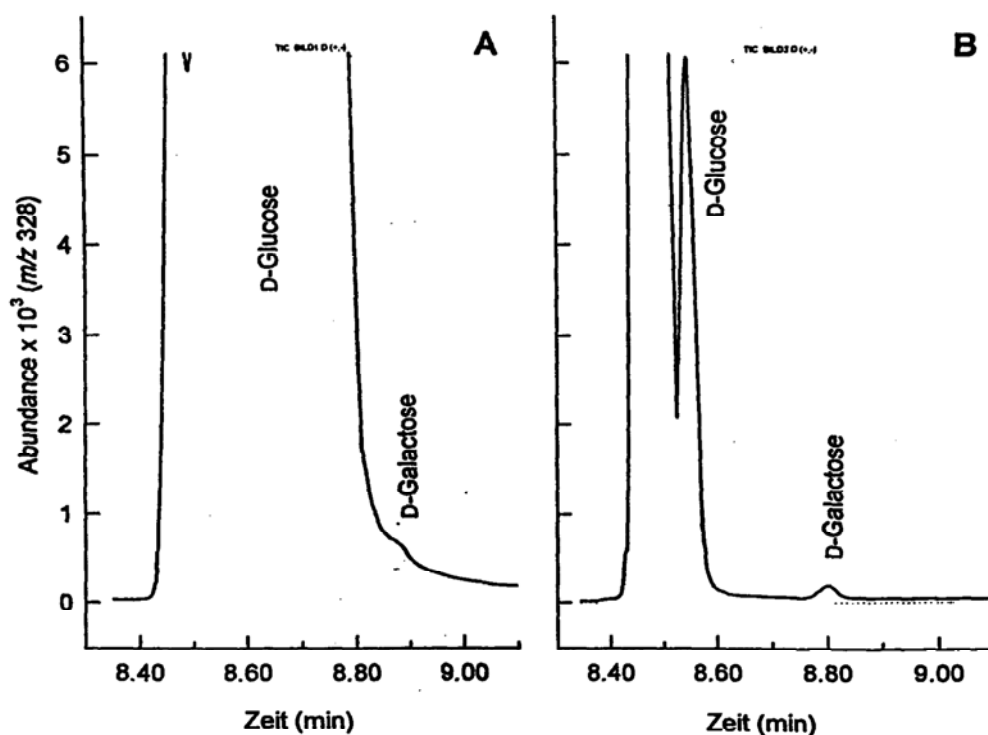


Abb. 2: Gaschromatographische Auftrennung der Aldonitril-Pentaacetat-Derivate von D-Glukose und D-Galaktose aus humanen Plasmaproben. Zwei Aliquots einer Plasmaprobe eines postabsorptiven gesunden Probanden wurden parallel, wie im Methoden-Teil beschrieben, aufgearbeitet. Die Proben wurden jedoch nicht mit D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktose angereichert. Die Probe A (links) wurde ohne, die Probe B (rechts) mit D-Glukose-Oxidase/Katalase-Behandlung aufgearbeitet. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mittels Methan-pCl und Bestimmung der Intensität der $[\text{MH}-60]^+$ -Ionen bei m/z 328.

In Abbildung 2 sind typische Chromatogramme abgebildet, die ohne und mit einer vorherigen enzymatischen Entfernung der D-Glukose erhalten wurden. Bei unbehandelten Proben eluierte die D-Galaktose als kleiner Schulter-Peak auf der abfallenden Flanke des breiten D-Glukose-Peaks. Unter diesen chromatographischen Bedingungen ist eine zuverlässige Bestimmung der Fläche des D-Galaktose-Peaks unmöglich. Dagegen ergab sich nach der Entfernung der D-Glukose eine gute Trennung der beiden Hexose-Peaks und ermöglichte so eine sensitive Quantifizierung des D-Galaktose-Peaks.

Liniarität und Präzision

Vorversuche an Plasmaproben mit der enzymatischen D-Galaktose-Dehydrogenase-Methode deuteten auf eine Konzentration der D-Galaktose im Plasma postabsorptiver Probanden von etwa $1 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ hin. Daher wurden bei

den folgenden Bestimmungen mit der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode die Plasma-Proben mit 1 nmol D-[U-¹³C₆]Galaktose pro mL Probe als internem Standard versetzt. Zunächst wurde die Methode auf Linearität und Wiederholbarkeit geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 und Tabelle 1 dargestellt.

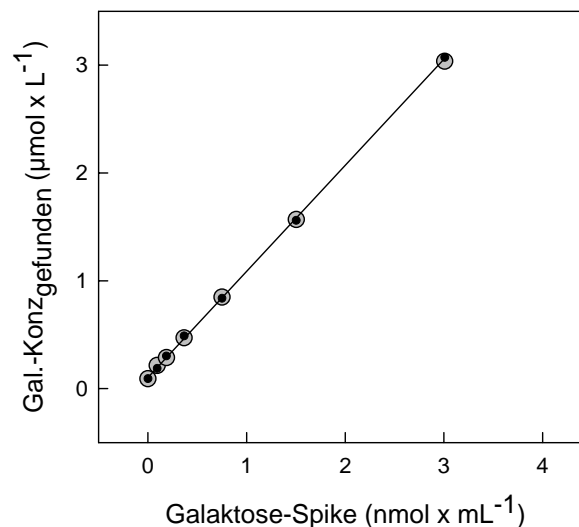


Abb. 3: Linearität der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode zur Bestimmung der Konzentration von D-Galaktose. Plasmaproben einer gesunden Person wurden mit steigenden Konzentrationen von natürlich markierter D-Galaktose versetzt und, wie im Methoden-Teil beschrieben, aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse stammen aus zwei getrennten Analysenserien (Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 0.979$ (SD ± 0.004) $x + 0.104$ (SD ± 0.005), $r > 0.9998$, $n=14$; der Y-Achsenabschnitt entspricht der ursprünglichen D-Galaktose-Konzentration in der Probe).

In Plasmaproben wurde eine ausgezeichnete lineare Korrelation der zugesetzten zum gemessenen natürlich markierten D-Galaktose erhalten.

Die Präzision der Bestimmung wurde mit zwei unterschiedlichen Plasmapools untersucht, von denen einer eine niedrige (ca. $0.2 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) und der andere eine hohe (ca. $1.3 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) Konzentration an D-Galaktose aufwies. Sowohl die Bestimmung in der Serie als auch die Bestimmungen von Tag zu Tag wiesen mit Variationskoeffizienten von $\leq 5\%$ und $< 15\%$ eine sehr gute bis gute Präzision auf.

Tabelle 1**Reproduzierbarkeit von Methoden zur Bestimmung von D-Galaktose in Humanplasma**

Plasmapool ^a	Stabil-Isotopen-Verdünnungs Methode		Enzymatische Methode	
Variationskoeffizienten (%)^b				
	In der Serie (n = 10)	Von Tag zu Tag (n = 10)	In der Serie (n = 10)	Von Tag zu Tag (n = 12)
niedrige Konzentration an D- Galaktose	5.0 (0.18 ± 0.01)	14.2 (0.18 ± 0.03)	3.2 (2.4 ± 0.1)	7.2 (1.6 ± 0.1)
hohe Konzentration an D-Galaktose	3.4 (1.32 ± 0.04)	2.4 (1.28 ± 0.03)	2.1 (5.1 ± 0.1)	6.0 (6.6 ± 0.4)
Bestimmungsgrenze (µmol × L⁻¹)				
	< 0.02		< 0.2	

^a verschiedene humane Poolplasmen wurden mit verschiedenen Konzentrationen D-Galaktose angereichert; die D-Glukose-Konzentration lag zwischen 7 und 11 mmol × L⁻¹.

^b die mit der jeweiligen Methode bestimmte (apparente) D-Galaktose-Konzentration (Mittelwert ± SD) ist in Klammern angegeben

Konzentration der D-Galaktose im Plasma postabsorptiver Probanden

Zur Bestimmung in verschiedenen Plasmaproben wurde die stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode mit D-[U-¹³C₆]Galaktose als internem Standard verwendet. Die Plasmaproben wurden im postabsorptiven Zustand entnommen, um den Einfluß einer unkontrollierten und variablen Zufuhr exogener D-Galaktose über die Nahrung auszuschließen.

Die unter diesen Bedingungen ermittelten D-Galaktose-Konzentrationen im Plasma sind für verschiedene Untersuchungsgruppen in Tabelle 2 angegeben. Bei gesunden Personen (n=16), Patienten mit Diabetes mellitus (n=5) und obligat-heterozygoten Eltern von Patienten mit klassischer Form der Galaktosämie (n=5) wurden jeweils ähnlich niedrige Werte um ca. 0.1 µmol × L⁻¹, gefunden. Dagegen wurden bei postabsorptiven Patienten mit klassischer Form

der Galaktosämie ca. 10fache höhere Konzentrationen an Plasma-D-Galaktose bestimmt.

Tabelle 2
Freie D-Galaktose im Plasma postabsorptiver Probanden

Probanden ^a	Konzentration der D-Galaktose ^b ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	n
gesunde Erwachsene	0.12 ± 0.03 (0.11; 0.08 – 0.18)	16 ^c
Diabetes-Patienten ^d	0.11 ± 0.04 (0.11; 0.07 – 0.21)	15 ^c
Galaktosämie-Patienten ^e	1.44 ± 0.54 (1.59; 0.44 – 2.27)	10
obligat heterozgote Eltern ^f	0.17 ± 0.07 (0.20; 0.08 – 0.26)	5

^a Probenentnahme nach Übernachtsfasten, ≥ 10 h; Median und Bereich in Klammern.

^b Analyse mittels der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode.

^c Plasmaproben wurden doppelt analysiert; Die Abweichungen der individuellen Werte vom Mittelwert war bei gesunden Probanden $3 \pm 3\%$ (0 - 10 %) und bei Patienten mit Diabetes mellitus $7 \pm 5\%$ (0 - 16 %).

^d Blutglukose: 9.7 ± 2.9 (Bereich 5.8 – 15.1) $\text{mmol} \times \text{L}^{-1}$.

^e GALT-Mangel. ^f Eltern der Galaktosämie-Patienten

Methodenvergleich

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, erbrachten erste Vergleichsmessungen unerwarteterweise bei der enzymatisch-fluorimetrischen Methode deutlich höhere D-Galaktose-Konzentrationen im Plasma als die stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode. Daher wurde die enzymatische Methode näher überprüft. Hierzu wurden eine Serie von Vergleichsmessungen durchgeführt.

Angaben zur Präzision der enzymatisch-fluorimetrischen Methode sind in Tabelle 1 enthalten. Die mit den beiden Methoden in individuellen Plasmaproben ermittelten Konzentrationen sind in Abbildung 4 wiedergegeben. Tabelle 3 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

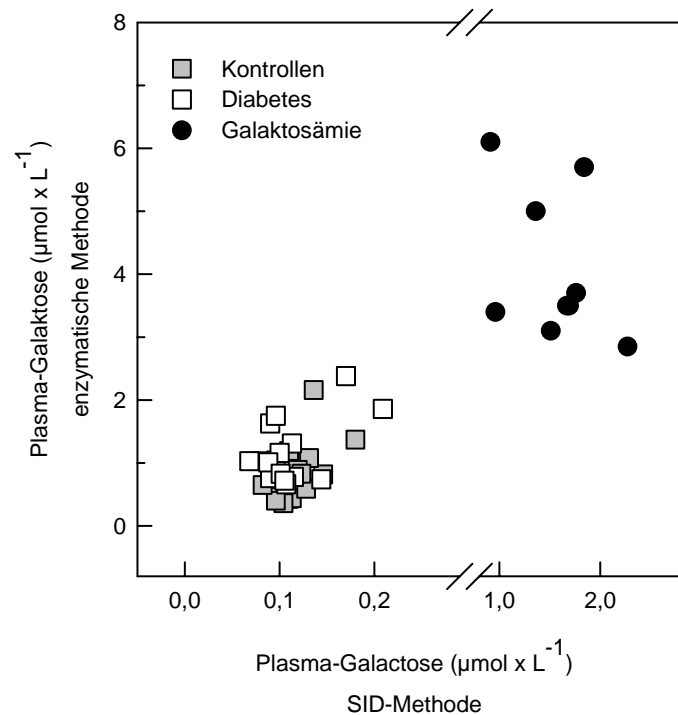


Abb. 4: Methodenvergleich bei der D-Galaktose-Konzentrationsbestimmung an postabsorptiven gesunden Personen und Galaktosämie-Patienten. Die mit der D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktose-Isotopen-Verdünnungsmethode (SID) erhaltenen Daten wurden mit denen der enzymatischen Methode verglichen. Zwischen den Daten der beiden Methoden besteht offensichtlich keine statistische Korrelation ($r < 0.5$; lineare Regression, Methode der kleinsten Fehlerquadrate). Die Daten für das nicht-galaktosämische Personenkollektiv (niedriger Konzentrationsbereich) sowie das der Galaktosämie-Kranken (hoher Konzentrationsbereich) sind jeweils mit einer Hintergrund-Schattenfläche gekennzeichnet.

Bei gesunden Erwachsenen und Patienten mit Diabetes mellitus waren die mit der enzymatisch-fluorimetrischen Methode bestimmten Werte bis zu 18fach höher als die mit der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode ermittelten Werte. Bei Galaktosämie-Patienten mit erhöhten Konzentrationen von D-Galaktose im Plasma wurde im Mittel immer noch eine ca. 3fache Überbestimmung gefunden.

Bemerkenswert ist, dass der Betrag der Überbestimmung mit der enzymatisch-fluorimetrischen Methode (nicht-Galaktosämie-Personen: $+0.91 \pm 0.50$ (Median 0.75; Bereich 0.26 - 2.21) $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, $n=30$; Galaktosämie-Patienten: $+2.54 \pm 1.42$ (Median 1.94, Bereich 0.58 - 5.19) $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, $n=9$) sehr variabel war. Weiterhin wurde bei keiner der drei Untersuchungsgruppen eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den gaschromatographisch-massenspektrometrisch ermittelten und den mit der enzymatischen Methode gemessenen Werten gefunden.

Tabelle 3**Enzymatisch-fluorimetrische Analyse der Konzentration von D-Galaktose im Plasma postabsorptiver Probanden**

Untersuchungsgruppe	Apparente D-Galaktose-Konzentration in Plasma-Proben	Apparente Überbestimmung ^c (-fache) ^b	n ^a
gesunde Erwachsene	0.9 ± 0.5 (0.8; 0.4 – 2.2)	7.6 ± 3.5 (7.5; 3.5 – 15.9)	16
Diabetes-Patienten	1.2 ± 0.5 (1.0; 0.7 – 2.4)	10.8 ± 4.3 (10.2; 5.1 – 18.2)	14
Galaktosämie-Patienten	4.1 ± 0.5 ^d (3.5; 2.9 – 6.1)	3.0 ± 1.6 ^d (2.1; 1.3 – 6.7)	9

^a Probanden wie in Tabelle 2; Mangel an Plasmavolumen bei einem Patienten mit Diabetes mellitus und einem Patienten mit Galaktosämie.

^b Mittelwert ± SD, Median und Bereich in Klammern.

^c verglichen mit den Werten, die mittels der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode erhalten wurden (vergl. Abb. 3)

^d statistisch signifikanter Unterschied zu den anderen Untersuchungskollektiven (p < 0.001)

Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung *in vivo*

Die Anwendbarkeit der neuen GC-MS-Methode für die Bestimmung der Isotopenanreicherung wurde an Plasmaproben aus einer Stoffwechselumsatzmessung geprüft. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse dargestellt, die anlässlich eines „primed continuous infusion“-Versuchs mit intravenöser Applikation von D-[1-¹³C]Galaktose bei einem gesunden Probanden erhalten wurden.

Etwa 3 h nach Beginn der Infusion von D-[1-¹³C]Galaktose wurde ein stabiler steady-state der 1-¹³C-Anreicherung in der D-Galaktose des Plasmas (76 ± 2 MPE, n=7) erreicht. Aus den Ergebnissen wurde eine Freisetzungsrate von endogener D-Galaktose in das Plasma zu 0.17 µmol/h pro kg KG berechnet. Unter Verwendung von D-[U-¹³C₆]Galaktose zur internen Standardisierung konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Anteil der aus endogenen Quellen stammenden D-Galaktose an der gesamten D-Galaktose-Konzentration des Plasmas während des Versuchs weitgehend konstant blieb.

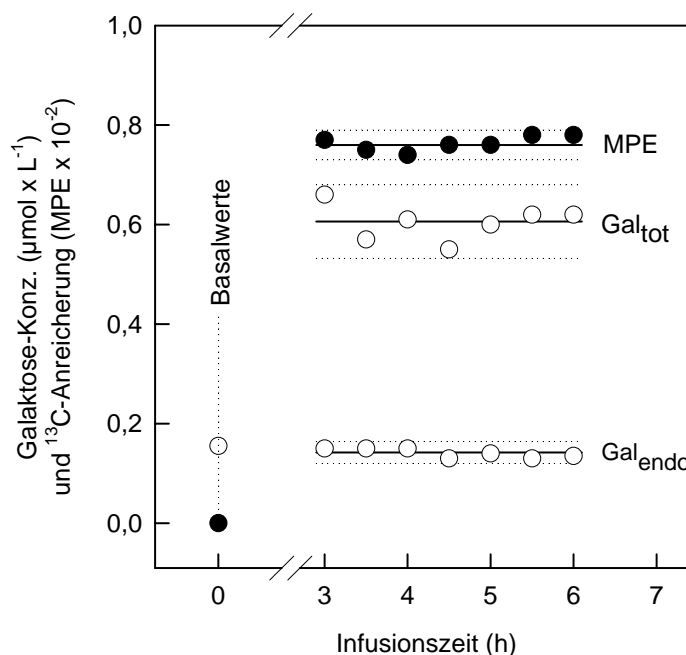


Abb. 5: Konzentration und ^{13}C -Anreicherung der D-Galaktose im Plasma eines postabsorptiven gesunden Probanden bei einem „primed continuous infusion“-Versuch mit intravenöser Applikation von D-[1- ^{13}C]Galaktose. Der Proband erhielt zu Beginn einen intravenösen Bolus ($5.5 \mu\text{mol/kg KG}$) und dann eine kontinuierliche Infusion über 6 Stunden ($0.8 \mu\text{mol/h pro kg KG}$). Plasma-Kontrollproben (Basalwerte) wurden vor Gabe des Bolus genommen. Die Analyse der Plasmaproben erfolgte mittels GC-MS. Zur Konzentrationsbestimmung der Gesamtgalaktose (Gal_{tot}) wurde D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktose als interner Standard verwendet. Der Anteil der endogenen D-Galaktose (Gal_{endo}) wurde anhand $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Isotopenanreicherung und der totalen D-Galaktose-Konzentration berechnet. Mittelwerte sind als durchgezogene Linien eingezeichnet; grau unterlegt sind die Bereiche von $\pm 2 \text{ SD}$.

2.4 Diskussion

Die Anwesenheit eines vergleichsweise riesigen Überschusses an D-Glukose stellt das primäre Problem bei der Etablierung von gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analysemethoden für die Bestimmung von D-Galaktose in Humanplasma dar. Die hier erhobenen Daten zeigen, dass unter postabsorptiven Bedingungen der Überschuss der D-Glukose gegenüber der D-Galaktose in Plasmen von gesunden Erwachsenen ca. 30 000 - 60 000, bei Patienten mit Diabetes mellitus ca. 50 000 - 20 000 und bei Patienten mit klassischer Form der Galaktosämie ca. 2000 - 10 000 beträgt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die D-Glukose aus Plasmaproben spezifisch und praktisch vollständig durch Behandlung mit D-

Glukose-Oxidase aus *Aspergillus niger* entfernt werden kann (Tygstrup et al., 1954, Sondergaard 1958). D-Galaktose wurde durch das Enzym nicht umgesetzt, so dass es während der Probenaufarbeitung nur zu geringen Verlusten bei der Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie kam.

Die bisher wohl empfindlichste Methode zur Bestimmung der Plasma-D-Galaktose wurde von Watanabe & Kawasaki (1987) etabliert, die mittels HPLC und elektrochemischer Detektion eine untere Nachweisgrenze von $2.2 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ erreichen konnten (Watanabe & Kawasaki 1987). Das in dieser Arbeit beschriebene Analysenverfahren ist damit um mehr als 2 Größenordnungen empfindlicher als alle bisher publizierten Methoden zur Bestimmung von D-Galaktose im Plasma (Henderson et al., 1982; Dahlquist, 1983; Fujimura, 1983; Schwarz et al., 1985; Watanabe & Kawasaki, 1987; Pudek et al., 1990; Shin, 1991; Diepenrock et al., 1992; Tang & Hu, 1992; Yuh et al., 1998).

Zur GC-MS-Analyse wurde das Aldonitril-Pentaacetat-Derivat der D-Galaktose verwendet. Dieses Derivat hat mehrere Vorteile: Acylierte Aldonitrile von Hexosen stellen chemisch einheitliche Substanzen dar. Demgegenüber entstehen bei anderen Derivatisierungsmethoden zwei oder mehr Produkte. Zum Beispiel ergibt die Alkylsilylierung von Aldoheptosen vier zyklische Tautomere in unterschiedlichen Anteilen. Durch die Aufteilung auf mehrere gaschromatographische Peaks wird dabei die Sensitivität der massenspektrometrischen Detektion vermindert (Pfaffenberger et al., 1975; Laker, 1980; Martinez-Castro et al., 1989; Rubino, 1989).

Darüber hinaus haben die Aldonitril-Pentaacetat-Derivate günstige Eigenschaften bei der Massenspektrometrie, da sie sehr stabil sind und bei der Anwendung chemischer Ionisationsmethoden kaum fragmentieren. Bei dem Derivat der D-Galaktose waren die Ionen fast vollständig auf das $[\text{MH}-60^+]$ -Ionencluster konzentriert (vergl. Tserng & Kalhan, 1983). Bei der Detektion im „selected ion monitoring (SIM)“-Modus wurden bei m/z 328, m/z 329 und m/z 334 keine störenden Ionen beobachtet, so dass eine hohe Spezifität und Sensitivität der quantitativen Bestimmung gegeben ist.

Die mit der neuen Methode gewonnenen Daten zeigen nun erstmals, dass D-Galaktose - auch im postabsorptiven Zustand - ein normaler Bestandteil des humanen Plasmas ist. Allerdings sind die Konzentrationen im allgemeinen sehr niedrig. Konzentrationsbestimmungen in den Proben aus der *in vivo* Stoffwechselumsatzmessung mit D-[1-¹³C]Galaktose zeigten, dass D-Galaktose aus endogenen Quellen mit einer weitgehend konstanten Rate in das Plasma freigesetzt wird. Aufgrund der Ergebnisse kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass die in das Plasma abgegebene D-Galaktose letztlich aus (exogenen) Nahrungsquellen stammte. Wäre dies der Fall gewesen, so wäre bei Normalpersonen nach über 10stündigem Fasten eine Abnahme der D-Galaktose-Konzentration im Plasma während des Versuchszeitraums zu erwarten gewesen. Dies nicht zuletzt auch deshalb, da bei den Probanden D-Galaktose mit relativ hoher Rate (ca. 1 µmol/h pro kg KG) während des Versuchs oxidativ abgebaut wurde. In diesem Zusammenhang ist auch darauf hinzuweisen, dass eine konstante Isotopenverdünnung der infundierten D-[1-¹³C]Galaktose im Plasma keinen direkten Indikator für stabile Plasma-Konzentrationsverhältnisse darstellt. Daher ist es bei solchen *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen unbedingt erforderlich, zum Nachweis eines metabolischen „steady state“ eine Akkumulation von D-Galaktose im Plasma experimentell auszuschließen.

Verglichen mit den von Berry et al. (1995b) angegebenen Werten war bei dem hier untersuchten Probanden die Freisetzungsrates der endogenen D-Galaktose in das Plasmakompartiment mit 0.17 µmol/h pro kg KG bemerkenswert niedrig. Berry et al. (1995b) bestimmten unter weitgehend vergleichbaren Versuchsbedingungen bei drei gesunden Erwachsenen D-Galaktose-Produktionsraten von 2.9 bis 5.4 µmol/h pro kg KG. Ein kürzlich durchgeführter eigener Kontrollversuch mit einem weiteren gesunden Erwachsenen, bei dem dieselbe ¹³C-Dosierung wie bei Berry et al. (1995b) appliziert wurde, ergab mit 0.43 µmol/h pro kg KG ebenfalls eine deutlich niedrigere Rate der Freisetzung von D-Galaktose aus endogenen Quellen. Die Ursachen für diese offensichtlichen Diskrepanzen sind bisher noch nicht bekannt. Es bleibt prüfen, ob die Erklärung z.B. in einer beträchtlichen intraindividuellen Variabilität der endogenen Bildung von D-Galaktose beim Menschen zu suchen ist.

Wie erwartet, waren die Konzentrationen der D-Galaktose im Plasma von Patienten mit klassischer Form der Galaktosämie deutlich höher als bei den nicht-galaktosämischen Untersuchungsgruppen. Ob diese erhöhten Konzentrationen bei den Patienten mit Galaktosämie letztlich vor allem auf eine sehr langsame metabolische Clearance von D-Galaktose in der Leber zurückzuführen ist, oder aber durch eine im Vergleich zu Normalpersonen etwas erhöhte Freisetzungsrates aus extrahepatischem Gewebe verursacht wird, muss nun durch *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen an Galaktosämie-Patienten geklärt werden.

In dieser Arbeit wurde eine konventionelle enzymatisch-fluorimetrische Methode (Fujimura, 1983) soweit modifiziert, dass es möglich wurde, enzymatische Bestimmungen der D-Galaktose im Plasma auch im niedrigen Konzentrationsbereich durchzuführen. Ein Vergleich der enzymatischen mit den GC-MS-Daten ergab, dass mit der enzymatischen Methode, aufgrund bislang noch nicht klar definierbarer Interferenzen, viel zu hohe D-Galaktose-Konzentrationen im Plasma bestimmt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren mitgeteilt (Watanabe & Kawasaki, 1987; Pudek et al., 1990; Yuh et al., 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse muss festgestellt werden, dass die enzymatisch-fluorimetrische Methode für eine Analyse niedrigerer D-Galaktose-Konzentration im Plasma nicht geeignet ist.

Abschließend ist festzuhalten, dass mit der hier vorgestellten GC-MS-Methode eine hochsensitive und zuverlässige Messung von Konzentration und ¹³C-Anreicherung der D-Galaktose in humanen Plasmaproben durchgeführt werden kann. Eine wesentliche Voraussetzung für valide Ergebnisse ist jedoch, dass jede Präparation stabil-Isotopen-markierter D-Galaktose, die als interner Standard oder zur Infusion verwendet werden soll, vorher gründlich geprüft werden muss, da unterschiedliche Präparationen auch unterschiedliche Mengen an störenden Komponenten enthalten können (Tserng & Kalhan, 1983).

Kapitel 3

Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten

Zusammenfassung. Für die Bestimmung der Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten wurde eine stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode etabliert. Dazu wurde D-Galaktose-1-Phosphat enzymatisch zu D-Galaktose umgewandelt und das Aldonitril-Pentaacetat-Derivat gaschromatographisch-massenspektrometrisch (GC-MS) analysiert. Die massenspektrometrische Quantifizierung der $[MH-60]^+$ -Ionen erfolgte nach positiver chemischer Ionisation im „selected-ion-monitoring“ (SIM) Modus. Zur internen Standardisierung wurde U- $^{13}C_6$ -markierte D-Galaktose verwendet. Vergleichsmessungen wurden mit einer etablierten enzymatisch-fluorimetrischen und einer radioenzymatischen Methode durchgeführt. Die GC-MS-Methode war linear (Bereich: 0 bis $600 \mu\text{mol} \times L_{RBC}^{-1}$ gepackte Zellen) und sowohl in niedrigeren wie in höheren Konzentrationsbereichen gut reproduzierbar (VK's in der Serie und von Tag zu Tag < 15%). Die Bestimmungsgrenze lag bei $0.01 \mu\text{mol} \times L_{RBC}^{-1}$. Bei Vergleichsmessungen in Erythrozyten von Galaktosämie-Patienten waren die Werte mit den Ergebnissen der konventionellen enzymatischen Methoden gut korreliert ($R^2 > 0.927$). Bestimmungen in Erythrozyten postabsorptiver Patienten unter diätetischer Behandlung (n=41), Q188R-heterozygoter Eltern (n=8) und gesunder Erwachsener (n=33) ergaben Werte des D-Galaktose-1-Phosphats von (Mittelwert \pm SD) 142 ± 38 , 1.4 ± 0.2 und $1.9 \pm 0.5 \mu\text{mol} \times L_{RBC}^{-1}$. Die Konzentrationen der freien D-Galaktose lagen bei 3.8 ± 1.7 , 0.49 ± 0.19 und $0.43 \pm 0.20 \mu\text{mol} \times L_{RBC}^{-1}$. Die Methode kann auch verwendet werden, um den Einbau von ^{13}C -Markierung in andere D-Galaktose-Metabolite des Erythrozyten zu analysieren.

3.1 Einleitung

Dem Menschen wird D-Galaktose hauptsächlich über die Nahrung, vor allem mit Milch und Milchprodukten zugeführt. Die Elimination der D-Galaktose erfolgt im Wesentlichen über den Leloir-Stoffwechselweg. Hierbei wird D-Galaktose mit Hilfe der Enzyme D-Galaktokinase (EC 2.7.1.6), D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (EC 2.7.7.12) und UDP-Galaktose-4-Epimerase (EC 5.1.3.2) abgebaut. Bei Galaktosämie ist aufgrund eines erblichen Mangels an einer dieser Enzymaktivitäten der Abbau von D-Galaktose gestört. Die häufigste Ursache der Galaktosämie ist ein angeborener Mangel an D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (klassische Galaktosämie; OMIM 230400). Bei Neugeborenen mit klassischer Form der Galaktosämie, die mit Milch ernährt werden, akkumulieren die potentiell toxischen Metabolite D-Galaktose-1-Phosphat und D-Galaktitol und es entwickelt sich ein lebensbedrohliches organ-toxisches Syndrom. Als Therapie der klassischen Galaktosämie wird derzeit eine lebenslange und weitgehende Restriktion der D-Galaktose-Zufuhr mit der Nahrung empfohlen (Übersicht bei Holton et al., 2001).

Zur Überwachung der Stoffwechseleinstellung bei klassischer Galaktosämie wird, wenn auch nicht unumstritten (Schwarz, 1960; Walter et al., 1999), der D-Galaktose-1-Phosphat-Gehalt in den Erythrozyten bestimmt. Bisher verfügbare Methoden für die Konzentrationsbestimmung von D-Galaktose-1-Phosphat sind: (i) Enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe und Bestimmung der entstandenen D-Galaktose mit einer gekoppelten D-Galaktose-Oxidase- (EC 1.1.1.39) oder D-Galaktose-Dehydrogenase- (EC 1.1.1.48) Indikatorreaktion (Dahlqvist, 1983). (ii) Bestimmung der D-Galaktose-1-Phosphat-abhängigen, durch die Uridyltransferase katalysierten, Freisetzung von ^{14}C -markiertem D-Glukose-1-Phosphat aus UDP- ^{14}C -Glukose oder, wenn Radiochemikalien nicht verwendet werden können, Kopplung mit der D-Glukose-6-Phosphat-Mutase- (EC 5.4.2.6) / -Dehydrogenase- (EC. 1.1.1.49) Indikatorreaktion (Shin, 1991). (iii) Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung der Trimethylsilyl-Derivate des D-Galaktose-1-Phosphats mittels stabil-Isotopen-Verdünnung (Chen et al., 2002a).

Diese Methoden sind zur Bestimmung von erhöhten Konzentrationen von D-Galaktose-1-Phosphat bei Patienten mit klassischer Galaktosämie gut geeignet und die Werte zeigen eine vergleichbare gute Übereinstimmung. Keine dieser Methoden ist jedoch von ausreichender Empfindlichkeit, um eine zuverlässige Bestimmung der niedrigen Konzentrationen an D-Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten von Normalpersonen und postabsorptiven Patienten mit milderer Formen der Galaktosämie zu erlauben (Chen et al., 2002a).

Im Folgenden wird eine Modifikation der im Kapitel 2 entwickelten GC/MS-Methode zur Bestimmung freier D-Galaktose beschrieben. Diese erlaubt es, die Konzentration und den ^{13}C -Gehalt des D-Galaktose-1-Phosphats über den gesamten (patho)physiologisch relevanten Konzentrationsbereich zu bestimmen.

3.2 Material und Methoden

Probanden und Patienten

Zur Bestimmung postabsorptiver D-Galaktose-Metabolit-Konzentrationen im Blut wurden Proben von EDTA-Blut zwischen 7 Uhr und 9 Uhr bei Patienten mit D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel (15 weiblich, 12 männlich; Alter 15 ± 9 Jahre (Mittelwert \pm SD), Gewicht 41 ± 21 kg, Größe 147 ± 28 cm), deren obligat heterozygoten Eltern (4 Frauen, 4 Männer; Alter 41 ± 4 Jahre, Gewicht 71 ± 11 kg, Größe 172 ± 2 cm) und gesunden erwachsenen Probanden (15 Frauen, 18 Männer; Alter 28 ± 9 Jahre, Gewicht 68 ± 13 kg, Größe 175 ± 8 cm) venös entnommen. Alle Probanden wurden in postabsorptivem Zustand nach Übernachtfasten von ≥ 10 Stunden untersucht. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Zellen vom Plasma durch Zentrifugation ($3000 \times g$, 5 min) getrennt. Die Erythrozyten wurden zwei mal mit gleichem Volumen physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Plasma- und Erythrozyten-Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Galaktoseumsatz-Studie

Dazu wurde - in Anlehnung an die Angaben von Berry et al. (1995b) - ein „primed-continuous-infusions“-Test nach Übernachtfasten > 10h unter Ruhebedingungen durchgeführt (vgl. Kap. 7.2):

Ein Galaktosämie-Patient (männlich, 18 Jahre) erhielt gegen 08:30 Uhr einen einmaligen intravenösen Bolus von D-[1-¹³C]Galaktose (8.0 µmol/kg KG, „priming dose“). Danach wurde über eine in einer geeigneten Armvene platzierten Venenverweilkanüle über 5.5 Stunden kontinuierlich D-[1-¹³C]Galaktose (1.25 µmol/h pro kg KG) infundiert. EDTA-Blutproben wurden ab 150 min im Abstand in 15 Minuten über eine Dauer von 3 Stunden aus einer Venenverweilkanüle entnommen, die im kontralateralen Arm gelegt war. Die Blutproben wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet und gelagert.

Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien und Enzyme bereits im Kap. 2.2 spezifiziert. Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1, aus Kalbsdarm), D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (EC 2.7.7.12, aus Hefe), D-Galaktose-1-Phosphat (Dikaliumsalz) und UDP-Glukose (Dinatriumsalz) waren von Sigma-Aldrich (Taufkirchen). UDP-[U-¹⁴C]Galaktose-1-Phosphat (11 Gbq / mmol) wurde von Biotrend (Köln) bezogen.

D-[U-¹³C₆]Galaktitol-Standard war nicht im Handel erhältlich. Daher wurde D-[U-¹³C₆]Galaktitol aus D-[U-¹³C₆]Galaktose durch Reduktion mit NaBH₄ synthetisiert (Jakobs et al., 1984). Die Reinheit des Produkts wurde mittels GC-MS-Analyse überprüft. Die D-[U-¹³C₆]Galaktitol-Präparation war rein (98.5% [U-¹³C₆]) und enthielt weniger 0.2% nicht umgesetzte D-[U-¹³C₆]Galaktose.

Galaktose-1-Phosphat

Für die Bestimmung von D-Galaktose-1-Phosphat wurden folgende Methoden eingesetzt.

Stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode

Erythrozyten-Proben wurden mit gleichem Volumen von physiologischer NaCl-Lösung gemischt. Zur internen Standardisierung wurden Erythrozytensuspensionen (100 μL) der Patienten mit D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktose-Lösung (50 $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$; 100 μL) und D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktitol-Lösung (50 $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$; 10 μL) versetzt und 1 min im Ultraschall-Bad behandelt. Danach wurde 400 μL Tris/HCl-Puffer (0.5 $\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, pH 8.6) zugefügt, und zur Enteiweißung erhitzt (95 $^\circ\text{C}$, 5 min), und der Überstand durch Zentrifugation (5 min, 10 000 $\times g$, 4 $^\circ\text{C}$) gewonnen. Zur Hydrolyse des D-Galaktose-1-Phosphats wurde der Extrakt (500 μL) mit MgCl_2 (0.5 $\text{mmol} \times \text{L}^{-1}$) und alkalischer Phosphatase (90 $\text{kU} \times \text{L}^{-1}$) versetzt, und 2 h bei 25 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Das Inkubat (500 μL) wurde mit H_2O (1 mL) und HClO_4 (30%, v:v; 0.15 mL) versetzt und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation (s.o.) entfernt. Der Überstand (1.4 mL) wurde mit KHCO_3 (2.5 $\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, 0.25 mL) neutralisiert und KClO_4 durch Zentrifugation (s.o.) abgetrennt. Die weitere Reinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie und die Derivatisierung erfolgte wie bereits im Kap. 2.2 beschrieben.

Zur Bestimmung der Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse wurden in jeder Serie Kontroll-Proben mitgeführt, denen 10 nmol D-Galaktose-1-Phosphat zugesetzt worden war. Als Leerwerte wurden Proben mitgeführt, die 0.5 nmol U- $^{13}\text{C}_6$ -markierte D-Galaktose enthielten und die ohne Zusatz von alkalischer Phosphatase aufgearbeitet wurden. Bei Proben von obligat heterozygoten Eltern und gesunden Erwachsenen wurden 200 μL Erythrozytensuspension verwendet, mit 10 μL (0.5 nmol) U- $^{13}\text{C}_6$ -markierten Standard-Lösungen versetzt und, wie oben beschrieben, weiter aufgearbeitet.

Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse des Aldonitril-Pentaacetat-Derivats der D-Galaktose erfolgte mittels pCI und SIM der $[\text{MH}-60]^+$ -Ionen wie bereits im Kap. 2.2. beschrieben. Zusätzlich wurde das Alditol-Hexaacetat-Derivat des D-Galaktitols analysiert. Dazu wurde die Intensität der $[\text{MH}-60]^+$ -Ionen im D-Galaktitol-Peak bei m/z 375, m/z 376, m/z 381 gemessen, um 1- ^{12}C -, 1- ^{13}C -, U- $^{13}\text{C}_6$ -markiertes D-Galaktitol zu erfassen.

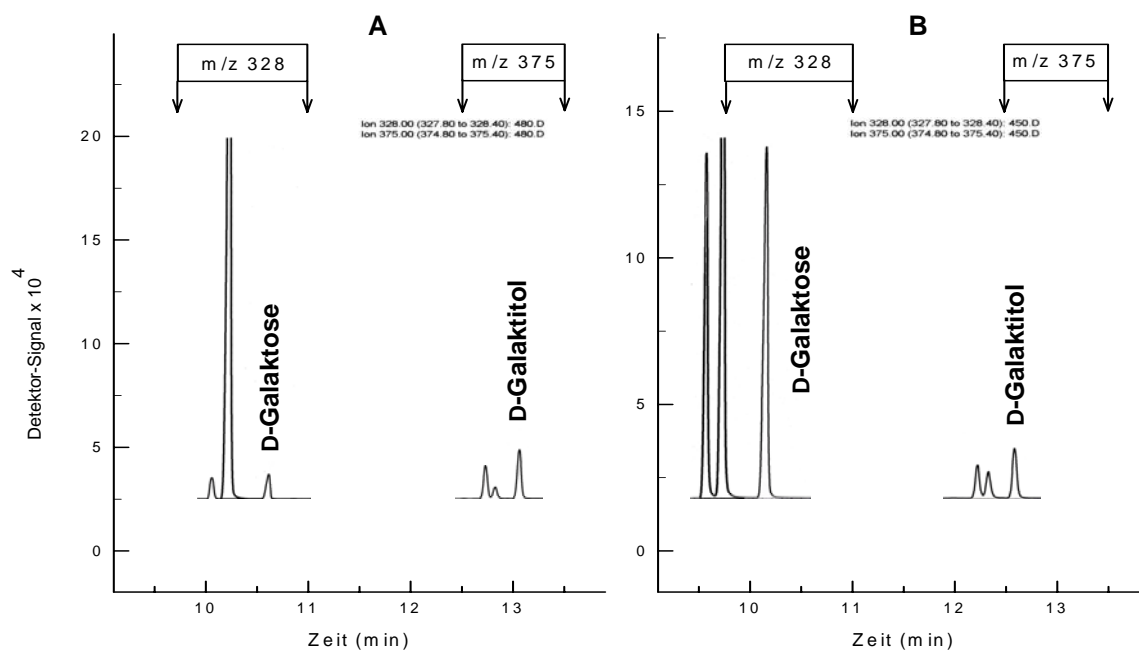


Abb. 1: Gaschromatographisch-Massenspektrometrische Bestimmung von freier D-Galaktose, totaler D-Galaktose (Summe aus freier D-Galaktose und D-Galaktose-1-Phosphat) und D-Galaktitol aus humanen Erythrozytenproben. Zwei Aliquots einer Erythrozytensuspension eines Patienten mit D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel wurden parallel, wie im Methoden-Teil beschrieben, aufgearbeitet. Die Probe A (links) wurde ohne, die Probe B (rechts) mit alkalischer Phosphatase-Behandlung aufgearbeitet. Die massenspektrometrische Detektion der Aldononitrilderivate der D-Galaktose sowie der Hexaacetate des D-Galaktitols erfolgte mittels Methan-pCI, und die Bestimmung der Intensitäten der $[MH-60]^+$ -Ionen bei m/z 328 und m/z 375. Die Metabolit-Konzentrationen waren in A: freie D-Galaktose $2.9 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, D-Galaktitol $8.4 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$; in B: totale D-Galaktose $99.7 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, D-Galaktitol $8.6 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$.

Die Konzentration von D-Galaktose und D-Galaktitol (C_{nat} ; in $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$) wurde aus den Ionenintensitätsverhältnissen $R_{\text{nat}} = (m/z 328)/(m/z 334)$ und $R_{\text{nat}} = (m/z 375)/(m/z 381)$ wie im Kap. 2.2 (Gleichung 1) beschrieben berechnet. Dabei wurde V_{Plasma} durch V_{RBC} ersetzt ($V_{\text{RBC}} = \text{Volumen gepackten Erythrozyten in mL}$). Entsprechend wurde die Konzentration von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter D-Galaktose und D-Galaktitol (C_{13} ; in $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$) aus den Ionen-Intensitätsverhältnissen $R_{13} = (m/z 329)/(m/z 334)$ und $R_{13} = (m/z 376)/(m/z 381)$ berechnet (s. Kap. 2.2; Gleichung 2). Für D-Galaktitol wurde die natürliche $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Anreicherung aus den Ionen-Intensitätsverhältnissen $R_0 = (m/z 376)/(m/z 375)$ im chromatographischen Peak von D-Galaktitol in einer repräsentativen Anzahl von authentischen Plasmaproben ($n=54$) zu 0.179 experimentell bestimmt und für die Berechnung verwendet. Alle weiteren Berechnungen erfolgten genau wie im Kap. 2.2 beschrieben.

