

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Schuff-Werner

Molekulargenetische und klinische Untersuchungen zur Laktoseintoleranz (Hypolaktasie)

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Johannes Futh

geboren am 20. Februar 1981 in Potsdam

Rostock 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0009-9

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Liebe
(Klinik für Innere Medizin / Abteilung für
Gastroenterologie / Universität Rostock)

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hartmut Hans-Jürgen Schmidt
(Experimentelle Transplantationshepatologie
/ Westfälische Wilhelmsuniversität Münster)

3. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Steiner
(Institut für Klinische Chemie und
Laboratoriumsmedizin / Universität Rostock)

Dissertationsort: Rostock

Tag der öffentlichen Verteidigung: 27.05.2009

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Historische Synopsis.....	1
1.2 Klassifikation des Laktasemangels.....	2
1.3 Physiologie und Pathophysiologie der Laktosemalabsorption.....	3
1.4 Klinik der Laktosemalabsorption.....	6
1.5 Diagnostik der Laktosemalabsorption.....	8
1.6 Therapie der Laktosemalabsorption.....	9
1.7 Primärer adulter Laktasemangel.....	11
1.7.1 Epidemiologie.....	13
1.7.2 Molekulare Genetik.....	14
2. Zielsetzung	17
3. Material und Methoden	18
3.1 Probanden und Patienten.....	18
3.2 DNA-Isolierung.....	18
3.3 Genotypisierung.....	19
3.3.1 PCR-RFLP.....	19
3.3.2 Real-time-PCR (LightCycler).....	23
3.4 Laktose-H ₂ -Atemtest.....	27
4. Ergebnisse	33
4.1 Epidemiologische Studie.....	33
4.1.1 Probanden	33

4.1.2	Genotypisierung des LCT-13910-Polymorphismus in einer Rostocker Blutspenderkohorte.....	33
4.1.3	Genotypisierung des LCT-13910-Polymorphismus in einer südkoreanischen Kohorte	34
4.1.4	Genotypisierung des LCT-13910-Polymorphismus mittels Real-time-PCR (LightCycler).....	34
4.2	Klinische Studie	34
4.2.1	Patienten.....	34
4.2.2	Prävalenz der H2-Non-Producer.....	36
4.2.3	H2-Producer: H2-Atemtestbefunde und Genotypisierung	36
4.2.4	H2-Non-Producer: Klinischer Befund und Genotypisierung.....	38
5.	Diskussion	40
5.1	Epidemiologische Studie.....	40
5.2	Klinische Studie.....	47
6.	Zusammenfassung	59
7.	Literaturverzeichnis.....	61
	Thesen	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Lebenslauf	
	Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

1.1	Physiologie der Laktoseabsorption.	5
1.2	Pathophysiologie der Laktosemalabsorption.	6
3.3	Nachweis der drei Genotypen des LCT-13910-Polymorphismus	23
3.4	Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET)	26
3.5	Darstellung der allelspezifischen Schmelzkurvenverläufe des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910.....	27
3.6	Schema der Befunderhebung auf Grundlage des H ₂ -Atemtests	29
3.7	Schema der Befunderhebung bei vorliegendem H ₂ -Non-Producer-Status	30
3.8	Fragebogen zur Erfassung anamnestischer Daten.....	31
3.9	Ereignisprotokoll zur Erfassung von Beschwerden während der Durchführung des Laktose-H ₂ -Atemtests	32
5.10	Prävalenz des primären adulten Laktasemangels innerhalb Europas	42

Tabellenverzeichnis

1.1	Gastrointestinale und systemische Manifestationen der Laktoseintoleranz, aufgelistet nach absteigender Häufigkeit	7
1.2	Laktosegehalt von Milch und Milcherzeugnissen	10
1.3	Kalziumgehalt ausgewählter Lebensmittel	11
3.4	Herstellung von 50 µl Reaktionsansatz für die DNA-Amplifikation zum Nachweis des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910	20
3.5	Cycler-Bedingungen für die DNA-Amplifikation zum Nachweis des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910	20
3.6	Herstellung des Restriktionsverdaugemisches für den Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910 und Durchführung des Restriktionsverdaus	21
3.7	Herstellung von 10 µl Reaktionslösung für die DNA-Amplifikation zur Analyse des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910 über sequenz-spezifische Sonden im LightCycler-Verfahren	24
3.8	LightCycler-Bedingungen für die DNA-Amplifikation zur Analyse des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910	25
3.9	Modifikationen des Laktose-, Glukose- und Laktulose-H ₂ -Atemtests	28
4.10	Genotypverteilung der Rostocker Blutspenderkohorte	33
4.11	Genotypverteilung der südkoreanischen Kohorte	34
4.12	Darstellung der Patientenkohorte nach Geschlecht und Alter	35
4.13	Prävalenz der H ₂ -Producer und H ₂ -Non-Producer	36
4.14	Ergebnisse des Laktose-H ₂ -Atemtests und des genetischen Tests der H ₂ -Producer-Kohorte	37
4.15	Befunde der Patienten mit diskrepanten Ergebnissen aus Atemtest und genetischer Untersuchung	38
4.16	Ergebnisse der klinischen Beurteilung und des genetischen Tests der H ₂ -Non-Producer	39
5.17	Prävalenz des primären adulten Laktasemangels ausgewählter Staaten bzw. Regionen innerhalb Europas	43

5.18	Potenzielle Ursachen falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse des H ₂ -Atemtests	51
------	---	----

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Forward (Vorwärtsprimer)
FLU	Fluoreszenzfarbstoff
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G	Guanin
GLUT	Glukosetransporter
Het	Heterozygot
Hom	Homozygot
LCT	Laktase-Gen
LIT	Laktoseintoleranz
LM	Laktoseabsorption
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase (Laktase)
MCM6	Gen „minichromosome maintenance deficient“
Na	Natrium
Neg	Negativ(-kontrolle)
ppm	Parts per million
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	Reverse (Rückwärtsprimer)
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SGLT	Natrium-abhängiger Glukosetransporter
T	Thymin
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Der primäre adulte Laktasemangel stellt weltweit den häufigsten erblichen Enzymmangel des Menschen dar und folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Etwa zwei Drittel der Weltbevölkerung sind von der Enzymdefizienz betroffen (Rasinperä et al. 2004). Kennzeichnend für den primären adulten Laktasemangel ist eine genetisch determinierte Abnahme der Laktaseexpression der Bürstensaumzellen der Dünndarmmukosa, die üblicherweise bis zum Beginn des Erwachsenenalters abgeschlossen ist (Sahi 1994). Der resultierende Enzymmangel führt nach oraler Aufnahme von Laktose zu einer Laktosemalabsorption und kann Symptome einer Laktoseintoleranz bedingen.

Das Beschwerdebild der Laktoseintoleranz ist unspezifisch und umfasst sowohl gastrointestinale als auch systemische Manifestationen (Campbell et al. 2005). Für den Ausschluss einer Laktoseintoleranz als Ursache gastrointestinaler Symptome eignen sich verschiedene diagnostische Verfahren. In der klinischen Praxis kommen dabei üblicherweise Verfahren zum Einsatz, die mit einer Laktosebelastung des Patienten verbunden sind.

Die geographische Verbreitung des primären adulten Laktasemangels schwankt weltweit und innerhalb Europas erheblich. Tendenziell lassen sich in Europa geographische Verteilungsmuster mit der Ausbildung von Gradienten erkennen. Bisherige Prävalenzdaten wurden größtenteils auf der Grundlage konventioneller diagnostischer Verfahren erhoben.

Im Jahr 2002 identifizierten Enattah et al. eine DNA-Variante (LCT-13910CC) in einem Intron des MCM6-Gens, die eine nahezu vollständige Assoziation mit dem Auftreten des primären adulten Laktasemangels zeigte (Enattah et al. 2002). Weiterführende Studien bestätigten, dass durch die Genotypisierung dieser DNA-Variante der Nachweis einer genetischen Anlage für eine Laktoseintoleranz möglich ist (Rasinperä et al. 2004). Fortführend wurde die Einbindung des genetischen Tests in ein neues Konzept des diagnostischen Vorgehens bei dem Verdacht einer Laktoseintoleranz vorgeschlagen (Matthews et al. 2005).

1.1 Historische Synopsis

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden Laktose wie auch andere Kohlenhydrate als mögliche Faktoren in der Pathogenese der Diarrhoe angenommen (Jacobi 1901).

1921 stellte Howland die Vermutung auf, dass dieser Beobachtung ein Mangel an Fermenten des Verdauungstraktes zugrunde liegen muss (Howland 1921). 1963 bestätigten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander einen isolierten Rückgang der Laktaseaktivität bei einem Teil der Menschheit (Auricchio et al. 1963, Dahlqvist et al. 1963). Dieser bei gesunden Probanden nachgewiesene Rückgang konnte von dem 1959 beschriebenen kongenitalen Laktasemangel (Holzel et al. 1959) und jenem sekundären Laktasemangel infolge von Erkrankungen des Dünndarms abgegrenzt werden. Etwa zeitgleich wurde erstmals die Auffassung publiziert, dass diese Variabilität der Laktaseaktivität einen genetischen Polymorphismus repräsentiert (Bayless und Rosensweig 1966) und den Sachverhalt des primären adulten Laktasemangels beschreibt. Simoons hielt den primären adulten Laktasemangel angesichts seiner weltweit hohen Prävalenz für den evolutionär ursprünglichen Phänotyp bzw. die Wildtypanlage (Simoons 1970). Der Nachweis eines Laktasemangels bei nahezu allen adoleszenten Säugetieren unterstützte diese Hypothese. Durch Anwendung der klassischen Verfahren der formalen genetischen Analyse wurde der Nachweis eines autosomal-rezessiven Vererbungsmodus des primären adulten Laktasemangels erbracht (Sahi et al. 1973, Sahi 1974). 1991 wurde die Struktur des Laktasegens auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2p21q) veröffentlicht (Boll et al. 1991) und 2002 identifizierten Enattah et al. einen Einzelnukleotidpolymorphismus in einem Intron des MCM6-Gens an Position LCT-13910, der nahezu vollständig mit dem primären adulten Laktasemangels assoziiert ist (Enattah et al. 2002).

1.2 Klassifikation des Laktasemangels

Sämtliche Formen des Laktasemangels führen infolge der Unfähigkeit, Laktose im Intestinum enzymatisch zu spalten, zu einer Laktosemalabsorption. Es werden die primären, vorrangig genetisch bedingten Formen von sekundären Formen infolge von Erkrankungen mit Beteiligung des Dünndarms unterschieden.

Zur Gruppe der primären Formen zählen der kongenitale Laktasemangel, der entwicklungsbedingte Laktasemangel und der primäre adulte Laktasemangel.

Der weltweit extrem seltene autosomal-rezessiv vererbte, kongenitale Laktasemangel beruht auf Mutationen innerhalb des Laktasegens LCT (Kuokkanen et al. 2006) und ist durch ein vollständiges Fehlen des Enzyms gekennzeichnet.

Klinisch imponieren sofort einsetzende Beschwerden nach der erstmaligen Aufnahme von Muttermilch (Savilahti et al. 1983).

Der entwicklungsbedingte Laktasemangel findet sich bei Frühgeborenen und zeichnet sich durch einen vorübergehenden Mangel an Laktase aus infolge einer intrauterin erst in den letzten Wochen der Schwangerschaft beginnenden Synthese des Enzyms.

Der primäre adulte Laktasemangel wird autosomal-rezessiv vererbt und ist bei weitem die häufigste Ursache einer Laktasedefizienz. Er ist durch eine kontinuierliche Abnahme der Laktaseaktivität nach Beendigung der Stillperiode gekennzeichnet.

Allen Formen des primären Laktasemangels sind eine bestehende Integrität der Dünndarmepithelzellen sowie der ausschließlich isolierte Mangel an Laktase ohne Beeinträchtigung weiterer Disaccharidasen des Dünndarms gemeinsam.

Der sekundäre Laktasemangel tritt bei Erkrankungen auf, die mit einer Schädigung des Dünndarmepithels einhergehen (Sprue, M. Crohn, strahlen- bzw. medikamentös induzierte Enteritis, Mukosa-Infektionen etc.). Neben dem histologischen Nachweis einer Läsion des Dünndarmepithels lassen sich im Regelfall eine verminderte Aktivität weiterer Disaccharidasen der Bürstensaumzellen der Dünndarmmukosa nachweisen (Flatz und Rotthauwe 1977). Der sekundäre Laktasemangel ist prinzipiell nach Therapie der zugrunde liegenden Erkrankung und Wiederherstellung der Integrität der Dünndarmmukosa reversibel.

Die mit einem absoluten oder relativen Laktasemangel einhergehende Unfähigkeit, größere Mengen an Laktose spalten zu können, muss primär keinen krankhaften Zustand darstellen. Bei Beschwerdefreiheit wird daher deskriptiv der Begriff Laktosemalabsorption verwendet, während der Terminus Laktoseintoleranz jenen Fällen vorbehalten ist, denen eine symptomatische Laktosemalabsorption zugrunde liegt.

1.3 Physiologie und Pathophysiologie der Laktosemalabsorption

Laktose (Beta-Galaktose-1,4-glukose) ist das Hauptkohlenhydrat der Milch. In der Natur erscheint das Disaccharid als spezifischer Bestandteil der Muttermilch von Säugetieren. Der Gehalt an Laktose differiert innerhalb verschiedener Säugetierspezies und liegt beim Menschen bei ca. 7,0 g/100 ml, in der Kuhmilch bei ca. 4,7 g/100 ml (Palmiter 1969). In der traditionellen Nahrung der europäischen Bevölkerung sind ca. 5 % der täglich konsumierten Kohlenhydrate Laktose (Leiß

2005). Erhebliche Laktosemengen finden sich weiterhin in zahlreichen, aus Milch hergestellten Produkten (Moore 2003).

Die Verwertung oral aufgenommener Laktose erfordert die hydrolytische Spaltung in ihre Konstituenten D-Glukose und D-Galaktose, da nur diese im Dünndarm resorbiert werden können. Dieser Schritt wird durch das Enzym Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) katalysiert, bei dem es sich um ein integrales Membranprotein in der Bürstensaummembran des differenzierten Dünndarmepithels handelt (Mantei et al. 1988).

LPH kann ab der achten Schwangerschaftswoche in den Bürstensaumzellen der Dünndarmmukosa nachgewiesen werden, wobei sich ein signifikanter Aktivitätsanstieg des Enzyms erst in den letzten Wochen der Schwangerschaft vollzieht. Das Enzym ist über die gesamte Länge des Dünndarms nachzuweisen und zeigt hinsichtlich seiner Aktivität eine charakteristische lokale Verteilung. Sie ist gering im Duodenum und steigt abrupt im Jejunum an, wo die höchste Aktivität zu messen ist. Im Ileum sind dagegen nur geringe Enzymaktivitäten nachweisbar (Auricchio et al. 1963). Auch die vertikale Verteilung der Laktaseaktivität stellt sich nach einem charakteristischen Muster dar. Die Expression von LPH lässt sich nahezu ausschließlich in den Villi des Dünndarms nachweisen mit tendenziell höchsten Aktivitäten in den mittleren und oberen Anteilen (Nordström und Dahlqvist 1973).

LPH weist zwei hydrolytische Einheiten auf. Während die Laktase (Beta-D-Galaktosid-Galaktohydrolase) das Disaccharid Laktose spaltet, führt die Phlorizin-Hydrolase (Glykosyl-N-Acylsphingosin-Glukohydrolase) zur Hydrolyse von Beta-Glykosylceramiden. Letztere konnten als Zellwandbestandteile einiger Pilze und Pflanzen nachgewiesen werden.

Nach der Spaltung von Laktose erfolgt die Resorption von Glukose und Galaktose auf der apikalen Seite der Enterozyten durch einen Na/Glukose-Kotransporter (SGLT1) und ihre Abgabe in das Blut am basolateralen Zellaspekt durch passive Diffusion mittels des Glukosetransporters Typ 2 (GLUT 2) (Abbildung 1.1). Während Glukose zur sofortigen systemischen Verwertung zur Verfügung steht, wird Galaktose als Substrat mit toxischer Potenz in der Leber hauptsächlich zu Glukose metabolisiert.

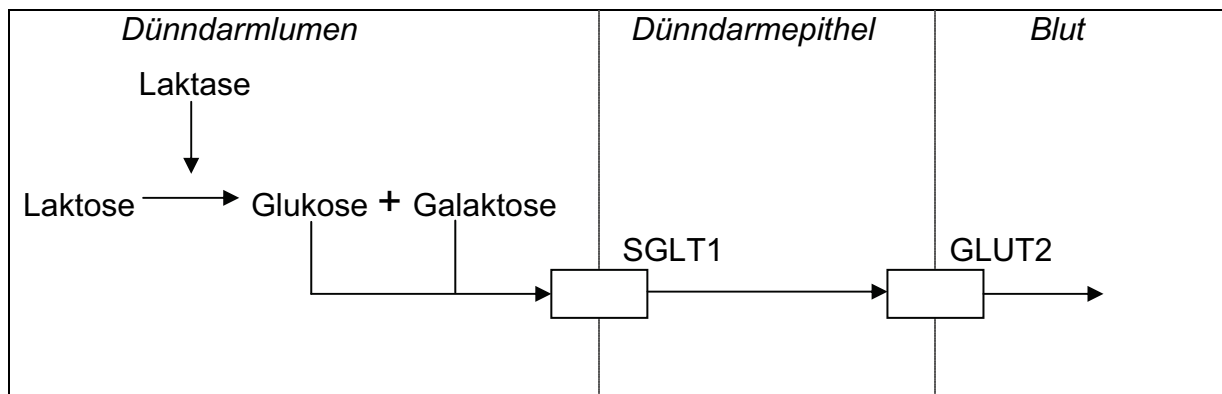


Abbildung 1.1: Physiologie der Laktoseabsorption (SGLT1: Natrium-abhängiger Glukose-1-Transporter; GLUT2: Glukose-2-Transporter).

Bei Individuen mit ausreichend hoher intestinaler Laktaseaktivität ist der Konsum von laktosehaltigen Lebensmitteln ohne Entwicklung von Beschwerden möglich.

Im Falle eines Laktasemangels führt der Verzehr laktosehaltiger Lebensmittel zu unspezifischen abdominalen und systemischen Symptomen. Ursächlich liegt eine unzureichende Hydrolyse der oral aufgenommenen Laktose im Dünndarm vor, wodurch die nicht resorbierbaren Laktosemoleküle in den Dickdarm gelangen. Dort sind zwei pathophysiologische Vorgänge für die Entstehung des Beschwerdebildes der Laktoseintoleranz wesentlich (Abbildung 1.2): Zum einem führt die Akkumulation von Laktose im Dickdarm zu einer Erhöhung des osmotischen Druckes mit Flüssigkeitsretention, nach luminal gerichteter Flüssigkeitsverlagerung und konsekutiver osmotischer Diarrhoe (Lloyd und Olsen 1995). Zum anderen erfolgt durch die ansässige Kolonflora eine Vergärung der unhydrolysierten Laktose zu kurzkettigen Fettsäuren, Kohlenstoffdioxid (CO₂), Wasserstoff (H₂) und in einigen Fällen die weiterführende Reduktion von CO₂ zu Methan (CH₄). Begleitend treten eine Reihe von toxischen Metaboliten des bakteriellen Stoffwechsels auf. Die bakterielle Gasbildung in Form von CO₂ und H₂ führt zu Flatulenz und Meteorismus, die Resorption toxischer Metabolite wird mit den systemischen Beschwerden assoziiert (Matthews und Campbell 2000). In seltenen Fällen ist eine Obstipation zu beobachten, die wahrscheinlich auf die bakterielle Bildung von Methan zurückzuführen ist. Tierversuche zeigten, dass die Ingestion von Methan zu einer Verlängerung der orozökalen Transitzeit führt (Pimentel et al. 2006).

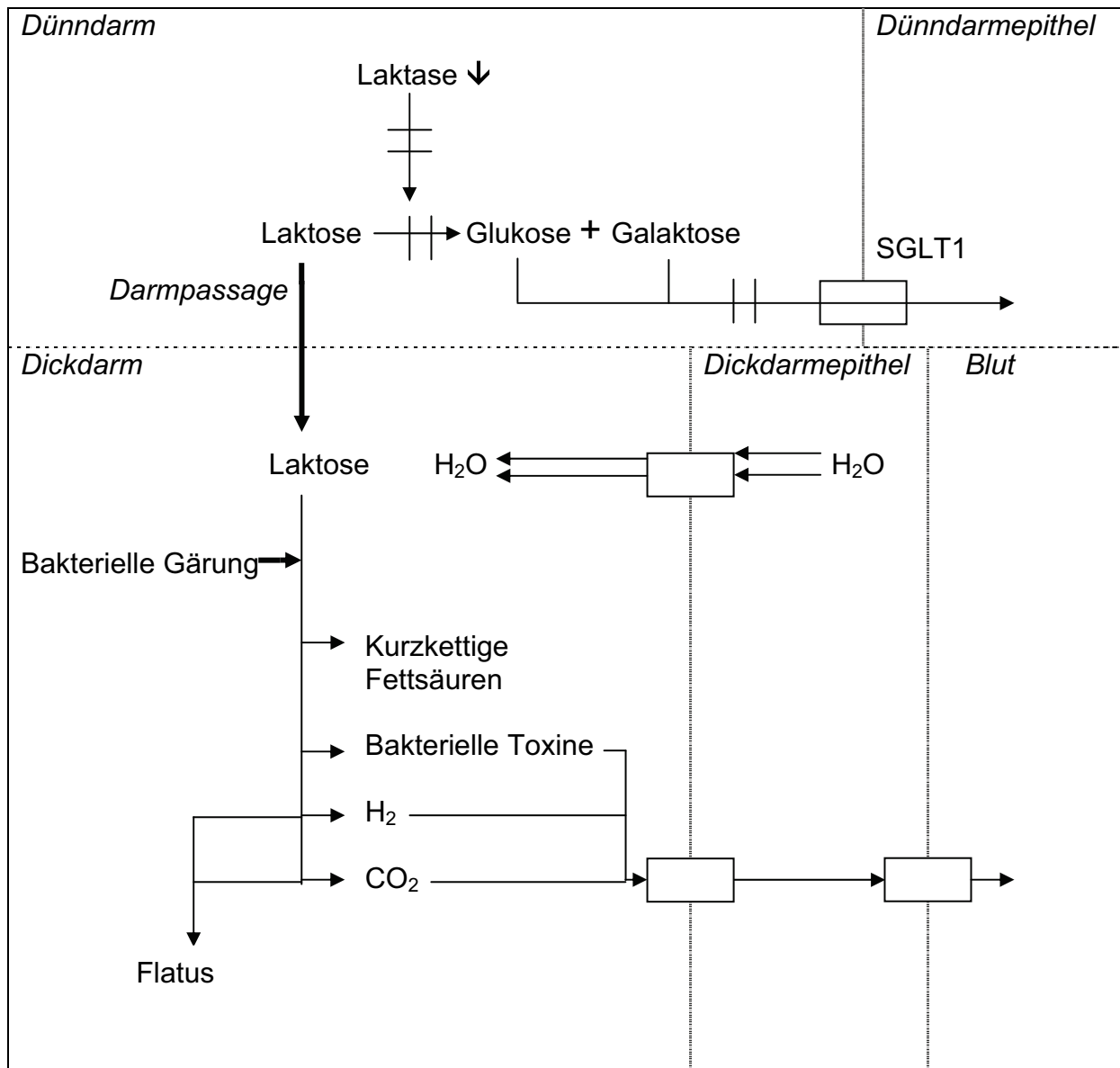


Abbildung 1.2: Pathophysiologie der Laktosemalabsorption.

