

Galaktokinase-Defekt bei einem Neugeborenen

F. LINNEWEH, E. SCHAUMLÖFFEL und M. VETRELLA

Kinderklinik und Institut für Strahlenbiologie und medizinische Isotopenanwendung
der Universität Marburg a. d. Lahn

Ein blockierter Metabolismus der Galaktose ist seit langem bei der sog. Galaktosämie bekannt, die auf einem Mangel an Gal-1-Phosphat-Uridyltransferase beruht und eine Anhäufung von Gal-1-Phosphat und Galaktitol zur Folge hat. Wenn der Milchzucker als Galaktosequelle nicht frühzeitig aus der Nahrung eliminiert wird, führt dies zu einem Intoxikationssyndrom, bei dem Hirnschaden, Hepatomegalie, Icterus und Katarakte das Krankheitsbild beherrschen. Neuerdings wird deshalb die Frühdiagnose im Nabelschnurblut gefordert, damit eine galaktosefreie Diät jeder beginnenden Schädigung vorbeugen kann.

Beutler u. Mitarb. haben 1966 die Duarte-Variante dieses Enzymdefektes beschrieben, die nur über die Hälfte der Aktivität verfügt und wohl eine Hypergalaktosämie hervorruft, aber keine klinisch manifesten Symptome zur Folge hat. Weiterhin haben Gitzelmann u. Mitarb. bei zwei erwachsenen Geschwistern, die als Kinder infolge Katarakten blind geworden waren, einen Galaktokinase-mangel gefunden. Die beiden genannten Enzymdefekte sind in Abb. 1 dargestellt.

Thalhammer u. Mitarb. gelang es 1968, bei einem Screening-Test die gleiche Anomalie schon bei einem Neugeborenen mit Hypergalaktosämie aufzudecken. In der Familienanamnese fehlen Hinweise auf Katarakte, Mentaldefekt oder Leberaffektionen. Während der ersten drei Wochen blieb das Neugeborene ohne diätetische Behandlung und zeigte keinerlei Intoxikationszeichen, vor allem keine Katarakte. Die Autoren vermuten, daß Linsentrübungen bei Galaktokinase-mangel später auftreten als bei Uridyltransferase-mangel.

Im folgenden wird über ein Neugeborenes berichtet, dessen Befunde die Klinik und Biochemie dieses Enzymdefektes weiter vervollständigen.

Klinische Befunde

Aus der Familienanamnese ist bekannt, daß es sich um eine dunkelhäutige Schausteller-Familie (Zigeuner?) handelt. Der Vater ist 22 Jahre, die Mutter 21 Jahre alt; sie sind blutsverwandt, indem die Mutter des Vaters und der Großvater der Mutter Geschwister sind. Der Patient ist das dritte Kind der Familie, die 2 $\frac{1}{2}$ Jahre und 15 Monate alten Brüder sind klinisch gesund. Der Großvater und eine seiner Tanten sind in früher Kindheit erblindet, waren aber zu einer klinischen und biochemischen Untersuchung nicht bereit. Die Eltern des Patienten weisen keinerlei Sehstörung auf und sind frei von Katarakten¹.

Weibliches Neugeborenes mit einem Geburtsgewicht von 2340 g. Die Klinikseinweisung erfolgte wegen perinataler Asphyxie. Während der klinischen Beobachtung wiederholte sich diese nicht, doch wurde am 7. Lebenstage eine positive Harnzuckerprobe festgestellt. Bei der Dünnschichtchromatographie erwies sich der Zucker als Galaktose. Im Blut lag der Hagedorn-Jensen-Wert stets beträchtlich höher als die enzymatische Glucosebestimmung. Diese Differenz erhöhte

sich nach den Milchmahlzeiten. So betrug z.B. der enzymatische Blutzuckerwert 90 mg %, der nach Hagedorn-Jensen ermittelte dagegen 166 mg %. Nach den Mahlzeiten stiegen die Werte auf 93 bzw. 204 mg %. Die Ernährung bestand zu diesem Zeitpunkt aus 200 ml Muttermilch und 160 ml Humana 1. Der Serumbilirubinspiegel betrug am 32. Lebenstage 0,16 mg %, die SGPT 15,2 mU/ml, die SGOT = 18,0 mU/ml. Der Urin zeigte keine Hyperaminoacidurie.

