

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

**Galaktosetoleranz  
bei  
klassischer Galaktosämie**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von  
Karolin Thomas**

**2019**

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani

**Für meine Familie**

# Zusammenfassung

## Galaktosetoleranz bei klassischer Galaktosämie

KarolinThomas

**Fragestellung:** Aus den Ergebnissen von in vivo Galaktose-Umsatzstudien wurde die Hypothese einer möglichen Galaktosetoleranz im Erwachsenenalter für exogen zugeführte Galaktose abgeleitet. Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Galaktosetoleranz-Hypothese

**Methodik:** Zur Klärung der Hypothese führten wir eine prospektive, unizentrische open-label Beobachtungsstudie bei sieben erwachsenen Patienten mit klassischer Galaktosämie durch. Die Patienten wurden längerfristig mit exogen (zusätzlich zur Diät) zugeführter Galaktose belastet. Die Studie wurde in 3 Phasen unterteilt. Jede Studienphase dauerte ca. 6-8 Wochen. Nach einer Kontrollphase (Galaktoseaufnahme über die Nahrung bei normaler Diät ca. 1 mg/kg<sub>KG</sub> pro d) wurde bei insgesamt sieben Patienten täglich zusätzlich anfänglich 5 mg, später 10 mg und schließlich, bei vier Patienten, 15-20 mg Galaktose pro kg<sub>KG</sub> p.o. appliziert (häufig morgens und abends). Für das metabolische Monitoring wurden die Galaktose-Metabolite im Blut (wöchentlich), sowie die renale Ausscheidung der Metabolite Galaktose, Galaktitol und Galaktonat (täglich) mittels SID-GC-MS analysiert. Zur Stoffwechselüberwachung und Kontrolle der Leberfunktion wurden wöchentlich die Transaminasen bestimmt. Um das Verhältnis der normalen Nahrungsgalaktose zu der zusätzlichen Galaktosegabe abschätzen zu können, führten die Patienten ein Ernährungsprotokoll. Alle Patienten hatten einen klassischen Genotyp, eine residuale GALT-Aktivität < 1% der Norm, und eine gute diätetische Stoffwechseleinstellung (Gal-1-P < 5 mg/dL<sub>RBC</sub>).

**Ergebnisse:** Eine persistierende Akkumulation der Galaktosemetabolite konnte bei keinem Patienten, zu keinem Zeitpunkt der Studie, festgestellt werden. Drei Patienten zeigten dosisabhängige, zum Teil signifikante Anstiege des Gal-1-P in den Erythrozyten. Bei vier Patienten konnten keine Veränderungen der Gal-1-P Werte in den Erythrozyten in Abhängigkeit von der Galaktosedosis festgestellt werden. Die Galaktoseausscheidung mit dem Urin war bei fünf Patienten teilweise signifikant erhöht. Bei zwei Patienten konnten keine Veränderungen der Galaktoseausscheidung festgestellt werden.

**Interpretation:** Die Galaktose-Toleranzhypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Die Tatsache, dass bei keinem Patienten eine persistierende Akkumulation der Galaktosemetabolite auftrat, weist darauf hin, dass sich ein metabolisches Gleichgewicht zwischen Galaktosezufuhr und -abbau eingestellt hat. Unter der Berücksichtigung der hier erhobenen Daten sollte eine Diätlockerung mit einer zusätzlichen Galaktosezufuhr von 1000 mg Galaktose pro Tag von einem erwachsenen Patienten toleriert werden.

## Summary

### Galactose tolerance in classical galactosemia

Karolin Thomas

**Introduction:** In galactose-1-phosphate-uridylyltransferase (GALT) deficiency (classical galactosemia) a lifelong strict lactose-free and galactose-poor diet is essential as the only therapy of option. With respect to the dietary management, the extent of galactose restriction is a matter of discussion. Whether and to what extent a tolerance for food galactose may exist in classical galactosemia has not been systematically studied. The hypothesis of quantitatively relevant galactose tolerance in adult patients has recently been deduced from in vivo galactose turnover-studies in patients with classical galactosemia.

**Objectives:** The aim of this work was a experimental testing of the galactose tolerance hypothesis

**Methods:** An open-label observation study with seven adult galactosemic patients was performed. All patients had a classic genotype, a residual GALT activity in erythrocytes of < 1 % of control, and a good dietary compliance (gal-1-P < 5 mg / dL<sub>RBC</sub>). The study comprised several intervals of 6-8 weeks duration. After an basal control phase with documented dietary galactose intake of approx. 1 mg / kg body weight per d, the patients received a daily supplementary dose of initially 5, subsequently 10 and finally, in four of the patients, 15-20 mg galactose per kg body weight p.o.. Metabolic monitoring was performed by weekly measurement of galactose-1-phosphate and galactitol in erythrocytes and by daily analysis of the renal excretion of galactose, galactitol and galactonate. Stable isotope dilution – gas chromatography was used for analysis. Liver function was monitored weekly by analysis of aminotransferases and  $\gamma$ -GT in serum.

**Results:** Clinical deteriorations were not observed in the study. Activities of the aminotransferases and  $\gamma$ -GT remained consistently in the normal range. There was no indication of any persistently increasing accumulation of galactose metabolites in the individual study. In general, the levels of galactose metabolites remained unchanged with the exception of gal-1-P in erythrocytes and galactose in urine in some patients. Four patients showed no changes in gal-1-P<sub>Ery</sub>. In three patients indication for dose-dependent increases of gal-1-P<sub>Ery</sub> were found. Galactose excretion was significantly increased in five patients in a dose dependent manner and remained unchanged in two patients.

**Conclusion:** The existence of a galactose tolerance in classical galactosemia is consistent with the results of the present study. The absence of a persistent accumulation of galactose metabolites during the different phases of the study indicated metabolic equilibrium between dietary galactose supply and endogenous metabolic degradation. Based on the quantitative data collected in this study, an additional galactose intake of 1000 mg galactose per day should be tolerated by an adult galactosemic patient under strict dietary treatment.

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Galaktose-Stoffwechsel	1
1.2 Galaktosämie	3
1.2.1 Galaktokinase-Mangel	3
1.2.2 UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangel	4
1.2.3 Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel	5
2 Ziele der Arbeit	8
3 Material und Methoden	10
3.1 Studiendesign	10
3.2 Patienten	13
3.3 Ernährungsprotokolle	15
3.4 Chemikalien und Enzyme	15
3.5 Analytische Verfahren	16
3.5.1 Proben/-entnahme und -transfer	16
3.5.2 Galaktose-1-Phosphat und Galaktitol im Erythrozyten	16
3.5.3 Galaktose, Galaktitol und Galaktonat im Urin	17
3.5.4 Aufreinigung und Derivatisierung	18
3.6 Gaschromatographie-Massenspektrometrie	19
3.7 Genotypisierung	20
3.8 GALT-Aktivität	20
3.9 Sonstige Analysen	21
3.10 Statistik	21
4 Ergebnisse	22
4.1 Patientenbezogene Einzeldarstellung	24
4.2 Gesamtschau	45
5 Diskussion	48
5.1 Studienaufbau	48

5.1.1 Patientenkollektiv	48
5.1.2 Methodenkritik	50
5.1.3 Ergebniskritik	53
5.2 Schlussfolgerung	55
6 Literaturverzeichnis	57
Danksagung	

# 1 Einleitung

## 1.1 Galaktose – Stoffwechsel

D-Galaktose ist ein Monosaccharid, das überwiegend  $\beta$ -1,4-glycosidisch gebunden an D-Glukose, in Form des Disaccharids Laktose, vorkommt. Es findet sich zudem in anderen Oligo- und Polysacchariden und in freier Form. Nach Einschleusung in den Glukosestoffwechsel dient es als Energielieferant oder kann bei der Galaktosylierung von Proteinen und Lipiden Verwendung finden.

Die Aufnahme der D-Galaktose über die Nahrung erfolgt überwiegend in Form von Laktose. Vorrangige Quelle für Laktose in der Nahrung sind Milch und Milchprodukte. So beinhalten 100 g Kuhmilch ca. 2,5 g Galaktose und 100 g Muttermilch ca. 3,5 g Galaktose (Hanus et al., 1992; Kunz et al., 1999). Allerdings finden sich auch in vielen Getreide-, Gemüse- und Fleischsorten nennenswerte Galaktosemengen (Gross & Acosta, 1991; Acosta & Gross, 1995). Außerdem wurde mittlerweile die 1984 von Gitzelmann & Steinmann (Gitzelmann & Steinmann, 1984) aufgestellte These einer quantitativ relevanten endogenen Galaktosebildung bestätigt (Schadewaldt et al., 2004, 2014; Berry et al., 2004).

Die Verstoffwechslung der Galaktose beim Menschen erfolgt hauptsächlich über den von Leloir beschriebenen Eliminationsweg (Leloir, 1951; vgl. Abb.1). Das mit der Nahrung aufgenommene Disaccharid Laktose wird durch eine  $\beta$ -Glukosidase (Lactase; EC 3.2.1.108) im Dünndarm in seine Monosaccharide D-Glukose und D-Galaktose gespalten. Die weitere Verstoffwechslung von D-Galaktose nach der Resorption erfolgt vorrangig in der Leber.

Im ersten Schritt erfolgt mit Hilfe des Enzyms Galaktokinase (EC 2.7.1.6) und unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung der D-Galaktose zu D-Galaktose-1-Phosphat (D-Gal-1-P). D-Gal-1-P wird mit UDP-Glukose als Kofaktor durch die Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT) (EC 2.7.7.12) in UDP-Galaktose und D-Glukose-1-Phosphat überführt.



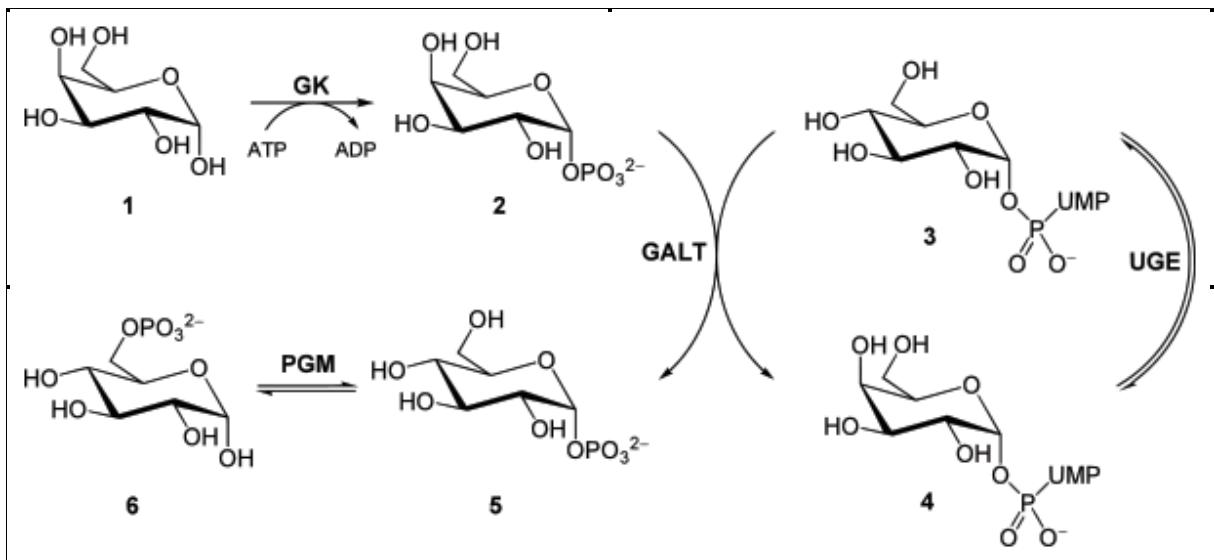
Alternativ kann D-Gal-1-P durch das Enzym UDP-Galaktose-Pyrophosphorylase in Anwesenheit von UTP in UDP-Galaktose umgesetzt werden. Die Effizienz dieser Reaktion ist allerdings gering und macht nur etwa 1 % der Kapazität des Leloir-Stoffwechselweges aus (Abraham et al., 1969).

Mengenmäßig wird der größere Anteil der UDP-Galaktose durch das Enzym UDP-Galaktose-4-Epimerase (EC 5.1.3.2) zu UDP-Glukose epimerisiert.

Der kleinere Anteil der UDP-Galaktose dient unter Zuhilfenahme einer Galaktosyltransferase (EC 2.4.1.22) der Galaktosylierung von Glykolipiden und Glykoproteinen.

UDP-Glukose geht entweder als Kofaktor in die GALT-Reaktion ein (s.o.) oder wird der Glykolyse zugeführt. Zu diesem Zweck wird die UDP-Glukose zunächst durch die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) zu D-Glukose-1-Phosphat und anschließend durch die Phosphoglukomutase (EC 5.4.2.2) zu D-Glukose-6-Phosphat umgesetzt.

**Abbildung 1: Galaktose-Stoffwechsel**



Legende: 1) D-Galaktose; 2) D-Galaktose-1-Phosphat (Gal-1-P); 3) UDP-Glukose; 4) UDP-Galaktose; 5) D-Glukose-1-Phosphat; 6) D-Gal-1-P; ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; GK: Glukokinase; GALT: Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase; PGM: Phosphoglukomutase; UGE: UDP-D-Galaktose-4-Epimerase

Außer dem Leloir-Stoffwechselweg sind noch weitere Eliminationswege vorhanden. D-Galaktose kann durch eine Aldose-Reduktase zu D-Galaktitol reduziert werden. Da eine weitere Verstoffwechslung von D-Galaktitol nicht möglich ist, erfolgt die Elimination unverändert renal. Des Weiteren kann Galaktose durch das Enzym Galaktose-Dehydrogenase zu D-Galaktonat oxidiert werden, das ebenfalls zum größten Teil unverändert renal eliminiert wird. Alternativ kann D-Galaktonat über eine Umlagerung zu  $\beta$ -Keto-D-Galaktonat und folgend zu D-Xylulose in den Pentosephosphatzyklus eingeschleust werden. Dies ist infolge geringer Enzymaktivitäten beim Menschen quantitativ wahrscheinlich kaum relevant (Cuatrecasas & Segal, 1966; Holton et al., 2001).

## **1.2 Galaktosämie**

Die Galaktosämie ist eine kongenitale Stoffwechselerkrankung. Aufgrund eines autosomal-rezessiv vererbten Enzymdefektes ist die Elimination der D-Galaktose (im Folgenden Galaktose) über den Leloir-Stoffwechselweg (s.o.) beeinträchtigt. Jedes der drei, den Abbau der Galaktose vermittelnden Enzyme, kann defizitär sein: die Galaktokinase (GALK), die Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (GALT) oder die UDP-Galaktose-4-Epimerase (GALE).

Diese Arbeit behandelt die „klassische Galaktosämie“ - den GALT-Mangel. Die übrigen Enzymdefekte und ihre pathophysiologische Bedeutung werden daher nur kurz dargestellt.

### **1.2.1 Galaktokinase-Mangel (GALK-Mangel)**

Der GALK-Mangel (OMIM 230200) wurde erstmalig 1965 von Gitzelmann charakterisiert (Gitzelmann, 1965). Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 1:350 000 (Holton et al., 2001).

Der Mangel von Galaktokinase führt zu einer erhöhten Konzentration von Galaktose und D-Galaktitol (im Folgenden Galaktitol) im Blut und damit zu einer erhöhten Ausscheidung beider Metabolite im Urin. Einziges einheitliches Symptom der

Erkrankung ist eine schon wenige Tage nach der Geburt auftretende Katarakt, die typischerweise beidseitig entsteht. Weitere Symptome oder Langzeitschäden, welche sicher auf einen Galaktokinase-Mangel zurückzuführen sind, sind bislang nicht bekannt. In seltenen Fällen wurde das Auftreten eines Pseudotumor cerebri beobachtet, welcher, aufgrund des gleichen Entstehungsmechanismus wie bei der Katarakt, möglicherweise mit dem Enzymmangel in Zusammenhang steht (Huttenlocher, 1970). Die Therapie des GALK-Mangels besteht in einer das ganze Leben hindurch einzuhaltenden laktosefreien und galaktosearmen Diät. Sofern mit der Therapie im frühen Säuglingsalter begonnen wird, ist die Kataraktbildung reversibel oder kann, bei Einleitung der Therapie in den ersten Tagen nach der Geburt, sogar ausbleiben (Gitzelmann, 1976; Bosch et al., 2002).

### **1.2.2 UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangel (GALE-Mangel)**

Erstbeschreiber des UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangels (OMIM 230350) war Gitzelmann (Gitzelmann, 1972). Die Inzidenz liegt bei 1:150 000 (Holton et al., 2001). Die GALE ist ein essentielles Enzym, das die wichtigen Kofaktoren UDP-Glukose und UDP-Galaktose zur Bildung komplexer Polysaccharide bereitstellt.

Bei einem Großteil der Patienten ist der GALE-Mangel auf Erythrozyten und Leukozyten begrenzt. Leberzellen und Hautfibroblasten weisen eine normale GALE-Aktivität auf (Gitzelmann, 1976). Bei diesem sogenannten peripheren pGALE-Mangel wird lediglich in den Erythrozyten ein erhöhter D-Gal-1-P (im Folgenden Gal-1-P) Wert gemessen und die Patienten sind im Allgemeinen asymptomatisch (Gitzelmann & Steinmann, 1973). Eine Therapie ist in der Regel nicht notwendig (Gitzelmann & Holton, 1980; Gitzelmann, 2000; Holton et al., 2001). Ein generalisierter gGALE-Mangel ist sehr selten. Der gGALE-Mangel geht mit ähnlichen Symptomen wie die klassische Galaktosämie einher (s.u.). Bislang sind weltweit nur 5 Patienten mit gGALE-Mangel identifiziert, welche zwei verschiedenen asiatischen Familien entstammen (Gitzelmann, 2000). Die Therapie besteht, wie beim GALT-Mangel, in einer laktosefreien und galaktosearmen Diät.

### 1.2.3 Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel (GALT-Mangel)

Die klassische Galaktosämie, der GALT-Mangel (OMIM 230400), ist die häufigste und folgenschwerste Form der Galaktosämie. Die klassische Galaktosämie wurde erstmals 1908 in der Medizinischen Wochenschrift Wien durch von Reuss beschrieben (von Reuss, 1908). 1956 wurde von Isselbacher der GALT-Mangel als Grund für die Erkrankung identifiziert (Isselbacher et al., 1956).