Enzymatisch-fluorimetrische Methode

Für die Bestimmung des D-Galaktose-1-Phosphats wurde das von Dahlqvist (1983) beschriebene Verfahren verwendet. Drei Aliquots der Erythrozytensuspension (160 μL) wurden zur internen Standardisierung mit D-Galaktose-1-Phosphat-Standardlösungen (0, 125 und 250 $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$; 40 μL) versetzt, und für 1 min im Ultraschall-Bad behandelt, dann wurde Tris/HCl-Puffer (0.5 mol/L, pH 8.6, 400 μL) zugefügt und zur Proteinfällung erhitzt (95 °C, 5min). Danach wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 10 000 \times g, 4 °C) und der Überstand gewonnen. Der Ansatz (Endvolumen 1 mL) für die fluorimetrische Bestimmung enthielt Überstand (330 μL), Tris/HCl-Puffer (0.5 mol \times L⁻¹, pH 8.0), NAD⁺-Lösung (1 mmol \times L⁻¹), MgCl₂ (0.45 mmol \times L⁻¹) und D-Galaktose-Dehydrogenase-Lösung (125 U \times L⁻¹). Nach Bestimmung des Leerwertes (λ_{ex} 340 nm, λ_{em} 450 nm; Fluorimeter SFM 25, Kontron, Zürich, Schweiz) wurde die Hydrolyse von D-Galaktose-1-Phosphat durch Zugabe von alkalischer Phosphatase (50 kU \times L⁻¹) gestartet. Nach vollständiger Hydrolyse (ca. 90 min) wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität gemessen. Die Berechnung der D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten erfolgte dann auf der Basis der Fluoreszenzintensität der internen Standards.

Radioenzymatische Bestimmung

Für vergleichende Messungen wurde außerdem eine weitere gebräuchliche Methode verwendet. Bei dieser Methode wird die D-Galaktose-1-Phosphat-abhängige Freisetzung von ¹⁴C-markiertem D-Glukose-1-Phosphat aus UDP-[U-¹⁴C]Glukose - katalysiert durch die D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase - gemessen. Die Analyse erfolgte wie bei Shin (1991) beschrieben mit der Ausnahme, dass zur chromatographischen Abtrennung des ¹⁴C-markierten D-Glukose-1-Phosphats anstelle einer DEAE-Säule eine Dowex 1X8-Säule (Cl⁻-Form, 200-400 mesh, 0.5 mL) verwendet wurde.

Sonstige Analysen

Die Aktivität der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase in den Erythrozyten wurde wie im Kap. 6.1 beschrieben gemessen. Das Screening auf die Q188R-

Mutation erfolgte wie im Kap. 5.2 beschrieben. D-Galaktose und D-Galaktitol im Plasma wurden, wie bereits im Kap. 2.2 beschrieben, mittels stabil-Isotopen-Verdünnung bestimmt.

Statistik

Im Allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm SD (Anzahl der unabhängigen Bestimmungen in Klammern) angegeben. Korrelationen wurden mit linearer Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Fehlerquadrate, RGP-Funktion, Microsoft-Excel) überprüft. Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen Stichproben wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet.

3.3 Ergebnisse

Linearität und Präzision

Zunächst wurde die neue Methode auf Linearität geprüft. Dazu wurden Erythrozytensuspensionen mit D-Galaktose-1-Phosphat in Konzentrationen angereichert, die typischerweise bei klassischer Galaktosämie auftreten können (50 bis 500 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$).

Sowohl mit dem Erythrozyten-Pool des Patienten als auch mit dem Erythrozyten-Pool eines gesunden Probanden wurde eine ausgezeichnete lineare Korrelation zwischen zugesetztem und analytisch bestimmtem D-Galaktose-1-Phosphat gefunden. Eine vergleichbar gute Linearität wurde auch mit Erythrozyten-Proben, denen D-Galaktose-1-Phosphat im niedrigen Konzentrationsbereich zugesetzt war (0-20 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$; Abb. 2B), ermittelt. Die Nachweisgrenze (d.h. Signal-Rausch-Verhältnis im D-Galaktose-Peak von 3:1) lag bei 0.01 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$ (siehe Abb.1).

Die Präzision wurde mit einem Erythrozyten-Pool von einem gesunden Erwachsenen (D-Galaktose-1-Phosphat: ca. 3 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$) sowie dem Erythrozyten-Pool eines Patienten mit Galaktosämie (D-Galaktose-1-Phosphat: ca. 90 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$) untersucht.

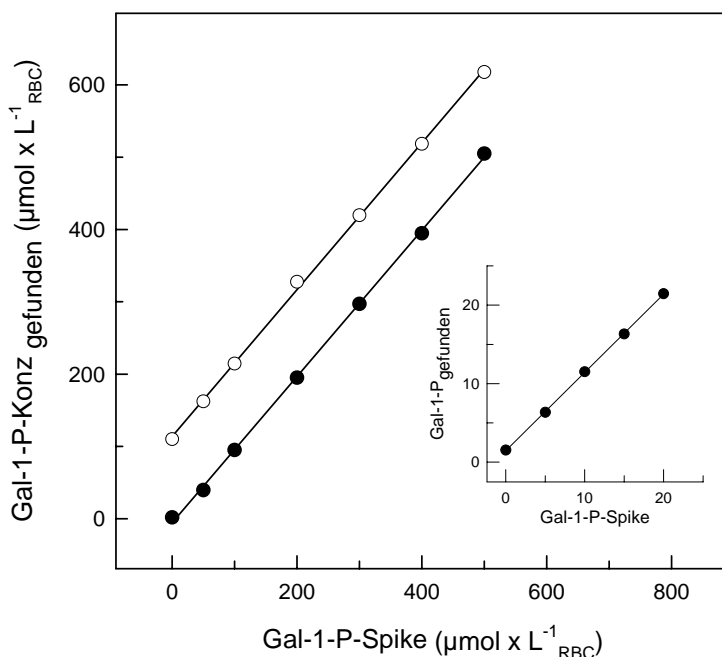


Abb. 2: Linearität der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode zur Bestimmung der Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat (Gal-1-P) in Humanerythrozyten.

A) Erythrozytenproben eines Patienten mit klassischer Galaktosämie, sowie Erythrozytenproben gesunder Erwachsenen wurden mit steigenden Konzentrationen von natürlich markiertem D-Galaktose-1-Phosphat versetzt, und wie im Methoden-Teil beschrieben, aufgearbeitet und analysiert (Gleichungen der Regressionsgeraden: $y = 1.014(\pm 0.012)x + 113.8(\pm 3.4)$; $S_{y/x} = 5.6$, $r > 0.999$; $y = 1.011(\pm 0.011)x + 5.6(\pm 3.1)$; $S_{y/x} = 5.1$, $r > 0.999$; der Y-Achsenabschnitt entspricht der ursprünglichen D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in der Probe).

B) Zu Erythrozytenproben gesunder Erwachsener wurde in den angegebenen Konzentrationen D-Galaktose-1-Phosphat zugegeben und analysiert (Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 0.991(\pm 0.014)x + 1.5(\pm 0.2)$; $S_{y/x} = 0.2$, $r > 0.999$; der Y-Achsenabschnitt entspricht der ursprünglichen D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in der Probe).

Bei der hohen Konzentration lagen die VK's in der Serie und von Tag zu Tag bei 0.6% bzw. 4%. Bei der niedrigen Konzentration lagen die entsprechenden VK's bei 12.9% bzw. 14.3%.

Methodenvergleich

Die stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode wurde weiter evaluiert, indem Vergleichsmessungen in Erythrozyten-Proben von Patienten mit Galaktosämie mit der konventionellen enzymatisch-fluorimetrischen Methode (56 Proben, D-Galaktose-1-Phosphat 123 ± 38 ; Bereich 9 - 231 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$) sowie mit der radioenzymatischen Methode (26 Proben, D-Galaktose-1-Phosphat 126 ± 41 ; Bereich 159 - 217 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$) durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in

Abbildung 3 dargestellt. Sie zeigen, dass alle drei Methoden untereinander linear korreliert waren und Ergebnisse mit einer guten Übereinstimmung erbrachten ($r > 0.963$, $S_{y/x} \leq 11 \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$).

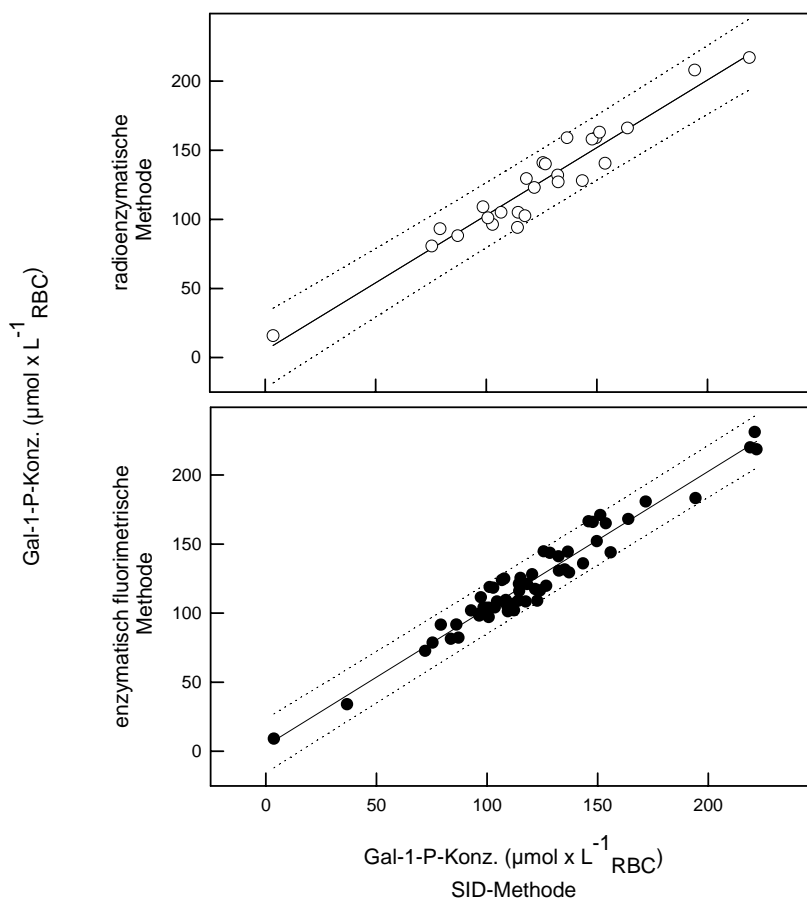


Abb. 3: Methodenvergleich bei der Konzentrationsbestimmung von D-Galaktose-1-Phosphat postabsorptiven Patienten mit D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel. Die mit der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode (SID) erhaltenen Daten wurden mit der konventionellen radioenzymatischen Methode ($n=26$), und der enzymatisch-fluorimetrischen Methode ($n=56$) verglichen, und in beiden Fällen gute statistische Korrelation gefunden (Gleichung der Regressionsgeraden: A (oben): $y = 0.978(\pm 0.056)x + 5.1(\pm 7.2)$; $S_{y/x} = 11.3$, $r > 0.963$; B (unten): $y = 0.993(\pm 0.031)x + 3.8(\pm 3.9)$; $S_{y/x} = 9.1$, $r > 0.97$). Die Daten der enzymatisch-fluorimetrischen Methode (x) und die Daten der radioenzymatischen Methode (Y) zeigen ebenfalls eine statistische Korrelation (Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 0.966(\pm 0.060)x + 2.9(\pm 8.1)$; $S_{y/x} = 12.5$; $n=26$). Bemerkung: Im Allgemeinen wurde in Erythrozyten der Patienten die Aktivität der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase $< 1\%$ der Norm gemessen. Die niedrige Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat wurde in Erythrozyten einer Patientin mit Duarte-Variante (D_2) bestimmt.

Galaktose-Metabolite in Erythrozyten

Diese Methode wurde angewendet, um die Relationen der D-Galaktose-Metaboliten in Humanerythrozyten zu bestimmen. Die Daten für Galaktosämie-Patienten, deren obligat heterozygoten Eltern und für gesunde Erwachsene sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1
D-Galaktose-Metabolite in Erythrozyten postabsorptiver Probanden

Probanden ^a	D-Galaktose-1-Phosphat ^b	D-Galaktose ^c	D-Galaktitol ^c	n
		($\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$)		
Galaktosämie-Patienten ^d	142 ± 38	3.8 ± 1.7	8.3 ± 1.5	41
	75 – 233	1.6 – 8.5 (3.3 ± 1.0)	5.0 – 11.2 (11.2 ± 1.4)	
obligat heterozyote Eltern ^e	1.4 ± 0.2	0.49 ± 0.19	0.73 ± 0.30	8
	1.0 – 1.7	0.13 – 0.75 (0.26 ± 0.05)	0.37 – 1.08 (0.17 ± 0.04)	
gesunde Erwachsene ^f	1.9 ± 0.5	0.43 ± 0.20	0.81 ± 0.38	33
	1.2 – 3.2	0.10 – 0.87 (0.33 ± 0.06)	0.25 – 1.79 (0.21 ± 1.06)	

^a Blutprobenentnahme nach Übernachtfasten, postabsorptive Periode ≥ 10 h.

^b Analyse mittels der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode; Mittelwert und Bereich sind für gepackte Erythrozyten angegeben.

^c Zum Vergleich sind Konzentrationen im Plasma in Klammern angegeben; wie im Kapitel 2 beschrieben, analysiert.

^d In den Erythrozyten der 26 Galaktosämie-Patienten betrug die GALT-Aktivität < 1% der Norm.

^e Q188R-heterozygote Probanden mit GALT-Aktivität von 50 ± 5 % der Norm.

^f GALT-Aktivität lag bei 23 ± 3 $\mu\text{mol/h}$ pro g Hb.

In Erythrozyten postabsorptiver Patienten mit Galaktosämie (n=41) ergaben sich bei einer mittleren D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration von 142(±38) $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$ folgende Verhältnisse für freie D-Galaktose (\equiv 1)/D-Galaktitol/D-Galaktose-1-Phosphat von 1: 2.5(±0.9): 42(±16). Die intra- zur extrazelluläre-Ratio von D-Galaktose betrug 1.2(±0.7), die von D-Galaktitol 0.7(±0.1). Diese Rationes deuten darauf hin, dass freie D-Galaktose intrazellulär geringfügig akkumuliert, wohingegen im D-Galaktitol Gleichverteilung zwischen dem extra- und intrazellulären Kompartiment gegeben ist.

In den Erythrozyten obligat heterozygoter Eltern (n=8) waren die Konzentrationen des D-Galaktose-1-Phosphats wesentlich niedriger ($1.4 \pm 0.2 \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$) und das Verhältnis D-Galaktose ($\equiv 1$)/D-Galaktitol/D-Galaktose-1-Phosphat betrug 1: 1.7 (± 0.7): 3.0 (± 1.3). Die intra-extrazelluläre-Ratio von D-Galaktose war 2.1 (± 1.0), die von D-Galaktitol 4.4 (± 1.9). Diese Werte deuten darauf hin, dass sowohl D-Galaktose als auch D-Galaktitol intrazellulär akkumulierte. Mit Erythrozyten gesunder Kontrollpersonen wurden, wie erwartet, mit den obigen Befunden übereinstimmende Ergebnisse erhalten (s. Tab. 1).

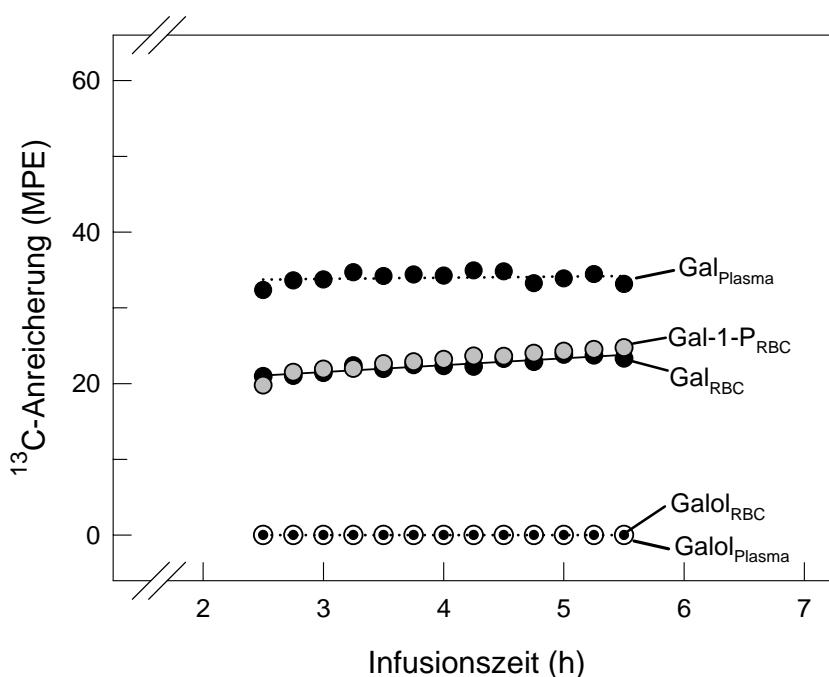


Abb. 4: ^{13}C -Anreicherung von D-Galaktose-Metaboliten im Plasma und in Erythrozyten eines postabsorptiven erwachsenen Patienten bei einem „primed continuous infusion“-Versuch mit intravenöser Applikation von D-[1- ^{13}C]Galaktose. Der Patient mit Q188R-homozygoter Mutation erhielt zu Beginn einen intravenösen Bolus ($8.0 \mu\text{mol}/\text{kg KG}$) und dann eine kontinuierliche Infusion über 5.5 Stunden ($1.25 \mu\text{mol}/\text{h pro kg KG}$). Venöse Blutproben wurden entnommen, und wie im Methoden-Teil beschrieben, die ^{13}C -Anreicherung mittels GC/MS bestimmt. In Plasmaproben wurde ein apparenter „steady-state“ in der ^{13}C -Anreicherung in D-Galaktose gefunden (Gal; 33.9 ± 0.8 ; $r < 0.09$). In Erythrozyten wurde eine statistisch hoch signifikante lineare Erhöhung der ^{13}C -Anreicherung in D-Galaktose und D-Galaktose-1-Phosphat bestimmt ($p < 0.001$). Gleichung der Regressionsgeraden (gerade Linien); für D-Galaktose: $y = 0.91(\pm 0.11)x + 18.8(\pm 0.4)$; $S_{y/x} = 0.36$, $r > 0.932$; für D-Galaktose-1-Phosphat: $y = 1.36(\pm 0.12)x + 17.5(\pm 0.5)$; $S_{y/x} = 0.42$, $r > 0.957$. In D-Galaktitol (Galol) wurde keine ^{13}C -Anreicherung gefunden

Diese Methode kann auch für die Bestimmung der Isotopenanreicherung verwendet werden. In unserer Arbeitsgruppe wird sie z.B. im Rahmen von *in vivo* D-Galaktose-Stoffwechsellumsatzmessungen zur Analyse des Einbaus von ^{13}C -

Markierung aus intravenös applizierter D-[1-¹³C]Galaktose in Galaktose-Metabolite der Erythrozyten eingesetzt. Beispielhaft sind in Abbildung 4 Ergebnisse dargestellt, die anlässlich einer Stoffwechselumsatzmessung bei einem Patienten mit Galaktosämie erhalten wurden.

3.4 Diskussion

Eine stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode zur sensitiven und zuverlässigen Bestimmung der D-Galaktose in Humanplasma wurde bereits früher etabliert und ist im vorangehenden Kapitel ausführlich beschrieben (Kap. 2). Diese Methode wurde nun modifiziert, um auch das D-Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten sensitiv bestimmen zu können. Dazu wurde die Phosphatgruppe durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase vom D-Galaktose-1-Phosphat abgespalten und danach die freigesetzte D-Galaktose mittels GC-MS quantifiziert.

Die Ergebnisse der Linearitäts- und Wiederholbarkeitsprüfung zeigen, dass D-Galaktose-1-Phosphat mit dieser Methode im gesamten Konzentrationsbereich von den sehr niedrigen Konzentrationen bei Normalpersonen bis zu den deutlich erhöhten Konzentrationen bei Patienten mit klassischer Form der Galaktosämie zuverlässig bestimmt werden kann.

Vergleichende Messungen in Erythrozyten von Galaktosämie-Patienten ergaben eine gute Übereinstimmung der neuen stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode mit den häufig verwendeten konventionellen enzymatisch-fluorimetrischen (Dahlqvist, 1983) und radioenzymatischen Methoden (Shin, 1991, s. Abb. 3). Da für den statistischen Vergleich lineare Regression verwendet wurde, ist erwähnenswert, dass Bland-Altman-Plots (Bland und Altman, 1986) eine gleichmäßige Verteilung der Residuen zeigten und dass die Korrelationskoeffizienten innerhalb der empfohlenen Grenzen lagen (Martin, 2000).

Bei der radioenzymatischen Methode entsteht D-[¹⁴C]-Glukose-1-Phosphat aus dem Umsatz von ¹⁴C-markierter UDP-Glukose und D-Galaktose-1-Phosphat nach

Zugabe von D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase. Diese Methode ist damit spezifisch für D-Galaktose-1-Phosphat. Bei der enzymatisch-fluorimetrischen Methode wie auch bei der GC-MS-Methode wird jedoch die Phosphatase-katalysierte Freisetzung von D-Galaktose aus D-Galaktose-1-Phosphat gemessen. Bei Verwendung der alkalischen Phosphatase sind jedoch Störungen durch D-Galaktose-6-Phosphat nicht a priori auszuschließen, weil dieser Metabolit ein Substrat der Phosphatase ist. Ein Vergleich der Daten der radioenzymatischen Methoden mit den alkalischen Phosphatase-Behandlungsmethoden ergab aber keinen Hinweis auf eine Überbestimmung. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass bei der Bestimmung von D-Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten die Interferenzen durch D-Galaktose-6-Phosphat, wenn überhaupt, vernachlässigbar gering sind. Die Bildung von relevanten Mengen an D-Galaktose-6-Phosphat ist kaum zu erwarten, da D-Galaktose bekanntermaßen ein sehr schlechtes Substrat für Säugetiere-Hexokinase ist (Fornaini et al., 1982).

Zur Bestimmung von D-Galaktose-1-Phosphat standen bisher die radioenzymatische, enzymatisch-fluorimetrische und eine GC/MS-Methode zur Verfügung (Shin, 1991; Dahlqvist, 1983; Chen et al., 2002a). Diese Methoden hatten eine untere Nachweisgrenze von $> 2 \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$. Mit diesen Methoden kann daher keine zuverlässige Bestimmung der niedrigen Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat in Erythrozyten bei den gesunden Erwachsenen durchgeführt werden (Chen et al., 2002a). Kürzlich wurde eine Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie-Methode zur direkten Bestimmung von Glykosyl-Phosphat-Derivaten (Wolucka et al., 1998) vorgestellt und auch beim Neonatalscreening auf Galaktosämie verwendet (Jensen et al., 2001). Diese Methode ist aber nicht spezifisch, da die Summen aller Hexosemonophosphate gemessen werden. Außerdem liegt die untere Nachweisgrenze dieser Methode bei $100 \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$ und ist daher für die meisten Untersuchungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ebenfalls nicht geeignet.

Die hier vorgestellte stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode ist um mehr als 1 Größenordnung empfindlicher als alle bisher publizierten Analyseverfahren. Mit der Methode kann eine untere Nachweisgrenze unter $0.1 \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$ erreicht

werden. Wegen der hohen Sensitivität konnte mit dieser Methode erstmals gezeigt werden, dass D-Galaktose-1-Phosphat sowohl in Erythrozyten gesunder Probanden als auch obligat heterozygoter Eltern immer enthalten ist. Allerdings ist diese Konzentration ca. 80-fach niedriger als die bei diätetisch behandelten Galaktosämie-Patienten.

Gegenüber allen bisher etablierten Methoden hat die neue Methode den Vorteil, dass neben freier D-Galaktose auch D-Galaktitol in Erythrozyten zuverlässig erfasst werden kann. Bemerkenswert ist, dass die Konzentration dieser beiden Metabolite bei den Patienten deutlich geringer erhöht war als die des D-Galaktose-1-Phosphats.

D-Galaktose-1-Phosphat wird zur Zeit hauptsächlich zur Kontrolle der Stoffwechseleinstellung bei Patienten mit Galaktosämie gemessen. Zu diesem Zweck ist die neue Methode mit den etablierten Methoden vergleichbar gut geeignet. Vorteilhaft für Routine-Messungen ist, dass die neue Methode relativ preiswert ist und die Verwendung von Radiochemikalien vermieden wird. Für die Bestimmung von D-Galaktose-1-Phosphat bei Patienten mit Galaktosämie ist von praktischem Interesse, dass die Konzentration der freien D-Galaktose in Erythrozyten sehr niedrig ist (< 3% der Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat). Für die Stoffwechselüberwachung kann daher auf die Bestimmung der freien D-Galaktose verzichtet werden, ohne dass dies zu einer relevanten Überbestimmung des D-Galaktose-1-Phosphats führen würde.

Kapitel 4

Galaktonat und Galaktitol im Urin

Zusammenfassung. Für die sensitive Bestimmung der Konzentration von D-Galaktonsäure im Humanurin wurde eine stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode etabliert. Zur internen Standardisierung wurde D-[U-¹³C₆]Galaktono-1,4-Lakton synthetisiert. Zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse wurde das N-(1-Butyl)Galaktonamid-Pentaacetat-Derivat dargestellt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels positiver chemischer Ionisation und Bestimmung der Intensitäten der [MH-60]⁺-Ionen bei m/z 402 und m/z 408. Diese Methode wurde angewendet, um die Variabilität der D-Galaktonat-Ausscheidung bei gesunden Probanden und Galaktosämie-Patienten zu untersuchen und um die Relation von D-Galaktonat zu D-Galaktitol im Humanurin zu bestimmen.

4.1 Einleitung

Beim Menschen wird D-Galaktose mit Hilfe der Enzyme D-Galaktokinase (EC 2.7.1.6), D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (EC 2.7.7.12) und UDP-Galaktose-4-Epimerase (EC 5.1.3.2) abgebaut und in den Glukose-Stoffwechsel eingeschleust. Bei klassischer Galaktosämie ist aufgrund eines erblichen Mangels an D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (OMIM 230400) der Abbau von D-Galaktose gestört. Prinzipiell könnten die Bildung und Ausscheidung von D-Galaktitol und D-Galaktensäure mögliche alternative Eliminationswege für D-Galaktose beim Menschen darstellen (Übersicht bei Holton et al., 2001).

Vor etwa 30 Jahren konnten Bergren und Kollegen (1972) in humanen Urinproben erstmals D-Galaktonat nachweisen, nachdem sie Galaktosämie-Patienten große Menge an D-Galaktose oral verabreicht hatten. Seither haben sich weniger Studien mit diesem alternativen D-Galaktose-Stoffwechselweg befasst (Wehrli et al., 1997; Berry et al., 1998). Bis heute ist unklar, ob die einmal gebildete D-Galaktensäure vor allem über die Nieren ausgeschieden wird, oder aber über den Xylulose-Stoffwechselweg weiter abgebaut wird (Cuatrecasas & Segal, 1966; Bergren et al., 1972). Zu quantitativen Aspekten der D-Galaktonat-Ausscheidung beim Menschen ist bisher nichts bekannt (Holten et al., 2001).

Zur Bestimmung von D-Galaktensäure wird häufig das Trimethylsilyl-Derivat verwendet und mittels Gaschromatographie oder Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert (Sweeley et al., 1963; Bergren et al., 1972; Peterson, 1974; Szafranek et al., 1974; Rogers et al., 1984; Wada & Tsumita, 1984; Xu et al., 2001; Chen et al., 2002b). Für die Bestimmung kann auch Pentaacetyl-Aldonmethylester (Hochstein et al., 1976) oder das Butylboroacetat-Derivat (Rogers et al., 1984) verwendet werden. Lehrfeld (1985a; 1985b) hat eine Methode zur spezifischen Synthese des N-Alkylamid-Peracetat-Derivates aus Aldonsäure beschrieben. D-Galaktensäure kann auch mittels Ionenaustausch-Chromatographie (Blake et al., 1984), Ionenausschluss-Chromatographie (Hicks et al., 1985; Fischer et al., 1995), HPLC (Rakotomanaga et al., 1991) und Kapillar-Elektrophorese (Bergholdt et al., 1993; Ye & Baldwin 1994; Schmitt-Kopplin et al.,

1998) bestimmt werden. Vor kurzem wurde auch eine ^1H - und ^{13}C -NMR-Methode zur Analyse von D-Galaktonsäure publiziert (Wehrli et al., 1997; Berry et al., 1998).

Keine dieser Methoden ist jedoch sensitiv genug, um eine zuverlässige Bestimmung der Konzentration von D-Galaktonat in Körperflüssigkeiten von gesunden Probanden oder behandelten Galaktosämie-Patienten zu ermöglichen. Bei einigen Methoden kann zudem das D-Galaktonsäure-Derivat nicht vom D-Glukonsäure-Derivat abgetrennt werden (Bergren et al., 1972; Blake et al., 1984; Rogers et al., 1984). Bei allen anderen Methoden - ausgenommen ist nur die von Lehrfeld etablierte Methode - stört die reversible Umwandlung der D-Galaktonsäure in ihr Lakton. Das Verhältnis von Lakton zur freien Aldonsäure ist sehr variabel und stark von pH, Temperatur und Lösungsmittel abhängig. Daher besteht die Gefahr einer Unterbestimmung, wenn das analytische Verfahren nur eine der Spezies erfasst (Szafranek et al., 1974; Lehrfeld 1985a; Lehrfeld 1985b).

Im folgenden wird eine sensitive und zuverlässige stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode zur gaschromatographie-massenspektrometrischen Analyse der totalen D-Galaktonsäure-Konzentration im Humanurin beschrieben. Hierbei wurde die von Lehrfeld (1985a) etablierte Methode modifiziert. Zur internen Standardisierung wurde selbst hergestelltes D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktono-1,4-Lakton verwendet. Zur Quantifizierung wurde im „selected-ion-monitoring“ (SIM)-Modus die Intensität der $[\text{MH}-60]^+$ -Ionen des natürlich markierten und des [U- $^{13}\text{C}_6$]-markierten N[1-Butyl]Galaktonamid-Pentaacetat-Derivats bestimmt.

4.2 Material und Methoden

Probanden und Patienten

Zur Bestimmung der Relation von D-Galaktose-Metaboliten im humanen Urin wurden Spontan-Urinproben zwischen 7 Uhr und 9 Uhr bei Patienten mit D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel (11 weiblich, 10 männlich; Alter 16 ± 10 Jahre (Mittelwert \pm SD) (Bereich 4-39), Gewicht 40 ± 21 kg (Bereich 13-77), Größe 147 ± 28 cm (Bereich 98-189)), deren obligat heterozygoten Eltern (12

Frauen, 12 Männer; Alter 42 ± 8 Jahre, Gewicht 74 ± 17 kg, Größe 172 ± 10 cm) und gesunden Erwachsenen (11 Frauen, 9 Männer; Alter 29 ± 8 Jahre, Gewicht 67 ± 15 kg, Größe 174 ± 9 cm), nach Übernachtsfasten von ≥ 10 Stunden gesammelt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien und Enzyme bereits im Kap. 2.2 spezifiziert. Die Präparation von D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktitol wurde im Kap. 3.3 beschrieben.

Da es im Handel nicht erhältlich ist, wurde D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktono-1,4-Lakton nach Dahlqvist (1983) hergestellt. D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktose (10 mg) wurde in Tris/HCl-Puffer (1.8 ml, $0.25 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$, pH 8.7) gelöst. Dann wurde NAD^+ (70 mg) und β -D-Galaktose-Dehydrogenase (1.5 U, 60 μL) zugegeben und bei 25 °C 10 h inkubiert. Zur Bildung des δ -Laktons wurde der Ansatz mit HCl ($6 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$, 0.15 mL) angesäuert, bei 25 °C über Nacht inkubiert und anschließend das D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktono-1,4-Lakton durch Ionenaustausch-Chromatographie, wie weiter unten für die Urin-Analyse beschrieben, gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung des δ -Laktons wurde mittels inverser Isotopen-Verdünnung mit natürlich markiertem D-Galaktono-1,4-Lakton bestimmt. Die Ausbeute an U- $^{13}\text{C}_6$ -markierten δ -Laktons war 45%. Bei der Reinheitsprüfung mittels GC-MS wurde eine [U- $^{13}\text{C}_6$]-Anreicherung von 98.5% und weniger als 0.2% D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktose gefunden.

Galaktonat und Galaktitol im Urin

Zur internen Standardisierung wurden Urinproben (1:5 verdünnt; 100 μL) der Patienten sowie Urinproben (100 μL) der heterozygoten Eltern und gesunden Probanden mit D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktitol-Lösung ($50 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$; 100 μL) und D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Galaktono-1,4-Lakton-Lösung ($250 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$; 20 μL) versetzt. Zur Bildung von D-Galaktono-1,4-Lakton wurde mit HCl ($6 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$, 30 μL) angesäuert, die Ansätze bei 25 °C über Nacht inkubiert, und dann mit H_2O verdünnt (Gesamtvolumen add. 2000 μL). Die Proben wurden schließlich durch Dowex 1X8- und Dowex 50WX8-Ionenaustausch-Chromatographie wie im Kap. 2.2

beschrieben gereinigt. Anschließend wurde ein Aliquot von 1 mL im Reaktivial bei Raumtemperatur im N₂-Strom zur Trockene eingedampft.

Die Darstellung der D-Galaktitol-Hexaacetate und N-(Butyl)Galaktonamid-Pentaacetate erfolgte im Wesentlichen nach Lehrfeld (1985a): Der trockene Rückstand wurde mit Butylamin-Pyridin (1:1 (v/v), 100 µL) 30 min bei 60 °C inkubiert. Die Proben wurden bei Raumtemperatur im N₂-Strom zur Trockene eingedampft. Danach wurde Acetanhydrid-Pyridin (1:1 (v/v), 100 µL) zugesetzt und der Ansatz 60 min bei 90 °C inkubiert. Die Proben wurden erneut eingedampft (s.o.). Der Rückstand wurde mit Hexan (200 µL) extrahiert, der Extrakt wie oben eingedampft, der Rückstand in 50 µL Ethylacetat gelöst und zur GC-MS-Analyse verwendet.

Die GC-MS-Analyse erfolgte wie im Kap. 2.2 beschrieben. Mit folgenden Modifikationen: Injiziert wurde 1 bis 2 µl Probe bei einer Anfangs-Säulentemperatur von 125 °C. Nach 1.5 min wurde die Temperatur mit 20 °C × min⁻¹ auf 190 °C, und weiter mit 5 °C × min⁻¹ auf 260 °C gebracht und dann noch für 2 min auf 280 °C erhöht. Bei positiver chemischen Ionisation mit Methan als Reaktandgas wurde im „selected-ion-monitoring“ (SIM)-Modus gearbeitet und die Intensität der [MH-60]⁺-Ionen im gaschromatographischen D-Galaktitol-Peak bei m/z 375 und m/z 381, sowie im D-Galaktonat-Peak bei m/z 402 und m/z 408 gemessen, um die jeweiligen D-Galaktose-Spezies, nämlich 1-¹²C- sowie U-¹³C₆-markiertes D-Galaktitol und 1-¹²C- und U-¹³C₆-markiertes D-Galaktonat, zu erfassen.

Die Konzentration von D-Galaktitol und D-Galaktonat (in µmol × L⁻¹) wurde im Urin aus den Ionenintensitätsverhältnissen $R_{\text{nat}} = (m/z\ 375)/(m/z\ 381)$ und $R_{\text{nat}} = (m/z\ 402)/(m/z\ 408)$ wie im Kap. 2.2 (Gleichung 1; für D-Galaktitol, $F_C = 1.071$; für D-Galaktonat, $F_C = 1.073$) beschrieben berechnet. In der Formel wurde V_{Plasma} durch V_U ersetzt. V_U ist das Probevolumen des Urins (in mL).

Sonstige Analysen

Die Aktivitätsbestimmung der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase in den Erythrozyten erfolgte wie im Kap. 6.1 beschrieben. Zur Konzentrationsbestimmung des D-Galaktose-1-Phosphats in den Erythrozyten wurde das im Kap. 3 beschriebene Verfahren angewendet. Die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration im Urin wurde enzymatisch durchgeführt (s. Kap. 6.3).

Statistik

Im Allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm SD (Anzahl der unabhängigen Bestimmungen in Klammern) angegeben. Die Präzision der D-Galaktitol-Konzentrationsbestimmung wurde in einer Urinprobe eines gesunden Probanden (D-Galaktitol: ca. $30 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) sowie in einer Urinprobe eines Patienten mit Galaktosämie (D-Galaktitol: ca. $1360 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) untersucht. Bei Bestimmungen in der Serie ($n=8$) und von Tag zu Tag ($n=10$) lagen die VK's bei der niedrigen Konzentration bei 6.1 und 7.3%, bei der hohen Konzentration dagegen bei 2.1 und 2.4%. Die Linearität der Bestimmung wurde mit D-Galaktitol dotierter Urinprobe eines gesunden Probanden geprüft. Dabei wurde sowohl im niedrigen Konzentrationsbereich ($0 - 200 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$; Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 1.02 (\pm 0.01)x + 8.3 (\pm 1.4)$, $sy/x = 2.3$, $R > 0.999$) als auch im hohen Konzentrationsbereich ($0-4.0 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$; Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 0.97 (\pm 0.01)x + 0.02 (\pm 0.02)$, $sy/x = 0.03$, $R > 0.999$) eine ausgezeichnete lineare Korrelation des zugesetzten (x) zum gemessenen (y) D-Galaktitol erhalten. Bei der Bestimmung der auf Kreatinin bezogenen D-Galaktitol-Konzentration lagen die totalen analytischen Variationskoeffizienten ($VK_{\text{total}} = \sqrt{VK_{\text{galol}}^2 + VK_{\text{krea}}^2}$) in Proben der gesunden Probanden bei 7.5% und in Patienten-Proben bei 3.1% (Schadewaldt et al., 2003). Korrelationen wurden mit linearer Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Fehlerquadrate, RGP-Funktion von Microsoft-Excel) überprüft. Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen Stichproben wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet.

4.3 Ergebnisse

CI- Fragmentationsmuster

Das mittels positiver chemischer Ionisation erhaltene Massenspektrum des N-(1-Butyl)-Galaktonamid-Pentaacetates ist in Abbildung 1 dargestellt.

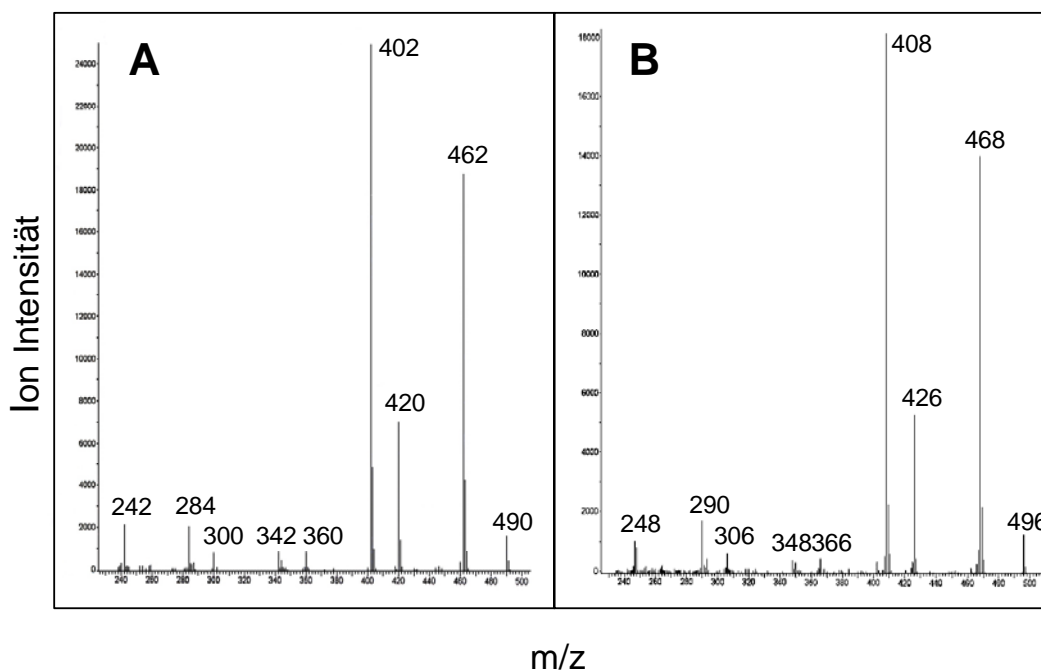


Abb.1: Fragmentationsmuster der N-(Butyl)-Pentaacetat-Derivate der unmarkierten (A) und [U-¹³C₆]-markierten (B) D-Galaktonsäure. Zur Detektion wurde mit Methan als Reaktandgas positiv chemisch ionisiert. Bei der nicht markierten Spezies war die Ionenintensität auf das Molekül-Ion [MH]⁺-bei m/z 462 und [MH-60]⁺-Ion bei m/z 402 am stärksten konzentriert gewesen. Bei der [U-¹³C₆]-markierten Spezies war diese entsprechend bei m/z 468 und m/z 408.

Charakterisierte Ionen traten an folgenden m/z Werten auf: 490, 462, 420, 402, 360, 342, 300, 284, 242. Bei dem Ion bei m/z 462 handelt es sich um das Pseudo-Molekularion [MH]⁺. Von diesem kann mehrfach Essigsäure (C₂H₄O₂, -60 U) abgespalten werden. Dadurch entstehen die Ionen bei m/z 402 und m/z 342. Die Fragmente bei m/z 420, 360, 300 sind höchst wahrscheinlich durch die - zusätzliche - Abspaltung von Keten (CH₂CO, -42 U) der bereits genannten Fragmente entstanden. Entsprechend wurde das Ion bei m/z 242 wahrscheinlich durch Keten-Abspaltung aus dem Fragment bei m/z 284 gebildet. Die Bildung des letzteren Fragments ist nicht eindeutig zu erklären. Möglicherweise entsteht es

aus dem $[MH-120]^+$ Ion (m/z 342) durch aufeinander Spaltung von CH_2O und CO (-58 U). Die Ionen bei m/z 490 sind höchst wahrscheinlich auf die Addition von Ethylen (C_2H_4 , +28 U) an das Pseudo-Molekularion zurückzuführen. Alle Fragmente enthalten das C_6 -Skelett der D-Galaktensäure. Dies zeigt die massenspektrometrische Analyse der $U-^{13}C_6$ -markierten D-Galaktensäure, da dort das gleiche Fragmentierungsmuster mit den um 6 U höheren m/z auftrat (Abb. 1B).

Etwa 80% der Ionenintensität des Spektrums waren auf die $[MH]^+$ - und $[MH-60]^+$ -Ionen konzentriert. Bei natürlich markiertem D-Galaktinat lagen diese bei m/z 462 und m/z 402, bei $D-[U^{13}C_6]$ Galaktinat bei m/z 468 m/z 408. Das Verhältnis $[MH]^+ / [MH-60]^+$ war bei 0.7. Das Massenspektrum konnte nicht auf eines dieser Ionen konzentriert werden. Es gelang nicht, die Ionenkonzentration durch Änderung der Analysenbedingungen auf eine der Hauptmassen zu konzentrieren.

