

Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und
Psychotherapie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Falkai

***Epigenetische Analyse des GABRA4 Rezeptorgens bei
alkoholabhängigen Patienten: Die Rolle der Promotor DNA-
Methylierung in der Pathogenese und während der
Alkoholentgiftung***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Bergmann

aus

Burghausen

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriele Koller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Rupp

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Peter Zill

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2023

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	7
1.1. ALKOHOL	7
1.1.1. Definitionen	7
1.1.2. Epidemiologie	9
1.1.3. Wirkung von Alkohol	10
1.1.3.1. Wirkungen auf periphere Organe	10
1.1.3.2. Wirkung auf das zentrale Nervensystem insbesondere auf den GABA-Rezeptor	11
1.1.4. Entstehung der Abhängigkeit: Psychologische Modelle	14
1.1.5. Entstehung der Abhängigkeit: Synaptische Plastizität	16
1.1.6. Alkoholentzugssyndrom und Anticravingtherapie	16
1.2. GENETIK	18
1.3. EPIGENETIK	20
1.3.1. Definition	20
1.3.2. Epigenetische Mechanismen	20
1.3.3. DNA Methylierung und Alkoholabhängigkeit	23
1.4. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	26
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1. STUDIENDESIGN	27
2.1.1. Versuchsgruppe	27
2.1.2. Kontrollgruppe	28
2.1.3. Rekrutierung	28
2.1.4. Studienablauf	29
2.2. MESSINSTRUMENTE	30
2.2.1. Semi Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism (SSAGA)	30
2.2.2. Allgemeiner Gesundheitsfragebogen	33
2.3. LABORANALYSE	33
2.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG	35
3. ERGEBNISSE	36
3.1. VERSUCHSGRUPPENBESCHREIBUNG	36
3.2. KONTROLLGRUPPENBESCHREIBUNG	36
3.3. THERAPIE	37
3.4. DROP OUTS	37
3.5. ANALYSE DER MESSINSTRUMENTE	38
3.6. AUSWERTUNG DER LABORANALYSEN	39
3.6.1. Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens der Versuchsgruppe während Alkoholentgiftung	41
3.6.2. Zusammenhänge des Trinkverhaltens der Probanden der Versuchsgruppe und der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens	43
3.6.3. Vergleich der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens von Versuchsgruppe und Kontrollgruppe	43
4. DISKUSSION	44
4.1. VERSUCHSGRUPPE	44
4.2. KONTROLLGRUPPE	45
4.3. MEDIKAMENTÖSE THERAPIE MITTELS BENZODIAZEPINE	46
4.4. DROP OUTS	48
4.5. LABORANALYSEN	49
4.5.1. Potenzieller Einfluss weiterer genetischer und epigenetischer Mechanismen auf die Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens	50