Der GALT-Locus ist auf Chromosom 9 am Ort p13 (Mohandas et al., 1977; Aitken & Ferguson-Smith, 1979). Das GALT-Gen besteht aus 11 Exons und 10 Introns (Leslie et al., 1992). Die Inzidenz der Erkrankung liegt in Deutschland bei 1:40 000 (Schweitzer, 1995; Holton et al., 2001). Für das GALT-Gen sind mehr als 150 Mutationen dokumentiert (Tyfield et al., 1999). Weniger als 10 % dieser Mutationen treten in unterschiedlichen ethnischen Gruppen und verschiedenen Regionen weltweit auf (Holton et al., 2001). Die am häufigsten auftretenden Mutationen sind Q188R, K285N und S135L. Der Genotyp Q188R ist mit einem Auftreten von 60-70 % die häufigste Mutation in der kaukasischen Bevölkerung Europas und Nordamerikas (Holton et al., 2001). Sie führt zu einer beinahe vollständigen Reduktion der Enzymaktivität (Friedovich-Keil & Jinks-Robertson, 1993; Friedovich-Keil et al., 1995). Die weltweit zweithäufigste Mutation, obwohl deutlich seltener, ist K285N. Die Gesamthäufigkeit in Europa beträgt 8 %. In einigen Ländern Ost- und Zentraleuropas liegt die Häufigkeit mit 25-35 % allerdings deutlich höher (Holton et al., 2001). Auch bei dieser Mutation ist die Enzymaktivität mit einer GALT-Aktivität von < 0,2 % des Wildtyps deutlich reduziert (Riehmman et al., 2001). Die dritthäufigste Mutation ist S135L und wurde bislang ausschließlich bei Afrikanern und Afroamerikanern gefunden. Eine weitere Mutation, die mit einem nahezu kompletten Verlust der Enzymaktivität einhergeht, ist L195P (Reichardt et al., 1992). In einigen Bevölkerungsgruppen beträgt die Inzidenz dieser Mutation 5-30 % (Holton et al., 2001).

## *Klinik*

Patienten mit GALT-Mangel haben in der Regel eine auf unter 1 % der Norm reduzierte Enzymaktivität in den Erythrozyten. Die Unterbrechung des Stoffwechselweges nach der Galaktokinasereaktion führt zur Akkumulation von Galaktose und Gal-1-P in Blut und Geweben. Im Urin kann eine stark erhöhte Ausscheidung von Galaktose, D-Galaktonat (im Folgenden Galaktonat) und Galaktitol festgestellt werden (Jacobs et al., 1995).

Die Erkrankung wird bereits in den ersten Lebenstagen durch die naturgemäße Fütterung von Milch symptomatisch. Neugeborene fallen durch Erbrechen, Durchfall, Trinkschwäche und Lethargie auf. Es entwickelt sich in kurzer Zeit ein schweres, potentiell tödliches Krankheitsbild mit Leberinsuffizienz (Ikterus, vermehrte Blutungsneigung, erhöhte Aminotransferasen) und Nierenfunktionsstörungen (renale tubuläre Azidose) bis hin zum Nierenversagen. Nicht selten tritt eine Enzephalopathie mit Hirnödem auf. Häufig erkranken die Kinder im Rahmen der Akutphase an einer E. coli Sepsis (Holton et al., 2001).

Eine Katarakt findet sich fast immer früh, kann aber nur mittels Spalt-Lampen-Untersuchung festgestellt werden (Holten et al., 2001).

Ein möglichst früher Diagnosezeitpunkt ist unbedingt erforderlich zur rechtzeitigen Therapie der lebensbedrohenden Komplikationen (Schweitzer, 1995). Um dies zu gewährleisten wurde in Deutschland 1978 die Galaktosämie in das Neugeborenencreening aufgenommen, welches derzeit in der Regel am dritten Lebenstag stattfindet.

Die sofortige Ernährungsumstellung auf eine laktosefreie, galaktosearme Säuglingsnahrung ist lebensrettend und führt zu einer vollständigen Rekonvaleszenz ohne bleibende Organschäden. Auch die Katarakt ist in der Regel vollständig reversibel. (Holton et al., 2001; Bosch, 2006; Bosch et al., 2011). Die laktosefreie, galaktosearme Diät muss lebenslang fortgeführt werden (Welling et al., 2017).

Der etablierte Leitparameter zur Stoffwechselkontrolle ist das Gal-1-P in den Erythrozyten. Ein Grenzwert von  $150 \mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$  ( $\cong 5 \text{ mg/dL}_{\text{Ery}}$ ) Gal-1-P soll nicht überschritten werden (Schwarz et al., 1960; Walter et al., 1999).

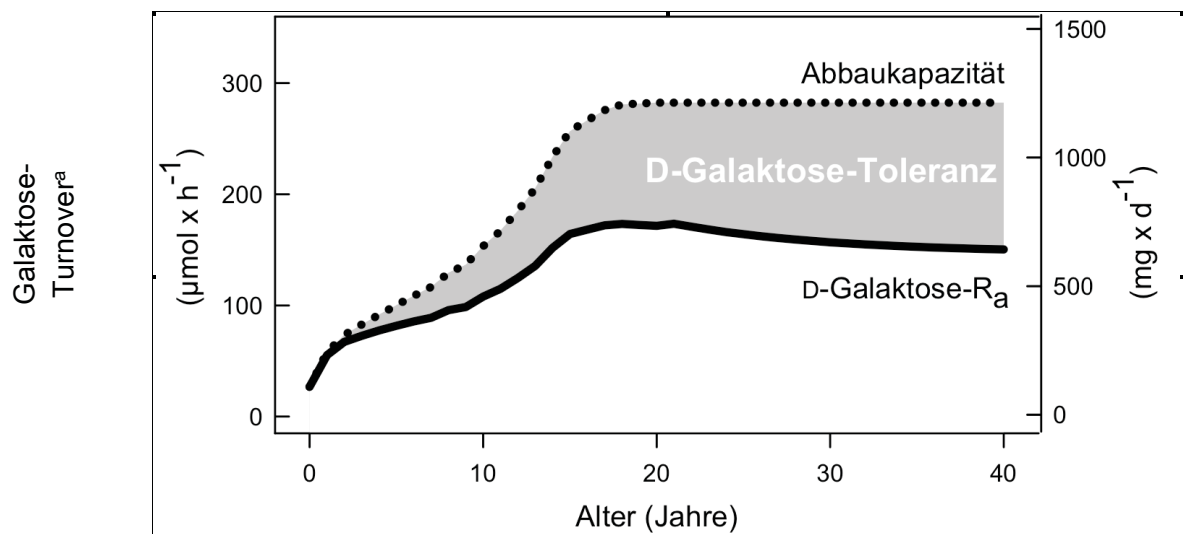
Trotz laktosefreier, galaktosearmer Diät entwickeln die Patienten Langzeitkomplikationen. Es treten neurologische Degenerationszeichen auf, wie Ataxie, Tremor, zerebrale Krämpfe, verbale Dyspraxie und kognitive Defizite. Weibliche Patienten weisen zudem in der überwiegenden Anzahl der Fälle einen hypergonadotrophen Hypogonadismus auf mit daraus resultierender Infertilität. Die testikuläre Funktion bei männlichen Patienten hingegen ist normal (Rubio-Gozalbo et al., 2010).

Die Ausprägung der beschriebenen Symptomatik ist, unabhängig vom Therapiebeginn, individuell äußerst unterschiedlich und kann durch die therapeutische Diät nicht beeinflusst werden (Schweitzer-Kranz, 2003). Die Pathophysiologie der Langzeitsymptome ist bis heute unbekannt. Als mögliche primäre Ursache kommt eine mengenmäßig relevante endogene Galaktosebildung in Betracht (Schadewaldt et al., 2004; Kamalanathan, 2005).

## 2 Ziele der Arbeit

In Folge ihrer Untersuchungen zur endogenen Galaktosebildung stellten Schadewaldt et al. die Hypothese einer quantitativ relevanten Galaktosetoleranz von erwachsenen Patienten mit klassischer Galaktosämie auf. Schadewaldt et al. zeigten, dass Säuglinge und Kleinkinder, bezogen auf das Körpergewicht, eine deutlich höhere endogene Galaktosebildung aufweisen als Erwachsene. Die endogene Galaktosebildung ist alters- und wachstumsabhängig, nimmt mit zunehmenden Alter ab und erreicht im Erwachsenenalter einen nahezu konstanten Wert (Schadewaldt et al., 2004, 2014).

Abbildung 2:



Vereinfachtes hypothetisches Modell für die altersabhängige Entwicklung der exogenen D-Galaktose-Toleranz bei Patienten mit klassischer Galaktosämie (residuale GALT-Aktivität < 1 % der Norm) (Kamalanathan, 2005)

Legende: D-Galaktose-Ra: endogene Galaktose-Freisetzung bezogen auf das Körpergewicht, gepunktete Linie: Leberabbaukapazität (berechnet) bezogen auf das Körpergewicht; a) bezogen auf das mittlere Körpergewicht, errechnet aus der 50 %-Percentile der Jungen (Brandt & Reinken, 1988).

Angesichts der Tatsache, dass im Kindes- und Säuglingsalter weder eine Akkumulation der Galaktosemetabolite noch eine erhöhte renale Exkretion von Galaktosemetaboliten festgestellt werden kann, müssen genügend Kapazitäten zum Abbau der endogen gebildeten Galaktose vorhanden sein. Angenommen, die Enzymkapazität zum Abbau der Galaktose bliebe altersunabhängig konstant, sollten durch die Reduzierung der endogen gebildeten Galaktose mit zunehmendem Alter Kapazitäten für exogen zugeführte Galaktose vorhanden sein (Schadewaldt et al., 2004, 2014; Kamalanathan, 2005). Die Galaktosetoleranz für exogene Galaktose sollte der Differenz zwischen Galaktose-Abbaukapazität und endogener Galaktose-Bildung entsprechen. Die geschätzte Toleranz für exogene Galaktose beträgt beim Erwachsenen > 1 g (Kamalanathan, 2005; vgl. Abb. 2).

Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Galaktosetoleranz-Hypothese im Rahmen einer prospektiven open-label-Beobachtungsstudie mit kontrollierter oraler Galaktose-Zufuhr zusätzlich zur Diät.



### 3 Material und Methoden

Die Methoden, welche für die hier durchgeführten Untersuchungen verwendet wurden, waren in der Arbeitsgruppe „Galaktosämie“ von Prof. Schadewaldt etabliert. Sie wurden auch bei früheren Publikationen der Arbeitsgruppe verwendet. (Schadewaldt et al., 2003, 2004; Kamalanathan 2005; Stollwerck 2009; Wöffler 2011).

#### 3.1 Studiendesign

Zur Prüfung der Galaktosetoleranz-Hypothese bei Patienten mit klassischer Galaktosämie wurde eine prospektive, unizentrische open-label Beobachtungsstudie mit sieben erwachsenen Patienten durchgeführt. Die Patienten erhielten zusätzlich zur normalen Diät längerfristig peroral Galaktose.

Die Studie war in Phasen von je etwa 6 Wochen unterteilt (s. Schema 1). In jeder Phase erfolgte wöchentlich eine venöse Blutentnahme. Täglich nahmen die Patienten morgens eine Probe Nüchtern-Urin und froren diese bei mindestens -18 °C ein. Zur Ermittlung der mit der Diät zugeführten Galaktose sollte in jeder Studienphase von den Patienten ein 2 Wochen überblickendes Ernährungsprotokoll erstellt werden.

Die Kontrolle der Leberfunktion erfolgte im Rahmen der wöchentlichen Blutentnahme durch Analyse der Aminotransferasen (ASAT, ALAT) und der  $\gamma$ -GT.

In den Blutproben wurden Galaktose-1-Phosphat (Gal-1-P) und Galaktitol bestimmt, in den Urinproben Galaktitol, Galaktonat und Galaktose.

Am Studienbeginn stand eine achtwöchige Basalphase. In diesem Zeitraum wurden die basalen Metabolitspiegel und die Galaktoseaufnahme mit der Nahrung über die normale Diät bestimmt. In der zweiten Studienphase nahmen die Patienten über einen Zeitraum von sechs Wochen 5 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) zu sich (in Leitungswasser aufgelöst, jeweils hälftig morgens und abends, direkt im Anschluss

an die Mahlzeiten). In der dritten Studienphase wurde die Dosierung auf 10 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) verdoppelt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der zweiten und dritten Studienphase bestand die Option, bei Einwilligung des Patienten, eine weitere Studienphase mit einer Gabe von 15 oder 20 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) anzuschließen.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und genehmigt (Nr. 2769).



### 3.2 Patienten

An der Studie nahmen sieben Patienten (4 ♂, 3 ♀) mit diätetisch behandelte(r) klassischer Galaktosämie teil.

Vorraussetzungen waren eine freiwillige Teilnahme und ein schriftliches Einverständnis nach entsprechender Aufklärung.

Weitere Einschlusskriterien waren bei allen Patienten die Diagnose einer klassischen Galaktosämie (Mangel an Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase) mit einer GALT-Aktivität von  $< 1\%$  der Norm ( $< 0,5 \mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g}_{\text{Hb}})$ ), einem Gal-1-P in den Erythrozyten im Zielbereich der diätetischen Behandlung (Gal-1-P  $< 5 \text{ mg}/\text{dL}_{\text{Ery}}$ ) sowie der Ausschluss weiterer akuter und chronischer Erkrankungen.

Der Genotyp hatte keinen Einfluss auf die Auswahl der Patienten. Er wurde jedoch zur Charakterisierung der Patienten mitbestimmt.

Die oben beschriebenen und weitere charakteristische Daten der Patienten sind in der Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Patientencharakteristik**

Patient	1	2	3	4	5	6	7
Alter <sup>a</sup> (Jahre)	34	20	18	36	38	30	32
Größe <sup>a</sup> (cm)	166	178	180	172	166	165	176
Gewicht <sup>a</sup> (kg)	72	68	74	60	60	55	52
Geschlecht	w	m	m	w	m	w	m
GALT-Aktivität im Ery ( $\mu\text{mol}/(\text{h}^* \text{g}_{\text{Hb}})$ )	0,19	0,24	0,29	0,10	0,10	0,20	0,10
Genotyp <sup>b</sup>	g.1466A>G/1466A>G (p.Q188R/Q188R)	g.1466A>G/1466A>G (p.Q188R/Q188R)	g.1466A>G/1466A>G (p.Q188R/Q188R)	g.1649T>C/1649T>C (p.L195P/L195P)	g.1466A>G/1466A>G (p.Q188R/Q188R)	g.1202T>C/2328G>T (p.V151A/K285N)	g.1466A>G/2328G>T (p.Q188R/K285N)

**Tabelle 1** Legende: a) zum Beginn der Studie; b) bezogen auf Sequenz NCBI NC\_000009.2 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004)

### 3.3 Ernährungsprotokolle

Nach entsprechender Anleitung erstellten die Patienten in jeder Studienphase ein 7- bis 14-tägiges detailliertes Ernährungsprotokoll. Die konsumierten Nahrungsmittel wurden von den Patienten aufgelistet und gewogen.

Die Auswertung der Protokolle zur Ermittlung der Kalorienzufuhr und der Nahrungsgalaktose erfolgte in Zusammenarbeit mit einer Diätassistentin, der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Düsseldorf, mithilfe des PC-Programms Diät 2000 der Firma Soft & Hard.

### 3.4 Chemikalien und Enzyme

Sämtliche Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert angegeben, in der höchsten Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die Ionenaustauscherharze (Dowex 50WX8, H<sup>+</sup>-Form, 100-200 mesh; Dowex 1X8, Cl<sup>-</sup>-Form, 200-400 mesh) waren von Serva (Heidelberg). Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1, aus Kalbsdarm),  $\beta$ -D-Galaktose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.48, aus *Pseudomonas fluorescens*) wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen. D-[1-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktose (97 % 1-<sup>13</sup>C; 3 % natürlich markiert) und D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktose-Standard (98,5 % U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>; 1 % natürlich markiert) wurden bei Promochem (Wesel) erworben.

Sowohl D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktitol als auch D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktono-1,4-Lakton waren nicht käuflich zu erwerben. Beide Substanzen wurden daher eigens synthetisiert.

D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktitol wurde durch Reduktion von D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktose mit NaBH<sub>4</sub> hergestellt (Jakobs et al., 1984). Die Evaluation des Reinheitsgrades mittels GC-MS-Analyse ergab 98,5 % D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktitol und weniger als 0,2 % nicht umgesetzte D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktose.

D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktono-1,4-Lacton wurde aus D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktose durch Umsetzung mit  $\beta$ -D-Galaktose-Dehydrogenase und NAD<sup>+</sup> synthetisiert (Dahlqvist, 1983). In der

GC-MS Analyse zeigte sich eine [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Anreicherung von 98,5 % und weniger als 0,2 % D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Galaktose.

### **3.5 Analytische Verfahren**

#### **3.5.1 Proben/-entnahme und -transfer**

Die venöse Blutentnahme erfolgte nüchtern nach den allgemein üblichen Standards zur Blutentnahme und zwar wöchentlich beim Hausarzt mit EDTA-Röhrchen.

Die Mittelstrahl-Urinproben wurden von den Patienten morgens nüchtern (nach entsprechender Anleitung) selbstständig genommen und im Anschluss bei -18 °C eingefroren.

Die Blutproben wurden direkt nach Abnahme, die gesammelten Urinproben nach Abschluss eines Studienabschnitts mit der Post in einer gekühlten Box versendet. Die Stabilität der Proben auf dem Transportweg wurde vor Beginn der Studie experimentell überprüft und gesichert. Der Postversand erfolgte zuverlässig und die berücksichtigten Proben wurden innerhalb von 48h zugestellt.

Nach Eintreffen im Labor wurden die Proben wie unten beschrieben behandelt.

#### **3.5.2 Galaktose-1-Phosphat und Galaktitol im Erythrozyten**

Zur Herstellung einer Erythrozyten-Suspension wurden die venösen Blutproben zunächst zentrifugiert (3000 x g, 5 min, 4 °C) und der entstandene Plasmaüberstand abpipettiert. Im Anschluss wurden die gepackten Erythrozyten 2 x mit einem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung (0,154 mol/L) gewaschen und abschließend mit der gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung in Suspension gebracht.

Sofern die weitere Aufarbeitung nicht direkt im Anschluss erfolgte, wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Bei der weiteren Aufarbeitung wurde stets eine Kontroll-Probe einer Erythrozytensuspension mitgeführt. Hierbei handelte es sich um eine bereits fertig aliquotierte Probe eines Patienten mit klassischer Galaktosämie mit gesicherter Ergebnisanalyse (Positivkontrollprobe).

Zu 100  $\mu\text{L}$  der Erythrozytensuspension wurden 100  $\mu\text{L}$  interner Standard D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-Galaktose (50  $\mu\text{mol/L}$ ) und 10  $\mu\text{L}$  interner Standard D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-Galaktitol (50  $\mu\text{mol/L}$ ) hinzugefügt und 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Nach Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  Tris/HCl-Puffer (0,5 mol/L, pH 8,6) erfolgte zur Enteiweißung eine fünfminütige Behandlung im Wasserbad bei 100 °C. Die Proteine wurden, nach Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur, durch Zentrifugation (13.000 x g, 5 min, 4 °C) abgetrennt.