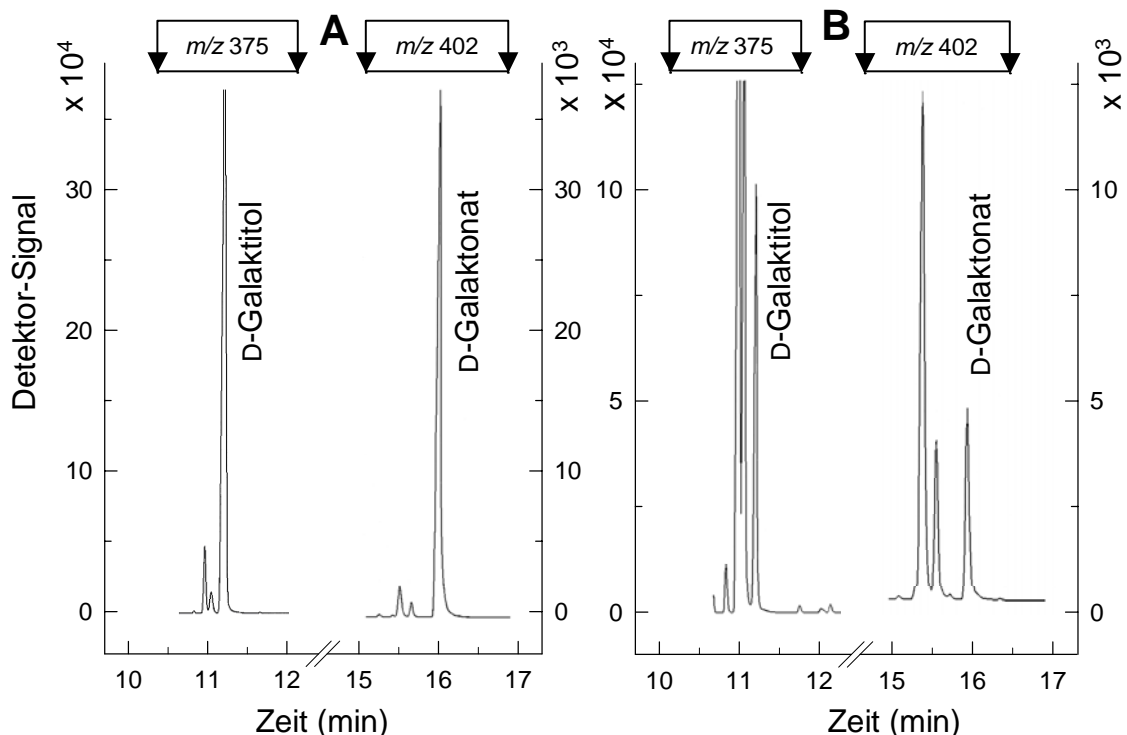


Abb. 2: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von D-Galaktinat und D-Galaktitol im Urin eines (A) Patienten mit Galaktosämie (GALT-Mangel) und eines (B) gesunden Probanden. Proben wurden nach Übernachtsfasten gesammelt und, wie im Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet. Die massenspektrometrische Analyse des N-(Butyl)Galaktinamid-Pentaactats und D-Galaktitol-Hexaacetats erfolgte mittels pCI und Detektion der $[MH-60]^+$ -Ionenintensitäten im SIM-Modus.

Daher wurde für die Quantifizierung im selected-Ion-Monitoring-Modus die Intensität der $[MH-60]^+$ -Ionen bei m/z 402 und m/z 408 gemessen. In Abbildung 2 sind beispielhafte Ionenchromatogramme dargestellt, die bei der Bestimmung von D-Galaktose-Metaboliten im Urin eines Galaktosämie-Patienten und eines gesunden Probanden erhalten wurden. Hierbei ist anzumerken, dass die Quantifizierung von D-Galaktonsäure nicht durch vorhandene D-Glukonsäure in den Proben gestört wurde, da das D-Glukonamid-Derivat etwa 0.5 min vor dem D-Galaktosamid-Derivat gut abgetrennt eluiert wurde.

Vollständigkeit

In Körperflüssigkeiten können neben D-Galaktono-1,4-Lakton auch variable Mengen D-Galaktonsäure vorhanden sein. Um die Vollständigkeit der Bildung des δ -Lakton unter den in dieser Arbeit gewählten Analysenbedingungen zu prüfen, wurden Urinproben mit Ca-D-Galaktonat und D-Galaktono-1,4-Lakton in variablen Verhältnissen dotiert, wie im Methoden-Teil beschrieben, ausgearbeitet und analysiert. Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Ausbeute des δ -Laktons unabhängig vom ursprünglichen D-Galaktonat / D-Galaktono-1,4-Lakton Verhältnis war und dass die Bildung des δ -Laktons aus D-Galaktonsäure vollständig ablief.

Tabelle 1

Bestimmung der totalen Konzentration von D-Galaktonat in humanen Urin mittels GC-MS-Analyse der N-[1-Butyl]Galaktosamid-Pentaacetat-Derivate

Zugabe von D-Galaktonat-Spezies ^a		totale Konzentration ^b
D-Galaktonat (Ca-Salz)	D-Galaktono-1,4-Lakton $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$	D-Galaktonat
100	0	98 ± 2
80	20	99 ± 2
60	40	99 ± 2
40	60	99 ± 2
20	80	101 ± 2
0	100	98 ± 2

^a Urinproben eines postabsorptiven gesunden Probanden wurden mit natürlich markierten Spezies versetzt, um die angegebenen nominalen Konzentrationen zu erreichen. ^b Mittelwert \pm SD; Ergebnisse aus vier Bestimmungen.

Linearität und Präzision

Zur Linearitätsprüfung wurden Aliquots der Urinprobe eines Galaktosämie-Patienten bzw. eines gesunden Probanden mit natürlich markierter D-Galaktonat-Lösung im Konzentrationsbereich von 0.1 bis 2 mmol \times L⁻¹ (typisch für klassische Galaktosämie) bzw. im Konzentrationsbereich von 0.01 bis 0.2 mmol \times L⁻¹ (vermuteter Konzentrationsbereich für gesunde Probanden) angereichert. Die Ergebnisse in Abbildung 3 zeigen, dass in beiden Fällen eine ausgezeichnete lineare Korrelation des zugesetzten zum gemessenen D-Galaktonat erreicht wurde. Die untere Nachweisgrenze (d.h. Signal-Rausch-Verhältnis im D-Galaktonat-Peak von 3:1, vgl. Abb. 2) wurde an 10 Probanden untersucht und lag bei $1.0 \pm 0.4 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$.

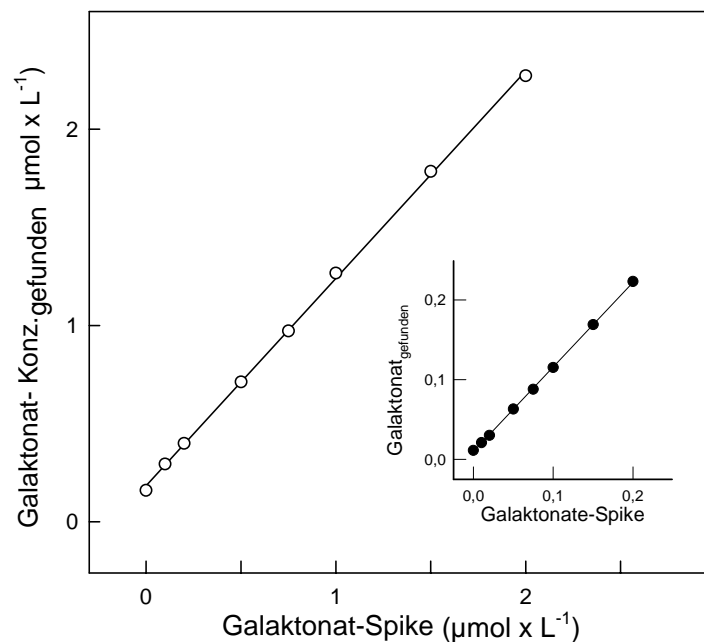


Abb. 3: Linearität der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode zur Bestimmung der Konzentration von D-Galaktonat in humanen Urinproben. A) Urinproben eines Patienten mit klassischer Galaktosämie wurden mit steigenden Konzentrationen von natürlich markiertem D-Galaktonat versetzt und, wie im Methoden-Teil beschrieben, aufgearbeitet und analysiert (Gleichungen der Regressionsgeraden (lineare Regression): $y = 1.06(\pm 0.01)x + 0.18(\pm 0.01)$; $S_{y/x} = 0.03$, $r > 0.998$; der Y-Achsenabschnitt entspricht der ursprünglichen D-Galaktonat-Konzentration in der Probe).

B) Zu Urinproben eines gesunden Probanden wurden in den angegebenen Konzentrationsverhältnissen natürlich markiertes D-Galaktonat zugegeben und analysiert (Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 1.06(\pm 0.01)x + 0.010(\pm 0.001)$; $S_{y/x} = 0.001$, $r > 0.999$; der Y-Achsenabschnitt entspricht der ursprünglichen D-Galaktonat-Konzentration in der Probe).

Die Präzision der Bestimmung wurde mit zwei unterschiedlichen Urinproben untersucht, von denen die eines gesunden erwachsenen Probanden eine niedrige Konzentration (ca. $40 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) und die eines Patienten mit Galaktosämie eine hohe Konzentration (ca. $161 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) an D-Galaktonat aufwies. Sowohl die Bestimmungen in der Serie als auch von Tag zu Tag (je $n=10$) wiesen bei der hohen Konzentration mit VK's von 1.5 und 8.4% eine sehr gute bis gute Präzision auf. Bei der niedrigen Konzentration lagen die VK's ähnlich bei 1.5 bzw. 7.1%.

Relation der Galaktose-Metabolite im Urin

Diese Methode wurde angewendet, um das Verhältnis der D-Galaktonat- zur D-Galaktitol-Ausscheidung bei Galaktosämie-Patienten, deren obligat heterozygoten Eltern und gesunden Erwachsenen zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Relation von D-Galaktonat zu D-Galaktitol im Urin postabsorptiver Probanden

Probanden ^a	D-Galaktonat ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}_{\text{Kreatinin}}$)	D-Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}_{\text{Kreatinin}}$)	Ratio ^e
Galaktosämie-Patienten (n = 21) ^b	42 ± 13 (39; 24 – 66)	185 ± 62 (157; 100 – 306)	0.23 ± 0.03 (0.22; 0.18 – 0.33)
heterozygote Eltern (n = 24) ^c	2.8 ± 2.1 (2.3; 0.4 – 8.6)	2.2 ± 0.7 (2.2; 1.3 – 3.8)	1.2 ± 0.7 (1.1; 0.2 – 2.5)
Gesunde Erwachsene (n = 20) ^d	2.5 ± 2.7 (1.7; 0.4 – 11.6)	1.6 ± 0.4 (1.7; 0.6 – 2.1)	1.3 ± 1.0 (1.1; 0.1 – 4.6)

^a Übernachtfasten, postabsorptive Periode ≥ 10 h; Mittelwert \pm SD; Median und Bereich sind in Klammern angegeben.

^b Galaktosämie-Patienten unter diätetischer Behandlung (D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration lag im Mittel bei $132 \pm 33 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}_{\text{RBC}}$); die GALT-Aktivität in den Erythrozyten betrug weniger als 1% der Norm.

^c GALT-Aktivität von 50 ± 5 % der Norm.

^d GALT-Aktivität lag bei $23 \pm 3 \mu\text{mol/h}$ pro g Hb.

^e D-Galaktonat-Konzentration / D-Galaktitol-Konzentration

Postabsorptive Patienten mit Galaktosämie schieden unterschiedliche und beträchtliche Mengen an D-Galaktonat ($79 - 949 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, entspricht $24 - 66 \mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Kreatinin}}^{-1}$) und D-Galaktitol ($238 - 4831 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, entspricht $100 - 306$

$\mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Kreatinin}}^{-1}$) aus. Das Verhältnis D-Galaktonat zu D-Galaktitol lag recht konstant bei 4:1.

Ergänzend wurde bei einem Galaktosämie-Patienten über 4.5 Wochen die intraindividuelle Variabilität der Metabolit-Ausscheidung im postabsorptiven Zustand untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

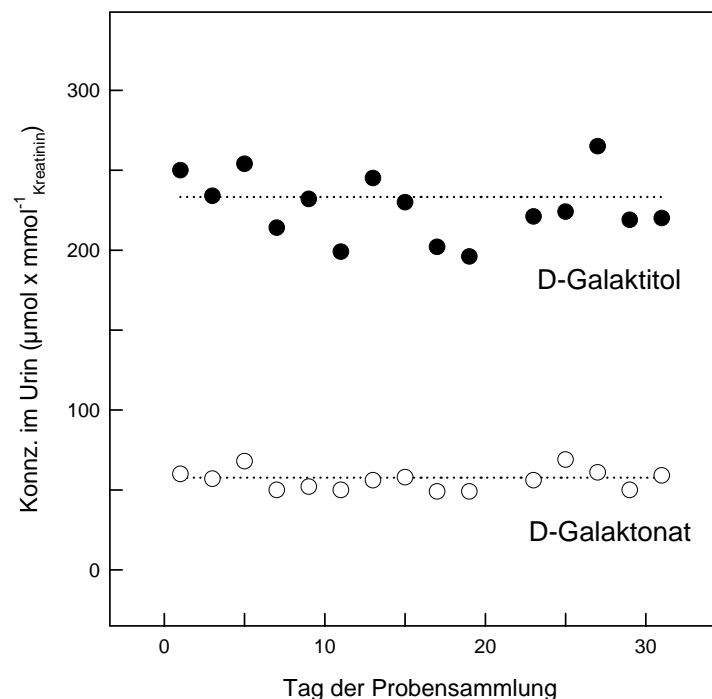


Abb. 4: Die intraindividuelle Variabilität der Ausscheidung von D-Galaktonat und D-Galaktitol bei einem Patienten mit klassischer Galaktosämie. Urinproben wurden bei einem Patienten mit D-Galaktose-1-Phosphat-Mangel über einen Zeitraum von vier Wochen gesammelt. Die Konzentration von D-Galaktonat und D-Galaktitol wurde mittels der stabil-Isotopen-Verdünnungsmethode bestimmt und auf Kreatinin bezogen. Mittelwerte sind als unterbrochene Linien eingezeichnet.

Berücksichtigt man die analytische Impräzision der Bestimmungsmethoden, so lagen die intraindividuellen VK's für die D-Galaktonat- und D-Galaktitol-Ausscheidung unter 10%. Diese Ergebnisse konnten später bei weiteren fünf Patienten bestätigt werden (Ergebnisse sind nicht dargestellt).

Bei obligat heterozygoten Eltern wurde im Urin eine wesentlich niedrigere Ausscheidung von D-Galaktonat ($6 - 99 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, entspricht $0.4 - 8.6 \mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Kreatinin}}^{-1}$) und von D-Galaktitol ($17 - 94 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, entspricht $1.3 - 3.8 \mu\text{mol} \times$

mmol_{Kreatinin}⁻¹) gefunden. Verglichen mit der mittleren Ausscheidung der Patienten betrug die mittlere Ausscheidung von D-Galaktonat und D-Galaktitol bei heterozygoten Eltern ca. 6% bzw. 1%. Das Verhältnis D-Galaktonat zu D-Galaktitol war sehr variabel und lag im Mittel bei 1.2 ± 0.7 . Damit übereinstimmende Ergebnisse wurden auch für gesunde Erwachsene erhalten (Tabelle 2).

4.4 Diskussion

Eine neue GC-MS-Methode wurde zur sensitiven und zuverlässigen Bestimmung von D-Galaktonat im Humanurin etabliert. Mit dieser Methode kann gleichzeitig die Konzentration des D-Galaktitols im Urin bestimmt werden. Im Gegensatz zur D-Galaktose-Ausscheidung, die vernachlässigbar gering ist, kann die Bildung und Ausscheidung von D-Galaktonat und D-Galaktitol alternativ zur Elimination von D-Galaktose beitragen (Holton et al., 2001). Dies könnte vor allem bei verschiedenen Formen der Galaktosämie eine Rolle spielen, bei denen aufgrund eines angeborenen Enzymmangels der Abbau von D-Galaktose über den normalen Leloir-Stoffwechselweg gestört ist (Wehrli et al., 1997; Schadewaldt et al., 2003).

Das Prinzip der stabil-Isotopen-Verdünnungsanalyse für D-Galaktitol wurde von Jakobs et al. (1985) bereits vor einiger Zeit ausgearbeitet. Das Verfahren ist in unserer Arbeitsgruppe in einer früheren Studie extensiv verwendet worden (Schadewaldt et al., 2003). Hinsichtlich einer Diskussion der D-Galaktitol-Analyse mittels GC-MS wird daher auf diese früheren Arbeiten verwiesen. Der Focus der folgenden Ausführungen liegt auf der Diskussion der D-Galaktonat-Analyse.

Bei der neuen GC-MS-Methode wurde zur internen Standardisierung U-¹³C₆-markiertes D-Galaktono-1,4-Lakton verwendet, um eine gegenseitige Beeinflussung der Isotopen-Cluster der natürlich markierten und U¹³C₆-markierten D-Galaktono-1,4-Lakton auszuschließen. Da zudem alle Haupt-Fragmente im CI-Massenspektrum alle Kohlenstoffatome des D-Galaktonats enthielten, erscheint diese Methode auch besonders für Markierungsstudien geeignet, bei denen

spezifisch markierte Precursoren, wie z.B. D-[1-¹³C]Galaktose bei *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen, eingesetzt werden.

Für die GC-MS-Analyse wurde das N-(1-Alkyl)Aldonamid-Pentaacetat-Derivat des D-Galaktonats ausgewählt. Dieses Derivat hat gegenüber dem häufig verwendeten N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid-Derivat viele Vorteile: Das D-Galaktonamid-Derivat ist vergleichbar stabil und lässt sich gut vom D-Glukonamid-Derivat abtrennen. Bei der positiven chemischen Ionisation waren die Ionen höherer Molekular-Spezies auf das [MH]⁺- und das [MH-60]⁺-Ion konzentriert. Damit war eine sensitive und eine hoch selektive Detektion im „selected ion monitoring (SIM)“-Modus möglich. Das Verfahren ist quantitativ, da ausschließlich D-Galaktono-1,4-Lakton bestimmt wurde, unabhängig von der Relation der freien Säure und des Laktons in der ursprünglichen Probe. Diese ist insofern wichtig, da das Verhältnis von D-Galaktonsäure zu D-Galaktono-1,4-Lakton in verschiedenen physiologischen Proben unterschiedlich sein kann. Außerdem kann sich dieses Verhältnis auch schnell bei der Aufarbeitung der Proben ändern, da die Lakton-Bildung stark mit pH- und Temperatur-Änderungen variiert (Lehrfeld 1985a; Lehrfeld 1985b).

Das hier vorgestellte Analysenverfahren ist mindestens eine Größenordnung empfindlicher als alle bisher publizierten Methoden. Daher konnte nun erstmals das D-Galaktonat in Urinproben von gesunden Probanden nachgewiesen und quantitativ erfasst werden. Bei allen anderen Arbeiten, unabhängig von den angewendeten Methoden, konnte D-Galaktonat im Urin bei gesunden Probanden erst nach Gabe von großen Mengen D-Galaktose (50 – 60 g; p.O.) nachgewiesen werden (Bergren et al., 1972; Wehrli et al., 1997). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass D-Galaktonat-Bildung und -Ausscheidung, wenn auch in geringen Maßen, mit an der D-Galaktose-Elimination beteiligt ist.

Auch bei Patienten mit Galaktosämie wurden bisher die quantitativen Aspekte und die Bedeutung der D-Galaktonat-Bildung nicht untersucht. Einige wenige fragmentarische Daten wurden zur Urin-Konzentration von Bergen et al. (1972) mit einer GC-MS-Methode erhoben, und eine etwas ausführlichere Studie von Wehrli

et al. (1997), verwendete ^1H - und ^{13}C -NMR-Methode. Wehrli et al. (1997) fanden D-Galaktonat-Konzentrationen im Urin von 20 - 100 $\mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Kreatinin}}$ und ein D-Galaktitol / D-Galaktonat Verhältnis von 3:1. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen aus dem hier untersuchten Patientenkollektiv recht gut überein. Daten zur intraindividuellen Variabilität der Ausscheidung von D-Galaktose-Metaboliten sind bisher in der Literatur nicht beschrieben und wurden in dieser Arbeit erstmals erhoben.

Abschließend ist festzuhalten, dass mit der hier vorgestellten GC-MS-Methode eine hochsensitive und zuverlässige Messung der Konzentration und ^{13}C -Anreicherung des D-Galaktonats in humanen Urinproben durchgeführt werden kann. Dies ermöglicht weiterführende Untersuchungen der Physiologie und Pathophysiologie des humanen D-Galaktonat-Stoffwechsels, z.B. in *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter D-Galaktose (vgl. Kap. 7).

Kapitel 5

Methoden zur genotypischen Charakterisierung

Zusammenfassung: Die genotypische Charakterisierung der Patienten mit GALT-Mangel erfolgte als Mutationsscreening auf die Q188R- und N314-Mutation mittels PCR/RFLP-Methodik, die Mutationsanalytik erfolgte über direkte Sequenzierung aller Exone des GALT- und GALK-Gens mittels etablierter Methoden.

5.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Applichem (Darmstadt), Merck Biosciences (Schwalbach am Taunus), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung (37.5:1, v/v) wurde von Mobitec (Göttingen), der dNTP-Mix (je $10 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) von Peqlab (Erlangen), Taq-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, rekombinant, E.Coli, $5 \text{ U}/\mu\text{L}$) von Qiagen (Hilden) bezogen. Ava II (aus *Anabeana variabilis*, $5 \text{ U}/\mu\text{L}$), Hpa II (aus *Haemophilus parainfluenzae*, $10 \text{ U}/\mu\text{L}$) und der DNA-Längenstandard VIII ($0.25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) wurden von Roche (Mannheim) bezogen. Alle synthetischen Oligonukleotide waren von MWG-Biotech (Ebersberg).

5.2 Mutationsdetektion bei Patienten mit klassischer Galaktosämie

Die Mutationen Q188R in Exon 6 und N314D in Exon 10 führen jeweils zu einer Schnittstelle für die Restriktionsenzyme Hpa II bzw. Ava II. Beide Mutationen können daher durch PCR-Amplifikation des Exon 6 bzw. Exon 10 und Analyse des RFLP nachgewiesen werden. Aufgrund der Häufigkeit der beiden Mutationen wurden alle Patienten zuerst auf diese zwei Mutationen mit der PCR/RFLP-Methode untersucht. Der Nachweis erfolgte über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Konnten die Mutationen mittels PCR/RFLP nicht nachgewiesen werden, so wurden alle Exone vervielfältigt und durch direkte Sequenzierung (Yang et al., 2001) die Mutationen charakterisiert.

DNA-Isolierung

Die Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut wurde mittels QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Zur DNA-Konzentration wurde A_{260} mit einem Spektralphotometer (Spectrometer DU 640 B,

Beckmann, München) bestimmt und die Konzentration wurde wie erfolgt berechnet: $c = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL}$.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Aus der genomischen DNA wurden die DNA-Fragmente mittels spezifischer Oligonukleotide vervielfältigt. In Tabelle 1 sind die für die PCR verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Ein Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 50 μL und enthielt folgende Komponenten:

- 120 ng genomische DNA
- 62.5 pmol von jedem Oligonukleotid
- 20 nmol von jedem dNTP
- 2.5 U Taq-DNA-Polymerase
- 1×PCR-Puffer (Tris/HCl 10 mmol \times L⁻¹ pH 8.8, KCl 50 mmol \times L⁻¹, MgCl₂ 1.5 mmol \times L⁻¹)

Tabelle 1: Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des GALT-Gens

Bereich	Frgment- Größe (Bp)	Sequenz (5'-3') Primer-Sense	Sequenz (5'-3') Primer-Antisense
Exon 1*	218	cggagaaagtgaaaggtgag	ggggacgaaagcttcta
Exon 2	245	agctctgaggactgatcttga	ccgtggcccagcctgcagatg
Exonbereich 2+3	536	agctctgaggactgatcttga	agcagcagttggagccaggtt
Exonbereich 3+4	256	gtacgatagcaccttctgtt	gctgagtctccaactctggtt
Exon 5	256	ttggggttgcacctgcccgtg	caaagcttcatcaccctctcc
Exon 6	183	aggaggagttgacttggtgt	ctgtcccatgtccacagtgc
Exon 7	269	tgggacagaggaaatatgcca	cctttacacacctctctcatg
Exon 8	249	ggctcctatgtcaccttgatg	caacctccatccagtgcttag
Exon 9	206	ggtcagcatctggaccccagg	aggttcagttcactaggctg
Exon 10	271	aggtgctaacctggataactg	cacatactgcatgagagagtg
Exon 11*	219	agtcctatgccaccattctt*	aggccctttctgcttaattc*

*Oligonukleotide wurden mittels <http://igh.gsf.de/cgi-bin/primer/ExonPrimer.pl> ausgewählt. Andere Oligonukleotide nach Elsas et al. (1995).

Die Ansätze wurden mit 50 µL Mineralöl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) überschichtet und in einem Personal Cycler 20 (Biometra, Göttingen) wie folgt inkubiert:

1 Zyklus:	95 °C	3 min	
30 Zyklen:	95 °C	1 min	(Denaturierung)
	57 °C	1 min	(Primer-Anlagerung)
	72 °C	1 min	(Primer-Verlängerung)
1 Zyklus:	72 °C	6 min	(Primer-Endverlängerung)
	4 °C	∞	(Aufbewahrung)

Nach Beendigung der Reaktion werden die PCR-Produkte entweder für RFLP-Analyse (Exon 6 und Exon 10) oder für die Sequenzierungsreaktion weiter verwendet (s.u.).

RFLP-Analyse

Mutationsscreening auf die Q188R- und N314D-Mutation erfolgte mittels RFLP (Elsas et al., 1995). Bei der Q188R-Mutation liegt eine Transition von Adenin zu Guanin in Position 563 der cDNA-Sequenz vor. Dadurch kommt es einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Hpa II. Die vervielfältigten DNA-Fragmente des Exons sechs mit den flankierenden Intronbereichen haben unter hier gewählten Bedingungen eine Länge von 183 bp. Das PCR-Produkt mit der Q188R-Mutation wird durch die Zugabe von Enzym Hpa II in zwei Fragmente von 68 und 115 bp geschnitten und kann mittels PAGE (s.u.) nachgewiesen werden.

Bei der Mutation N314D liegt in Position 940 der cDNA-Sequenz eine Transition von Adenin zu Guanin vor und führt zu einer neuen Schnittstelle für das Restriktionsenzym Ava II in Exon 10. Daneben existiert unabhängig von der N314D-Mutation noch eine weitere Schnittstelle für Ava II. Eine Inkubation der PCR-Produkte (Länge: 270 bp) mit der N314D-Mutation mit Ava II ergibt daher drei DNA-Fragmente von 68, 100 und 102 bp, die mittels PAGE (s.u.) nachgewiesen werden.

Die Restriktionshydrolyse-Ansätze (20 μ L) enthielten:

10 μ L PCR-Produkt

0.5 μ L Restriktionsenzym

2 μ L 10 \times Inkubationspuffer

(für Hpa II: Puffer L; für Ava II: Puffer A; wurden mit den Endonukleasen geliefert)

Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37 °C. Als Positivkontrolle für die Q188R-Mutation wurde das PCR-Produkt eines Q188R-homozygoten Patienten, als Negativkontrolle das PCR-Produkt eines gesunden Erwachsenen mitgeführt. Dann wurden 4 μ L Inkubat bzw. 2 μ L PCR-Produkt mit 2 μ L Auftragspuffer (s.u.) gemischt und elektrophoretisch (s.u.) aufgetrennt. Die Größenbestimmung erfolgte anhand des mitgeführten Längenstandards (4 μ L).

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über Polyacrylamidgele. Zum Gießen der Gele, wurde eine Lösung hergestellt, die in 100 mL die folgende Komponenten enthielt:

48 g Harnstoff

26.8 mL Acrylamid:Bisacrylamid

2 mL 10 \times Na-TAE-Puffer

(400 mmol \times L⁻¹ Tris/CH₂COOH, pH 8.6, 10 mmol \times L⁻¹ EDTA, 1 mol \times L⁻¹ Natriumacetat)

4 mL Glycerol (40%, v/v)

mit H₂O auf 100 mL aufgefüllt

Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt, und kurz vor dem Verbrauch bei 25 °C für 3 min mit Ultraschall behandelt. Danach wurden 4 mL dieser Lösung in einem Messzylinder vorgelegt und mit 20 μ L TEMED und 40 μ L Ammoniumpersulfat (10%, m/v) gemischt. Diese Lösung wurde auf eine Polybondfolie (9 cm \times 9 cm; Biometra, Göttingen) mit einer Pasteurpipette aus Glas (Brand, Werthheim), gegossen.

4 μ L PCR-Produkt wurden mit 2 μ L 1:10 verdünntem Auftragspuffer versetzt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. 10 mL Auftragspuffer-Lösung enthielten:

2 mL 10× Na-TAE (s.o.)
4.8 g Harnstoff
10 mg Xylencyanol
10 mg Bromphenolblau
1 mL Triton x-100
add. 10 mL mit H₂O

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden in der ersten Spur (Slot) 4 µL des Längenstandard-Lösung (bestehen aus 50 µL Längenstandard VIII, 20 µL Auftragspuffer, 30 µL H₂O) aufgetragen. Als Laufpuffer diente ein 0.2× Na-TAE-Lösung, die aus der 10× Na-TAE hergestellt wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei 300 V und 25 °C für 30 min (TGGE System und TGGE System Controlle, Firma Biometra, Göttingen).

Silberfärbung

Die Anfärbung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit einer Silberfärbung (Schumacher et al., 1983):

Das Polyacrylamidgel wurde zunächst in Fixierlösung (Ethanol, 10%, v/v; Essigsäure, 1%, v/v) 5 min inkubiert, danach in Silbernitrat-Lösung (AgNO₃, 0.19%, m/v) 10 min gefärbt und 3mal kurz mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde 10 min das Gel in Entwickler-Lösung [NaOH, 1.5%, m/v; NaBH₄ 0.08%; Formaldehyd (37%, v/v) 0.04%, v/v] gelegt und für weitere 5 min in Natriumcarbonat-Lösung (Na₂CO₃, 0.75%, m/v) neutralisiert. Zum Schluss wurde das Gel 5 min in H₂O gelegt. Alle Schritte, bis auf die kürzeren Waschvorgänge mit Wasser, wurden unter Schütteln (IKA) durchgeführt. Zur Dokumentation wurde das Gel luftgetrocknet und in Plastikfolie eingeschweißt.

DNA-Sequenzierung (Cycle-Sequencing-Reaction)

Für Sequenzierungsreaktion wurden die DNA-Fragmente aus den PCR-Reaktionen mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt und die Reinheit mittels PAGE charakterisiert.

Die zyklische Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequenzierung Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Für diese Reaktionen wurden die aufgereinigten PCR-Produkte und die in Tabelle 1 angegebenen Oligonukleotide eingesetzt. Es wurde je ein Ansatz für die Sequenzierung des Sense- und des Antisense-Stranges hergestellt. Ein Ansatz mit 20 µL enthielt 10 ng PCR-Produkt, 7.5 pmol Primer-Sense oder Primer-Antisense und 3 µL Big Dye-Mix. Anschließend wurden die Proben mit 20 µL Mineralöl (Sigma-Aldrich, München) überschichtet. Die Sequenzierungsreaktion wurde im Perconal Cyler 20 (Biometra, Göttingen) wie folgt durchgeführt:

1 Zyklus :	96 °C 1 min	(initiale Denaturierung)
25 Zyklen:	96 °C 10 sec	(Denaturierung)
	50 °C 5 sec	(Primer-Anlagerung)
	60 °C 4 min	(Primer-Verlängerung)
1 Zyklus :	4 °C ∞	(Aufbewahrung)

Nach Beendigung der Cycling Sequenzierung Reaktion wurden die Ansätze (ohne Mineralöl) mit dem Dye Ex™ 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. 10 µL des aufgereinigten Produktes wurden mit 10 µL Formamid gemischt und mittels des automatischen Sequenziergerätes ABI 310 (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert.

5.3 Mutationsdetektion bei Patienten mit Galaktokinase-Mangel

Zum Nachweis der Mutationen wurde aus EDTA-Blut die genomische DNA gewonnen (s. 5.2). Die Exone 1 bis 8 wurden mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente sequenziert.

Amplifikation von DNA-Fragmenten

Für die PCR der Exone wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Oligonukleotide verwendet (Kolosha et al., 2000). Die PCR-Ansätze (50 µL) wurden wie oben beschrieben angesetzt (s. 5.2). Der Ansatz enthielt, um die Amplifikationseffizienz

zu verbessern, zusätzlich 7.5 μL Glycerin. Die Proben wurden mit Mineralöl (50 μL) überschichtet und die PCR-Amplifikation mit dem bereits oben beschriebenen Programm inkubiert (s. 5.2). Die PCR-Produkte wurden mittels PAGE und Silberfärbung anhand des mitgeführten Längenstandards charakterisiert.

Tabelle 2: Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des GALK-Gens

Bereich	Frgment- Größe (Bp)	Sequenz (5'-3') Primer-Sence	Sequenz (5'-3') Primer-Antisence	Annealing- Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
Exon 1	360	ccgagcatcccgcgccgac	cagctgcccgccccacatct	60
Exon 2	370	gactgtggaggcatcagaacct	atcagacaaatgaatgggctctgt	60
Exon 3	300	gctgccctcccgccaggaca	acctcataaggcatagtagaa	55
Exon 4	340	agggggtggcagggaaatctc	aatgggggagatgacgaggccaa	55
Exon 5	400	cactcagcagctcctgggtgga	gactggggagagcatggcagaa	60
Exon 6	350	tcaccgtccagccaggccact	gcagctcacctcatagtctct	55
Exon 7	400	ctgagacgtggcgactacaga	cgccgtagtgtcctctaaga	55
Exon 8	375	tccgctgtctcccacgccatg	tagggtaggggagcggttctga	60

Oligonukleotide wurden nach Kolosha et al. (2000) ausgewählt.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Jedes PCR-Produkt wurde über ein PAGE wie im Kap. 5.2 beschrieben aufgetrennt. Dazu wurden 40 μL des PCR-Produktes mit 20 μL Auftragspuffer (1:10 verdünnt) gemischt auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel enthielt 8 Spuren, pro Spur wurden 6 μL des Gemisches aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde die erste Spur ausgeschnitten und, wie oben beschrieben, gefärbt. Anschließend wurden die nicht gefärbten Spuren mit der gefärbten Spur verglichen und die DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Polyacrylamidgel wurde sie zerkleinert und die Extraktion mit dem E.Z.N.A. Poly-Gel DNA Extraktion Kit (Peqlab, Erlangen) nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt (Extraktion 65 $^{\circ}\text{C}$ über Nacht). Die Konzentrationen der zurückgewonnenen DNA-Fragmente wurden im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (s.o.).

DNA-Sequenzierung

Die aufgereinigten PCR-Produkte und die Oligonukleotide aus der Tabelle 2 wurden für die zyklische Sequenzierungsreaktion verwendet. Ein Ansatz mit 20 µL enthielt 15 ng PCR-Produkt, 10 pmol Primer-Sense oder Primer-Antisense und 5 µL Big Dye-Mix. Danach wurden die Ansätze mit Mineralöl überschichtet und zur Amplifikation mit dem im Kap. 5.2 beschriebenen Programm inkubiert. Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben mit dem Dye Ex™ 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden) wie oben beschrieben gereinigt und mit Formamid (1:1 v/v) gemischt. Anschließend wurden die Proben mit dem automatischen Sequenziergerät ABI 310 analysiert.

Kapitel 6

Sonstige Methoden

Zusammenfassung: Im Folgenden werden in dieser Arbeit verwendete sonstige Methoden, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, aufgeführt.

6.1 Enzymaktivitätsbestimmung

Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Anionenaustauschharz wurde von Serva (Heidelberg) bezogen, D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (EC 2.7.7.12, aus Hefe), D-Galaktokinase (EC 2.7.1.6, aus Hefe), D-Galaktose-1-Phosphat (Dikaliumsalz) und UDP-Glukose (Dinatriumsalz) waren von Sigma-Aldrich (Taufkirchen). ATP (Dinatriumsalz) wurde von Roche (Mannheim) bezogen. D-[U-¹⁴C]Galaktose-1-Phosphat (12.2 Gbq × mmol⁻¹), D-[1-¹⁴C]Galaktose (2 Gbq × mmol⁻¹) wurden von Biotrend (Köln) bezogen.

Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase

Die GALT-Aktivität in Erythrozyten wurde nach Shin (1991) mit einigen Modifikationen bestimmt.

Das Prinzip des Nachweises ist die Bildung von UDP-[U-¹⁴C]Galaktose aus D-[U-¹⁴C]Galaktose-1-Phosphat nach folgender Reaktionsgleichung:



EDTA-Blutproben wurden venös entnommen, wie im Kapitel 2 beschrieben aufgearbeitet und bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden aufgetaut, und 1:4 mit H₂O verdünnt. 50 µL des Hämolyrates wurden 1 min bei 25 °C im Ultraschallbad behandelt, mit 50 µL GALT-Bestimmungspuffer gemischt und 40 min bei 32 °C inkubiert. Der GALT-Bestimmungspuffer enthielt folgende Komponenten:

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

Zur Beendigung der Reaktion wurden die Proben 4 min im Wasserbad gekocht. Danach wurden die Proben abgekühlt und 5 min bei $13000 \times g$ zentrifugiert. 70 μL Überstand wurde auf eine Dowex 1X8-Säule (200-400 mesh, Cl^- -Form, 0.3 mL in Einmal-Filterssäulen; Mallinckrodt Baker, Griesheim) gegeben. Das nicht umgesetzte D-[U- ^{14}C]Galaktose-1-Phosphat wurde durch Waschen mit 3 mL HCl ($25 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) entfernt. Die UDP-[U- ^{14}C]Galaktose wurde mit 1.6 mL HCl ($500 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) in Szintillationsgefäßen (Zinsser, Frankfurt) eluiert. Das Eluat wurde im Verhältnis 1:10 mit Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A; Zinsser, Frankfurt) gemischt und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (LS 6000; Beckmann, München) die Radioaktivität gemessen.

Als Leerwerte wurden Hämolystat-Proben verwendet, die vor Zugabe des GALT-Bestimmungspuffers 4 min im Wasserbad gekocht worden waren. Als Kontrollproben wurden Hämolystate zweier gesunder Erwachsenen mitgeführt.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

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

A: Enzymaktivität in $\mu\text{mol/h}$ pro gHb

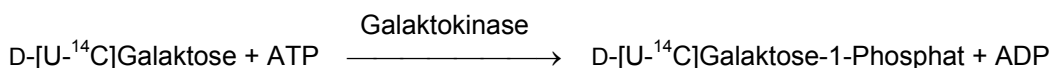
DPM: gemessene Radioaktivität in Zerfälle pro min.

Der Hämoglobin-Gehalt wurde, wie im Kap. 6.3 beschrieben, bestimmt.

Galaktokinase Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität im Blut wurde das von Shin (1991) beschriebene Verfahren modifiziert.

Das Prinzip des Nachweises ist die Bildung von ^{14}C -markiertem D-Galaktose-1-Phosphat aus D-[U- ^{14}C]Galaktose nach folgender Reaktionsgleichung:



EDTA-Blutproben wurden venös entnommen und 1:2 mit physiologischer NaCl-Lösung (0.9%, w/v) verdünnt. 50 μL der Probe wurden mit 100 μL GALK-Bestimmungspuffer gemischt und 40 min bei 32 °C inkubiert. Der GALK-Bestimmungspuffer enthielt folgende Komponenten:

Tris/HCl-Puffer	(200 mmol \times L ⁻¹ , pH 8.1)
Dithiothreitol	(20 mmol \times L ⁻¹)
Saponin	(0.2 %, m/v)
D-Galaktose	(1.2 mmol \times L ⁻¹)
D-[1- ¹⁴ C]Galaktose	(1.5 mCi \times L ⁻¹)
Natriumfluorid	(4 mmol \times L ⁻¹)
Magnesiumsulfat	(8 mmol \times L ⁻¹)
ATP	(8 mmol \times L ⁻¹)

Nach der Inkubation wurden die Proben 4 min im Wasserbad gekocht. Danach wurden die Proben abgekühlt und 5 min bei 13000 \times g zentrifugiert. 80 μL Überstand wurde auf eine Dowex 1X8-Säule (200-400 mesh, Cl⁻-Form, 0.3 mL in Einmal-Filtersäulen; Mallinckrodt Baker, Griesheim) aufgetragen und mit 3 mL H₂O nachgespült, um die nicht umgesetzte D-[1-¹⁴C]Galaktose zu entfernen. Das D-[1-¹⁴C]Galaktose-1-Phosphat wurde mit 1.6 mL HCl (500 mmol \times L⁻¹) eluiert. Anschließend wurde das Eluat mit 20 mL Szintillationsflüssigkeit gemischt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen (s.o.).

Als Leerwerte wurden Hämolysat-Proben verwendet, die vor Zugabe des GALT-Bestimmungspuffers 4 min im Wasserbad gekocht wurden waren. Als Kontrollproben wurden Hämolysate zweier gesunder Erwachsenen mitgeführt.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{(\text{DPM in Probe} - \text{DPM in Leerwert}) \times \frac{150 \mu\text{L}}{80 \mu\text{L}} \times \text{Galaktose in } 100 \mu\text{L} (120 \text{ nmol})}{(\text{DPM in } 100 \mu\text{L GALK-Bestimmungspuffer} \times \text{Inkubationszeit (min)} \times \text{Hb (g in } 25 \mu\text{L Blut)})}$$

A: Enzymaktivität in nmol/min pro gHb

DPM: gemessene Radioaktivität in Zerfälle pro min.

Dann wurde der Hämoglobingehalt bestimmt (s. Kap. 6.3).

6.2 Bestimmung der CO₂-Exhalationsluft

Die Bestimmung der Isotopenanreicherung im CO₂ erfolgte mit einem Isotopenratio-Massenspektrometer (Finnigan MAT 251; Finnigan MAT, Bremen). Dazu wurden Proben der Exhalationsluft aus den Atembeuteln mit Hilfe einer 50 mL-Infusionsspritze (B. Braun; ausgestattet mit einem Drei-Wege-Hahn) in evakuierte 10 mL-Röhrchen (Exetainer; Spectromat, Bremen) überführt. Es wurde ein gegen Pee Dee Belemniten-kalibrierter Standard (PDB; Wolfe, 1992) verwendet. Die ¹³C/¹²C-Ratio im CO₂ der Exhalationsluft (R) wurde anhand der Isotopenanreicherung, bezogen auf dem Pee Dee Belemniten-Standard (Faktor 0.011237), wie folgt berechnet (Wolfe, 1992):

$$R = \left(\frac{\delta_{\text{PDB}}}{1000} + 1 \right) \times 0.011237 \quad (1)$$

R: Verhältnis der Ionenintensitäten bei m/z 45 zu m/z 44 (¹³C/¹²C-Ratio im CO₂ der Exhalationsluft).
 δPDB: Isotopenanreicherung bezogen auf den Pee Dee Belemniten: Standard, ‰

Die CO₂-Exhalation unter Ruhebedingungen wurde aus Körpergewicht und -größe, auf der Basis einer CO₂-Produktion von 5 nmol × min⁻¹ × m² Körperoberfläche (Schreeve et al., 1970) unter Berücksichtigung der Körperoberfläche (nach Haycock et al., 1978) wie folgt berechnet.

$$V\text{CO}_2 = 5 \times 22.4 \times M^{0.5378} \times H^{0.3964} \times 0.024265 \quad (2)$$

VCO₂: mittlere CO₂-Exhalationsrate, ml × min⁻¹

M: Körpergewicht, kg

H: Körpergröße, cm

Die ¹³CO₂-Exhalation (V¹³CO₂) über basal wurde mittels der ¹³C-Anreicherung im CO₂ der Ausatemungsluft wie folgt berechnet (Wolfe, 1992):

$$V^{13}CO_2 = VCO_2 \times \left(\frac{R}{R+1} - \frac{R_0}{R_0+1} \right) \times \frac{1000}{22.4} \times \frac{1}{m} \times F \quad (3)$$

$V^{13}CO_2$: $^{13}CO_2$ -Exhalation über basal, $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$

VCO_2 : mittlere CO_2 -Exhalationsrate, $\text{mL} \times \text{min}^{-1}$

R: $^{13}C/^{12}C$ -Ratio im CO_2 nach Gabe von D-[1- ^{13}C]Galaktose.

