

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
12. Jg. 1974, S. 59–61

## Bestimmung der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase-Aktivität im Erythrocytenhämolysat von Patienten mit Down-Syndrom<sup>1)</sup>

Von J. Nothjunge, Ingrid Most, Ingrid Hass und F. Menne

Aus der Abteilung für Stoffwechselforschung (Vorstand: Prof. Dr. F. Menne) des Physiologisch-Chemischen Institutes der Universität Münster

(Eingegangen am 7. September/6. Dezember 1973)

Bei 28 Patienten mit Down-Syndrom (19 männlichen und 9 weiblichen Geschlechtes) wurde die Aktivität der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase (E.C. 2.7.7.12) im Erythrocytenhämolysat gemessen. Sie betrug 500 bis 883 mU/g Hb mit einem arithmetischen Mittelwert von  $\bar{x} = 690$  bei einer Standardabweichung von  $s = \pm 103,50$  mU/g Hb. Alters- und geschlechtsentsprechende Gesunde hatten im Erythrocytenhämolysat eine Enzymaktivität von 133 bis 483 mU/g Hb ( $\bar{x} = 291$ ,  $s = \pm 103,33$  mU/g Hb). Damit lag die Aktivität dieses Enzymes bei Mongoloiden durchschnittlich um das 2,7-fache (Bereich: 1,0 bis 4,5,  $s = \pm 1,05$ ) höher als bei Gesunden.

### Determination of the Galactose-1-phosphate-Uridyltransferase activity in the erythrocyte haemolysate of mongoloids

The activity of Galactose-1-phosphate-Uridyltransferase was measured in the erythrocyte haemolysate of 28 patients with Down's syndrome (19 males, 9 females). It was found to be between 500 and 883 mU/g Hb with the mathematical mean of  $\bar{x} = 690$ , and a standard deviation of  $\pm 103.50$  mU/g Hb. A control group of an equivalent number of healthy males and females with the same age range showed an enzyme activity of 133 to 483 mU/g Hb ( $\bar{x} = 291$ ,  $s = \pm 103.33$  mU/g Hb). Thus, the enzyme activity of the mongoloids was on average 2.7 times (range: 1.0 to 4.5,  $s = \pm 1.05$  higher than the control group.

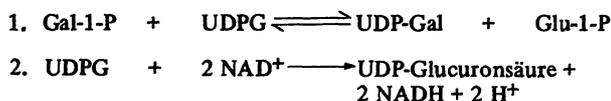
Über Enzymaktivitätssteigerung in den Leukocyten und Erythrocyten von Patienten mit Morbus Down liegen mehrere Berichte vor. Eine Übersicht geben Hsia et al (1) und Lenz (2). Bezüglich der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase (E. C. 2.7.7.12) sind diese Befunde jedoch nicht einheitlich. Brandt et al (3, 4), Hsia et al (5) und Rosner et al (6) fanden überhöhte Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferaseaktivitäten im Vollblut, sowie Hsia et al (5), Mellman et al (7) und Rosner et al (6) in den Leukocyten. Während Ng et al (8) und Hsia et al (5) keine oder nur unwesentlich erhöhte Aktivitäten der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase in den Erythrocyten finden konnten, berichteten Rosner et al (6) und Schuppisser et al (9) über Steigerungen der Aktivität dieses Enzymes in den roten Blutzellen.

Wegen dieser Diskrepanz haben wir nochmals die Aktivität der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase im Erythrocytenhämolysat von 30 Mongoloiden untersucht, zumal uns seit 1971 eine neue Bestimmungsmethode (10) zur Verfügung steht.

### Methodik

#### Prinzip

Als Maß für die Aktivität des Enzyms Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase wird die in der Zeiteinheit verbrauchte Menge UDPG verwendet. Nach Abstoppen der Meßreaktion bestimmt man die verbleibende UDPG-Menge mit Hilfe von UDPG-Dehydrogenase (E. C. 1.1.1.22) und  $NAD^+$  im optischen Test:



Die methodischen Einzelheiten werden nach den von Haschemian (10) gegebenen Richtlinien durchgeführt.