Zur Hydrolyse des Gal-1-P wurden 500  $\mu\text{L}$  des Überstandes mit 50  $\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$ -Lösung (5 mmol/L) und 10  $\mu\text{L}$  alkalischer Phosphatase (90 kU/L, 1:3 verdünnt mit  $\text{H}_2\text{O}$ ) versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  wurden die Proben mittels Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt und anschließend derivatisiert (s.u.).

### **3.5.3 Galaktose, Galaktitol und Galaktonat im Urin**

Zur Validierung des jeweiligen Probenansatzes wurde stets eine Urinkontrollprobe mitgeführt. Hierbei handelte es sich um eine bereits fertig aliquotierte Probe einer Normalperson, mit einem geringen Gehalt an Galaktosemetaboliten, welche mit einer bekannten Menge Galaktose, Galaktitol und Galaktonat angereichert waren.

Einer Lösung bestehend aus 20  $\mu\text{L}$  Urin und 80  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  wurden interne Standards von D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-Galaktose (50  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{L}$ ), D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-Galaktitol (50  $\mu\text{mol/L}$ , 100  $\mu\text{L}$ ) und D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-Galaktonat (0,25 mmol/L, 20  $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt. Anschließend wurde der Probenansatz mit 30  $\mu\text{L}$  HCl (6 mol/L) angesäuert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 700  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  wurden die Proben mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt und anschließend derivatisiert (s.u.).



### 3.5.4 Aufreinigung und Derivatisierung

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mittels Ionenaustausch-Chromatographie. Hierzu wurden graduierte konische 4 mL Poly-Prep-Einmal-Chromatographie-Säulen (BioRad, München) zum Anionenaustausch mit einer Harzsuspension (Dowex 1X8, Cl<sup>-</sup>-Form, 200-400 mesh) und Säulen zum Kationenaustausch mit der entsprechenden Harzsuspension (Dowex-50 WX 8, H<sup>+</sup>-Form, 100-200 mesh) gefüllt. Das Volumen des Sediments betrug 2 mL, das Volumen des Lösungsmittels (destilliertes Wasser) 1 mL.

Die Proben wurden zunächst auf die Säulen für den Anionenaustausch aufgebracht. Es wurde jeweils das Eluat nach dem Auftragen der Probe verworfen und anschließend wurden die Testansätze mit 1 mL H<sub>2</sub>O eluiert. Danach wurden die Eluate auf die Säulen für den Kationenaustausch aufgebracht. Das Eluat nach dem Auftragen der Probe wurde verworfen und die Testansätze mit 1 mL H<sub>2</sub>O eluiert. Abschließend wurden 0,5 mL des Eluats der Erythrozytenansätze in 1 mL Reactivals (Zinsser Analytik GmbH) überführt. Das Eluat der Urinprobenansätze wurde in zwei 1 mL Reactivals (jeweils 0,5 mL) überführt. Ein Reactival wurde zur Bestimmung der Galaktose und des Galaktitols, das zweite Reactival zur Bestimmung des Galaktonats weiter verwendet.

Sowohl Urin- als auch Erythrozytenproben wurden über Nacht im Vakuumexsikkator über festem NaOH eingetrocknet. Dabei wurde zunächst für eine Stunde ein Druck von 50 mbar angelegt und im Anschluss auf 15 mbar nachgezogen.

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

Zur Herstellung des Aldonitrilpentaacetats der Galaktose und des D-Galaktitol-Hexaacetats wurde zu dem trockenen Rückstand der Erythrozytenansätze und zu einer der zwei eingetrockneten Proben der Urinansätze 50 µL Hydroxylammoniumchlorid in Pyridin (0,3 mol/L) pipettiert. Die Proben wurden im Anschluss für 30 min bei 90 °C im Reacti-Therm-Heizgerät (Pierce) inkubiert. Nach

Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 100 µL Essigsäureanhydrid. Nachfolgend wurden die Proben erneut für 60 min im Heizgerät bei 90 °C inkubiert.

### ***Derivatisierung zur Bestimmung von Galaktonat***

Mit der zweiten getrockneten Probe des Urinansatzes wurde das Derivat N-(Butyl-) Galaktonamid-Pentaacetat hergestellt, indem zunächst 100 µL Butylamin in Pyridin (1:1) zu der getrockneten Probe gegeben wurden. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 90 °C inkubiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur im N<sub>2</sub>-Strom eingedampft. Nach Zugabe von 100 µL Essigsäureanhydrid in Pyridin (1:1) wurden die Proben erneut für 60 min bei 90 °C inkubiert.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde mit N<sub>2</sub> eingedampft, der Rückstand mit 200 µL Hexan extrahiert und der Extrakt in 200 µL Glas-Einsätze (Welabo) überführt und erneut eingedampft. Anschließend wurden die Proben in Ethylacetat (10 µL) gelöst und der Gaschromatographie-Massenspektrometrie zugeführt.

### **3.6 Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

Die Auswertung der Proben mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie erfolgte mit einem HP-6890-Gaschromatographen (Agilent). Bei der Trennsäule handelte es sich um eine HP-5 MS-Kapillarsäule (Phenylmethylpolysiloxan 5 %, Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, J&W Scientific, Folrom, CA). Unmittelbar daran angeschlossen war der massenselektive Detektor (HP-MSD, Agilent). Helium fungierte als Trägergas (0,9 mL x min<sup>-1</sup>). Beim Injektionseinlass handelte es sich um einen Splitlos-Injektor, welcher wie das Verbindungsstück zum Massenspektrometer konstant auf 250 °C erhitzt wurde. Bei einer Anfangs-Säulentemperatur von 125 °C wurde jeweils 1 µL der Probe injiziert. Nach 1,5 min wurde die Temperatur mit 20 °C/min zunächst auf 190 °C und im Anschluss mit 2,5 °C/min auf 250 °C angehoben. Abschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 280 °C für 2 min. Die massenspektrometrische Detektion

wurde mittels positiver chemischer Ionisierung mit Methan als Reaktandgas durchgeführt. Die Ionenquelle wurde bei einer Temperatur von 155-170 °C und einem Druck von 70-85 mbar betrieben. Der massenselektive Detektor wurde im selected ion monitoring (SIM) betrieben und die Intensität der Ionen bei  $m/z$  328 (Galaktose),  $m/z$  334 ([U-<sup>13</sup>C] Galaktose),  $m/z$  375 (Galaktitol),  $m/z$  381 ([U-<sup>13</sup>C] Galaktitol),  $m/z$  402 (Galaktonat) und  $m/z$  408 ([U-<sup>13</sup>C] Galaktonat) gemessen.

### 3.7 Genotypisierung

Zur Mutationsanalyse wurde zunächst ein Screening auf häufig vorkommende Mutationen Q188R und N314D durchgeführt. Sie erfolgte mittels PCR/RFLP-Methodik (Elsas et al., 1995).

Konnten die genetischen Varianten nicht detektiert werden, erfolgte nach Amplifikation der Exone 1 bis 11 des GALT-Gens mittels PCR die Charakterisierung durch direkte Sequenzierung (Yang et al., 2002).

Die angewendeten Methoden sind detailliert in der Inauguraldissertation von Kamalanathan beschrieben (Kamalanathan, 2005).

### 3.8 GALT-Aktivität

Die Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität in den Erythrozyten wurde mit Modifikationen (Schadewaldt et al., 2003) nach der Methode von Shin (1991) ermittelt.

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



Messgröße war die Rate der [<sup>14</sup>C]-Galaktosefreisetzung im Reaktionsansatz.

### **3.9 Sonstige Analysen**

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

Die Ermittlung der Kreatininkonzentration im Urin erfolgte auf einem Hitachi 912 Analysegerät (Boehringer, Mannheim) mittels einer enzymatischen Methode (Wahlefeld & Siedel, 1985).

Die Messung der Aminotransferasen und der  $\gamma$ -GT wurde in den der jeweiligen Hausarztpraxis assoziierten medizinischen Laboren nach Standardverfahren der klinischen Chemie durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dem Studienleiter mitgeteilt.

### **3.10 Statistik**

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

Die Prüfung auf statistische Signifikanzunterschiede wurden mittels univariater Varianz-Analyse (One-Way-ANOVA) mit IBM SPSS Statistics 22 (Ehningen, Deutschland) durchgeführt.

Die Abbildungen wurden mit SigmaPlot 10.0 von Systat Software GmbH (Erkrath, Deutschland) erstellt.

## 4 Ergebnisse

An der Galaktosetoleranz-Studie nahmen sieben erwachsene Patienten mit klassischer Galaktosämie (4 ♂, 3 ♀) teil. Zu Studienbeginn wurde über einen Zeitraum von acht Wochen eine initiale Erfassung aller relevanten Stoffwechselfparameter (Galaktose-1-Phosphat und Galaktitol in den Erythrozyten, Galaktose, Galaktitol und Galaktonat im Urin, Galaktoseaufnahme mit der Diät, Kontrollparameter für die Leberfunktion) durchgeführt.

Die Ausgangsdaten in Tabelle 2 zeigen, dass alle Studienteilnehmer eine strenge Diätführung einhielten und dass die relevanten Stoffwechselfparameter im empfohlenen Zielbereich lagen. Die Studienteilnehmer wiesen eine altersentsprechende Kalorienaufnahme mit einer mengenmäßig vergleichbar geringen Galaktoseaufnahme auf. Die Kontrollparameter für die Leberfunktion (ALAT, ASAT,  $\gamma$ -GT) wurden in jeder Studienphase mehrfach bestimmt und waren insgesamt über die gesamte Studiendauer bei allen Patienten unauffällig (ASAT, Bereich: 12-43 U/L; ALAT, Bereich: 10-52 U/L;  $\gamma$ -GT, Bereich: 7-20 U/L).

Da die Verläufe jedes Studienteilnehmers individuell und zum Teil sehr unterschiedlich waren, werden die Ergebnisse nachfolgend für jeden Patienten einzeln beschrieben. Die Galaktoseausscheidung im Urin ist in den statistischen Übersichten enthalten. In die graphischen Darstellungen wurde die Galaktoseausscheidung im Urin nicht aufgenommen, da diese aufgrund der geringen Größe nicht sinnvoll darstellbar war.

**Tabelle 2: Stoffwechselkontrollparameter unter Basalbedingungen<sup>a</sup>**

Patient	Kalorienzufuhr <sup>b</sup> (kJ/(kg <sup>KG</sup> *d))	Galaktoseaufnahme <sup>b</sup> (mg/(kg <sup>KG</sup> *d))	Metabolite im Erythrozyten <sup>c</sup>		Metabolite im Urin <sup>c</sup>		
			Gal-1-P ( $\mu\text{mol}/L_{Ery}$ )	Galaktitol ( $\mu\text{mol}/L_{Ery}$ )	Galaktose	Galaktitol ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}_{Krea}$ )	Galaktonat
1	180 ± 38 (185;106-233;n=30)	1,38 ± 0,58 (1,24;0,61-2,87;n=30)	138 ± 15 (135;122-156;n=6)	9,7 ± 1,3 (10,2;7,7-11,2;n=6)	6,2 ± 1,4 (6,0;4,0-9,6; n=35)	140 ± 23 (143;82-199;n=38)	26 ± 7 (26; 3-44;n=33)
2	116 ± 29 (112;71-202;n=30)	0,81 ± 0,32 (0,78;0,13-1,47;n=30)	102 ± 7 (102;93-114;n=6)	7,5 ± 0,4 (7,5;7,0-8,2;n=6)	2,4 ± 0,4 (2,3;1,9-3,6;n=21)	93 ± 22 (94;55-185;n=22)	30 ± 10 (28;16-63;n=25)
3	139 ± 26 (144;98-180;n=7)	0,60 ± 0,28 (0,65;0,29-1,02;n=7)	104 ± 6 (102;99-113; n=6)	7,2 ± 0,6 (7,2;6,2-8,1;n=6)	4,5 ± 0,6 (4,5;3,4-5,6;n=16)	98 ± 8 (98;85-123;n=29)	43 ± 7 (41;33-58;n=29)
4	180 ± 38 (185;106-233;n=13)	1,38 ± 0,58 (1,24;0,61-2,87;n=13)	83 ± 9 (87;72-93;n=6)	7,2 ± 1,1 (7,3;6,2-8,9;n=6)	3,4 ± 0,7 (3,3;1,6-4,4;n=21)	104 ± 18 (103;66-147;n=22)	34 ± 10 (32;19-60;n=22)
5	166 ± 27 (158;118-223;n=30)	1,47 ± 0,46 (1,35;0,73-2,43;n=30)	113 ± 10 (114;99-124;n=6)	8,4 ± 1,1 (8,3;8,1-10,0;n=6)	5,3 ± 0,8 (5,0;4,0-6,7;n=18)	103 ± 12 (104;72-130;n=50)	30 ± 5 (31;20-43;n=51)
6	119 ± 30 (120;43-160;n=30)	0,70 ± 0,30 (0,67;0,14-1,62;n=30)	113 ± 15 (114;85-129;n=6)	7,1 ± 0,5 (7,2;6,5-7,8;n=6)	2,4 ± 0,4 (2,4;1,8-3,3;n=48)	116 ± 20 (111;68-147;n=48)	36 ± 9 (121;19-58;n=48)
7	163 ± 30 (160;111-239;n=30)	1,00 ± 0,50 (1,00;0,26-2,46;n=30)	124 ± 15 (121;107-144;n=6)	8,5 ± 0,6 (8,5;7,6-9,5;n=6)	2,6 ± 0,4 (2,6;2,1-3,4;n=18)	108 ± 10 (108;93-129;n=18)	38 ± 9 (34;29-61;n=18)

Legende: a) angegeben sind MW ± SD, in Klammern: Median, Bereich, Anzahl der Bestimmungen (n), b) Ernährungsprotokolle 7-30 Tage, Kalorien- und Galaktosezufuhr berechnet, c) mittels SID-GCMS gemessene Metabolite

## 4.1 Patientenbezogene Einzeldarstellung

### *Ergebnisse Patient 1*

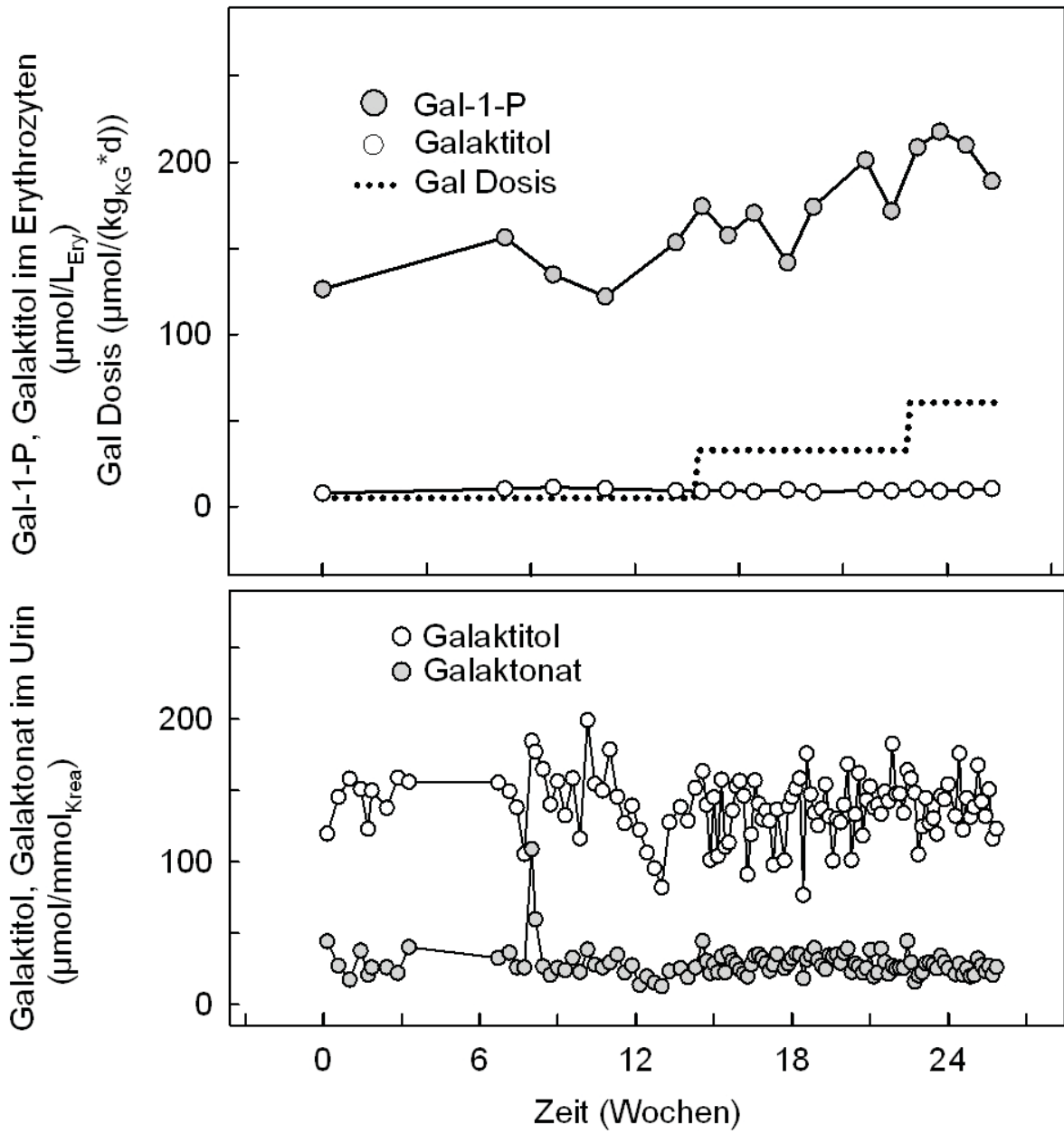
Eine Übersicht der Ergebnisse von Patient 1 wird in Abbildung 3 gezeigt. Die statistische Auswertung ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Während aller Untersuchungsphasen betrug die Galaktosezufuhr über die Diät gleichbleibend im Mittel  $< 1 \text{ mg}/(\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{d})$ .

Bei Patient 1 wurden, außer beim Galaktose-1-Phosphat in den Erythrozyten (Gal-1- $\text{P}_{\text{Ery}}$ ), keinerlei Veränderungen nach Galaktosegabe beobachtet. Beim Gal-1- $\text{P}_{\text{Ery}}$  zeigte sich ein leichter, statistisch signifikanter, dosisabhängiger Anstieg im Mittel von 23 % ( $p = 0,016$ ) bei oraler Galaktosegabe von  $5 \text{ mg}/(\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{d})$  und ein Anstieg im Mittel von 49 % ( $p \ll 0,001$ ) bei oraler Galaktosegabe von  $10 \text{ mg}/(\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{d})$ .