R_0 : $^{13}C/^{12}C$ -Ratio im CO_2 vor Gabe der D-[1- ^{13}C]Galaktose (Basalwerte)

m: Körpergewicht, kg

F: Faktor (=1.25) zur Berücksichtigung der CO_2 -Retention im Organismus nach Allsop et al. (1978)

6.3 Andere

Kreatinin-Bestimmung

Die Bestimmung der Kreatininkonzentration in Plasma- und Urinproben erfolgte mittels eines enzymatischen Farbtestes (Kreatinin PAP-Test; Roche, Mannheim) auf einem Autoanalyser (Hitachi 704, Roche) (Wahlefeld & Siedel, 1985).

Hämoglobin-Bestimmung

Die Messung des Hämoglobingehaltes im Blut und in Erythrozyten wurde mittels der Cyanmethämoglobin-Methode auf einem Analysator (KX-21; Sysmex, Norderstedt) durchgeführt.

Teil III

Endogene Galaktose-Bildung bei Galaktosämie

Kapitel 7

Endogene Galaktose-Bildung bei Q188R-homozygoten Patienten mit Galaktosämie

Zusammenfassung: Wir haben bei Q188R-homozygoten Patienten mit Galaktosämie (n=18; Alter 4-38 Jahre) die Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Bildung untersucht. Die Untersuchungen wurden bei einer guten diätetischen Stoffwechseleinstellung und nach mindestens 10stündigem Übernachtsfasten mittels der „primed continuous infusion“-Methode mit D-[1-¹³C]Galaktose als Substrat durchgeführt. Dabei wurde die Rate der Freisetzung von D-Galaktose aus endogenen Quellen in das Plasma-Kompartiment („rate of appearance“ R_a) bestimmt. Die R_a nahm mit dem Alter der Patienten ab, und lag im Bereich von 4.6 bis 2.0 $\mu\text{mol/h pro kg KG}$. Die Freisetzungsraten von D-Galaktitol und D-Galaktonat nahmen parallel zu der D-Galaktose- R_a ab, und waren jedoch niedriger als die D-Galaktose- R_a . Das Verhältnis der Freisetzungsraten von D-Galaktose/D-Galaktitol/D-Galaktonat lag im Mittel bei 10:5:1. Die totale D-Galaktose-Freisetzungsraten (i.e. Summe von D-Galaktose- R_a und der Freisetzungsraten von D-Galaktonat und D-Galaktitol) war statistisch hoch signifikant ($p < 0.0001$) invers mit dem Alter der Patienten korreliert. Die Ergebnisse ($y =$ totale Freisetzungsraten, $t =$ Alter) konnten mittels nicht linearer Regression am besten an das einfache Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-bt)$ angepasst werden. Dabei ergaben sich folgende Schätzwerte für Parameter: $y_0 = 3.0 \pm 0.2$, $a = 6.5 \pm 0.4$, $b = 0.11 \pm 0.02$. Der Wert y_0 entspricht einem mittleren Schätzwert für die totale endogene D-Galaktose-Freisetzung bei erwachsenen Patienten (ca. 13 mg/d pro kg KG), $\Sigma (y_0 + a)$ gibt einen Schätzwert für die totale endogene D-Galaktose-Freisetzung bei Neugeborenen mit Galaktosämie (ca. 41 mg/d pro kg KG). Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass bei Patienten mit Galaktosämie beträchtliche Menge an D-Galaktose endogen gebildet wird, und dass die Freisetzungsraten von D-Galaktose bei Säuglingen vielfach höher als bei Erwachsenen ist. Diese Befunde können die bei Galaktosämie-Patienten trotz strikter Diätführung persistierende hohe intrazelluläre Konzentration an D-Galaktose-1-Phosphat sowie deren Altersabhängigkeit erklären.

7.1 Einleitung

Die wesentlichen Symptome der klassischen Galaktosämie (OMIM 230400) wurden erstmals von von Reuss (1908) vor etwa 100 Jahren beschrieben. Heute wissen wir, dass diese Erkrankung durch eine verminderte Aktivität der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT, E.C. 2.7.7.10) verursacht wird. Bei Neugeborenen mit klassischer Galaktosämie, die mit (Mutter-)Milch ernährt werden, entwickelt sich ein toxisches Krankheitsbild mit gestörter Leberfunktion, gestörter Nierenfunktion, gestörter Gehirnfunktion und Kataraktbildung, bedingt durch die Akkumulation von potentiell toxischem D-Galaktose-1-Phosphat und D-Galaktitol. Eine sofortige Unterbrechung jeglicher D-Galaktose-Zufuhr wirkt hier lebensrettend und führt zu einem raschen Rückgang der klinischen Symptomatik. Als Therapiemaßnahme wird derzeit eine lebenslange Laktose-freie und weitestgehend D-Galaktose-reduzierte Diät empfohlen. Aber trotz strengster Restriktion der D-Galaktose-Zufuhr mit der Nahrung persistieren erhöhte Konzentrationen von D-Galaktose-Metaboliten in Zellen und Körperflüssigkeiten, und es können sich langfristig Komplikationen, wie z.B. eine gestörte Sprachentwicklung, eine verminderte Wahrnehmungsfähigkeit oder eine neurologische Symptomatik entwickeln. Bei den meisten Frauen kommt es überdies zu einer Ovarialinsuffizienz (Übersicht bei Holton et al., 2001).

Die pathophysiologischen Ursachen für die Langzeitkomplikationen sind bisher nicht bekannt. Gitzelmann & Steinmann (1984) vermuteten, dass die Ursachen letztlich in der endogenen Bildung von D-Galaktose, die z.B. beim Abbau von Glykoproteinen und Glykolipiden freigesetzt wird, begründet sein können. Vorläufige Ergebnisse aus ersten *in vivo* Stoffwechseluntersuchungen an Erwachsenen deuten darauf hin, dass bei Gesunden und bei Patienten mit Galaktosämie vergleichbare und relevante Mengen an D-Galaktose endogen gebildet werden dürften (Berry et al., 1995b). Die in dieser ersten Studie ermittelten Freisetzungsraten waren jedoch, wie sich später herausstellte, insbesondere bei Gesunden weit überbestimmt, da eine inadäquate Analysenmethodik verwendet worden war (Ning et al., 2000, Schadewaldt et al., 2000). Dennoch geben die von Berry und Kollegen (1995b) publizierten Daten

erste Hinwiese auf die Gültigkeit für die oben genannten „Autointoxikations“-Hypothese (Gitzelmann & Steinmann, 1984). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass sowohl die Konzentrationen von D-Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten als auch die renale D-Galaktitol-Ausscheidung mit zunehmendem Alter der Galaktosämie-Patienten, die mit Diät behandelt werden, abnimmt (Schweitzer et al., 1993; Hutchesson et al., 1999). Damit erhebt sich die Frage, ob diese Abnahme mit entsprechenden Änderungen der endogenen D-Galaktose-Freisetzung zusammenhängen könnte.

Um die Bedeutung der endogenen D-Galaktose-Bildung bei Galaktosämie-Patienten unterschiedlichen Alters näher zu charakterisieren, wurde bei einem genotypisch homogenen Kollektiv von Q188R-homozygoten Patienten D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen durchgeführt. Dabei wurde die primed continuous infusion-Methode mit D-[1-¹³C]Galaktose als Substrat eingesetzt. Die Analyse von Konzentration und ¹³C-Isotopenanreicherung der verschiedenen D-Galaktose-Metaboliten in Plasma, Erythrozyten und Urin ermöglichte dann eine Bestimmung wesentlicher quantitativer Aspekte des D-Galaktose-Stoffwechsels *in vivo*.

7.2 Material und Methoden

Probanden und Patienten

Sieben gesunde Erwachsene und achtzehn Patienten (12 weiblich, 6 männlich) mit klassischer Galaktosämie (GALT-Mangel) nahmen an den Untersuchungen teil. Bei den Kontrollpersonen wurde bei einer körperlichen Untersuchung weder eine akute noch eine chronische Erkrankung festgestellt. Bei Patienten wurden außer der angeborenen Stoffwechselstörung keine weiteren akuten oder chronischen Erkrankungen festgestellt. Die Patienten waren zwischen 4 und 38 Jahre alt und wiesen Homozygotie für die Q188R-Mutation auf. Weitere charakteristische Daten der Gesunden und der Patienten sind in den Tabellen 1a und 1b wiedergegeben.

Tabelle 1a: Charakteristische Daten der gesunden Erwachsenen^a

Probanden	Geschlecht (M/W)	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)
G1	M	26	75	180
G2	M	26	80	180
G3	M	21	90	186
G4	M	23	83	193
G5	M	28	61	170
G6	W	28	55	162
G7	M	27	63	175
Mittelwert ± SD		26 ± 3	72 ± 13	177 ± 8

^a Zum Zeitpunkt der D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung mit D-[1-¹³C]Galaktose

Tabelle 1b: Charakteristische Daten der Patienten mit Galaktosämie^{a,b}

Patienten	Geschlecht (M/W)	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)
P1	W	4.4	15	103
P2	W	4.8	12	98
P3	W	5.7	14	107
P4	W	5.9	20	117
P5	W	6.4	22	120
P6	M	6.8	20	118
P7	W	9.2	26	126
P8	M	11.1	33	143
P9	W	14.5	49	169
P10	W	15.8	42	157
P11	M	16.7	66	173
P12	W	17.1	46	160
P13	M	17.8	74	180
P14	M	18.6	67	178
P15	W	20.3	65	160
P16	W	27.8	59	159
P17	W	30.3	72	166
P18	M	37.6	68	166

^a Zum Zeitpunkt der D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung mit D-[1-¹³C]Galaktose

^b Homozygotie für die Q188R-Mutation

Proben zur Bestimmung der Basalwerte (Kontrollwerte) wurden zwischen 8 und 8:30 Uhr unmittelbar vor der D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung

genommen. Vor Beginn der Untersuchung wurden die Patienten und Probanden gebeten, die Blase zu entleeren und eine Kontroll-Urinprobe genommen. Danach wurden zwei EDTA-Blutproben im Abstand von 15 Minuten entnommen. In dieser Zeit wurden auch fünf Proben der Exhalationsluft unter Ruhebedingungen in Atembeuteln (1.5 L Tecobag; Tessaurex Container, Bürstadt) gesammelt. Um eine präanalytische Veränderung der Plasma-D-Galaktose-Konzentration zu verhindern, wurden die Blutproben sofort nach der Entnahme zentrifugiert (5 min, $3000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und das Plasma gewonnen. Erythrozyten wurden zweimal mit gleichem Volumen physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Plasmaproben, Erythrozytenproben sowie Aliquots der Urinprobe wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Proben der Exhalationsluft wurden aus den Atembeuteln in evakuierte 10 mL-Röhrchen (Exetainer; Spectromat, Bremen) überführt.

Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung

Dazu wurden „primed continuous infusion“-Tests unter Ruhebedingungen im Liegen durchgeführt. Zunächst wurde den postabsorptiven Galaktosämie-Patienten und Probanden eine Venenverweilkanüle (Vasofix-Braunüle, 1.2 mm; B.Braun, Melsungen) in die V.basilica eines Armes gelegt. Nach der Kontrollproben-Entnahme für die Basalwerte wurde gegen 08:30 Uhr über diese Venenverweilkanüle $5.5 \mu\text{mol D-[1-}^{13}\text{C]Galaktose pro kg KG}$ (sterile Lösung, $50 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) als initialer Bolus gegeben. Unmittelbar danach schloss sich eine kontinuierliche Infusion mit einer Rate von $0.8 \mu\text{mol D-[1-}^{13}\text{C]Galaktose/h pro kg KG}$ (sterile Lösung, 200 mg gelöst in 1 L 0.9% NaCl) für eine Dauer von 5.5 Stunden an (Infusomat, B.Braun, Melsungen). Dann wurden EDTA-Blutproben ab der 150. min im Abstand von 15 Minuten über eine Dauer von 3 Stunden aus einer weiteren Venenverweilkanüle entnommen, die im contralateralen Arm gelegt war. Parallel zu den Blutproben wurden Proben der Exhalationsluft gesammelt. Am Ende der Untersuchung wurde erneut der Urin gesammelt und das Gesamtvolumen gemessen. Blutproben, Atemproben und die Urinprobe wurden bis zu weiteren Analysen, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und gelagert.

Chemikalien

Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien und Enzyme bereits im Kap. 2.2 spezifiziert.

Analytische Verfahren

Konzentration und ^{13}C -Anreicherung (MPE) in den D-Galaktose-Metaboliten der Plasma-, Erythrozyten- und Urinproben wurden mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie bestimmt. Die Methoden für die Bestimmung von D-Galaktose (Kap. 2), D-Galaktitol (Kap. 4), D-Galaktonat (Kap. 4) und D-Galaktose-1-Phosphat (Kap. 3) wurden bereits früher detailliert beschrieben. $^{13}\text{CO}_2$ in der Atemluft wurde mit der IRMS bestimmt (s. Kap. 6.2).

Das Screening auf die Q188R-Mutation erfolgte nach Kap. 5.2. Die Aktivität der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase wurde nach Kap. 6.1 gemessen. Kreatinin und Hämoglobin wurden wie im Kap. 6.3 angegeben bestimmt.

Berechnungen

Die Freisetzungsrates der endogenen D-Galaktose in das Plasma unter apparenten steady state Bedingungen (R_a , in $\mu\text{mol/h pro kg KG}$) wurde aus dem Verhältnis der $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten zur gesamten D-Galaktose und der Infusionsrate (Inf, in $\mu\text{mol/h pro kg KG}$) berechnet (s. Kap. 2.2, Gleichung 6).

Da in D-Galaktitol und D-Galaktonat praktisch keine Inkorporation der ^{13}C -Markierung nachzuweisen war, und die Plasma-Konzentrationen dieser Metabolite während der Beobachtungszeit konstant blieben, muss die mit dem Urin ausgeschiedene Metabolit-Menge der Menge entsprechen, die systemisch aus endogen Quellen in das Plasma-Kompartiment freigesetzt wurde. Die endogene Freisetzung (R_e , $\mu\text{mol/h pro kg KG}$) dieser Metabolite wurde daher wie folgt abgeschätzt:

$$R_e = \frac{C_U \times V_U \times 1}{t \times KG}$$

C_U : Metabolit-Konzentration in Urin in $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, V_U : Gesamtes Urin-Volumen am der Untersuchungsperiode in L, t : Dauer der Untersuchung in h, KG : Körpergewicht in kg.

Die Bestimmung der ^{13}C -Exhalation erfolgte wie im Kap. 6.2 beschrieben.

Statistik

Im Allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm SD (Anzahl der Bestimmungen in Klammern) angegeben. Korrelationen wurden mit linearer Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Fehlerquadrate, RGP-Funktion von MS Excel) überprüft. Die Daten wurden unter Anwendung des Marguardt-Levenberg-Algorithmus für nicht-lineare Regressionsanalysen (Sigma Plot 8.0, Jandel Scientific) angepasst. Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen Stichproben wurde der Wilcoxon Matched-Pairs-Signed-Rank-Test (2seitig) und der Mann-Whitney U-Test (2seitig) verwendet.

7.3 Ergebnisse

Biochemische Charakterisierung der Probanden und Patienten

Erwachsene Kontroll-Personen wie auch die Patienten wurden ausführlich hinsichtlich für biochemische Parameter des D-Galaktose-Stoffwechsels (i.e. GALT-Enzymaktivität und Gal-1-P in Erythrozyten, D-Galaktose, D-Galaktitol ggf. D-Galaktonat im Plasma und Urin) charakterisiert. Die Gesunden wurden hier zur Etablierung von Vergleichswerten untersucht. Die Daten sind in den Tabellen 2a und 2b zusammengefasst.

Tabelle 2a: Biochemische Charakterisierung der gesunden Erwachsenen^a

	Erythrozyten (RBC)		Plasma		Urin		Exhalationsluft
	GALT ($\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$)	D-Gal-1-P ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}_{\text{RBC}}$)	D-Galaktose ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	D-Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	D-Galaktose ($\mu\text{mol} \times \text{mmol}^{-1}_{\text{Krea}}$)	D-Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{mmol}^{-1}_{\text{Krea}}$)	¹³ CO ₂ (δ_{PDB} -Werte) ^b
G1	22.7	1.3	0.26	0.14	0.61	1.42	-28.1
G2	24.7	1.2	0.22	0.13	0.70	1.50	-27.5
G3	26.2	0.9	0.19	0.14	0.40	1.65	-27.2
G4	21.8	1.2	0.16	0.11	0.37	1.22	-26.0
G5	23.4	1.4	0.21	0.14	0.51	1.29	-28.0
G6	26.4	2.1	0.20	0.11	0.46	1.76	-27.0
G7	24.3	1.0	0.20	0.13	0.48	1.23	-27.0
MW \pm SD	23.5 \pm 2.2	1.3 \pm 0.4	0.20 \pm 0.03	0.13 \pm 0.01	0.50 \pm 0.12	1.44 \pm 0.21	-27.3 \pm 0.7

^a Blut-, Spontanurin- und Atem-Proben wurden unmittelbar vor der *in vivo* Untersuchung gesammelt.

^b Mittelwert aus drei Atemproben.

Tabelle 2b: Biochemische Charakterisierung der Patienten mit Galaktosämie

	Erythrozyten (RBC)		Plasma		Urin		Exhalationsluft
	GALT ($\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$)	D-Gal-1-P ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}_{\text{RBC}}$)	D-Galaktose ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	D-Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	D-Galaktose ($\mu\text{mol} \times \text{mmol}^{-1}_{\text{Krea}}$)	D-Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{mmol}^{-1}_{\text{Krea}}$)	$^{13}\text{CO}_2$ (δ_{PDB} -Werte) ^b
Galaktosämie-Patienten ^c							
P1	0.15	105	3.0	11.1	5.0	255	n.a.
P2	0.24	161	3.6	11.0	4.8	289	-27.5
P3	0.16	238	2.9	9.7	5.0	202	-27.3
P4	0.17	161	3.4	11.5	9.5	209	-28.9
P5	0.19	129	2.7	12.3	n.a.	n.a.	-25.4
P6	0.18	201	3.3	11.6	9.3	266	-27.0
P7	0.14	206	3.1	10.5	8.0	216	-25.4
P8	0.22	91	3.1	12.1	4.4	110	-28.5
P9	0.18	143	2.5	9.7	4.9	148	-23.6
P10	0.19	115	2.8	11.7	3.9	133	-27.4
P11	0.20	130	2.9	11.4	n.a.	n.a.	-27.5
P12	0.16	104	2.5	9.5	n.a.	n.a.	-28.8
P13	0.20	120	2.8	11.3	5.7	135	-28.2
P14	0.24	129	2.8	11.8	3.3	101	-27.9
P15	0.29	120	2.8	11.7	7.5	138	-28.3
P16	0.26	117	2.2	10.0	3.4	154	-25.4
P17	0.18	173	2.5	10.0	n.a.	n.a.	-27.1
P18	0.10	130	2.7	11.8	6.2	131	-29.3

^a Blut-, Spontanurin- und Atem-Proben wurden unmittelbar vor der *in vivo* Untersuchung gesammelt.

^b Mittelwert aus fünf Atemproben. ^c Q188R-homozygote Patienten.

Bei allen Patienten wurde in den Erythrozyten eine geringe Aktivität der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (ca. 0.2 $\mu\text{mol}/\text{h}$ pro g_{Hb} , entsprechend $\leq 1\%$ der Norm) nachgewiesen. Postabsorptiv lag die D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration im Bereich zwischen 2.36 und 6.17 $\text{mg} \times \text{dL}_{\text{RBC}}^{-1}$ (91 - 238 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$). Demgegenüber war diese bei postabsorptiven gesunden Erwachsenen $< 0.05 \text{ mg} \times \text{dL}_{\text{RBC}}^{-1}$ ($< 2 \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$). Die Konzentrationen von D-Galaktose ($2.9 \pm 0.4 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) und D-Galaktitol ($11.0 \pm 0.9 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) im Plasma der Patienten waren ca. 25fach und 70fach höher als bei den Kontrollpersonen. Die interindividuelle Variabilität der D-Galaktose- bzw. D-Galaktitol-Konzentration im Plasma war relativ gering (VK 12% bzw. 8%; n=18). Die Konzentrationen von D-Galaktose und D-Galaktitol im Urin lagen im Bereich zwischen 3.3 und 9.5 bzw.

101 und 289 $\mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Krea}}^{-1}$ und waren damit ca. 10fach bzw. 100fach höher als bei Normalpersonen.

Steady state Bedingungen

Die Untersuchungen bei gesunden Erwachsenen ergaben, dass im Plasma und in der Ausatemluft nach einer 2.5stündigen Äquiblierungsphase stabile metabolische sowie isotopische steady state Bedingungen erreicht wurden. Die unter steady state Bedingungen bei Gesunden ermittelten Umsatzraten sind in Tabelle 3a zusammengestellt.

Tabelle 3a: Individuelle Daten der gesunden Erwachsenen aus der *in vivo* D-[1-¹³C]Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung^a

Probanden		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
D-Galaktose im Plasma								
totale		0.81	0.70	0.79	0.62	0.82	0.62	0.78
($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	SD	0.02	0.02	0.03	0.04	0.05	0.01	0.05
endogene		0.21	0.20	0.20	0.16	0.20	0.19	0.22
($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	SD	0.01	0.01	0.004	0.005	0.005	0.01	0.02
¹³ C-Markierung		72.2	69.7	73.0	72.1	73.6	66.5	70.0
(MPE)	SD	0.6	1.0	1.0	1.4	1.4	1.3	1.1
Plasma-D-Galaktitol		0.15	0.11	0.12	0.10	0.12	0.10	0.11
($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	SD	0.01	0.004	0.003	0.002	0.01	0.005	0.005
¹³ CO ₂ -Exhalation		0.65	0.55	0.53	0.57	0.70	0.73	0.60
($\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)	SD	0.05	0.04	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03

^a Postabsorptive Probanden erhielten ein Priming (5.5 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$) und eine kontinuierliche Infusion von D-[1-¹³C]Galaktose (0.8 $\mu\text{mol}/\text{h pro kg KG}$) über 6 h. 2.5 h nach dem Beginn der Infusion wurden Proben von EDTA-Blut venös im Abstand von 15 Minuten entnommen. Parallel zu den Blutproben wurden Proben der Exhalationsluft gesammelt. Angegeben sind MW \pm SD.

Aufgrund der Erfahrungen bei den Gesunden wurden bei den Patienten 2.5 h nach Beginn der Isotopen-Infusion mit der Proben-Entnahme begonnen. Ein typisches Ergebnis für den zeitlichen Verlauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

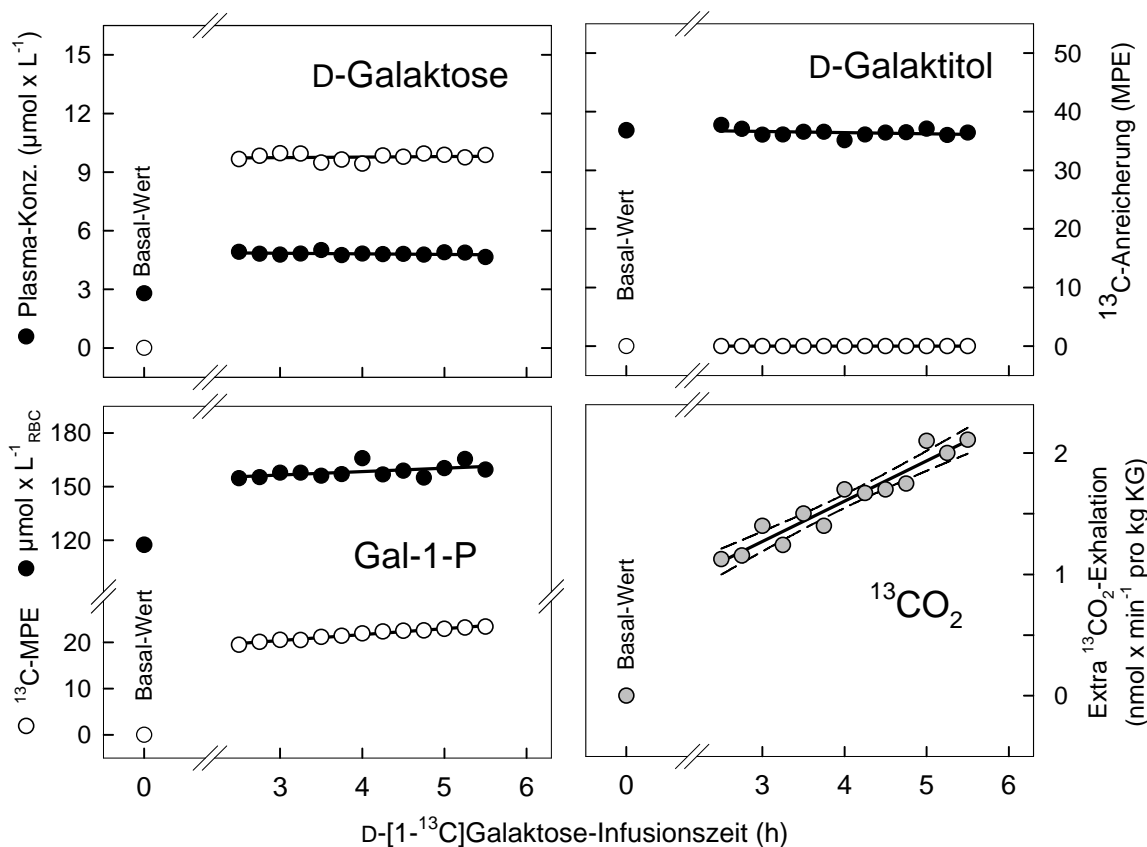


Abb. 1: ^{13}C -Isotopenanreicherung und Konzentrationen von D-Galaktose-Metaboliten im Blut sowie $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bei einem Patienten (Q188R-Homozygot) mit klassischer Form der Galaktosämie während der *in vivo* D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung. Ein primed continuous infusion-Versuch wurde mit D-[1- ^{13}C]Galaktose als Substrat (priming mit $8 \mu\text{mol}/\text{kg KG}$ und kontinuierliche Infusion mit $1.2 \mu\text{mol}/\text{h pro kg KG}$) unter postabsorptiven Bedingungen durchgeführt. Im Plasma wurden ab der 2.5 Stunde der Tracer-Infusion apparente stabile steady state Bedingungen in den D-Galaktose-Metaboliten erreicht. Während der 3stündigen Messphase wurde eine langsame, aber hoch signifikante ($p < 0.0001$) lineare Akkumulation der ^{13}C -Markierung, sowohl im D-Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten (Regressionslinie: $y = 16.6 (\pm 0.2) + 1.29 (\pm 0.06)x$; $y = \text{MPE}$, $x = \text{Stunde}$, $r = 0.989$) als auch in der Exhalationsluft (Regressionslinie: $y = 0.27 (\pm 0.12) + 0.33 (\pm 0.03)x$; $y = ^{13}\text{CO}_2\text{-Exhalation}$, $x = \text{Zeit in h}$, $r = 0.962$) bestimmt.

Die Befunde für jeden einzelnen Patienten sind in Tabelle 3b aufgeführt. Die Daten zeigen, dass während der steady state Phase sowohl die Konzentration als auch die ^{13}C -Markierung von D-Galaktose und D-Galaktitol im Plasma recht stabil waren. Auch die Konzentration des D-Galaktose-1-Phosphats blieb in den Erythrozyten konstant.

Tabelle 3b: Individuelle Daten der Q188R-homozygoten Patienten aus der *in vivo* D-[1-¹³C]Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung^a

Patienten (Alter)	P1 ^b (4.4)	P2 ^b (4.8)	P3 ^c (5.7)	P4 ^c (5.9)	P5 ^{b,c} (6.4)	P6 ^b (6.8)	P7 ^b (9.2)	P8 ^c (11.1)	P9 (14.5)	P10 ^c (15.8)	P11 (16.7)	P12 (17.1)	P13 ^c (17.8)	P14 ^c (18.6)	P15 ^c (20.3)	P16 (27.8)	P17 (30.3)	P18 ^c (37.6)
D-Galaktose im Plasma																		
totale ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	3.87	4.46	4.40	4.69 ^d	4.31	4.23	4.31	4.79	3.74	4.42	3.68	3.83	4.85	4.78	4.82	3.20	3.40	4.72
SD	0.06	0.10	0.07	0.04	0.07	0.09	0.08	0.13	0.14	0.05	0.12	0.09	0.15	0.08	0.09	0.09	0.11	0.12
endogene ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	3.26	3.69	3.33	3.58 ^d	3.19	3.45	3.48	3.46	2.88	3.07	2.78	2.85	3.28	3.11	3.20	2.29	2.47	2.94
SD	0.06	0.08	0.06	0.08	0.08	0.08	0.06	0.11	0.11	0.04	0.13	0.08	0.12	0.08	0.08	0.06	0.09	0.08
¹³ C-Markierung (MPE)	15.0	16.6	23.5	23.0 ^d	25.1	17.6	18.3	26.8	22.1	29.6	23.1	24.7	31.4	33.9	32.6	27.3	26.2	36.4
SD	0.6	0.4	0.4	0.3	0.8	0.6	0.3	0.7	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.9	0.6	0.6	1.3	0.5
Plasma-D-Galaktitol $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$	10.8	10.1	9.3	10.5	11.5	11.6	11.6	11.7	9.6	11.3	10.9	9.4	10.8	11.8	10.9	9.3	9.8	11.9
SD	0.6	0.1	0.3	1.0	0.2	0.1	0.3	0.3	0.5	0.1	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.9	0.5
Gal-1-P in RBC ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	126	183	286	189	155	222	238	121	173 ^d	151	154	129 ^d	156 ^d	171	158	147 ^d	206	182
SD	6	9	16	17	15	18	9	5	11	7	6	10	6	7	4	12	9	9
¹³ CO ₂ in der Exhalationsluft																		
Erhöhungsraten ^e ($\Delta\delta\text{PDB} \times \text{h}^{-1}$)	n.a.	0.00	0.25 ^f	0.27 ^e	0.27 ^f	0.00	0.14 ^f	0.20 ^f	0.01	0.20 ^f	0.03	-0.10	0.34 ^f	0.36 ^f	0.27 ^f	0.04	n.a.	0.23 ^f
SE		0.00	0.07	0.05	0.07	0.00	0.05	0.06	0.06	0.04	0.04	0.07	0.88	0.07	0.05	0.05	n.a.	0.06
¹³ CO ₂ -Exhalation ^g ($\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)	n.a.	0.08 ^h	0.09 ^h	0.11 ^h	0.20 ^h	0.04	0.10 ^h	0.09 ^h	0.14 ^h	0.08 ^h	0.06 ^h	0.00	0.11 ^h	0.12 ^h	0.12 ^h	0.08 ^h	n.a.	0.11
		(0.49)	(0.58)	(0.88)	(1.54)	(0.31)	(0.79)	(0.81)	(1.37)	(0.71)	(0.66)	(-0.1)	(1.25)	(1.36)	(1.44)	(0.87)		(1.31)

Legende s. Seite 102

Während der 3stündigen Messphase lagen die VK's im Mittel $< 5\%$, und waren nie höher als 10% . Eine lineare Regressionsanalyse zeigte, dass Metabolit-Konzentrationen und die ^{13}C -Markierung, bis auf einige wenige Ausnahmen, nicht mit der Zeit korreliert waren ($r < \text{oder} \ll 0.45$). Dagegen wurde bei den meisten Patienten ein leichter, statistisch signifikanter Anstieg der ^{13}C -Markierung im CO_2 der Exhalationsluft gemessen ($0.15 \pm 0.14 \Delta\delta$ -Werte pro Stunde).

Die Infusion von D-[1- ^{13}C]Galaktose führte bei Patienten zu einem dosis-abhängigen Anstieg der Konzentration von Plasma-D-Galaktose. Die Hälfte der Patienten ($n=9$) erhielt eine Standard-Dosierung von $0.8 \mu\text{mol/h}$ pro kg KG, die andere Hälfte der Patienten ($n=9$) eine 1.5fache Dosierung von $1.2 \mu\text{mol/h}$ pro kg KG. Bei der Standard-Dosierung stieg die steady state Konzentration der Plasma-D-Galaktose im Mittel um $1.03 \pm 0.21 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, bei der 1.5fachen Dosierung um $1.72 \pm 0.27 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ über den Basalwert an. Die 1- ^{13}C -Isotopenanreicherung in der D-Galaktose des Plasmas bei Standard-Dosierung lag im Mittel bei 21.2 ± 4.5 MPE, bei 1.5facher Dosierung bei 28.3 ± 4.2 MPE. Die Konzentration des D-Galaktitols im Plasma wurde durch die D-Galaktose-Gabe nicht beeinflusst und lag im Mittel bei $10.6 \pm 0.9 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$. Bemerkenswert ist, dass im D-Galaktitol kein Einbau von ^{13}C -Markierung nachgewiesen werden konnte.

Fortsetzung Tabelle 3b:Legende

^{a,b} Postabsorptive Patienten erhielten ein Priming ($5.5 \mu\text{mol/kg}$ KG) und eine kontinuierliche Infusion von D-[1- ^{13}C]Galaktose ($0.8 \mu\text{mol/h}$ pro kg KG) über 6 h. 2.5 h nach dem Beginn der Infusion wurden Proben von EDTA-Blut venös im Abstand von 15^(a) Minuten bzw. 30^(b) Minuten entnommen. Parallel zu den Blutproben wurden Proben der Exhalationsluft gesammelt. Angegeben sind MW \pm SD. Die Alter der Patienten sind in Klammern angegeben.

^c Patienten erhielten eine 1.5fache Dosierung von D-[1- ^{13}C]Galaktose.

^d Statistisch (lineare Regressionsanalyse) signifikanter Anstieg ($p < 0.001$) mit der Zeit ($< \text{oder} \ll 7\%$ des Mittelwerts pro h).

^e Steigung \pm SE (lineare Regressionsanalyse) während der 3stündigen Messphase.

^f Statistisch signifikanter Anstieg ($p < 0.001$).

^g Minimum-Schätzwerte wurden auf der Grundlage des mittleren Anstiegs des $^{13}\text{CO}_2$ -Gehaltes während der letzten Stunde der Infusion berechnet. In Klammern sind die mittleren $\Delta\delta$ -Werte über den mittleren Basal-Werten (s. Tabelle 2b) angegeben.

^h Statistisch (Wilcoxon-Test) signifikante Erhöhung über den Basal-Wert ($n=5$, $p < 0.05$).

Die Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat stieg im Mittel um 26 ± 5 ($+ 19 \pm 5\%$) $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$ bei der Standard-Dosierung, und um 33 ± 14 ($+28 \pm 7\%$) $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$ bei der 1.5fachen D-[1- ^{13}C]Galaktose-Dosierung an. Die Erhöhung war ausschließlich auf die Akkumulation von 1- ^{13}C -markiertem D-Galaktose-1-Phosphat zurückzuführen. Bei den meisten Patienten deutete sich während der 3stündigen steady state Phase ein geringfügiger, kontinuierlicher Anstieg der totalen D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration an. Dieser Effekt war bei einigen Patienten statistisch hoch signifikant ($p < 0.002$). Bei allen Patienten wurde ein statistisch hoch signifikanter linearer Anstieg der Akkumulation von ^{13}C -Markierung im D-Galaktose-1-Phosphat über die Zeit gefunden ($p < 0.001$). Die Rate des ^{13}C -Anstiegs betrug unter Standard-Bedingungen 0.76 ± 0.23 MPE/h und bei der 1.5fachen D-[1- ^{13}C]Galaktose-Dosierung 1.10 ± 0.30 MPE/h.

Der mittlere Anstieg des ^{13}C -Gehaltes in der Exhalationsluft während der letzten Stunde der Infusion betrug 0.63 ± 0.5 $\Delta\delta$ -Werte ($n=7$) bei der Standard-Infusion und 0.91 ± 0.5 bei der 1.5fachen D-[1- ^{13}C]Galaktose-Dosierung. Die mittlere $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate über Basal lag damit bei 0.07 ± 0.04 und bei 0.12 ± 0.04 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG.

Galaktose-Stoffwechselumsatzraten

Aus den Analysen der D-Galaktose-Metabolite in Plasma und Urin sowie des CO_2 in der Ausatemungsluft (s. Tabelle 3a und 3b) wurden die D-Galaktose-Stoffwechselumsatzraten bei Gesunden (Tabelle 4a) und bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (Tabelle 4b) abgeschätzt.

Bei den Gesunden war die endogene D-Galaktose-Freisetzung in das Plasma (R_a) mit 0.29 ± 0.04 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG recht niedrig. Die D-Galaktose-Oxidationsraten zeigen, dass sowohl die endogene, systemisch freigesetzte, als auch exogene, infundierte D-Galaktose vollständig oxidativ abgebaut wurden. Die renale Exkretion von D-Galaktose und D-Galaktose-Metaboliten (D-Galaktitol, D-Galaktonat) war bei den gesunden vernachlässigbar gering ($< 5\%$).

Tabelle 4a: *In vivo* D-Galaktose-Stoffwechselumsatzraten bei gesunden Erwachsenen^a

Probanden	D-Galaktose		
	endogene Freisetzung (R _a)	Infusionsrate	Oxidation
	in $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{h}^{-1}$		
G1	0.27	0.8	1.12
G2	0.32	0.8	0.96
G3	0.26	0.8	0.92
G4	0.28	0.8	0.96
G5	0.25	0.8	1.19
G6	0.37	0.8	1.38
G7	0.31	0.8	1.08
Mittelwert \pm SD	0.29 \pm 0.04	0.8	1.09 \pm 0.16

^a Umsatzraten wurden auf der Grundlage der in der Tabelle 3a dargestellten Daten aus primed continuous infusion-Untersuchungen mit D-[1-¹³C]Galaktose als Substrat berechnet (s. Kap. 2.2 und Kap. 6.3).

Tabelle 4b: *In vivo* D-Galaktose-Stoffwechselumsatzraten bei Patienten^a

Patienten (Alter)	endogene D-Galaktose			D-Galaktitol ^b	D-Galaktonat ^b
	Freisetzungsrate (R _a)	Oxidation ^c	renale ^b Ausscheidung	Renale Ausscheidung	renale Ausscheidung
	in $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{h}^{-1}$				
Galaktosämie-Patienten ^d					
P1 (4.4)	4.58	n.a.	0.07	1.91	0.52
P2 (4.8)	4.29	0.50	0.07	1.99	0.46
P3 (5.7)	3.89	0.36	0.08	2.21	0.56
P4 (5.9)	4.00	0.46	0.08	1.99	0.49
P5 (6.4)	3.68	0.75	0.06	1.95	0.44
P6 (6.8)	3.73	0.24	0.12	2.11	0.58
P7 (9.2)	3.66	0.56	0.10	2.04	0.46
P8 (11.1)	3.26	0.31	0.06	1.59	0.37
P9 (14.5)	2.90	0.61	0.06	1.31	0.25
P10 (15.8)	2.87	0.24	0.08	1.24	0.21
P11 (16.7)	2.57	0.25	0.04	1.06	0.26
P12 (17.1)	2.35	0.00	0.06	1.06	0.21
P13 (17.8)	2.60	0.30	0.08	1.12	0.27
P14 (18.6)	2.33	0.29	0.08	1.09	0.24
P15 (20.3)	2.46	0.32	0.05	1.05	0.28
P16 (27.8)	2.12	0.27	0.03	1.05	0.26
P17 (30.3)	2.18	n.a.	0.05	1.01	0.23
P18 (37.6)	2.05	0.31	0.14	1.01	0.23

^a Umsatzraten wurden auf der Grundlage der in der Tabelle 3 dargestellten Daten berechnet (Details s. Kap. 2.2 und Kap. 6.3). ^b Bestimmung in dem am Ende der D-[1-¹³C]Galaktose-Umsatzmessung gesammelten Spontanurin. ^c Minimum-Schätzwerte (vgl. Ergebnisse und Tabelle 3b). ^d Q188R-homozygote Patienten.

Bei Patienten mit Galaktosämie nahm die Freisetzungsrates von D-Galaktose aus den endogenen Quellen in das Plasma-Kompartiment (R_a) von ca. 4.6 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei einem 5jährigen auf ca. 2.1 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG im Erwachsenenalter ab. Ähnlich wie die Freisetzungsrates von D-Galaktose, nahmen auch die renalen Ausscheidungsrates von D-Galaktitol und D-Galaktinat von ca. 2.0 bzw. 0.6 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei Säuglingen auf ca. 1.0 bzw. 0.2 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei Erwachsenen ab. Interessanterweise wurde ein recht stabiles Verhältnis zwischen der D-Galaktose- R_a und der D-Galaktitol-Ausscheidung beobachtet. Es lag im Mittel bei 2.1 ± 0.2 (Bereich 1.8 - 2.5). Das Verhältnis der Ausscheidung von D-Galaktitol und D-Galaktinat war ebenfalls recht konstant und lag im Mittel bei 4.4 ± 0.6 (Bereich 3.6 - 5.9). Bei allen Patienten war die renale D-Galaktose-Ausscheidung vernachlässigbar gering und betrug $< 3.5\%$ der D-Galaktose- R_a .

Im Allgemeinen wurde bei Patienten eine messbare D-[1- ^{13}C]Galaktose-Oxidation (extra $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bis zu 0.2 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG) gefunden. Allerdings konnte bei den Patienten die Ganzkörper-D-Galaktose-Oxidation nicht berechnet werden, da - im Gegensatz zu den Studien bei den Gesunden - während der Messperiode keine steady state Bedingungen im $^{13}\text{CO}_2$ der Exhalationsluft erreicht wurden.

Sowohl die D-Galaktose- R_a als auch die Ausscheidung von D-Galaktitol und D-Galaktinat (= y) waren statistisch hoch signifikant ($p < 0.001$) invers mit dem Alter (= t) der Patienten korreliert. Bei einer Anzahl getesteter Funktionsmodellen konnten die Ergebnisse (mittels nicht-linearer Regressionsanalyse) am besten an das folgende einfache Exponentialfunktionsmodell angepasst werden (s. Abb. 2):

$$y = y_0 + a^{-bt}$$

Bei diesem Modell gibt y_0 einen mittleren Schätzwert für Erwachsene und $\Sigma (y_0 + a)$ einen mittleren Schätzwert für Säuglinge. Auf der Grundlage der experimentellen Daten ergaben sich mit dem Modell folgende Umsatzraten für Säuglinge: D-Galaktose- R_a 5.7 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG, D-Galaktitol-Ausscheidung 2.9 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG und D-Galaktinat-Ausscheidung 0.8 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG. Für

Erwachsene lagen die entsprechenden Schätzwerte bei 1.9, 0.8 und 0.2 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG.