1.4 Klinik der Laktosemalabsorption

Die auftretenden Symptome nach Aufnahme laktosehaltiger Lebensmittel sind unspezifisch und umfassen Abdominalschmerzen, Borborygmen, Flatulenz und Diarrhoen, gelegentlich auch Obstipationen. Ferner wurde über eine Reihe systemischer Beschwerden berichtet, deren Ursache toxische Metabolite sein sollen, die im Zuge der bakteriellen Verstoffwechslung von Laktose entstehen (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Gastrointestinale und systemische Manifestationen der Laktoseintoleranz, aufgelistet nach absteigender Häufigkeit (Campbell et al. 2005).

Abdominale Symptome	Systemische Symptome
Abdominalschmerzen	Kopfschmerzen
Borborygmen	Konzentrations- und Gedächtnisstörungen
Flatulenz	Müdigkeit
Diarrhoen	Muskelschmerzen
Übelkeit	Gelenkschmerzen und/und -schwellung
Erbrechen	Allergien
	Ekzem
	Pruritus
	Rhinitis
	Sinusitis
	Asthma
	Herzrhythmusstörungen
	Ulzera der Mundschleimhaut

Eine Vielzahl von Studien beschäftigte sich mit den Ursachen der variablen interindividuellen Symptomausprägung bei Patienten mit Laktasedefizienz. Neben der zugeführten Laktosemenge und der Restaktivität an Laktase scheinen mit der oroökalen Transitzeit und der absoluten Zahl der Kolonbakterien zwei weitere Determinanten von Bedeutung zu sein. Es zeigte sich, dass die oroökale Transitzeit bei Patienten mit einer Laktoseintoleranz signifikant verkürzt ist im Vergleich zu Patienten ohne Laktoseintoleranz (Vonk et al. 2003). Ebenso scheint die absolute Zahl an Kolonbakterien den Beschwerdegrad derart zu beeinflussen, dass mit steigender Bakterienzahl die Fermentationskapazität der Bakterien zunimmt bei gleichzeitiger Abnahme des Schweregrades der Symptomatik (Zhong et al. 2004).

Eine gemäßigte Toleranzsteigerung von laktasedefizienten Probanden nach Aufnahme moderater Laktosemengen über einen längeren Zeitraum scheint durch Adaptationsvorgänge der Kolonflora begründet zu sein. Diese beinhalten eine gesteigerte Bildung kurzkettiger Fettsäuren zugunsten einer verringerten Gasbildung während des bakteriellen Vergärungsprozesses sowie einen Anstieg der bakteriellen Beta-Galaktosidaseaktivität mit vermehrter Spaltung der osmotisch wirksamen

Laktose lässt sich in die Konstituenten Glukose und Galaktose (Hertzler und Savaiano 1996). Die intestinale Laktaseaktivität des Menschen lässt sich im Gegensatz zur bakteriellen Beta-Galaktosidaseaktivität substratabhängig nicht steigern (Rosensweig 1971, Gilat et al. 1972).

Die Reduzierung des Konsums von Milch und Milchprodukten als wesentliche Kalziumquelle in der täglichen Ernährung führte zur Annahme möglicher Beeinträchtigungen des Knochenstoffwechsels bei Patienten mit einem primären adulten Laktasemangel. Einige Studien kamen zum Ergebnis, dass der primäre adulte Laktasemangel mit einer Senkung des Mineralgehaltes der Knochen assoziiert sein kann und für eine Osteoporose prädisponiert (Segal et al. 2003, Obermayer-Pietsch et al. 2004). Der strikte Verzicht auf Milchprodukte als potenzielle Kalziumquelle sollte daher individuell abgewogen werden, da die Mehrheit laktasedefizienter Patienten täglich eine Laktosemenge entsprechend 240 ml Milch gut toleriert (Suarez et al. 1995). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die Laktosemalabsorption zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Resorption anderer Nährstoffe führt (Debongnie et al. 1979).

1.5 Diagnostik der Laktosemalabsorption

Als Referenzmethode in der Diagnostik einer Laktasedefizienz gilt die Messung der Laktaseaktivität mit paralleler Bestimmung des Laktase/Sucrase-Quotienten in Jejunum-Biopsien (Messer und Dahlqvist 1966). Die Dünndarmbiopsie stellt jedoch in der Diagnostik der Laktosemalabsorption ein unpraktikables Verfahren zum primären Ausschluss einer Laktoseintoleranz dar. Zu berücksichtigen ist zusätzlich, dass die Dünndarmbiopsie zwar als Goldstandard gewertet wird, sie jedoch lediglich an lokalisierten Arealen die Laktaseaktivität misst und demnach die Gefahr falsch-negativer Ergebnisse in der Ausschlussdiagnostik der Laktoseintoleranz in sich birgt. Darüber hinaus ermöglicht sie keine Differenzierung zwischen einer asymptomatischen und symptomatischen Laktosemalabsorption.

Das häufigste in der Diagnostik von Kohlenhydratmalabsorptionssyndromen angewendete Verfahren ist der H₂-Atemtest. Dieser ist klinisch etabliert in der Diagnostik einer Kohlenhydratmalabsorption und -unverträglichkeit (H₂-Laktose-Atemtest, H₂-Fruktose-Atemtest, H₂-Saccharose-Atemtest, H₂-Sorbit-Atemtest), einer bakteriellen Fehlbesiedlung (H₂-Glukose-Atemtest), zur Messung der

orozökalen Transitzeit (H₂-Laktulose-Atemtest) und zur Erfassung eines H₂-Non-Producer-Status (H₂-Laktulose-Atemtest).

Wasserstoff-Atemtests basieren auf der Messung von Wasserstoff in der Exhalationsluft des Patienten nach oraler Gabe von Kohlenhydraten. H₂ wird ausschließlich von intestinalen Bakterien produziert, signifikante Mengen solcher H₂-bildenden Bakterien sind beim Gesunden nur im Kolon zu finden. Ein Anstieg der H₂-Konzentration in der Exhalationsluft des Patienten kann somit als Indikator für eine Malabsorption von Kohlenhydraten mit konsekutiver bakterieller Verstoffwechslung im Kolon herangezogen werden. Etwa 14 % des intestinal produzierten H₂ gelangen dabei durch Diffusion in das Kapillarblut der Darmschleimhaut und werden fortgeleitet in die Lunge, wo es aufgrund der geringen Löslichkeit im Blut nahezu vollständig abgeatmet wird (Levitt 1969).

Bei bis zu 20 % der Bevölkerung kommt es nach Gabe einer standardisierten Laktulosedosis aufgrund der individuellen Zusammensetzung der Kolonflora zu keinem Anstieg der H₂-Exhalation (Gilat et al. 1978, Hammer et al. 1996). Dafür scheint eine besonders rasche bakterielle Verwertung des anfallenden Wasserstoffs zu Methan verantwortlich zu sein (Wolin 1981). Um falsch-negative Ergebnisse in der H₂-Atemtest-Diagnostik zu vermeiden, empfiehlt sich daher die kombinierte Anwendung mit einem Laktulose-H₂-Atemtest. Dieser ermöglicht den Ausschluss eines H₂-Non-Producer-Status und erhöht so die Sensitivität der jeweiligen H₂-Atemtests (Hammer et al. 1996).

1.6 Therapie der Laktosemalabsorption

Die Therapie der Laktoseintoleranz beruht vorwiegend auf diätetischen Maßnahmen und erfordert eine ausführliche Ernährungsberatung der Patienten. Bei der Erstellung von Diättempfehlungen sollte Berücksichtigung finden, dass Patienten mit einer diagnostizierten Laktoseintoleranz größtenteils eine Restaktivität an Laktase besitzen, so dass kleine Laktosemengen beschwerdefrei vertragen werden können. Die Verträglichkeitsgrenze für Laktose sollte daher individuell ermittelt werden, in dem zunächst für einige Tage konsequent auf jegliche laktosehaltige Produkte verzichtet werden sollte, um dann in steigender Menge (zwischen 1 und 8-10 g am Tag) bis zur individuellen Verträglichkeitsgrenze laktosehaltige Lebensmittel zu verzehren. Die Wahl geeigneter Lebensmittel wird seit wenigen Jahren dadurch erleichtert, dass nach der neuen EU-Richtlinie 2003/89/EG ab November 2005

Laktose im Zutatenverzeichnis ausgewiesen werden muss. Der durchschnittliche Laktosegehalt einiger ausgewählter Lebensmittel ist in der Tabelle 1.2 zusammengefasst.

Tabelle 1.2: Laktosegehalt von Milch und Milcherzeugnissen (nach Renner und Renz-Schauen 1994).

Milch bzw. Milcherzeugnis	Laktosegehalt (g pro 100 g)
Konsummilch (Frischmilch, H-Milch)	4,8 - 5,0
Kondensmilch (4-10 % Fett)	9,3 - 12,5
Molke, Molkegetränke	2,0 - 5,2
Milchpulver	38,0 - 51,5
Butter	0,6 - 0,7
Speisequark (10-70 % Fett i. Tr.)	2,0 – 8,0
Magerquark	4,1
Joghurt	3,7 - 5,6
Hart-, Schnitt-, Weichkäse	< 1
Hüttenkäse (20 % i. Tr.)	2,6
Rahm-, Doppelrahmfrischkäse	3,4 - 4,0

Prinzipiell gelten gesäuerte Milchprodukte (Joghurt, Dickmilch, Buttermilch, Quark) und reifer Käse (Hartkäse, Schnittkäse) als gut verträglich, da durch die bereits enthaltenen Milchsäurebakterien (Lin et al. 1998) bzw. durch die Fermentation während der Käseherstellung ein Teil der Laktose abgebaut wird. Zudem werden allgemein fettreiche Milchprodukte besser vertragen als fettarme, da es aufgrund des hohen Fettanteils der Mahlzeit zu einer verzögerten Magenentleerung und damit zu einer verlängerten Kontaktzeit zwischen Dünndarmschleimhaut und Chymus kommt. Um den Genuss von Lebensmitteln zu ermöglichen, bei denen der Laktosegehalt nicht bekannt ist, empfiehlt sich die Verwendung von Laktasepräparaten, die in Form von Kautabletten vor der Mahlzeit eingenommen bzw. in Pulverform zu milchzuckerhaltigen Lebensmittel hinzugefügt werden können.

Da der tägliche Verzehr von Milchprodukten eine wesentliche Kalziumquelle darstellt, sollten bei milchfreier Diät weitere potentielle Kalziumquellen in der täglichen Ernährung Berücksichtigung finden, um den für Erwachsene empfohlenen

Tagesbedarf von ca. 1000-1200 mg Kalzium zu decken (Schauder und Ollenschläger 2006). Hierzu eignet sich eine Vielzahl von Lebensmitteln (Tabelle 1.3). Kann der tägliche Kalziumbedarf nicht über die Nahrung gedeckt werden, sollte eine Substitution in Form von Kalziumzitrat in Erwägung gezogen werden. Generell gilt jedoch, dass auch Laktosemalabsorber ohne wesentliche begleitende gastrointestinale Symptomatik ihren Kalziumbedarf über verschiedene, im Laktosegehalt reduzierte Milchprodukte decken können (Suarez et al. 1998).

Tabelle 1.3: Kalziumgehalt ausgewählter Lebensmittel.

Lebensmittel	Kalzium (mg pro 100 g)
Gemüse*	
Grünkohl, roh	160,0
Staudensellerie, roh	80,0
Porree (Lauch), gegart	71,4
Broccoli	100,0
Kohlrabi, roh	66,7
Mineralwasser**	
Meisterperle	61,8
Stephensbrunnen, Salzgitter	59,6
Nüsse, Samen ***	
Erdnüsse	40,0
Haselnüsse	225,0
Pistazienkerne	130,0
Sesamsamen	783,0

*Schauder und Ollenschläger 2006; ** Aign et al. 2007; *** Klein et al. 1993

1.7 Primärer adulter Laktasemangel

Der primäre adulte Laktasemangel zeichnet sich durch eine postnatale Abnahme der Laktaseaktivität der Bürstensaumzellen der Dünndarmmukosa aus und stellt unter den verschiedenen Formen des Laktasemangels die bei weitem häufigste Ursache einer Laktoseintoleranz dar.

Untersuchungen zum primären adulten Laktasemangel belegen, dass sich bei nahezu allen Säugetieren während der Stillperiode die höchsten Laktaseaktivitäten zeigen, gefolgt von einer altersabhängigen sukzessiven Abnahme der Laktaseexpression (Simoons et al. 1978, Flatz 1987). Auch beim Menschen ist dieser Rückgang der Enzymaktivität größtenteils zu verzeichnen. Es zeigen sich jedoch populationsabhängig Ausnahmen von dieser Regel. Mehrheitlich weisen Europide sowie einige isolierte afrikanische Stämme zeitlebens hohe Laktaseaktivitäten (Laktasepersistenz) auf (Scrimshaw und Murray 1988). Hierbei zeigt sich, dass beim primären adulten Laktasemangel im Vergleich zur Laktasepersistenz ein Rückgang der Laktaseaktivität um etwa das Zehnfache vorliegt (Villako und Maaros 1994).

Intensität und Frequenz der Symptome von Patienten mit einem primären adulten Laktasemangel variieren interindividuell erheblich (Cavalli-Sforza und Strata 1987, Suarez et al. 1995). In den meisten Fällen ist der Verzehr von etwa 240 ml Milch pro Tag, entsprechend 12,5 g Laktose, beschwerdefrei möglich (Hertzler et al. 1996). Bei einem Teil der laktasedefizienten Patienten können jedoch bereits geringere Mengen Laktose zu Symptomen führen (Suarez et al. 1997). Bemerkenswert ist zudem, dass sich im Fall des primären adulten Laktasemangels starke populationsabhängige Schwankungen hinsichtlich des Manifestationsalters zeigen. Während in Populationen mit einer hohen Prävalenz Beschwerden bereits in den ersten Jahren nach der Geburt auftreten (Keusch et al. 1969, Kretchmer et al. 1971), setzt das Vollbild der klinischen Symptomatik in Bevölkerungsgruppen mit einer geringen Prävalenz in der Regel nicht vor Beginn der Adoleszenz ein (Sahi und Launiala 1978).

Eine im Jahr 2002 veröffentlichte Publikation wies einen Einzelnukleotidpolymorphismus etwa 14 Kilobasen vor dem Startkodon des Laktasegens LCT im Intron 13 des MCM6-Gens nach, der eine nahezu vollständige Assoziation mit dem Auftreten des primären adulten Laktasemangels zeigte (Enattah et al. 2002). Eine Studie konnte für den genetischen Test eine Sensitivität und Spezifität von 95 bzw. 100 % im Vergleich zur Referenzmethode der Dünndarm-biopsie belegen (Rasinperä et al. 2004). Die Aufnahme des genetischen Tests in ein neues diagnostisches Konzept beim Verdacht einer Laktoseintoleranz wurde daraufhin empfohlen (Matthews et al. 2005). Dieses Konzept sieht für den primären Ausschluss einer Laktoseintoleranz die Durchführung des genetischen Tests vor.

1.7.1 Epidemiologie

Der primäre adulte Laktasemangel ist der häufigste erbliche Enzymmangel des Menschen und betrifft etwa zwei Drittel der Weltbevölkerung (Rasinperä et al. 2004). Bei der Betrachtung der vorliegenden Prävalenzdaten muss Berücksichtigung finden, dass diese hauptsächlich auf der Basis oraler Laktosetoleranztests beruhen. Für diese konventionellen diagnostischen Verfahren besteht derzeit keine einheitliche Verfahrensweise. Dennoch lassen die bisher erhobenen Populationsstudien Erhebungen charakteristischer Verteilungsmuster der adulten Form des Laktasemangels zu (Flatz und Rotthauwe 1977).

Die geographische Verteilung des primären adulten Laktasemangels ist uneinheitlich. Die weltweit geringsten Prävalenzen finden sich in Nord- und Zentraleuropa sowie in der weißen Bevölkerung europäischer Abstammung in Nordamerika und Australien sowie Neuseeland. Die höchsten Prävalenzen lassen sich in zentralafrikanischen Populationen und in den südöstlichen Gebieten Asiens nachweisen. Innerhalb Europas findet sich eine charakteristische geographische Verteilung des genetischen Polymorphismus mit einem Nord-Süd-Gefälle. Die Prävalenzen variieren zwischen 1 und 7 % in den skandinavischen Ländern (Gudmand-Hoyer et al. 1969, Dahlqvist und Lindquist 1971) und werden mit bis zu 80 % in den Mittelmeerregionen angegeben (Rinaldi et al. 1984). Innerhalb Deutschlands zeigt sich ein ähnliches Verteilungsmuster, wobei der Anteil der adulten Form des primären Laktasemangels in den nordwestlichen, südlichen und östlichen Gebieten bei 6-9, 13-14 bzw. 22 % liegen soll (Flatz et al. 1982).

In Ostasien wurden besonders hohe Prävalenzen gefunden. In Thailand und Vietnam lag der Anteil der adulten Form des primären Laktasemangels bei 100 % (Flatz und Saengudom 1969, Anh et al. 1977), in Indonesien bei 91 % (Surjono et al. 1973). In Nordafrika und im arabischen Raum werden Prävalenzen von etwa 75 % angegeben (O`Morain et al. 1978, Nasrallah 1979, Hussein et al. 1982, Hijazi et al. 1983). Populationsstudien in Zentralafrika zeigten Prävalenzen über 90 % (Kretchmer et al. 1971, Elliott et al. 1973). Hohe Frequenzen lassen sich auch in einheimischen Bevölkerungsgruppen Nord- und Südamerikas mit bis zu 100 % bei Populationen indianischer Abstammung (Newcomer et al. 1977) bzw. 82 % bei kanadischen Eskimos nachweisen (Ellestad-Sayed et al. 1978). In der afroamerikanischen Bevölkerung liegt die Prävalenz bei 80 % (Bayless et al. 1975). In der

nordamerikanischen weißen Bevölkerung europäischer Abstammung finden sich Prävalenzen vergleichbar jener Nord- und Mitteleuropas (Newcomer und McGill 1967, Bedine und Bayless 1973). Deutliche lokale Abweichungen lassen sich bei Nomaden-Stämmen auf der arabischen Halbinsel und Afrika antreffen, bei denen sich Prävalenzen in der Größenordnung von 20 % zeigen (Kretchmer et al. 1971, Cook und Al-Torki 1975).

1.7.2 Molekulare Genetik

Das humane Laktase-Gen LCT befindet sich auf Chromosom 2 (Kruse et al. 1988) und umfasst eine Länge von etwa 50 kb (Boll et al. 1991). Das Gen beinhaltet 17 Exons (Boll et al. 1991). Die Translation des mRNA-Transkriptes führt zu einer 1927 Aminosäuren umfassenden Vorstufe der nativen LPH, der Pre-Pro-LPH (Mantei et al. 1988), die posttranslational durch Glykosylierung sowie proteolytische Abspaltung von Teilsequenzen (Jacob et al. 1996) zur nativen LPH, einem transmembranösen Glykoprotein aus 1059 Aminosäuren, modifiziert wird. Innerhalb der Pre-Pro-LPH lassen sich vier homologe Regionen nachweisen, die aminoterminal durch ein Signalpeptid und karboxyterminal durch einen Membrananker flankiert werden. Die 19 Aminosäuren lange Prä-Sequenz der Enzymvorstufe wird durch das N-terminale Signalpeptid gebildet, die benachbarten zwei N-terminalen, homologen Regionen von 849 Aminosäuren Länge bilden die Pro-Sequenz (Mantei et al. 1988). Im Rahmen der posttranslationalen Modifikation wird im endoplasmatischen Retikulum die Pre-Pro-LPH durch Abspaltung des Signalpeptids, das die Translokation von den Ribosomen in das endoplasmatische Retikulum steuert, in die Pro-Form überführt. Im selben Kompartiment erfolgt danach eine Dimerisierung der Pro-Form und in einem weiteren Schritt in Form der Abtrennung der zwei N-terminal nahen, homologen Regionen die Entfernung der Prä-Sequenz. Sie besitzt im Gegensatz zu den benachbarten, C-terminal nahen homologen Sequenzen keine katalytische Aktivität (Naim et al. 1995), sondern übernimmt wahrscheinlich die Funktion eines intramolekularen Chaperons zur Steuerung der Proteinfaltung der Pro-LPH (Oberholzer et al. 1993, Naim et al. 1994, Jacob et al. 2002). Im Rahmen der weiteren posttranslationalen Modifikation erfolgt im Golgi-Apparat die N- sowie O-Glykosylierung des Proteins und während des Transportes zur Bürstensaummembran der Enterozyten eine finale N-terminale Modifikation. Glykosylierung und Dimerisierung des Proteins stellen eine Voraussetzung für die Entfaltung der

enzymatischen Aktivität der LPH dar (Naim und Lentze 1992). Die verbliebenen zwei homologen Regionen der LPH bilden die beiden katalytischen Zentren des Enzyms, wobei die Laktase-Aktivität bei Glutamat 1749 und die Phlorizin-Hydrolase-Aktivität bei Glutamat 1273 lokalisiert ist (Zecca et al. 1998). Das native Glykoprotein ist über das C-terminale Ende in der Lipiddoppelschicht der apikalen Bürstensaummembran des Dünndarmepithels verankert, der Hauptteil des Moleküls projiziert sich in das Dünndarmlumen (Mantei et al. 1988).

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen des primären adulten Laktasemangels war Gegenstand zahlreicher Publikationen und ist derzeit nicht abgeschlossen. Sequenzanalysen des LPH-Gens und des mRNA-Moleküls bei laktasedefizienten Patienten und Patienten mit Laktasepersistenz zeigten identische Nukleotidsequenzen innerhalb beider Gruppen (Boll et al. 1991). Weiterhin unterscheidet sich die LPH bei laktasedefizienten Individuen nicht vom Protein bei Menschen mit Laktasepersistenz (Potter et al. 1985). Die mit einer hohen Laktase-mRNA-Expression einhergehende gesteigerte Laktaseaktivität in humanen Dünndarmbiopsien erbrachte den Nachweis einer vorrangigen Regulierung auf der Transkriptionsebene (Montgomery et al. 1991). Gleiche Ergebnisse erbrachten zahlreiche Tierexperimente (Büller et al. 1990, Torp et al. 1993, Lacey et al. 1994). Genetische Analysen zeigten hierbei eine höchst konservierte Sequenz aus 150 bp in der proximalen Promotorregion des LPH-Gens mit drei cis-regulierenden Elementen, die potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren darstellen. In Transfektionsexperimenten mit Caco 2-Zellen führte die Bindung dieser Faktoren zu einer Steigerung der Promotoraktivität (Mitchelmore et al. 2000, Fang et al. 2001). Die Feststellung, dass der proximale Promotor in vitro lediglich zu einer Zunahme der Laktase-Expression auf geringem Niveau fähig ist (Troelsen et al. 1992), ließ weitere transkriptionsregulierende Sequenzen außerhalb der proximalen Promotorregion vermuten.