4.5.1.1. GABRA2.....	50
4.5.1.2 DeNovoMethyltransferase	51
4.5.1.4. GABRA4.....	52
4.5.2. <i>Veränderung der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens der Versuchsgruppe</i>	53
4.5.3. <i>Zusammenhänge des Trinkverhaltens der Probanden der Versuchsgruppe und der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens</i>	54
4.5.4. <i>Vergleich der Promotor DNA Methylierungen des GABRA4 Rezeptorgens von Versuchsgruppe und Kontrollgruppe</i>	55
4.5.5. <i>Limitationen</i>	56
ZUSAMMENFASSUNG	57
LITERATURVERZEICHNIS.....	59
DANKSAGUNG.....	69
AFFIDAVIT	70
PUBLIKATIONSLISTE.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dendrogramm mit Darstellung der Sequenzbeziehung von 19 menschlichen GABA A Rezeptor Untereinheiten	12
Abbildung 2: Suchtdreieck nach Kielholz & Ladewig 1973	14
Abbildung 3: Teufelskreis der Abhängigkeit nach Kűfner 1981	15
Abbildung 4: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz (Promotor) des humanen Gamma-Aminobuttersäure Typ A Rezeptors α 4-Untereinheit (GABRA4) auf Chromosom 4.....	35
Abbildung 5: Anzahl der Studienprobanden (Versuchs- und Kontrollgruppe) im Verlauf....	38
Abbildung 6: Promotor DNA Methylierung der untersuchten GABRA4 CpG-Positionen der Versuchs- und Kontrollgruppe	40
Abbildung 7: Promotor DNA Methylierung der analysierten CpG1-6 des GABRA4 Rezeptorgens der Versuchsgruppe	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzgebrauchsstörung: Diagnosekriterien gemäß DSM-V	9
Tabelle 2: Medikamentöse Optionen der Rückfallprophylaxe	17
Tabelle 3: Darstellung der Visiten der Versuchsgruppe	29
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Messinstrumente	30
Tabelle 5: Ausgewählte Items der Kategorie E mit besonderer Relevanz für die vorliegende Studie	31
Tabelle 6: Alter der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe bei Blutabnahme(n)	37
Tabelle 7: Deskriptive Datenanalyse gesonderter Items der Kategorie E des SSAGA (Versuchsgruppe N=71)	39
Tabelle 8: Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens (in %) an CpG1-CpG6 im Verlauf der Entgiftung (ALC), Promotor DNA Methylierung des GABRA 4 Rezeptorgens (in%) an CpG1-CpG6 der Messung der CNT-Gruppe	41
Tabelle 9: Unterschiede der Promotor DNA Methylierungen des GABRA4 Rezeptorgens (in %) der ALC und CNT-Gruppe.....	43

Abkürzungsverzeichnis

ALC *Studienteilnehmer der Versuchsgruppe*
AMPA *Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*
APA *American Psychological Association*
BIS *Barratt Impulsivness Scale*
BME *Bacopa minnieri*
CG *Cytosin-Guanin*
CNT *Studienteilnehmer der Kontrollgruppe*
CpG *Cytosin-Guanin-Dinukleotid*
CTQ *Child Trauma Questionnaire*
DNA *Desoxyribonukleinsäure*
DNMT *De-novo-Methyltransferase*
DSM-V *Statistical Manual of Mental Disorders*
EDTA *Ethylendiamintetraacetat*
FHAM *Family History Assessment Module*
GABA *Gamma - Aminobuttersäure*
GABRA2 *Gama-aminobuttersäure Rezeptor Untereinheit α 2*
GABRG *Gamma aminobuttersäure Typ A Rezeptor Untereinheit gamma*
GC *Guanin-Cytosin*
GEDA *Gesundheit in Deutschland Aktuell*
HLA *Human-Leukocyte-Antigen*
HTTLPR *Serotonin transporter gene polymorphism*
ICD-10 *Internationale Klassifikation psychischer Störungen*
IRQ *Impulsive relapse Questionnaire*
LMU *Ludwig-Maximilians-Universität*
MeCp *Methyl-CpG binding domain-Protein*
mRNA *Messenger ribonucleic acid*
PCR *Polymerase Kettenreaktion*
POMC *Proopiomelanocortin*
RNA *Ribonucleic acid*
SCAN *Schedule for Clinical Assessment in Neuropsychiatry*
SNP *Einzelnukleotid-Polymorphismus*
SNPs *Einzelnukleotid-Polymorphismen*
SPSS *Statistical Package for Social Sciences*
SSAGA *Semi-Structured-Assessment for the Genetics of Alcoholism*
TM *Transmembrandomäne*
WHO *Weltgesundheitsorganisation*
ZNS *Zentrales Nervensystem*

1. Einleitung

1.1. Alkohol

1.1.1. Definitionen

Die Global Burden of Disease (GBD) Studie der Weltgesundheitsorganisation führt Alkohol neben Tabak und Bluthochdruck als dritthäufigste Ursache für verlorene Lebensjahre auf (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2021). Somit zählt der Alkoholkonsum, die Alkoholgebrauchsstörung, als auch die Alkoholabhängigkeit zu einer gesellschaftlichen Thematik, die zunehmend in den Fokus des Gesundheitswesens rückt. Der Alkoholkonsum und die miteinhergehenden alkoholbezogenen Störungen stellen ein sehr heterogenes Krankheitsbild dar. Um eine strukturierte Definition der psychischen Entität gewährleisten zu können, wird vorerst eine Begriffsbestimmung vorgenommen. Die Begriffe Sucht, schädlicher Gebrauch / Missbrauch, Abhängigkeit und Substanzkonsumstörung / Substanzgebrauchsstörung müssen voneinander abgegrenzt werden.