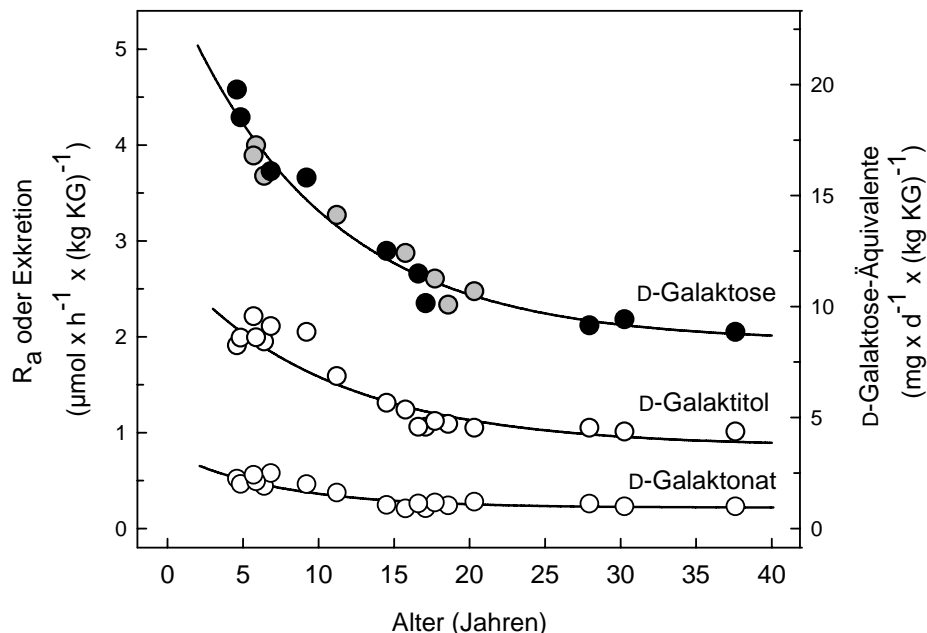


Abb. 2: Die Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Freisetzung (R_a) und die renale Ausscheidung von D-Galaktitol bzw. D-Galaktonat bei einem Q188R-homozygoten Galaktosämie-Patienten. Die Stoffwechselumsatzraten wurden während der *in vivo* D-Galaktose-Umsatzmessung unter postabsorptiven Bedingungen mit D-[1- ^{13}C]Galaktose (priming mit 5.5 $\mu\text{mol/kg KG}$ und kontinuierliche Infusion mit 0.8 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG; graue Punkte: 1.5fache Dosierung) ermittelt. Die D-Galaktose- R_a (Freisetzungsrates in das Plasma-Kompartiment) wurde anhand der ^{13}C -Isotopenverdünnung im Plasma errechnet. Die Ausscheidungsrate von D-Galaktose und D-Galaktonat wurde mittels Analyse des Spontanurins bestimmt. Die experimentellen Daten konnten mittels nicht-linearer Regression sehr gut an das einfache Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$ angepasst werden (x = Alter in Jahren, y = Umsatzraten). Durchgezogene Linien: Regressionskurven (Koeffizienten (\pm SE): Für D-Galaktose: $y_0 = 1.95 (\pm 0.15)$, $a = 3.79 (\pm 0.24)$, $b = 0.102 (\pm 0.016)$, $Sy/x = 0.16$, $r = 0.931$, $p < 0.0001$; Für D-Galaktitol: $y_0 = 0.85 (\pm 0.16)$, $a = 2.11 (\pm 0.24)$, $b = 0.10 (\pm 0.03)$, $Sy/x = 0.16$, $r = 0.943$, $p < 0.0001$; Für D-Galaktonat $y_0 = 0.20 (\pm 0.03)$, $a = 0.64 (\pm 0.13)$, $b = 0.13 (\pm 0.04)$, $Sy/x = 0.05$, $r = 0.920$, $p < 0.0001$).

Im D-Galaktitol und D-Galaktonat des Urins wurde keine oder vernachlässigbar geringe ^{13}C -Anreicherung gefunden. Daher stammte das im Urin gemessene D-Galaktonat und D-Galaktitol praktisch nur aus der endogenen D-Galaktose. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Summe aus D-Galaktose- R_a plus D-Galaktitol- und D-Galaktonat-Ausscheidungsrate (= totale D-Galaktose-Freisetzungsrates) einen Minimum-Schätzwert für die Ganzkörper-D-Galaktose-Bildung darstellt.

Die totalen D-Galaktose-Freisetzungsraten sind in Abbildung 3 für die einzelnen Patienten wiedergegeben. Die mit dem obigen Modell ermittelten Schätzwerte für die totale D-Galaktose-Freisetzung nehmen exponentiell von ca. 9.5 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei Neugeborenen mit Galaktosämie auf ca. 3.0 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei erwachsenen Patienten mit Galaktosämie ab. Dies entspricht bei Säuglingen einer Menge von ca. 40 mg D-Galaktose-Äquivalenten/Tag pro kg KG und bei Erwachsenen ca. 12 mg/Tag pro kg KG.

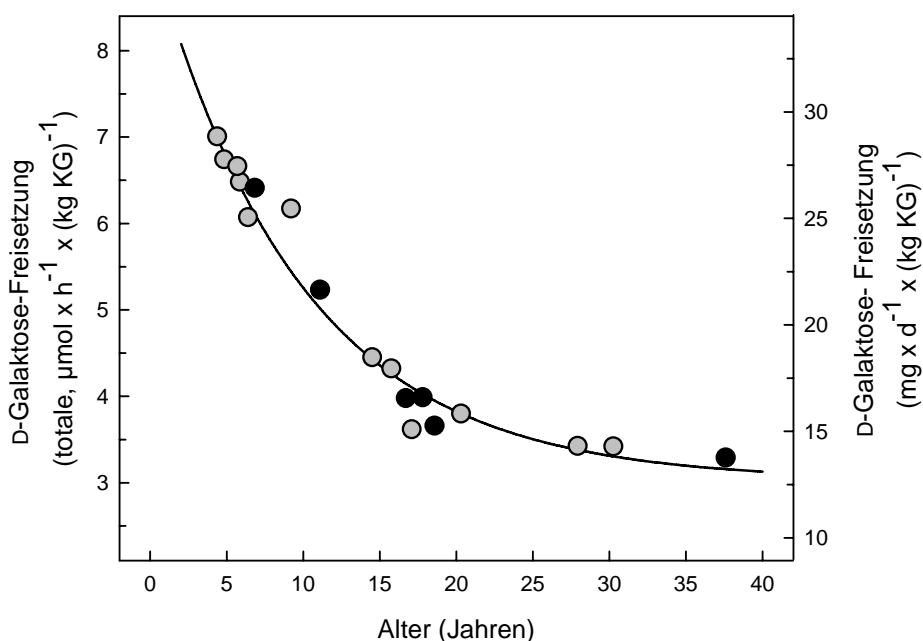


Abb. 3: Die Altersabhängigkeit der totalen endogenen D-Galaktose-Bildung bei Q188R-homozygoten Galaktosämie-Patienten. Die Freisetzungsraten wurden während der *in vivo* Umsatzmessung mittels dem primed continuous infusion-Verfahren mit D-[1- ^{13}C]Galaktose als Substrat ermittelt. Die weiblichen Patienten sind mit grauen Punkten und die männlichen Patienten mit schwarzen Punkten dargestellt. Die Summe aus der D-Galaktose-Freisetzungsrates (R_a) und der Ausscheidungsrate von D-Galaktitol und D-Galaktonat ergibt die totale endogene D-Galaktose-Freisetzungsrates (s. Abb. 2 und Text). Durchgezogene Linie: Regressionskurven nach Anpassung an das Exponentialfunktionsmodell (Koeffizienten (\pm SE): Für D-Galaktose: $y_0 = 3.03 (\pm 0.24)$, $a = 6.45 (\pm 0.41)$, $b = 0.10 (\pm 0.02)$, $Sy/x = 0.27$, $n = 18$, $r = 0.983$, $p < 0.0001$).

7.4 Diskussion

Zur Methodik

Um den möglichen Einfluss einer genotypischen Variabilität auszuschließen, wurden in dieser Studie ausschließlich Galaktosämie-Patienten untersucht, die

eine Homozygotie für die häufigste Q188R-Mutation aufwiesen. Bei allen Patienten wurde in den Erythrozyten vergleichbar geringe ($\leq 1\%$ der Norm) GALT-Aktivität nachgewiesen. Vor der Untersuchung wurden die Konzentrationen der D-Galaktose-Metabolite im Plasma sowie des D-Galaktose-1-Phosphats in den Erythrozyten bestimmt. Diese Daten zeigten, dass die diätetische Stoffwechseleinstellung der Patienten gut bis befriedigend war. Die untersuchten Patienten haben phänotypisch die schwere Form der klassischen Galaktosämie und wiesen eine vergleichbare Stoffwechseleinstellung auf. Somit stellen sie ein einheitliches Patientenkollektiv dar.

Die *in vivo* D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen wurden bei Patienten im postabsorptiven Zustand nach Übernachtfasten durchgeführt, um eine Verfälschung durch eine diätabhängige (versteckte) D-Galaktose-Zufuhr soweit wie möglich auszuschließen (Acosta & Gross, 1995; Schadewaldt et al., 2003). In der Tat wurden bei diesen Untersuchungen keine Hinweise auf einen Einfluss der mit der Nahrung aufgenommenen D-Galaktose festgestellt. Obwohl eine beträchtliche Menge an natürlich markierter D-Galaktose und D-Galaktitol durch die Nieren ausgeschieden wurde, blieben die Konzentrationen dieser Metabolite im Plasma während der gesamten Untersuchungszeit (7 h) konstant. Daher kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass die im Plasma gemessene Konzentration von D-Galaktose-Metaboliten letztlich aus Nahrungsquellen stammte. Wäre dies der Fall gewesen, so hätte die Konzentration dieser Metabolite während der Untersuchung signifikant abnehmen müssen.

Wesentliche Voraussetzung für zuverlässige Quantifizierung von Freisetzungsraten (rate of appearance, R_a) und renalen Ausscheidungsraten aus dem primed continuous infusion-Versuch ist die Einstellung stabiler steady state Bedingungen (Thompson et al., 1989). Bei den Stoffwechselumsatzmessungen wurden Blut- und Atem-Proben über einen längeren (3 h) Beobachtungszeitraum und relativ oft ($n= 7 - 13$) gewonnen, um die Einstellung der apparenten steady state Bedingungen mit statistischen Methoden analysieren zu können. Tatsächlich zeigten (lineare) Korrelationsanalysen der Daten, dass sich in D-Galaktose und in D-Galaktitol des Plasmas keine signifikante, zeitabhängige Änderung der

Konzentration und der ^{13}C -Markierung festzustellen war. Zu D-Galaktonat im Plasma liegen keine Daten vor, da zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine geeignete Methode zur Verfügung stand. Im D-Galaktonat des Urins wurde nur eine sehr geringe ^{13}C -Anreicherung festgestellt. Daher kann angenommen werden, dass Konzentration und ^{13}C -Anreicherung des D-Galaktonats im Plasma, wie bei D-Galaktose und D-Galaktitol, weitgehend konstant war.

In Erythrozyten blieb die Konzentration von natürlich markiertem D-Galaktose-1-Phosphat während der gesamten Untersuchungszeit konstant. Während der 3stündigen Messphase stieg die totale Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat durch Akkumulation von ^{13}C -markiertem D-Galaktose-1-Phosphat an. Ein statistisch hoch signifikanter, zeitabhängig linearer Anstieg der ^{13}C -Anreicherung im D-Galaktose-1-Phosphat wurde bei allen Patienten gefunden. Dagegen konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der totalen D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration nur bei einigen Patienten festgestellt werden. Diese offensichtliche Diskrepanz ist vermutlich vor allem darauf zurückzuführen, dass der Anstieg des ^{13}C -markierten D-Galaktose-1-Phosphats im Vergleich zur totalen D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration sehr gering war. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Bestimmung der $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Anreicherung als Verhältnis $m/z (329) / m/z (328)$ analytisch wesentlich präzise möglich ist, als die eine GC/MS-Konzentrationsbestimmung mittels internen Standard.

Die aufwendige Analyse des D-Galaktose-1-Phosphats in den Erythrozyten hat folgende Hintergründe: Bei den Patienten lag (intrazellulär) die Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten im Mittel bei $143 \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$ und war somit etwa 50fach höher als die mittlere D-Galaktose-Konzentration im Plasma. Beim Menschen ist das Verhältnis vom Intrazellulär- zum Extrazellulär-Raum 2:1. Intrazellulär wird D-Galaktose durch die Galaktokinase-Reaktion praktisch vollständig in D-Galaktose-1-Phosphat umgewandelt. Daraus kann abgeleitet werden, dass bei den untersuchten Patienten der Ganzkörper-D-Galaktose-1-Phosphat-Pool etwa 200fach größer als der freie D-Galaktose-Pool war. Selbst wenn nur eine geringe Menge an D-Galaktose aus dem vergleichsweise großen Pool von D-Galaktose-1-Phosphat-Pool freigesetzt würde,

könnte das bereits zu signifikanten Veränderung in der Größe des freien D-Galaktose-Pools führen. Daher wäre es vorstellbar, dass *in vivo* D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen mit stabilen Isotopen eine apparente D-Galaktose-Freisetzung (R_a) in das Plasma ausschließlich auf einem extra- / intrazellulären D-Galaktose-Cycling beruht: Die ^{13}C -markierte D-Galaktose, infundiert in vergleichsweise geringen Mengen, wird in den intrazellulären Raum aufgenommen und zu ^{13}C -markiertem D-Galaktose-1-Phosphat umgewandelt. Zum Ausgleich könnte natürliche D-Galaktose aus den Zellen in das Plasma freigesetzt werden. Die Analysen der Konzentration und ^{13}C -Anreicherung in den Plasma-Metaboliten alleine - ohne entsprechende Analyse der intrazellulären Metabolite - sind nicht ausreichend, um zwischen einem Cycling-abhängigen D-Galaktose-Austausch und einer Netto-Freisetzung von D-Galaktose aus dem intrazellulären Raum zu unterscheiden.

Hier konnte ein Cycling-Artefakt aus folgenden Gründen weitgehend ausgeschlossen werden: (1) Zwischen der D-Galaktose- R_a und der D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten bestand keine Korrelation. (2) Während der gesamten Untersuchungszeit blieb die Konzentration von natürlich markiertem D-Galaktose-1-Phosphat konstant. (3) Die totale D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration wurde nur durch die Akkumulation des ^{13}C -markierten D-Galaktose-1-Phosphats erhöht (entspricht dem Gleichgewicht der D-Galaktokinase-Reaktion unter physiologischen Bedingungen) (4) Durch die Erhöhung der Infusionsrate von ^{13}C -markierter D-Galaktose wurde die gemessene D-Galaktose-Freisetzungsrates (R_a) nicht beeinflusst. (5) Der fehlende oder sehr geringe Einbau von ^{13}C -Markierung in D-Galaktitol und D-Galaktonat deutet daraufhin, dass infundierte D-[1- ^{13}C]Galaktose von extrahepatischen Gewebe praktisch nicht aufgenommen wurde. Diese Beobachtung steht vermutlich nicht im Widerspruch zu zahlreichen anderen Studien, bei denen nach D-Galaktose-Belastung eine erhöhte renale Ausscheidung von D-Galaktose und D-Galaktitol bestimmt wurden, weil in diesen Studien weit höhere D-Galaktose-Dosierungen appliziert wurden (Bergren et al., 1972; Roe et al., 1973; Ng et al., 1975; Sitzmann et al., 1977; Schwarz et al., 1985; Wehrli et al., 1997, Palmieri et al., 1999) als in der vorliegenden Untersuchung. Aus diesen Überlegungen kann angenommen

werden, dass die mit der primed continuous infusion-Methode bestimmte D-Galaktose-Freisetzungsrates (R_a) tatsächlich ein Maß für die Rate der systemischen D-Galaktose-Freisetzung darstellt.

Bei gesunden Probanden wurde ein apparenter steady state der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation in der Regel innerhalb von 2.5 h nach dem Beginn der D-[1- ^{13}C]Galaktose-Infusion erreicht. Dagegen wurde bei Patienten im Allgemeinen keine steady state Phase der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation festgestellt. Fast bei allen Patienten wurde ein mit der Zeit im Wesentlichen linearer Anstieg der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bestimmt. Der Unterschied zu den Gesunden ist vermutlich dadurch zu erklären, dass bei Patienten nur eine geringe Menge an D-Galaktose oxidiert wird, und somit nur wenig CO_2 freigesetzt wird. Demgegenüber werden beträchtliche Mengen an natürlichem CO_2 aus dem viel größeren Hydrogencarbonat-Pool freigesetzt. Daher kann sich ein Gleichgewicht zwischen dem natürlichen und dem ^{13}C -markierten CO_2 während der 5.5stündigen Infusionszeit nicht einstellen. Theoretisch kann dieses Problem vermieden werden, in dem der Hydrogencarbonat-Pool durch das Priming mit $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ aufgefüllt wird (Allsop et al., 1978). Dieser Versuchsansatz wurde bei der Planung dieser Studie bewusst nicht gewählt, da zwischen der erwarteten geringen $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation aus der Oxidation von ^{13}C -markierter D-Galaktose und einer $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation aus dem markiertem $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ letztlich nicht unterschieden werden kann. Mit der Bestimmung der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation sollte jedoch eine geringe D-Galaktose-Oxidation bei Patienten erfasst werden. Letztlich konnte die gesamte D-Galaktose-Oxidation des Ganzkörpers jedoch nicht bestimmt werden, da sich im $^{13}\text{CO}_2$ der Exhalationsluft keine steady state Phase einstellte. Auf jeden Fall zeigt aber die bei allen Patienten bestimmter signifikanter Anstieg der $^{13}\text{CO}_2$ -Freisetzung, dass bei Q188R-Homozygotie *in vivo* D-Galaktose-Oxidation stattfindet. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der hier gefundenen, geringen residualen GALT-Aktivität der Patienten (s. Tabelle 2).

Zur Bildung endogener D-Galaktose

Um die Frage einer Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Bildung bei Patienten mit Galaktosämie zu klären, wurden D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen durchgeführt. Hier sollte die wichtige Frage

geklärt werden, ob die endogene D-Galaktose-Freisetzung von der Wachstumsrate abhängig ist. Die in dieser Studie erhobenen Befunde zeigen deutlich, dass die D-Galaktose- R_a mit zunehmendem Alter der Patienten abnimmt. Die Ergebnisse konnten sehr gut an ein einfaches Funktionsmodell angepasst werden. Das Modell geht von einer exponentiellen Abnahme der D-Galaktose-Freisetzung mit dem Alter und dem Erreichen eines konstanten Wertes im Erwachsenenalter aus. Vermutlich stammt die endogen freigesetzte D-Galaktose primär aus zwei Quellen. Eine bestimmte basale Menge von D-Galaktose wird generell beim Abbau von Glykoproteinen und -Lipiden im Rahmen des Erhaltungsstoffwechsels gebildet. Zusätzlich kann eine von der Wachstumsrate abhängige Menge aus dem (zusätzlichen) Umsatz von Glykoproteinen und -Lipiden freigesetzt werden.

Die renalen Ausscheidungsraten von D-Galaktitol und D-Galaktonat nahmen, parallel zu der D-Galaktose- R_a altersabhängig ab, allerdings mit niedrigeren Raten. Die renale Ausscheidung von D-Galaktitol lag bei 50%, die des D-Galaktonats bei 10% der systemischen D-Galaktose- R_a . Diese Relationen wiesen eine überraschend geringe Variabilität auf und waren offensichtlich unabhängig vom Alter der Patienten. Diese Befunde zeigen, dass die aus den endogenen Quellen freigesetzte D-Galaktose mit recht konstanten Raten über verschiedene Abbauewege der D-Galaktose intrazellulär verstoffwechselt wird.

D-Galaktitol ist ein Endprodukt beim D-Galaktose-Stoffwechsel (Weinstein & Segal, 1968), wird weiter nicht verstoffwechselt und über die Nieren ausgeschieden. Bei den Stoffwechselumsatzmessungen wurde in Plasma und Urin im D-Galaktitol keine ^{13}C -Markierung nachgewiesen. Daraus kann abgeleitet werden, dass aus infundierter D-[1- ^{13}C]Galaktose kein D-Galaktitol gebildet wurde. Da die Konzentration von D-Galaktitol während der gesamten Untersuchungszeit im Plasma konstant blieb, muss daher die Ausscheidungsrate des D-Galaktitols im Urin der Ganzkörper-D-Galaktitol-Produktionsrate entsprechen.

Ob die renale Ausscheidungsrate von D-Galaktonat auch der Ganzkörper-D-Galaktonat-Produktionsrate entsprechen, ist unklar. Zwar wurde die Bildung von

D-Galaktonat bei Galaktosämie bereits vor 35 Jahren beschrieben (Roe et al., 1973), doch ist nicht geklärt worden, ob D-Galaktonat vollständig über die Nieren ausgeschieden oder auch über den sogenannten D-Galaktonat-Weg oxidiert werden kann (Cuatrecasas & Segal, 1966). Die bisher verfügbaren experimentellen Resultate deuten darauf hin, dass beim Menschen die D-Galaktose-Elimination über den D-Galaktonat-Oxidationsweg, wenn überhaupt, nur geringe Bedeutung haben dürfte (Holton et al., 2001).

Aus den obigen Befunden wird deutlich, dass für die Quantifizierung der totalen endogenen D-Galaktose-Bildung bei Patienten nicht nur die systemische D-Galaktose- R_a , sondern auch die renalen Ausscheidungsraten von D-Galaktitol und D-Galaktonat berücksichtigt werden müssen. Die in dieser Studie ermittelten Daten zur totalen D-Galaktose-Freisetzung liegen jedoch vermutlich deutlich unter der tatsächlichen endogenen Produktion von freier D-Galaktose im gesamten Organismus.

Da intrazelluläre D-Galaktose-Stoffwechselraten - insbesondere der oxidative Abbau - in extrahepatischen Geweben bisher experimentell nicht erfasst werden können, kann die wahre Ganzkörper-D-Galaktose-Bildung bei Galaktosämie-Patienten prinzipiell nicht quantitativ erfasst werden. Dass die peripheren Gewebe eine aktive Rolle beim Stoffwechselumsatz der endogenen D-Galaktose spielen, zeigt die Freisetzung von natürlich markierten D-Galaktose, D-Galaktitol und D-Galaktonat. Der aktive D-Galaktose-Stoffwechsel in extrahepatischen Geweben erklärt vermutlich die sehr niedrige D-Galaktose-Freisetzung bei gesunden Erwachsenen.

Da die Konzentrationen der D-Galaktose-Metabolite im Blut während der Stoffwechselumsatzmessung konstant blieben, und da über die Nieren vernachlässigbar geringe Mengen an D-Galaktose ausgeschieden wurden, kann angenommen werden, dass die systemisch in das Blut-Kompartiment freigesetzte D-Galaktose in der Leber verstoffwechselt wurde. Demzufolge sollte die Eliminationskapazität der Leber für die D-Galaktose zumindest gleich, vermutlich aber größer als die gemessene D-Galaktose- R_a sein.

Quantitative Aspekte der endogenen Galaktose-Bildung

Mit oben erwähnten Funktionsmodell wurden Stoffwechselumsatzraten für D-Galaktose bei erwachsenen Q188R-homozygoten Patienten abgeschätzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

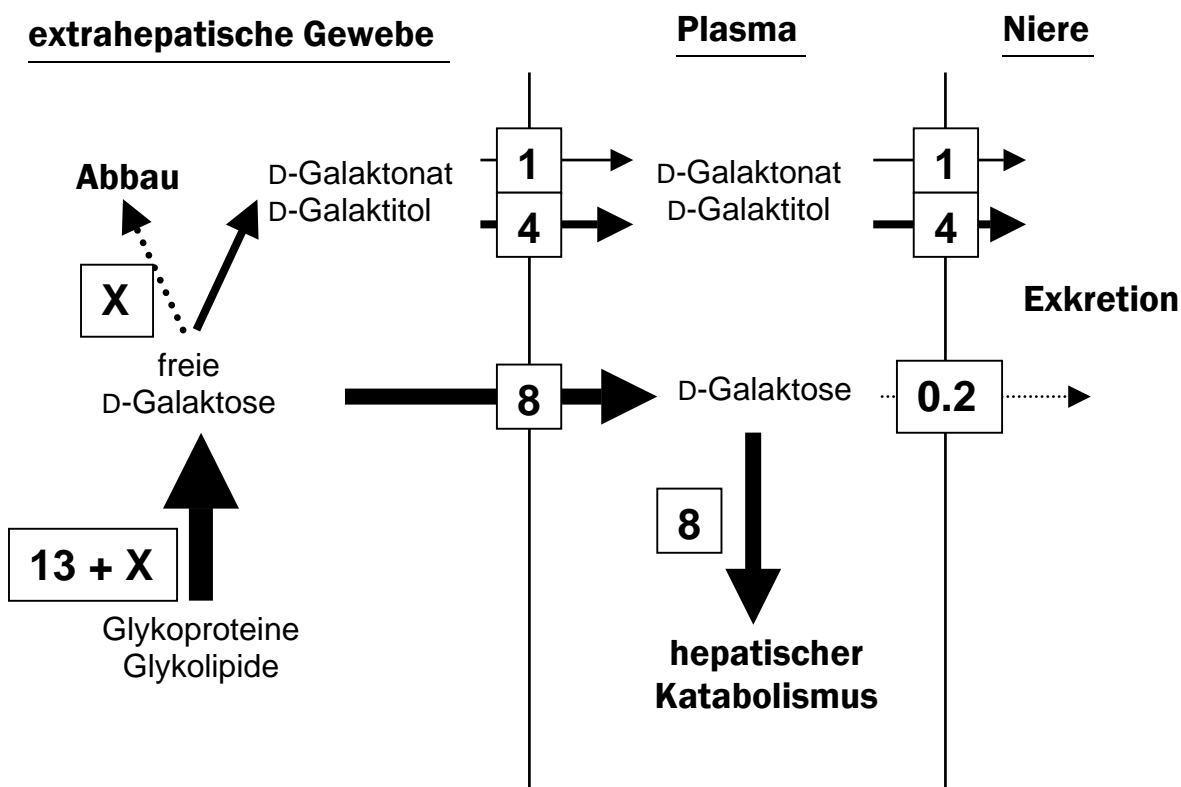


Abb. 4: Quantitative Aspekte der endogenen D-Galaktose-Bildung und der Galaktosehomöostase bei postabsorptiven erwachsenen Patienten mit klassischer Galaktosämie. X entspricht der bisher unbekannt Menge an endogener D-Galaktose, die direkt in den Zellen abgebaut wird. Flussraten sind in D-Galaktose-Äquivalenten angegeben.

Aus peripheren Geweben wurden ca. 5 mg D-Galaktose-Äquivalente/Tag pro kg KG nach vorheriger intrazellulären Umwandlung zu D-Galaktitol (4 mg D-Galaktose-Äquivalente) und D-Galaktonat (1 mg D-Galaktose-Äquivalente) an die Zirkulation abgegeben und anschließend über die Nieren ausgeschieden. Etwa 8 mg D-Galaktose/Tag pro kg KG wurden direkt in das Plasma-Kompartiment freigesetzt und in der Leber verstoffwechselt. Aus diesen Daten ergibt sich, dass bei einem Patienten mit 70 kg Körpergewicht die totale endogene D-Galaktose-Bildung mehr als 0.9 g pro Tag betragen sollte.

In allen Geweben und Zellen wird D-Galaktose im Allgemeinen über den Leloir-Weg verstoffwechselt. Bei allen Patienten wurde eine geringe, aber messbare residuale GALT-Aktivität in den Erythrozyten nachgewiesen. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass ein - experimentell nicht bestimmbarer - Anteil X direkt in den Zellen nach der Freisetzung aus Glykoproteinen und -Lipiden noch am Entstehungsort abgebaut wird.

Hinweise auf die Größe der intrazellulären Abbaurate können vielleicht aus Ergebnissen von D-[1-¹³C]Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen bei drei erwachsenen Patienten mit Galaktokinase-Mangel (GALK) abgeleitet werden. Bei diesen Patienten war keine residuale Aktivität der D-Galaktokinase in den Erythrozyten nachweisbar. Somit sollte bei diesen Patienten der Abbau von D-Galaktose praktisch vollständig blockiert sein. Die wesentlichen Ergebnisse aus den Untersuchungen dieser sehr kleinen Zahl von Patienten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: D-Galaktose-Stoffwechselumsatzraten *in vivo* bei Patienten mit Galaktokinase-Mangel^a

Patienten	endogene D-Galaktose		D-Galaktitol	D-Galaktonat	totale D-Galaktose Bildung ^b
	Freisetzungs-Rate (R _a)	renale Ausscheidung	renale Ausscheidung	renale Ausscheidung	
in $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{h}^{-1}$					
P1	4.34	3.56	4.80	0.99	10.13
P2	2.90	2.42	2.48	0.56	5.94
P3	3.84	1.75	4.91	0.74	9.49

^a Keine nachweisbare GALK-Aktivität in den Erythrozyten; Umsatzraten wurden wie bei den GALT-Patienten experimentell ermittelt (vgl. Material und Methoden).

^b Minimum Schätzwert (s. Text) ergibt sich als Summe von D-Galaktose plus D-Galaktitol- und D-Galaktonat-Ausscheidung.

Die endogene D-Galaktose-Freisetzungsrate (R_a) lag hier im Mittel bei 3.7 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG. Die Ausscheidungsrate von D-Galaktitol betrug etwa 4.1 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG, die von D-Galaktonat 0.8 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG. Diese Daten zeigen, dass bei diesen Patienten mindestens 40 mg/Tag pro kg KG an endogener D-Galaktose

gebildet wurde. Dies entspricht einer endogenen D-Galaktose-Freisetzung von etwa 2.5 g pro Tag bei einem 70 kg schweren Patienten mit GALK-Mangel. Die totale endogene D-Galaktose-Freisetzung ist damit fast 3fach höher als bei Patienten mit GALT-Mangel.

Sowohl bei Patienten mit GALT-Mangel als auch bei Patienten mit GALK-Mangel sollte intrazellulär die gleiche Menge an freier D-Galaktose beim Abbau von Glykoproteinen und -Lipiden entstehen. Da sich die endogene D-Galaktose-Freisetzungsraten bei den Patienten mit GALK-Mangel von den Patienten mit GALT-Mangel deutlich unterscheidet, ist es wahrscheinlich, dass die totale Ganzkörper-D-Galaktose-Bildung bei Patienten mit GALT-Mangel bei den *in vivo* Untersuchungen unterschätzt wird. Möglicherweise beträgt der analytisch nicht fassbare Anteil an endogener D-Galaktose, der direkt in den Zellen abgebaut wird, bei erwachsenen Q188R-homozygoten Patienten mehr als 20 mg/Tag pro kg KG. Berücksichtigt man die obigen Befunde, kann angenommen werden, dass bei den Q188R-homozygoten Galaktosämie-Patienten ca. 60% der endogen freigesetzten D-Galaktose intrazellulär in den Geweben verstoffwechselt und ca. 40% als D-Galaktose-Metabolite an das Blut-Kompartiment abgegeben werden.

Im Vergleich zu den erwachsenen Patienten wurde bei den Q188R-homozygoten Kleinkindern eine mehrfach erhöhte endogene D-Galaktose-Freisetzungsraten gefunden. Es erhebt sich die Frage, ob dieses eher auf eine erhöhte endogene Bildung oder aber auf einen geringeren intrazellulären D-Galaktose-Abbau zurückzuführen ist. Die zweite Erklärung ist allerdings sehr unwahrscheinlich, weil die residualen GALT-Aktivitäten bei Kleinkindern und erwachsenen Patienten durchaus vergleichbar waren und darüber hinaus keine Hinweise auf irgendwelche altersabhängige Veränderungen der GALT-Aktivität in menschlichen Geweben - einschließlich in Leber - gibt (Holton et al., 2001).

Mit dem Exponentialfunktionsmodell wurde bei Säuglingen 3- bis 4fach höhere Freisetzungsraten von D-Galaktose-Metaboliten als bei Erwachsenen geschätzt. Für Säuglinge lagen die Schätzwerte für die D-Galaktose- R_a , für die D-Galaktitol-Ausscheidung und D-Galaktonat-Ausscheidung bei 25, 13 und 4 mg D-Galaktose-

Äquivalenten/Tag pro kg KG. Daraus ergab sich eine totale D-Galaktose-Freisetzungsrate von etwa 42 mg/Tag pro kg KG. Bei erwachsenen Patienten lag dagegen die mittlere totale D-Galaktose-Freisetzungsrate bei ca. 13 mg/Tag pro kg KG. Berücksichtigt man die intrazellulär oxidativ verstoffwechselte D-Galaktose, bei Säuglingen - wie auch bei erwachsenen Patienten - ca. 20 mg/Tag pro kg KG (s. oben), dann kann die totale endogene D-Galaktose-Bildungsrate bei Säuglingen etwa 60 mg/Tag pro kg KG betragen und wäre somit etwa doppelt so hoch wie bei erwachsenen Patienten. Diese Überlegungen zeigen, dass zur Aufklärung der Altersabhängigkeit totaler D-Galaktose-Bildungsrate im Körper weitere Untersuchungen notwendig sind. Experimentell könnte die hier vermuteten unterschiedlichen Relationen von totaler D-Galaktose-Bildung und D-Galaktose-Freisetzung bei Säuglingen im Vergleich zu Erwachsenen, durch D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen bei Säuglingen bzw. Kleinkindern mit einem vollständigen Block der D-Galaktose-Verwertung, z.B. jüngere Patienten mit einem kompletten Ausfall der D-Galaktokinase-Aktivität, verifiziert werden.

Auf jeden Fall zeigen die Daten eindeutig, dass bei Säuglingen und Kleinkindern die Belastung durch die endogene D-Galaktose viel höher als bei Erwachsenen ist. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass bei Säuglingen das Lebergewebe (bezogen auf eine vergleichbare Lebermasse) etwa 3mal mehr endogene D-Galaktose aus extrahepatischen Quellen abbaut als das Lebergewebe bei erwachsenen Patienten. Daher wird die Leber im Erwachsenenalter weniger mit endogener D-Galaktose belastet. Da sich die Kapazität des Lebergewebes (i.e. GALT-Aktivität/g_{Leber}) für die D-Galaktose-Elimination mit dem Alter nicht signifikant ändert, dürfte bei erwachsenen Patienten die Toleranz für exogen mit der Nahrung zugeführte D-Galaktose höher als bei Säuglingen liegen.

Schätzt man auf der Grundlage der hier erhobenen Daten die D-Galaktose-Toleranz für erwachsene Q188R-homozygote Patienten ab, so ergibt sich eine Toleranz von etwa 20 mg/Tag pro kg KG, entsprechend > 1 g D-Galaktose pro Tag bei 70 kg KG. Dieser Schätzwert stimmt recht gut mit den Ergebnissen einer kürzlich durchgeführten D-Galaktose-Toleranz-Studie überein. (Bosch et al., 2002). Bei dieser Untersuchung wurde Q188R-homozygoten erwachsenen

Patienten bis zu 0.6 g D-Galaktose pro Tag zusätzlich zu ihrer normalen Diät für zwei Wochen verabreicht. Dabei blieben die klinischen und biochemischen Parameter unverändert. Wir bereiten zur Zeit eine mehrmonatige Studie vor, in der die Langzeit-Toleranz für D-Galaktose bei Patienten mit klassischer Galaktosämie ermittelt werden soll.

Schlussfolgerungen

Die hier erhobenen Befunde zur endogenen D-Galaktose-Bildung bei Q188R-homozygoten Patienten mit Galaktosämie zeigen, dass die D-Galaktose-R_a vom Säuglingen bis zum Erwachsenen - statistisch hochsignifikant - exponentiell abnimmt. Die hohe endogene D-Galaktose-Bildung und die relativ hohe Galaktokinase-Aktivität bei Säuglingen und Kleinkindern im Vergleich zu Erwachsenen dürften ursächlich für die, trotz strikt laktosefreier Diät, zu beobachtenden relativ höheren Konzentrationen von D-Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten bei jüngeren Patienten sein. Aufgrund der Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Bildung erscheint es erforderlich, altersabhängige Zielbereiche zu etablieren, wenn D-Galaktose-1-Phosphat als Parameter für die Kontrolle der Stoffwechseleinstellung bei Galaktosämie (Walter et al., 1999) verwendet werden soll. Die Befunde weisen zudem daraufhin, dass die Belastung durch die endogene D-Galaktose-Bildung mit zunehmendem Alter allmählich bis zum Erwachsenenalter abnehmen sollte. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Toleranz für exogene D-Galaktose mit zunehmendem Alter zunehmen sollte. Diese Überlegung könnte von Bedeutung für zukünftige Empfehlungen zur Diät bei Galaktosämie sein.

Kapitel 8

Endogene Galaktose-Bildung bei compound-heterozygoten Patienten mit klassischer Galaktosämie

Zusammenfassung: Bei einer Gruppe von nicht-Q188R-homozygoten Patienten mit Galaktosämie (n=17; 4-34 Jahre) wurde die endogene D-Galaktose-Bildung untersucht. Alle Patienten hatten eine vergleichbar niedrige GALT-Aktivität (< 1% der Norm) in den Erythrozyten. D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen *in vivo* wurden nach ≥ 10 stündigem Übernachtsfasten und bei guter diätetischer Stoffwechseleinstellung mittels der primed continuous infusion-Methode und mit D-[1- 13 C]Galaktose als Substrat durchgeführt. Die D-Galaktose-Freisetzungsrate (R_a) aus endogenen Quellen nahm mit dem Alter der Patienten ab, und lag in einem Bereich von 4.6 bis 1.7 $\mu\text{mol/h pro kg KG}$. Die Freisetzungsraten von D-Galaktitol und D-Galaktonat nahmen parallel zu der D-Galaktose- R_a ab, und waren niedriger als die D-Galaktose- R_a . Das Verhältnis der Freisetzungsraten von D-Galaktose (R_a) zu D-Galaktitol zu D-Galaktonat lag im Mittel bei 10:5:1. Die totalen D-Galaktose-Freisetzungsraten (die Summe aus D-Galaktose- R_a plus der Freisetzungsraten von D-Galaktonat und D-Galaktitol) konnten mittels nicht linearer Regression am besten ($p < 0.0001$) an das einfache Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-bt)$ (y = totale D-Galaktose, t = Alter) angepasst werden. Dabei ergaben sich folgende Schätzwerte für die Parameter: $y_0 = 3.4 \pm 0.4$, $a = 6.2 \pm 1.7$ und $b = 0.12 \pm 0.05$. Der Wert y_0 entspricht einem mittleren Schätzwert für die totale endogene D-Galaktose-Freisetzung bei erwachsenen Patienten (z.B. etwa 15 mg/Tag pro kg KG), die $\Sigma (y_0 + a)$ gibt einen Schätzwert für die totale endogene D-Galaktose-Freisetzung bei Neugeborenen mit Galaktosämie (z.B. etwa 42 mg/Tag pro kg KG). Die Ergebnisse stimmen ausgezeichnet mit früheren Befunden bei Q188R-homozygoten Patienten überein. Darüber hinaus bestätigen diese Daten, dass bei Patienten mit klassischer Galaktosämie beträchtliche Mengen an D-Galaktose endogen gebildet werden. Schließlich wurde über die mögliche Bedeutung dieser Ergebnisse für eine differenzierte Diätempfehlung bei Galaktosämie diskutiert.

8.1 Einleitung

Bei Galaktosämie ist aufgrund eines angeborenen Enzym-Mangels der Abbau von D-Galaktose über den Leloir-Stoffwechselweg gestört. Häufigste und schwerste Form der Galaktosämie ist der Mangel an D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT, E.C. 2.7.7.10). Diese sog. klassische Galaktosämie (OMIM 230400) hat in Europa eine Inzidenz von ca. 1:45000. Eine strikt laktosefreie Diät ist vor allem bei Neugeborenen erforderlich, um eine Akkumulation von potentiell toxischen D-Galaktose-Metaboliten (D-Galaktose-1-Phosphat, D-Galaktitol) zu vermeiden und die damit verbundenen hepatischen, renalen und neuronalen Schädigungen zu verhindern (Übersicht bei Holton et al., 2001).

Bei Galaktosämie-Patienten persistieren, trotz strengster diätetischer D-Galaktose-Restriktion, erhöhte Konzentrationen von D-Galaktose-Metaboliten, und langfristig können neurologische kognitive Störungen auftreten (Waggoner, 1990; Schweitzer et al., 1993). Schon lange wurde vermutet, dass diese Schädigungen in Sinne einer chronischen Autointoxikation durch endogene Bildung von D-Galaktose, die z.B. beim Abbau von Glykoproteinen und Glykolipiden freigesetzt werden, verursacht werden könnten (Gitzelmann & Steinmann, 1984). Tatsächlich zeigten eigene *in vivo* Stoffwechseluntersuchungen bei Q188R-homozygoten Patienten, dass beträchtliche Mengen an D-Galaktose endogen freigesetzt werden (s. Kap. 7).

Die Q188R-Mutation ist zwar mit 60% die häufigste Mutation bei klassischer Galaktosämie, jedoch werden bei mehr als 50% der Galaktosämie-Patienten kaukasischen Ursprungs nicht-Q188R-homozygote Mutationen gefunden (Holton et al., 2001). Daher war von großem Interesse, ob und in welchem Umfang die Ergebnisse, die bei Q188R-Homozygotie erhoben wurden, auch für Patienten mit anderen Genotypen repräsentativ sind.

Um diese Frage zu klären, wurde in der folgenden Untersuchung die Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Freisetzung mittels *in vivo* D-

Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen bei siebzehn Patienten mit klassischer Galaktosämie zwischen 4 und 34 Jahren mit nicht-Q188R-homozygotem Genotyp durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Befunden bei Q188R-homozygoten Patienten verglichen.

8.2 Material und Methoden

Vorbemerkung

Die hier verwendeten Materialien, wie auch die angewendeten analytischen und statistischen Methoden sind mit den bereits im Kapitel 7 detailliert beschriebenen Methoden identisch. Daher wird bezüglich des Materials und Methoden auf dieses Kapitel verwiesen.

Patienten

Siebzehn Patienten (8 weiblich, 9 männlich) mit D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel (GALT-Mangel) nahmen an den primed continuous infusion-Untersuchungen teil. Alle Patienten wurden in postabsorptivem Zustand nach Übernachtfasten von ≥ 10 Stunden untersucht. Sie waren zwischen 4 und 34 Jahre alt und wiesen, mit einer Ausnahme, compound-heterozygote Mutationen auf. Die charakteristischen klinischen Daten der Patienten mit Galaktosämie sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Charakteristische Daten der Patienten^a

Patienten	Mutationen	Geschlecht (M/W)	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)
Galaktosämie-Patienten					
P1	Q188R/R148W	M	4.4	20	112
P2	Q188R/K285N	M	6.1	16	109
P3	Q188R/R259W	M	8.9	28	133
P4	H319Q/A320T	W	9.7	25	134
P5	Q188R/S297P	W	11.1	26	141
P6	Q188R/R148W	M	11.1	34	143
P7	Q188R/K285N	M	11.3	27	141
P8	D28Y/Q38P	M	14.3	52	177
P9	Q188R/L195P	M	19.7	77	189
P10	H319Q/A320T	W	22.6	51	171
P11	Q188R/K285N	W	23.3	49	164
P12	F117C/L195P	W	25.6	53	163
P13	V151A/K285N	W	26.8	55	165
P14	Q188R/K285N	M	29.8	52	176
P15	Q188R/ Δ N97	W	31.7	57	157
P16	K285N/H319Q	M	33.8	75	169
P17	L195P/L195P	W	34.3	60	172
gesunde Erwachsene ^b					
Mittelwert \pm SD		1 W, 6 M	25 \pm 3	72 \pm 13	178 \pm 10

^a Am Tag der primed continuous infusion-Untersuchung mit D-[1-¹³C]Galaktose. ^b Zum Vergleich angegeben.

8.3 Ergebnisse

Biochemische Charakterisierung der Patienten

Zunächst wurde jeder Patient ausführlich hinsichtlich der biochemischen Galaktosämie-Parameter charakterisiert. Die Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Bei allen Patienten wurde in den Erythrozyten eine geringe residuale Aktivität der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (etwa 0.1 - 0.3 μ mol/h pro g_{Hb}; entspricht < 1.5% der Norm) nachgewiesen. Die D-Galaktose-1-Phosphat-

Konzentration lag im Bereich von 2.0 bis $4.5 \text{ mg} \times \text{dL}_{\text{RBC}}^{-1}$ (78 - $173 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$), war damit wesentlich höher als bei gesunden Erwachsenen ($< 2 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$).