Sequenzanalysen führten dann zur Identifizierung eines Einzelnukleotidpolymorphismus, der eine sehr ausgeprägte Assoziation mit dem Auftreten des primären adulten Laktasemangels in einer finnischen Kohorte zeigte (Ennatah et al. 2002). Dieser Einzelnukleotidpolymorphismus befindet sich 13910 Basenpaare vor dem Startkodon des Laktasegens (LCT-13910). Die Genotypen LCT-13910CT bzw. LCT-13910TT korrelierten hierbei mit einer Laktasepersistenz, während der Genotyp LCT-13910CC mit dem primären adulten Laktasemangel assoziiert war. In einer Studie

konnte entsprechend der drei möglichen Genotypen eine trimodale Verteilung der Laktaseaktivität nachgewiesen werden mit den höchsten Aktivitäten beim Genotyp LCT-13910TT, den niedrigsten Aktivitäten beim Genotyp LCT-13910CC und intermediären Aktivitäten beim Genotyp LCT-13910CT (Rasinperä et al. 2004). Zu gleichen Ergebnissen führte eine weitere Untersuchung (Kuokkanen et al. 2003). Experimente mit Caco-2-Zellen konnten der Region um den Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13190 sowohl bei laktasedefizienten Patienten als auch bei Menschen mit Laktasepersistenz eine Enhancerfunktion zuweisen (Troelsen et al. 2003). Eine In-vitro-Studie bestätigte diese Ergebnisse, wonach sich die polymorphe Sequenz an Position LCT-13910 in einem cis-Element befindet, das die transkriptionelle Aktivierung des Laktase-Promotors beeinflusst (Olds und Sibley 2003). Dabei zeigte sich, dass die Promotoraktivität der DNA-Variante LCT-13910C erheblich schwächer ausfällt als bei vorliegender DNA-Variante LCT-13910T, die mit einer ausgeprägten Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Enhancer-Region und einer konsekutiven Steigerung der Promotoraktivität des LPH-Gens um ein Vielfaches assoziiert war (Troelsen et al. 2003). Derzeit bleibt ungeklärt, welche Transkriptionsfaktoren die Enhancerfunktion der Region um den Einzelnukleotidpolymorphismus vermitteln (Troelsen 2005).

2. Zielsetzung

Mit der Identifizierung des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910C/T eröffnet sich die Möglichkeit, durch den Einsatz PCR-basierter Testverfahren die genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz nachzuweisen (Enattah et al. 2002). Prinzipiell würde sich so das Spektrum der diagnostischen Verfahren beim Verdacht einer Laktoseintoleranz erweitern lassen, ohne den Patienten mit einer oralen Laktosezufuhr belasten zu müssen, wie es bei dem in der klinischen Praxis üblichen H₂-Laktose-Atemtest der Fall ist. Zusätzlich würde der genetische Test eine Unterscheidung zwischen einem sekundären und primären adulten Laktasemangel bei bestehender Laktoseintoleranz ermöglichen. In diesem Zusammenhang wurde bereits kurz nach der Identifizierung der molekularen Grundlagen der Laktoseintoleranz die Aufnahme des genetischen Tests in ein neues Konzept des diagnostischen Vorgehens beim Verdacht einer Laktoseintoleranz vorgeschlagen (Matthews et al. 2005). Weiterhin würde sich der Test als methodisches Prinzip zur Erhebungen von Prävalenzdaten des primären adulten Laktasemangels eignen. Umfangreiche Populationsstudien zum primären adulten Laktasemangel in Deutschland wurden dagegen zuletzt Anfang der 1980er Jahre erhoben und basierten hauptsächlich auf konventionellen diagnostischen Verfahren in Form oraler Laktosetoleranztests (H₂-Laktose-Atemtests, biochemische Analytik im Blut nach Laktosegabe) (Flatz et al. 1982).

Die vorliegende Arbeit hatte folgende Zielsetzungen:

1. Erhebung von Prävalenzdaten des primären adulten Laktasemangels im nordostdeutschen Raum in einer Genotypisierungsstudie
2. Untersuchung einer asiatischen Kohorte für interethnische Vergleichszwecke
3. Vergleichende Untersuchung zweier molekulargenetischer Verfahren (PCR-RFLP und Real-time-PCR) zum Nachweis der Laktoseintoleranz
4. Untersuchung des diagnostischen Wertes des genetischen Tests im Rahmen der Routinediagnostik beim Verdacht einer Laktoseintoleranz. Als Referenzmethode wurde der in der klinischen Praxis etablierte H₂-Atemtest herangezogen.

3. Material und Methoden

3.1 Probanden und Patienten

Im Rahmen der diagnostischen Tätigkeit wurden von September 2005 bis Dezember 2006 in der Abteilung für Gastroenterologie der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Rostock 128 Patienten zum Ausschluss einer Laktosemalabsorption mit einem H₂-Atemtest untersucht. Es wurden Geschlecht und Alter dokumentiert sowie relevante anamnestische Daten (Beschwerden nach Aufnahme laktosehaltiger Nahrungsmittel, Medikation, Krankheiten, Operationen, Nikotinkonsum) in einem Fragebogen festgehalten. Die untersuchten Patienten stimmten nach Aufklärung durch den untersuchenden Arzt der zusätzlichen genetischen Untersuchung in schriftlicher Form zu. Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion in Kombination mit einer Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse (PCR-RFLP).

Im Rahmen der Untersuchungen zur genetischen Epidemiologie der Laktoseintoleranz erfolgte die genetische Diagnostik mit 300 anonymisierten DNA-Proben von Probanden europäischer Abstammung aus der Region Rostock mittels PCR-RFLP. Ergänzend wurden 139 dieser DNA-Proben mit einem Real-time-PCR-Verfahren genotypisiert. Zu interethnischen Vergleichszwecken erfolgten Analysen zusätzlicher 303 DNA-Proben einer anonymisierten Kohorte südkoreanischer Abstammung.

3.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte aus EDTA-antikoagulierten Vollblutproben unter Verwendung eines kommerziellen Kits (QIAamp Blood Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Isolierung bestand aus folgenden Schritten:

1. 20 µl der Proteaselösung wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 200 µl EDTA-Vollblut und 200 µl Pufferlösung AL auf einem Vortex (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) für 15 s gemischt und danach 10 min bei 56°C für die Lyse der Zellen inkubiert.
2. Nach kurzer Zentrifugation (Biofuge 13, Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) erfolgte die Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100 %), ein Mischen (Vortex, 15 s) und eine kurze Zentrifugation.

3. Die Mischung wurde auf eine Spin-Säule in einem 2 ml-Auffanggefäß aufgetragen und anschließend 1 min bei 8000 rpm (rounds per minute) zentrifugiert. Dabei vollzog sich die Bindung der DNA an die Matrix der Spin-Säule.
4. Das Filterröhrchen wurde in ein neues Auffanggefäß gesetzt und mit 500 µl Puffer AW1 unter Zentrifugation 1 min bei 8000 rpm gewaschen.
5. Danach wurden 500 µl Puffer AW2 zur Anreicherung der DNA in einem neuen 2 ml-Gefäß bei 14000 rpm für 3 min in einer Zentrifuge verwendet.
6. Die Elution der DNA von der Matrix fand mit 100 µl Pufferlösung AE nach Einsetzen des Filters in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß statt. Bei Raumtemperatur wurde die Spin-Säule 1 min inkubiert und danach 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert.
7. Eine Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration mit Hilfe einer photometrischen Messung bei 260 nm Wellenlänge sollte in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl etwa 3-12 µg DNA pro 200 µl Vollblut (15-60 ng/µl) ergeben. Die Reinheit der DNA sollte ein Absorptionsverhältnis (A260/A280) von 1,7-1,9 aufweisen.

3.3 Genotypisierung

3.3.1 PCR-RFLP

Die Analyse des genetischen Polymorphismus LCT-13910 erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und nachfolgender Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) nach der Methode von Büning et al. (2003) mit Modifikationen.

Zur Anwendung kamen zwei verschiedene Thermo-Cycler (Personal Cycler bzw. Personal T, Biometra, Göttingen, Deutschland), dazugehörige 0,5 ml-Reaktionsgefäße (bio-one, Greiner) und das Taq-PCR-Core-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).

PCR zum Nachweis des LCT-13910-Polymorphismus

Tabelle 3.4: Herstellung von 50 µl Reaktionsansatz für die DNA-Amplifikation zum Nachweis des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910.

Substanz	Menge
Genomische DNA	100 ng in 3 µl Puffer
10x PCR-Puffer (Tris-HCl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15 mM MgCl ₂ ; pH 8,7), (Qiagen)	5 µl
dNTP-Gemisch (10 mM, Qiagen)	0,5 µl
Vorwärts-Primer Laktase-13910-F (5'-GGA TGC ACT GCT GTG ATG AG) (BioTez GmbH, Berlin, Deutschland)	0,8 µl (20 µmol/l)
Rückwärts-Primer Laktase-13910-R (5'-CCC ACT GAC CTA TCC TCG TG) (BioTez GmbH, Berlin, Deutschland)	0,8 µl (20 µmol/l)
Taq-Polymerase (Qiagen)	2 IU (1 µl)
Q-Solution	10 µl
Aqua ster.	29,7 µl

Tabelle 3.5: Cyclo-Bedingungen für die DNA-Amplifikation zum Nachweis des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910.

PCR-Zyklus	Dauer (min)	Temperatur (°C)	Zykluszahl
Initiale Denaturierung der DNA	5	94	1 x
Denaturierung	1	94	30 x
Primer-Annealing	1	61	
Extension	1	72	
Finale Extension	5	72	1 x

Restriktionsverdau zum Nachweis des LCT-13910-Polymorphismus

Tabelle 3.6: Herstellung des Restriktionsverdaugemisches für den Einzelnukleotid-polymorphismus LCT-13910 und Durchführung des Restriktionsverdaus.

Substanz	Menge
PCR-Amplifikat (LCT-13910)	15 µl
Restriktionsenzym BsmF I (New England Biolabs (NEB), Schwalbach, Deutschland)	1 µl (2 IU)
Puffer 4 (NEB-Puffer-4, NEB)	2 µl
Rinderserumalbumin (NEB)	0,2 µl
Aqua ster.	1,8 µl
Inkubation für 2 Stunden bei 65°C (Unimax 1010, Heidolph, Kehlheim, Deutschland).	

Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde mit einem 2,5 % Agarose-Standardgel durchgeführt (Biozym LE Agarose, Oldendorf, Deutschland). Das Gel wurde pro 85 ml Ansatz mit 3 µl Ethidiumbromid-Lösung (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) versetzt.

Zu jeweils 15 µl des Restriktionsgemisches wurden 3 µl Probenpuffer (Blue/Orange 6x Loading Dye, Promega, Madison, WI, USA) hinzugefügt und 15 µl jeder Probe auf das Gel aufgetragen. 5 µl einer 100-Basenpaar-Leiter (Promega, Madison, WI, USA), versetzt mit 1 µl Probenpuffer, sowie eine Negativkontrolle wurden mit jeder Gelanalyse mitgeführt. Bei einer konstanten Spannung von 200 Volt wurde die Elektrophorese für 15 min mit dem Laufpuffer 1x Borax (10x Borax (19,07 g Borax pro 1 l Aqua ster.), pH 8,44) durchgeführt.

Dokumentation

Die Gele wurden auf einem UV-Lichttisch (Transilluminator, Biometra) fotografiert (GelCam, Polaroid Film Typ 667, Polaroid GmbH, Offenbach, Deutschland) und ausgewertet.

PCR-RFLP-Nachweis des Einzelnukleotidpolymorphismus an Position LCT-13910

Die Amplifikation der Zielsequenz erfolgte mit dem Vorwärts-Primer 5'-GGA TGC ACT GCT GTG ATG AG sowie dem Rückwärts-Primer 5'-CCC ACT GAC CTA TCC TCG TG und führte zu einem 448 bp (Basenpaaren) umfassenden PCR-Produkt (Büning et al. 2003). Das Wildtyp-Allel unterscheidet sich von der Variante lediglich durch ein Nukleotid. An Position LCT-13910 liegt beim Wildtyp-Allel die Base Cytosin (LCT-13910C) und bei der Variante die Base Thymin vor (LCT-13910T). Der Restriktionsverdau mit dem Enzym BsmF I führt bei bestehender Homozygotie für das Wildtyp-Allel LCT-13910C zu zwei Fragmenten von 351 und 97 Basenpaaren Länge. Durch die Variante entsteht eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym, sodass der 351 Basenpaare umfassende Teilabschnitt in Fragmente von 253 und 98 Basenpaaren gespalten wird. Homozygotie für das Wildtyp-Allel zeigt folglich zwei Fragmente (351 und 97 bp), Homozygotie für das veränderte Allel drei Fragmente (253, 98 und 97 bp) und die heterozygote Form vier Fragmente (351, 253, 98 und 97 bp). Die verschiedenen Restriktionsfragmentmuster erlauben eine sichere Identifizierung der drei möglichen Genotypen LCT-13910CC (Wildtyp), LCT-13910CT (heterozygoter Anlageträger) und LCT-13910TT (homozygoter Anlageträger) nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente (Abbildung 3.3).

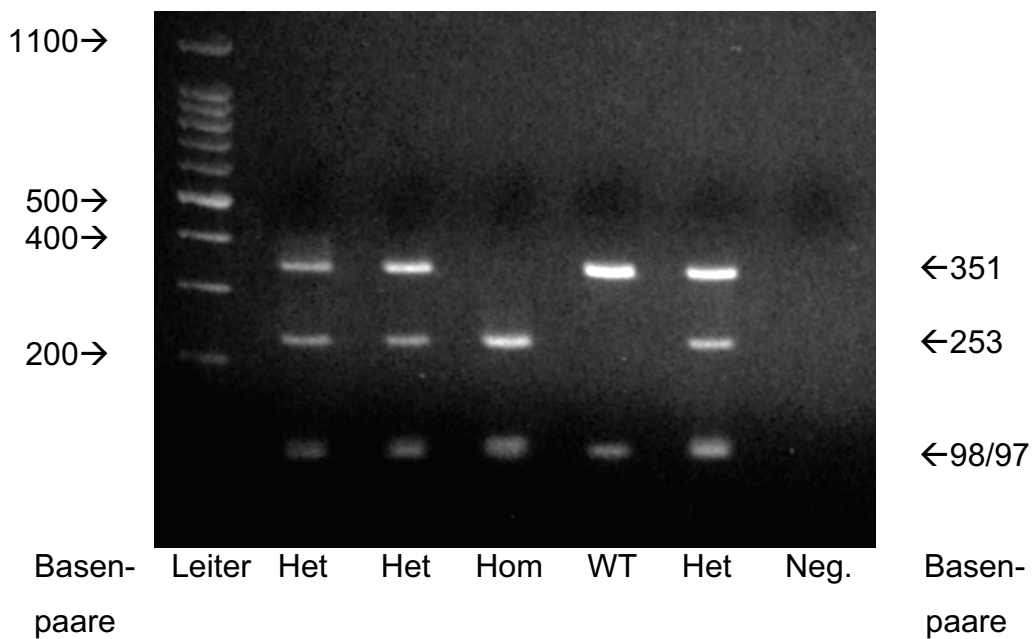


Abbildung 3.3: Nachweis der drei Genotypen des LCT-13910-Polymorphismus. Dargestellt sind heterozygote Anlageträger (Het), ein homozygoter Anlageträger für die Variante (Hom), die homozygote Wildtyp-Anlage (WT) sowie eine Negativkontrolle.

3.3.2 Real-time-PCR (LightCycler)

Es erfolgte die Amplifikation einer 225 bp umfassenden Zielsequenz unter Einbeziehung der Region des Einzelnukleotidpolymorphismus an Position LCT-13910. Zur Anwendung kamen der Vorwärts-Primer MCM6-F 5'-GTT AGA CGG AGA CGA TCA CG und der Rückwärts-Primer MCM6-R 5'-GCA GGG CTC AAA GAA CAA TC. Die PCR wurde in LightCycler-Format durchgeführt.

Real-time-PCR

Tabelle 3.7: Herstellung von 10 µl Reaktionslösung für die DNA-Amplifikation zur Analyse des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910 über sequenzspezifische Sonden im LightCycler-Verfahren.

Substanz	Menge
Genomische DNA	1 µl
10x PCR-Puffer	1 µl
dNTP-Gemisch (Roche Biochemicals)	0,2 mmol/L
3 mM MgCl ₂	0,2 mmol/L
Vorwärts-Primer MCM6-F (5'-GTT AGA CGG AGA CGA TCA CG)	0,2 µmol/L
Rückwärts-Primer MCM6-R (5'-GCA GGG CTC AAA GAA CAA TC)	0,5 µmol/l
Taq-Polymerase	1 IU (0,5 µl)
Dimethylsulfoxid 50 mL/L(Sigma)	0,2 mmol/L
Rinderserumalbumin 500 mg/L (New England BioLabs)	0,2 mmol/L
Sensorsonde (Wildtyp-Sonde) (5'-TAG <u>C</u> CC CTG GCC TCA-FLU) (MWG Biotech, Ebersbach, Deutschland)	0,2 µmol/L
Ankersonde (5'-Cy5.5-AGG AAC TCT CCT CCT TAG GTT GC-PHO) (MWG Biotech, Ebersbach, Deutschland)	0,2 µmol/L
Aqua ster.	ad 10 µl

Tabelle 3.8: LightCycler-Bedingungen für die DNA-Amplifikation zur Analyse des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910.

PCR-Zyklus	Dauer	Temperatur (°C)	Zykluszahl
Initiale Denaturierung der DNA	30 s	95	1 x
Denaturierung	0 s	95	45 x
Primer-Annealing	5 s	50	
Extension	10 s	72	
Nach dem letzten PCR-Zyklus Messung der Signalemission der Ankersonde unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung des Amplifikats (Temperaturbereich: 30-80°C; Temperatursteigerung: 0,1°C/s)			

Analyse des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910 im LightCycler-Verfahren

Zur Anwendung kamen eine Wildtypsonde und eine Ankersonde. Beide Sonden waren sequenzspezifisch und enthielten einen Fluoreszenzfarbstoff am 3'- bzw. 5'-Ende (Wildtyp-Sonde: 5'-TAG CCC CTG GCC TCA-FLU, Ankersonde: 5'-Cy5.5-AGG AAC TCT CCT CCT TAG GTT GC-PHO). Die Wildtypsonde hybridisiert am Matrizenfragment unter Einbeziehung des Einzelnukleotidpolymorphismus und weist an Position LCT-13910 die Base Cytosin auf (5'-TAG CCC CTG GCC TCA-FLU), die Ankersonde lagert sich in unmittelbarer Nachbarschaft an. Die Sondenhybridisierung wurde optimiert mit Hilfe der Software Melt calc (<http://www.meltcalc.com>). Infolge der engen Beziehung beider Sonden im Hybridisierungszustand führt die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes (FLU) der Wildtypsonde über eine LED-Lampe des LightCyclers zu einer Energieübertragung auf den benachbarten Fluoreszenzfarbstoff der Ankersonde (FRET; Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer), der seinerseits ein Fluoreszenzsignal emittiert (Abbildung 3.4).

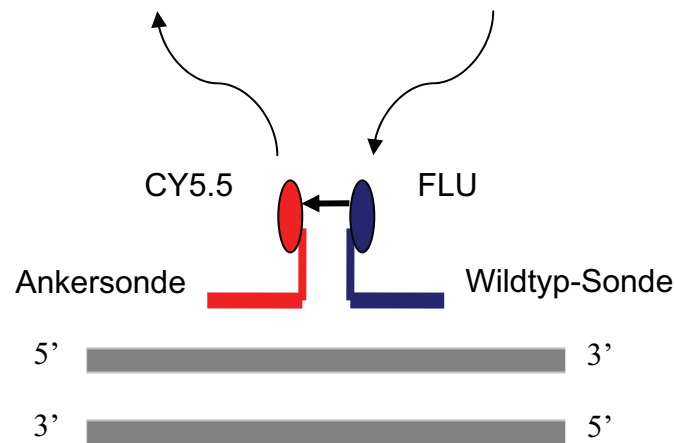


Abbildung 3.4: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) mit Darstellung der Lagebeziehung der sequenzspezifischen Sonden im Hybridisierungszustand.

Die Identifizierung des Genotyps erfolgte über eine Schmelzkurvenanalyse. Zur Erstellung der Schmelzkurve wird das von der Ankersonde abgegebene Fluoreszenzsignal gemessen und in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen. Solange beide Sonden an die Komplementärsequenz gebunden sind, wird ein Fluoreszenzsignal emittiert. Die Emission ist dabei proportional der gebildeten Menge DNA. Ein abfallendes Fluoreszenzsignal signalisiert die Ablösung der Sonden vom Matrizenfragment zum Zeitpunkt der Schmelztemperatur. Aufgrund der Sequenzspezifität der Wildtyp-Sonde fällt bei vorliegendem C-Allel die Bindung an das Matrizenfragment ausgeprägter aus als bei bestehendem T-Allel, wodurch sich die Schmelztemperaturen allelabhängig unterscheiden. Eine Schmelztemperatur von 45°C zeigt hierbei das Vorliegen des LCT-13910T-Allels an, eine Schmelztemperatur von 57°C weist auf das Vorliegen des LCT-13910C-Allels hin. Somit ergibt sich ein charakteristischer genotypabhängiger Schmelzkurvenverlauf mit einem singulären Signalmaximum bei 45°C bei bestehender Homozygotie für die Variante (LCT-13910TT) und einem singulärem Signalmaximum bei 57°C bei vorliegendem Wildtyp (LCT-13910CC). Ein heterozygoter Anlageträger (LCT-13910CT) weist ein doppelgipfliges Signal mit Maxima bei 45 und 57°C auf (Abbildung 3.5).