Die Sucht wird als gesteigertes Verlangen, Bedürfnis, Gier definiert. Ab der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wird der Begriff Sucht mit krankhafter Abhängigkeit von Betäubungs- und Rauschmitteln assoziiert (Silbereisen und Reese 2001). Die Sucht geht weitgehend mit einem Kontrollverlust des Betroffenen einher (Tölle et al. 2014). Es kann zwischen stoffgebundener und stoffungebundener Sucht unterschieden werden. Somit lässt sich der Begriff auch auf Verhaltensweisen ausweiten, die nicht in Verbindung mit einer psychotropen Substanz wie dem Alkohol stehen (Schneider et al. 2013).

Sucht gilt als schwer definierbarer Begriff. Er findet umgangssprachlich und fachspezifisch nach wie vor Anwendung, wird aber in den internationalen Klassifikationssystemen psychischer Erkrankungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der American Psychological Association (APA) nicht mehr verwendet.

Die Definition des schädlichen Gebrauchs beinhaltet laut Internationaler Klassifikation psychischer Störungen (ICD-10) der WHO die Manifestation folgender Kriterien innerhalb eines Zeitraums von zwölf Monaten: Wiederholter Konsum mit Vernachlässigungen der privaten und beruflichen Pflichten, wiederholter Konsum mit physischer Gefährdung, rechtliche Konsequenzen durch Konsum, Substanzgebrauch ungeachtet sozialer Konflikte. Die Diagnose

kann nur nach festgestellter Schädigung der psychischen und physischen Gesundheit gestellt werden. Soziale oder ökonomische Faktoren, sowie eine bestimmte Mengenangabe oder Frequenz werden hier nicht berücksichtigt (Soyka et al. 2018).

Eine Abhängigkeit besteht laut WHO bei Vorliegen folgender Kriterien: Toleranzentwicklung, Entzugssymptomen, Kontrollverlust bezüglich des Umgangs mit der Substanz, Konsum trotz gesundheitsschädigender Folgen (Soyka et al. 2018). Als Leitsymptom der Abhängigkeit kann das sogenannte Craving aufgeführt werden (Soyka et al. 2018). Der Begriff Craving wird nach WHO als „starkes Verlangen nach einer psychoaktiven Substanz“ definiert. Bei den Auslösern des Cravings ist von komplexen individuell stark unterschiedlichen Vorgängen auszugehen.

Bezüglich des Konsums und des Entzugs von Alkohol spielen konditionierende Prozesse der klassischen Verhaltenstherapie und adaptive Prozesse der neuronalen Strukturen eine übergeordnete Rolle (Kessler et al. 2007).

Die APA unterscheidet im Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V) die Begrifflichkeiten Substanzmissbrauch, Abhängigkeit und Substanzkonsumstörungen. Der Substanzmissbrauch wird hier als Ereignis beschrieben, bei dem das Konsumieren einer Substanz mit übergeordneter Wichtigkeit, verglichen mit anderen Handlungen, die in der Vergangenheit eine größere Rolle gespielt haben, gesehen wird.