Tabelle 2: Biochemische Charakterisierung der untersuchten Patienten^a

	Erythrozyten (RBC)		Plasma		Urin		Exhalationsluf
	GALT ($\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$)	D-Gal-1-P ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}_{\text{RBC}}$)	D-Galaktose ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	D-Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	D-Galaktose ($\mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Krea}}^{-1}$)	D-Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Krea}}^{-1}$)	¹³ CO ₂ (δ_{PDB} -Werte) ^b
Galaktosämie-Patienten							
P1	0.2	159	3.4	13.3	5.1	234	-27.2
P2	0.1	148	2.7	9.8	6.6	271	-25.6
P3	0.1	81	2.3	10.8	4.3	166	-26.6
P4	0.3	173	2.9	11.2	2.7	153	-28.2
P5	0.1	125	3.1	9.8	7.7	125	-25.5
P6	0.2	151	2.7	9.9	4.0	171	-26.7
P7	0.2	130	2.7	9.2	4.0	161	-27.3
P8	0.3	139	3.1	10.5	5.1	94	-24.5
P9	0.2	104	1.7	7.7	4.7	89	-24.9
P10	0.3	97	2.7	11.4	4.8	127	-27.8
P11	0.2	78	2.5	9.3	5.9	120	-28.5
P12	0.3	129	1.9	9.7	3.2	109	-28.3
P13	0.2	172	2.8	11.8	n.a.	n.a.	-27.3
P14	0.1	163	2.3	14.3	3.6	140	-25.6
P15	0.1	91	2.3	12.5	6.7	182	-27.8
P16	0.2	156	2.9	13.3	3.0	97	-25.7
P17	0.1	127	2.0	10.5	2.5	139	-26.4
gesunde Erwachsene ^c							
MW \pm	23.5 ± 2.2	1.3 ± 0.4	0.20 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.50 ± 0.12	1.44 ± 0.21	-27.3 ± 0.7
SD							

^a Blut-, Spontanurin- und Atem-Proben wurden unmittelbar vor der in vivo Untersuchung gesammelt.

^b Mittelwert aus fünf Atemproben. ^c Zum Vergleich angegeben.

Basal waren die Konzentrationen von D-Galaktose ($2.6 \pm 0.5 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) und D-Galaktitol ($10.9 \pm 1.7 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) im Plasma der Patienten über 10fach bzw. 70fach höher als bei Kontroll-Personen. Im Urin lag die Konzentration von D-Galaktose und D-Galaktitol im Bereich 2.5 bis $7.7 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Krea}}^{-1}$ bzw. 89 bis $271 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Krea}}^{-1}$ und war damit über 10fach bzw. 100fach höher als bei Normalpersonen.

Steady state Bedingungen

Frühere Untersuchungen ergaben, dass nach 2.5 h stabile metabolische und isotopische steady state Bedingungen erreicht waren. Daher wurde bei dieser Studie 2.5 h nach Beginn des Infusionsstarts mit der Probennahme begonnen. Ein typisches Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt.

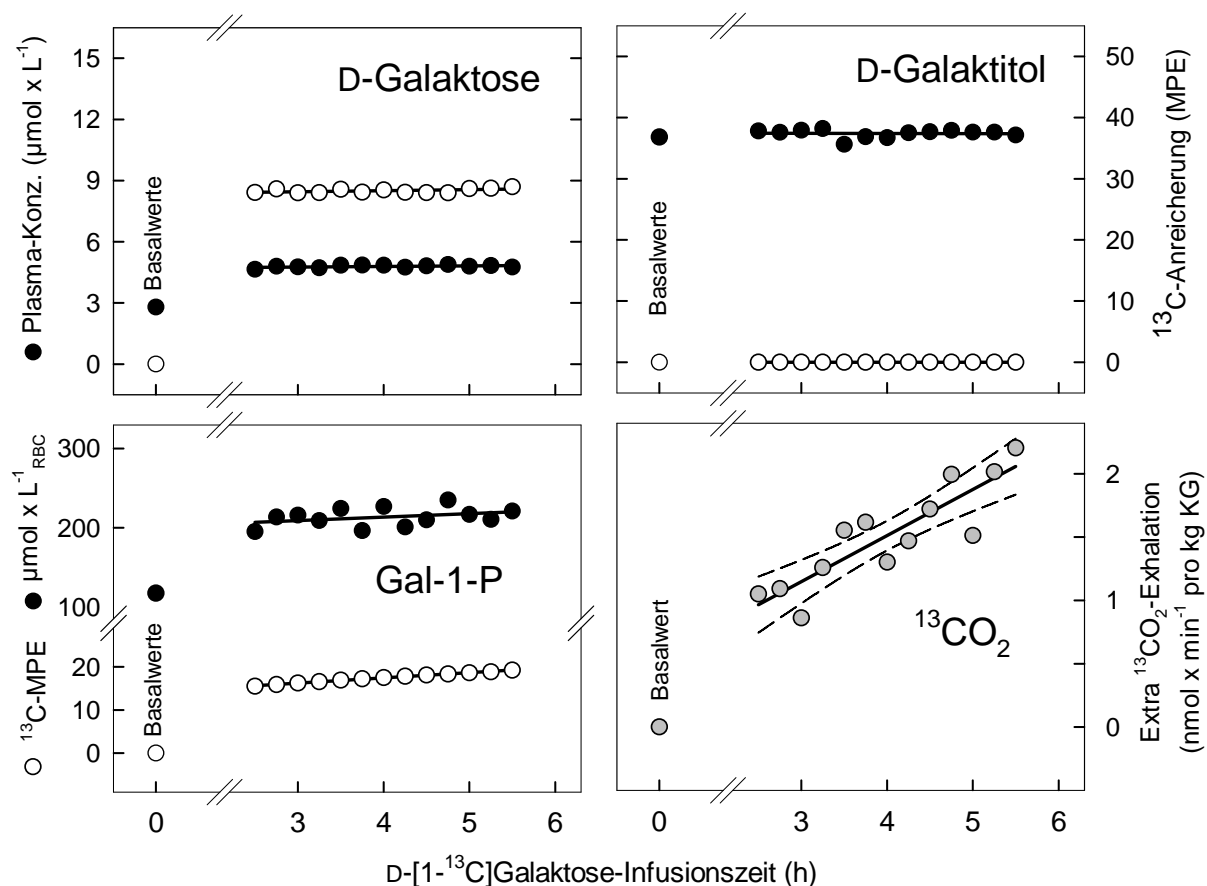


Abb. 1: ^{13}C -Isotopenanreicherung und Konzentrationen von D-Galaktose-Metaboliten im Blut sowie $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bei einem Patienten (P4; Compound-Heterozygotie für H319Q und A320T) während der *in vivo* D-Galaktose-Stoffwechsel-Umsatzmessung. Ein primed continuous infusion-Versuch wurde mit D-[1- ^{13}C]Galaktose als Substrat (priming mit 8 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$ und kontinuierliche Infusion mit 1.2 $\mu\text{mol}/\text{h pro kg KG}$) unter postabsorptiven Bedingungen durchgeführt. Im Plasma wurden ab 2.5 Stunden nach der Tracer-Infusion apparente stabile steady state Bedingungen in den D-Galaktose-Metaboliten erreicht. Während der 3stündigen Messphase wurde eine langsame, aber hoch signifikante ($p < 0.001$) lineare Akkumulation von ^{13}C -Markierung, sowohl im D-Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten (Regressionslinie: $y = 12.6 (\pm 0.1) + 1.21 (\pm 0.02)x$; $y = \text{MPE}$, $x = \text{Stunde}$, $r = 0.998$) als auch in der Exhalationsluft (Regressionslinie: $y = 0.06 (\pm 0.24) + 0.36 (\pm 0.06)x$; $y = ^{13}\text{CO}_2\text{-Exhalation}$, $x = \text{Zeit in Stunde}$, $r = 0.879$) bestimmt.

Tabelle 3: Individuelle Daten der nicht Q188R-homozygoten Patienten aus der *in vivo* D-[1-¹³C]Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung^a

Patienten (Alter)	P1 ^b (4.4)	P2 ^b (6.1)	P3 ^b (8.9)	P4 ^c (9.7)	P5 ^b (11.1)	P6 ^c (11.1)	P7 ^c (11.3)	P8 ^b (14.3)	P9 (19.7)	P10 ^c (22.6)	P11 ^c (23.3)	P12 (25.6)	P13 (26.8)	P14 (29.8)	P15 (31.7)	P16 ^c (33.8)	P17 ^c (34.3)
D-Galaktose im Plasma																	
totale ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	4.19	3.43	2.87	4.79	3.81	4.08	4.00	3.66	2.68	4.05	4.08	3.25	3.55	3.04	3.20	5.35	3.35
SD	0.06	0.09	0.08	0.07	0.11	0.06	0.11	0.11	0.09	0.11	0.11	0.12	0.12	0.14	0.13	0.15	0.11
endogene ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	3.53	2.87	2.19	3.39	3.07	2.94	2.88	3.04	1.87	2.75	2.75	2.19	2.81	2.27	2.48	3.16	2.07
SD	0.06	0.07	0.08	0.05	0.10	0.05	0.09	0.09	0.06	0.07	0.08	0.08	0.10	0.12	0.11	0.10	0.09
¹³ C-Markierung (MPE)	14.8	15.5	21.8	28.3	18.9	27.0	27.0	16.3	29.3	31.3	31.6	31.4	20.2	24.3	21.9	39.5	36.9
SD	0.2	0.5	0.6	0.4	0.6	0.4	0.5	0.5	0.9	0.9	0.6	0.8	0.4	0.7	0.5	0.9	1.0
Plasma-D-Galaktitol $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$	10.1	9.6	11.0	11.2	9.8	9.3	8.7	10.7	7.8	10.7	9.4	9.7	11.1	14.0	12.0	13.4	9.3
SD	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.1	0.3	0.1	0.1	0.9	0.2	0.3	0.4	0.5	0.3	0.3
Gal-1-P in RBC ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	208	197	94	212	138	182	159	160	125	124	108 ^d	160	194	174	104	207	160
SD	13	11	4	13	2	11	6	9	5	10	5	6	14	14	7	12	6
¹³ CO ₂ in der Exhalationsluft																	
Erhöhungsraten ^e ($\Delta\delta\text{PDB} \times \text{h}^{-1}$)	0.78 ^f	0.46 ^f	-0.5	0.17 ^f	0.16	0.52 ^f	0.62 ^f	0.06	0.65 ^f	0.20 ^f	0.57 ^f	0.50 ^f	0.10	0.52 ^f	0.12 ^f	0.42 ^f	0.54 ^f
SE	0.06	0.06	0.09	0.03	0.08	0.04	0.07	0.07	0.06	0.04	0.02	0.07	0.05	0.07	0.04	0.06	0.08
¹³ CO ₂ -Exhalation ^g ($\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)	0.29 ^h	0.18 ^h	0.01	0.11 ^h	0.09	0.24 ^h	0.28 ^h	0.08	0.23 ^h	0.07 ^h	0.17 ^h	0.16 ^h	0.07 ^h	0.21 ^h	0.04	0.12 ^h	0.22 ^h
	(2.2)	(1.3)	(0.2)	(0.9)	(0.7)	(2.1)	(2.2)	(0.8)	(2.7)	(0.7)	(1.7)	(1.6)	(0.8)	(2.1)	(0.5)	(1.5)	(2.4)

Legende s. Seite 126

Die Befunde für jeden Patienten sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Daten zeigen, dass sowohl die Konzentration als auch die ^{13}C -Markierung von D-Galaktose und D-Galaktitol im Plasma stabil blieben. Außerdem blieb die Konzentration des D-Galaktose-1-Phosphats in den Erythrozyten konstant. Während der 3stündigen Messphase lagen die VK's im Mittel $< 5\%$, und waren nie höher als 10% .

Auch eine statistische Korrelationsanalyse (lineare Regression) zeigte, dass die Metabolit-Konzentrationen und die ^{13}C -Markierungen, mit einer Ausnahme (s. Tabelle 3), über die Zeit konstant blieben ($r < \text{oder} \ll 0.6$). Dagegen wurde bei den meisten Patienten ein leichter, statistisch signifikanter Anstieg der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation gefunden.

Bei zehn Patienten, die eine Standard-D-[1- ^{13}C]Galaktose-Infusion von $0.8 \mu\text{mol/h}$ pro kg KG erhalten hatten, stieg die mittlere Konzentration der Plasma-D-Galaktose um $0.8 \pm 0.2 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ über den Basalwert an. Bei den sieben Patienten, die eine 1.5fache Dosierung von $1.2 \mu\text{mol/h}$ pro kg KG erhalten hatten, stieg die Konzentration um $1.6 \pm 0.4 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ über den Basalwert an. Die mittlere ^{13}C -Isotopenanreicherung in der Plasma-D-Galaktose bei Standard-Dosierung lag bei $21.4 \pm 5.6 \text{ MPE}$ und bei 1.5facher Dosierung $31.6 \pm 4.9 \text{ MPE}$. Die Konzentration von D-Galaktitol im Plasma blieb unverändert. Sie lag im Mittel bei 10.5 ± 1.6 ($n=17$) $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$, und es konnte keine ^{13}C -Anreicherung im D-Galaktitol nachgewiesen werden.

Fortsetzung Tabelle 3: Legende

^{a,b} Postabsorptive Patienten erhielten ein Priming ($5.5 \mu\text{mol/kg KG}$) und eine kontinuierliche Infusion von D-[1- ^{13}C]Galaktose ($0.8 \mu\text{mol/h}$ pro kg KG) über 5.5 h. 2.5 h nach dem Beginn der Infusion wurden Proben von EDTA-Blut venös im Abstand von 15^(a) Minuten bzw. 30^(b) Minuten entnommen. Parallel zu den Blutproben wurden Proben der Exhalationsluft gesammelt. Angegeben sind MW \pm SD. Die Alter der Patienten sind in Klammern angegeben.

^c Patienten erhielten eine 1.5fache Dosierung von D-[1- ^{13}C]Galaktose.

^d Statistisch (lineare Regressionsanalyse) signifikanter Anstieg ($p < 0.01$) mit der Zeit ($< 4\%$ des Mittelwerts pro h).

^e Steigung \pm SE (lineare Regressionsanalyse) während der 3stündigen Messphase.

^f Statistisch signifikanter Anstieg ($p < 0.005$).

^g Minimum-Schätzwerte wurden auf der Grundlage des mittleren Anstiegs des $^{13}\text{CO}_2$ -Gehaltes während der letzten Stunde der Infusion berechnet. In Klammern sind die mittleren $\Delta\delta$ -Werte über den Initialwerten angegeben.

^h Statistisch (Wilcoxon-Test) signifikante Erhöhung über den Basalwert ($n=5$, $p < \text{oder} \ll 0.01$).

Bei der Standard-D-[1-¹³C]Galaktose-Infusion lag die Konzentration von D-Galaktose-1-Phosphat im Mittel bei 25 ± 15 ($+19 \pm 10\%$) $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$ über den Basalwert. Bei der 1.5fachen Dosierung betrug der mittlere Anstieg 31 ± 11 ($+27 \pm 6\%$) $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$. Diese Erhöhungen waren auf die Akkumulation von 1-¹³C-markiertem D-Galaktose-1-Phosphat zurückzuführen. Diese lag im Mittel bei 20 ± 5 bzw. 35 ± 10 $\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$. Obwohl bei den meisten Patienten sich während der 3stündigen steady state Phase ein langsamer und kontinuierlicher Anstieg der totalen D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration andeutete, war dies nur bei einem Patienten statistisch signifikant ($p < 0.01$) zu sichern. Im Gegensatz dazu war bei allen Patienten ein hoch signifikanter ($p < 0.001$) linearer Anstieg der ¹³C-Markierung festzustellen. Die Rate des Anstiegs der ¹³C-Markierung betrug bei der Standard-D-[1-¹³C]Galaktose-Infusion 0.7 ± 0.2 MPE/h und bei der 1.5fachen Dosierung 1.2 ± 0.4 MPE/h.

In der ¹³CO₂-Exhalation stellten sich keine steady state Bedingungen ein. Sie stieg kontinuierlich über die Beobachtungszeit an. Während der letzten Stunde der Untersuchung lag der mittlere Anstieg des ¹³C-Gehalts unter Standard-Bedingungen bei 1.3 ± 0.8 $\Delta\delta$ -Werte ($n=10$), bei der 1.5fachen Dosierung 1.6 ± 0.6 $\Delta\delta$ -Werte ($n=7$). Diese Werte entsprachen eine mittlere ¹³CO₂-Exhalationsrate von 0.14 ± 0.09 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG und 0.17 ± 0.08 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG.

Galaktose-Stoffwechselumsatzraten

Aus den Ergebnissen der Tabelle 3 wurden die in Tabelle 4 wiedergegeben Stoffwechselumsatzraten abgeschätzt (vgl. Kap. 7).

Die Freisetzungsrates von D-Galaktose aus endogenen Quellen in das Plasma-Kompartiment (R_a) nahm von ca. 4.6 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei einem 4jährigen auf ca. 2.3 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG im Erwachsenenalter ab. Ähnlicherweise nahmen auch die renalen Ausscheidungsrate von D-Galaktitol und D-Galaktonat von ca. 2.0 bzw. 0.4 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei Kleinkindern auf ca. 1.0 bzw. 0.2 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei Erwachsenen ab. Das Verhältnis zwischen der D-Galaktose- R_a und der D-Galaktitol-Ausscheidung war stabil und lag bei 2.3 ± 0.5 (Bereich $1.7 - 3.6$). Das

Verhältnis der Ausscheidung von D-Galaktitol und D-Galaktonat war ebenfalls recht konstant und lag im Mittel bei 5.0 ± 1.4 (Bereich 3.1 - 8.8). Bei allen Patienten war die renale D-Galaktose-Ausscheidung vernachlässigbar gering. Sie betrug $< 3.5\%$ der D-Galaktose- R_a .

Tabelle 4: D-Galaktose-Stoffwechselumsatzraten *in vivo*^a

Patienten (Alter)	endogene D-Galaktose			D-Galaktitol ^b	D-Galaktonat ^b
	Freisetzungsrate	Oxidation ^c	renale ^b Ausscheidung	Renale Ausscheidung	renale Ausscheidung
	in $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{h}^{-1}$				
Galaktosämie-Patienten					
P1 (4.4)	4.61	2.01	0.06	1.90	0.34
P2 (6.1)	4.36	1.23	0.07	2.31	0.46
P3 (8.9)	2.86	0.04	0.04	1.37	0.29
P4 (9.7)	3.02	0.35	0.04	1.32	0.15
P5 (11.1)	3.42	0.48	0.07	1.50	0.35
P6 (11.1)	3.22	0.81	0.06	1.42	0.30
P7 (11.3)	3.22	0.95	0.05	1.74	0.35
P8 (14.3)	4.10	0.51	0.07	1.14	0.31
P9 (19.7)	1.92	0.69	0.06	1.07	0.30
P10 (22.6)	2.63	0.19	0.05	1.09	0.21
P11 (23.3)	2.57	0.46	0.03	0.91	0.25
P12 (25.6)	1.73	0.44	0.03	0.76	0.16
P13 (26.8)	3.15	0.35	0.05	1.09	0.24
P14 (29.8)	2.48	0.82	0.03	1.05	0.34
P15 (31.7)	2.84	0.18	0.03	0.99	0.13
P16 (33.8)	1.81	0.23	0.03	1.07	0.22
P17 (34.3)	2.03	0.47	0.03	1.05	0.20
gesunde Erwachsene ^d					
Mittelwert \pm SD	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.07	0.006 ± 0.001	0.013 ± 0.002	n.b.

^a Umsatzraten wurden auf der Grundlage der in der Tabelle 3 dargestellten Daten berechnet (Details s. Kap. 2.2 und Kap. 6.3).

^b Bestimmung in dem am Ende der D-[1-¹³C]Galaktose-Umsatzmessung gesammelten Spontanurin.

^c Minimum-Schätzwerte (s. Ergebnisse). ^d n=7 (Details s. Tabelle 1).

Im Allgemeinen wurde bei den Patienten eine messbare D-[1-¹³C]Galaktose-Oxidation (extra ¹³CO₂-Exhalation bis zu 0.3 μmol/h pro kg KG) gefunden. Allerdings wurden im ¹³CO₂ der Exhalationsluft keine steady state Bedingungen erreicht. Daher konnte bei den Patienten die Ganzkörper-D-Galaktose-Oxidation nicht ermittelt werden.

Sowohl die D-Galaktose-R_a als auch die Ausscheidung von D-Galaktitol und D-Galaktonat (= y) waren statistisch hoch signifikant (p < 0.0001) invers mit dem Alter (= t) der Patienten korreliert. Bei einer Anzahl getesteter Funktionsmodelle konnten die Ergebnisse (mittels nicht linearer Regressionsanalyse) - wie bereits bei den früheren Untersuchungen der Q188R-homozygoten Patienten - am besten an das folgende einfache Exponentialfunktionsmodell angepasst werden (s. Abb. 2): $y = y_0 + a^{-bt}$

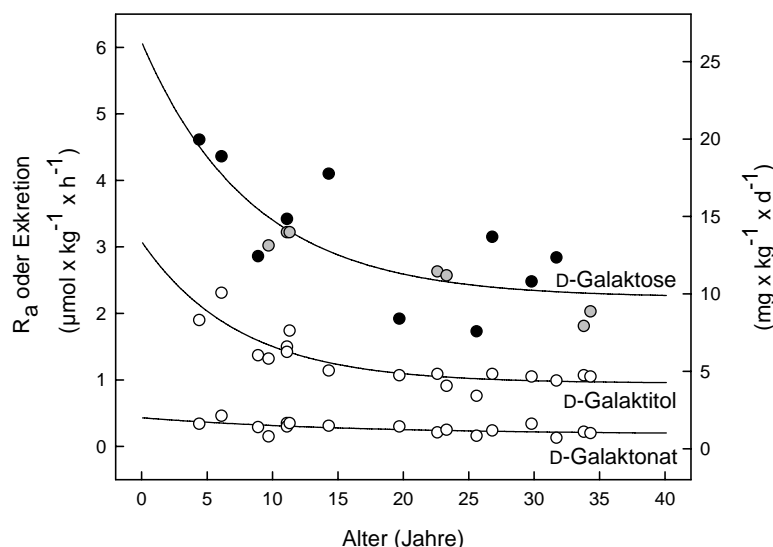


Abb.2: Die Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Freisetzung (R_a) und die renale Ausscheidung von D-Galaktitol bzw. D-Galaktonat bei nicht-Q188R-homozygoten Patienten mit klassischer Galaktosämie. Die Stoffwechselumsatzraten wurden während der *in vivo* D-Galaktose-Umsatzmessung unter postabsorptiven Bedingungen mit D-[1-¹³C]Galaktose (priming mit 5.5 μmol/kg KG und kontinuierliche Infusion mit 0.8 μmol/h pro kg KG; graue Punkte: 1.5fache Dosierung) ermittelt. Die D-Galaktose-R_a (Freisetzungsrates in das Plasma-Kompartiment) wurde anhand der ¹³C-Isotopenverdünnung im Plasma errechnet. Die Ausscheidungsrate von D-Galaktose und D-Galaktonat wurde mittels Analyse des Spontanurins bestimmt. Die experimentellen Daten konnten mittels nicht-linearer Regression sehr gut an das einfache Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$ angepasst werden (x = Alter in Jahren, y = Umsatzraten). Durchgezogene Linien: Regressionskurven (Koeffizienten (± SE): Für D-Galaktose: $y_0 = 2.24 (\pm 0.33)$, $a = 3.84 (\pm 1.38)$, $b = 0.12 (\pm 0.06)$, $Sy/x = 0.55$, $r = 0.795$, $p < 0.001$; Für D-Galaktitol: $y_0 = 0.95 (\pm 0.11)$, $a = 2.13 (\pm 0.58)$, $b = 0.13 (\pm 0.05)$, $Sy/x = 0.20$, $r = 0.881$, $p < 0.0001$; Für D-Galaktonat $y_0 = 0.18 (\pm 0.12)$, $a = 0.25 (\pm 0.09)$, $b = 0.06 (\pm 0.10)$, $Sy/x = 0.07$, $r = 0.602$, $p < 0.05$).

Der Parameter y_0 gibt einen mittleren Schätzwert für Erwachsene; $\Sigma (y_0 + a)$ gibt einen mittleren Schätzwert für Säuglinge. Mit dem Modell wurden folgende Umsatzraten für Säuglinge abgeschätzt: D-Galaktose- R_a , 6.1 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG; D-Galaktitol-Ausscheidung, 3.1 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG; D-Galaktonat-Ausscheidung 0.4 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG. Für Erwachsene lagen die entsprechenden Schätzwerte bei 2.2, 0.9 und 0.2 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG.

Da auch bei diesen Untersuchungen im D-Galaktitol und D-Galaktonat des Urins keine oder vernachlässigbar geringe ^{13}C -Anreicherung gefunden wurde, wurde die totale D-Galaktose-Freisetzung als Summe aus D-Galaktose- R_a plus D-Galaktitol- und D-Galaktonat-Ausscheidungsrate ermittelt (vgl. Kap. 7)

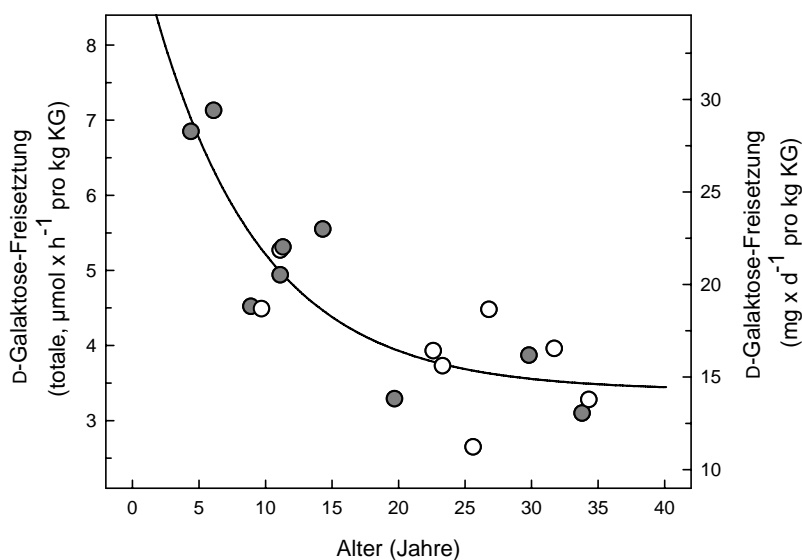


Abb.3: Die Altersabhängigkeit der totalen endogenen D-Galaktose-Bildung bei nicht-Q188R-homozygoten Galaktosämie-Patienten. Die Bildungsrate wurde während der *in vivo* Umsatzmessung mittels primed continuous infusion-Verfahren mit D-[1- ^{13}C]Galaktose als Substrat ermittelt. Die weiblichen Patienten sind mit grauen Punkten und die männlichen Patienten mit schwarzen Punkten dargestellt. Die Summe aus D-Galaktose-Freisetzungsrate (R_a) und der Ausscheidungsrate von D-Galaktitol, D-Galaktonat ergibt die totale endogene D-Galaktose-Freisetzungsrate (s. Abb.2 und Text). Durchgezogene Linie: Regressionskurve nach Anpassung an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$ ($x = \text{Alter in Jahren}$, $y = \text{Umsatzraten}$) (Koeffizienten ($\pm \text{SE}$): $y_0 = 3.40 (\pm 0.39)$, $a = 6.22 (\pm 1.75)$, $b = 0.12 (\pm 0.05)$, $Sy/x = 0.67$, $n = 17$, $r = 0.864$, $p < 0.0001$).

Die totalen D-Galaktose-Freisetzungsraten sind in Abbildung 3 wiedergegeben. Die mit dem obigen Modell berechneten mittleren Schätzwerte für die totale D-Galaktose-Freisetzung nehmen exponentiell von ca. 9.6 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei Neugeborenen auf ca. 3.4 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei erwachsenen Patienten ab. Bei

Säuglingen entspricht dies einer Menge von ca. 42 mg D-Galaktose-Äquivalenten/Tag pro kg KG; bei Erwachsenen ca. 14 mg/Tag pro kg KG.

8.4 Diskussion

Genotypische Heterogenität des Untersuchungskollektivs

Bei den 17 Patienten wurden insgesamt 13 verschiedene Mutationen detektiert. Darunter waren 12 Missens-Mutationen (2 bisher nicht beschrieben: F117C, S297P) und 1 Deletion, in 12 verschiedenen Genotypen. Alle Patienten, mit einer Ausnahme (L195P-Homozygotie) waren compound Heterozygote, 10 (= 63%) Patienten wiesen jeweils ein Allel für die sehr häufig vorkommende Q188R-Mutation auf.

**Tabelle 5: Mutierte Allele dieser Studie:
Zusammenstellung von Daten der Expressions-Versuche**

Mutierte Allele	n ^a	Expressionssystem	Residuale hGALT-Aktivität ^b (%)	Referenz
Q188R ^c	10	Hefe-Zellen	n.d. ^d / 0.0 / < 0.2	1 / 2 / 3
K285N	6	COS-Zellen	< 0.2	3
L195P	4	COS-Zellen	0.0	4
H319Q	3	COS-Zellen	n.d. ^e	5
R148W	2	COS-Zellen	< 0.2 ^e	4
A320T	2			n.e ^f
V151A	1	Hefe-Zellen	3.1 / 4.6	2 / 3
R259W	1	Hefe-Zellen	< 0.2	3
D28Y, Q39P, F117C ^g , S297P ^g und ΔN97 (je n = 1)				n.e ^f

^a Anzahl der mutierten Allele, die in dieser Studie detektiert wurden; ^b Expressions-Versuche bei Homozygotenstatus, verglichen mit dem Wildtyp (≡ 100%); ^c Bei der ersten Transfektions-Studie in COS-Zellen (Referenz 1) lag die residuale hGALT-Aktivität bei 10%; ^d Nicht nachweisbare Aktivität; ^e Instabiles Protein; ^f Bisher nicht mittels Expressions-Test untersucht; ^g Neue, bisher nicht beschriebene Mutationen; 1: Fridovich-Keil & Jinks-Robertson, 1993; 2: Fridovich-Keil et al., 1995; 3: Riehm et al., 2001; 4: Reichardt et al., 1992; 5: Reichardt et al., 1993.

Für 27 von 34 mutierten Allelen liegen Daten zu funktionalen Auswirkungen auf die humane GALT-Aktivität (hGALT-Aktivität) vor, die mittels Expressions-Versuchen, z.B. in Hefe-Zellen oder COS-Zellen gewonnen wurden (Reichardt &

Woo, 1991; Reichardt et al., 1992; Fridovich-Keil & Jinks-Robertson, 1993; Reichardt et al., 1993; Fridovich-Keil et al., 1995; Riehman et al., 2001). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Ingesamt stehen die Ergebnisse der Expressionsstudien hinsichtlich der Wirkung der individuellen Mutationen auf die GALT-Aktivität in guter Übereinstimmung mit den sehr geringen Enzymaktivitäten, die in den Erythrozyten der Patienten dieser Studie gemessen wurden.

Zur Methodik

Das hier angewendete experimentelle Verfahren wurde bereits zur Bestimmung der endogenen D-Galaktose-Freisetzung bei Q188R-homozygoten Patienten verwendet (Kap. 7). Die Methodik dieses Verfahrens wurde dort ausführlich diskutiert. Daher wird in diesem Abschnitt nicht weiter darauf eingegangen. Ebenso sei bezüglich eine Erörterung folgender Aspekte auf das vorhergehende Kapitel verwiesen: (i) Das nicht-Erreichen von steady state Bedingungen bei der ^{13}C -Markierung im CO_2 der Exhalationsluft und im D-Galaktose-1-Phosphat der Erythrozyten hat keinen Einfluss auf die Bestimmung der endogenen D-Galaktose-Freisetzungsrates. (ii) Welche Bedeutung hatte die verschiedenen Abbauege für die D-Galaktose-Elimination. (iii) Welche endogene Quellen sind für die Bildung freier D-Galaktose von Bedeutung.

Hier soll jedoch noch einmal betont werden, dass sowohl die früheren (Kap. 7) als auch die hier vorgestellten Schätzwerte zur totalen D-Galaktose-Freisetzung niedriger liegen müssen als die wahre Ganzkörper-D-Galaktose-Bildung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie. Die erhöhte $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation zusammen mit den niedrigeren, aber nachweisbaren GALT-Aktivitäten zeigen nämlich, dass bei Patienten D-Galaktose über den Leloir-Weg abgebaut wurde. Da in Plasma und Urin keine ^{13}C -Anreicherung in D-Galaktitol und D-Galaktonat gefunden wurde, kann angenommen werden, dass die infundierte D-[1- ^{13}C]Galaktose nur in die Leber, und nicht in die extrahepatischen Gewebe, wo D-Galaktonat und D-Galaktitol gebildet wird, gelangt. Daher konnte bei dem hier verwendeten Versuchsansatz die extrahepatische D-Galaktose-Elimination über den oxidativen

Abbau analytisch nicht erfasst und quantifiziert werden. Dieser unbekannte Anteil fehlt also in der gesamten Bilanz.

Zur endogenen Galaktose-Bildung

Zielsetzung dieser Studie war zu prüfen, in wieweit die bei Q188R-homozygoten Patienten erhobenen Befunde zur Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Freisetzung auf Patienten mit nicht Q188R-homozygoten Mutationen übertragbar sind. Zur letzteren Gruppe gehören in Europa mehr als 50% der Patienten mit klassischer Galaktosämie (Holton et al., 2001).

Die hier bei Patienten mit compound-heterozygoten Mutationen erhobenen Daten zeigen, dass, ähnlich wie bei dem Q188R-homozygoten Patientenkollektiv, die endogene D-Galaktose-Freisetzung (R_a) exponentiell mit zunehmendem Alter bis zum Erwachsenenalter abnimmt. Ebenso konnten die Raten der D-Galaktose- R_a , D-Galaktitol- und D-Galaktonat-Ausscheidung sehr gut an das einfache Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-bt)$ ($y = \text{Rate}$, $a = \text{Alter}$) angepasst werden. Dabei wurden für beide Patientenkollektive übereinstimmende Werte für die Parametern y_0 , a und b bestimmt.

Tabelle 6: Vergleich der Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Freisetzungsrates bei Q188R-homozygoten und nicht-Q188R-homozygoten Patienten mit klassischer Galaktosämie^a

Mittlere Schätzwerte ^b	Q188R-homozygote ^c		nicht-Q188R-homozygote ^d	
	Neugeborene	Erwachsene	Neugeborene	Erwachsene
	D-Galaktose-Äquivalente in $\text{mg} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{d}^{-1}$			
Plasma-D-Galaktose- R_a	24.8	8.4	26.3	9.7
D-Galaktitol-Ausscheidung	11.6	3.7	13.3	4.1
D-Galaktonat-Ausscheidung	3.6	0.9	1.9	0.8
Summe	41.0	13.1	41.6	14.7

^a Primed continuous infusion-Versuch wurde mit D-[1-¹³C]Galaktose als Substrat unter postabsorptiven Bedingungen durchgeführt; ^b Schätzwerte wurden mit dem Exponentialfunktionsmodell berechnet (Details s. Ergebnisse); ^c GALT-Aktivität in den Erythrozyten $< 0.3 \mu\text{mol/h}$ pro g_{Hb} , $n=18$ (Daten aus dem Kap. 5); ^d GALT-Aktivität in den Erythrozyten $< 0.3 \mu\text{mol/h}^{-1}$ pro g_{Hb} , $n=17$ (Daten in dieser Studie).

Dies bedeutet letztlich, dass zwischen den beiden Patientengruppen kein Unterschied in der Altersabgängigkeit der endogenen D-Galaktose-Freisetzung festzustellen war. Dies zeigt auch ein Vergleich der (mit dem Exponentialfunktionsmodell ermittelten) Schätzwerte von Stoffwechselraten für Neugeborene und Erwachsene beider Patientenkollektive (s. Tabelle 6).

Die totalen endogenen D-Galaktose-Freisetzungsraten sind für beide Patientenkollektive gemeinsam in Abbildung 4 dargestellt.

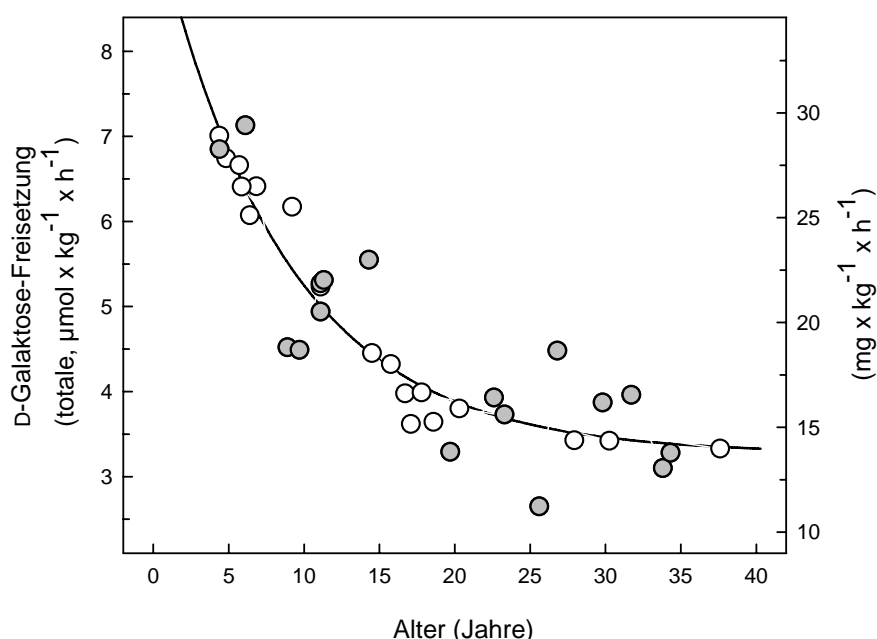


Abb. 4: Vergleich der ermittelten Ergebnisse der totalen endogenen D-Galaktose-Bildung bei Galaktosämie-Patienten. Die im vorigen Kapitel bei Q188R-homozygoten Patienten (weiße Punkte) erhaltene Daten wurden mit denen in dieser Studie bei nicht-Q188R-homozygoten Patienten (graue Punkte) verglichen. Alle Daten wurden an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$ angepasst ($x =$ Alter in Jahren, $y =$ Umsatzraten). Durchgezogene Linie: Regressionskurve (Koeffizienten (\pm SE): $y_0 = 3.3 (\pm 0.2)$, $a = 6.4 (\pm 0.7)$, $b = 0.12 (\pm 0.02)$, s. Legend Abb. 3, $Sy/x = 0.49$, $n = 35$, $r = 0.933$)

Der einzige Unterschied zwischen beiden Kollektiven war die höhere interindividuelle Variabilität bei Patienten mit compound-Heterozygotie. Vermutlich liegt die Ursache für die höhere Variabilität in einer ausgeprägten Mikroheterogenität der residualen GALT-Aktivität. Patienten mit Q188R-Homozygotie dürften dagegen eine insgesamt homogenere residuale GALT-Aktivität aufweisen. Mit den bisher verfügbaren Methoden (Shin, 1991, Xu et al.,

1995) können allerdings solche geringfügigen Unterschiede im niedrigen Enzymaktivitätsbereich nicht ausreichend genau aufgelöst werden.

Die obigen Vergleiche zeigen, dass die bereits früher bei Q188R-homozygoten Patienten erhobenen Befunde zur endogenen D-Galaktose-Freisetzung repräsentativ für die D-Galaktose-Stoffwechselraten bei klassischer Galaktosämie sind. Insbesondere bestätigen sie, dass die renale Ausscheidung von D-Galaktitol und D-Galaktonat nur zu einem vergleichsweise geringeren Maß (wahrscheinlich < 30%) zur gesamten D-Galaktose-Elimination beiträgt. Selbst bei Patienten mit geringer GALT-Aktivität (< 1% der Norm) wird offensichtlich der größte Teil (vermutlich > 60%) der endogen gebildeten D-Galaktose auch über den endogenen D-Galaktose-Katabolismus abgebaut.

Die Entwicklung der mittleren Ganzkörper-D-Galaktose-Freisetzung mit dem Alter ist in dem Nomogramm in Abbildung 5 skizziert.

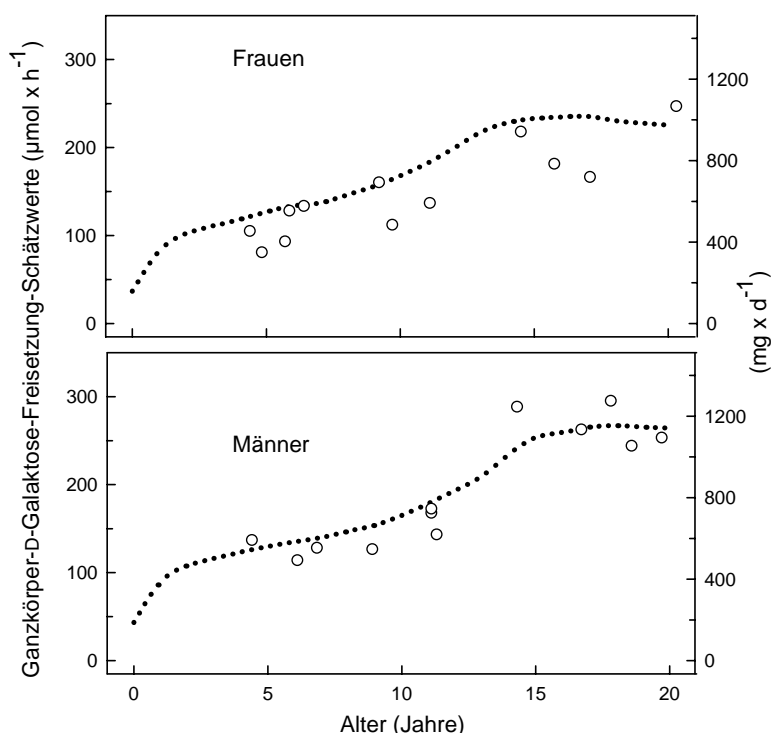


Abb. 5: Hypothetisches Nomogramm für die Ganzkörper-D-Galaktose-Freisetzung bei Patienten mit D-Galaktose-1-Phosphat-Mangel (residuale GALT-Aktivität < 1% der Norm). Gepunktete Linien sind Mittelwerte, die mittels des Exponentialfunktionsmodells zur Altersabhängigkeit der totalen D-Galaktose-Freisetzung und der 50%-Perzentile des altersentsprechenden Körpergewichts ermittelt wurden. Zum Vergleich wurden die aus den in vivo Umsatzmessungen erhaltenen Daten der individuellen Patienten als Punkte dargestellt.

Dieses Nomogramm wurde auf der Grundlage der altersentsprechenden mittleren D-Galaktose-Freisetzungsrates (berechnet aus dem Exponentialfunktionsmodell) und der 50%-Perzentile des alters- und geschlechtsentsprechenden Körpergewichtes (Brandt & Reinken, 1988) berechnet. Aus dem Nomogramm kann abgelesen werden, dass die endogene Ganzkörper-D-Galaktose-Freisetzung von etwa 200 mg pro Tag bei Neugeborenen auf etwa 1000 mg pro Tag bei erwachsenen Patienten ansteigt. Eine schnelle und nicht-lineare Steigerung findet sich in Phasen starken Wachstums (in den ersten Lebensjahren und während der Pubertät). Die in Abbildung 4 auf kg Körpergewicht normierten Daten geben keinen Hinweis auf einen geschlechtsabhängigen Unterschied der endogenen D-Galaktose-Freisetzung. Die Unterschiede zwischen Frauen und Männern in Abbildung 5 sind daher auf die geschlechtsspezifischen Körpergewichtsunterschiede zurückzuführen.