Während der Basalphase wurde einmalig im Urin ein Galaktonat-Wert  $> 100 \mu\text{mol}/\text{mmol}_{\text{Krea}}$  gemessen und durch Mehrfachbestimmungen analytisch gesichert. Ein Grund für diesen Anstieg konnte nicht ermittelt werden.

Abbildung 3: Verlaufsdarstellung Galaktosemetabolite in Abhängigkeit von der Galaktosedosis bei Patient 1





**Tabelle 3: Ergebnisübersicht Patient 1<sup>a</sup>**

Studienphase	Basal	Galaktose p.o. pro kg <sub>KG</sub> *d	
		5 mg	10 mg
<b>Metabolite im Erythrozyten (μmol/L<sub>Ery</sub>)<sup>b</sup></b>			
<b>Gal-1-P</b>	138 ± 15 (135;122-156;n=5)	170 <sup>#</sup> ± 18 (172;142-201;n=7)	206 <sup>##</sup> ± 12 (209;189-218;n=4)
<b>Galaktitol</b>	9,7 ± 1,3 (10,2;7,7-11,2;n=5)	9,0 ± 0,5 (9,0;8,3-9,6;n=7)	9,7 ± 0,7 (9,7;8,9-10,4;n=4)
<b>Metabolite im Urin (μmol/mmol<sub>Krea</sub>)<sup>b</sup></b>			
<b>Galaktose</b>	6,2 ± 1,4 (6,0;4,0-9,6;n=35)	6,0 ± 1,4 (5,7; 3,1-9,1;n=55)	6,2 ± 1,3 (6,4; 3,8-9,0;n=23)
<b>Galaktitol</b>	140 ± 23 (143;82-199;n=38)	136 ± 22 (139;77-183;n=55)	138 ± 17 (138;105-176;n=23)
<b>Galaktonat</b>	26 ± 7 (26;13-44;n=33)	30 ± 6 (29;18-45;n=55)	25 ± 5 (25;16-34;n=23)
<b>Diätführung<sup>c</sup></b>			
<b>Kalorienaufnahme</b> (kJ/(kg <sub>KG</sub> *d))	121 ± 51 (114;34-232;n=28)	115 ± 38 (106;48-204;n=30)	107 ± 35 (107;50-164;n=16)
<b>Galaktoseaufnahme</b> (mg/(kg <sub>KG</sub> *d))	0,93 ± 0,77 (0,70;0,11-3,26;n=28)	0,89 ± 0,61 (0,69;0,23-2,20;n=30)	0,71 ± 0,29 (0,66;0,33-1,27;n=16)

Legende: a) angegeben sind MW ± SD, in Klammern: Median, Bereich, Anzahl der Bestimmungen (n), b) mittels SID-GCMS gemessene Metabolite, c) Kalorien- und Galaktosezufuhr berechnet. Statistisch signifikant gegenüber basal: # p < 0,05, ## p < 0,005

## ***Ergebnisse Patient 2***

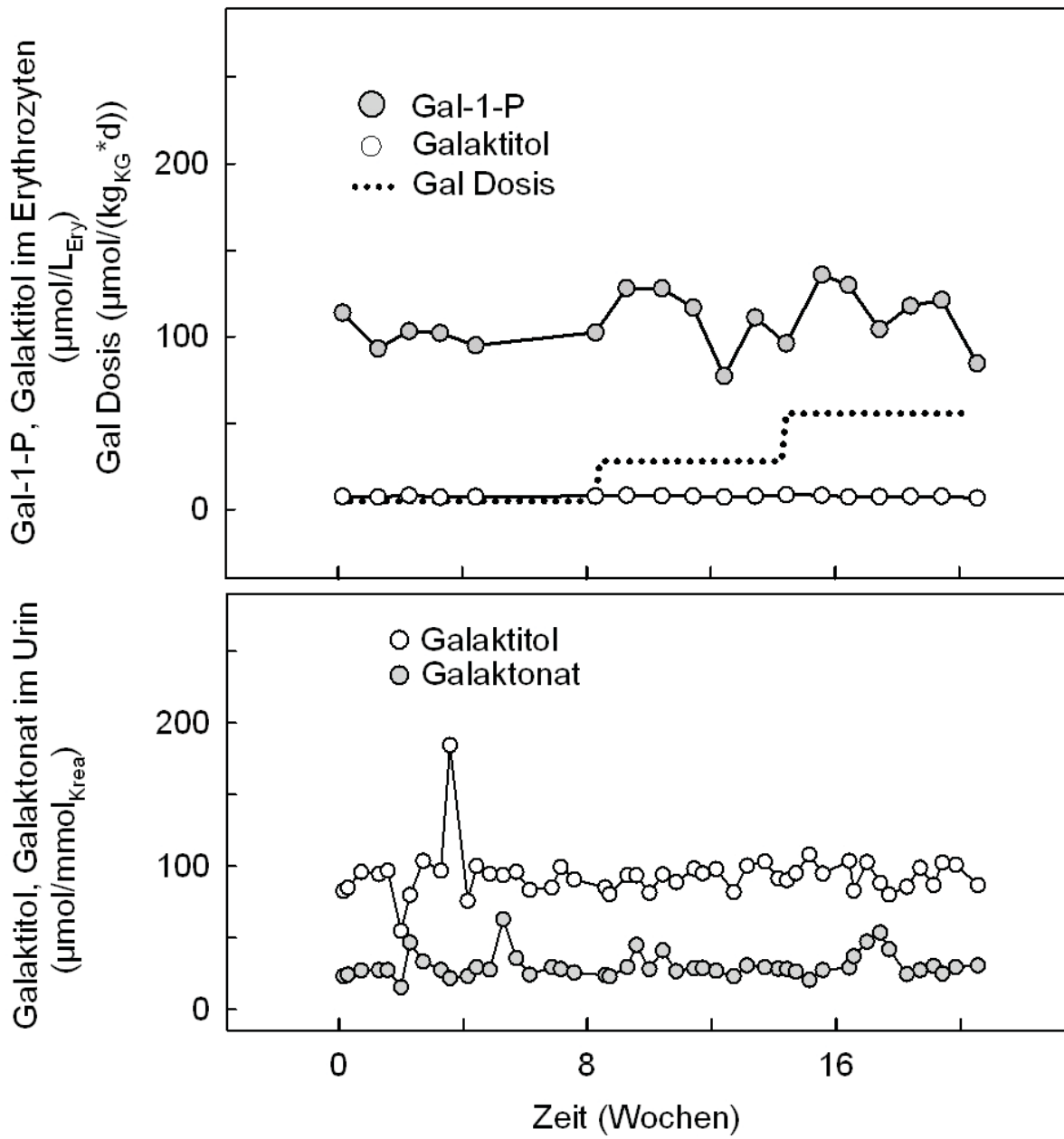
Die Ergebnisübersicht von Patient 2 ist der Abbildung 4 zu entnehmen und die statistische Auswertung der Tabelle 4. Die Galaktosezufuhr über die Nahrung war in allen Phasen vergleichbar und betrug im Mittel  $< 1 \text{ mg}/(\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{d})$ .

Bei Patient 2 zeigten sich, in Abhängigkeit von der Galaktosegabe, keine Veränderungen der Stoffwechselmetabolite, einschließlich des Gal-1- $\text{P}_{\text{Ery}}$ .

Es ergab sich jedoch ein geringer, statistisch signifikanter Anstieg der Galaktoseausscheidung im Urin im Verlauf der Phase mit oraler Galaktosegabe von  $10 \text{ mg}/(\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{d})$ . Dieser betrug im Mittel 26 % ( $p = 0,004$ ).

Bei diesem Patienten fiel in der Basalphase ein einmaliger Anstieg der Galaktitolausscheidung auf das Doppelte der üblichen Ausscheidung auf. Dieser Wert wurde durch Mehrfachbestimmung analytisch gesichert. Trotz intensiver Nachfrage/Nachforschung konnte die Ursache nicht geklärt werden.

Abbildung 4: Verlaufsdarstellung Galaktosemetabolite in Abhängigkeit von der Galaktosedosis bei Patient 2



**Tabelle 4: Ergebnisübersicht Patient 2<sup>a</sup>**

Studienphase	Basal	Galaktose p.o. pro kg <sub>KG</sub> *d	
		5 mg	10 mg
<b>Metabolite im Erythrozyten (μmol/L<sub>Ery</sub>)<sup>b</sup></b>			
<b>Gal-1-P</b>	102 ± 7 (102;93-114;n=6)	109 ± 20 (114;77-128;n=6)	116 ± 19 (119;85-136;n=6)
<b>Galaktitol</b>	7,5 ± 0,4 (7,6;7,0-8,2;n=6)	7,9 ± 0,4 (7,8;7,2-8,5;n=6)	7,4 ± 0,5 (7,5;6,6-8,2;n=6)
<b>Metabolite im Urin (μmol/mmol<sub>Krea</sub>)<sup>b</sup></b>			
<b>Galaktose</b>	2,4 ± 0,4 (2,3;1,9-3,6;n=21)	2,7 ± 0,3 (2,8;2,2-3,2;n=15)	3,0 ± 0,8 <sup>##</sup> (3,0;1,7-4,6;n=14)
<b>Galaktitol</b>	93 ± 22 (94;55-185;n=22)	94 ± 8 (95;80-108;n=20)	104 ± 19 (102;71-132;n=20)
<b>Galaktonat</b>	30 ± 10 (28;16-63;n=25)	31 ± 8 (28;21-54;n=21)	32 ± 5 (32;24-40;n=20)
<b>Diätführung<sup>c</sup></b>			
<b>Kalorienaufnahme</b> (kJ/(kg <sub>KG</sub> *d))	116 ± 29 (112;71-202;n=30)	130 ± 38 (139;47-193;n=21)	111 ± 23 (112;67-147;n=13)
<b>Galaktoseaufnahme</b> (mg/(kg <sub>KG</sub> *d))	0,81 ± 0,32 (0,78;0,13-1,47;n=30)	0,95 ± 0,39 (0,90;0,41-1,64;n=21)	0,80 ± 0,35 (0,81;0,28-1,29;n=13)

Legende: a) angegeben sind MW ± SD, in Klammern: Median, Bereich, Anzahl der Bestimmungen (n), b) mittels SID-GCMS gemessene Metabolite, c) Kalorien- und Galaktosezufuhr berechnet. Statistisch signifikant gegenüber basal: <sup>##</sup> p < 0,005

### ***Ergebnisse Patient 3***

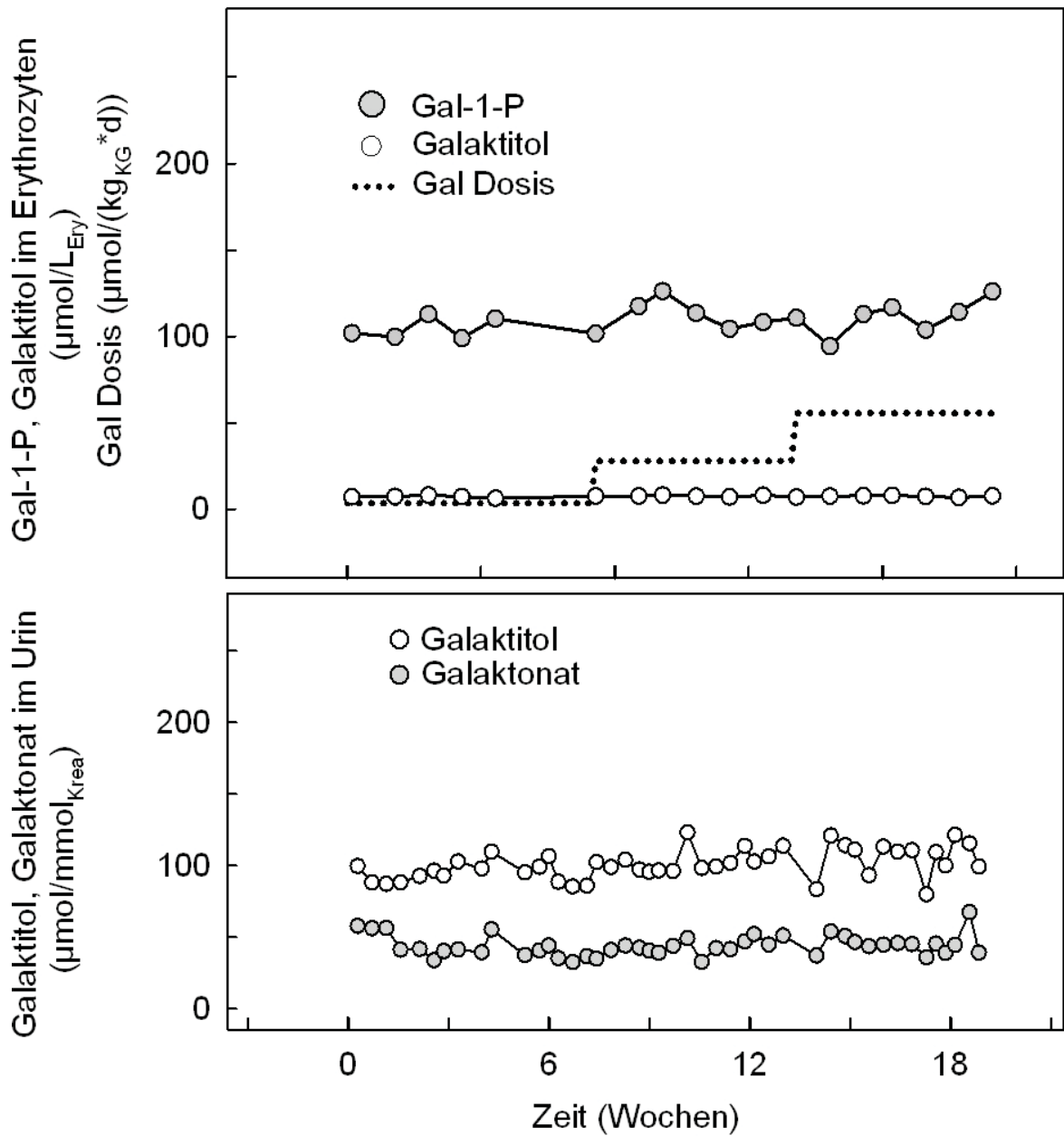
Die Ergebnisse von Patient 3 werden in Abbildung 5 und die statistische Auswertung wird in Tabelle 5 gezeigt.

Die Galaktoseaufnahme mit der Nahrung war in allen Studienphasen konstant gering und belief sich im Mittel auf  $< 1 \text{ mg}/(\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{d})$ .

Bei Patient 3 ergab sich ein ähnlicher Befund wie bei Patient 2. Es konnten keine dosisabhängigen Veränderungen der Stoffwechselmetabolite, einschließlich des Gal-1-P<sub>Ery</sub> festgestellt werden.

Wie bei Patient 2 zeigte sich jedoch ein geringer, statistisch signifikanter Anstieg der Galaktoseausscheidung im Urin im Verlauf der Phase mit oraler Galaktosegabe von  $10 \text{ mg}/(\text{kg}_{\text{KG}} \cdot \text{d})$  von im Mittel 26 % ( $p = 0,006$ ).

Abbildung 5: Verlaufsdarstellung Galaktosemetabolite in Abhängigkeit von der Galaktosedosis bei Patient 3



**Tabelle 5: Ergebnisübersicht Patient 3<sup>a</sup>**

Studienphase	Basal	Galaktose p.o. pro kg <sub>KG</sub> *d	
		5 mg	10 mg
<b>Metabolite im Erythrozyten (μmol/L<sub>Ery</sub>)<sup>b</sup></b>			
<b>Gal-1-P</b>	104 ± 6 (102;99-113;n=6)	113 ± 8 (112;104-126;n=6)	111 ± 11 (101;94-126;n=6)
<b>Galaktitol</b>	7,2 ± 0,6 (7,2;6,2-8,1;n=6)	7,5 ± 0,5 (7,5;6,9-8,1;n=6)	7,4 ± 0,4 (7,6;6,7-7,9;n=6)
<b>Metabolite im Urin (μmol/mmol<sub>Krea</sub>)<sup>b</sup></b>			
<b>Galaktose</b>	4,5 ± 0,7 (4,5;3,4-5,6;n=16)	5,1 ± 0,4 (5,1;4,4-5,7;n=14)	5,7 ± 1,6# (5,3;2,9-8,8;n=14)
<b>Galaktitol</b>	98 ± 8 (98;85-123;n=29)	104 ± 10 (106;80-121;n=32)	92 ± 10 (93;73-110;n=21)
<b>Galaktonat</b>	43 ± 7 (41;33-58;n=29)	46 ± 7 (45;36-68;n=32)	38 ± 9 (36;29-62;n=21)
<b>Diätführung<sup>c</sup></b>			
<b>Kalorienaufnahme</b> (kJ/(kg <sub>KG</sub> *d))	139 ± 26 (145;98-180;n=7)	145 ± 19 (145;123-181;n=8)	109 ± 32 (107;67-158;n=7)
<b>Galaktoseaufnahme</b> (mg/(kg <sub>KG</sub> *d))	0,60 ± 0,28 (0,65;0,29-1,02;n=7)	0,67 ± 0,19 (0,69;0,43-0,95;n=8)	0,52 ± 0,27 (0,55;0,15-0,84;n=7)

Legende: a) angegeben sind MW ± SD, in Klammern: Median, Bereich, Anzahl der Bestimmungen (n), b) mittels SID-GCMS gemessene Metabolite, c) Kalorien- und Galaktosezufuhr berechnet. Statistisch signifikant gegenüber basal: # p < 0,05

### ***Ergebnisse Patient 4***

Bei Patient 4 wurde aufgrund der Zwischenergebnisse eine dritte Phase mit oraler Galaktosegabe von 15 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) eingeführt.

Detaillierte Diätprotokolle wurden von dem Patienten während der Basalphase und der ersten Phase der oralen Galaktosegabe mit 5 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) geführt.