Abhängigkeit kann laut APA diagnostiziert werden, wenn mindestens drei der folgenden Charakteristika in der Zeitspanne eines Jahres zu beobachten sind: Wunsch / Zwang psychotrope Substanzen zu konsumieren, Kontrollverlust bezüglich des Umgangs mit der Substanz, Entzugssyndrome, Toleranznachweis, Vernachlässigung anderer Freizeitaktivitäten, erhöhte Bemühungen die Substanz zu beschaffen und bestehender Konsum trotz negativer Konsequenzen. Die Substanzgebrauchsstörung wird durch die APA als Schema heterogener Symptome beschrieben. Das DSM-V führt elf Kriterien zur Diagnostik der Substanzgebrauchsstörung auf (Soyka et al. 2018) (Soyka und Kufner 2008) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Substanzgebrauchsstörung: Diagnosekriterien gemäß DSM-V

Substanzgebrauchsstörung: Diagnosekriterien gemäß DSM-V
1. Wiederholter Konsum mit Vernachlässigung wichtiger Verpflichtungen
2. Wiederholter Konsum in Situationen, in denen es auf Grund des Konsums zu körperlicher Gefährdung kommen kann
3. Wiederholter Konsum trotz ständiger oder häufig auftretender sozialer Probleme
4. Toleranzentwicklung mit Dosissteigerung und reduzierter Wirkung
5. Entzugssymptome oder Substanzkonsum, um diese zu vermeiden
6. Kontrollverlust, der sich in längerem Konsum/gesteigerten Mengen äußert
7. Anhaltender Kontrollwunsch
8. Hoher Zeitaufwand zur Beschaffung der Substanz, zum Konsum, zur Rehabilitation
9. Aufgabe oder Reduzierung von Aktivitäten auf Grund des Substanzkonsums
10. Fortgesetzter Gebrauch trotz körperlicher oder psychischer Folgen
11. Craving: Starkes Konsumverlangen

1.1.2. Epidemiologie

Substanzkonsum und gefährliche Konsummuster sind in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands häufig. Substanzbezogene Störungen durch den Gebrauch legal erwerblicher Drogen, wie Alkohol und Tabak führen zu einer gesellschaftlichen Belastung (Atzendorf et al. 2019). Es gibt unterschiedliche Methoden den Alkoholkonsum einer Gesellschaft einzuordnen. Hier soll im Folgenden auf den Risikokonsum - das Konsumieren einer Menge, welche sich riskant auf den physischen und psychischen Gesundheitszustand auswirken kann, eingegangen werden: Der Schwellenwert liegt bei 10 g Reinalkohol pro Tag für Frauen, 20 g Reinalkohol pro Tag für Männer. Beruhend auf einer Analyse der Gesundheit in Deutschland Aktuell (GEDA) besteht bei 14% der Frauen und 18% der Männer ein gesundheitlich riskanter Alkoholkonsum. Die Prävalenz erreicht in der Altersgruppe 45 bis 64 ihren Höhepunkt. Auch bezüglich der Einteilung in Bildungsgruppen lassen sich signifikante Unterschiede feststellen. Ausgenommen der Altersgruppe 30 – 44 zeigen Frauen der oberen Bildungsgruppe höhere Prävalenzen des Alkoholkonsums. Männer in der Altersgruppe ab 65 weisen vergleichbare Ergebnisse auf, es konnten keine relevanten Unterschiede bei Männern in anderen Altersgruppen aufgedeckt werden (RKI 2017).

Etwas schwieriger ist die epidemiologische Darstellung des Alkoholmissbrauchs- / der Alkoholabhängigkeit. Der Lübecker Alkoholabhängigkeits-Missbrauchs-Screening Test stellt im deutschsprachigen Raum eine gute Methode zur Erfassung von Alkoholabhängigkeit dar. Hier konnte im Jahr 2000 bei 3,8% der Befragten im Alter zwischen 18 und 64 Jahren im Lebensverlauf Alkoholabhängigkeit festgestellt werden (Bloomfield et al. 2008).

Laut Bundesgesundheitsministerium gelten aktuell 1,6 Millionen Menschen dieser Altersgruppe als alkoholabhängig (Atzendorf et al. 2019). Die Mortalität durch eine durch Alkoholmissbrauch induzierte Erkrankung berechnet sich 2014 in Deutschland auf 14.095 Volljährige. Es handelt sich bei ca. 66% der Betroffenen um Männer (Robert Koch-Institut 2016a).