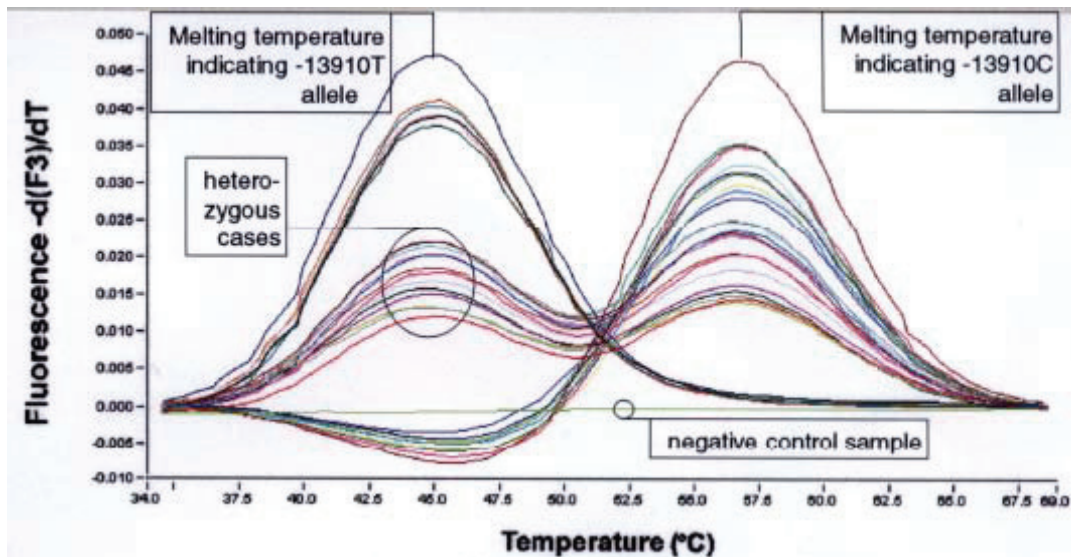


Abbildung 3.5: Darstellung der allelspezifischen Schmelzkurvenverläufe des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910.

3.4 Laktose-H₂-Atemtest

Vorbereitung und Durchführung

Die Messung des molekularen Wasserstoffs in der Expirationsluft erfolgte elektrochemisch durch ein H₂-Atemtestgerät (Stimotron, Wendelstein, Deutschland). Hierzu wurden jeweils 20 ml einer endexpiratorischen Atemprobe in das Atemtestgerät injiziert.

Zur Durchführung des Tests waren zwölfstündige Nüchternperiode, Verzicht auf ballaststoffreiche Mahlzeiten innerhalb der letzten 24 Stunden, Nikotinkarenz am Untersuchungstag sowie das Unterbleiben des morgendlichen Zähneputzens erforderlich.

Zur Erfassung anamnestischer Daten (zur Indikation des H₂-Atemtest führende Beschwerden, bekannte Beschwerden nach Aufnahme laktosehaltiger Nahrungsmittel, aktuelle Medikation, bestehende Erkrankungen, Operationen) wurde ein standardisierter Fragebogen erarbeitet (Abbildung 3.8). Während der Testdurchführung auftretende Symptome wurden in einem Ereignisprotokoll (Abbildung 3.9) festgehalten.

Die Durchführung der Tests beinhaltet folgende Schritte:

1. Über ein Atemrohr mit Anschluss an eine verschließbare 20 ml-Plastikspritze erfolgte zweimalig im Abstand von 5 min die Entnahme einer endexpiratorischen Nüchternatemprobe. Bei H₂-Basalwerten über 10 ppm wurde eine Munddesinfektion mit einer Chlorhexidin-Lösung durchgeführt.
2. Es schloss sich die orale Gabe der jeweiligen Testsubstanzen gelöst in CO₂-freiem Wasser mit nachfolgender Entnahme weiterer endexpiratorischer Atemproben in definierten zeitlichen Abständen an (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Modifikationen des Laktose-, Glukose- und Laktulose-H₂-Atemtests.

Substrat	Dosis	Flüssigkeitsmenge zum Lösen	Probengewinnung	Testdauer
Laktose	50 g	200 ml	alle 15 min	150 min
Glukose	50 g	200 ml	30., 60. und im weiteren Verlauf alle 15 min	120 min
Laktulose	10 g	200 ml	alle 15 min	150 min

Befundinterpretation des H₂-Atemtests

Bei sämtlichen H₂-Atemtests galt ein H₂-Anstieg von mehr als 20 parts per million (ppm) in der Expirationsluft des Patienten als pathologisch. Bei einem pathologisch erhöhten H₂-Anstieg im Laktose-H₂-Atemtest wurde die Diagnostik um einen Glukose-H₂-Atemtest erweitert, um eine bakterielle Fehlbesiedlung differenzialdiagnostisch ausschließen zu können (Keller et al. 2005). Um die Sensitivität des Laktose-H₂-Atemtests zu erhöhen, wurde bei einem ausbleibenden H₂-Anstieg ein Laktulose-H₂-Atemtest zum Ausschluss eines H₂-Non-Producer-Status angeschlossen (Abbildung 3.6).

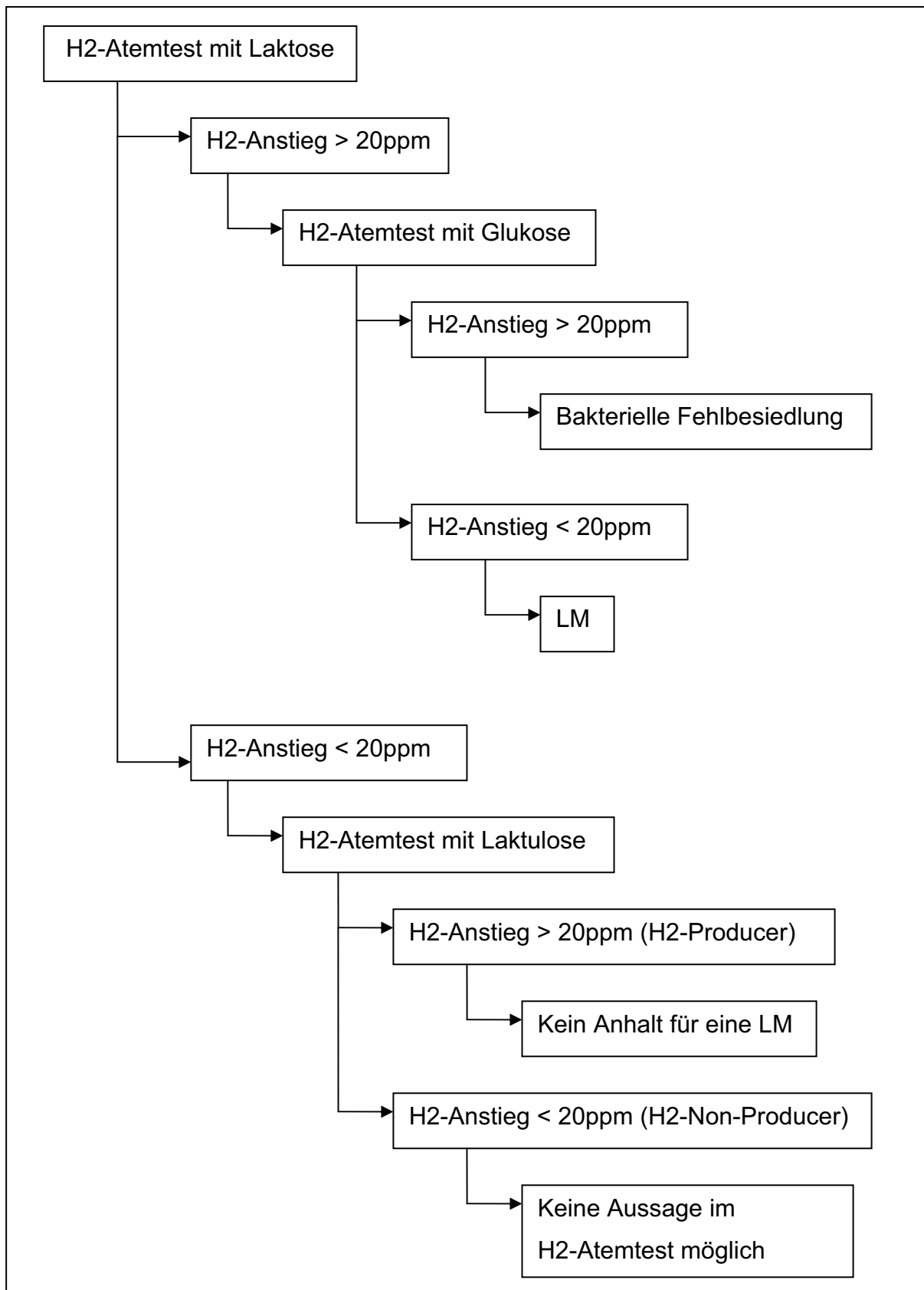


Abbildung 3.6: Schema zur Befunderhebung auf Grundlage des H₂-Atemtests (LM: Laktosemalabsorption).

Bei Vorliegen eines H₂-Non-Producer-Status war keine Aussage im H₂-Atemtest möglich. Die Befunderhebung erfolgte in diesem Fall unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik nach oraler Gabe der Testsubstanz Laktose. Bei Auftreten gastrointestinaler Symptome während der Testdurchführung wurde der Befund einer klinisch wahrscheinlichen Laktoseintoleranz erhoben, bei beschwerdefreien Patienten galt unter klinischen Gesichtspunkten eine Laktoseintoleranz als unwahrscheinlich (Abbildung 3.7).

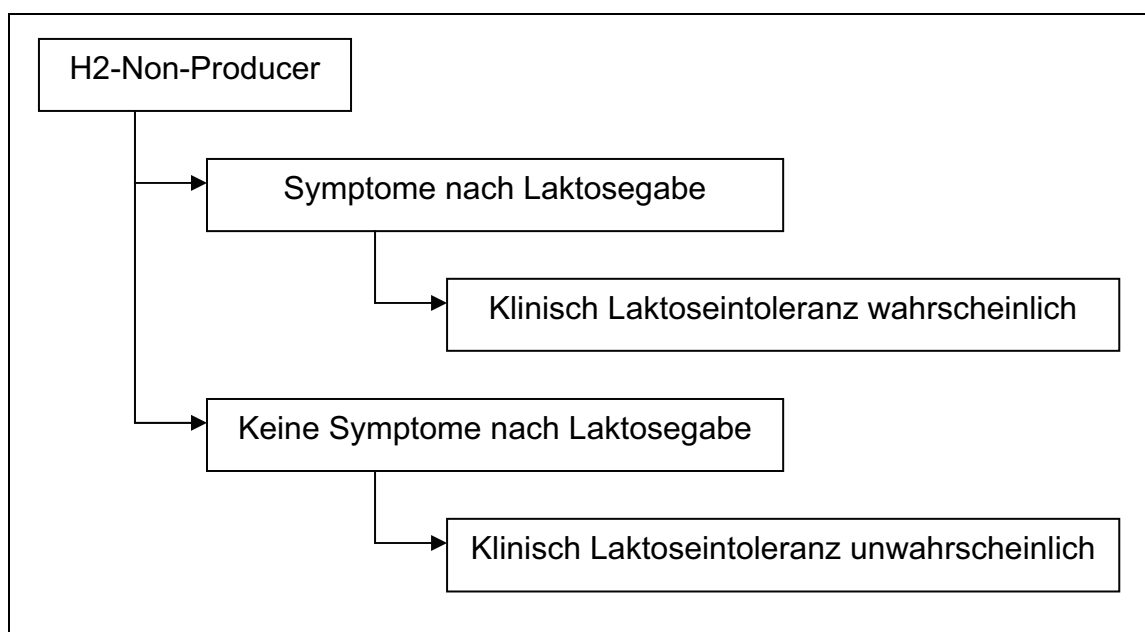


Abbildung 3.7: Schema der Befunderhebung bei vorliegendem H₂-Non-Producer-Status.

Name:	Geburtsdatum:
Vorname:	
1. Welche Beschwerden führten zur Durchführung des Atemtests? Bitte kreuzen Sie an	
<input type="checkbox"/> Blähungen <input type="checkbox"/> Übelkeit/Erbrechen <input type="checkbox"/> Bauchkrämpfe <input type="checkbox"/> Verstopfung <input type="checkbox"/> Durchfall <input type="checkbox"/> Bauchschmerzen <input type="checkbox"/> Bauchgeräusche <input type="checkbox"/> keine der aufgeführten Beschwerden	
2. Haben Sie gehäuft folgende Beschwerden bemerkt? Bitte kreuzen Sie an	
<input type="checkbox"/> Müdigkeit <input type="checkbox"/> Kopfschmerzen <input type="checkbox"/> depressive Stimmung <input type="checkbox"/> Konzentrationsstörungen <input type="checkbox"/> Schlafstörungen <input type="checkbox"/> Muskelschmerzen <input type="checkbox"/> Schwindelgefühl <input type="checkbox"/> keine der aufgeführten Beschwerden	
3. Gibt es einen Zusammenhang mit der Einnahme folgender Nahrungsmittel? Bitte kreuzen Sie an	
<input type="checkbox"/> Vollmilch <input type="checkbox"/> Schlagsahne <input type="checkbox"/> Joghurt <input type="checkbox"/> Magermilch <input type="checkbox"/> Milkschokolade <input type="checkbox"/> Schafs- oder Ziegenkäse <input type="checkbox"/> Buttermilch <input type="checkbox"/> Speisequark <input type="checkbox"/> Butter <input type="checkbox"/> Kaffeesahne <input type="checkbox"/> Kuhmilchkäse <input type="checkbox"/> Mayonnaise, Ketchup, Senf <input type="checkbox"/> Süßigkeiten (Fruchtgummi, Bonbons usw.) <input type="checkbox"/> keinen Zusammenhang bemerkt	
4. Sind Sie am Magen-Darm-Trakt operiert worden? Was wurde operiert?	
5. Existieren Darmerkrankungen? Welche (Zöliakie/Sprue, Morbus Crohn usw.)?	
6. Sind Nahrungsalergien bekannt? Welche?	
7. Nehmen Sie zur Zeit Medikamente ein? Welche?	
8. Rauchen Sie? Wann zuletzt?	
9. Wann haben Sie zuletzt gegessen oder getrunken? Was?	

Abbildung 3.8: Fragebogen zur Erfassung anamnestischer Daten.

Uhrzeit	Beschwerden
: (Einnahme der Laktoselösung)	
:	
:	
:	
:	
:	

Abbildung 3.9: Ereignisprotokoll zur Erfassung von Beschwerden während der Durchführung des Laktose-H₂-Atemtests.

4. Ergebnisse

4.1 Epidemiologische Studie

4.1.1 Probanden

Zur Abschätzung der Prävalenz des primären adulten Laktasemangels im Einzugsbereich Rostock wurden 300 anonymisierte DNA-Proben von Blutspendern des Universitätsklinikums Rostock in die Untersuchung eingeschlossen. Zur Bestätigung vorliegender Prävalenzdaten aus dem ostasiatischen Raum und zu interethnischen Vergleichszwecken erfolgte die genetische Analyse von 303 DNA-Proben einer anonymisierten südkoreanischen Kohorte. Ergänzend wurden 139 DNA-Proben durch eine Real-time-PCR im LightCycler-Format genotypisiert, um eine weitere molekulargenetische Methodik zu evaluieren.

4.1.2 Genotypisierung des LCT-13910-Polymorphismus in einer Rostocker Blutspenderkohorte

Es wurden 300 anonymisierte DNA-Proben von Blutspendern des Universitätsklinikums Rostock in die Untersuchung eingeschlossen. Die Genotypisierung wurde mittels PCR-RFLP durchgeführt.

Die genetische Analyse zeigte bei 85 Probanden (28,3 %) den Nachweis einer homozygoten Variante, 158 Probanden (52,7 %) stellten sich als heterozygote Anlageträger dar und 57 Probanden (19,0 %) wiesen mit einer Homozygotie für das Wildtypallel die Anlage für einen genetisch determinierten Laktasemangel auf (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10: Genotypverteilung der Rostocker Blutspenderkohorte.

Probanden	Gesamt	Homozygotie (LCT-13910TT)	Heterozygotie (LCT-13910-CT)	Wildtyp (LCT-13910CC)
Anzahl (n)	300	85	158	57
(%)	100	28,3	52,7	19,0

4.1.3 Genotypisierung des LCT-13910-Polymorphismus in einer südkoreanischen Kohorte

Das Screening von 303 anonymisierten DNA-Proben südkoreanischer Probanden durch die PCR-RFLP zeigte in allen Fällen (100%) den Nachweis einer Anlage für einen genetisch determinierten Laktasemangel. Heterozygote Anlageträger oder eine Homozygotie für die Variante wurden nicht ermittelt (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Genotypverteilung der südkoreanischen Kohorte.

Probanden	Gesamt	Homozygotie (LCT-13910TT)	Heterozygotie (LCT-13910-CT)	Wildtyp (LCT-13910CC)
Anzahl (n)	303	0	0	303
(%)	100	0	0	100

4.1.4 Genotypisierung des LCT-13910-Polymorphismus mittels Real-time-PCR (LightCycler)

Ergänzend wurden 139 DNA-Proben der Rostocker Blutspenderkohorte durch eine Real-time-PCR im LightCycler-Format analysiert, um eine zweite molekulargenetische Untersuchungsmethode zu evaluieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. med. N. von Ahsen und Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich (Abteilung für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Die Real-time-PCR im LightCycler-Format mit anschließender Schmelzkurvenanalyse konnte in allen Proben den vorliegenden Genotyp eindeutig identifizieren. Die vergleichende Analyse der 139 DNA-Proben durch Real-time-PCR und PCR-RFLP zeigte eine vollständige Konkordanz der Genotypen.

4.2 Klinische Studie

4.2.1 Patienten

Die klinische Studie umfasste 128 Patienten (93 Frauen und 35 Männer) von ursprünglich 143 Patienten, die konsekutiv zum Ausschluss einer Laktosemalabsorption durch einen H₂-Atemtest in der Abteilung für Gastroenterologie der Klinik

für Innere Medizin des Universitätsklinikums Rostock untersucht wurden. Die Patientenkohorte setzte sich aus 124 ambulanten und 4 stationären Patienten zusammen. Wesentliche zur Überweisung führende Beschwerden waren Flatulenzen (80%), Durchfälle (73%), Abdominalschmerzen (59%) und Borborygmen (52%).

Insgesamt wurden 15 Patienten der ursprünglich 143 Patienten von der Auswertung ausgeschlossen. Unberücksichtigt blieben neun Patienten, die zu notwendigen ergänzenden H₂-Atemtests (fehlender Laktulose-H₂-Atemtest in sieben Fällen, fehlender Glukose-H₂-Atemtest in vier Fällen) für eine Vervollständigung der H₂-Atemtest-Diagnostik nicht vorstellig wurden. In diesen Fällen konnte eine Ausschöpfung der diagnostischen Mittel des H₂-Atemtests nicht erfolgen. Zwei weitere Patienten blieben unberücksichtigt wegen vorangegangener Koloskopie bzw. aufgrund einer bestehenden antibiotischen Therapie. Weiterhin mussten vier Patienten entfallen, bei denen der Befund einer bakteriellen Fehlbesiedlung erhoben wurde.

Das mittlere Alter lag bei 42 Jahren (Range 14-75 Jahre) mit einer nahezu identischen Altersverteilung beider Geschlechtergruppen. Die Geschlechtsverteilung zeigte ein deutliches Übergewicht zugunsten der weiblichen Patientengruppe (Tabelle 4.12).

120 Patienten (94%) gaben den Wunsch an, dass bei Vorliegen einer genetischen Anlage für eine Laktoseintoleranz eine schriftliche Mitteilung an den Hausarzt erfolgen sollte. Drei Patienten (2%) lehnten eine Mitteilung ab, bei fünf Patienten (4%) erfolgte keine Angabe.

Tabelle 4.12: Darstellung der Patientenkohorte nach Geschlecht und Alter.

	Patienten		
		Range	%
Gesamt	128		100
Alter (Jahre)	42,4	14-75	
Frauen	93		72,7
Alter (Jahre)	42,3	16-71	
Männer	35		27,3
Alter (Jahre)	42,6	14-75	

4.2.2 Prävalenz der H2-Non-Producer

Ein H2-Producer-Status konnte bei 108 (84,4 %) von 128 Patienten ermittelt werden. Bei 20 (15,6 %) von 128 Patienten blieb der physiologische H2-Anstieg nach Gabe der Testsubstanz Laktulose aus, so dass der Befund eines H2-Non-Producerstatus vorlag (Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13: Prävalenz der H2-Producer und H2-Non-Producer.

Probanden	Gesamt	H2-Producer	H2-Non-Producer
Anzahl (n)	128	108	20
(%)	100	84,4	15,6

4.2.3 H2-Producer-Kohorte: H2-Atemtestbefunde und Genotypisierung

Bei 108 Patienten konnte im H2-Atemtest ein H2-Producer-Status erhoben werden. Der H2-Atemtest mit Laktose ergab bei 71 Patienten (65,7 %) keinen Anhalt für eine Laktosemalabsorption, bei 37 Patienten (34,3 %) wurde der Befund einer Laktosemalabsorption erhoben. 36 dieser 37 Patienten (97 %) zeigten während des Tests eine symptomatische Laktosemalabsorption (Laktoseintoleranz) mit Auftreten von Durchfällen, Blähungen, Borborygmen, Bauchkrämpfen, Übelkeit, Erbrechen, Aufstoßen oder Völlegefühl. Von den 71 Patienten ohne Anhalt für eine Laktosemalabsorption wiesen 15 Patienten (21%) Symptome während des Tests auf. 32,4% der Patienten mit einem signifikanten H2-Anstieg im Laktose-H2-Atemtest sahen zuvor keinen Zusammenhang mit der Aufnahme laktosehaltiger Lebensmittel. 62% der Patienten ohne Hinweis auf eine Laktosemalabsorption im H2-Atemtest vermuteten eine Intoleranz gegenüber Laktose als Ursache ihrer gastrointestinalen Beschwerden.

Sämtliche Patienten mit einem signifikanten H2-Anstieg in der Exhalationsluft nach Gabe der Testsubstanz Laktose zeigten im Glukose-Atemtest keinen Anhalt für eine bakterielle Fehlbesiedlung. Bei der Befunderhebung einer Laktosemalabsorption wurde eine laktosefreien Diät bzw. eine Laktasesubstitution empfohlen.

Die genetische Analyse der 108 Patienten umfassenden Kohorte ergab bei 73 Patienten (67,6 %) keine genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz (Genotyp

LCT-13910CT bzw. TT), während bei 35 Patienten (32,4 %) eine genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz (Genotyp LCT-13910CC) ermittelt wurde (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14: Ergebnisse des Laktose-H₂-Atemtests und des genetischen Tests der H₂-Producer-Kohorte (Genotyp CC: genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz; Genotyp CT/TT: keine genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz; LM: Laktosemalabsorption).

	LM im H ₂ -Atemtest	Keine LM im H ₂ -Atemtest	Gesamt
Genotyp CC	33	2	35 (32,4 %)
Genotyp CT/TT	4	69	73 (67,6 %)
Gesamt	37 (34,3 %)	71 (65,7 %)	108 (100 %)

Unter Berücksichtigung des H₂-Atemtests als Referenzmethode wurden für den genetischen Test eine Sensitivität von 89 %, eine Spezifität von 97 %, ein positiver Vorhersagewert von 94 % und ein negativer Vorhersagewert von 95 % ermittelt.