Mögliche Auswirkung dieser Studie

Die hier erhobenen Befunde könnten zu einer Änderung der bisherigen Diät Empfehlung bei Galaktosämie führen. Zur Zeit wird einheitlich eine lactosefreie und galaktose-arme Diät bei Galaktosämie-Patienten aller Altersstufen empfohlen (Walter et al., 1999). In Zukunft kann vielleicht eine altersentsprechende Lockerung der Diätführung empfohlen werden. Diese Vermutung basiert auf folgender Überlegung:

Bisher publizierte Daten zeigen, dass die spezifische GALT-Aktivität in humanen Geweben weitgehend altersunabhängig ist, mit der möglichen Ausnahme eines Aktivitätsabfalls in den ersten Lebensmonaten (Segal et al., 1971; Shin, 1991). Demzufolge sollte die auf kg KG normierte Enzymkapazität für den D-Galaktose-Abbau über den Leloir-Weg bei allen Altersstufen im Wesentlichen identisch sein. Im Gegensatz dazu nimmt die endogene D-Galaktose-Freisetzungsrates mit dem Alter ab. Mit zunehmendem Alter wird also verfügbare Enzymkapazität durch die endogene D-Galaktose-Freisetzung weniger beansprucht. D.h. dass Patienten mit Galaktosämie mit ansteigendem Alter eine zunehmende - ungenützte - Enzymkapazität z.B. für den Abbau exogener D-Galaktose zur Verfügung stehen sollte.

Hypothese zur Galaktose-Toleranz

Quantitative Daten zur *in vivo* Toleranz für exogene (Nahrungs) D-Galaktose, die bei der Diätbehandlung der Galaktosämie-Patienten von ausschlaggebender Bedeutung sein können, sind bisher nicht verfügbar. Im Prinzip sollte die Toleranz für die exogene D-Galaktose der Differenz zwischen der D-Galaktose-Abbaukapazität und der endogenen D-Galaktose-Belastung entsprechen (s.o.). Da Nahrungsgalaktose vor allem von der Leber aufgenommen und metabolisiert wird, ist dieses Organs für die Toleranz exogener D-Galaktose von ausschlaggebender Bedeutung. Bei Patienten mit Galaktosämie wird die extrahepatische Freisetzung von endogener D-Galaktose durch den D-Galaktose-Katabolismus in der Leber ausgeglichen. Mit dem Exponentialfunktionsmodell kann der Abbau endogener D-Galaktose bei Säuglingen auf 26 mg/kg KG und Tag abgeschätzt werden. Bei einem mittleren Leber-Anteil von ca. 30 g/kg KG sollte die *in vivo* Abbaukapazität der Leber mindestens etwa 1 mg D-Galaktose pro Gramm Leber pro Tag betragen.

Auf der Basis der obigen Überlegungen wurde die Altersabhängigkeit der mittleren D-Galaktose-Abbaukapazität bei Galaktosämie abgeschätzt. Dabei wurde berücksichtigt, dass das Verhältnis von Lebergewicht zu Ganzkörpergewicht mit dem Alter etwas abnimmt (Wissenschaftliche Tabellen Geigy, 1977). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

Nach unseren Schätzungen dürfte die D-Galaktose-Abbaukapazität der Leber im Mittel von etwa 100 mg pro Tag bei einem 5 kg schweren Neugeborenen mit Galaktosämie auf etwa 1850 mg pro Tag bei einem Galaktosämie-Patienten mit einem 70 kg Körpergewicht zunehmen. Dagegen nimmt die endogene D-Galaktose-Freisetzungsrates im Mittel von etwa 100 mg pro Tag beim Neugeborenen auf etwa 680 mg pro Tag beim Erwachsenen zu. Die Daten deuten darauf hin, dass Neugeborene und Kleinkinder keine oder eine sehr geringe Toleranz für exogene D-Galaktose haben dürften. Mit zunehmendem Alter sollte sich die Toleranz erhöhen und bei Erwachsenen > 1 g betragen.

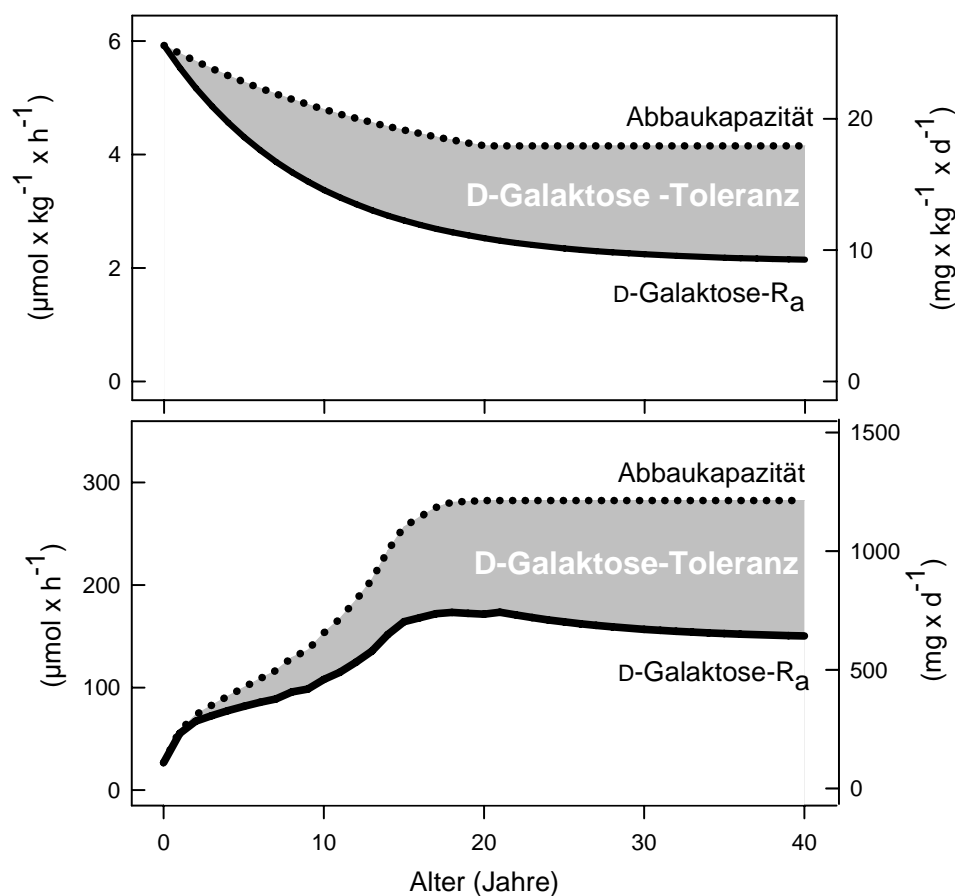


Abb. 6: Vereinfachtes hypothetisches Modell für die altersabhängige Entwicklung der exogenen D-Galaktose-Toleranz bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (residuale GALT-Aktivität < 1% der Norm). Mit dem Modell wurde sowohl für pro kg KG (A) als auch für Ganzkörpergewicht (B) die D-Galaktose-Toleranz ermittelt. Bei der Berechnung der Leberabbaukapazität (gepunktete Linien) wurde angenommen, dass endogen freigesetzte D-Galaktose (R_a) vollständig bei Neugeborenen mit Galaktosämie abgebaut wird, die D-Galaktose-Abbaukapazität pro kg Lebergeweicht bei allen Altersgruppen ähnlich ist und das Verhältnis vom Lebergewicht zum Ganzkörpergewicht minimal von etwa 3% bei Säuglingen auf etwa 2% bei Erwachsenen (Wissenschaftliche Tabellen geigy, 1977) abnimmt. Mittlere D-Galaktose- R_a wurde aus den in dieser Studie erhaltenen Daten pro kg KG (Abb. 4), und das mittlere Körpergewicht wurde aus der 50%-Perzentile der Jungen berechnet (Brandt & Reinken, 1988).

Natürlich dürfen diese hypothetischen Ergebnisse nicht direkt die Diätführung bei Patienten mit Galaktosämie beeinflussen. Dazu müssen die Daten zunächst experimentell verifiziert werden, am besten mit Hilfe von Langzeitstudien zur oralen D-Galaktose-Belastung. Wir haben kürzlich eine erste Pilotstudie bei einer erwachsenen Q188R-homozygoten Patientin durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass Gabe von bis zu 10 mg D-Galaktose/kg KG pro Tag zusätzlich zu normaler Diät auch über mehrere Wochen nicht zu einer signifikanten

Änderung der Stoffwechselwerte führte. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den obigen Überlegungen. Um neue, Evidenz-basierte Diät-Empfehlungen für die Behandlung der klassischen Galaktosämie zu erarbeiten, sind jedoch weiter ausgedehntere Langzeitstudien dringend erforderlich.

Schlussfolgerungen

Die in diesem und im vorigen Kapitel vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die endogene D-Galaktose-Belastung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (GALT-Aktivität < 1% der Norm) exponentiell vom Neugeborenen- bis zum Erwachsenenalter hin abnimmt, und zwar unabhängig von Genotyp. Obwohl bei Erwachsenen die endogene D-Galaktose-Freisetzung immer noch beträchtlich ist, sollte die Toleranz für exogene D-Galaktose bis zum Erwachsenenalter deutlich zunehmen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es notwendig ist, die aktuellen Diät-Empfehlungen experimentell zu überprüfen. Die pathophysiologischen und pathobiochemischen Ursachen der längerfristigen klinischen Störungen bei Patienten mit Galaktosämie sind aus den Ergebnissen nicht ableitbar und bedürfen weiter eine Aufklärung.

Kapitel 9

Bedeutung der residualen Enzymaktivität für die endogene Galaktose-Freisetzung

Zusammenfassung: Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen endogener D-Galaktose-Freisetzung und residualer GALT-Aktivität bei Patienten mit GALT-Mangel. Dazu wurden bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (GALT-Aktivität in den Erythrozyten $< 0.2 \mu\text{mol/h pro } g_{\text{Hb}}$, $n=5$; 9-12 Jahre) und bei Patienten mit milderer Formen des GALT-Mangels (GALT-Aktivität in den Erythrozyten > 0.3 bis $5 \mu\text{mol/h pro } g_{\text{Hb}}$, $n=5$, 9-14 Jahre) *in vivo* D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen mit dem primed continuous infusion-Verfahren, mit D-[1- ^{13}C]Galaktose als Substrat durchgeführt. Die Rate der aus endogenen extrahepatischen Geweben in das Plasma freigesetzten D-Galaktose (R_a) nahm mit zunehmender residualer GALT-Aktivität von 3.7 bis zu normnahen $0.4 \mu\text{mol/h pro kg KG}$ ab. Die renalen Ausscheidungsraten von D-Galaktitol und D-Galaktonat nahmen weitgehend parallel zu der D-Galaktose- R_a ab, lagen jedoch niedriger als die D-Galaktose- R_a . Die totale D-Galaktose-Freisetzung (i.e. Summe aus D-Galaktose- R_a plus Ausscheidungsraten von D-Galaktonat und D-Galaktitol) war statistisch hoch signifikant ($p = 0.0002$) invers mit der residualen GALT-Aktivität korreliert. Die Ergebnisse ($y = \text{totale D-Galaktose-Freisetzung in } \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$, $t = \text{GALT-Aktivität in } \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times g_{\text{Hb}}^{-1}$) konnten mittels nicht linearer Regression am besten an das einfache Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a^{(-bt)}$ angepasst werden. Der Wert für y_0 ($0.4 \mu\text{mol/h pro kg KG}$) entspricht einem mittleren Schätzwert für die totale endogene D-Galaktose-Freisetzung für Personen mit normaler GALT-Aktivität (GALT in den Erythrozyten $> 20 \mu\text{mol/h pro } g_{\text{Hb}}$). $\Sigma (y_0 + a)$ ($7 \mu\text{mol/h pro kg KG}$) gibt einen mittleren Schätzwert für die totale endogene D-Galaktose-Bildung bei Patienten mit einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität an. Die Ergebnisse zeigen, dass die endogene Freisetzungsrates von D-Galaktose bei klassischer Galaktosämie vielfach höher als bei milderer Formen der klassischen Galaktosämie ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bereits eine relativ geringe Erhöhung der residualen GALT-Aktivität bei Galaktosämie die intrazelluläre D-Galaktose-Elimination in den extrahepatischen Geweben deutlich verbessert. Es ist zu vermuten, dass entsprechend auch die Toleranz gegenüber einer D-Galaktose-Zufuhr mit der Nahrung bei höheren residualen GALT-Aktivitäten zunimmt.

9.1 Einleitung

In den beiden vorhergehenden Kapiteln wurden Untersuchungen zur quantitativen Bedeutung der systemischen endogenen D-Galaktose-Freisetzung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (GALT-Aktivität $< 1\%$ der Norm) beschrieben. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass bei klassischer Galaktosämie beträchtliche Mengen an D-Galaktose aus endogenen Quellen freigesetzt wurden. Die Befunde zeigten auch, dass bei den Patienten, trotz der geringen GALT-Aktivität in den Erythrozyten, die im Plasma erscheinende D-Galaktose vollständig in der Leber abgebaut wurde.

Berücksichtigt man, dass die GALT in allen bisher untersuchten humanen Geweben exprimiert wird, kann aus den obigen Befunden abgeleitet werden, dass bei klassischer Galaktosämie die D-Galaktose auch in den extrahepatischen Geweben über den Leloir-Stoffwechselweg abgebaut wird. Demzufolge sollte auch eine geringfügige Erhöhung der Enzymaktivität zu einer Steigerung der Gesamtkapazität der D-Galaktose-Elimination in extrahepatischen Geweben und in der Leber führen. Könnte eine solche, mit der residualen GALT-Aktivität positiv korrelierte Kapazitätsänderung für die D-Galaktose-Elimination experimentell nachgewiesen werden, wäre dies nicht nur von theoretischem Interesse, sondern auch für die individuelle Diäteeinstellung bei Galaktosämie von praktischer klinischer Bedeutung.

Daher wurden in den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen der Einfluss der residualen GALT-Aktivität auf die D-Galaktose-Freisetzung geprüft. Dazu wurden *in vivo* D-Galaktose-Umsatzmessungen bei Patienten mit unterschiedlichen residualen GALT-Aktivitäten durchgeführt. Das Spektrum der GALT-Aktivität reichte dabei von der typisch klassischen Form mit einer Aktivität von $< 1\%$ der Norm über mildere Varianten (GALT $> 2\%$ bis 15% der Norm) bis zu den sog. Duarte-D2-Varianten mit einer Restaktivität von ca. 25% der Norm.

9.2 Material und Methoden

Vorbemerkung

Die hier verwendeten Materialien, wie auch die angewendeten analytischen und statistischen Methoden sind mit den bereits im Kapitel 7 detailliert beschriebenen Methoden identisch. Daher wird bezüglich des Materials und Methoden auf dieses Kapitel verwiesen.

Patienten

In diese Studie wurden Patienten aufgenommen, die eine residuale GALT-Aktivität in den Erythrozyten von $\leq 25\%$ der Norm, d.h. $< 5 \mu\text{mol/h}$ pro g_{Hb} aufwiesen. Bei der Auswahl der Patienten musste zudem darauf geachtet werden, dass alle ein ähnliches Alter hatten, um den Einfluss der Altersabhängigkeiten der endogenen D-Galaktose-Freisetzung weitestgehend zu minimieren.

Tabelle 1: Charakteristische Daten der Patienten mit Galaktosämie^a

Patienten	GALT ($\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}_{\text{Hb}}^{-1}$)	Mutationen	Geschlecht (M/W)	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)
P3 ^c	0.1	Q188R/R259W	M	8.9	28	133
P7 ^b	0.1	Q188R/Q188R	W	9.2	26	126
P5 ^c	0.1	Q188R/S297P	W	11.1	26	141
P8 ^b	0.2	Q188R/Q188R	M	11.1	33	143
P4 ^c	0.2	H319Q/A320T	W	9.7	25	134
V1	0.4	R67C/N314D,W316X	M	8.6	27	133
V2	0.7	T138M/Q188R	W	11.6	37	152
V3	1.8	Q188R/T350A	M	11.3	51	157
V4	2.6	I32N/Q188R	M	10.5	30	138
V5	5.0	Q188R/N314D	M	9.5	29	134

^a Zum Zeitpunkt der primed continuous infusion-Untersuchung mit D-[1-¹³C]Galaktose.

^b Daten der Patienten aus Kap. 7; ^c Daten der Patienten aus Kap. 8

Für diese Studie konnte ein Kollektiv von 10 Patienten im Altersbereich von 8.6 bis 11.6 Jahren gewonnen werden. Fünf Patienten (3 weiblich, 2 männlich) hatten die typische Form der klassischen Galaktosämie mit GALT-Aktivitäten $< 1\%$ der Norm,

weitere 5 Patienten (1 weiblich, 4 männlich) hatten mildere Formen mit GALT-Aktivitäten > 2 bis 25% der Norm. Die charakteristischen Daten der Patienten mit Galaktosämie sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

9.3 Ergebnisse

Biochemische Charakterisierung der Patienten

Die Patienten wurden ausführlich mittels biochemischer Parameter der Galaktosämie charakterisiert. Die Daten sind in Tabelle 2 angegeben. Sie zeigen, dass bei allen D-Galaktose-Metaboliten umso geringere Konzentrationen in Zellen und in Körperflüssigkeiten festzustellen waren, je höher die in den Erythrozyten gemessene residuale GALT-Aktivität war. Bemerkenswert war, dass bei dem Patienten, der eine residuale GALT-Aktivität von (nur) 25% der Norm aufwies, bereits nahezu normale Metabolit-Konzentrationen beobachtet wurden.

Tabelle 2: Biochemische Charakterisierung der Patienten mit Galaktosämie^a

Patienten (GALT ^b)	Erythrozyten	Plasma		Urin		Exhalationsluft
	Gal-1-P ($\mu\text{mol} \times \text{L}_{\text{RBC}}^{-1}$)	Galaktose ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	Galaktose ($\mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Krea}}^{-1}$)	Galaktitol ($\mu\text{mol} \times \text{mmol}_{\text{Krea}}^{-1}$)	¹³ CO ₂ (δ_{PDB} -Werte) ^c
Patienten mit GALT-Aktivitäten \geq 2% der Norm						
V1 (0.4)	42.4	1.35	8.3	4.0	118	-26.8
V2 (0.7)	13.7	0.45	1.7	1.2	25.4	-28.8
V3 (1.8)	2.9	0.34	0.53	1.0	6.6	-28.5
V4 (2.6)	0.7	0.27	0.26	0.94	2.2	-24.7
V5 (5.0)	1.9	0.28	0.17	1.7	2.7	-27.2
Patienten mit GALT-Aktivitäten < 1% der Norm^d						
MW \pm SD	135 \pm 53.5	2.9 \pm 0.3	10.9 \pm 0.9	5.4 \pm 2.3	154 \pm 41.1	-26.8 \pm 1.5
gesunde Erwachsene^e						
MW \pm SD	1.3 \pm 0.4	0.20 \pm 0.03	0.13 \pm 0.01	0.50 \pm 0.12	1.4 \pm 0.2	-27.3 \pm 0.7

^a Blut-, Spontanurin- und Atem-Proben wurden unmittelbar vor der *in vivo* Untersuchung gesammelt.

^b GALT-Aktivität in $\mu\text{mol/h}$ pro g_{Hb} . ^c Mittelwert aus fünf Atemproben. ^d n=5 (weitere Einzelheiten s. Tabelle 1)

^e Zum Vergleich mit angegeben (n=7; s. Kap. 7 Tab. 2a)

Steady state Bedingungen

Wie bei den früheren *in vivo* Untersuchungen mit D-[1-¹³C]Galaktose-Infusion stellten sich auch hier bei allen Patienten weitgehend stabile metabolische und isotopische steady state Bedingungen nach einer initialen 2.5stündigen Äquilibrationsphase ein (s. Kap. 7 und 8). Die Befunde für die Patienten V1 bis V5 sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Befunde für die anderen, bereits früher untersuchten Patienten sind in den vorhergehenden Kapiteln enthalten (Patienten P3, P4 und P5, s. Kap. 8, Tab. 3; P7 und P8, s. Kap. 7, Tab. 3b).

Tabelle 3: Individuelle Daten der Patienten aus *in vivo* D-[1-¹³C]Galaktose-Stoffwechselumsatzmessung^a

Patienten		V1 ^c	V2	V3	V4 ^b	V5
D-Galaktose im Plasma						
Total		2.47	0.93	0.77	0.63	0.70
($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	SD	0.10	0.03	0.02	0.03	0.04
Endogen		1.47	0.44	0.33	0.22	0.26
($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	SD	0.08	0.01	0.02	0.01	0.01
¹³ C-Markierung		39.3	51.4	55.4	63.7	60.4
(MPE)	SD	1.3	1.0	1.9	1.1	1.1
D-Galaktitol im Plasma						
($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	SD	9.2	1.70	0.55	0.16	0.19
Gal-1-P in RBC		44.9	22.8	4.9	0.94	2.2
($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)	SD	2.9	1.4	0.6	0.12	0.4
¹³ CO ₂ -Exhalation		0.66	0.59	0.46	0.58	0.57
($\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)	SD	0.03	0.03	0.02	0.04	0.05

^{a,b} Postabsorptive Patienten erhielten ein Priming (5.5 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$) und eine kontinuierliche Infusion von D-[1-¹³C]Galaktose (0.8 $\mu\text{mol}/\text{h}$ pro kg KG) über 6 h. 2.5 h nach dem Beginn der Infusion wurden Proben von EDTA-Blut venös im Abstand von 15^(a) Minuten bzw. 30^(b) Minuten entnommen. Parallel zu den Blutproben wurden Proben der Exhalationsluft gesammelt. Angegeben sind MW \pm SD.

^c Patient erhielt eine 1.5fache Dosierung von D-[1-¹³C]Galaktose.

Bemerkenswert ist, dass bei den Patienten V1 bis V5, die gegenüber dem typischen Patientenkollektiv mit klassischer Galaktosämie mehr oder weniger deutlich höhere residualen GALT-Aktivitäten aufwiesen, sich nicht nur bei den D-Galaktose-Metaboliten im Blut, sondern auch bei der ¹³CO₂-Exhalation steady

state Bedingungen einstellten. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den früheren Beobachtungen bei Patienten mit GALT-Aktivitäten < 1% der Norm, bei denen in keinem einzigen Fall steady state Bedingungen bei der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation erreicht wurden (vgl. Kap.7, Tab 3b und Kap.8, Tab 3).

Galaktose-Stoffwechselumsatzraten

Basierend auf obigen Ergebnissen und der Analyse des am Ende der Untersuchung gesammelten Urins wurden die Umsatzraten der D-Galaktose-Metaboliten bei Galaktosämie-Patienten ermittelt. Die Ergebnisse für das hier betrachtete Patientenkollektiv sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: D-Galaktose-Stoffwechselumsatzraten *in vivo*^a

Patienten	endogene D-Galaktose			D-Galaktitol	D-Galaktonat
	Freisetzungs- Rate	Oxidation	Renale Ausscheidung ^b	renale Ausscheidung ^b	renale Ausscheidung ^b
in $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{h}^{-1}$					
milde Formen der klassischen Galaktosämie					
V1	1.84	1.28	0.04	0.92	0.19
V2	0.74	0.70	0.02	0.17	0.03
V3	0.63	0.46	0.02	0.03	0.01
V4	0.46	0.41	0.03	0.03	0.01
V5	0.51	0.45	0.03	0.02	0.01
klassische Galaktosämie ^c					
Mittelwert \pm SD	3.24 ± 0.32	0.35 ± 0.20^d	0.06 ± 0.02	1.56 ± 0.29	0.32 ± 0.11
gesunde Erwachsene ^e					
Mittelwert \pm SD	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.07	0.006 ± 0.001	0.013 ± 0.002	n.d.

^a Umsatzraten wurden auf der Grundlage der in der Tabelle 3 dargestellten Daten berechnet (Details s. Material und Methoden).

^b Bestimmung in dem am Ende der D-[1- ^{13}C]Galaktose-Umsatzmessung gesammelten Spontanurin.

^c n=5 (Patienten Details s. Tabelle 1; individuelle Umsatzraten s. Kap. 7 Tab. 4b und Kap. 8 Tab. 4).

^d Minimum-Schätzwerte (s. Kapitel 7 und 8).

^e Zum Vergleich angegeben (n=7; s. Kap. 7 Tab. 4a).

Dabei sind die Stoffwechselumsatzraten für Patienten mit milderer Formen (Pat V1 bis Pat. V5) individuell aufgeführt. Für die Patienten mit GALT-Aktivitäten < 1%

der Norm sind nur die Mittelwerte angegeben, da diese Patienten bereits früher untersucht wurden (Patient P3, P4 und P5 s. Kap. 8, Tab. 4; P7 und P8 s. Kap. 7, Tab. 4b).

Bei den Patienten V1 bis V5 stellten sich im Gegensatz zu den anderen Patienten die steady state Bedingungen in der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation ein. Daher konnte bei diesen Patienten eine D-Galaktose-Oxidationsrate berechnet werden. Wie im Kapitel 7 bereits erläutert wurde, ist dieser Wert ein Maß für die Oxidation endogener D-Galaktose im Lebergewebe. Bei den Patienten V1 bis V5 fällt auf, dass diese hepatische D-Galaktose-Oxidationsrate weitgehend der D-Galaktose-Freisetzungsrate (R_a) aus extrahepatischen Geweben entspricht. Eine vergleichbare Entsprechung von D-Galaktose- R_a und -Oxidationsrate wurde bereits bei den Untersuchungen an gesunden Erwachsenen beobachtet (s. Kap. 7, Tab 4a).

In dieser Arbeit sollte vor allem geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der residualen GALT-Aktivität einerseits und D-Galaktose-Stoffwechselumsatzraten andererseits besteht. In Abbildung 1 sind nun die D-Galaktose-Freisetzungsraten (R_a) sowie die Ausscheidungsraten von D-Galaktitol und D-Galaktonat gegen die in Erythrozyten der Patienten gemessenen GALT-Aktivitäten aufgetragen.

Die Daten zeigen, dass die D-Galaktose-Freisetzungsraten bei niedrigen residualen GALT-Aktivitäten (< 5% der Norm) zunächst mit zunehmender GALT-Aktivität exponentiell abfällt und dann bei einer GALT-Aktivität um $2 \mu\text{mol/h pro g}_{\text{Hb}}$ in eine offenbar konstante, von der GALT-Aktivität bis $5 \mu\text{mol/h pro g}_{\text{Hb}}$ unabhängige, Freisetzungsraten überzugehen. Diese konstante D-Galaktose-Freisetzungsraten betrug etwa $0.4 \mu\text{mol/h pro kg KG}$ und war damit - wenn man den Altersunterschied berücksichtigt - recht gut mit dem bei gesunden Erwachsenen (GALT-Aktivität > $20 \mu\text{mol/h pro g}_{\text{Hb}}$) gefundenen Wert ($0.3 \mu\text{mol/h pro kg KG}$; Kap.7, Tab. 4a) vergleichbar.

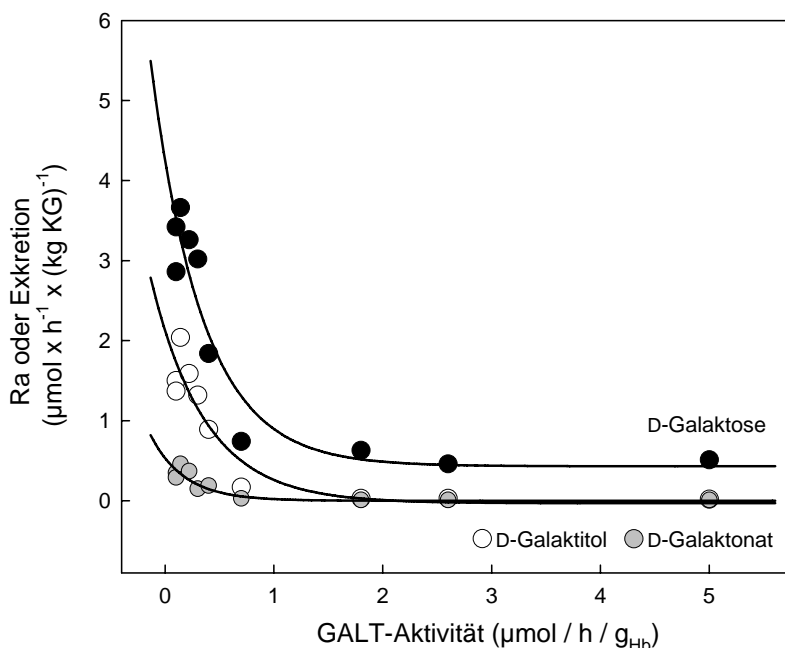


Abb.1: Die endogene D-Galaktose-Freisetzung (R_a) und die renale Ausscheidung von D-Galaktitol bzw. D-Galaktonat bei Galaktosämie-Patienten in Abhängigkeit von residualer GALT-Aktivität. Die Stoffwechselumsatzraten wurden während der *in vivo* D-Galaktose-Umsatzmessung unter postabsorptiven Bedingungen mit D-[1-¹³C]Galaktose (priming mit 5.5 µmol/kg KG und kontinuierlicher Infusion mit 0.8 µmol/h pro kg KG) ermittelt. Die D-Galaktose- R_a (Freisetzungsrates in das Plasma-Kompartiment) wurde anhand der ¹³C-Isotopenverdünnung im Plasma errechnet. Die Ausscheidungsrate von D-Galaktitol und D-Galaktonat wurde mittels Analyse des Spontanurins bestimmt. Die experimentellen Daten konnten mittels nicht-linearer Regression sehr gut an das einfache Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$ angepasst werden (x = GALT-Aktivitäten; y = Umsatzraten). Durchgezogene Linien: Regressionskurven (Koeffizienten (\pm SE): Für D-Galaktose: $y_0 = 0.43 (\pm 0.29)$, $a = 3.82 (\pm 0.53)$, $b = 2.11 (\pm 0.74)$, $Sy/x = 0.46$, $r = 0.95$, $p = 0.002$; Für D-Galaktitol: $y_0 = -0.03 (\pm 0.18)$, $a = 2.15 (\pm 0.03)$, $b = 2.00 (\pm 0.78)$, $Sy/x = 0.29$, $r = 0.944$, $p = 0.004$; Für D-Galaktonat $y_0 = 0.0006 (\pm 0.045)$, $a = 0.53 (\pm 0.11)$, $b = 3.23 (\pm 1.38)$, $Sy/x = 0.08$, $r = 0.918$, $p = 0.0015$).

Die renalen Ausscheidungsraten von D-Galaktitol und D-Galaktonat waren deutlich niedriger als die D-Galaktose- R_a . Zudem war der exponentielle Abfall der Ausscheidungsraten bei zunehmender GALT-Aktivität dieser Metabolite noch deutlicher ausgeprägt als bei der D-Galaktose-Freisetzungsrates. Wie bei der D-Galaktose- R_a wurden dann ab einer residualen GALT-Aktivität von etwa 2 µmol/h pro g_{Hb} auch bei diesen Metaboliten konstante Ausscheidungsraten erreicht.

Wie bereits früher ausgeführt, stellt die Summe aus D-Galaktose-Freisetzungsrates plus D-Galaktitol- und D-Galaktonat-Ausscheidung einen Minimum-Schätzwert für die Ganzkörper-D-Galaktose-Bildung dar. Die entsprechenden Werte sind in Abbildung 2 gegen die residualen GALT-Aktivitäten der Patienten aufgetragen.

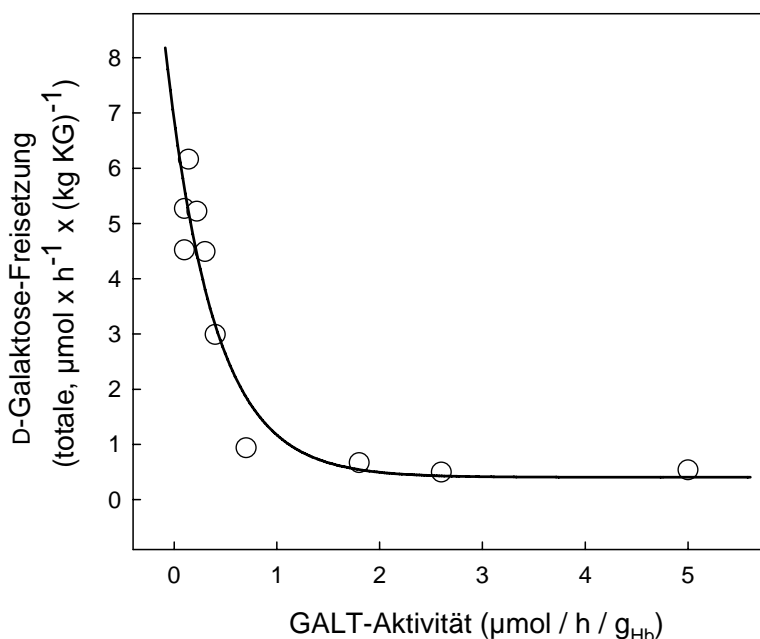


Abb.2: Die Korrelation zwischen der totalen endogenen D-Galaktose-Bildung und der residualen GALT-Aktivität bei Patienten mit Galaktosämie. Die Bildungsraten wurden während der *in vivo* Umsatzmessung mittels primed continuous infusion-Verfahren mit D-[1-¹³C]Galaktose als Substrat ermittelt. Die Summe aus der D-Galaktose-Freisetzungsrate (R_a) und der Ausscheidungsrate von D-Galaktitol und D-Galaktonat ergibt die totale endogene D-Galaktose-Bildungsrate (s. Abb.1 und Text). Durchgezogene Linie: Regressionskurve nach Anpassung an das Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a^{-bx}$ (x = GALT-Aktivitäten; y = Umsatzraten) (Koeffizienten (\pm SE): $y_0 = 0.41 (\pm 0.49)$, $a = 6.48 (\pm 0.90)$, $b = 2.14 (\pm 0.75)$, $Sy/x = 0.78$, $n=10$, $r = 0.983$, $p = 0.0002$).

Der Zusammenhang dieser Daten mit residualen GALT-Aktivitäten ließ sich statistisch sehr gut ($p < 0.0002$) mit dem bereits früher verwendeten Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a^{-bx}$ beschreiben. Dabei ist y die totale D-Galaktose-Freisetzungsrate und x die GALT-Aktivität; y_0 , a und b sind Konstanten. Nach Anpassung der experimentellen Daten an das Modell mittels nicht-linearer Regression ergaben sich als mittlere Schätzwerte für die Konstanten $y_0 = 0.4$, $a = 6.5$ und $b = 2.1$. Mit dem Modell kann errechnet werden, dass bei einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität die totale D-Galaktose-Freisetzungsrate (ergibt sich als $\Sigma y_0 + a$) etwa $7 \mu\text{mol/h pro kg KG}$ betragen dürfte. Entsprechend ergibt das Modell einen mittleren konstanten Wert für die totale D-Galaktose-Freisetzung von $0.4 \mu\text{mol/h pro kg KG}$ ab einer GALT-Aktivität von etwa $2 \mu\text{mol/h pro g}_{\text{Hb}}$. Die Hälfte des exponentiellen Abfalls der totalen D-Galaktose-Freisetzung sollte bereits bei einer GALT-Aktivität von nur etwa $0.4 \mu\text{mol/h pro g}_{\text{Hb}}$ erreicht werden.

9.4 Diskussion

Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Ziel der in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen war es, den Einfluss der residualen GALT-Aktivität auf die endogene Freisetzung von D-Galaktose bei Patienten mit klassischer Galaktosämie zu untersuchen. Zudem sollte letztlich die Frage geklärt werden, wie viel residuale GALT-Aktivität erforderlich ist, um eine Normalisierung des endogenen D-Galaktose-Stoffwechsels sicher zu ermöglichen. Dazu sollten *in vivo* D-Galaktose-Umsatzmessungen bei Patienten mit unterschiedlicher residualen GALT-Aktivität zwischen < 1% und ca. 25% der Norm durchgeführt werden.

Ursprünglich war geplant, für diese Untersuchungen nur erwachsene Galaktosämie-Patienten zu rekrutieren, um einen möglichen Einfluss der Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Freisetzung auszuschließen. Es war jedoch nicht möglich, ein entsprechendes Patientenkollektiv zu gewinnen. Die primäre Ursache dafür liegt in der Tatsache, dass mildere Formen der Galaktosämie mit GALT-Restaktivitäten zwischen 2 und 20% der Norm deutlich seltener sind als die typisch schweren Formen mit einer GALT-Restaktivität < 1% der Norm (Inzidenz ca. 1:40 000). Nach unserer noch begrenzten Erfahrung dürften die milderen Varianten nur mit ein zehntel der Häufigkeit der schweren Form auftreten. Dies entspräche einer Inzidenz von etwa 1:400 000 und damit, in Deutschland, ca. ein bis zwei neue Patienten pro Jahr.

Außerdem kann vermutet werden, dass einige Patienten mit milderer Form nicht das typische klinische Bild der klassischen Galaktosämie in der Neugeborenenperiode entwickelt hatten und die Stoffwechselstörung daher nicht diagnostiziert wurde. Selbst in den Gebieten, in denen seit Jahrzehnten ein flächendeckendes Neugeborenen-Screening auf Galaktosämie durchgeführt wird, dürften manche Patienten mit milder Form früher unentdeckt geblieben sein, da erst seit ca. einem Jahrzehnt mit ausreichend sensitiven Methoden untersucht wird.

In diesem Zusammenhang muss noch die sogenannte Duarte-D2-Variante der Galaktosämie erwähnt werden. Personen mit diesem Genotyp weisen eine auf 25% der Norm verminderte GALT-Aktivität auf. Sie werden heute beim Neugeborenen-Screening aufgrund erhöhter D-Galaktose-1-Phosphat-Konzentration entdeckt und sind relativ häufig. In aller Regel wird trotz Milchfütterung keinerlei klinische Symptomatik beobachtet, und die Kinder entwickeln sich normal. Auch die anfänglich erhöhte Metabolit-Konzentration normalisiert sich innerhalb weniger Monate. Diese Personen sind auch im Erwachsenenalter klinisch und biochemisch vollständig unauffällig, so dass man hier eigentlich nicht von Patienten sprechen sollte. Dieses Kollektiv ist für unsere Fragestellung nicht von primärer Bedeutung, da aufgrund der vorigen Ausführungen angenommen werden kann, dass bei der hier vorliegenden residualen GALT-Aktivität von 25% der Norm ein normaler Stoffwechsel der endogenen Galaktose vorliegt. Die hier vorgestellten Befunde der D-Galaktose-Umsatzmessungen bei einer Person mit Duarte-D2-Genotyp bestätigen diese Annahme und dürften repräsentativ für das gesamte Kollektiv sein.

Eine deutschlandweite Suche nach Patienten mit residualer GALT-Aktivität im Bereich von 2 bis 20% der Norm ergab letztlich ein Kollektiv von 4 nicht erwachsenen Patienten mit etwa ähnlichem Alter. Dieses Kollektiv haben wir dann auf die oben genannte Duarte-D2-Variante und um fünf bereits früher untersuchte Patienten mit residualer GALT-Aktivität < 1% der Norm erweitert.

Bei den 10 Patienten wurden insgesamt 11 verschiedene Mutationen gefunden. Für sechs Mutationen, nämlich R67C, Q188R, R259W, N314D, H319Q und T350A liegen Daten zu funktionalen Auswirkungen auf die humane GALT-Aktivität vor. Diese wurden mittels Expressions-Versuchen in Hefe-Zellen gewonnen (Riehman et al., 2001). Diese sechs Mutationen repräsentieren 16 der insgesamt 20 mutierten Allele (entspricht 80%). Insgesamt stimmen die, in dem Expressions-System erhobenen Befunde gut mit den bei diesen Patienten gemessenen residualen GALT-Aktivitäten überein.

Endogene Galaktose-Bildung und Galaktose-Toleranz

Die hier erhobenen Daten zeigten eine inverse Korrelation zwischen der residualen GALT-Aktivität in den Erythrozyten der Patienten und der endogenen D-Galaktose-Freisetzung. Dabei nahm die Freisetzungsrates exponentiell mit zunehmender GALT-Aktivität ab. Bei einer Restaktivität von ca. 5% der Norm wurde eine konstante und normnahe Freisetzungsrates erreicht. Eine Extrapolation der Daten mittels eines einfachen Exponentialfunktionsmodells ergab bei vollständigem Ausfall der GALT-Aktivität eine zu erwartende totale D-Galaktose-Freisetzung von ca. 7 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG. Dieser Wert ist etwa doppelt so hoch wie der bei den Patienten mit GALT-Aktivitäten $< 1\%$ der Norm gemessene Wert. Dies lässt vermuten, dass bei diesen Patienten etwa die Hälfte der insgesamt in extrahepatischen Geweben aus dem Abbau von Glykoproteinen und Glykolipiden freigesetzten D-Galaktose am Ort der Freisetzung auch wieder über den Leloir-Stoffwechselweg abgebaut wird.

Die Befunde zeigen weiter, dass bereits eine relativ geringfügige Steigerung der residualen GALT-Aktivität zu einer Verbesserung der Stoffwechselsituation führt (vgl. Abb. 1). Bereits bei einer GALT-Aktivität in den Erythrozyten von etwa 1 $\mu\text{mol/h}$ pro g_{Hb} , entsprechend einer residualen GALT-Aktivität nicht einmal ca. 5% der Norm, werden hinsichtlich des endogenen D-Galaktose-Umsatzes Werte erreicht, die denen gesunder Personen entsprechen. Diese Normalisierung gilt gleichermaßen für die dynamischen Parameter, diese sind die endogene D-Galaktose- R_a und die Bildungs- und renalen Ausscheidungs-rates von D-Galaktitol und D-Galaktonat, wie auch für die statischen Parameter, i.e. die intra- und extrazellulären Konzentrationen von D-Galaktose-Metaboliten. Insgesamt reicht also eine residuale GALT-Aktivität von ca. 5% Norm aus, um in allen Geweben, insbesondere in extrahepatischen Geweben, sicher zu stellen, dass die endogen gebildete D-Galaktose vollständig über den Leloir-Weg oxidativ abgebaut wird. Es kann also vermutet werden, dass bei einer residualen GALT-Aktivität von $\geq 5\%$ der Norm keine Effekte einer sogenannten „Autointoxikation“ mehr zu befürchten sind. Offensichtlich kommt es unter diesen Bedingungen nicht mehr zu einer auf eine endogene D-Galaktose-Bildung zurückzuführende Akkumulation der potentiell toxischen Stoffwechsel-Metaboliten D-Galaktose-1-Phosphat und D-Galaktitol.

Die Ergebnisse belegen auch, dass mit zunehmender residualer GALT-Aktivität die Belastung des Lebergewebes durch endogene D-Galaktose abnimmt. Da die Leber das Organ für die Verwertung der exogenen D-Galaktose darstellt, ist anzunehmen, dass durch die verminderte endogene Belastung einerseits und die relativ erhöhte Abbaukapazität andererseits die Verträglichkeit oder Toleranz für exogene D-Galaktose mit steigender residualer GALT-Aktivität deutlich zunimmt. Allerdings können aus den bisherigen Ergebnissen keine quantitativen Daten für die Toleranz für exogene, mit der Nahrung zugeführte, D-Galaktose abgeleitet werden.