Etwa 3-10% der deutschen Bevölkerung lebt alkoholabstinent (Tölle et al. 2014; Deutsches Krebsforschungszentrum und Pabst Science Publishers 2017). Im Vergleich zu den vergangenen Jahren lässt sich eine sinkende Tendenz bezüglich des Alkoholkonsums in der Bundesrepublik feststellen (Atzendorf et al. 2019).

1.1.3. Wirkung von Alkohol

Alkohol gilt als bedeutendes Genussmittel der westlichen Bevölkerung, entfaltet aber ebenfalls psychopharmakologische Wirkung. Alkohol wirkt zuerst stimulierend, später sedierend. Durch Alkoholkonsum verändert sich das subjektive Wahrnehmen und das Verhalten. Sehfähigkeit, Konzentration, Gleichgewicht und Artikulation werden beeinträchtigt. Bei weiterem Konsum kommt es zu Gedächtnis- und Orientierungsstörungen (Soyka und Küfner 2008).

1.1.3.1. Wirkungen auf periphere Organe

Oesophagus, Magen und Pankreas gelten als häufig betroffene Organe bei akutem, aber auch chronischem Alkoholkonsum. Dieser äußert sich klinisch in Störungen der Motilität, Mukosa Läsionen und stellt einen Hauptrisikofaktor des Plattenepithelkarzinoms dar (Siegmund und Singer 2005). Neben dem oberen Gastrointestinaltrakt wird Alkohol auch als Risikofaktor mit klinischer Manifestation von Erkrankungen des Duodenums, Jejunums und Kolons betrachtet (Bode et al. 2005). Akute, subakute und chronische Leberschädigungen durch Alkohol mit dem Endstadium der Leberzirrhose sind durch chronischen, langjährigen Alkoholkonsum bekannt (Martini und Doelle 1965).

Die Spätfolgen von Alkoholkonsum treten auch bei geringem Konsum deutlich häufiger auf als bei abstinenten Menschen. Direkt oder indirekt sind annähernd alle Organe von übermäßigem Alkoholkonsum betroffen. Karzinome des oberen Respirationstrakts und des Urogenitaltraktes fallen mit hoher Letalität auf. Auch zerebrale Schädigungen sind bekannt, welche sich jedoch unter Abstinenz teilweise reversibel äußern (Tölle et al. 2014).

1.1.3.2. Wirkung auf das zentrale Nervensystem insbesondere auf den GABA-Rezeptor

Alkohol (Ethanol) wird enzymatisch über Dehydrogenasen vorerst zu Acetaldehyd, später zu Acetat metabolisiert. Hierbei gilt Acetaldehyd als toxischer Metabolit. Neben direkt toxischen Wirkungen auf das zentrale Nervensystem werden auch indirekte Effekte auf Neurotransmittersysteme ausgeübt (Soyka und Küfner 2008).

Der γ -Aminobuttersäure (GABA) A Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Chloridionenkanal, der ubiquitär im zentralen Nervensystem vorkommt und durch den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) aktiviert wird. Der GABA A Rezeptor besteht aus fünf Proteinuntereinheiten. Es lassen sich unterschiedliche Subtypen des GABA A Rezeptors mit abweichender Affinität zu GABA, variierender Kinetik und verschiedenen Lokalisationen differenzieren. Die Bezeichnung der Subtypen erfolgt durch griechische Buchstaben, differente Isomere der Untereinheiten werden durch arabische Zahlen beschrieben. So ergeben sich für die Subtypen des GABA A Rezeptor α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1-3. 60% des GABA A Rezeptors bestehen aus der Sequenz α 1 β 2 α 1 β 2 γ 3, entsprechend fünf Proteinuntereinheiten. Der GABA A Rezeptor ist an der postsynaptischen Membran des Neurons lokalisiert. Durch ein Aktionspotenzial im präsynaptischen Endknöpfchen kommt es über einen Calciumeinstrom zur Modulation und Fusion von GABA gefüllten Vesikeln mit der Membran. Nach Diffusion im synaptischen Spalt kann der Neurotransmitter an GABA A Rezeptoren binden, durch Konformationsänderung die Öffnung des Chloridionenkanals und überwiegend Hyperpolarisationen des nachfolgenden Neurons auslösen. GABA gilt als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter (Drexler et al. 2006).