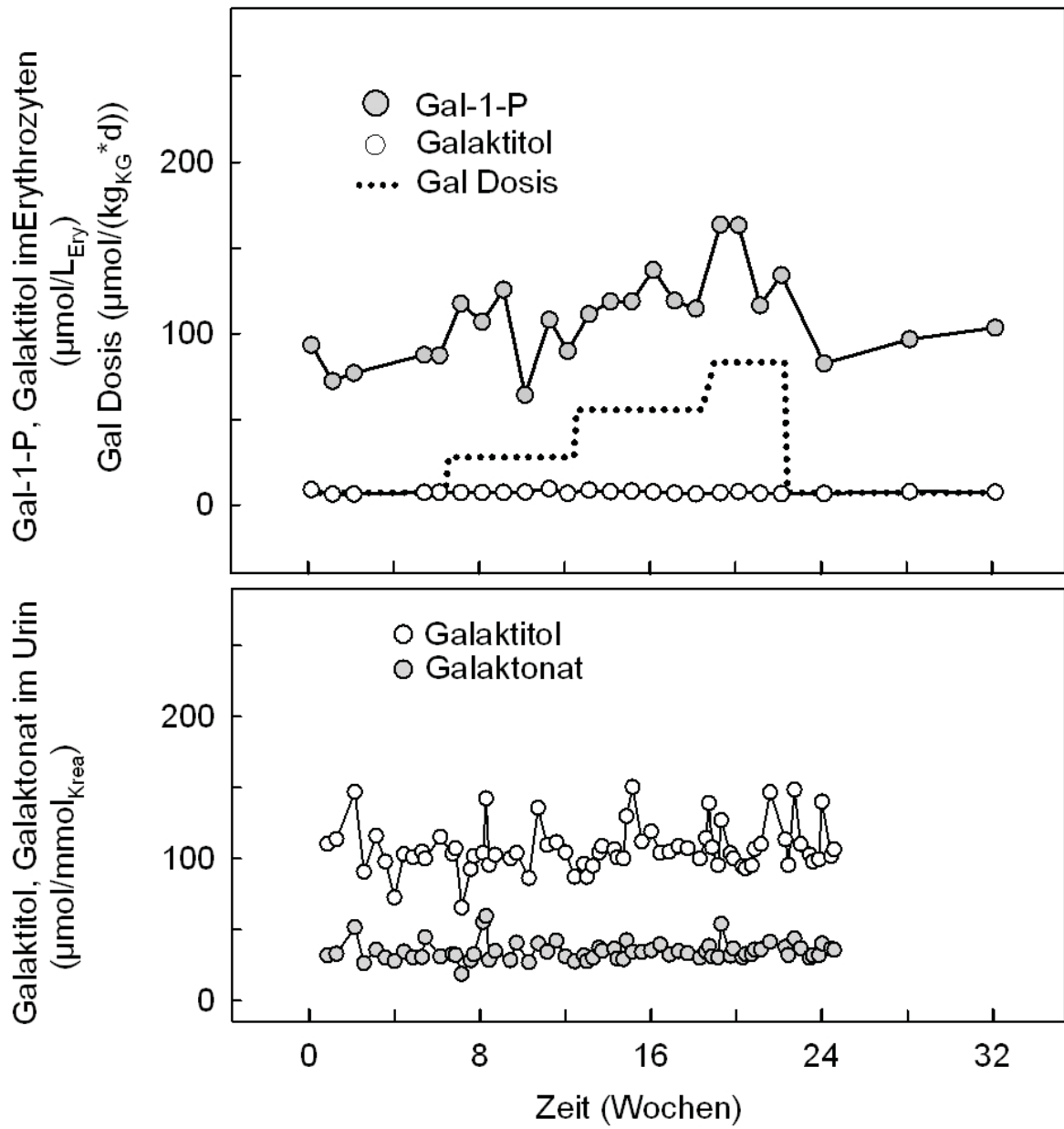
Auf Wunsch des Patienten wurde zur Nachkontrolle im Anschluss an die dritte Untersuchungsphase über einen dreiwöchigen Zeitraum unter normaler Diätführung Gal-1-P und Galaktitol in den Erythrozyten weiterhin bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 und die Statistik ist in Tabelle 6 dargestellt. Wie bei den anderen Patienten war die Galaktoseaufnahme mit der Nahrung konstant gering und betrug im Mittel in allen Untersuchungsphasen gleichbleibend < 1,5 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d).

Patient 4 zeigte eine auffällige Variabilität der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte. Es zeigten sich graduelle Anstiege des Gal-1-P<sub>Ery</sub> bei oraler Galaktosegabe von 5 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) von im Mittel 22 % (n.s.), bei Gabe von 10 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) von im Mittel 43 % (n.s.) und bei Gabe von 15 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) von im Mittel 73 % (p = 0,032) jeweils im Vergleich zur Basalphase. Nach Beendigung der oralen Galaktosegabe sanken die Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte innerhalb einer Woche wieder auf Basalwerte ab. Die übrigen biochemischen Parameter zeigten keine Veränderungen mit Ausnahme der Galaktoseausscheidung im Urin. Diese stieg gegenüber der Basalphase bei oraler Gabe von 5 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) im Mittel um 10 % (n.s.), bei Gabe von 10 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) im Mittel um 30 % (p = 0,002) und bei Gabe von 15 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) im Mittel um 58 % (p << 0,001) an.



Abbildung 6: Verlaufsdarstellung Galaktosemetabolite in Abhängigkeit von der Galaktosedosis bei Patient 4



**Tabelle 6: Ergebnisübersicht Patient 4<sup>a</sup>**

Studienphase	Basal	Galaktose p.o. pro kg <sub>KG</sub> *d			Kontrolle
		5 mg	10 mg	15 mg	
<b>Metabolite im Erythrozyten (µmol/L<sub>Ery</sub>)<sup>b</sup></b>					
<b>Gal-1-P</b>	83 ± 9 (87;72-93;n=5)	102 ± 22 (107;64-126;n=6)	120 ± 9 (119;111-137;n=6)	144 ± 23 <sup>#</sup> (149;117-164;n=4)	91 ± 10 (90;83-103;n=3)
<b>Galaktitol</b>	7,2 ± 1,1 (7,3;6,2-8,9;n=5)	7,6 ± 1,0 (7,3;7,2-9,4;n=6)	7,5 ± 0,8 (7,6;6,4-8,7;n=6)	7,0 ± 0,5 (6,9;6,6-7,7;n=4)	7,3 ± 0,5 (7,5;6,7-7,7;n=3)
<b>Metabolite im Urin (µmol/mmol<sub>Krea</sub>)<sup>b</sup></b>					
<b>Galaktose</b>	3,3 ± 0,7 (3,3;1,6-4,4;n=21)	3,7 ± 1,0 (3,5;2,6-5,7;n=16)	4,4 ± 0,9 <sup>###</sup> (4,2;2,9-5,8;n=19)	5,2 ± 1,0 <sup>###</sup> (5,0;3,7-6,9;n=13)	n.a.
<b>Galaktitol</b>	104 ± 18 (103;66-147;n=22)	107 ± 17 (104;86-150;n=17)	108 ± 12 (107;93-139;n=19)	113 ± 19 (105;96-148;n=13)	n.a.
<b>Galaktonat</b>	35 ± 10 (32;19-60;n=22)	34 ± 5 (34;27-43;n=17)	35 ± 5 (34;30-54;n=19)	36 ± 4 (36; 30-44;n=13)	n.a.
<b>Diätführung<sup>c</sup></b>					
<b>Kalorienaufnahme</b> (kJ/(kg <sub>KG</sub> *d))	180 ± 38 (185;106-233;n=13)	173 ± 43 (164;122-260;n=8)	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Galaktoseaufnahme</b> (mg/(kg <sub>KG</sub> *d))	1,38 ± 0,58 (1,24;0,61-2,87;n=13)	1,22 ± 0,33 (1,21;0,64-1,73;n=8)	n.a.	n.a.	n.a.

Legende: a) angegeben sind MW ± SD, in Klammern: Median, Bereich, Anzahl der Bestimmungen (n), b) mittels SID-GCMS gemessene Metabolite, c) Kalorien- und Galaktosezufuhr berechnet, n.a.: nicht verfügbar. Statistisch signifikant gegenüber basal: # p < 0,05, ## p < 0,005, ### p < 0,001

### ***Ergebnisse Patient 5***

Ebenso wie bei Patient 4 wurde bei Patient 5 eine dritte Phase mit einer Galaktosegabe von 15 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) durchgeführt.

Dieser Patient musste die Studie aufgrund eines unvorhergesehenen Auslandsaufenthaltes zwischen den Untersuchungsphasen mit Galaktosegabe von 5 und 10 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) für 9 Wochen unterbrechen.

Bei diesem Patienten wurde, wie bei Patient 4, auf Wunsch eine Nachkontrolle im Anschluss an die dritte Untersuchungsphase durchgeführt. Dabei wurden Gal-1-P und Galaktitol in den Erythrozyten bestimmt.

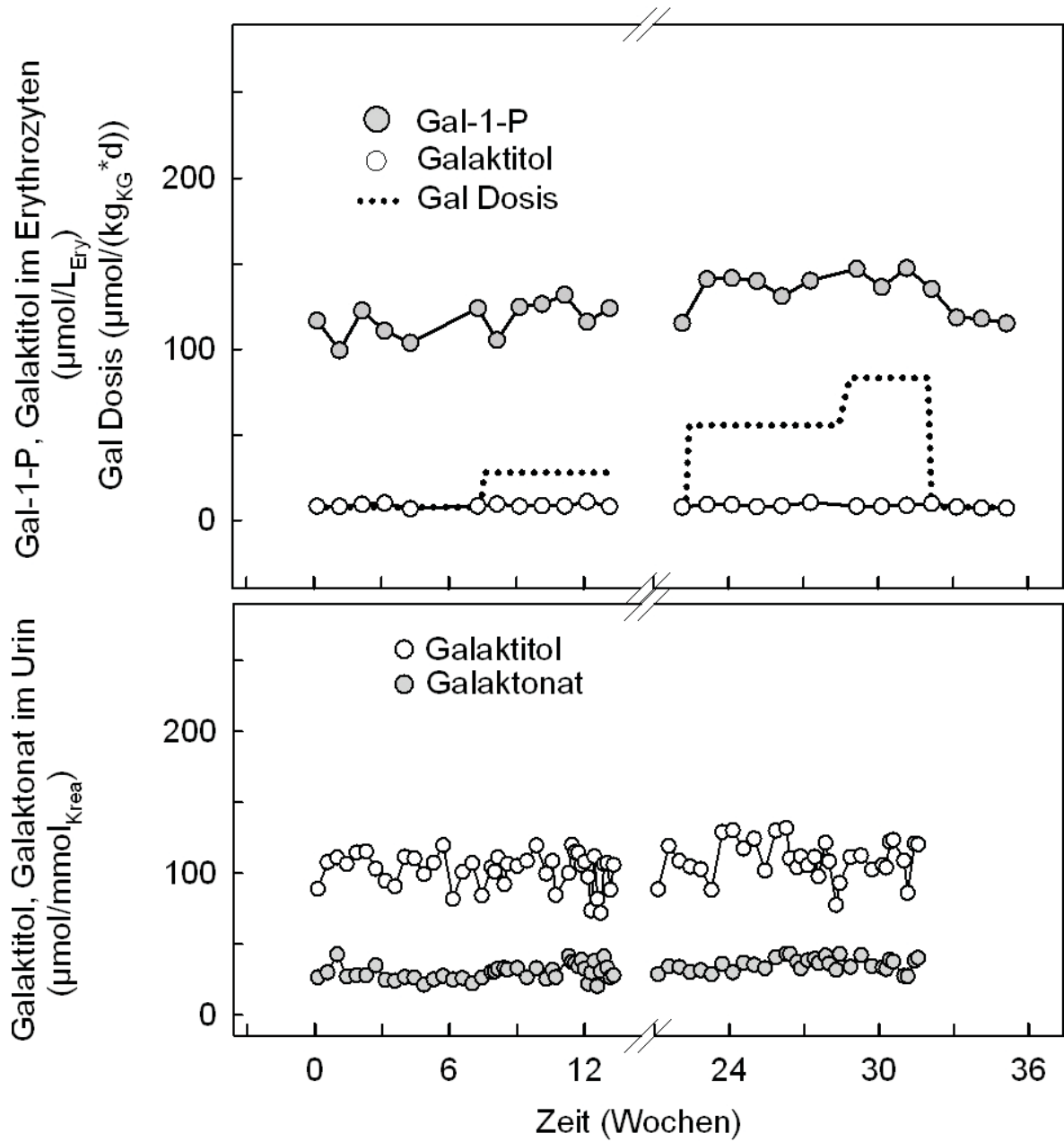
Eine Übersicht der Ergebnisse wird in Abbildung 7 gezeigt. Die statistische Auswertung ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Während der gesamten Untersuchung betrug die Galaktosezufuhr über die Diät im Mittel gleichbleibend < 1,5 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d).

Bei Patient 5 zeigte sich beim Gal-1-P<sub>Ery</sub> bei oraler Galaktosegabe von 5, 10 und 15 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) ein Anstieg im Mittel von 8 % (n.s.), 20 % (p = 0,004) und 25 % (p = 0,001) jeweils gegenüber der Basalphase.

Es deutete sich im Vergleich zur Basalphase eine dosisabhängige Steigerung der Galaktoseausscheidung im Urin an, welche bei der höchsten Dosis von 15 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) statistisch signifikant gegenüber basal von im Mittel 39 % (p = 0,001) erhöht war.

Abbildung 7: Verlaufsdarstellung Galaktosemetabolite in Abhängigkeit von der Galaktosedosis bei Patient 5



**Tabelle 7: Ergebnisübersicht Patient 5<sup>a</sup>**

Studienphase	Basal	Galaktose p.o. pro kg <sub>KG</sub> *d			Kontrolle
		5 mg	10 mg	15 mg	
<b>Metabolite im Erythrozyten (µmol/L<sub>Er</sub>)<sup>b</sup></b>					
<b>Gal-1-P</b>	113 ± 10 (114;99-124;n=6)	121 ± 9 (124;105-132;n=6)	135 ± 10 <sup>##</sup> (140;115-142;n=6)	141 ± 7 <sup>##</sup> (142;135-147;n=4)	117 ± 2 (118;118-115;n=3)
<b>Galaktitol</b>	8,4 ± 1,1 (8,3;8,1-10,0;n=6)	8,9 ± 1,1 (8,4;8,1-10,1;n=6)	8,8 ± 1,0 (8,7;7,7-10,4;n=6)	8,7 ± 0,8 (8,5;8,8-9,8;n=4)	7,3 ± 0,4 (7,1;7,1-7,7;n=3)
<b>Metabolite im Urin (µmol/mmol<sub>Krea</sub>)<sup>b</sup></b>					
<b>Galaktose</b>	5,3 ± 0,8 (5,0;4,0-6,7;n=18)	5,0 ± 1,4 (5,0;1,7-6,7;n=17)	6,0 ± 1,5 (6,1;3,7-8,7;n=22)	7,3 ± 1,9 <sup>##</sup> (7,9;4,6-9,8;n=11)	n.a.
<b>Galaktitol</b>	103 ± 12 (105;72-130;n=50)	109 ± 16 (110;50-133;n=39)	99 ± 10 (98;85-134;n=23)	97 ± 6 (94;89-110;n=14)	n.a.
<b>Galaktonat</b>	30 ± 5 (31;20-43;n=51)	36 ± 4 (36;27-43;n=38)	27 ± 4 (26;22-37;n=21)	28 ± 5 (28;20-38;n=14)	n.a.
<b>Diätführung<sup>c</sup></b>					
<b>Kalorienaufnahme</b> (kJ/(kg <sub>KG</sub> *d))	166 ± 27 (158;118-223;n=30)	156 ± 23 (161;112-195;n=8)	164 ± 13 (167;147-185;n=8)	n.a.	n.a.
<b>Galaktoseaufnahme</b> (mg/(kg <sub>KG</sub> *d))	1,47 ± 0,46 (1,35;0,73-2,43;n=30)	1,27 ± 0,52 (1,19;0,54-2,49;n=8)	1,35 ± 0,34 (1,49;0,87-1,74;n=8)	n.a.	n.a.

Legende: a) angegeben sind MW ± SD, in Klammern: Median, Bereich, Anzahl der Bestimmungen (n), b) mittels SID-GCMS gemessene Metabolite c) Kalorien- und Galaktosezufuhr berechnet, n.a.: nicht verfügbar. Statistisch signifikant gegenüber basal: ## p < 0,005

### ***Ergebnisse Patient 6***

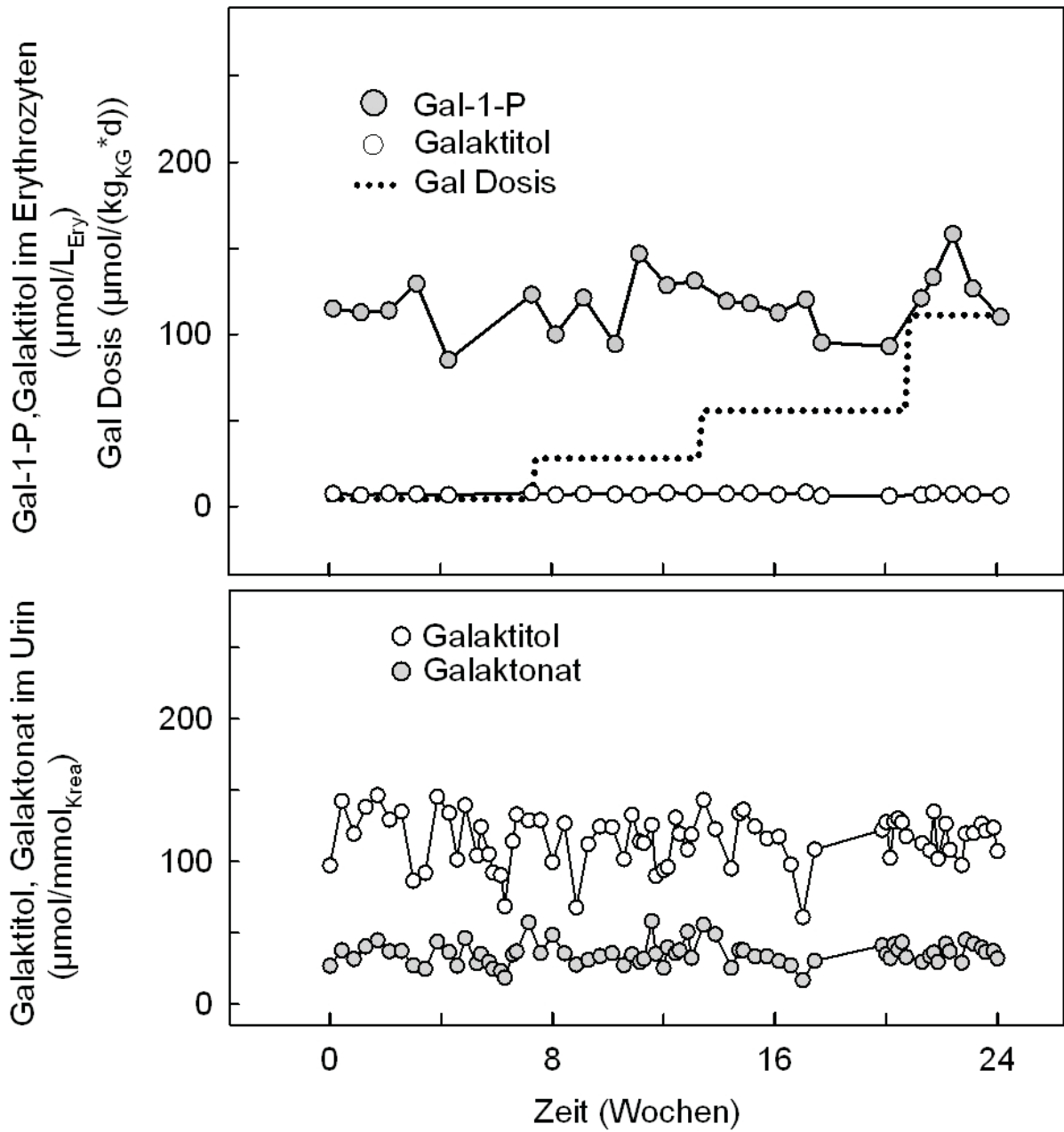
Bei Patient 6 wurde eine dritte Studienphase mit einer Galaktosegabe p.o. von 20 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt und die statistische Auswertung ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Die Galaktosezufuhr über die Diät war während der gesamten Untersuchung gleichbleibend niedrig mit im Mittel < 1 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d).