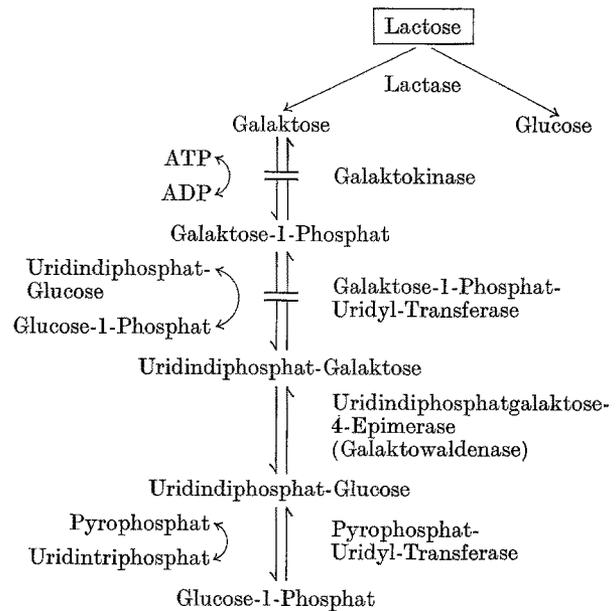


Abb. 1. Schema des Galaktose-Metabolismus mit den dabei bekannten hereditären Enzymdefekten

Die diätetische, galaktosefreie Therapie wurde am 32. Lebenstage mit Nutramigen begonnen und 3 Wochen später auf MBF Gerber umgestellt. Der Säugling zeigte im Alter von 4 $\frac{1}{2}$ Monaten ein Gewicht von 4300 g. Die charakteristische Differenz zwischen enzymatischer Blutzuckerbestimmung und dem Reduktionswert war wenige Tage nach Diätbeginn verschwunden.

Am Tage vor Beginn der galaktosefreien Diät konnten erstmalig Trübungen im Linsenzentrum mit reiterartigen Verdichtungen in der Randzone der Trübungen beobachtet werden, die weit über die gelegentlich vorkommenden Trübungen bei gesunden Neugeborenen hinausgingen; die peripheren, äquatorialen Linsenanteile waren frei. Die Katarakte dehnten sich in den ersten Tagen nach Diätbeginn noch weiter aus, waren aber eine Woche später rückläufig und 6 Wochen später kaum noch erkennbar.

Biochemische Untersuchungen

Mit Hilfe von Galaktose-1-C¹⁴ untersuchten wir die Aktivität der Galaktokinase durch Inkubation von Erythrocyten-Hämolysat und papierchromatographische Auftrennung in phosphorylierte Galaktosederivate und nicht metabolisierte Galaktose (Ng, Donnell

¹ Doz. Dr. Reim, Universitäts-Augenklinik Marburg.

und Bergren). Diese Autoren konnten nachweisen, daß dabei vorwiegend Galaktose-1-Phosphat und nur etwa 10% Uridyl-Diphosphat-Galaktose (UDP-Gal) gebildet werden. Da unter diesen Versuchsbedingungen die UDP-Gal-4-Epimerase infolge Zerstörung von NAD inaktiviert wird, können UDP-Glucose und $^{14}\text{CO}_2$ auf diesem Wege nicht gebildet werden.

Methodik

1. *Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität.* 5 ml frisch abgenommenes, heparinisieretes Blut wurden in der Kälte zentrifugiert, Plasma und die Anreicherungszone der weißen Blutzellen abpipettiert. Die Erythrocyten wurden dreimal mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, wobei das Waschvolumen dem des Erythrocyten-Rückstandes entsprach.

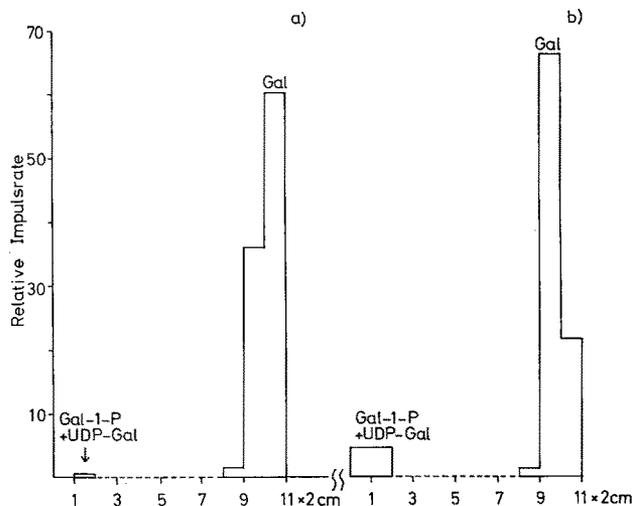


Abb. 2a u. b. Radiopapierchromatogramm: Phosphorylierte Galaktose (Gal-1-P + UDP Gal) und nicht umgesetzte Galaktose bei a) Kind mit Galaktokinase-Defekt, b) gesundem Kontrollkind. Relative Impulsraten (Summe der Gesamtaktivität der 2 cm breiten Streifen = 100)