Neben dem ligandengesteuerten GABA A Rezeptor, kommt der durch GABA aktivierte metabotrope G-Protein gekoppelte GABA B Rezeptor im zentralen Nervensystem (ZNS) vor (Kerr und Ong 1995).

GABA A Rezeptoren gehören u.a. neben Acetylcholin-Rezeptoren, Glycin-Rezeptoren und Serotonin-Typ3 Rezeptoren zu den pentameren Liganden-gesteuerten Ionenkanälen. Diese werden auch als Cys-Loop Rezeptoren bezeichnet. Die Ähnlichkeit dieser Rezeptorsysteme zeigt sich in der gemeinsamen Domänenstruktur: Der molekulare Aufbau der Rezeptorsysteme besteht aus einer N-terminalen Domäne mit Cis Loop und der Liganden - Bindestelle für Transmitter (bspw. GABA) oder allosterische Modulatoren. Die Transmitterbindestelle befindet sich an der extrazellulären Schnittstelle zwischen zwei Proteinuntereinheiten. Des Weiteren weist der Rezeptor eine Transmembrandomäne (TM) mit vier Segmenten, als TM 1-4

bezeichnet, auf. Zwischen TM3 und TM4 lässt sich eine intrazelluläre Domäne identifizieren. (Ernst und Sieghart 2015).

Es wurde eine Vielzahl homologer Gene identifiziert, die für die Proteinuntereinheiten des GABA A Rezeptors codieren (Stephenson 1995). Ein Überblick der Charakterisierung der 19 bekannten menschlichen GABA A Untereinheiten hinsichtlich Lokalisierung, Größe und Exon- bzw. Intron- Struktur liegt von Simon et. Al vor (Simon et al. 2004) (Abbildung 1).