Bei Patient 6 zeigten sich in Abhängigkeit von der Galaktosegabe keine relevanten Unterschiede der Stoffwechselmetabolite zwischen den einzelnen Phasen der Untersuchung.

Abbildung 8: Verlaufsdarstellung Galaktosemetabolite in Abhängigkeit von der Galaktosedosis bei Patient 6



**Tabelle 8: Ergebnisübersicht Patient 6<sup>a</sup>**

Studienphase	Basal	Galaktose p.o. pro kg <sub>KG</sub> *d		
		5 mg	10 mg	20 mg
<b>Metabolite im Erythrozyten (µmol/L<sub>Ery</sub>)<sup>b</sup></b>				
<b>Gal-1-P</b>	113 ± 15 (114;85-129;n=6)	120 ± 20 (125;94-147;n=6)	110 ± 12 (115;93-120;n=6)	130 ± 18 (126;110-158;n=5)
<b>Galaktitol</b>	7,1 ± 0,5 (7,2;6,5-7,8;n=6)	7,1 ± 0,5 (7,1;6,5-7,7;n=6)	7,0 ± 0,8 (7,1;6,0-8,0;n=6)	6,9 ± 0,5 (6,9;6,2-7,6;n=5)
<b>Metabolite im Urin (µmol/mmol<sub>Krea</sub>)<sup>b</sup></b>				
<b>Galaktose</b>	2,4 ± 0,4 (2,4;1,8-3,3;n=22)	2,3 ± 0,5 (2,2;1,5-3,0;n=19)	2,2 ± 0,4 (2,6;1,4-3,1;n=17)	2,5 ± 0,7 (2,3;1,8-4,1;n=14)
<b>Galaktitol</b>	116 ± 20 (111;68-147;n=48)	115 ± 14 (118;61-135;n=36)	107 ± 20 (117;61-131;n=17)	117 ± 10 (121;99-131;n=14)
<b>Galaktonat</b>	36 ± 9 (121;19-58;n=48)	35 ± 5 (35;17-45;n=36)	35 ± 9 (36;21-53;n=17)	38 ± 6 (37;32-51;n=14)
<b>Diätführung<sup>c</sup></b>				
<b>Kalorienaufnahme</b> (kJ/(kg <sub>KG</sub> *d))	119 ± 30 (120;43-160;n=30)	120 ± 33 (110;53-181;n=20)	113 ± 29 (112;69-173;n=16)	n.a.
<b>Galaktoseaufnahme</b> (mg/(kg <sub>KG</sub> *d))	0,70 ± 0,30 (0,67;0,14-1,62;n=30)	0,86 ± 0,38 (0,83;0,35-1,73;n=20)	0,72 ± 0,43 (0,61;0,18-1,95;n=16)	n.a.

Legende: a) angegeben sind MW ± SD, in Klammern: Median, Bereich, Anzahl der Bestimmungen (n), b) mittels SID-GCMS gemessene Metabolite, c) Kalorien- und Galaktosezufuhr berechnet, n.a.: nicht verfügbar



### ***Ergebnisse Patient 7***

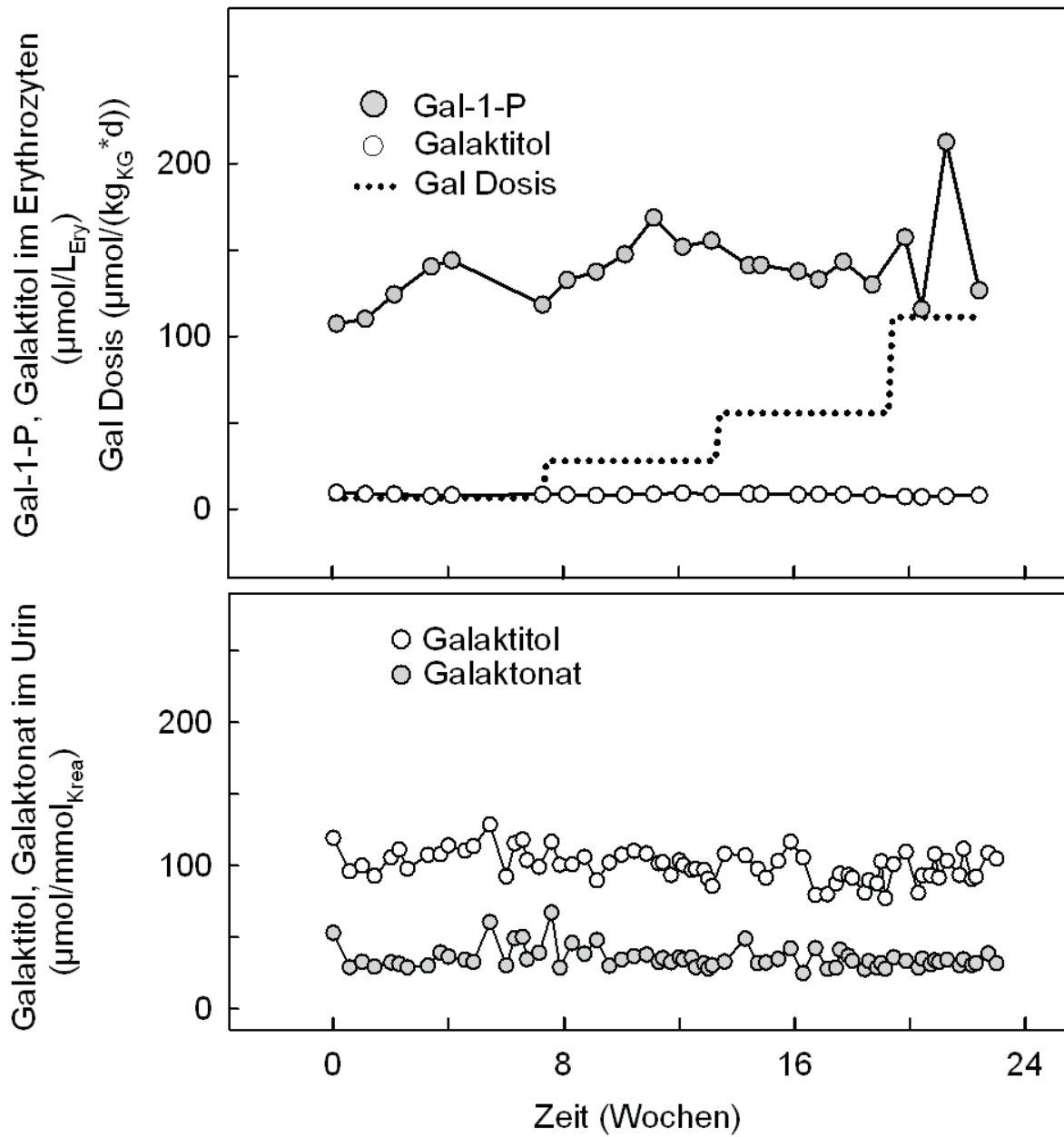
Ebenso wie bei Patient 6 wurde bei Patient 7 eine dritte Belastungsphase mit einer Galaktosegabe p.o. von 20 mg/(kg<sub>KG</sub>\*d) durchgeführt.

Die Ergebnisübersicht wird in Abbildung 9 gezeigt, die statistische Auswertung ist in Tabelle 9 dargestellt.

Während der gesamten Untersuchung war die Galaktosezufuhr über die Diät gleichbleibend im Mittel  $\leq 1,5$  mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d).

Bei Patient 7 zeigten sich in Abhängigkeit von der Galaktosedosis keine Veränderungen der Kontrollparameter, mit Ausnahme eines graduellen Anstiegs der Galaktoseausscheidung im Urin. Der Anstieg betrug gegenüber basal im Mittel bei oraler Gabe von 5 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) 20 % (n.s.), bei 10 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) 34 % (p = 0,03) und bei 20 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) 67 % (p << 0,001).

Abbildung 9: Verlaufsdarstellung Galaktosemetabolite in Abhängigkeit von der Galaktosedosis bei Patient 7



**Tabelle 9: Ergebnisübersicht Patient 7<sup>a</sup>**

Studienphase	Basal	Galaktose p.o. pro kg <sub>KG</sub> *d		
		5 mg	10 mg	20 mg
<b>Metabolite im Erythrozyten (µmol/L<sub>Ery</sub>)<sup>b</sup></b>				
<b>Gal-1-P</b>	124 ± 15 (121;107-144;n=6)	149 ± 13 (150;133-169;n=6)	138 ± 5 (139;130-143;n=6)	153 ± 43 (142;127-212;n=6)
<b>Galaktitol</b>	8,5 ± 0,6 (8,5;7,6-9,5;n=6)	8,5 ± 0,5 (8,5;9,2-7,8;n=6)	8,4 ± 0,3 (8,4;8,0-8,8;n=6)	7,4 ± 0,5 (7,3;6,9-8;n=6)
<b>Metabolite im Urin (µmol/mmol<sub>Krea</sub>)<sup>b</sup></b>				
<b>Galaktose</b>	2,6 ± 0,4 (2,6;2,1-3,4;n=18)	3,1 ± 0,5 (3,0;2,4-4,3;n=20)	3,5 ± 0,7 <sup>#</sup> (3,4;2,5-5,3;n=17)	4,4 ± 1,2 <sup>###</sup> (4,2;2,7-6,3;n=13)
<b>Galaktitol</b>	108 ± 10 (108;93-129;n=18)	101 ± 8 (101;86-117;n=20)	94 ± 11 (93;77-117;n=18)	99 ± 9 (97;81-112;n=14)
<b>Galaktonat</b>	38 ± 9 (34;29-61;n=18)	37 ± 9 (34;28-67;n=20)	34 ± 6 (33;25-49;n=18)	33 ± 3 (33;29-39;n=14)
<b>Diätführung<sup>c</sup></b>				
<b>Kalorienaufnahme</b> (kJ/(kg <sub>KG</sub> *d))	163 ± 30 (160;111-239;n=30)	169 ± 31 (179;114-209;n=7)	165 ± 30 (171;112-196;n=7)	n.a.
<b>Galaktoseaufnahme</b> (mg/(kg <sub>KG</sub> *d))	1,00 ± 0,50 (1,00;0,26-2,46;n=30)	1,29 ± 0,45 (1,37;0,77-2,04;n=7)	1,19 ± 0,43 (1,38;0,47-1,64;n=7)	n.a.

Legende: a) angegeben sind MW ± SD, in Klammern: Median, Bereich Anzahl der Bestimmungen (n), b) mittels SID-GCMS gemessene Metabolite, c) Kalorien- und Galaktosezufuhr berechnet, n.a.: nicht verfügbar. Statistisch signifikant gegenüber basal: # p < 0,05, ### p << 0,001

## 4.2 Gesamtschau

Bei Betrachtung aller Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsphasen zeigten sich bei der Mehrzahl der gemessenen Stoffwechselfparameter keine Veränderungen in Abhängigkeit von der Galaktosegabe.

Bei drei Patienten zeigten sich mit der Galaktosedosis korrelierende, zum Teil statistisch signifikante Anstiege der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte (s. Abb. 10a). Bei vier Patienten wurden keine Veränderungen des Gal-1-P<sub>Ery</sub> in Abhängigkeit von der Galaktosegabe festgestellt (s. Abb. 10b).

Bei fünf Patienten wurden dosisabhängige, zum Teil signifikante Anstiege der Galaktoseausscheidung im Urin mit steigender oraler Galaktosegabe beobachtet (s. Abb. 11a). Bei zwei Patienten ließen sich keine Veränderungen der Galaktoseausscheidung während der Phasen mit zusätzlicher Galaktosegabe feststellen (s. Abb. 11b).

Bei drei Patienten wurde ein Anstieg sowohl des Gal-1-P<sub>Ery</sub> als auch der Galaktoseausscheidung im Urin in Abhängigkeit von der Galaktosegabe festgestellt (Patient 2, Patient 4 und Patient 5).

Abbildung 10: Einfluss der Galaktosegabe auf das Gal-1-P<sub>Ery</sub> bei jedem einzelnen Patienten

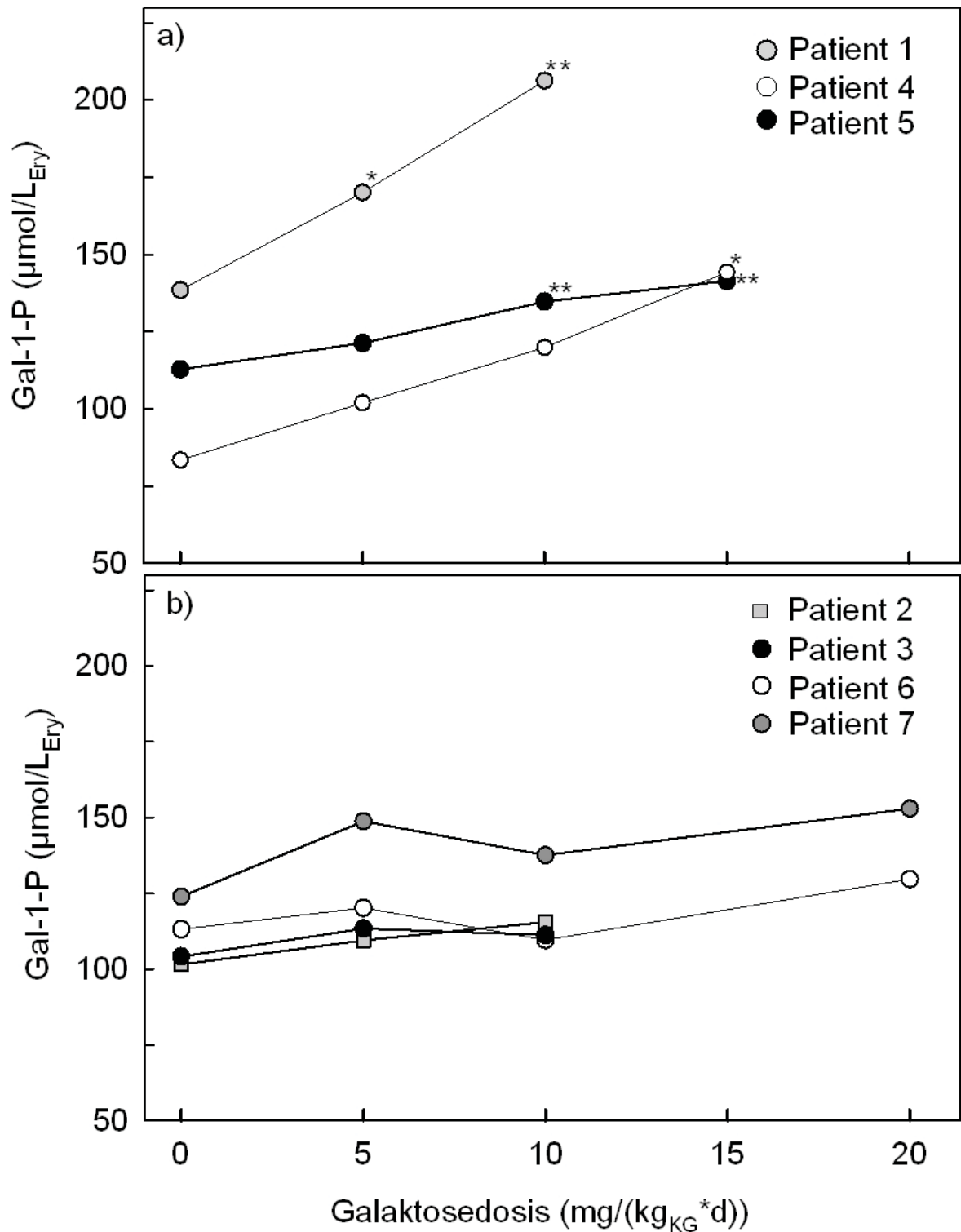


Abb. 10: Legende: dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Phase für jeden Patienten (n = 4-7). Statistisch signifikant gegenüber der Phase ohne zusätzliche Galaktosegabe: \*p < 0,05, \*\* p < 0,005, \*\*\* p << 0,001

Abbildung 11: Einfluss der Galaktosegabe auf die Galaktose-Ausscheidung im Urin bei jedem einzelnen Patienten