Anschließend wurden die gewaschenen Erythrocyten dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Durch Zugabe von dest. Wasser in der Menge des Erythrocytenvolumens wurde ein 50%iges Hämolysat hergestellt.

Die Inkubation wurde in Plastikröhrchen mit einer Lösung durchgeführt, die in 1,0 ml Gesamtvolumen enthielt:

- 0,56 μmol Galaktose-1- C^{14} (spezifische Aktivität 5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$),
- 4,0 μmol ATP,
- 0,08 μmol MgSO_4 ,
- 150 μmol Trispuffer PH 7,0,
- 0,4 ml 50%iges Erythrocyten-Hämolysat.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden die Plastikgefäße zur Deproteinisierung und Enzyminaktivierung der Inkubationslösung für 4 min in kochendes Wasser gebracht und anschließend im Eisbad gekühlt. Die erforderlichen Kontrollen wurden durch Denaturierung der Proteine vor der Inkubation und Zugabe von Galaktose-1- C^{14} hergestellt.

Die gekühlten Gefäße wurden durch mehrfaches Umschwenken gut durchmischt und bei $+1^\circ\text{C}$ zentrifugiert (ca. 12000 g). Zur Chromatographie wurde 0,1 ml des klaren Überstandes in einer Breite von 3,5 cm auf DEAE-Cellulosepapier (Whatman DE 20) aufgetragen. Die auf eine Länge von 30 cm geschnittenen Streifen wurden im geschlossenen Tank absteigend mit destilliertem Wasser als Laufmittel chromatographiert. Bei einer Laufmittelfront von ca. 20 cm, die nach ca. $1\frac{1}{2}$ Std erreicht waren, wurde die Chromatographie abgebrochen. Die luftgetrockneten Chromatogramme wurden 1 cm vor der Auftragsstelle beginnend in 2 cm breite Streifen geschnitten, in Meßgläschen mit 15 ml Szintillationslösung (4 g Omnifluor/1 Toluol) getaucht und im Flüssigkeits-Szintillationspektrometer (Packard Tri Carb Modell 4322) zur Aktivitätsbestimmung verwendet.

Von jedem Versuchsansatz wurden drei Parallelen und ein Kontrollwert deproteinisierter Lösung inkubiert und chromatographiert. Neben den Versuchs- und Kontrollchromatogrammen lief jeweils ein Chromatogramm mit nicht inkubierter Galaktose-1- C^{14} -Standardlösung zur Kontrolle auf Verunreinigung mit.

In unseren Untersuchungen zeigten sich in allen Chromatogrammen nur zwei Gipfel. Eine Trennung in phosphorylierte Produkte, die an oder in der Nähe der Auftragsstelle lagen, und in die mit der Laufmittelfront gewanderte, unveränderte Galaktose war jedoch einwandfrei möglich (Abb. 2).

Die Galaktokinase-Aktivität wurde aus der Fraktion der phosphorylierten Galaktose nach Abzug der entsprechenden Kontrollwert errechnet und in μmol phosphorylierte Galaktose/ml Erythrocyten-Konzentrat/Std ausgedrückt. Ng u. Mitarb. konnten nachweisen, daß bei Normalpersonen innerhalb 90 min die Konzentration der phosphorylierten Galaktose proportional der Zeit ansteigt.

2. *Bestimmung der Oxydationsrate von Galaktose-1- C^{14} zu $^{14}\text{CO}_2$.* 1 ml frisch abgenommenes heparinisieretes Blut wurde nach Weinberg in Warburg-Gefäßen mit zentralen Mikrokammern unter Zusatz von 1 ml Ringer-Bicarbonat-Lösung von pH 7,4, die 1 mg Glucose/ml und 0,5 μCi Galaktose-1- C^{14} /ml (spezifische Aktivität 5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) enthielt, über 90 min bei 37°C inkubiert. In die zentralen Mikrokammern der Warburg-Gefäße waren 0,5 ml Hyamin eingefüllt worden. Vor Beginn der Inkubation wurden die Gefäße kurze Zeit mit Sauerstoff begast. Nach 90 min wurde durch Zugabe von 0,2 ml 5 n H_2SO_4 die Inkubation beendet. Die Hyaminbase wurde in entsprechende Meßgläschen abpipettiert, die zentralen Mikrokammern mehrmals mit Szintillationslösung ausgespült und die Meßgläschen auf 15 ml mit Szintillationslösung (4 g Omnifluor/1 Toluol) aufgefüllt.