In sechs Fällen (5,6 %) zeigten sich diskrepante Ergebnisse zwischen Laktose-H₂-Atemtest und dem Genotyp:

Vier Patienten wiesen im Laktose-H₂-Atemtest eine Laktosemalabsorption auf bei fehlendem Nachweis einer genetischen Anlage für eine Laktoseintoleranz. Alle diese Patienten gaben Beschwerden nach Gabe der Testsubstanz Laktose an. Bei einem Patienten bestand der Verdacht auf eine Zöliakie, bei einem weiteren Patienten lag ein Zustand nach Magenoperation vor.

Zwei Patienten zeigten keinen Anhalt für eine Laktosemalabsorption im Laktose-H₂-Atemtest bei nachgewiesener genetischer Anlage für eine Laktoseintoleranz. Nach Gabe der Testsubstanz wurden in einem Fall Beschwerden angegeben (Tabelle 4.15).

Tabelle 4.15: Befunde der Patienten mit diskrepanten Ergebnissen aus Atemtest und genetischer Untersuchung (LM: Laktosemalabsorption; Genotyp CC: genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz; Genotyp CT/TT: keine genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz).

Alter, Geschlecht	H2-Atemtest-Befund, max. H2-Anstieg	Genotyp	Beschwerden nach Laktosegabe
30, männlich	LM, 24 ppm	TT	+
43, weiblich	LM, 31 ppm	CT	+
71, weiblich	LM, 32 ppm	TT	+
75, männlich	LM, 133 ppm	CT	+
23, weiblich	Kein Anhalt für LM, < 20 ppm	CC	-
22, weiblich	Kein Anhalt für LM, < 20 ppm	CC	+

4.2.4 H2-Non-Producer: Klinische Befunde und Genotypisierung

Der Laktulose-Atemtest erbrachte bei 20 von 128 Patienten (15,6 %) einen H2-Non-Producer-Status. Eine diagnostische Aussage im H2-Atemtest zu einer gegebenenfalls vorliegenden Laktosemalabsorption bzw. einer bakteriellen Fehlbesiedlung war bei dieser Kohorte nicht möglich. Die Befunderhebung richtete sich in diesen Fällen nach der vorliegenden Symptomatik nach Gabe der Laktose-testdosis, wobei ein Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden (Durchfälle, Blähungen, Borborygmen, Bauchkrämpfe, Übelkeit, Erbrechen, Aufstoßen, Völlegefühl) während der Testdurchführung klinisch eine Laktoseintoleranz wahrscheinlich machte. Entwickelten Patienten keine Beschwerden nach Gabe der Testsubstanz Laktose, so bestand klinisch kein Verdacht auf eine Laktoseintoleranz. Auch wenn klinische Parameter einen schlechten prädiktiven Wert bezüglich einer Laktosemalabsorption im Vergleich zum Laktose-Atemtest haben (Di Palma und Narvaez 1988), wurden die H2-Non-Producer in die Vergleichsstudie miteinbezogen, da sich für Patienten dieser Kohorte mit einem klinischem Verdacht einer Laktoseintoleranz dieselbe therapeutische Konsequenz ergab wie für Patienten mit einer im Laktose-Atemtest diagnostizierten Laktosemalabsorption.

Nach der Symptombewertung war bei 16 (80 %) von 20 Patienten eine Laktoseintoleranz unwahrscheinlich und bei vier (20 %) wahrscheinlich.

Die genetische Analyse dieser Kohorte ergab bei 19 (95 %) von 20 Patienten keinen Nachweis einer Anlage für eine Laktoseintoleranz und ein Patient (5 %) wies die genetische Anlage der Laktoseintoleranz auf.

Die Vergleichstudie zeigte in 5 (25 %) von 20 Fällen ein diskrepantes Ergebnis. Sämtliche vier Patienten mit dem klinischen Befund einer wahrscheinlichen Laktoseintoleranz zeigten keine genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz. Ein Patient ohne klinische Hinweise auf eine Laktoseintoleranz wies eine genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz auf (Tabelle 4.16).

Tabelle 4.16: Ergebnis der klinischen Beurteilung und des genetischen Tests der H2-Non-Producer (Genotyp CC: genetische Anlage für Laktoseintoleranz; Genotyp CT/TT: keine genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz; LIT: Laktoseintoleranz).

	Klinisch LIT wahrscheinlich	Klinisch LIT unwahrscheinlich	Gesamt
Genotyp CC	0	1	1 (5 %)
Genotyp CT/TT	4	15	19 (95 %)
Gesamt	4 (20 %)	16 (80 %)	20 (100 %)

5. Diskussion

5.1 Epidemiologische Studie

Der primäre adulte Laktasemangel ist die bedeutendste Ursache einer Laktoseintoleranz und stellt weltweit den häufigsten erblichen Enzymmangel dar (Lomer et al. 2008). Die resultierende Laktasedefizienz kann nach dem Verzehr laktosehaltiger Lebensmittel zu abdominalen Beschwerden führen. Vorrangig treten Diarrhoen, Flatulenz, Meteorismus und Borborygmen auf. Einige Autoren berichten darüber hinaus über ein breites Spektrum systemischer Beschwerden wie Kopfschmerz, Übelkeit, Müdigkeit, depressive Verstimmung, Muskelschmerzen und allergische Reaktionen, die durch eine Laktoseintoleranz begründet sein sollen. Angesichts des unspezifischen Beschwerdebildes der Laktoseintoleranz ist eine sorgfältige Anamnese der Ernährungsgewohnheiten der Patienten unerlässlich, um die Verdachtsdiagnose einer Laktoseintoleranz bei entsprechender Symptomatik in Betracht ziehen zu können.

Eine wesentliche Differenzialdiagnose der Laktoseintoleranz stellt das Reizdarmsyndrom dar, bei dem es sich um eine funktionelle Störung des Gastrointestinaltraktes handelt (Read 1994) und das sich so ätiologisch klar von einer Laktoseintoleranz abgrenzt. Die Prävalenz der Laktosemalabsorption scheint bei Patienten mit Reizdarmsyndrom deutlich höher zu liegen als bei gesunden Kontrollgruppen (Sciarretta et al. 1984). In einer Studie nordeuropäischer Probanden waren 24,3 % der Patienten mit einem diagnostizierten Reizdarmsyndrom und lediglich 5,7 % der gesunden Kontrollprobanden von einer Laktosemalabsorption betroffen (Böhmer und Tuynman 1996). Alpers konnte nachweisen, dass eine Laktoserestriktion bei Patienten mit einem Reizdarmsyndrom und einer koexistierenden Laktosemalabsorption in 52 % der Fälle zu einer Besserung der Beschwerden führte (Alpers 2006). Ferner muss in der klinischen Praxis Berücksichtigung finden, dass ein Großteil der Patienten sich keines Zusammenhangs zwischen der Aufnahme laktosehaltiger Lebensmittel und dem Auftreten gastrointestinaler Symptome bewusst ist (Tolliver et al. 1994).

Besondere Bedeutung gewinnt die Laktoseintoleranz in Regionen mit einer hohen Prävalenz des primären adulten Laktasemangels, wenn Milchprodukte traditionell einen wesentlichen Bestandteil der Ernährung ausmachen. Daher ist es notwendig,

sich die weltweite Prävalenz und die regionalen Schwankungen des primären adulten Laktasemangels zu vergegenwärtigen und gegebenenfalls zu aktualisieren. Die Prävalenz des primären adulten Laktasemangels beträgt weltweit etwa 70 % und unterliegt erheblichen regionalen Schwankungen. Der Großteil der bisherigen epidemiologischen Studien basierte auf konventionellen diagnostischen Verfahren in Form oraler Laktosetoleranztests. Die Selektionskriterien für Probanden und die Modifikationen der Testverfahren müssen dabei rückblickend als uneinheitlich angesehen werden (Flatz und Rotthauwe 1977). Zusätzlich muss Berücksichtigung finden, dass durch konventionelle diagnostische Verfahren lediglich der indirekte Nachweis eines Laktasemangels ohne weitere Differenzierung zwischen der primären und sekundären Form möglich ist. Aufgrund des unbestritten hohen Anteils der primären adulten Form unter laktasedefizienten Probanden lassen sich dennoch anhand der bisher gewonnenen Daten typische geographische Verteilungsmuster des primären adulten Laktasemangels nachweisen.

Unter Betrachtung der weltweit erhobenen Prävalenzdaten zum primären adulten Laktasemangels zeigen sich die geringsten Prävalenzen in Nord- und Zentraleuropa, in Populationen europäischer Abstammung der USA, Kanadas, Australiens und Neuseelands und in einigen Nomadenvölkern in Afrika (Hima, Tussi, Fulani) und der arabischen Halbinsel (Beduinen). Ein besonders hoher Verbreitungsgrad des primären adulten Laktasemangels lässt sich unter der schwarzafrikanischen Bevölkerung, im südost- bzw. ostasiatischen Raum und den Ureinwohnern Nordamerikas und Australiens finden. Die Prävalenzen in Süd- und Osteuropa zeigen im Vergleich zu den vorangegangenen Populationen ein intermediäres Bild. Innerhalb Europas zeigt sich tendenziell ein Nord-Süd- und West-Ost-Gefälle der Verbreitung des primären adulten Laktasemangels mit den niedrigsten Prävalenzen im nord- bzw. westeuropäischen Raum (Abbildung 5.10, Tabelle 5.17).

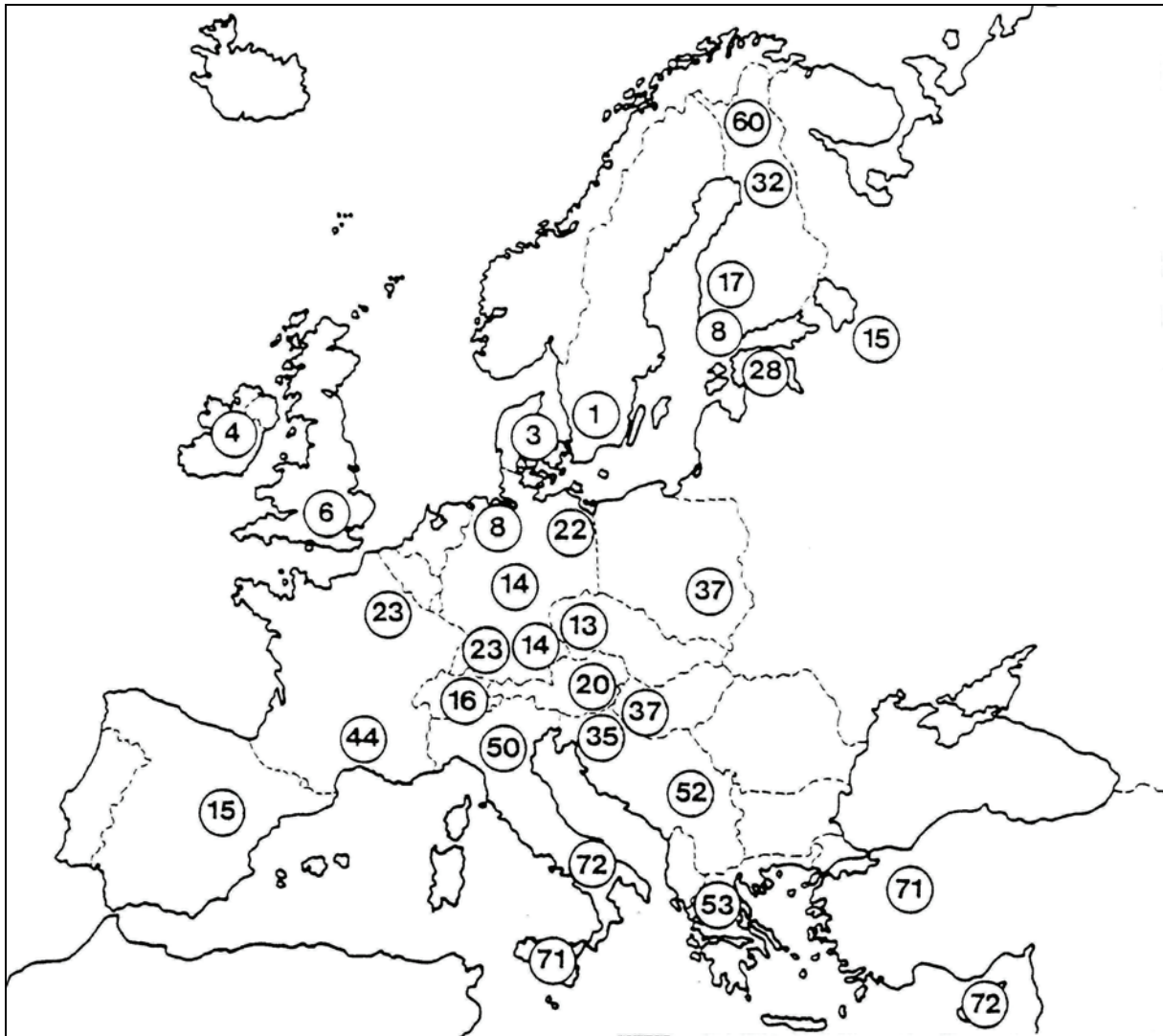


Abbildung 5.10: Prävalenz des primären adulten Laktasemangels innerhalb Europas in Prozent (Gudmand-Hoyer und Skovbjerg 1996).

Tabelle 5.17: Prävalenz des primären adulten Laktasemangels ausgewählter Staaten bzw. Regionen innerhalb Europas (Swallow und Hollox 2001).

Land/Region	Probanden	Laktosemalabsorber (%)
Niederlande	14	0
Schweden	400	1
Dänemark	761	3
Irland	50	4
Großbritannien (weiße Bevölkerung)	163	5
Tschechische Republik	200	13
Deutschland (alte Bundesländer) *	1805	15
Schleswig-Holstein und Hamburg	255	12,5
Niedersachsen und Bremen	328	14,3
Nordrhein-Westfalen	346	12,7
Hessen	70	12,9
Rheinland-Pfalz und Saarland	56	8,9
Baden-Württemberg	302	21,9
Bayern	433	14,8
Berlin, Ausländer und Unbekannte	15	6,7
Spanien	265	15
Schweiz	64	16
Finnland (finnisch sprachig)	449	17
Österreich	528	20
Frankreich (Norden)	62	23
Estland	902	27
Slowenien	153	35
Polen	275	37
Ungarn	262	41
Frankreich (Süden)	71	44
Italien (Norden)	383	50
Italien (Süden)	197	67
Italien (Sizilien)	100	71

* Flatz et al. 1982

In Deutschland wurde zuletzt 1982 eine größere epidemiologische Studie zum primären adulten Laktasemangel veröffentlicht (Flatz et al. 1982). In dieser Untersuchung wurde die Prävalenz des primären adulten Laktasemangels mithilfe des H₂-Atemtestverfahrens erhoben. Die Studie umfasste das Gebiet der BRD vor 1990 und schloss 1805 Patienten ein. Patienten mit chronischen oder akuten gastrointestinalen Beschwerden wurden zur Vermeidung der Erfassung sekundärer Formen der Laktosemalabsorption ausgeschlossen. Ferner war anzunehmen, dass bei einem mittleren Probandenalter von 20,3 Jahren der genetisch determinierte Rückgang der Laktaseaktivität potentieller Laktosemalabsorber bereits abgeschlossen war. Die Studie ergab für das Gebiet der alten Bundesländer eine durchschnittliche Prävalenz der Laktosemalabsorption von 15 % (Tabelle 5.17).

Um Rückschlüsse auf die Prävalenz des primären adulten Laktasemangels im Gebiet der ehemaligen DDR zu ziehen, erfolgte eine weitere Kategorisierung der Probanden nach Herkunft der Großeltern. Hierbei konnten 246 Probanden rekrutiert werden, deren familiäre Wurzeln dem Gebiet der heutigen neuen Bundesländer und Westpolens zugeordnet werden konnten. Die Auswertung dieser 246 Probanden ergab eine Prävalenz des primären adulten Laktasemangels von 22,4 %.

Angesichts der neuen geopolitischen Situation und der Verfügbarkeit molekular-genetischer Nachweisverfahren erscheint die Aktualisierung der Daten in Deutschland notwendig. Dafür sprechen unter anderem erhebliche Abweichungen des Verbreitungsgrades des primären adulten Laktasemangels benachbarter Länder im Vergleich zu älteren Prävalenzdaten, wie etwa ein kürzlich durchgeführtes molekulargenetisches Screening zum primären adulten Laktasemangel in Schweden zeigen konnte (Almon et al. 2007). Ebenso führte ein im Jahr 2003 durchgeführtes molekulargenetisches Screening zum LCT-13910-Polymorphismus in einer 187 Probanden umfassenden Kohorte aus dem Berliner Raum zu der Annahme, dass die Prävalenz des primären adulten Laktasemangels in Deutschland ansteigt (Büning et al. 2003). Außerdem sind der Studie von Flatz et al. (1982) keine detaillierten Daten zur Prävalenz des primären adulten Laktasemangels im Nordosten Deutschlands zu entnehmen.

Die vorgestellte Studie stellte sich das Ziel, mittels eines molekulargenetischen Screenings die Prävalenz des primären adulten Laktasemangels im Einzugsbereich Rostock zu erheben und die gewonnenen Daten mit den Ergebnissen epidemiologischer Studien angrenzender Regionen zu vergleichen. Dazu wurden in

die Studie 300 DNA-Proben anonymisierter Blutspender des Universitätsklinikums Rostock einbezogen.

Die Untersuchung führte bei 19 % (57 Probanden) zum Nachweis einer genetischen Anlage für eine Laktoseintoleranz, während 81 % (243 Probanden) keine erbliche Anlage für einen Laktasemangel aufwiesen.

Die gewonnenen Daten sind gut mit der Verbreitung der Laktosemalabsorption angrenzender Regionen vereinbar und bestätigen das in vorangegangenen Studien erhobene tendentielle West-Ost- und Nord-Süd-Gefälle des primären adulten Laktasemangels innerhalb Europas: Nach der älteren Studie betrug sie für das Gebiet Schleswig-Holstein und Hamburg 12,5 % und für das Gebiet Niedersachsen und Bremen 14,3 % (Flatz 1982). Für Polen wurde eine Prävalenz von 37 % angegeben (Swallow und Hollox 2001). Die vermutete Prävalenz der Laktosemalabsorption des Gebietes der heutigen neuen Bundesländer und der Gebiete Westpolens lag bei 22,4 % (Flatz et al. 1982). Für Schweden und Dänemark wurden Prävalenzen von 1 bzw. 3 % gefunden, in Italien schwankt die Prävalenz zwischen 50 und 71 % (Swallow und Hollox 2001).

Ein vor wenigen Jahren durchgeführtes molekulargenetisches Screening einer 187 Probanden umfassenden Kohorte aus dem Berliner Raum ergab einen Verbreitungsgrad des primären adulten Laktasemangels von 21,4 % (Büning et al. 2003) und lag damit deutlich über der mit 6,7 % angegebenen Prävalenz für diese Region (Flatz et al. 1982). Diese Daten legten die Vermutung nahe, dass die Prävalenz des primären adulten Laktasemangels in Deutschland ansteigt. Eine Bestätigung dieses Trends ist in der vorliegenden Arbeit aufgrund fehlender Vergleichsdaten im Rostocker Raum nicht möglich. Dennoch lässt die von Flatz et al. mit lediglich 12,4 % ermittelte Prävalenz für Schleswig-Holstein eine wachsende Verbreitung des primären adulten Laktasemangels auch im Nordosten Deutschlands vermuten (Flatz et al. 1982).

Die detaillierte Betrachtung der vorliegenden Prävalenzdaten im ostasiatischen Raum verdeutlicht den extrem hohen Verbreitungsgrad des primären adulten Laktasemangels in dieser Region. In Thailand und Vietnam wurden Prävalenzen von 100 % (Flatz und Saengudom 1969, Anh et al. 1977), in Indonesien von 91 % (Surjono et al. 1973), in Taiwan von 100 % und in Japan von 81 % (Swallow und Hollox 2001) nachgewiesen.

Zur Bestätigung vorliegender Prävalenzdaten zum primären adulten Laktasemangel im südostasiatischen Raum und zu interethnischen Vergleichszwecken erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine molekulargenetische Untersuchung von 303 anonymisierten DNA-Proben südkoreanischer Probanden. In sämtlichen 303 Fällen (100%) konnte hierbei mit der DNA-Variante LCT-13910CC der molekulargenetische Marker des primären adulten Laktasemangels nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Studie erhobene Prävalenz des primären adulten Laktasemangels von 100% bei südkoreanischen Probanden bestätigt den sehr hohen Verbreitungsgrad des primären adulten Laktasemangels im ostasiatischen Raum.

Um die weltweit divergierende Prävalenz des primären adulten Laktasemangels zu erklären, wurden zwei unterschiedliche Hypothesen aufgestellt:

Die sogenannte adaptive Hypothese unterstützt die Behauptung, dass die Laktaseexpression substratabhängig gesteuert wird. Die Befürworter dieser Hypothese argumentieren, dass eine im Alter auftretende Laktasedefizienz durch mangelnden alltäglichen Milchkonsum begründet ist. Das würde die niedrige Laktaseaktivität in Regionen mit laktosearmer bzw. laktosefreier Ernährung erklären. Die adaptive Hypothese steht jedoch im Widerspruch zu den in verschiedenen Publikationen mitgeteilten Ergebnissen stehen, wonach die intestinale Laktaseaktivität durch kontinuierliche Milchezugabe beim Menschen nicht induziert werden konnte (Rosensweig 1971, Gilat et al. 1972).

Die derzeit favorisierte kulturell historische Hypothese basiert auf einem genetischen Selektionsmodell. Sie wurde durch Simoons erstmalig publiziert (Simoons 1970) und in weiteren Studien ausgearbeitet (McCracken 1971, Johnson et al. 1974, Flatz und Rotthauwe 1977, Simoons 1978). Ihr liegt die Annahme zugrunde, dass eine vor mehreren Jahrtausenden aufgetretene Mutation zur Laktasepersistenz führte. Die resultierende Fähigkeit, Milch und Milchprodukten als Nahrungsquelle zu verwenden, soll zu einem Selektionsvorteil geführt haben. Zur Aufrechterhaltung der kulturell historischen Hypothese trägt bei, dass in Regionen, in denen Viehwirtschaft und Milchkonsum eine lange Tradition haben, die Prävalenz des primären adulten Laktasemangels relativ gering ausfällt. Insbesondere sind hierbei die nordeuropäischen Populationen (Sahi 1994) und einige Nomadenstämme Afrikas und der arabischen Halbinsel (Kretchmer et al. 1971, Cook und Al-Torki 1975) zu nennen.

Enattah et al. konnten durch Haplotypstudien des Laktasegens nachweisen, dass die zur Laktasepersistenz führende DNA-Variante LCT-13910 erstmalig im Gebiet westlich des Uralgebirges und nördlich des Kaukasus vor etwa 5000 bis 12000 Jahren auftrat (Enattah et al. 2007). Die niedrige Prävalenz des primären adulten Laktasemangels in nordeuropäischen Populationen eröffnete Überlegungen zu einer Migrationstheorie, nach der Farmer aus der Region westlich des Urals nach Nordeuropa migrierten. Diese Vermutungen wurden durch eine Studie bekräftigt, in der anhand molekulargenetischer Untersuchungen neusteinzeitlicher Skelette mit Fundort in Zentral- und Osteuropa ausnahmslos eine Homozygotie für das Wildtypallel nachgewiesen werden konnte (Burger et al. 2007).