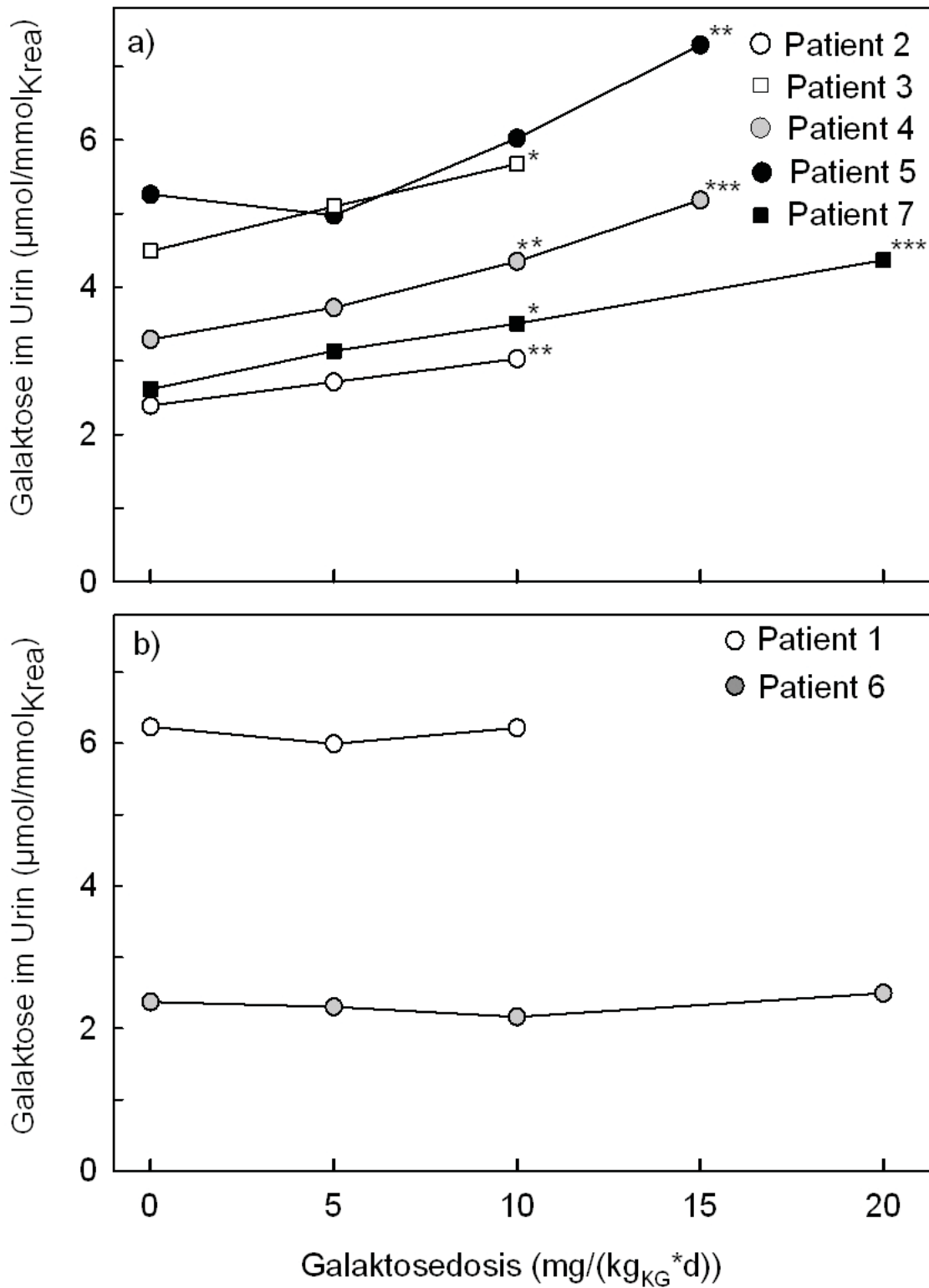


Abb. 11: Legende: dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Phase für jeden Patienten (n = 4-7)  
 Statistisch signifikant gegenüber der Phase ohne zusätzliche Galaktosegabe: \*p < 0,05, \*\* p < 0,005, \*\*\* p < 0,001

## 5 Diskussion

### 5.1 Studienaufbau

#### 5.1.1 Patientenkollektiv

Die einzige Behandlungsoption bei klassischer Galaktosämie ist eine, von Geburt an, laktosefreie, galaktosearme Diät (Mason und Turner, 1935; Walter et al., 1999; Welling et al., 2016). In den pädiatrischen Stoffwechselzentren gelten weltweit in verschiedenen Ländern unterschiedliche Vorgaben bezüglich der Strenge dieser Diät. Einigkeit besteht in der strikten Einhaltung einer laktosefreien Ernährung. Kontrovers diskutiert wird die Zulassung von verschiedenen Früchten und Gemüsearten, welche sowohl freie als auch gebundene Galaktose, in Form von Glycolipiden und Glykoproteinen, enthalten, z.B. Tomate, Dattel, Banane, Apfel (Jumbo-Lucioni et al., 2012; Adam et al., 2015). Daten zur Toleranz der Patienten für Galaktose, die das Ausmaß der Strenge der Diättempfehlungen stützen, existieren bis jetzt nicht.

Hinweise auf eine mögliche Galaktosetoleranz lieferten die Arbeiten von Schadewaldt et al. (2004, 2014) und Kamalanathan (2005) zur Altersabhängigkeit der endogenen Galaktosebildung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie.

Sie zeigten, dass Neugeborene bezogen auf das Körpergewicht eine dreimal höhere endogene Galaktosebildung aufweisen als Erwachsene, dass die endogene Galaktosebildung vom Neugeborenen- zum Erwachsenenalter exponentiell abnimmt (Kamalanathan 2005) und im Erwachsenenalter einen konstanten Wert erreicht.

Die endogen gebildete Galaktose akkumuliert nicht und wird nicht ausgeschieden. Es müssen daher ausreichend Kapazitäten zur Verstoffwechslung der endogen gebildeten Galaktose bestehen. Unter der Voraussetzung, dass die Kapazität zur Verstoffwechslung konstant bleibt und die Menge an endogen gebildeter Galaktose abnimmt, sollte mit zunehmendem Alter eine Toleranz für exogene Galaktose vorhanden sein. Diese müsste im Erwachsenenalter den höchsten Wert annehmen und weitgehend konstant sein. Aufgrund der experimentellen Daten zur endogenen

Galaktosebildung schätzten Schadewaldt et al. (2004, 2014), dass bei einem erwachsenen Patienten mit einem Körpergewicht von 70 kg diese Toleranz bei über 1000 mg Galaktose pro Tag liegen könnte (ca. 20 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d)).

Ziel dieser Arbeit war die experimentelle Prüfung, ob bei erwachsenen Patienten mit klassischer Galaktosämie eine Galaktosetoleranz besteht und gegebenenfalls die Bestimmung der quantitativen Ausprägung. Sofern sich eine quantitativ bedeutsame Galaktosetoleranz bestätigen ließe, bestünde die Möglichkeit einer Lockerung der Diät, was eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität bedeuten würde (Hoffmann B. et al., 2012; ten Hoedt A.E. et al., 2011).

An der Studie nahmen sieben erwachsene Patienten ( $\geq 18$  Jahre) mit klassischer Galaktosämie teil. Alle Patienten hatten eine vergleichbare Ausprägung des genetischen Defekts der klassischen Galaktosämie mit einer Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität (GALT) von  $< 1$  % der Norm ( $< 0,2 \mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g}_{\text{Hb}})$ ) und wiesen somit eine vergleichbare residuale Stoffwechselkapazität für den Galaktosekatabolismus auf. Sie hatten eine gute Stoffwechseleinstellung mit vergleichbaren Galaktose-1-Phosphat-Ausgangswerten. Die Galaktose-1-Phosphat-Werte im Erythrozyten (Gal-1-P<sub>Ery</sub>) lagen bei allen Patienten unterhalb des empfohlenen Grenzwertes (Gal-1-P<sub>Ery</sub>  $< 150 \mu\text{mol}/\text{L}_{\text{Ery}}$ , Walter et al., 1999 ) und bestätigten eine gute Diät-Compliance der Patienten. Die Patienten waren normgewichtig und litten nicht an weiteren akuten oder chronischen Erkrankungen. Genotypen waren kein Einschlusskriterium für die Studienteilnahme, allerdings sind die im Untersuchungskollektiv vorkommenden Varianten des GALT-Gens alle als typisch für die „klassische Galaktosämie“ in der Literatur beschrieben (Leslie et al., 1992; Elsas et al., 1995; Holton et al., 2001) und bestätigten so zusätzlich die Diagnose.



### 5.1.2 Methodenkritik

Die Studie gliederte sich in vier Phasen. In einer initialen 6-wöchigen Kontrollphase wurden die individuellen basalen Stoffwechselwerte und deren Streuung erfasst. Es folgten in der Regel drei Phasen mit zusätzlicher oraler Einnahme von Galaktose in steigender Dosierung, jeweils für einen Zeitraum von mindestens vier Wochen.

Anhand von Ernährungsprotokollen wurde die Einhaltung der laktosefreien, galaktosearmen Diät kontrolliert. Die Evaluation der 7- bis 14-tägigen Protokolle, welche die Patienten innerhalb des Studienzeitraums von ca. sechs Monaten jeweils zu Beginn einer Studienphase erstellten, ergab bei allen Patienten eine sowohl gleichmäßige, bedarfsentsprechende Kalorienaufnahme als auch eine gleichmäßig niedrige Galaktoseaufnahme. Die individuelle tägliche Galaktoseaufnahme betrug im Mittel  $0,5\text{-}1,5 \text{ mg Galaktose}/(\text{kg}_{\text{KG}}\cdot\text{d})$ , entsprechend einer Gesamtaufnahme im Mittel von  $41\text{-}101 \text{ mg Galaktose pro Tag}$ . Systematische Studien zur Galaktoseaufnahme existieren bisher nicht in der Literatur. Berry et al. (1993) haben bei einer Patientin während einer Diät mit Früchten und Gemüse eine mittlere tägliche Aufnahme von  $0,7 \text{ mg Galaktose}/(\text{kg}_{\text{KG}}\cdot\text{d})$  ermittelt. Dies entspricht einer totalen Galaktoseaufnahme von  $54 \text{ mg Galaktose pro Tag}$ . Bosch et al. (2004) beobachteten drei Patienten während einer sehr strengen Diät mit Beschränkung von Galaktose enthaltenden Früchten und Gemüse. Die Berechnung der Galaktoseaufnahme erfolgte anhand eines 3 Tage erfassenden Ernährungsprotokolls mittels einer Lebensmittelliste von Gross und Acota (1991). Es wurde eine Galaktoseaufnahme zwischen  $0,3$  und  $0,5 \text{ mg Galaktose}/(\text{kg}_{\text{KG}}\cdot\text{d})$ , entsprechend einer Tagesgesamtaufnahme von  $17\text{-}18 \text{ mg Galaktose}$ , ermittelt.

Die Empfehlungen hinsichtlich der diätetischen Galaktosezufuhr sind sehr variabel. In pädiatrischen Stoffwechselzentren in Deutschland beträgt die erlaubte Aufnahme bis zu  $500 \text{ mg Galaktose pro Tag}$  (Adam et al., 2015). Im europäischen Vergleich liegt diese Dosis im oberen Bereich. Belgien empfiehlt eine tägliche Aufnahme  $\leq 50 \text{ mg Galaktose pro Tag}$  und die Stoffwechselzentren in Italien und den Niederlanden begrenzen die Galaktoseaufnahme mit der Diät auf  $\leq 100 \text{ mg Galaktose pro Tag}$

(Adam et al., 2015). Im Vergleich zur endogenen Galaktosebildung bei Erwachsenen von ca. 1000 mg Galaktose pro Tag (Schadewaldt et al., 2004, 2014; Berry et al., 2004), war die Galaktoseaufnahme mit der Nahrung bei allen an der Studie teilnehmenden Patienten relativ gering und betrug etwa 5-10 % der endogenen Bildung.

Unter Abwägung von Patienten-Compliance und Aussagefähigkeit der Datensätze wurden die Blutentnahmen einmal wöchentlich durchgeführt. Die Dauer der einzelnen Phasen (mindestens vier Wochen) und die Zahl der Blutentnahmen (einmal wöchentlich) gewährleisteten ein Mindestmaß an statistischer Absicherung bezüglich Mittelwert, Variationsbreite und zeitlichem Auflösungsvermögen des metabolischen Kontrollparameters Gal-1-P<sub>Ery</sub>. Außerdem wurde so sichergestellt, eine mögliche Akkumulation der zusätzlich gegebenen Galaktose im Körper und eine damit verbundene mögliche Toxizität sehr frühzeitig zu erfassen. Die Urinprobennahme zur Bestimmung der Ausscheidung der Galaktosemetabolite (Galaktose, Galaktitol, Galaktonat) erfolgte täglich. Durch die hohen Datenmengen wurde eine hohe Sensitivität erreicht und selbst geringfügige Änderungen konnten erfasst werden.

In der wöchentlichen Metabolitkontrolle wurde Gal-1-P<sub>Ery</sub> bestimmt. Dies ist der etablierte Parameter zur Stoffwechselkontrolle bei klassischer Galaktosämie (Schwarz et al., 1960). Ein Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Wert von 150 µmol/L<sub>Ery</sub> ( $\hat{=}$  5 mg/dL<sub>Ery</sub>) soll nicht überschritten werden (Schwarz et al., 1960; Walter et al., 1999). Ein absoluter Grenzwert für Gal-1-P<sub>Ery</sub> ist aber nicht definiert. Symptomatische Neugeborene mit klassischer Galaktosämie weisen unter Milchfütterung deutlich höhere Werte auf (> 3 mmol Gal-1-P/L<sub>Ery</sub>  $\hat{=}$  80 mg Gal-1-P/dL<sub>Ery</sub>) (Gitzelmann et al., 1995; Ficicioglu et al., 2005; Zlatunich et al., 2005).

Bei Neugeborenen mit Duarte D2 - Variante, die in aller Regel eine Restaktivität der GALT von 25 % besitzen, wurden unter Milchfütterung in den ersten Lebenswochen Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte von 2 mmol/L<sub>Ery</sub> ( $\hat{=}$  50 mg/dL<sub>Ery</sub>) beobachtet. Trotz Milchfütterung

erfolgte ein Abfall des Gal-1-P<sub>Ery</sub> auf Normwerte, allerdings langsam und über mehrere Monate. Klinische Auffälligkeiten, als Zeichen einer relevanten Störung des Stoffwechsels, zeigten diese Neugeborenen bei diesen Werten nicht. (Schadewaldt, 2017 - mündliche Mitteilung unpublizierter Daten). Ein Gal-1-P-Wert < 2 mmol/L<sub>Ery</sub> ( $\hat{=}$  50 mg/dL<sub>Ery</sub>) dürfte daher kurzfristig keine klinisch auffälligen Störungen des Stoffwechsels bedingen. In dieser Studie wurde daher, zur Gewährleistung der Patientensicherheit, der Grenzwert für einen Abbruch auf < 0,4 mmol Gal-1-P/L<sub>Ery</sub> ( $\hat{=}$  10 mg Gal-1-P/dL<sub>Ery</sub>) festgelegt.

Die Einnahme der zusätzlichen Galaktose erfolgte in der Studie oral, jeweils hälftig morgens und abends zu den Mahlzeiten. Zunächst erhielten die Patienten 5 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d). Die Galaktosegabe war 3- bis 7-mal höher als die tägliche durchschnittliche Galaktoseaufnahme mit der normalen Diät. Nach unserer Abschätzung hätte, selbst bei vollständiger Verstoffwechslung der zusätzlichen Galaktose zu Gal-1-P und vollständiger Akkumulation des Gal-1-P im Körper, ein Wert > 2 mmol Gal-1-P/L<sub>Ery</sub> ( $\hat{=}$  50 mg Gal-1-P/dL<sub>Ery</sub>) innerhalb von 7 Tagen, die zwischen den Kontrollbestimmungen des Gal-1-P<sub>Ery</sub> lagen, nicht erreicht werden können. In der Studienphase mit Gabe von 5 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) sind, mit Ausnahme einer Patientin, die mit Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werten im Mittel von 170  $\mu$ mol/L<sub>Ery</sub> geringfügig erhöhte Werte aufwies, keine Veränderungen der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte festgestellt worden. Auch bei einer Steigerung der oralen Galaktosegabe um weitere 5 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) sollte daher ein Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Wert > 2 mmol/L<sub>Ery</sub> nicht erreicht werden. Die Dosis der zusätzlichen Galaktosegabe wurde in der nachfolgenden Studienphase daher auf insgesamt 10 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) gesteigert. In dieser Phase war die exogene Galaktosedosis 7- bis 15-mal höher als die Galaktoseaufnahme mit der normalen Diät. Bei der Dosierung von 10 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) zeigten drei Patienten Erhöhungen der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte. Bei zweien dieser drei Patienten lagen die Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte in einem Bereich von 110-142  $\mu$ mol/L<sub>Ery</sub> weiterhin unterhalb des empfohlenen Grenzwertes von 150  $\mu$ mol Gal-

1-P/L<sub>Ery</sub>. Der dritte Patient zeigte Erhöhungen der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte im Mittel auf 206  $\mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$ .

Die beiden Patienten, die unter der Gabe von 10 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) erhöhte Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte aufwiesen, allerdings unter dem empfohlenen Grenzwert von 150  $\mu\text{mol/L}_{\text{Ery}}$ , stimmten einer weiteren Studienphase zu und erhielten 15 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d). Mit 938 mg Galaktose/d und 1058 mg Galaktose/d handelte es sich um das ca. 10-fache der Galaktoseaufnahme dieser Patienten mit der normalen Diät.

Zwei weitere Patienten zeigten unter der zusätzlichen Galaktosegabe von 10 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) keinerlei Veränderungen der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte. Auch diese Patienten stimmten einer zusätzlichen Studienphase zu. Sie erhielten 20 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d) *per os*. Dies entsprach mit 1110 mg Galaktose pro Tag und 1150 mg Galaktose pro Tag dem 20- bis 30-fachen der täglichen Galaktoseaufnahme mit der regulären Diät.

Insgesamt kam es während der Studie bei keinem Patienten zu Erhöhungen der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte über den Grenzwert von 0,4 mmol Gal-1-P/L<sub>Ery</sub>, der einen Abbruch der Studienteilnahme erfordert hätte. Dies gilt entsprechend für die anderen Abbruchkriterien, insbesondere der Aminotransferasen im Serum. Die wöchentliche Kontrolle der Leberfunktion zeigte keinerlei Auffälligkeiten. Eine Beeinträchtigung der Leberfunktion wurde damit ausgeschlossen. Entsprechend den Befunden der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte und der Werte der Aminotransferasen wurden auch im Urin keine quantitativ bedeutsamen Veränderungen der Metabolitausscheidung festgestellt.

### 5.1.3 Ergebniskritik

Die Galaktosetoleranz-Hypothese (Schadewaldt et al., 2004, 2014; Kamalanathan, 2005) wird anhand der in dieser Studie erhobenen Daten experimentell bestätigt. Die Ergebnisse zeigen allerdings ein differenziertes Bild. Bei vier Patienten ließen sich zu keinem Zeitpunkt Veränderungen der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte feststellen. Bei drei Patienten wurden statistisch signifikante, dosisabhängige Anstiege des Gal-1-P<sub>Ery</sub> festgestellt.

Diese Erhöhungen der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte überschritten in der Regel nicht den oberen Behandlungszielwert von 150 µmol Gal-1-P/L<sub>Ery</sub>, mit Ausnahme zweier Patienten, welche bei der Gabe von insgesamt 5 und 10 mg Galaktose pro Tag bzw. bei Gabe von insgesamt 20 mg Galaktose pro Tag im Mittel geringfügig höhere Werte aufwiesen. Es erfolgte bei keinem Patienten eine persistierende Akkumulation. Daraus folgt, dass sich in jeder Phase der Studie ein metabolisches Gleichgewicht zwischen exogener Galaktosezufuhr und katabolem Abbau einstellte. Klinische Auffälligkeiten wurden nicht festgestellt. Alle an der Studie teilnehmenden Patienten wiesen somit eine quantitativ bedeutsame Toleranz für exogene Galaktose zusätzlich zu ihrer regulären Diät auf.