Die im Spektrometer gemessenen Impulsraten wurden mit Hilfe externer Standardisierung (^{223}Ra) auf maximale Impulsausbeute und auf 1×10^7 weiße Blutzellen pro Ansatz korrigiert. Von jeder Blutprobe wurden 3 Parallelen gleichzeitig angesetzt und von den Ergebnissen die in entsprechenden Blindversuchen ohne Blutzusatz ermittelten Impulsraten für CO_2 subtrahiert.

Ergebnisse der radiochemischen Untersuchungen

Dem Säugling wurde zweimal in Abständen von 10 Tagen Blut entnommen und die Galaktokinase-Aktivität nach der beschriebenen Methodik bestimmt. Zu den gleichen Zeiten aber wurden parallele Untersuchungen an Erythrocyten-Hämolysat eines gesunden Säuglings der gleichen Altersstufe durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1. Radiopapierchromatographische Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität. Umsatz von D-Galaktose zu phosphorylierten Produkten (Gal-1-P + UDP-Gal). Einsatz von 2,8 μMol D-Galaktose/ml Erythrocyten; Inkubationszeit 30 min

Name	Alter	Phosphorylierung von Galaktose ($\mu\text{Mol}/\text{ml}$ Erythrocyten)	
		Einzelwerte	Mittelwert
W., N.-M. (Galaktokinasedefekt)	3 Mon.	0,036 0,004	0,02
G. S. (Kontrolle)	6 Mon.	0,430 0,650	0,54

Bei dem gesunden Kind liegt mit einem Umsatz von durchschnittlich 0,54 μmol Galaktose zu phosphorylierten Produkten/ml Erythrocyten und Stunde eine normale Galaktokinase-Aktivität vor. Dieser Wert entspricht der von Ng u. Mitarb. ermittelten Galaktokinase-Aktivität von Kindern dieser Altersgruppe. Bei dem kranken Kind dagegen liegt die Galaktokinase-Aktivität gegenüber dem Normalwert auf etwa 4%

erniedrigt. 1 ml Erythrocyten des kranken Kindes setzen in 1 Std von den angebotenen 2,8 μmol Galaktose weniger als 1% in Galaktose-1-Phosphat bzw. Uridyl-diphosphatgalaktose um, während bei dem gesunden Kontrollkind die Umsatzrate bei etwa 20% lag (Abb. 2).

Die Ergebnisse allein der chromatographischen Untersuchungen zeigen, daß es sich hier nicht um einen Fall des üblichen Transferase-, sondern eines Galaktokinase-Defektes handelt. Läge ein Defekt der Gal-1-P-UDP-Transferase vor, so wäre es bei dem kranken Kinde zu einer Anreicherung von Gal-1-P gekommen, was in der chromatographischen Analyse zu einer entsprechend hohen Aktivität im Gipfel der phosphorylierten Produkte nahe der Auftragsstelle geführt hätte.

Eine auch bei dem erkrankten Kind und dem Kontrollkind durchgeführte Untersuchung über den Umsatz von Galaktose zu CO_2 , deren Ergebnisse in Tabelle 2 wiedergegeben sind, bestätigen auf Grund des nur äußerst geringen Umsatzes der weißen Blutzellen des erkrankten Kindes das Vorliegen des Stoffwechselblockes.

Tabelle 2. Umsatz von 0,56 μMol Galaktose- ^{14}C (spezifische Aktivität 5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ zu $^{14}\text{CO}_2$ pro 1×10^7 weiße Blutzellen). 90 min Inkubation von 1 ml Vollblut

Name	Alter	Umsatz zu $^{14}\text{CO}_2$ (Imp/min)
W., N.-M. (Galaktokinasedefekt)	3 Mon.	112
G. S. (Kontrolle)	6 Mon.	8900

Die angewandte Methodik der Bebrütung von Erythrocyten-Hämolyolat und die chromatographische Trennung ergeben einen sicheren Aufschluß über die Galaktokinase-Aktivität, da, wie bereits erwähnt, durch die Inaktivierung der Epimerase weder Glucose noch CO_2 in nachweisbarer Menge gebildet werden können. Es darf daher als sicher angenommen werden, daß der Enzymdefekt des kranken Kindes in einem Mangel an Galaktokinase-Aktivität begründet ist.