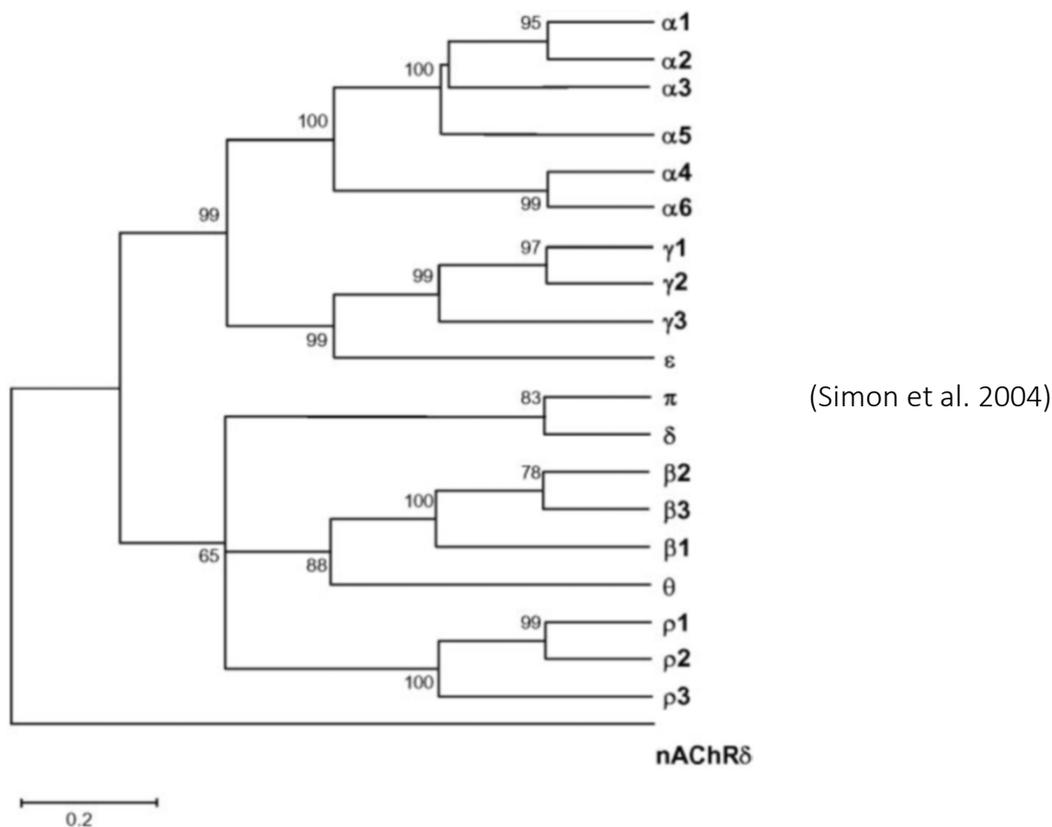


Abbildung 1: Dendrogramm mit Darstellung der Sequenzbeziehung von 19 menschlichen GABA A Rezeptor Untereinheiten

*Dendrogramm das die Sequenzbeziehungen von 19 menschlichen GABA-A-Rezeptor-Untereinheiten zeigt. Die verwendeten Sequenzen sind die des reifen Proteins nach Entfernung des Signalpeptids. Zur Verfeinerung des Diagramms wurde eine entfernt verwandte Außengruppe die nAChR-Untereinheit (wie gezeigt) verwendet. Die Länge der horizontalen Zweige die zwei beliebige GABA-A-Rezeptor-Untereinheiten miteinander verbinden stellt die fraktionelle Divergenz in ihrer Aminosäuresequenz dar. Der Skalensbalken entspricht einer Sequenzdivergenz von 20 %. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind Bootstrap-Werte für 100.000 Replikationen.

Benzodiazepine, Barbiturate und Ethanol wirken neben weiteren Substanzen verstärkend auf die GABAerge inhibitorische Transmission (Ticku et al. 1983).

Bei chronischem Alkoholkonsum wurde eine verminderte GABA Rezeptordichte u.a. im frontalen Kortex, Hippocampus und Cerebellum festgestellt, die sich in einer Anfälligkeit zur Suchtentwicklung und einer Toleranzentwicklung widerspiegelt (Abi-Dargham et al. 1998).

Während früher von einer unspezifisch toxischen Wirkung von Alkohol auf die Lipiddoppelschicht von Neuronen ausgegangen wurde, gilt aktuell die spezifische modulierende Wirkung auf ligandengesteuerte Ionenkanäle als bestätigt. Der Aktivierung des GABA A Rezeptors, gefolgt von einer Verringerung der neuronalen Erregbarkeit wird eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von Ethanol auf das Nervensystem zugesprochen (Davies 2003).

Bei der Grundlegenden biochemischen Untersuchung der Wechselwirkung von Ethanol auf den GABA A Rezeptor konnten zwei spezifische Aminosäurereste in TM2 und TM3 identifiziert werden, die für die allosterische Modulation von GABA A durch Ethanol ausschlaggebend sind (Mihic et al. 1997).

Neben Auswirkungen von Ethanol auf die GABAerge Neurotransmission, sind auch weitere Transmittersysteme betroffen. Eine Zusammenfassung der Wirkungsweise zur Übersicht folgt. Durch Alkoholkonsum kommt es zu einer reduzierten Neurotransmission von Glutamin an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, die in deutlichem Zusammenhang mit Gedächtnislücken steht. Durch adaptive Prozesse folgt bei Chronizität des Alkoholkonsums ein Anstieg der Rezeptoren, welcher sich bei einem Abbruch der Zufuhr klinisch durch Entzugssymptome äußert (Tsai et al. 1995). Neben NMDA Rezeptoren wird auch eine Regulation der Dichte von α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) Rezeptoren durch chronischen Alkoholkonsum beschrieben (Huganir und Nicoll 2013). Nicht nur die Droge selbst, auch alkoholassoziierte Reize können eine verstärkte Ausschüttung von Dopamin erzeugen, welche sich als gesteigertes Verlangen und Kontrollverlust über den Trinkkonsum äußert (Bühler und Mann 2011).