Die von Schadewaldt et al. (2004, 2014) prognostizierte „Mindest“ - Toleranz für exogene Galaktose von ca. 1000 mg Galaktose pro Tag bei einem Körpergewicht von 70 kg (ca. 20 mg Galaktose/(kg<sub>KG</sub>\*d)) wurde damit bestätigt.

Andere Autoren berichten von differenten Ergebnissen. Bosch et al. (2004) stellten bei 3 Patienten in einem Studienzeitraum von insgesamt 6 Wochen bei einer zusätzlichen Galaktosegabe von 200 mg bis zu maximal 600 mg Galaktose pro Tag und Dosissteigerungen um 200 mg Galaktose im 2-wöchigen Intervall keinerlei Veränderungen der Galaktose-1-P<sub>Ery</sub>-Werte fest. Ebenso konnten keine Veränderungen der Galaktitolausscheidung im Urin festgestellt werden. Berry et al. (1993) beobachteten 2 Patienten und konnten bei einer Galaktosegabe von 200 mg Galaktose pro Tag innerhalb eines Zeitraums von 3 Wochen keine Variation der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte detektieren. Es wurde allerdings unter der zusätzlichen Galaktosegabe eine erhöhte Galaktitolausscheidung gefunden. Coss et al. (2011) führten eine Studie mit 5 Patienten durch. In einem Gesamtstudienzeitraum von 14 Wochen, bei einer oralen Galaktosegabe von 300 mg bis zu maximal 4000 mg Galaktose pro Tag, bei Dosissteigerungen im 2- bis 4-wöchigen Intervall, wurden keine Veränderungen des Gal-1-P<sub>Ery</sub> beobachtet. Die Galaktitolausscheidung im Urin war unverändert. Im Rahmen der bekannten hohen Inter- und Intraindividualität des Gal-1-P<sub>Ery</sub> sind die Ergebnisse von Coss et al. kritisch zu hinterfragen, da die erhobenen

Stoffwechselwerte (Gal-1-P<sub>Ery</sub> und Galaktitol) nicht für jeden Patienten einzeln betrachtet, sondern Mittelwerte und Standardabweichungen über das Kollektiv ermittelt worden sind. Individualverläufe wurden bei dieser Studie nicht untersucht. In der Studie von Coss et al. wurden wie beim Gal-1-P<sub>Ery</sub> im Kollektiv keine Veränderungen der Galaktitolausscheidung festgestellt.

In der hier vorgelegten Studie wurden unter zusätzlicher Galaktosegabe ebenfalls bei keinem Patienten Veränderungen der Galaktitolausscheidung beobachtet. Die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich des Effekts einer Galaktosegabe auf die Galaktitolausscheidung von Berry, verglichen mit Coss, Bosch und den in dieser Studie erhobenen Daten, deuten darauf hin, dass die Galaktitolausscheidung offenbar variabel ist.

Bezüglich der Galaktoseausscheidung im Urin bei Galaktosämie existieren keine spezifischen Studien in der Literatur. In dieser Studie wurde bei fünf Patienten eine signifikante Erhöhung der Galaktoseausscheidung im Urin festgestellt. Zwei Patienten zeigten keine Veränderungen der Galaktoseausscheidung. Bezogen auf die Galaktosegabe ist die erhöhte Galaktoseausscheidung im Urin in den jeweiligen Phasen mit < 0,5 % der Galaktoseaufnahme vernachlässigbar gering. Es ist zu vermuten, dass die Galaktoseausscheidung im Urin, unter zusätzlicher Galaktosegabe, ähnlich variabel ist wie die Galaktitolausscheidung im Urin.

## 5.2 Schlussfolgerung

Die Toleranzgrenze wurde von keinem Patienten in dieser Studie erreicht. Sie ist in dieser Arbeit definiert als die Menge zusätzlicher oraler Galaktose, die gerade nicht zu einer persistierenden Akkumulation und nicht zu einer Erhöhung der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte > 0,4 mmol/L<sub>Ery</sub> ( $\cong$  10 mg Gal-1-P/dL<sub>Ery</sub>) führt. Auf Basis der hier erhobenen Ergebnisse erscheint eine Lockerung der Diät möglich. Eine zusätzliche Aufnahme von 1000 mg Galaktose ( $\cong$  20 mg Galaktose/kg<sub>KG</sub>) pro Tag sollte von einem erwachsenen Patienten mit klassischer Galaktosämie toleriert werden. Unter dieser Dosierung sollten höchstwahrscheinlich keine oder lediglich geringfügige

Erhöhungen der Gal-1-P<sub>Ery</sub>-Werte auftreten und sich keine klinisch relevanten Veränderungen ergeben. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse auf eine Interindividualität hinsichtlich der Größe der Galaktosetoleranz hin. Rückschlüsse auf die individuelle Größe der Toleranz lassen die Daten jedoch nicht zu. Eine über die genannte Menge von ca. 1000 mg Galaktose pro Tag hinausgehende Zufuhr sollte individuell ausgetestet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Abraham, H.D., Howell, R.R., 1969. Human hepatic uridine diphosphate galactose pyrophosphorylase. Its characterization and activity during development. *J. Biol. Chem.* 244, 545–550.

Acosta, P.B., Gross, K.C., 1995. Hidden sources of galactose in the environment. *Eur. J. Pediatr.* 154, S87-92.

Adam, S., Akroyd, R., Bernabei, S., Bollhalder, S., Boocock, S., Burlina, A., Coote, T., Corthouts, K., Dalmau, J., Dawson, S., Defourny, S., De Meyer, A., Desloovere, A., Devlin, Y., Diels, M., Dokoupil, K., Donald, S., Evans, S., Fasan, I., Ferguson, C., Ford, S., Forga, M., Gallo, G., Grünert, S.C., Heddrich-Ellerbrok, M., Heidenborg, C., Jonkers, C., Lefebure, K., Luyten, K., MacDonald, A., Meyer, U., Micciche, A., Müller, E., Portnoi, P., Ripley, S., Robert, M., Robertson, L.V., Rosenbaum-Fabian, S., Sahm, K., Schultz, S., Singleton, K., Sjöqvist, E., Stoelen, L., Terry, A., Thompson, S., Timmer, C., Vande Kerckhove, K., van der Ploeg, L., Van Driessche, M., van Rijn, M., van Teeffelen-Heithoff, A., Vitoria, I., Voillot, C., Wenz, J., Westbrook, M., Wildgoose, J., Zweers, H., 2015. How strict is galactose restriction in adults with galactosaemia? *International practice. Mol. Genet. Metab.* 115, 23–26.

Aitken, D.A., 1979. Intra-chromosomal assignment of the structural gene for GALT to the short arm of chromosom-9 by gene dosage studies. *Cytogenet. Cell Genet.* 25, 131.

Berry, G.T., Palmieri, M., Gross, K.C., Acosta, P.B., Henstenburg, J.A., Mazur, A., Reynolds, R., Segal, S., 1993. The effect of dietary fruits and vegetables on urinary galactitol excretion in galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 16, 91–100.

Berry, G.T., Nissim, I., Lin, Z., Mazur, A.T., Gibson, J.B., Segal, S., 1995. Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosaemia. *Lancet Lond. Engl.* 346, 1073–1074.

Berry, G.T., Moate, P.J., Reynolds, R.A., Yager, C.T., Ning, C., Boston, R.C., Segal, S., 2004. The rate of de novo galactose synthesis in patients with galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 81, 22–30.

Bosch, A.M., 2011. Classic galactosemia: dietary dilemmas. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34, 257–260.

Bosch, A.M., 2006. Classical galactosaemia revisited. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 516–525.

Bosch, A.M., Bakker, H.D., van Gennip, A.H., van Kempen, J.V., Wanders, R.J.A., Wijburg, F.A., 2002. Clinical features of galactokinase deficiency: a review of the literature. *J. Inherit. Metab. Dis.* 25, 629–634.



Bosch, A.M., Bakker, H.D., Wenniger-Prick, L.J.M. de B., Wanders, R.J.A., Wijburg, F.A., 2004. High tolerance for oral galactose in classical galactosaemia: dietary implications. *Arch. Dis. Child.* 89, 1034–1036.

Brandt, I., L., 1988. The growth rate of healthy children in the first 16 years: Bonn-Dortmund longitudinal developmental study. *Klin. Pädiatr.* 200, 451–456.

Coss, K.P., Byrne, J.C., Coman, D.J., Adamczyk, B., Abrahams, J.L., Saldova, R., Brown, A.Y., Walsh, O., Hendroff, U., Carolan, C., Rudd, P.M., Treacy, E.P., 2012. IgG N-glycans as potential biomarkers for determining galactose tolerance in Classical Galactosaemia. *Mol. Genet. Metab.* 105, 212–220.

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

Dalquist, 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)

Elsas, L.J., Langley, S., Steele, E., Evinger, J., Fridovich-Keil, J.L., Brown, A., Singh, R., Fernhoff, P., Hjelm, L.N., Dembure, P.P., 1995. Galactosemia: a strategy to identify new biochemical phenotypes and molecular genotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 630–639.

Ficicioglu, C., Hussa, C., Yager, C., Segal, S., 2008. Effect of galactose free formula on galactose-1-phosphate in two infants with classical galactosemia. *Eur. J. Pediatr.* 167, 595–596.

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

Fridovich-Keil, J.L., Langley, S.D., Mazur, L.A., Lennon, J.C., Dembure, P.P., Elsas, J.L., 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.

Gitzelmann, R., 2000. Disorders of Galactose Metabolism, in: Fernandes, J., Saudubray J.-M., Van den Berghe G., Walter J.H. [eds.]: *Inborn Metabolic Diseases*. 4<sup>th</sup> ed. Springer, 102–109, Berlin, Heidelberg

Gitzelmann, R., 1965. Deficiency of erythrocyte galactokinase in a patient with galactose diabetes. *The Lancet* 286, 670-671.

Gitzelmann, R., 1995. Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. *Eur. J. Pediatr.* 154, S45–S49.

Gitzelmann, R., 1976. Screening of newborns for inborn errors of galactose metabolism. Methods and results. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 129, 654–657.

Gitzelmann, R., 1972. Deficiency of uridine diphosphate galactose 4-epimerase in blood cells of an apparently healthy infant. Preliminary communication. *Helv. Paediatr. Acta* 27, 125–130.

Gitzelmann, R., Hansen, R.G., 1980. Galactose metabolism, hereditary defects and their clinical significance, in: Burman, D., Holton, J.B., Pennock, C.A. (Eds.), *Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism: Monograph Based upon Proceedings of the Sixteenth Symposium of The Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*. Springer Netherlands, Dordrecht, 61–101.

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

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

Gross, K.C., Acosta, P.B., 1991. Fruits and vegetables are a source of galactose: implications in planning the diets of patients with galactosaemia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 14, 253–258.

Hanus, O., Zváčková, I., Gencurová, 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.

Hoffmann, B., Dragano, N., Schweitzer-Krantz, S., 2012. Living situation, occupation and health-related quality of life in adult patients with classic galactosemia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 1051–1058.

Holton J.B., Walter J.H., Tyfield L.A., 2001. Galactosemia. in: Scriver C.R. Beaudet A.L., Sly W., Valle D., Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B. [eds]: *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Diseases*, 8<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, 1553-1587, New York

Huttenlocher, P.R., Hillman, R.E., Hsia, Y.E., 1970. Pseudotumor cerebri in galactosemia. *J. Pediatr.* 76, 902–905.

Isselbacher, K.J., Anderson E.P., Kurahashi K., Kalckar H.M., 1956. Congenital galactosemia, a single enzymatic block in galactose metabolism. *Science* 123, 635-636.

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.

International Human Genome Sequencing Consortium, 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945. (NC\_000009.2)

Jakobs, C., Schweitzer, S., Dorland, B., 1995. Galactitol in galactosemia. *Eur. J. Pediatr.* 154, 50-52.

Jumbo-Lucioni, P.P., Garber, K., Kiel, J., Baric, I., Berry, G.T., Bosch, A., Burlina, A., Chiesa, A., Pico, M.L.C., Estrada, S.C., Henderson, H., Leslie, N., Longo, N., Morris, A.A.M., Ramirez-Farias, C., Schweitzer-Krantz, S., Schewitzer-Krantz, S., Silao, C.L.T., Vela-Amieva, M., Waisbren, S., Fridovich-Keil, J.L., 2012. Diversity of approaches to classic galactosemia around the world: a comparison of diagnosis, intervention, and outcomes. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 1037–1049.

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

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

Leloir, L.F., 1951. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 186–190.

Leslie, N.D., Immerman, E.B., Flach, J.E., Florez, M., Fridovich-Keil, J.L., Elsas, L.J., 1992. The human galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *Genomics* 14, 474–480.

Levy, H.L., 1980. Screening for galactosaemia, in: Burman, D., Holton, J.B., Pennock, C.A. [eds.], *Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism: Monograph Based upon Proceedings of the Sixteenth Symposium of The Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*. Springer Netherlands, Dordrecht, 133–139.

Mason H.H., Turner M.E., 1935. Chronic Galaktosemia: report case with studies on carbohydrates. *Am J Dis Child* 50, 359-374.

Mohandas, T., Sparkes, R.S., Sparkes, M.C., Shulkin, J.D., 1977. Assignment of the human gene for galactose-1-phosphate uridylyltransferase to chromosome 9: studies with Chinese hamster-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5628–5631.

National Center for Biotechnology Information. MIM No. 230200, 230350 and 230400. Galactosemia. OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>; Zugriffsdatum: 24.01.2019

National Center for Biotechnology Information. NCB1 NC\_000009.2. International Human Genome Sequencing Consortium. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>; Zugriffsdatum: 24.01.2019

Reichardt, J.K., Belmont, J.W., Levy, H.L., Woo, S.L., 1992. Characterization of two missense mutations in human galactose-1-phosphate uridylyltransferase: different molecular mechanisms for galactosemia. *Genomics* 12, 596–600.

Riehman, K., 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.

- Rubio-Gozalbo, M.E., Gubbels, C.S., Bakker, J.A., Menheere, P.P.C.A., Wodzig, W.K.W.H., Land, J.A., 2010. Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Hum. Reprod. Update* 16, 177–188.
- Schadewaldt, P., Kamalanathan, L., Hammen, H.-W., Wendel, U., 2003. Stable-isotope dilution analysis of galactose metabolites in human erythrocytes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2833-2838.
- Schadewaldt, P., Killius, S., Kamalanathan, L., Hammen, H.W., 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., 2004. Age dependence of endogenous galactose formation in Q188R homozygous galactosemic patients. *Mol. Genet. Metab.* 81, 31–44.
- Schadewaldt, P., Hammen, H.-W., Stolpmann, S., Kamalanathan, L., Wendel, U., 2004. Galactonate determination in urine by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 801, 249–255.
- Schadewaldt, P., Kamalanathan, L., Hammen, H.-W., Kotzka, J., Wendel, U., 2014. Endogenous galactose formation in galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Arch. Physiol. Biochem.* 120, 228–239.
- Schwarz, V., 1960. The value of galactose phosphate determinations in the treatment of galactosaemia. *Arch. Dis. Child.* 35, 428–432.
- Schweitzer, S., 1995. Newborn mass screening for galactosemia. *Eur. J. Pediatr.* 154, S37-39.
- Schweitzer-Krantz, S., 2003. Early diagnosis of inherited metabolic disorders towards improving outcome: the controversial issue of galactosaemia. *Eur. J. Pediatr.* 162, S50–S53.
- Segal S., Berry G.T., 1995. Disorders of galactose metabolism. in: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W., Valle D., [eds.]: *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 7<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, 967-1000, New York
- Shin Y.S., 1991. Reith s. Hover S. Endres W., 1985. Galactose metabolites and disorders of galactose metabolism. in: F.A. Hommes [eds.]: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*, Wiley-Liss, 267-283, New York
- Stollwerck, A., 2009. Charakteristik der renalen Galaktosemetabolit-Exkretion bei Patienten mit klassischer Galaktosämie. Inauguraldissertation Medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

ten Hoedt, A.E., Maurice-Stam, H., Boelen, C.C.A., Rubio-Gozalbo, M.E., van Spronsen, F.J., Wijburg, F.A., Bosch, A.M., Grootenhuis, M.A., 2011. Parenting a child with phenylketonuria or galactosemia: implications for health-related quality of life. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34, 391–398.

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

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

Wahlefeld A.W., 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, J.H., Collins, J.E., Leonard, J.V., 1999. Recommendations for the management of galactosaemia. UK Galactosaemia Steering Group. *Arch. Dis. Child.* 80, 93–96.

Welling, L., Bernstein, L.E., Berry, G.T., Burlina, A.B., Eyskens, F., Gautschi, M., Grünewald, S., Gubbels, C.S., Knerr, I., Labrune, P., van der Lee, J.H., MacDonald, A., Murphy, E., Portnoi, P.A., Öunap, K., Potter, N.L., Rubio-Gozalbo, M.E., Spencer, J.B., Timmers, I., Treacy, E.P., Van Calcar, S.C., Waisbren, S.E., Bosch, A.M., Galactosemia Network (GalNet), 2017. International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up. *J. Inherit. Metab. Dis.* 40, 171–176.

Wöffler, M., 2011. Charakteristik der renalen Galaktitol-Ausscheidung bei Patienten mit klassischer Galaktosämie. Inauguraldissertation Medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Yang, Y.P., Corley, N., Garcia-Heras, J., 2002. Molecular analysis in newborns from Texas affected with galactosemia. *Hum. Mutat.* 19, 82–83.

Zlatunich, C.O., Packman, S., 2005. Galactosaemia: early treatment with an elemental formula. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 163–168.

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. rer. nat. P. Schadewaldt für die Überlassung des Themas und die fortwährende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation. Durch intensive Diskussion und den kritischen Disput wurde die Realisierung erst möglich.

Besonderer Dank und Wertschätzung gilt den Patienten und ihren Eltern für ihre Teilnahme an der Studie und den damit verbundenen Mühen.

Der Galaktosämie Initiative Deutschland e.V. danke ich für die Unterstützung der Studie.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Dr. rer. nat. L. Kamalanathan und Herrn Dipl.-Biol. H.-W. Hammen für die stetige und geduldige Unterstützung im Labor. Herrn Dr. Kamalanathan danke ich insbesondere für die Hilfe bei den Mutationsanalysen.

Frau M. Grotzke-Leweling danke ich für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Auswertung der Ernährungsprotokolle.

Ich danke vor allen Dingen auch meiner Schwester Liesel Heiermann, die mir bei der statistischen Auswertung mit Rat und Tat zu Seite stand.

Außerordentlicher Dank gilt meiner Schwiegermutter Else Thomas und meinem Mann Kai, die es stets verstanden, mich zu motivieren.