Die radiochemischen Befunde konnten durch enzymologische Befunde bestätigt werden, über die an anderer Stelle berichtet wird.

Diskussion

Bei dem beschriebenen Falle handelt es sich um den zweiten Fall eines Kindes mit Galaktokinase-mangel. Mit einer einfachen radiochromatographischen Methode nach Ng, Donnell und Bergren wurde bewiesen, daß im Erythrocyten-Hämolyolat weniger als 1% der eingesetzten Galaktose- ^{14}C umgesetzt wurde, während bei dem Kontrollkind unter den gleichen Versuchsbedingungen etwa 20% phosphoryliert wurden. Zur Sicherung dieses Befundes wurde die Oxidation der Galaktose- ^{14}C zu $^{14}\text{CO}_2$ nach Weinberg bestimmt, bei der sich ebenfalls ergab, daß die Reaktion bei dem kranken Kinde zu kaum meßbaren Werten führte. Weiterhin

zeigte die Bestimmung der Gal-1-P-Uridyltransferase eine normale Aktivität und der Gal-1-P einen dem Normalen entsprechenden Nullwert, die zusammen die Bestätigung brachten, daß der Stoffwechselblock schon bei der Phosphorylierung der Galaktose liegt. Die radiochromatographische Ermittlung der Phosphorylierung hat jedoch schon eine eindeutige Klärung der Lokalisation des Enzymdefektes gebracht. So wird es möglich sein, auf dem einfachen radiochromatographischen Wege weitere Fälle dieses heute noch sehr seltenen Defektes zu finden.

Zusammenfassung. Bei einem Neugeborenen wurde am 7. Lebenstage eine Galaktosurie und Hypergalaktosämie gefunden, die durch Mangel an Galaktokinase bedingt ist. Radiochromatographisch konnte an Erythrocyten-Hydrolyolat gezeigt werden, daß die Bildung von phosphorylierten Galaktosederivaten aus Galaktose- ^{14}C auf etwa 4% und die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ ebenfalls stark herabgesetzt war. Die Galaktose-1-P-Uridyltransferase erwies sich im optischen Test als normal aktiv.

Vor Beginn einer milchfreien Diät im Alter von 5 Wochen entstanden Katarakte, die sich später zurückbildeten. Die Heredität dieser Erkrankung ist anzunehmen, da die Eltern blutsverwandt und zwei Sippenangehörige als Kinder erblindet sind. Auffällig ist die Häufung dieses Enzymdefektes bei Zigeunern.

Summary. A newborn with hypergalactosaemia and galactosuria due to galactokinase deficiency was detected by inability of blood cells haemolysates to form phosphorylated derivatives from galactose- ^{14}C and to oxidize this substance to $^{14}\text{CO}_2$. The activity of galactose-1-phosphate-uridylyltransferase was in normal range. There was a family history of cataracts and the patient showed also opacities in consequence of a 5 week exposure to milk. There were no other symptoms f. e. jaundice, hyperaminoaciduria or vomiting, and no weight-loss. Mellituria disappeared upon elimination of all milk from the diet. The parents were related and apparently gypsies.

Literatur

- Gitzelmann, R.: Hereditary galactokinase deficiency, a newly recognized cause of juvenile cataracts. *Pediat. Res.* 1, 14 (1967).
- Thalhammer, O., R. Gitzelmann, and M. Pantlitschko: Hypergalactosemia and galactosuria due to galactokinase deficiency in a newborn. *Pediat. (St. Louis)* 42, 441 (1968).
- Weinberg, A. N.: Detection of congenital galactosemia and the carrier state using galactose C^{14} and blood cells. *Metabolism* 10, 728 (1961).
- Won G. Ng, G. N. Donnell, and W. R. Bergen: Galactokinase activity in human erythrocytes of individuals at different ages. *J. Lab. clin. Med.* 66, 115 (1965).

Prof. Dr. F. Linneweh
Univ.-Kinderklinik
3550 Marburg a. d. Lahn
Deutschhausstr. 12