Zur Genotypisierung des Einzelnukleotidpolymorphismus LCT-13910 stehen verschiedene methodische Prinzipien zur Verfügung. Die Kombination PCR-RFLP wurde in unterschiedlichen Variationen beschrieben (Büning et al. 2003, Chao und Sibley 2004, Högenauer et al. 2005). Alternativ kam die Pyrosequencing-Methode zur Anwendung (Nilsson und Johansson 2004). Ebenfalls Verwendung fand ein Revershybridierungsansatz auf einem Teststreifen (Tag et al. 2008) sowie das LightCycler-Verfahren mittels fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonden (Stolba et al. 2005, Bodlaj et al. 2006).

Zur Bestätigung früherer Ergebnisse erfolgte in der vorliegenden Untersuchung eine vergleichende genetische Analyse von 139 DNA-Proben mittels PCR-RFLP und LightCycler-Verfahren. Die Gegenüberstellung beider methodischer Ansätze erbrachte keine diskrepanten Ergebnisse und bestätigt, dass Real-time-PCR und PCR-RFLP für die Genotypisierung des LCT-13910-Polymorphismus gleichermaßen geeignet sind. Potentielle Probleme mit dem LightCycler-Verfahren wurden beim Vorliegen von Allelvarianten an den Positionen LCT-13907, LCT-13913 und LCT-13915 im Sinne veränderter Schmelzkurven beschrieben (Weiskirchen et al. 2007). In der vorliegenden vergleichenden Untersuchung wurden solche Phänomene jedoch nicht beobachtet.

Es stehen zwischenzeitlich mehrere Test- und Reagenzienkombinationen für den genetischen Nachweis der Laktoseintoleranz kommerziell zur Verfügung.

5.2 Klinische Studie

Laktose stellt das Hauptkohlenhydrat der Säugetiermilch dar. Das Disaccharid wird im Dünndarm durch das membranständige Enzym Laktase in seine Konstituenten

Glukose und Galaktose gespalten, welche im Unterschied zur Laktose resorbiert werden können. Die Laktase-Expression ist zeitlich reguliert und verringert sich mit fortschreitender Dünndarmentwicklung. Beim Menschen tritt dieser Rückgang der Enzymaktivität variabel nach dem Abstillen bis zum frühen Erwachsenenalter auf und wird unter dem Begriff primärer adulter Laktasemangel zusammengefasst. Etwa zwei Drittel der Weltbevölkerung sind von dieser genetisch bedingten Enzymdefizienz betroffen, die damit offensichtlich im Gegensatz zur weit weniger verbreiteten Laktasepersistenz die natürliche Anlage darstellt.

Der Laktasemangel kann nach Verzehr von laktosehaltigen Lebensmitteln zu gastrointestinalen Beschwerden und damit zur Laktoseintoleranz, der symptomatischen Laktosemalabsorption, führen. Die phänotypische Ausprägung der Hypolaktasie weist dabei erhebliche interindividuelle Unterschiede auf. Generell wird angenommen, dass laktasedefiziente Patienten ein bis zwei Gläser Milch, entsprechend 12 bzw. 24 g Laktose, beschwerdefrei vertragen können (Suarez et al. 1995, Vesa et al. 1996). Dennoch wird berichtet, dass einige Laktosemalabsorber bereits auf geringe Laktosemengen mit Symptomen reagieren (Suarez et al. 1997). Faktoren, die den Beschwerdegrad von Laktosemalabsorbern nach Verzehr laktosehaltiger Lebensmittel determinieren, waren daher Gegenstand zahlreicher Publikationen. Zu diesen sollen die absolute Zahl an Kolonbakterien, die Zusammensetzung der Kolonflora, der pH-Wert des Stuhls sowie die oroökale Transitzeit zählen. Es wurde hinsichtlich der Kolonbakterienzahl eine negative Korrelation zwischen der Inzidenz von Diarrhoen und der Masse an Kolonbakterien nachgewiesen (Zhong et al. 2004). Dabei scheinen insbesondere die beim bakteriellen Fermentationsprozess von Kohlenhydraten vermehrt anfallenden kurzkettigen Fettsäuren die Diarrhoeintensität abzuschwächen, da sie die Eigenschaft besitzen, rasch resorbiert zu werden und konsekutiv die Reabsorption von Flüssigkeit aus dem Darmlumen fördern (Argenzio et al. 1981). Kontrovers wird ferner die Bedeutung der laktaseproduzierenden Bifidobakterien des Dickdarms diskutiert. Hill führte die im Zuge einer kontinuierlichen Laktosegabe abnehmenden Beschwerden auf eine substratinduzierte vermehrte Aktivität der Bifidobakterien zurück (Hill 1983). Zhong et al. dagegen konnten bei laktasedefizienten Patienten, die mit einer unterschiedlichen Symptomausprägung auf die Gabe einer definierten Laktosedosis reagierten, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bifidobakterienpopulation verzeichnen und maßen dieser Bakterienpopulation eine

untergeordnete Rolle bei (Zhong et al. 2004). Als weiterer modulierender Faktor der klinischen Manifestation der Laktosemalabsorption wird die orozökale Transitzeit diskutiert. Sie ist neben der Laktaseaktivität die zweite determinierende Variable der Laktose-Digestionskapazität im Dünndarm. Vonk et al. wiesen in diesem Zusammenhang innerhalb einer Gruppe von Laktosemalabsorbern nach, dass zwischen der beschleunigten orozökalen Transitzeit und dem Auftreten gastrointestinaler Beschwerden nach Laktosegabe eine positive Korrelation besteht. Die verkürzte gastrointestinale Passagedauer war nach dieser Untersuchung nicht Folge eines osmotisch bedingten Effektes des malabsorbierten Zuckers, sondern Ausdruck einer physiologischen Schwankungsbreite der orozökalen Transitzeit (Vonk et al. 2003). Die klinische Manifestation der Laktosemalabsorption ist damit nicht ausschließlich vom Grad der konsumierten Laktosedosis abhängig, sondern scheint durch weitere Faktoren bedingt zu sein. Diese Beobachtung wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass das Ausmaß der H₂-Exhalation, die proportional zur bakteriellen Gasbildung im Kolon und somit zur malabsorbierten Laktosemenge ist (Bond und Levitt 1972), keine Assoziation mit der Symptomausprägung laktasedefizienter Probanden zeigt (Casellas et al. 2003, Di Stefano et al. 2004).

Zahlreiche laktasedefiziente Patienten vermuten keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten gastrointestinaler Beschwerden und der Aufnahme laktosehaltiger Lebensmittel. In einer Studie waren sich 52 % der Patienten mit einer im Laktose-H₂-Atemtest gesicherten Laktosemalabsorption nicht bewusst, dass laktosehaltige Lebensmittel Ursache ihrer gastrointestinalen Beschwerden sein können (Tolliver et al. 1994). Eine weitere Studie zeigte, dass über die Hälfte der Patienten mit einer selbstdiagnostizierten Laktoseintoleranz nach dem Resultat konventioneller diagnostischer Verfahren tatsächlich Laktoseabsorber waren (Peuhkuri und Vapaatalo 2000). Weitere Studien bestätigen, dass die Vorhersage einer Laktoseintoleranz anhand klinischer Patientenangaben nicht sicher möglich ist (DiPalma et al. 1988, Suarez et al. 1995).

Die vorliegende Untersuchung bekräftigt diese Ergebnisse: 32,4 % der Patienten mit einem signifikanten H₂-Anstieg im Laktose-H₂-Atemtest sahen zuvor keinen Zusammenhang mit der Aufnahme laktosehaltiger Lebensmittel. 62 % der Patienten ohne Hinweis auf eine Laktosemalabsorption im H₂-Atemtest vermuteten dagegen eine Intoleranz gegenüber Laktose als Ursache ihrer gastrointestinalen Beschwerden.

Der H₂-Atemtest stellt in der klinischen Praxis der Kohlenhydratmalabsorption wegen seiner geringen Kosten und nichtinvasiven Technik das diagnostische Mittel der Wahl dar. Die ursprüngliche Modifikation des H₂-Atemtests zur Diagnostik einer Laktosemalabsorption ist auf Metz et al. zurückzuführen und besteht aus einer Intervallmessung der H₂-Exhalationswerte über 2 Stunden nach Gabe von 2 g Laktose je Kilogramm Körpergewicht bis zu einer Maximaldosis von 50 g (Metz et al. 1975). Nach dieser üblichen Modifikation erfolgt die Diagnosestellung einer Laktosemalabsorption bei einem Anstieg des H₂-Exhalationswertes von über 20 ppm. Gemessen an der Referenzmethode der Dünndarmbiopsie schwanken die Angaben zur Sensitivität und Spezifität des Verfahrens zum Teil erheblich. Newcomer et al. ermittelten für den Laktose-H₂-Atemtest Werte von jeweils 100 % (Newcomer et al. 1975), während Arola et al. die Sensitivität und Spezifität mit 69 bzw. 96 % bezifferten (Arola et al. 1988). Angesichts dieser abweichenden Angaben muss das H₂-Atemtestverfahren kritisch beurteilt und mögliche Fehlerquellen bei der Interpretation des H₂-Atemtestergebnisses berücksichtigt werden.

Zu den möglichen Ursachen eines falsch-positiven Ergebnisses gehört die bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms, die zum sicheren Ausschluss eines Glukose-H₂-Atemtests bedarf (Keller et al. 2005). Die bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms ist charakterisiert durch eine abnorm hohe Bakterienzahl im oberen Gastrointestinaltrakt und zeichnet sich nach Gabe kohlenhydrathaltiger Testdosen durch einen H₂-Anstieg in der Exhalationsluft innerhalb der ersten Stunde der Testdurchführung aus. Ferner sind Fluktuationen erhöhter Basalwerte zu berücksichtigen, die als signifikanter H₂-Anstieg nach Laktosegabe fehlinterpretiert werden können (Perman et al. 1984, Kagaya et al. 1998). Daher ist vor der Testdurchführung für eine hinreichend lange Zeit der Verzicht auf faserreiche Mahlzeiten erforderlich (Kotler et al. 1982). Weiterhin ist die sorgfältige Munddesinfektion vor Gabe der Laktosetestdosis notwendig, um einen frühen H₂-Anstieg als Folge der ingestierten oropharyngealen Flora zu vermeiden (Thompson et al. 1986). Ebenso sollte durch Rauchverzicht vor Testbeginn eine Kontamination der Exhalationsluft vermieden werden (Tadesse et al. 1977). Ferner kann eine beschleunigte oroökale Transitzeit die Kontaktdauer des laktosehaltigen Chymus mit der Dünndarmschleimhaut verkürzen und im Sinne einer relativen Laktase-defizienz zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Vonk et al. 2003). Ebenso scheint die individuelle endexpiratorische Technik die detektierten H₂-Konzentrationen in der

Exhalationsluft zu beeinflussen (Strocchi et al. 1991). Strocchi und Levitt vermuteten zusätzlich, dass eine vermehrte Kotbewegung zu einer Freisetzung von intestinalen Restmengen an Wasserstoff und in der Folge zu falsch-positiven H₂-Exhalationswerten führen kann (Strocchi und Levitt 1992). Es konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass auch bei Laktoseabsorbern physiologischerweise Restmengen oral verabreichter Laktose in das Kolon gelangen mit konsekutiver H₂-Produktion und -Exhalation (Bond und Levitt 1976).

Zu den möglichen Ursachen eines falsch-negativen Ergebnisses zählt eine verstärkte körperliche Betätigung vor der Testdurchführung, die infolge der Hyperventilation eine signifikant erniedrigte H₂-Exhalation bedingen kann (Payne et al. 1983). Ebenso führen mechanische Kolonreinigungen vor Koloskopie oder eine bestehende Antibiotikatherapie für unbestimmte Zeit zu einer Beeinträchtigung der Kolonflora mit der Gefahr falsch-negativer Ergebnisse (Gilat et al. 1978). Gleichfalls kann ein H₂-Non-Producer-Status betroffener Patienten zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Dieser Patientengruppe liegt ein Übergewicht H₂-konsumierender Bakterien zugrunde, die das während der bakteriellen Fermentation von Kohlenhydraten entstehende H₂ zur Methanbildung verwenden. In diesem energiegewinnenden bakteriellen Stoffwechselprozess wird CO₂ durch H₂ zu Methan reduziert (Wolin 1981). Ein weiterer Einflussfaktor der bakteriellen H₂-Produktion ist der pH-Wert des Kolonmilieus. In einigen Studien konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Gabe nichtresorbierbarer Kohlenhydrate zu einer Ansäuerung des Kolonstuhls führte, wobei eine Verminderung des Stuhl-pH mit einer Abnahme der H₂-Exhalation korrelierte (Perman et al. 1981, Vogelsang et al. 1988). Es zeigt sich jedoch, dass bereits eine 24-stündige Kohlenhydratabstinenz die Beeinträchtigung der bakteriellen Gasbildung vollständig aufhebt (Perman et al. 1981). Diese Beobachtung bestätigte vorangegangene Studien, nach denen Stoffwechselprozesse der Kolonflora unter erniedrigten pH-Werten inhibiert werden (Vince et al. 1978). Eine Zusammenfassung möglicher Fehlerquellen des H₂-Atemtests zeigt Tabelle 5.18.

Tabelle 5.18: Potenzielle Ursachen falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse des H₂-Atemtests.

Falsch-positive Ergebnisse	Falsch-negative Ergebnisse
Bakterielle Fehlbesiedlung	Methanbildner
Erhöhte H ₂ -Basalwerte	Saurer Kolon-pH
Ingestion der oropharyngealen Flora	Hyperventilation
Testnahes Rauchen	Antibiotika
Physiologische Laktoserestmengen im Kolon	Mechanische Kolonreinigung zur Koloskopievorbereitung
Expirationstechnik	Expirationstechnik
Vermehrte Kolonmotilität	
Faserreiche Diät	

Seit der Einführung des H₂-Atemtests in der Diagnostik der Laktosemalabsorption werden die klassischen Modifikationen des Testverfahrens kontrovers diskutiert. Da die konventionelle Testdosis von 50 g Laktose, entsprechend einer Milchmenge von 1 Liter, selbst bei Probanden mit bioptisch gesicherter Laktasepersistenz zu gastrointestinalen Symptomen führen kann (Peuhkuri und Vapaatalo 2000), wurde die klinische Relevanz dieser ursprünglichen Modifikation des Testverfahrens (Metz et al. 1975) wiederholt in Frage gestellt. In den vergangenen Jahren wurde eine Verringerung der Testdosis auf physiologische Dosen von 12 bis 18 g Laktose, entsprechend 240 bzw. 360 ml Milch, vorgeschlagen (Solomons et al. 1980, Sciarretta et al. 1984, Tursi 2006). Da die H₂-Exhalation proportional zur malabsorbierten Laktosedosis ist (Bond und Levitt 1972), bestehen ebenfalls Empfehlungen zu einer Absenkung des bisher als signifikant bewerteten H₂-Anstiegs von 20 ppm (Di Stefano et al. 2004). Andere Autoren stufen den konventionellen Grenzwert weiterhin als klinisch gerechtfertigt ein, da sie gastrointestinale Beschwerden erst ab H₂-Exhalationswerten von über 20 ppm beobachteten (Solomons et al. 1980). Ferner wird von einigen Autoren als Substrat nicht Laktose in Reinform favorisiert, sondern empfohlen, entsprechende Testdosen in Form des natürlichen Mediums der Laktose, der Milch, zu verabreichen (Solomons et al. 1980, Sategna-Guidetti 1989). Da die Magenentleerung durch Proteine und Fette der Milch im Vergleich zur Laktosegabe in Reinform verzögert erfolgt, ist zur Erfassung erster signifikanter H₂-Exhalationswerte eine Verlängerung der Testdauer auf 3 bis 6

Stunden erforderlich, um eine hinreichend hohe Sensitivität des Tests zu gewährleisten (Rosado und Solomons 1983, Di Stefano et al. 2004). Ebenso sollte bei einer verringerten Dosis in Milchform eine Messung in stündlichen, besser in halbstündlichen Intervallen erfolgen (Rosado und Solomons 1983, Tursi 2006). Unter Berücksichtigung der erwähnten Publikationen müssen die Modifikationen des Laktose-H₂-Atemtests daher als uneinheitlich bewertet werden.

Im Jahre 2002 publizierten Enattah et al., dass die DNA-Variante LCT-13910CC einen genetischen Marker zum Nachweis eines primären adulten Laktasemangel darstellt (Enattah et al. 2002). Damit besteht prinzipiell die Möglichkeit, bei Patienten mit unklaren gastrointestinalen Beschwerden durch Anwendung eines genetischen Tests den Ausschluss einer genetischen Anlage für eine Laktoseintoleranz zu ermöglichen. Im Gegensatz zu dem in der Diagnostik einer Laktosemalabsorption etablierten Laktose-H₂-Atemtest würde die molekulargenetische Untersuchung ein für den Patienten relativ beschwerdefreies und zeitarmes Verfahren darstellen.

Die vorliegende Untersuchung hat das Ziel, den genetischen Test in der Diagnostik der Laktoseintoleranz zu evaluieren. Als Referenzmethode wurde der in der klinischen Praxis zum Ausschluss einer Laktoseintoleranz etablierte Laktose-H₂-Atemtest herangezogen. Der Laktose-H₂-Atemtest wurde bewusst als Referenzmethode herangezogen, da das Testverfahren unter den konventionellen, nichtinvasiven Verfahren als Methodik der Wahl gilt (Newcomer et al. 1975). Um die Sensitivität des H₂-Atemtests zu erhöhen, wurden weiterhin in der Vergleichsstudie H₂-Producer und H₂-Non-Producer gesondert betrachtet.

Die verwendete Modifikation des Laktose-H₂-Atemtests bestand aus der Gabe von 50 g Laktose und der nachfolgenden Messung der H₂-Exhalationswerte in 15-minütigen Intervallen über einen Zeitraum von zweieinhalb Stunden. Ein H₂-Anstieg von über 20 ppm wurde als Zeichen einer vorliegenden Laktosemalabsorption gewertet.

Die Auswertung des Atemtests der 108 Patienten mit einem nachgewiesenen H₂-Producerstatus erbrachte in 94,4 % der Fälle ein übereinstimmendes Ergebnis mit dem genetischen Test. 33 von 37 Patienten (89 %) mit einem pathologischen H₂-Anstieg im Laktose-H₂-Atemtest wiesen den Genotyp LCT-13910CC auf. 69 von 71 Patienten (97 %) mit ausbleibendem signifikantem H₂-Anstieg im Laktose-H₂-Atemtest zeigten den Genotyp LCT-13190CT bzw. TT.

Diese Daten ergaben für den genetischen Test eine Sensitivität von 89 %, eine Spezifität von 97 %, einen positiven Vorhersagewert von 94 % und einen negativen Vorhersagewert von 95 %.

Seit der Erstbeschreibung der genetischen Variante LCT-13910, die mit der Laktoseintoleranz assoziiert ist, wurde in einigen Studien der diagnostische Wert des genetischen Nachweises evaluiert. Teilweise können diese Untersuchungen hinsichtlich des Designs mit der vorliegenden Studie als vergleichbar gelten.

Bei der Untersuchung von 166 Patienten mit Laktoseintoleranzverdacht wurden für den genetischen Nachweis eine Sensitivität von 91 %, eine Spezifität von 96 %, ein positiver Vorhersagewert von 98 % und ein negativer Vorhersagewert von 83 % berichtet. Die Autoren empfehlen den genetischen Test bei Laktoseintoleranzverdacht und argumentieren, dass diese diagnostische Option bereits bei der initialen Patientenvorstellung genutzt werden kann. Die Überprüfung der Kosteneffizienz dieses Vorgehens stehe allerdings aus. Ein weiterer Vorteil des Gentests besteht in der Möglichkeit, primäre von sekundärer Laktoseintoleranz zu differenzieren (Büning et al. 2005).

Eine finnische Studie schloss 329 Patienten im Alter bis 20 Jahren mit dem Verdacht einer Laktoseintoleranz ein. Es erfolgte die biochemische Analytik der Laktaseaktivität in Dünndarmbiopsien als Goldstandard und der genetische Test erreichte dazu im Vergleich eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 100 % für das Alter jenseits des 12. Lebensjahres. Positiver und negativer prädiktiver Wert betragen 100 % und 98 %. Der genetische Test wurde als Erstdiagnostik im Sinne eines Screenings empfohlen (Rasinperä et al. 2004). Diese Studie war Anlass für kontroverse Diskussionen. Einerseits wurde vor der verfrühten breiten Anwendung der genetischen Untersuchung in Populationen, die keinen nordeuropäischen Ursprung aufweisen, gewarnt (Swallow 2006). Andererseits wurde die Eignung des Gentests ausdrücklich unterstützt und die Vorteile der Integration in einen diagnostischen Algorithmus wie folgt beschrieben. Bei Patienten mit einem negativen oder nicht eindeutigen Atemtest gelingt auf der Grundlage des Gentests sicher die Vermeidung falsch-negativer Befunde und weitergehende Untersuchungen können unterbleiben. Der Gentest ist hilfreich in der Interpretation von grenzwertigen Befunden des Atemtests und in der Differenzierung der primären von sekundären Formen der Laktoseintoleranz (Usai Satta et al. 2008).

Eine weitere Untersuchung aus Italien zeigt mit einer Sensitivität von 100 %, einer Spezifität von 96 % sowie positivem und negativem prädiktiven Wert von 98 bzw. 100 % ebenfalls die Qualität des genetischen Verfahrens (Schirru et al. 2007). Mit geringfügigen Abstrichen an der Sensitivität (75 %) bestätigte mit einer Spezifität von 99 % sowie positivem und negativem prädiktiven Wert von 97 bzw. 86 % eine weitere Untersuchung aus Österreich ebenfalls die sehr guten Ergebnisse der Genotypisierung (Högenauer et al. 2005).

Die Empfehlungen zum diagnostischen Vorgehen beim Verdacht einer Laktoseintoleranz unterliegen derzeit durch die neuen Möglichkeiten der genetischen Diagnostik einer raschen Dynamik. Zunehmend ist eine Akzeptanz für den Gentest zu konstatieren. Auf der Grundlage eigener Untersuchungen empfehlen Waud et al. als optimiertes Vorgehen die initiale Durchführung der Genotypisierung. Patienten mit dem Genotyp LCT-13910CC sollten sofort eine 12-wöchige laktosefreie Diät erhalten und ein Symptom-Monitoring erfolgen. Der Atemtest wird bei vorliegenden Genotypen LCT-13910CT bzw. LCT-13910TT empfohlen (Waud et al. 2008). Deutlich zurückhaltender wird der Stellenwert der genetischen Untersuchung von Terjung und Lammert bewertet, die initial den Atemtest und/oder die Genotypisierung empfehlen und beide Methoden als spezifische und sensitive Untersuchungen einstufen (Terjung und Lammert 2007).