#### Reagenzien

1. Glycin-Puffer, 1 mol/l, pH 8,7
2. Glycin-Puffer, 0,2 mol/l, pH 8,9
3. UDPG-Lösung, 10,5 mmol/l
4. UDPG-Glycinmischung: 1 Teil UDPG-Lösung, 4 Teile Glycin-Puffer, 1 mol/l
5. Gal-1-P-Lösung, 8 mmol/l
6. NAD-Lösung, 13,6 mmol/l
7. UDPG-Dehydrogenase (Suspension in Ammoniumsulfat-Lösung, 3,2 mol/l, Aktivität 3 U/ml)

Die Lösungen 3. bis 6. werden mit Präparaten der Firma Boehringer, Mannheim, angesetzt, die Enzymsuspension bezogen wir ebenfalls von der Firma Boehringer.

#### Hämolysat

Zentrifugation von heparinisierem Vollblut (20 E Heparin/ml) bei 2000 g 15 min lang in der Kälte, absaugen des überstehenden Plasmas und der Leukocyten-schicht (weitgehende Vollständigkeit wird dadurch erreicht, daß auch noch die obere Erythrocyten-schicht mit erfaßt wird). Zweimaliges Waschen der Erythrocyten in 9 g/l NaCl-Lösung (1 Vol. Erythrocytenkonzentrat in 2 Vol. NaCl-Lösung); Zentrifugation bei 2000 g 15 min lang;

<sup>1)</sup> Durchgeführt mit freundlicher Unterstützung des Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen – Landesamt für Forschung.

mischen des gewaschenen Erythrocytenkonzentrates mit dest. Wasser (1 Vol. Erythrocytenkonzentrat mit 2 Vol. dest. Wasser); zweimaliges Einfrieren dieses Hämolsates im Methanolbad bei  $-28^{\circ}\text{C}$  mit anschließendem Auftauen; zerstören von NAD durch 10 min Vorinkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  zur Inaktivierung der UDPG-Epimerase (E.C. 5.1.3.2). Die Hämoglobinbestimmung im Hämolsat erfolgte nach *Kampen* und *Zijlstra* (13).

#### Meßreaktion

Folgende Mengen werden im Eisbad in Zentrifugenröhrchen pipettiert:

	Reaktionsansatz	Leerwert
UDPG-Glycin	0,2 ml	0,2 ml
Gal-1-P	0,1 ml	—
dest. Wasser	—	0,1 ml
Hämolsat	0,2 ml	0,2 ml

Anschließend inkubiert man 15 min im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Nach Abstoppen der Reaktion durch Einstellen der Röhrchen ins Eisbad (5 min) wird in jedes Röhrchen 1 ml 9 g/l eiskalte NaCl-Lösung pipettiert.

Enteweißen der Ansätze: Die mit Parafilm verschlossenen Röhrchen werden 2 min lang in ein siedendes Wasserbad gestellt und dabei intermittierend geschüttelt. Danach Zentrifugation bei  $2000\text{ g}$  15 min lang und anschließende Filtration des enteweißten Überstandes.

#### Indikatorreaktion

In Küvetten mit kritischem Volumen von weniger als 1 ml ( $d = 1\text{ cm}$ ) werden folgende Substanzen pipettiert:

	Reaktionsansatz	Leerwert
Glycin-Puffer, 0,2 mol/l	0,7 ml	0,7 ml
NAD	0,1 ml	0,1 ml
Filtrat	0,2 ml	0,2 ml

Nach Mischen Ablesen der Extinktion ( $E_1$ ) bei 340 nm. Anschließend wird jeder Probe 0,02 ml UDPG-Dehydrogenase-Suspension zugefügt und nach Stillstand der Reaktion (nach etwa 15 min)  $E_2$  abgelesen.