Im vorigen Kapitel wurden Überlegungen zur Abschätzung der minimalen Toleranz für exogene D-Galaktose bei Patienten mit Galaktosämie vorgestellt. Im Folgenden soll versucht werden mit einem ganz anderen Ansatz die maximale Toleranz für D-Galaktose abzuleiten. Diese Überlegungen basieren auf den inzwischen über viele Jahren akkumulierten Daten zur D-Galaktose-Eliminationskapazität der Leber (GEC) bei Menschen. Dieser Ansatz wurde von Tygstrup (1963) etabliert und bestimmt die maximale GEC. Der Test gilt inzwischen als etablierter Leberfunktionstest.

Zur Ermittlung der GEC werden i.d.R. 500 mg D-Galaktose pro kg KG als intravenöser Bolus appliziert und dann der lineare Abfall der D-Galaktose-Konzentration im Plasma-Kompartiment und renale D-Galaktose-Ausscheidung bestimmt. Die D-Galaktose-Elimination erfolgt dabei zu ca. 90% durch den Leber-Metabolismus und ca. 10% durch die Nieren (Tygstrup 1963). Bei gesunden Erwachsenen wurde, übereinstimmend bei zahlreichen Autoren, mit dieser Methode eine mittlere GEC von 7 mg/min pro kg KG ermittelt.

Sollen diese Daten für eine Abschätzung der GEC bei Patienten mit Galaktosämie verwendet werden, ist zunächst zu berücksichtigen, dass bei Gesunden nicht die Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Reaktion sondern die Galaktokinase-Reaktion der geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des D-Galaktose-Abbaus darstellt. Bei gesunden Erwachsenen ist die GALT-Aktivität etwa zweifach höher als die GALK-Aktivität. Die GALT-Reaktion wird erst dann zum

geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, wenn die GALT-Aktivität um 50% vermindert ist. Diese Situation tritt typischerweise bei den heterozygoten Eltern von Patienten mit Galaktosämie auf.

Aufgrund dieser Überlegung sollte bei weiterer Verminderung der GALT-Aktivität die GEC entsprechend der Reduktion der geschwindigkeitsbestimmenden Enzym-Reaktion abnehmen. D.h. bei einer residualen GALT-Aktivität von 25% der Norm, die typischerweise bei Personen mit Duarte-D2-Genotyp auftritt, dürfte die GEC auf ca. 3 mg/min pro kg KG reduziert sein. Bei einer residualen GALT-Aktivität von 5% der Norm, also dem o.a. Grenzwert für die Normalisierung der endogenen D-Galaktose-Elimination, kann die GEC auf unter 1 mg/min pro kg KG geschätzt werden. Bei einer residualen Enzymaktivität von ca. 0.5% der Norm, die typischerweise bei Patienten mit klassischer Galaktosämie zu finden ist, könnte die GEC dann entsprechend 0.1 mg/min pro kg KG betragen. Falls z.B. letzteres zutrifft, sollte ein erwachsener Patient mit klassischer Galaktosämie bei einem Körpergewicht von 70 kg über den Tag verteilt bis zu 10 g D-Galaktose durch den Leber-Stoffwechsel eliminieren können. Diese Abschätzung liegt nahe der mittleren D-Galaktose-Zufuhr gesunder Erwachsene, die 10 bis 15 g D-Galaktose pro Tag mit der Nahrung aufnehmen. Tatsächlich gibt es auch sporadische Berichte über Patienten mit klassischer Galaktosämie, die auch ohne Einhaltung einer Diät, D-Galaktose-Metabolit-Konzentrationen in Zellen und Körperflüssigkeiten aufweisen, die mit Konzentrationen bei diätetisch behandelten Patienten vergleichbar sind (Lee et al., 2004). Anzumerken ist hier, dass unter Diät die Patienten ca. 50 mg D-Galaktose pro Tag zu sich nehmen (Berry et al., 1993).

Falls diese Überlegungen letztlich zutreffen, sollte bei einer GALT-Aktivität von 5% der Norm die maximale D-Galaktose-Toleranz ca. 70 g D-Galaktose pro Tag betragen, eine Zufuhrmenge (i.e. 4 L Milch), die mit einer normalen Ernährung nicht erreicht wird. Entsprechend sollte bei Patienten mit Duarte-D2-Genotyp (GALT-Aktivität ca. 25% der Norm) aufgrund der hohen theoretischen D-Galaktose-Toleranz im Erwachsenenalter keine Zufuhr-Beschränkung erforderlich sein. Eine Vermutung, die zumindest durch die Erfahrung voll bestätigt wird. Allerdings steht dies im scheinbaren Gegensatz dazu, dass Neugeborene mit dem

Duarte-D2-Genotyp durch deutlich erhöhte Konzentrationen an D-Galaktose-1-Phosphat im Neugeborenen-Screening auffällig werden (ohne dass jedoch die typischen klinischen Zeichen der klassischen Galaktosämie auftreten). Die Erklärung dürfte darin liegen, dass bei diesen Neugeborenen aufgrund der reduzierten GALT-Aktivität diese Enzymreaktion insgesamt zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die D-Galaktose-Elimination wird. Da die spezifische GALT-Aktivität im Leber-Gewebe nicht vom Alter abhängig ist, kann die maximale GEC für diese Neugeborenen zu etwa 5 g D-Galaktose pro kg KG pro Tag abgeschätzt werden. Dies entspricht bei einem 3.5 kg schweren Neugeborenen 32 g Laktose pro Tag. Diese Menge ist in etwa 500 mL Muttermilch enthalten. Das Volumen entspricht der normalen Trinkmenge des Säuglings von etwa ein fünftel bis ein sechstel seines Körpergewichts. Unter diesen Bedingungen ist damit die Grenze der Eliminationskapazität der GALT-Reaktion beinahe erreicht. Aufgrund des großen Überschusses an GALK-Aktivität kann es initial zu einem moderaten Anstieg des D-Galaktose-1-Phosphats kommen. Aufgrund des Rückgangs der GALK-Aktivität normalisieren sich die Stoffwechselfparameter dann innerhalb von zwei bis drei Monaten.

Ausblick

Zu diesen Überlegungen muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass es sich um eine theoretisch abgeschätzte Toleranz bei Patienten auf der Grundlage der maximalen Toleranz bei Gesunden handelt. Da unklar ist, ob eine solche Übertragung tatsächlich möglich ist, muss in nachfolgenden Studien experimentell die D-Galaktose-Toleranz bei Patienten mit klassischer Galaktosämie ermittelt werden. Aufgrund der Befunde zur Altersabhängigkeit der endogenen D-Galaktose-Bildung dürfte hier auch eine Altersabhängigkeit der Toleranz für exogene D-Galaktose von wesentlicher Bedeutung sein. Wir vermuten, dass diese Toleranz-Studien letztlich zu einem Paradigmen-Wechsel der Diätführung bei Galaktosämie führen werden.

Teil IV

Synopsis

10 Zur endogenen Galaktose-Bildung beim Menschen

Fragestellung und primäre Zielsetzung

Bei der klassischen Form der Galaktosämie ist der Abbau von D-Galaktose aufgrund eines angeborenen Mangels an Aktivität der D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase gestört. Als Folge akkumulieren die potentiell toxischen Metabolite D-Galaktose-1-Phosphat und D-Galaktitol. Die Therapie besteht in einer lebenslangen strikt laktose-freien und galaktose-armen Diät. Trotz strengster Diät persistieren bei den Patienten jedoch deutlich über die Norm erhöhte Metabolitspiegel. Seit langem wird vermutet, dass dies auf die Bildung von endogener D-Galaktose im Rahmen des Abbaus von Glykoproteinen und Glykolipiden zurückzuführen sein könnte. Zur Bedeutung der endogenen D-Galaktose-Synthese beim Menschen sind in der Literatur bisher allerdings keine zuverlässigen Daten publiziert.

Ziel dieser Arbeit war zunächst, die endogene D-Galaktose-Freisetzung mittels *in vivo* Stoffwechselumsatzmessung vergleichend bei Gesunden und bei Patienten mit klassischer Galaktosämie quantitativ zu erfassen.

Die vermutete endogene D-Galaktose-Bildung aus Glykoprotein- und Glykolipidumsatz wird nicht nur vom normalen Erhaltungsstoffwechsel beeinflusst sondern dürfte auch mit der Wachstumsrate korreliert sein. Um diese weitergehende Hypothese zu prüfen, wurde bei Patienten mit Galaktosämie untersucht, ob und inwieweit die endogene D-Galaktose-Freisetzung vom Wachstum, also dem Alter der Patienten, abhängig ist.

Etablierung spezieller Analysenverfahren

Eine ausführliche Literaturrecherche vor Beginn der *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen ergab, dass bisher keine geeigneten und/oder ausreichend sensitiven Methoden zur Bestimmung der Konzentration und ^{13}C -

Anreicherung der D-Galaktose-Metabolite in Zellen und Körperflüssigkeiten publiziert wurden. Daher wurde für die Bestimmungen der Metabolite D-Galaktose, D-Galaktose-1-Phosphat, D-Galaktitol, und D-Galaktonat jeweils spezielle gaschromatographisch-massenspektrometrische Analysenverfahren unter Einsatz U-¹³C-markierter interner Standards ausgearbeitet. Nach Metabolitextraktion, Aufreinigung durch Ionenaustauschchromatographie und Metabolit-spezifischer Derivatisierung erfolgte die Quantifizierung mittels der stabil-Isotopen-Verdünnungs-Technik.

Alle Verfahren wurden hinsichtlich der Anwendbarkeit für Analysen bei Gesunden und Patienten evaluiert und waren hochsensitiv (D-Galaktose < 0.02 µmol/L, D-Galaktose-1-Phosphat < 0.01 µmol × L_{RBC}⁻¹, D-Galaktitol < 0.01 µmol × L⁻¹, D-Galaktonat < 1.0 µmol × L⁻¹) und gut reproduzierbar (VK < 15%).

Endogene Bildung von Galaktose

Die *in vivo* Umsatzmessungen zum D-Galaktose-Stoffwechsel wurden unter Einsatz der stabil-Isotopen-Technik mit D-[1-¹³C]Galaktose als Substrat durchgeführt.

Zur Etablierung eines Referenzbereichs wurden zunächst gesunde Erwachsene (n=7) untersucht. Bei diesem Kollektiv lag die Rate der D-Galaktose-Freisetzung aus endogenen, extrahepatischen Geweben (R_a, „rate of appearance in plasma“) im Mittel bei 0.29 ± 0.04 µmol/h pro kg KG. Die in das Plasma freigesetzte endogene D-Galaktose wurde praktisch vollständig (> 98%) von der Leber aufgenommen und oxidativ abgebaut. Die D-Galaktose-Ausscheidung über die Nieren war dagegen vernachlässigbar gering (< 2%).

Danach wurden die *in vivo* Umsatzmessungen bei einem genotypisch homogenen Kollektiv von achtzehn Q188R-homozygoten Patienten mit klassischer Galaktosämie (GALT-Aktivität in Erythrozyten < 1% der Norm) im Alter zwischen 4 und 38 Jahren durchgeführt. Die extrahepatische Freisetzungsrates endogener D-

Galaktose (R_a) war altersabhängig und nahm von etwa 4.6 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei Kleinkindern exponentiell auf etwa auf etwa 2.0 $\mu\text{mol/h}$ pro kg KG bei Erwachsenen ab. Die R_a bei erwachsenen Patienten war damit über 10fach höher als bei Gesunden. Ähnlich wie bei Gesunden wurde ins Plasma freigesetzte D-Galaktose zu > 99% in der Leber verstoffwechselt.

Parallel zur R_a der D-Galaktose nahmen bei den Patienten auch die Freisetzungsraten von D-Galaktitol- und die D-Galaktonat mit zunehmendem Alter ab. Das Verhältnis der Freisetzungsraten von D-Galaktose zu D-Galaktitol zu D-Galaktonat war mit etwa 10:5:1 weitgehend konstant. Im Gegensatz zur D-Galaktose wurden D-Galaktitol und D-Galaktonat nahezu vollständig über die Niere ausgeschieden.

Die totale endogene D-Galaktose-Freisetzungsrates wurde als Summe aus der D-Galaktose- R_a und der Ausscheidung von D-Galaktitol und D-Galaktonat berechnet. Die totalen D-Galaktose-Freisetzungsraten konnten sehr gut an das einfache Exponentialfunktionsmodell $y = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot t)$ angepasst werden. Mit diesem Model ergaben sich Schätzwerte für die totale D-Galaktose-Freisetzungsrates von ca. 41 mg/Tag pro kg KG bei Säuglingen und Kleinkinder und von 13 mg/Tag pro kg KG bei erwachsenen Patienten.

Um zu prüfen, inwieweit die bei Q188R homozygoten Patienten erhobenen Daten für das gesamte Patientenkollektiv repräsentativ sind, wurden auch bei einer Anzahl ($n=17$) compound heterozygoter Patienten im Alter zwischen 4 und 34 Jahren mit vergleichbar niedriger GALT-Aktivität (< 1% der Norm) *in vivo* Stoffwechselumsatzmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten insgesamt eine sehr gute Übereinstimmung mit den Daten für das Q188R-homozygote Patientenkollektiv. Z.B. lagen bei den compound heterozygoten Patienten die mittleren Schätzwerte des Exponentialfunktionsmodells für die totale endogene D-Galaktose-Freisetzung bei 42 mg/Tag pro kg KG für Neugeborene und bei 15 mg/Tag pro kg KG für erwachsenen Patienten.

Insgesamt zeigten diese Befunde, dass bei Patienten mit klassischer Form der Galaktosämie (GALT < 1% der Norm) - unabhängig von Genotyp - beträchtliche Mengen an D-Galaktose endogen freigesetzt wurden. Durch diese Ergebnisse wird letztlich die Hypothese zum Einfluss der endogenen D-Galaktose-Bildung auf die Metabolitkonzentrationen bei Galaktosämie bestätigt. Zudem steht die hier beobachtete Altersabhängigkeit der totalen D-Galaktose-Freisetzungsrates in Übereinstimmung mit unserer Vermutung, dass die Bildungsrate der endogenen D-Galaktose im Rahmen des Glykoprotein- und Glykolipidstoffwechsels auch mit der Wachstumsrate korreliert sein dürfte.

Bei allen Patienten wurde eine geringe residuale GALT-Aktivität in den Erythrozyten nachgewiesen. In Übereinstimmung damit war auch bei allen Patienten eine oxidative Verstoffwechslung der D-Galaktose *in vivo* nachweisbar. Daraus konnte geschlossen werden, dass ein noch unbekannter Anteil der D-Galaktose nach der Freisetzung aus der Protein- bzw. Lipid-Bindung intrazellulär direkt am Entstehungsort metabolisiert wurde und damit einer Messung im Blut-Kompartiment nicht zugänglich war. Demzufolge sollte die endogene D-Galaktose-Bildung bei klassischer Galaktosämie insgesamt höher sein, als die mittels D-Galaktose-Stoffwechselumsatzmessungen erfasste totale D-Galaktose-Freisetzung.

Um diese Vermutung zu prüfen wurden *in vivo* Studien bei Patienten mit weitestgehend blockiertem Abbau der D-Galaktose durchgeführt. Stoffwechseluntersuchungen bei drei erwachsenen Patienten mit vollständigem Ausfall der D-Galaktokinase-Aktivität ergaben, dass die totale D-Galaktose-Freisetzungsrates bei diesen Patienten etwa 3fach höher lag als bei altersentsprechenden Patienten mit D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte abgeschätzt werden, dass bei erwachsenen Patienten mit klassischer Galaktosämie ca. 65% der gesamten in extrahepatischen Geweben endogen gebildeten D-Galaktose direkt abgebaut wurde. Etwa 25% wurde in das Plasma-Kompartiment freigesetzt und in der Leber abgebaut. Etwa 10% wurde als D-Galaktitol oder D-Galaktonat renal eliminiert.

Die obigen Befunde deuteten darauf hin, dass Patienten mit klassischer Galaktosämie, trotz sehr geringer residualer GALT-Aktivität, beträchtliche Mengen an D-Galaktose oxidativ verstoffwechseln können. Demzufolge sollte jede Erhöhung der residualen GALT-Aktivität zu einer deutlichen Erhöhung der Kapazität für die Elimination von D-Galaktose führen. Auch bei deutlich reduzierter GALT-Aktivität sollte es damit letztlich zu einer Normalisierung des D-Galaktose-Stoffwechsels kommen. Um den Einfluss der residualen GALT-Aktivität auf die D-Galaktose-Freisetzung zu prüfen, wurden Stoffwechselumsatzmessungen bei Patienten durchgeführt, die bei vergleichbarem Alter unterschiedliche residuale GALT-Aktivitäten zwischen $< 1\%$ und 25% der Norm aufwiesen. Diese Untersuchungen zeigten eine exponentielle Abnahme der totalen endogenen D-Galaktose-Freisetzung mit zunehmender residualer GALT-Enzymaktivität. Ab einer residualen Enzymaktivität von etwa 5% der Norm wurden praktisch normale Freisetzungsraten erreicht.

Mögliche Bedeutung der Ergebnisse

Insgesamt bestätigen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde sowohl die ursprünglich Hypothese einer relevanten endogenen D-Galaktose-Bildung beim Menschen als auch die weiterführende Hypothese einer positiven Korrelation von Wachstumsrate und endogener D-Galaktose-Bildung (s. Kap. 7,8).

Diese Befunde lieferten auch eine Erklärung dafür, dass bei Neugeborenen und Säuglingen, trotz vergleichbar strikter Diät, immer höhere Konzentrationen der D-Galaktose-Metabolite gefunden werden als bei erwachsenen Patienten. Außerdem legt die altersabhängige Reduktion der endogenen D-Galaktose-Belastung aus extrahepatischen Quellen nahe, dass mit zunehmendem Alter die Toleranz der Patienten für exogene, mit der Nahrung zugeführte D-Galaktose zunehmen sollte.

Auf der Grundlage der Befunde wurden erste theoretische Schätzung zur D-Galaktose-Toleranz durchgeführt. Danach kann die Toleranz für exogene D-Galaktose z.B. bei einem erwachsenen Galaktosämie-Patienten von 70 kg

Körpergewicht mindestens ca. 1 g D-Galaktose pro Tag (s. Kap. 8) möglicherweise aber auch mehr als etwa 10 g pro Tag (s. Kap. 9) betragen. Berücksichtigt man, dass bei der derzeitigen diätetischen Therapie die Zufuhr mit der Nahrung deutlich weniger als 0.1 g D-Galaktose pro Tag bei erwachsenen Patienten beträgt, sollte also zumindest im Erwachsenenalter eine diätetisch relevante D-Galaktose-Toleranz bei klassischer Galaktosämie vorhanden sein.

Das Vorliegen einer solchen Toleranz für exogene D-Galaktose muss nun in nachfolgenden D-Galaktose-Belastungsstudien experimentell geprüft werden. Sollte die Toleranz in der erwarteten Größenordnung verifiziert werden können, dürfte dies zu einem Paradigmenwechsel bei den Diätetempfehlungen führen. Diese sind derzeit für Patienten unabhängig vom Alter, äußerst restriktiv und nur schwierig einzuhalten.

Bezüglich der langfristigen Entwicklung von neurologisch-kognitiven Defiziten bei Patienten mit Galaktosämie deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass nicht die exogen mit der Nahrung zugeführte D-Galaktose, sondern vor allem die endogen gebildete D-Galaktose die entscheidende Rolle spielt. Weiterführende Untersuchungen zur zellulären Pathobiochemie der D-Galaktose-Metaboliten sind nun erforderlich, um zu klären, welche Mechanismen den Langzeitschäden im Zentralnervensystem zugrunde liegen.

Literatur

- Acosta PB, Gross KC. 1995. Hidden sources of galactose in the environment. *Eur J Pediatr* 154:87-89.
- Allsop JR, Wolfe RR, Burke JF. 1978. Tracer priming the bicarbonate pool. *J Appl Physiol* 45:137-139.
- Belman AL, Moshe SL, Zimmerman RD. 1986. Computed tomographic demonstration of cerebral edema in a child with galactosemia. *Pediatrics* 78:606-609.
- Bergen WR, Ng WG, Donnell GN. 1972. Galactonic acid in galactosemia: Identification in the urine. *Science* 176:683-684.
- Bergholdt A, Overgaard J, Colding A. 1993. Separation of D-galactonic and D-gluconic acids by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr* 644:412-415.
- 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 uridylyltransferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 16:91-100.
- Berry GT, Nissim I, Mazur AT, Elsas LJ, Singh RH, Klein PD, Gibson JB, Lin Z, Segal S. 1995a. In vivo oxidation of [¹³C]galactose in patients with galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Biochem Mol Med* 56:158-165.
- Berry GT, Nissim I, Lin Z, Mazur AT, Gibson JB, Segal S. 1995b. Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosaemia. *Lancet* 346:1073-1074.
- Berry GT, Nissim I, Gibson JB, Mazur AT, Lin Z, Elsas LJ, Singh RH, Klein PD, Segal S. 1997. Quantitative assessment of whole body galactose metabolism in galactosemic patients. *Eur J Pediatr* 156:43-49.
- Berry GT, Wehrli S, Reynolds R, Palmieri M, Frangos M, Williamson JR, Segal S. 1998. Elevation of erythrocyte redox potential linked to galactonate biosynthesis: elimination by Tolrestat. *Metabolism* 47:1423-1428.
- Blake JD, Clarke ML, Richards GN. 1987. Determination of organic acids in sugar cane process juice by high-performance liquid chromatography: improved resolution using dual Aminex HPX-87H cation-exchange columns equilibrated to different temperatures. *J Chromatogr* 398:265-277.
- Bland JM, Altman DJ. 1986. Regression analysis. *Lancet* 1:908-909.
- Bosch AM, Prick L, Ter Horst NM, van Kempen JV, Wanders RJ, Duran M, Bakker HD, Wijburg FA. 2002. Oral loading does not affect clinical or biochemical parameters in classical galactosemia. *J Inher Metab Dis* 25 (1):129.
- Brandt I, Reinken L. 1988. The growth rate of healthy children in the first 16 years: Bonn-Dortmund longitudinal developmental study. *Klin Padiatr* 200:451-456.
- Cleary MA, Heptinstall LE, Wraith JE, Walter JH. 1995. Galactosaemia: relationship of IQ to biochemical control and genotype. *J Inher Metab Dis* 18:151-152.
- Chen J, Yager CT, Reynolds RA, Palmieri M, Segal S. 2002a. Erythrocyte galactose-1-phosphate quantified by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 48:604-612.
- Chen J, Yager CT, Reynolds RA, Segal S. 2002b. Identification of galactitol and galactonate in red blood cells by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 322:37-41.

Christacos NC, Fridovich-Keil JL. 2002. Impact of patient mutations on heterodimer formation and function in human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Mol Genet Metab* 76:319-326.

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

Dahlqvist A. 1983. Determination of galactose-1-phosphate. In: Bergmeyer J, Graßl M [eds]: *Methods of enzymatic analysis* 3. ed. Vol. VI:297-303, Weinheim, Derrfield Beach, Basel (Verlag Chemie).

Donnell GN, Collado M, Koch R. 1961. Growth and development of children with galactosemia. *J Pediatr* 58:836-844.

Durand G, Seta N. 2000. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem* 46:795-805.

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.

Elsas LJ, Lai K, Saunders CJ, Langley SD. 2001. Functional analysis of the human galactose-1-phosphate uridylyltransferase promoter in Duarte and LA variant galactosemia. *Mol Genet Metab* 72:297-305.

Elsevier JP, Fridovich-Keil JL. 1996. The Q188R mutation in human galactose-1-phosphate uridylyltransferase acts as a partial dominant negative. *J Biol Chem* 271: 32002-32007.

Elsevier JP, Wells L, Quimby BB, Fridovich-Keil JL. 1996. Heterodimer formation and activity in the human enzyme galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7166-7171.

Ferraris RP, Diamond J. 1997. Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev* 77:257-302.

Fischer K, Bipp HP, Bieniek D, Kettrup A. 1995. Determination of monomeric sugar and carboxylic acids by ion-exclusion chromatography. *J Chromatogr* 706:361-373.

Flach JE, Reichardt JK, Elsas LJ. 1990. Sequence of a cDNA encoding human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Mol Biol Med* 7:365-369.

Fornaini G, Dacha M, Magnani M, Stocchi V. 1982. Hexokinase from rabbit red blood cells. *Meth Enzymol* 90:3-10.

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

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 uridylyltransferase gene associated with galactosemia in a single family. *Am J Hum Genet* 56:640-646.

Fujimura Y. 1983. Determination of galactose. In Bergmeyer J, Graßl M [eds]: *Methods of enzymatic analysis*, 3. ed. Vol. VI:288-296, Wienheim, Derrfield Beach, Basel (Verlag Chemie).

Gibson JB, Reynolds RA, Rogers S, Palmieri MJ, Segal S. 1993. Uridine diphosphoglucose content of human erythrocytes: assessment by conversion to uridine diphosphoglucuronate. *J Pediatr* 123:906-914.

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

- Guo S, Sato T, Shirane K, Furukawa K. 2001. Galactosylation of N-linked oligosaccharides by human beta-1,4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells. *Glycobiology* 11:813-820.
- Hanus O, Zvackova I, Gencurova V, Gabriel B. 1992. Relation of lactose levels in milk and indicators of mammary gland health in the first third of lactation. *Vet Med (Praha)* 37:595-604.
- Haycock GB, Schwartz GJ, Wisotsky DH. 1978. Geometric method for measuring body surface area: a height-weight formula validated in infants, children, and adults. *J Pediatr* 93:62-66.
- Hellerstein MK, Kaempfer S, Schwarz JM, Wu K, Shackleton CHL. 1995. Rate of glucose entry into hepatic UDP-glucose by the direct pathway in fasted and fed states in normal humans. *Metab Clin Exp* 44:172-182.
- Henderson JM, Kutner MH, Bain RP. 1982. First-order clearance of plasma galactose: the effect of liver disease. *Gastroenterology* 83:1090-1096.
- Heyman S, Kinoshita JH. 1965. Isolation and properties of lens aldose reductase. *J Biol Chem* 240:877-880.
- Heyman S, Lou M, Merola L, Kinoshita JH. 1966. Aldose reductase activity in the lens and other tissues. *Biochim Biophys Acta* 128:474.
- Hicks KB, Lim PC, Haas MJ. 1985. Analysis of uronic and aldonic acids, their lactones, and related compounds by high-performance liquid chromatography on cation-exchange resins. *J Chromatogr* 319:159-171.
- Hochstein LI, Dalton BP, Pollock G. 1976. The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: identification of galactonic acid as a product of galactose metabolism. *Can J Microbiol* 22:1191-1196.
- Holton JB, Walter JH, Tyfield LA. 2001. Galactosemia. In: Sriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B [eds.]: *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Diseases*, 8th ed. McGraw-Hill:1553-1587, New York.
- 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.
- 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
- Isselbacher KJ. 1957. Evidence for an accessory pathway of galactose metabolism in mammalian liver. *Science* 126:652-654.
- Jakobs C, Warner TG, Sweetman L, Nyhan WL. 1984. Stable isotope dilution analysis of galactitol in amniotic fluid: an accurate approach to the prenatal diagnosis of galactosemia. *Pediatr Res* 18:714-718.
- Jakobs C, Schweitzer S, Dorland B. 1995. Galactitol in galactosemia. *Eur J Pediatr* 154:50-52.
- Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, Skovby F, Norgaard-Pedersen B, Simonsen H. 2001. Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: a retrospective study. *Clin Chem* 47:1364-1372.
- Kamalanathan L, Hammen HW, Wendel U, Schadewaldt P. 2003. Endogenous galactose release in classical galactosemia: influence of residual enzyme activity. *J Inherit Metab Dis* 26:125.

- 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.
- Kaufman FR, McBride-Chang C, Manis FR, Wolff JA, Nelson, MD. 1995. Cognitive functioning, neurologic status and brain imaging in classical galactosemia. *Eur J Pediatr* 154:2-5.
- Kirkman HN. 1995. Measurements of uridine diphosphate glucose and uridine diphosphate galactose:an appraisal. *Eur J Pediatr* 154:72-74.
- Kolosha V, Anoaia E, de Cespedes C, Gitzelmann R, Shih L, Casco T, Saborio M, Trejos R, Buist N, Tedesco T, Skach W, Mitelmann O, Ledee D, Huang K, Stambolian D. 2000. Novel mutations in 13 probands with galactokinase deficiency. *Hum Mutat* 15:447-453.
- Komrower GM, Lee DH. 1970. Long-term follow-up of galactosaemia. *Arch Dis Child* 45:367-373.
- Kozak L, Francova H, Pijackova A, Macku J, Stastna S, Peskovova K, Martincova O, Krijt J. 1999. Presence of a deletion in the 5' upstream region of the GALT gene in Duarte (D2) alleles. *J Med Genet* 36:576-578.
- Kunst A, Dreager B, Ziegenhorn J. 1983. UV-method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer J, Graßl M [eds]:*Methods of enzymatic analysis* 3. ed. Vol. VI:288-296, Weinheim, Derrfield Beach, Basel (Verlag Chemie).
- Kunz C, Rudloff S, Schad W, Braun D. 1999. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br J Nutr* 82:391-9.
- Landau BR. 2001. Methods for measuring glycogen cycling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E413-E419.
- Laker MF. 1980. Estimation of neutral sugars and sugar alcohols in biological fluids by gas-liquid chromatography. *J Chromatogr* 184:457-470.
- Langley SD, Lai K, Dembure PP, Hjelm LN, Elsas LJ. 1997. Molecular basis for Duarte and Los Angeles variant galactosemia. *Am J Hum Genet* 60:366-372.
- Lee PJ, Lilburn M, Wendel U, Schadewaldt P. 2004. A woman with untreated galactosaemia. *Lancet* 362:330
- Lehrfeld J. 1985a. Gas-liquid chromatographic determination of aldonic acids as acetylated aldonamides. *Carbohydrate Research* 135:179-185.
- Lehrfeld J. 1985b. Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of aldonic acids and aldoses. *Anal Chem* 57:346-348.
- Leloir LF. 1951. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivate. *Arch Biochem* 33:186.
- 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.
- Martin RF. 2000. General deming regression for estimating systematic bias and its confidence interval in method-comparison studies. *Clin Chem* 46:100-104.
- Martínez-Castro I, Páez, MI, Sanz J, García-Raso A. 1989. Gas chromatographic behaviour of carbohydrate trimethylsilyl ethers II. Aldohehexoses. *J Chromatogr* 462:49-60.
- Nadler HL, Inouye T, Hsia DYY. 1969. Clinical galactosemia: a study of fiftyfive-cases. In: Hsia DYY [ed.]: *Galactosemia*, Charles C. Thomas:274, Springfield.

- National Center for Biotechnology Information. 2004. MIM No. 230200, 230350 and 230400. Galactosemia. OMIM™: Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.
- Ng WG, Donnell GN, Bergren WR. 1975. Mannitol excretion in galactosemia patients. *Clin Chim Acta* 64:39-44.
- Ng WG, Xu YK, Kaufman F, Donnell GN. 1989. Deficit of uridine diphosphate galactose in galactosemia. *J Inher Metab Dis* 115:166-167.
- Ning C, Fenn PT, Blair IA, Berry GT, Segal S. 2000. Apparent galactose appearance rate in human galactosemia based on plasma [¹³C]galactose isotopic enrichment. *Mol Genet Metab* 70:261-271.
- 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.
- Petersson G. 1974. Gas-Chromatographic analysis of sugars and related hydroxy acids as acyclic oxime and ester trimethylsilyl derivatives. *Carbohydr Res* 33:47-61.
- Podskarbi T, Kohlmetz T, Gathof BS, Kleinlein B, Bieger WP, Gresser U, Shin YS. 1996. Molecular characterization of Duarte-1 and Duarte-2 variants of galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Inher Metab Dis* 19:638-644.
- Podskarbi T, Bieger WP, Shin YS. 1997. Allelic heterogeneity of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene: biochemical and clinical phenotypes. *Mol Diagn*:A27.
- Pudek MR, Jamani A, Bernstein V, Scudamore C, Secombe D. 1990. Low concentration galactose determination in plasma adapted to the Cobas-Bio. *Clin Biochem* 23:221-223.
- Rakotomanga S, Baillet A, Pellerin F, Baylocq-Ferrier D. 1991. Simultaneous determination of gluconolactone, galactonolactone and galactitol in urine by reversed-phase liquid chromatography: application to galactosemia. *J Chromatogr* 570:277-284.
- Rancour NJ, Hawkins ED, Wells WW. 1979. Galactose oxidation in liver. *Arch Biochem Biophys* 193:232-241.
- Reichardt JK, Berg P. 1988. Cloning and characterization of a cDNA encoding human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Mol Biol Med* 5:107-122.
- 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.
- Reichardt JK, Packman S, Woo SL. 1991. Molecular characterization of two galactosemia mutations: correlation of mutations with highly conserved domains in galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Am J Hum Genet* 49:860-867.
- Reichardt JK, Belmont JW, Levy HL, Woo SL. 1992. Characterization of two missense mutations in human galactose-1-phosphate uridylyltransferase: different molecular mechanisms for galactosemia. *Genomics* 12:596-600.
- Reichardt JK, Novelli G, Dallapiccola B. 1993. Molecular characterization of the H319Q galactosemia mutation. *Hum Mol Genet* 2:325-326.
- Riehman K, Crews C, Fridovich-Keil JL. 2001. Relationship between genotype, activity, and galactose sensitivity in yeast expressing patient alleles of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Biol Chem* 276:10634-10640.
- Roe TF, Hallatt JG, Donnell GN, Ng WG. 1971. Childbearing by a galactosemic woman. *J Pediatr* 78:1026-1030.

- Roe TF, Ng WG, Bergren WR, Donnell GN. 1973. Urinary galactitol in galactosemic patients. *Biochem Med* 7:266-273.
- Rogers S, Lichtenstein G, Gentile D, Segal S. 1984. Accumulation of galactonate in liver of suckling rats perfused with galactose. *Biochem Biophys Res Commun* 118:304-309.
- Roschlau G, Hinkel GK, Gottschalk B. 1969. Clinical and morphological findings in during galactosemia. *Monatsschr Kinderheilkd* 117:7-13.
- Schadewaldt, P, Hammen HW, Loganathan K, Bodner-Leidecker A, Wendel U. 2000. Analysis of concentration and ^{13}C enrichment of D-galactose in human plasma. *Clin Chem* 46:612-619.
- Schadewaldt P, Killius S, Kamalanathan L, Hammen HW, Strassburger K, Wendel U. 2003. Renal excretion of galactose and galactitol in patients with classical galactosaemia, obligate heterozygous parents and healthy subjects. *J Inherit Metab Dis* 26:459-479.
- 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.
- Schmitt-Kopplin Ph, Fischer K, Freitag D, Kettrup A. 1998. Capillary electrophoresis for the simultaneous separation of selected carboxylated carbohydrates and their related 1,4-lactones. *J.Chromatogr* 807:89-100.
- Schumacher J, Randles JW, Riesner D. 1983. A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular virioids and virusoids. *Anal Biochem* 135:288-295.
- Schoeller DA, Schneider JF, Solomons NW, Watkins JB, Klein PD. 1977. Clinical diagnosis with the stable isotope ^{13}C in CO_2 breath tests: methodology and fundamental considerations. *J Lab Clin Med* 90:412-421.
- Schwarz HP, Schaefer T, Bachmann C. 1985. Galactose and galactitol in the urine of children with compound heterozygosity for Duarte variant and classical galactosemia ($\text{Gt}^{\text{D}}/\text{gt}$) after an oral galactose load. *Clin Chem* 31:420-422.
- Schwarz V. 1960. The value of galactose-1-phosphate determinations in the treatment of galactosaemia. *Arch Dis Child* 35:428-432.
- Schweitzer S, Shin Y, Jakobs C, Brodehl J. 1993. Long-term outcome in 134 patients with galactosaemia. *Eur J Pediatr* 152:36-43.
- Schweitzer S. 1995. Newborn mass screening for galactosemia. *Eur J Pediatr* 157:37-39.
- Segal S, Berry GT. Disorders of galactose metabolism. 1995. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D [eds.]: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. McGraw-Hill:967-1000, New York.
- Segal S, Rogers S, Holtzaple PG. 1971. Liver galactose-1-phosphate uridyl transferase: activity in normal and galactosemic subjects. *J Clin Invest* 50:500-506.
- Shin YS. 1991. Galactose metabolites and disorders of galactose metabolism. In: F.A. Hommes [eds.]: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*, Wiley-Liss:267-283, New York.
- Shin YS, Reith S, Hover S, Endres W. 1985. Uridine diphosphogalactose, galactitol and galactose-1-phosphate concentration in patients with classical galactosaemia. *Proceedings of the Annual Symposium of the SSIEM* 23:34.
- Shirazi-Beechey SP. 1995. Molecular biology of intestinal glucose transport. *Nutr Res Rev* 8:27-41.

Shreeve WW, Cerasi E, Luft R. 1970. Metabolism of [2-¹⁴C] pyruvate in normal, acromegalic and hgh-treated human subjects. *Acta Endocrinol* 65:155-169.

Sitzmann FC, Schmid RD, Kaloud H. 1977. Excretion of galactitol in the urine of heterozygotes of both forms of galactosemia. *Clin Chim Acta* 75:313-319.

Soendergaard G. 1958. Micro-Method for determination of blood galactose by means of glucose oxidation (notatin) and anthrone. *Scand J Clin Lab Invest* 10:203-210.

Sprong H, Degroote S, Nilsson T, Kawakita M, Ishida N, van der Sluijs P, van Meer G. 2003. Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 14:3482-3493.

Sweeley CC, Bentley R, Matika M, Wells WW. 1963. Liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J Am Chem Soc* 85:2497-2507.

Szafranek J, Pfaffenberger CD, Horning EC. 1974. Separation of aldonic, deoxyaldonic, hexuronic and hexaric lactones and acids using thermostable open tubular glass capillary columns. *J Chromatogr* 88:149-156.

Tedesco TA, Morrow G, Mellman WJ. 1972. Normal pregnancy and childbirth in a galactosemic woman. *J Pediatr* 81:1159-1161.

Thompson GN, Pacy PJ, Ford GC, Halliday D. 1989. Practical considerations in the use of stable isotope labelled compounds as tracers in clinical studies. *Biomed Environ Mass Spectrom* 18:321-327.

Trbusek M, Francova H, Kozak L. 2001. Galactosemia: deletion in the 5' upstream region of the GALT gene reduces promoter efficiency. *Hum Genet* 109:117-120.

Tserng KY, Kalhan SC. 1983. Estimation of glucose carbon recycling and glucose turnover with [U-¹³C]glucose. *Am J Physiol* 245 (Endocrinol Metab 8):476-482.

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 uridylyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 13:417-430.

Tygstrup N, Winkler K, Ringshospitalct B, Engell HC. 1954. A clinical method for determination of plasma galactose in tolerance tests. *Scand J Clin Lab Invest* 43:43-48.

Tygstrup N. 1963. Determination of the hepatic galactose elimination capacity after a single intravenous injection in man: the reproducibility and the influence of uneven distribution. *Acta Physiol Scand* 58:162-72.

von Reuss A. 1908. Zuckerausscheidung im Säuglingsalter: *Wien Med Wochenschr* 58:799-804.

Wada E, Tsumita T. 1984. Finding of a galactose-oxidation-product in lens of galactose-fed guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 125:643-648.

Wada E. 1986. Galactonolactone in experimental galactosemic animals. *Arch Biochem Biophys* 251:215-221.

Waggoner DD, Buist NR, Donnell GN. 1990. Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis* 13:802-818.

Wahlefeld AW, Siedel J. 1985. Creatine and Creatinine. In: Bergmeyer J, Graßl M [eds.]: *Methods of enzymatic analysis* 3. ed. Vol. VII:488-506, Weinheim, Derrfield Beach, Basel (Verlag Chemie).

Walter JH, Collins JE, Leonard JV. 1999. Recommendations for the management of galactosaemia: UK Galactosaemia Steering Group. *Arch Dis Child* 80:93-96.

Watanabe N, Kawasaki S. 1987. Determination of galactose in human plasma by HPLC with electrochemical detection. *Biomed Chromatogr* 2:95-98.

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

Weinstein AN, Segal S. 1968. The metabolic fate of [$1-^{14}\text{C}$]galactitol in mammalian tissue. *Biochim Biophys Acta* 156:9-16.

Wendel U, Kamalanathan L, Hammen HW, Schadewaldt P. 2002. Age dependence of endogenous formation in Q188R-homozygous galactosemic patients. *J Inher Metab Dis* 25 (1):131.

Wissenschaftliche Tabellen Geigy. 1977. Ciba-Geigy Ltd, Teilband Körperflüssigkeiten 8. ed.:213, Basel.

Wolfe RR. 1992. Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine: principles and practice of kinetic analysis:p 32, Willy-Liss New York.

Wolucka BA, Rush JS, Waechter CJ, Shibaev VN, de Hoffmann E. 1998. An electrospray-ionization tandem mass spectrometry method for determination of the anomeric configuration of glycosyl 1-phosphate derivatives. *Anal Biochem* 255:244-251.

Xu K, Wang L, Cai H, Zhang T, Zhang C, Matsumoto I. 2001. Screening for inborn errors of metabolism using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 758:75-80.

Xu YK, Kaufman FR, Donnell GN, Ng WG. 1995. Radiochemical assay of minute quantities of galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity in erythrocytes and leukocytes of galactosemia patients. *Clin Chim Acta* 235:125-136.

Yang YP, Corley N, Garcia-Heras J. 200. Molecular analysis in newborns from Texas affected with galactosemia. *Hum Mutat* 19:82-83.

Ye J, Baldwin RP. 1994. Determination of carbohydrates, sugar acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. *J Chromatogr* 687:141-148.

Yuh YS, Chen JL, Chiang CH. 1998. Determination of blood sugars by high pressure liquid chromatography with fluorescent detection. *J Pharm Biomed Anal* 16:1059-1066.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes „Endogene Galactosesynthese bei Galaktosämie: in vivo Untersuchungen unter Einsatz der stabil-Isotopen-Technik mit D-[1-¹³C]Galaktose (Leiter: Prof. Dr. U. Wendel, Prof. Dr. P. Schadewaldt)“ durchgeführt.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. rer. nat. P. Schadewaldt für die engagierte Betreuung meiner Arbeit. Weiterhin bin ich ihm für die zahlreichen Ratschläge die Unterstützung und sein Verständnis sehr dankbar.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Wagner möchte ich mich für die Betreuung und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. U. Wendel danke ich für die Unterstützung bei den Untersuchungen an Probanden und Patienten, sowie für sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bei Herrn Dipl.-Biol. H. W. Hammen bedanke ich mich herzlich für die Einweisung in die gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmungen. Für die Enzymaktivitätsbestimmungen sowie für die Synthese von D-[U-¹³C₆]Galaktitol und D-[U-¹³C₆]Galaktonat bin ich ihm sehr dankbar. Weiterhin danke ich ihm für die zahlreichen Hilfestellungen bei Stilistik und Grammatik der deutschen Sprache.

Bei Frau Dr. rer. nat. A. Bodner-Leidecker bedanke ich mich dafür, dass es ihr gelungen ist, Patienten bzw. deren Eltern für eine Teilnahme an den in vivo Untersuchungen zu gewinnen.

Frau J. Fundstein, Berlin, danke ich für die Isotopenratiomassenspektrometrischen Bestimmungen.

Bei Frau M. Müller bedanke ich mich herzlich für die Einweisung in die Sequenzierung-Analysen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. med. J. Karpi-Schadewaldt für ärztliche Betreuung der Probanden während der in vivo Untersuchungen bedanken.

Den Probanden und ganz besonders den Patienten und ihren Eltern möchte ich für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an den in vivo Untersuchungen ganz herzlich danken.