Wie in allen anderen Untersuchungen gab es auch bei der vorliegenden Studie diskrepante Ergebnisse zwischen Atemtest und Genotypisierung, die bei sechs Patienten (5,6 %) auftraten.

Von 37 Patienten mit einem im Laktose-H₂-Atemtest ermittelten H₂-Anstieg von über 20 ppm zeigte die genetische Analyse bei vier Patienten (11 %) den Genotyp LCT-13910TT bzw. LCT-13910CT. Sämtliche Patienten beklagten gastrointestinale Beschwerden nach Laktosegabe. Für die bestehenden Diskrepanzen können folgende Erklärungen ursächlich sein:

Es erfolgte keine biopsische Abklärung der Patienten zum Nachweis einer möglichen sekundären Laktoseintoleranz, die für eine verringerte Laktaseaktivität verantwortlich sein könnte. Bei einem Patienten sollte laut Anamnesebogen zukünftig der Ausschluss einer Zöliakie erfolgen. Es soll darauf verwiesen werden, dass zwischenzeitlich ein Schnelltest für die Untersuchung von Biopsie-Material auf Laktaseaktivität zur Verfügung steht (Lactose Intolerance Quick Test Kit, Biohit PLC,

Helsinki, Finnland), der in einer Studie evaluiert wurde (Kuokkanen et al. 2006) und eine Alternative zur aufwendigen biochemischen Enzymanalytik darstellen könnte.

Zum zweiten ist eine beschleunigte orozökale Transitzeit mit der Folge einer verkürzten Kontaktzeit der laktosehaltigen Lösung im Dünndarm als mögliche Ursache eines pathologischen H₂-Anstiegs nicht auszuschließen. Ein Patient zeigte im Laktose-H₂-Atemtest nach 75 Minuten einen ersten signifikanten H₂-Anstieg. Der nachfolgende Laktulose-H₂-Atemtest ergab eine grenzwertig beschleunigte orozökale Transitzeit von 60 Minuten. Ein zweiter Patient mit diskrepantem Ergebnis wies im Laktose-H₂-Atemtest bereits nach 30 Minuten einen signifikanten H₂-Anstieg auf. Bei diesem Patienten konnte eine bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms im Glukose-H₂-Atemtest ausgeschlossen werden, ein Laktulose-H₂-Atemtest wurde jedoch nicht durchgeführt. Der deutlich frühzeitige H₂-Anstieg im Laktose-H₂-Atemtest lässt, auch wenn dieser nicht das Mittel der Wahl in der Diagnostik der orozökalen Transitzeit darstellt (Keller et al. 2005), eine beschleunigte gastrointestinale Passage nicht ausschließen. Der Umstand, dass der betroffene Patient in der Vergangenheit am Magen operiert wurde, bekräftigt die Vermutung einer postoperativ beschleunigten orozökalen Transitzeit.

Weiterhin zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass Probanden mit dem heterozygoten Genotyp LCT-13910CT nur eine etwa halb so hohe intestinale Laktaseaktivität aufweisen wie Probanden mit dem Genotyp LCT-13910TT (Rasinperä et al. 2004). Die in der vorliegenden Studie verwendete Testdosis von 50 g Laktose entspricht etwa dem Laktosegehalt eines Liters Milch. Es ist daher denkbar, dass bei den zwei heterozygoten Anlageträgern mit einer im Vergleich geringeren Laktaseaktivität die Enzymkapazität vorzeitig ausgeschöpft ist, sodass ein Teil der zugeführten Laktose malabsorbiert wurde. In einer Studie berichteten gesunde Kontrollprobanden ohne anamnesticke Hinweise auf gastrointestinale Symptome über Beschwerden nach Gabe einer Testdosis von 50 g Laktose (Matthews et al. 2005). Es wird daher angenommen, dass bei Anwendung einer geringeren Laktosetestdosis die Korrelation zwischen dem Laktose-H₂-Atemtest und dem genetischen Test verbessert werden könnte.

Zwei von 71 Patienten (3 %) mit einem im Laktose-H₂-Atemtest ermittelten H₂-Anstieg von weniger als 20 ppm wiesen mit dem Genotyp LCT-13910CC die genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz auf. Während des Tests beklagte einer dieser Patienten gastrointestinale Symptome, der zweite blieb beschwerdefrei. Ein

H₂-Non-Producer-Status konnte mittels Laktulose-H₂-Atemtest ausgeschlossen werden. Bei der Auswertung der vorliegenden, diskrepanten Befundkonstellation muss Berücksichtigung finden, dass der Zeitpunkt der Abnahme der Laktaseaktivität populationsabhängig schwankt. Tendenziell lässt sich feststellen, dass in Populationen mit einer geringen Prävalenz des primären adulten Laktasemangels der Rückgang der Laktaseexpression verhältnismäßig spät auftritt (Sahi 1994). In einer nordeuropäischen Kohorte war bei einem Teil der Probanden der genetisch determinierte Laktaseverlust erst um das 20. Lebensjahr abgeschlossen (Sahi et al. 1983). Bei einem Alter von 22 bzw. 23 Jahren der betroffenen Patienten kann ein verzögerter Laktaserückgang demnach nicht ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus wurde berichtet, dass nach einer Laktosegabe von 50 g ein erster signifikanter H₂-Anstieg zum Teil erst ab der 180. Minute nach Testbeginn zu verzeichnen war (Solomons et al. 1980). In der vorliegenden Untersuchung wurden H₂-Atemwerte lediglich bis zur 150. Minute gemessen. Ein späterer signifikanter H₂-Anstieg ist demnach bei diesen Patienten nicht auszuschließen.

Ferner wurde vermutet, dass neben dem LCT-13910-Polymorphismus weitere polymorphe Sequenzen bestehen könnten, die mit einer Laktasepersistenz assoziiert sind. In einer Studie konnte in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden, dass ein Individuum mit dem LCT-13910C-Allel entgegen der Erwartung eine hohe Laktase-Expression aufwies (Poulter et al. 2003).

Die Gruppe der H₂-Non-Producer wurde gesondert berücksichtigt, da innerhalb dieser Kohorte eine Aussage zur Laktosemalabsorption im H₂-Atemtest nicht möglich ist. Das ärztliche Personal unterteilte diese Kohorte anhand der Klinik in Patienten mit einer wahrscheinlichen Laktoseintoleranz und Laktosetoleranz. Im Falle der ersten Gruppe ergab sich die gleiche therapeutische Empfehlung wie bei Laktosemalabsorbieren mit nachgewiesenem H₂-Producer-Status.

Die Vergleichstudie aus klinischem Befund und genetischem Test erbrachte bei 15 von 20 Patienten (75 %) ein konkordantes Ergebnis. 15 von 16 Patienten (94 %) ohne gastrointestinale Beschwerden nach Laktosegabe wiesen keine genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz auf. Keiner der vier Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Laktoseintoleranz zeigte die genetische Anlage für eine Laktoseintoleranz. Die Vergleichstudie dieser Kohorte ergab somit fünf Diskrepanzen (25 %).

Die Ergebnisse der Vergleichsstudie der H₂-Non-Producer-Gruppe müssen mit Zurückhaltung bewertet werden, da die Klinik in der Diagnostik einer Laktosemalabsorption bzw. Laktoseintoleranz kein valides Kriterium darstellt (Villako et al. 1994). Nach einer Studie hatten 66 % der Patienten ohne einen signifikanten H₂-Anstieg nach Laktosegabe gastrointestinale Symptome entwickelt, während 11 % der Patienten mit einem signifikanten H₂-Anstieg dennoch keine Beschwerden nach der Testdosisapplikation aufwiesen (Hermans et al. 1997). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine weitere Untersuchung, nach der 31 % der Laktosemalabsorber nach Applikation von 50 g Laktose beschwerdefrei waren, 28 % der Laktoseabsorber hingegen nach Gabe der Testdosis gastrointestinale Symptome entwickelten (Peuhkuri und Vapaatalo 2000).

In der vorliegenden Untersuchung wiesen 15,6 % im Laktulose-H₂-Atemtest keinen signifikanten H₂-Anstieg auf. Die vorliegende Untersuchung bestätigt damit bisher veröffentlichte Prävalenzen zum H₂-Non-Producer-Status, wonach populationsabhängig bis zu 20 % der Bevölkerung nicht zu einer signifikanten H₂-Exhalation befähigt sind (Gilat et al. 1978, Hammer et al. 1996).

Zusammenfassung

Der primäre adulte Laktasemangel stellt weltweit den häufigsten erblichen Enzymmangel des Menschen dar. Kennzeichnend für diese Form der Laktasedefizienz ist eine zeitliche Regulation der Laktaseexpression, die sich bei Säugtieren mit fortschreitender Dünndarmentwicklung verringert.

Patienten mit Hypolaktasie können nach dem Konsum laktosehaltiger Lebensmittel gastrointestinale Beschwerden entwickeln. Die Klinik der Laktoseintoleranz ist unspezifisch und es bestehen Überschneidungen zu funktionellen Darmerkrankungen. Insbesondere in Regionen, in denen Milchprodukte einen wesentlichen Anteil in der Nahrung darstellen, sind daher Erhebungen zum Verbreitungsgrad des primären adulten Laktasemangels erforderlich.

Etwa zwei Drittel der Weltbevölkerung sind vom primären adulten Laktasemangel betroffen. In Europa lässt sich tendenziell ein Nord-Süd- und West-Ost-Gefälle des primären adulten Laktasemangels nachweisen. Größere epidemiologische Studien zur Prävalenz der adulten Hypolaktasie in Deutschland sind zuletzt in den 1980er Jahren erhoben worden und bezogen sich auf das Gebiet der alten Bundesländer.

In der klinischen Praxis gilt der Laktose-H₂-Atemtest als Mittel der Wahl zum Ausschluss einer Laktoseintoleranz. Das mehrstündige Verfahren ist mit einer Laktosebelastung des Patienten verbunden und führt in der Regel zur Ausprägung gastrointestinaler Beschwerden. Nachweislich wird über verschiedene Fehlerquellen berichtet, welche die Sensitivität und Spezifität des Verfahrens einschränken. Insbesondere das Kriterium der Positivität bleibt Gegenstand der Diskussion, was sich an den uneinheitlichen Modifikationen des Laktose-H₂-Atemtests zeigt.

Im Jahr 2002 wurde ein Einzelnukleotidpolymorphismus an der Genposition LCT-13910 identifiziert, dessen DNA-Variante LCT-13910CC eine hohe Assoziation mit dem Auftreten des primären adulten Laktasemangels aufwies, während die Genotypen LCT-13910CT bzw. TT mit einer Laktasepersistenz assoziiert waren. Durch dieses Verfahren besteht die Möglichkeit, Patienten mit dem Verdacht einer Laktoseintoleranz zeitarm und unter Vermeidung einer Laktoseexposition zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die erstmalige Erstellung von Prävalenzdaten des primären adulten Laktasemangels für Nordostdeutschland im Rahmen eines molekulargenetischen Screenings. Die Untersuchung beinhaltete 300 anonymisierte

DNA-Proben. Die Ergebnisse zeigten bei 19 % den Genotyp LCT-13910CC, bei 28,3 % den Genotyp LCT-13910TT und bei 52,7 % den Genotyp LCT-13910CT. Die ermittelte Prävalenz unterstreicht das Nord-Süd- und West-Ost-Gefälle des Verbreitungsgrades des primären adulten Laktasemangels innerhalb Europas. Unter Berücksichtigung älterer Prävalenzdaten aus dem norddeutschen Raum besteht ferner die Vermutung, dass die Prävalenz der adulten Hypolaktasie zunehmend ist. Zur Bestätigung dieser Hypothese muss die Prävalenz der primären adulten Hypolaktasie in weiteren Regionen Deutschlands aktualisierend untersucht werden. Zu interethnischen Vergleichszwecken erfolgte die genetische Analyse von 303 DNA-Proben einer anonymisierten südkoreanischen Kohorte. Die Genotypisierung zeigte in allen Fällen den Nachweis der DNA-Variante LCT-13910CC und bestätigte den hohen Verbreitungsgrad des primären adulten Laktasemangels im ostasiatischen Raum.

Zur Evaluierung einer weiteren molekulargenetischen Methodik zum Nachweis des Polymorphismus LCT-13910 erfolgte die Genotypisierung von 137 DNA-Proben mittels PCR-RFLP und Real-time-PCR im LightCycler-Format. Die vergleichende Studie zeigte vollständige Konkordanz und wies nach, dass sich neben der PCR-RFLP auch die LightCycler-Methodik für die eindeutige Identifikation der DNA-Varianten an Position LCT-13910 eignet.

Um die diagnostische Bedeutung des Einzelnukleotidpolymorphismus an Position LCT-13910 in der klinischen Praxis zu bewerten, erfolgte die Evaluierung des genetischen Tests unter Verwendung des Laktose-H₂-Atemtests als Referenzmethode. Die Vergleichsstudie umfasste 128 Patienten. Bei 108 Patienten (84,4 %) wurde ein H₂-Producer-Status ermittelt, bei 20 (15,6 %) ein H₂-Non-Producer-Status. Um die Validität der Referenzmethode zu erhöhen, wurden ausschließlich Patienten mit H₂-Producer-Status in die vergleichende Auswertung einbezogen. Die ermittelte Sensitivität und Spezifität der Genotypisierung betrug 89 bzw. 97 % mit einem positiven prädiktiven Wert von 94 % und einem negativen prädiktiven Wert von 95 %. Innerhalb der H₂-Non-Producer-Gruppe wurde die Klinik als Goldstandard berücksichtigt. Während der genetische Test seine Spezifität bewahrt (94 %), verliert sich die Sensitivität.

Weiterhin zeigte die Untersuchung, dass der genetische Test eine hohe Patientenakzeptanz findet, da 94 % der untersuchten Patienten die Mitteilung über das Ergebnis der genetischen Analyse wünschten.

7. Literaturverzeichnis

- Aign W, Elmadfa I, Fritzsche D, Muskat E. Die große GU-Nährwert-Kalorien-Tabelle. Gräfe & Unzer 2007
- Almon R, Engfeldt P, Tysk C, Sjöström M, Nilsson TK. Prevalence and trends in adult-type hypolactasia in different age cohorts in Central Sweden diagnosed by genotyping for the adult-type hypolactasia-linked LCT-13910C>T mutation. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:165-170.
- Alpers DH. Diet and irritable bowel syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:136-139.
- Anh NT, Thuc TK, Welsh JD. Lactose malabsorption in adult Vietnamese. *Am J Clin Nutr* 1977;30:468-469.
- Argenzio RA. Short-chain fatty acids and the colon. *Dig Dis Sci* 1981;26:97-99
- Arola H, Koivula T, Jokela H, Jauhiainen M, Keyriläinen O, Ahola T, et al. Comparison of indirect diagnostic methods for hypolactasia. *Scand J Gastroenterol* 1988;23:351-357.
- Auricchio S, Rubino A, Tosi R, Semenza G, Landolt M, Kistler H, et al. Disaccharidase activities in human intestinal mucosa. *Enzymol Biol Clin* 1963;74:193-208.
- Bayless TM, Rosensweig NS. A racial difference in incidence of lactase deficiency. A survey of milk intolerance and lactase deficiency in healthy adult males. *JAMA* 1966;197:968-972.
- Bayless TM, Rothfeld B, Massa C, Wise L, Paige D, Bedine MS. Lactose and milk intolerance: clinical implications. *N Engl J Med* 1975;292:1156-1159.
- Bedine MS, Bayless TM. Intolerance of small amounts of lactose by individuals with low lactase levels. *Gastroenterology* 1973;65:735-743.
- Bodlaj G, Stöcher M, Hufnagl P, Hubmann R, Biesenbach G, Stekel H, et al. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clin Chem* 2006;52:148-151.
- Böhmer CJ, Tuynman HA. The clinical relevance of lactose malabsorption in irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:1013-1016.

- Boll W, Wagner P, Mantei N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in human with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am J Hum Genet* 1991;48:889-902.
- Bond JH, Levitt MD. Use of pulmonary hydrogen (H₂) measurements to quantitate carbohydrate absorption. Study of partially gastrectomized patients. *J Clin Invest* 1972;51:1219-1225.
- Bond JH, Levitt MD. Quantitative measurement of lactose absorption. *Gastroenterology* 1976;70:1058-1062.
- Büller HA, Kothe MJ, Goldman DA, Grubman SA, Sasak WV, Matsudaira PT, et al. Coordinate expression of lactase-phlorizin hydrolase mRNA and enzyme levels in rat intestine during development. *J Biol Chem* 1990;265:6978-6983.
- Büning C, Genschel J, Jurga J, Fiedler T, Voderholzer W, Fiedler EM, et al. Introducing genetic testing for adult-type hypolactasia. *Digestion* 2005;71:245-250.
- Büning C, Ockenga J, Krüger S, Jurga J, Baier P, Dignass A, et al. The C/C (-13910) and G/G (-22018) genotypes for adult-type hypolactasia are not associated with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:538-542.
- Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, Thomas MG. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3736-3741.
- Campbell AK, Waud JP, Matthews SB. The molecular basis of lactose intolerance. *Sci Prog* 2005;88:157-202.
- Casellas F, Malagelada JR. Applicability of short hydrogen breath test for screening of lactose malabsorption. *Dig Dis Sci* 2003;48:1333-1338.
- Cavalli-Sforza LT, Strata A. Double-blind study on the tolerance of four types of milk in lactose malabsorbers and absorbers. *Hum Nutr Clin Nutr* 1987;41:19-30.
- Chao CK, Sibley E. PCR-RFLP genotyping assay for lactase persistence polymorphism upstream of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Genet Test* 2004;8:190-193.
- Cook GC, Al-Torki MT. High intestinal lactase concentrations in adult Arabs in Saudi Arabia. *Br Med J* 1975;3:135-136.
- Dahlqvist A, Hammond JB, Crane RK, Dunphy JV, Littman A. Intestinal lactase deficiency and lactose intolerance in adults. Preliminary report. *Gastroenterology* 1963;45:488-491.

- Dahlqvist A, Lindquist B. Lactose intolerance and protein malnutrition. *Acta Paediatr Scand* 1971;60:488-494.
- Debongnie JC, Newcomer AD, McGill DB, Phillips SF. Absorption of nutrients in lactase deficiency. *Dig Dis Sci* 1979;24:225-231.
- DiPalma JA, Narvaez RM. Prediction of lactose malabsorption in referral patients. *Dig Dis Sci* 1988;33:303-307.
- Di Stefano M, Missanelli A, Miceli E, Strocchi A, Corazza GR. Hydrogen breath test in the diagnosis of lactose malabsorption: accuracy of new versus conventional criteria. *J Lab Clin Med* 2004;144:313-318.
- Ellestad-Sayed JJ, Haworth JC, Hildes JA. Disaccharide malabsorption and dietary patterns in two Canadian Eskimo communities. *Am J Clin Nutr* 1978;31:1473-1478.
- Elliott FG, Cox J, Nyoma BL. [Lactose intolerance in adults in central Africa]. *Ann Soc Belg Med Trop* 1973;53:113-132.
- Enattah NS, Kuokkanen M, Forsblom C, Natah S, Oksanen A, Järvelä I, et al. Correlation of intestinal disaccharidase activities with the C/T-13910 variant and age. *World J Gastroenterol* 2007;13:3508-3512.
- Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002;30:233-237.
- Enattah NS, Trudeau A, Pimenoff V, Maiuri L, Auricchio S, Greco L, et al. Evidence of still-ongoing convergence evolution of the lactase persistence T-13910 alleles in humans. *Am J Hum Genet* 2007;81:615-625.
- Fang R, Olds LC, Santiago NA, Sibley E. GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G58-G67.
- Flatz G. Genetics of lactose digestion in humans. *Adv Hum Genet* 1987;16:1-77.
- Flatz G, Howell JN, Doench J, Flatz SD. Distribution of physiological adult lactase phenotypes, lactose absorber and malabsorber, in Germany. *Hum Genet* 1982;62:152-157.
- Flatz G, Rotthauwe HW. The human lactase polymorphism: physiology and genetics of lactose absorption and malabsorption. *Prog Med Genet* 1977;2:205-249.

- Flatz G, Saengudom C. Lactose tolerance in Asians: a family study. *Nature* 1969;224:915-916.
- Gilat T, Ben Hur H, Gelman-Malachi E, Terdiman R, Peled Y. Alterations of the colonic flora and their effect on the hydrogen breath test. *Gut* 1978;19:602-605.
- Gilat T, Russo S, Gelman-Malachi E, Aldor TA. Lactase in man: a nonadaptable enzyme. *Gastroenterology* 1972;62:1125-1127.
- Gudmand-Høyer E, Dahlqvist A, Jarnum S. Specific small-intestinal lactase deficiency in adults. *Scand J Gastroenterol* 1969;4:377-386.
- Gudmand-Høyer E, Skovbjerg H. Disaccharide digestion and maldigestion. *Scand J Gastroenterol* 1996;suppl 216:111-121.
- Hammer HF, Petritsch W, Pristautz H, Krejs GJ. Assessment of the influence of hydrogen nonexcretion on the usefulness of the hydrogen breath test and lactose tolerance test. *Wien Klin Wochenschr* 1996;108:137-141.
- Hermans MM, Brummer RJ, Ruijgers AM, Stockbrügger RW. The relationship between lactose tolerance test results and symptoms of lactose intolerance. *Am J Gastroenterol* 1997;92:981-984.
- Hertzler SR, Huynh BC, Savaiano DA. How much lactose is low lactose?. *J Am Diet Assoc* 1996;96:243-246.
- Hertzler SR, Savaiano DA. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1996;64:232-236.
- Hijazi SS, Abulaban A, Ammarin Z, Flatz G. Distribution of adult lactase phenotypes in Bedouins and in urban and agricultural populations of Jordan. *Trop Geogr Med* 1983;35:157-161.
- Hill MJ. Bacterial adaptation to lactase deficiency. In: Delmond J, ed. *Milk intolerance and rejection*. Basel, Karger 1983:22-26.
- Högenauer C, Hammer HF, Mellitzer K, Renner W, Krejs GJ, Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:371-376.
- Holzel A, Schwarz V, Sutcliffe KW. Defective lactose absorption causing malnutrition in infancy. *Lancet* 1959;1:1126-1128.
- Howland J. Prolonged intolerance to carbohydrates. *Trans Amer Pediatr Soc* 1921;33:11-19.