#### Berechnung

$$\frac{\Delta E \cdot K}{\text{Hb (g/ml)} \cdot 60} = \mu\text{mol UDPG-Verbrauch/min} \cdot \text{gHb}$$

$K = 12,3$ ;  $K$  setzt sich zusammen aus: Testvolumen (1,02), Verdünnungsfaktor (7,5) des Hämolsates, Extinktionskoeffizient von NADH ( $6,22\text{ cm}^2/\mu\text{mol}$  bei 340 nm), Schichtdicke (1 cm), Probevolumen (0,2 ml), Inkubationszeit (1/4 Stunde), sowie Faktor 2, da pro Mol UDPG 2 mol NADH gebildet werden: Eine Einheit des Enzyms ist dann die Menge, die den Umsatz von  $1\text{ }\mu\text{mol}$  UDPG/min verursacht.

#### Patienten

Es werden 20 männliche Patienten mit Down-Syndrom (im Alter zwischen 2 und 31 Jahren) und 10 weibliche (im Alter zwischen 8 und 37 Jahren), sowie 30 alters- und geschlechtsentsprechende Gesunde untersucht. Alle Patienten mit M. Down sind in Heimen für geistig Behinderte oder Sonderschulen als Mongoloide erfaßt.

#### Ergebnisse

Von den untersuchten 30 Paaren wurden aus folgenden Gründen bei der statistischen Auswertung zwei Paare ausgesondert:

1. Bei einer 16-jährigen, weiblichen Patientin mit M. Down ergab die Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferasebestimmung eine Aktivität von  $333\text{ mU/g Hb}$ , ein Wert, welcher innerhalb des Normbereiches für Gesunde lag. Da es sich in diesem Fall möglicherweise um einen Translokationsmongolismus, bei dem bisher keine erhöhten Enzymaktivitäten gefunden wurden (1) handelte, wurde der hier gefundene Wert nicht berücksichtigt.
2. Eine Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferaseaktivität von  $1116\text{ mU/g Hb}$  von einem männlichen Mongoloide erwies sich bei der statistischen Beurteilung nach *Nalimov* signifikant als Ausreißer:  $r^* = 2,99$  (mehr als  $t_{99}$ ).

Das so bereinigte Material ergab für 28 (19 männliche und 9 weibliche) Mongoloide eine Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferaseaktivität von durchschnittlich  $690 \pm 103,33\text{ mU/g Hb}$  (Extremwerte:  $500\text{--}883\text{ mU/g Hb}$ ), und für 28 Gesunde einen arithmetischen Mittelwert von  $291 \pm 103,50\text{ mU/g Hb}$  (Extremwerte:  $133\text{--}483\text{ mU/g Hb}$ ). An Hand der gefundenen Ergebnisse zeigte sich in den Erythrocyten der Patienten mit M. Down eine Aktivitätssteigerung des untersuchten Enzymes um das durchschnittlich 2,7-fache gegenüber den Vergleichswerten bei einer Standardabweichung von  $\pm 1,05$ .

Zur Beurteilung der Mittelwertdifferenzen zwischen den zusammengehörenden Datenpaaren von Patienten mit Down-Syndrom und den Gesunden errechneten wir mit Hilfe des Differenzen-t-Testes einen hochsignifikanten Unterschied:  $t = 12,3$  (größer als  $t_{99,9}$ ). Einen graphischen Überblick über die Ergebnisse zeigt die Abbildung 1.

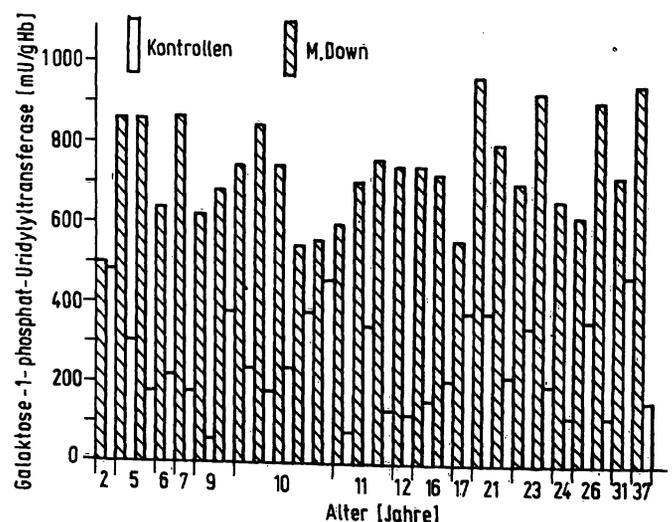


Abb. 1. Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferaseaktivität bei 28 Patienten mit Down-Syndrom im Vergleich zu alters- und geschlechtsentsprechenden Kontrollen, auf der Abszisse von links nach rechts mit steigendem Alter angeordnet.