- Hussein L, Flatz SD, Kühnau W, Flatz G. Distribution of human adult lactose phenotypes in Egypt. *Hum Hered* 1982;32:94-99.
- Jacob R, Peters K, Naim HY. The prosequence of human lactase-phlorizin hydrolase modulates the folding of the mature enzyme. *J Biol Chem* 2002;277:8217-8225.
- Jacob R, Radebach I, Wüthrich M, Grünberg J, Sterchi EE, Naim HY. Maturation of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase: generation of the brush border form of the enzyme involves at least two proteolytic cleavage steps. *Eur J Biochem* 1996;236:789-795.
- Jacobi A. Milk-sugar in infant feeding. *Trans Amer Pediatr Soc* 1901;13:150-160.
- Johnson JD, Kretchmer N, Simoons FJ. Lactose malabsorption: its biology and history. *Adv Pediatr* 1974;21:197-237.
- Kagaya M, Iwata M, Toda Y, Nakae Y, Kondo T. Circadian rhythm of breath hydrogen in young women. *J Gastroenterol* 1998;33:472-476.
- Keller J, Franke A, Storr M, Wiedbrauck F, Schirra J. Klinisch relevante Atemtests in der gastroenterologischen Diagnostik - Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität sowie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen. *Z Gastroenterol* 2005;43:1071-1090.
- Keusch GT, Troncale FJ, Miller LH, Promadhat V, Anderson PR. Acquired lactose malabsorption in Thai children. *Pediatrics* 1969;43:540-545.
- Klein K, Danz A, Clausen A. Osteoporose heute: ein Leitfaden zur Ernährungsberatung. Gabriele Klein Verlag, Köln 1993.
- Kotler DP, Holt PR, Rosensweig NS. Modification of the breath hydrogen test: increased sensitivity for the detection of carbohydrate malabsorption. *J Lab Clin Med* 1982;100:798-805.
- Kretchmer N, Ransome-Kuti O, Hurwitz R, Dungy C, Alakija W. Intestinal absorption of lactose in Nigerian ethnic groups. *Lancet* 1971;2:392-395.
- Kruse TA, Bolund L, Grzeschik KH, Ropers HH, Sjöström H, Norén O, et al. The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. *FEBS Lett* 1988;240:123-126.
- Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilahti E, Orpana A, Järvelä I. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 2003;52:647-652.

- Kuokkanen M, Kokkonen J, Enattah NS, Ylisaukko-Oja T, Komu H, Varilo T, et al. Mutations in the translated region of the lactase gene (LCT) underlie congenital lactase deficiency. *Am J Hum Genet* 2006;78:339-344.
- Kuokkanen M, Myllyniemi M, Vaukhonen M, Helske T, Kääriäinen I, Karesvuori S, et al. A biopsy-based quick test in the diagnosis of duodenal hypolactasia in upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy* 2006;38:708-712.
- Lacey SW, Naim HY, Magness RR, Gething MJ, Sambrook JF. Expression of lactase-phlorizin hydrolase in sheep is regulated at the RNA level. *Biochem J* 1994;302:929-935.
- Leiß O. Laktoseintoleranz: Pathophysiologie, Symptomatik, Diagnostik und Therapie. *Verdauungskrankheiten* 2005;23:53-65.
- Levitt MD. Production and excretion of hydrogen gas in man. *N Engl J Med* 1969;281:122-127.
- Lin MY, Yen CL, Chen SH. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing lactobacilli. *Dig Dis Sci* 1998;43:133-137.
- Lloyd ML, Olsen WA. Disaccharide malabsorption. In: Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE, eds. *Bockus Gastroenterology*. 5th ed. Philadelphia, Saunders 1995:1087-1100.
- Lomer MC, Parkes GC, Sanderson JD. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:93-103.
- Mantei N, Villa M, Enzler T, Wacker H, Boll W, James P, et al. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J* 1988;7:2705-2713.
- Matthews SB, Campbell AK. When sugar is not so sweet. *Lancet* 2000;355:1330.
- Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 2005;81:167-173.
- McCracken RD. Lactase deficiency: an example of dietary evolution. *Curr Anthropol* 1971;12:479-517.
- Messer M, Dahlqvist A. A one-step ultramicro method for the assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 1966;14:376-392.

Metz G, Jenkins DJ, Peters TJ, Newman A, Blendis LM. Breath hydrogen as a diagnostic method for hypolactasia. *Lancet* 1975;1:1155-1157.

Moore BJ. Dairy foods: Are they politically correct? *Nutr Today* 2003;38:82-90.

Mitchelmore C, Troelsen JT, Spodsberg N, Sjöström H, Norén H. Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1alpha mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem J* 2000;346:529-535.

Montgomery RK, Büller HA, Rings EH, Grand RJ. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *FASEB J* 1991;5:2824-2832.

Naim HY. The pro-region of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase is enzymatically inactive towards lactose. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995;376:255-258.

Naim HY, Jacob R, Naim H, Sambrook JF, Gething MJ. The pro region of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem* 1994;269:26933-26943.

Naim HY, Lentze MJ. Impact of O-glycosylation on the function of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. Characterization of glycoforms varying in enzyme activity and localization of O-glycoside addition. *J Biol Chem* 1992;267:25494-25504.

Nasrallah SM. Lactose intolerance in the Lebanese population and in "Mediterranean lymphoma". *Am J Clin Nutr* 1979;32:1994-1996.

Newcomer AD, McGill DB. Disaccharidase activity in the small intestine: prevalence of lactase deficiency in 100 healthy subjects. *Gastroenterology* 1967;53:881-889.

Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofmann AF. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med* 1975;293:1232-1236.

Newcomer AD, Thomas PJ, McGill DB, Hofmann AF. Lactase deficiency: a common genetic trait of the American Indian. *Gastroenterology* 1977;72:234-237.

Nilsson TK, Johansson CA. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the -13910 C/T polymorphism with pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:287-290.

Nordström C, Dahlqvist A. Quantitative distribution of some enzymes along the villi and crypts of human small intestine. *Scand J Gastroenterol* 1973;8:406-416.

Oberholzer T, Mantei N, Semenza G. The pro sequence of lactase-phlorizin hydrolase is required for the enzyme to reach the plasma membrane. An intramolecular chaperone? *FEBS Lett* 1993;333:127-131.

Obermayer-Pietsch BM, Bonelli CM, Walter DE, Kuhn RJ, Fahrleitner-Pammer A, Berghold A, et al. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. *J Bone Miner Res* 2004;19:42-47.

Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Hum Mol Genet* 2003;12:2333-2340.

O`morain C, Loubiere M, Rampal P, Sudaka P, Delmont J. [Comparative study of the primary lactase deficiency in two different adult populations (55 inhabitants of Nice and 55 Maghrebins)]. *Acta Gastroenterol Belg* 1978;41:56-63.

Palmiter RD. What regulates lactose content in milk? *Nature* 1969;221:912-914.

Payne DL, Welsh JD, Claypool PL. Breath hydrogen (H₂) response to carbohydrate malabsorption after exercise. *J Lab Clin Med* 1983;102:147-150.

Peuhkuri K, Vapaatalo H, Korpela R, Teuri U. Lactose intolerance - a confusing clinical diagnosis. *Am J Clin Nutr* 2000;71:600-602.

Perman JA, Modler S, Barr RG, Rosenthal P. Fasting breath hydrogen concentration: normal values and clinical application. *Gastroenterology* 1984;87:1358-1363.

Perman JA, Modler S, Olson AC. Role of pH in production of hydrogen from carbohydrates by colonic bacterial flora. Studies in vivo and in vitro. *J Clin Invest* 1981;67:643-650.

Pimentel M, Lin HC, Enayati P, van den Burg B, Lee HR, Chen JH, et al. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1089-G1095.

Potter J, Ho MW, Bolton H, Furth AJ, Swallow DM, Griffiths B. Human lactase and the molecular basis of lactase persistence. *Biochem Genet* 1985;23:423-439.

Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare C, Peuhkuri K, Kajander K, et al. The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann Hum Genet* 2003;67:298-311.

- Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Tötterman N, Lindahl H, et al. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 2004;53:1571-1576.
- Read NW. Irritable bowel syndrome: overview. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6:457-459.
- Renner E, Renz-Schauen A. Nutrition composition tables of milk and dairy products. Nährwerttabellen für Milch und Milchprodukte. Giessen, Renner 1994.
- Rinaldi E, Albin L, Costagliola C, De Rosa G, Auricchio G, De Vizia B, et al. High frequency of lactose absorbers among adults with idiopathic senile and presenile cataract in a population with a high prevalence of primary adult lactose malabsorption. *Lancet* 1984;1:355-357.
- Rosado JL, Solomons NW. Sensitivity and specificity of the hydrogen breath-analysis test for detecting malabsorption of physiological doses of lactose. *Clin Chem* 1983;29:545-548.
- Rosensweig NS. Adult lactase deficiency: genetic control or adaptive response? *Gastroenterology* 1971;60:464-467.
- Sahi T. The inheritance of selective adult-type lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol* 1974;9(suppl 30):1-73.
- Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol* 1994;29(suppl 202):S7-S20.
- Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K, Pyörälä K. Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. *Lancet* 1973;2:823-826.
- Sahi T, Launiala K. Manifestation and occurrence of selective adult-type lactose malabsorption in Finnish teenagers. A follow-up study. *Am J Dig Dis* 1978;23:699-704.
- Sahi T, Launiala K, Laitinen H. Hypolactasia in a fixed cohort of young Finnish adults. A follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:865-870.
- Sategna-Guidetti C, Cruto E, Capobianco P. Breath hydrogen excretion after lactose and whole milk ingestion. A prospective comparison in lactase deficiency. *J Clin Gastroenterol* 1989;11:287-289.
- Savilahti E, Launiala K, Kuitunen P. Congenital lactase deficiency. A clinical study on 16 patients. *Arch Dis Child* 1983;58:246-252.

- Schauder P, Ollenschläger G. Ernährungsmedizin: Prävention und Therapie. 3. Auflage. München, Elsevier, Urban & Fischer 2006.
- Schirru E, Corona V, Usai-Satta P, Scarpa M, Oppia F, Loriga F, et al. Genetic testing improves the diagnosis of adult type hypolactasia in the Mediterranean population of Sardinia. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1220-1225.
- Sciarretta G, Giacobazzi G, Verri A, Zanirato P, Garuti G, Malaguti P. Hydrogen breath test quantification and clinical correlation of lactose malabsorption in adult irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1984;29:1098-1104.
- Scrimshaw NS, Murray EB. The acceptability of milk and milk products with a high prevalence of lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1988;48(suppl 4):1079-1159.
- Segal E, Dvorkin L, Lavy A, Rozen GS, Yaniv I, Raz B, et al. Bone density in axial and appendicular skeleton in patients with lactose intolerance: influence of calcium intake and vitamin D status. *J Am Coll Nutr* 2003;22:201-207.
- Simoons FJ. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: a problem in biologic and cultural interrelations. II. A culture historical hypothesis. *Am J Dig Dis* 1970;15:695-710.
- Simoons FJ. The geographic hypothesis and lactose malabsorption. A weighing of the evidence. *Am J Dig Dis* 1978;23:963-980.
- Solomons NW, Garcia-Ibanez R, Viteri FE. Hydrogen breath test of lactose absorption in adults: the application of physiological doses and whole cow's milk sources. *Am J Clin Nutr* 1980;33:545-554.
- Stolba R, Rezanka E, Eckhard U, Wider G. Genotyping of the LCT (T/C-13910) polymorphism on the LightCycler using fluorescent hybridisation probes. *J Lab Med* 2005;29:194-197.
- Strocchi A, Ellis C, Levitt MD. Reproducibility of measurement of trace gas concentrations in expired air. *Gastroenterology* 1991;101:175-179.
- Strocchi A, Levitt MD. Factors affecting hydrogen production and consumption by human fecal flora. The critical roles of hydrogen tension and methanogenesis. *J Clin Invest* 1992;89:1304-1311.
- Suarez FL, Adshead J, Furne JK, Levitt MD. Lactose maldigestion is not an impediment to the intake of 1500 mg calcium daily as dairy products. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1118-1122.

- Suarez FL, Savaiano D, Arbisi P, Levitt MD. Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1502-1506.
- Suarez FL, Savaiano DA, Levitt M. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *N Engl J Med* 1995;333:1-4.
- Surjone A, Sebodo T, Sunarto J, Moenginah PA. Lactose intolerance among healthy adults. *Paediatr Indones* 1973;13:49-54.
- Swallow DM. DNA test for hypolactasia premature. *Gut* 2006;55:131.
- Swallow DM, Hollox EJ. Genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. In: *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver CR (ed). 8th edition, New York, McGraw Hill 2001:1651-1663.
- Tadesse K, Eastwood M. Breath-hydrogen test and smoking. *Lancet* 1977;2:91.
- Tag CG, Oberkanins C, Kriegshäuser G, Ingram CJ, Swallow DM, Gressner AM, et al. Evaluation of a novel reverse-hybridization StripAssay for typing DNA variants useful in diagnosis of adult-type hypolactasia. *Clin Chim Acta* 2008;392:58-62.
- Terjung B, Lammert F. Laktoseintoleranz: neue Aspekte eines alten Problems. *Dtsch Med Wochenschr* 2007;132:271-275.
- Thompson DG, O'Brien JD, Hardie JM. Influence of the oropharyngeal microflora on the measurement of exhaled breath hydrogen. *Gastroenterology* 1986;91:853-860.
- Tolliver BA, Herrera JL, DiPalma JA. Evaluation of patients who meet clinical criteria for irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 1994;89:176-178.
- Torp N, Rossi M, Trolsen JT, Olsen J, Danielsen EM. Lactase-phlorizin hydrolase and aminopeptidase N are differentially regulated in the small intestine of the pig. *Biochem J* 1993;295:177-182.
- Troelsen JT. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys Acta* 2005;1723:19-32.
- Troelsen JT, Mitchelmore C, Olsen J. An enhancer activates the pig lactase phlorizin hydrolase promoter in intestinal cells. *Gene* 2003;305:101-111.
- Troelsen JT, Olsen J, Møller J, Sjöström H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology* 2003;125:1686-1694.

- Troelsen JT, Olsen J, Norén O, Sjöström H. A novel intestinal trans-factor (NF-LPH1) interacts with the lactase-phlorizin hydrolase promoter and co-varies with the enzymatic activity. *J Biol Chem* 1992;267:20407-20411.
- Tursi A. Three-hour hydrogen breath test for assessing lactose malabsorption in clinical practice: to give 50 or 20 grams of lactose? *Dig Dis Sci* 2006;51:138-139.
- Usai Satta P, Congia M, Schirru E, Scarpa M, Mura G. Genetic testing is ready to change the diagnostic scenario of lactose malabsorption. *Gut* 2008;57:137-138.
- Vesa TH, Korpela RA, Sahi T. Tolerance to small amounts of lactose in lactose maldigesters. *Am J Clin Nutr* 1996;64:197-201.
- Villako K, Maaros H. Clinical picture of hypolactasia and lactose intolerance. *Scand J Gastroenterol* 1994;29(suppl 202):36-54.
- Vince A, Killingley M, Wrong OM. Effect of lactulose on ammonia production in a fecal incubation system. *Gastroenterology* 1978;74:544-549.
- Vogelsang H, Ferenci P, Frotz S, Meryn S, Gangl A. Acidic colonic microclimate - possible reason for false negative hydrogen breath tests. *Gut* 1988;29:21-26.
- Vonk RJ, Priebe MG, Koetse HA, Stellaard F, Lenoir-Wijnkoop I, Antoin JM, et al. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. *Eur J Clin Invest* 2003;33:70-75.
- Waud JP, Matthews SB, Campbell AK. Measurement of breath hydrogen and methane, together with lactase genotype, defines the current best practice for investigation of lactose sensitivity. *Ann Clin Biochem* 2008;45:50-58.
- Weiskirchen R, Tag CG, Mengsteab S, Gressner AM, Ingram CJ, Swallow DM. Pitfalls in LightCycler diagnosis of the single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene that is associated with adult-type hypolactasia. *Clin Chim Acta* 2007;384:93-98.
- Wolin MJ. Fermentation in the rumen and human large intestine. *Science* 1981;213:1463-1468.
- Zecca L, Mesonero JE, Stutz A, Poirée J, Giudicelli J, Cursio R, et al. Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. *FEBS Lett* 1998;435:225-228.
- Zhong Y, Priebe MG, Vonk RJ, Huang CY, Antoine JM, He T, et al. The role of colonic microbiota in lactose intolerance. *Dig Dis Sci* 2004;49:78-83.

Thesen:

1. Der primäre adulte Laktasemangel (Hypolaktasie) stellt weltweit den häufigsten erblichen Enzymmangel des Menschen dar. Kennzeichnend für diese Form der Laktasedefizienz ist eine zeitliche Regulation der Laktaseexpression, die sich mit fortschreitender Dünndarmentwicklung verringert. Patienten mit Hypolaktasie können nach dem Konsum laktosehaltiger Lebensmittel gastrointestinale Beschwerden im Sinne einer Laktoseintoleranz entwickeln.
2. Ein Einzelnukleotidpolymorphismus an der Genposition LCT-13910 zeigt eine deutliche Assoziation mit dem primären adulten Laktasemangel und der Nachweis des Genotyps LCT-13910CC eröffnet neue Möglichkeiten in der Untersuchung der genetischen Epidemiologie und Differenzialdiagnostik des primären adulten Laktasemangels.
3. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Prävalenzdaten des primären adulten Laktasemangels für Nordostdeutschland im Rahmen eines molekulargenetischen Screenings erhoben. Von 300 anonymisierten DNA-Proben wiesen 19 % den mit der Laktasedefizienz assoziierten Genotyp LCT-13910CC auf. Diese Prävalenz ordnet sich in das bekannte Nord-Süd- und West-Ost-Gefälle des primären adulten Laktasemangels innerhalb Europas ein.
4. Eine zu interethnischen Vergleichszwecken erfolgte genetische Analyse von 303 DNA-Proben einer anonymisierten südkoreanischen Kohorte zeigte in allen Fällen den Nachweis der DNA-Variante LCT-13910CC und bestätigte den sehr hohen Verbreitungsgrad des primären adulten Laktasemangels im ostasiatischen Raum.
5. Vergleichende molekulargenetische Analysen mittels PCR-RFLP und LightCycler-Verfahren zeigten vollständige Konkordanz der Ergebnisse. Beide Verfahren eignen sich zur eindeutigen Identifizierung des LCT-13910-Polymorphismus.
6. Im Rahmen diagnostischer Untersuchungen wurde die molekulargenetische Analytik gegen den H₂-Atemtest nach oraler Laktosebelastung als Referenzmethode evaluiert. Bei Auswertung der H₂-Producer-Kohorte (n=108) zeigte der Gentest eine

Sensitivität von 89 %, eine Spezifität von 97 % sowie einen positiven und negativen Vorhersagewert von 94 bzw. 95 %. Der genetische Test eignet sich für den klinischen Einsatz zum Ausschluss einer primären Laktoseintoleranz.

7. Die Prävalenz des H₂-Non-Producer-Status betrug 15,6 %. Eine Aussage zum Vorliegen einer Laktosemalabsorption war im H₂-Atemtest somit bei einer beträchtlichen Patientenanzahl nicht möglich und die Diagnosestellung musste in diesen Fällen nach der Klinik erfolgen. Die vorliegende Untersuchung bestätigt, dass die Klinik kein valides Kriterium in der Diagnostik der Laktoseintoleranz darstellt. Der Gentest bewährte sich in dieser Gruppe zum Ausschluss einer Laktoseintoleranz, war dagegen für die Diagnosesicherung wertlos.

8. Aufgrund der Resultate, des geringen Zeitaufwandes und der initial nicht notwendigen oralen Laktosebelastung der Patienten schließt sich die vorliegende Untersuchung in der Zusammenfassung neueren Konzepten an, wonach der genetische Test als primäres diagnostisches Verfahren dem H₂-Atemtest vergleichbar ist. Die Empfehlung zur Verwendung des Gentests als Erstdiagnostik wird international kontrovers diskutiert. Diagnostische Empfehlungen nehmen dennoch zunehmend Bezug auf die genetische Untersuchung.

9. Der genetische Test ist nicht in der Lage, eine sekundäre Laktosemalabsorption primär zu diagnostizieren. Er ist jedoch hilfreich in der Differenzierung zwischen einer primären und sekundären Laktoseintoleranz bei vorliegendem H₂-Anstieg im Laktose-Atemtest.

10. Das Angebot einer genetischen Untersuchung fand eine hohe Patientenakzeptanz, da 94 % der Patienten über das Ergebnis der genetischen Analyse benachrichtigt werden wollten.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die hier vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, den 30.06.2008

Johannes Futh

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Futh
Vorname: Johannes
Straße: Brunnenstraße 195
Wohnort: 10119 Berlin
Geboren am: 20.02.1981
Geburtsort: Potsdam
Familienstand: ledig
Eltern: Jutta Futh (geb. Paske)
Ulrich Futh

Ausbildung / Ersatzdienst:

1987 – 1992: Albert-Einstein-Grundschule Caputh
1992 – 2000: Evangelisches Gymnasium Hermannswerder / Potsdam
2000 – 2001: Zivildienst / St. Josefs-Krankenhaus / Abteilung für Chirurgie / Potsdam
2001 – 2007: Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
2003: Ärztliche Vorprüfung / Physikum
2007: Ärztliche Prüfung
seit 03.2008: Arzt in Weiterbildung am Institut für Radiologie / Unfallkrankenhaus Berlin

Famulaturen:

02. – 03.2004: Gemeinschaftspraxis für Nephrologie und Diabetologie
Dr. med. Bischoff, Dr. med. Hartmann, Dr. med. Meyer /
Fachärzte für Innere Medizin / Potsdam
07. – 08.2004: St. Hedwig Krankenhaus / Abteilung für Innere Medizin /
Berlin
02. – 03.2005: Universität Innsbruck / Klinische Abteilung für Allgemeine
und Transplantationschirurgie / Österreich
08.2005: Universität Rostock / Klinik und Poliklinik für Innere
Medizin / Abteilung für Gastroenterologie

02. – 03.2006: Universität Rostock / Klinik und Poliklinik für
Augenheilkunde

Praktisches Jahr:

08.2006 – 12.2006: Universität Rostock / Institut für Diagnostische und
Interventionelle Radiologie

12.2006 – 03.2007: Universität Rostock / Klinik und Poliklinik für Chirurgie /
Abteilung für Allgemeinchirurgie, Abteilung für
Unfallchirurgie

03. – 07.2007: Spital Zimmerberg / Medizinische Klinik / Schweiz

Berlin, 30.06.2008

Johannes Futh

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Schuff-Werner und Herrn Professor Liebe für die Möglichkeit, im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin und der Abteilung für Gastroenterologie diese Arbeit anfertigen zu können.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Steiner schulde ich besonderen Dank für seine Betreuung und Geduld. Frau Röhring, Frau Dreißiger und Frau Hamp danke ich für die harmonische Zusammenarbeit im Labor, praktische Anleitung und zahlreiche Hilfestellungen.

Ich danke Herrn PD Dr. von Ahsen und Herrn Professor Oellerich für die Bereitstellung der Ergebnisse der Real-time-PCR im LightCycler-Format.

Frau Dr. Wolf danke ich für die fachliche Beratung bei der Auswertung der Atemtestergebnisse. Frau Stein gilt mein Dank für die sorgfältige und verlässliche Archivierung der Atemtestresultate.

Allen PatientInnen und ProbandInnen, die sich für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben, danke ich.

Meinen Eltern und Brüdern danke ich für den immerwährenden seelischen Rückhalt.