## Diskussion

Der von Hsia et al (5) vorgebrachte und nachgewiesene Einwand, daß die Aktivitätssteigerung der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase im Vollblut ausschließlich auf intrazelluläre Leukocytenenzymaktivitätssteigerung zurückzuführen ist und die Erythrocyten nicht betrifft, konnte aus methodischen Gründen durch unsere Befunde nicht bestätigt werden, da wir zur Untersuchung nur Erythrocytenhämolysat einsetzten.

Bei der Interpretation unserer Ergebnisse wurde der Differenzen-t-Test zur Beurteilung der Mittelwerte der beiden zusammengehörenden Datenpaare benutzt: Er ergab mit  $t = 12,3$  (mehr als  $t_{99,9}$ ) einen hochsignifikanten Unterschied der Meßwerte. Im Durchschnitt betrug

die Enzymaktivität bei Patienten mit Down-Syndrom das 2,7-fache der Aktivität der Kontrollgruppe. Dieser Befund spricht gegen die bisher mehrfach diskutierte „Ein Gen/Ein Enzym“-Hypothese (6, 9), da hiernach nur ein Verhältnis von 1,5 : 1 erwartet werden darf. Erklärt werden könnte dagegen der von uns gefundene 1,7-fache Enzymaktivitätsanstieg gegenüber der Norm mit dem bei Mongoloiden offensichtlich vorhandenen niedrigeren mittleren Alter der peripheren Blutzellen (11,12).

Nicht unerwähnt bleiben soll die Tatsache, daß der von uns gefundene Mittelwert bei Gesunden von 291 mU/g Hb um 93 mU/g Hb niedriger lag als bei der Originalbeschreibung (10).

Dies könnte verursacht sein durch heterozygote Merkmalsträger für Galaktosämie in unserer Vergleichsgruppe.

## Literatur

1. Hsia, D. Y. Y., Justice, P., Smith, G. F. & Dowben, R. M. (1971), Amer. J. Dis. Child. 121, 153–161.
2. Lenz, W. (1967), in Humangenetik, (Becker, P. E. Hrsg.) 345–346, G. Thieme-Verlag, Stuttgart, 8. Auflage.
3. Brandt, N. J. (1962), Lancet II, 837
4. Brandt, N. J., Frøland, A., Mikkelsen, M., Nielsen, A. & Tolstrup, N. (1963), Lancet II, 700–703
5. Hsia, D. Y. Y., Inouye, T., Wong, P. & South, A. (1964), N. Engl. J. Med. 270, 1085–1088.
6. Rosner, F., Ong, B. H., Paine, R. S. & Mahanand, D. (1965), N. Engl. J. Med. 273, 1356–1361
7. Meliman, W. J., Oski, F. A., Tedesco, T. A., Maciera-Coelho, A. & Harris, H. (1964), Lancet II, 674–675
8. Ng, W. G., Bergren, W. R. & Donnell, G. N. (1964), Clin. Chim. Acta 10, 337–343.
9. Schuppisser, R., Joss, E. & Richterich, R. (1967), Schweiz. Med. Wochenschr. 97, 1540–1542.
10. Haschemian, G. (1971), Inaug.-Dissertation, Münster.
11. Hook, E. B. & Engel, R. R. (1964), Lancet I, 112.
12. Naiman, J. L., Oski, F. A. & Mellman, W. J. (1965), Lancet I, 821
13. Kampen, E. J. van, & Zijlstra, W. G. (1961) Clin. Chim. Acta 6, 538–544.

Prof. Dr. F. Menne  
Physiol. Chem. Inst.  
44 Münster  
Waldeyerstr. 15