Alkohol bewirkt grundsätzlich eine Erhöhung der Freisetzung von Endorphinen. Bei progredientem Konsum lässt sich eine kompensatorische Zunahme der postsynaptischen Opioid-Rezeptoren feststellen (Cowen und Lawrence 1999).

Chronischer Alkoholkonsum bewirkt einen geringeren Umsatz des Neurotransmitters Serotonin, welcher sich auf psychischer Ebene mit Depressionen und Angstzuständen in Zusammenhang bringen lässt (Fils-Aime et al. 1996; Heinz et al. 1998).

Zusammengefasst wirkt Ethanol als Modulator auf die Transmittersysteme und fördert auf biochemischer Ebene Abhängigkeit, Verhaltensweisen und Entzugssymptomatik.

1.1.4. Entstehung der Abhängigkeit: Psychologische Modelle

Um die Entstehung und das Bestehen der Alkoholabhängigkeit zu erklären, eignet sich kein monokausales Modell. Vielmehr muss eine große Anzahl unterschiedlicher Faktoren in vielschichtigen, komplexen Schemata berücksichtigt werden. Um einen einfachen Überblick zu erlangen, wird ein bio-psychosoziales Modell verwendet. Generell kann man von drei Variablen mit unterschiedlich großen Einflüssen und Wechselwirkungen ausgehen: Die Substanz inklusive der Wirkung, des Suchtpotentials und der Verfügbarkeit, das Individuum geprägt durch biologische und psychische, sowie genetische Faktoren und zuletzt das Umfeld mit sozialen, kulturellen und ökonomischen Strukturen (Abbildung 2) (Feuerlein 1999).

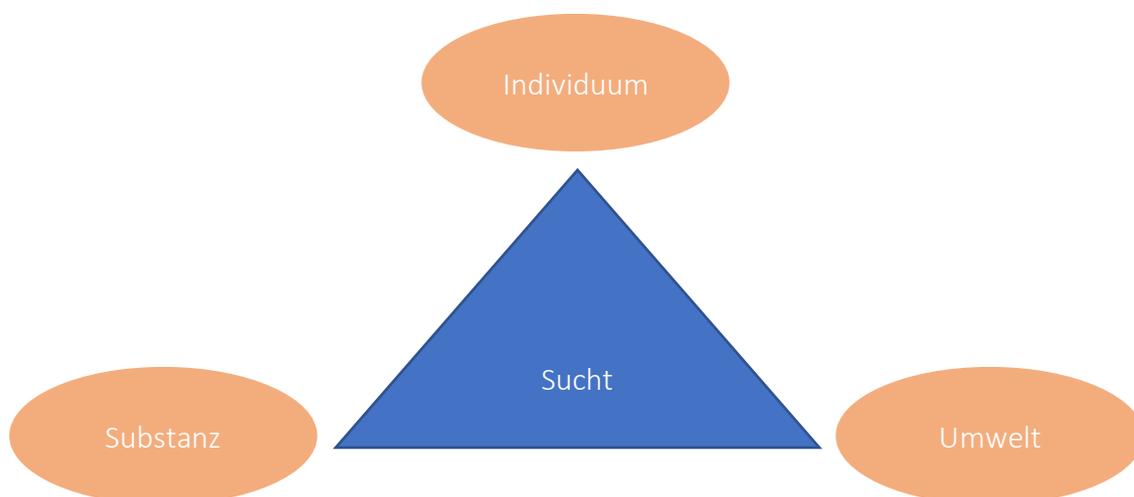


Abbildung 2: Suchtdreieck nach Kielholz & Ladewig 1973

Um dieses einfache Dreiecksschema mit einer dynamischen Sichtweise zu ergänzen, kann auf den Teufelskreis nach Küfner Bezug genommen werden (Soyka und Küfner 2008).

Hier werden die Faktoren Droge, Individuum, Umwelt auf drei Ebenen beleuchtet. Auf der somatischen Ebene werden u.a. Toleranzentwicklung und Entzugssymptome berücksichtigt. Die intrapsychische Ebene befasst sich mit Konfliktlösung durch Alkohol. Die psychosoziale Ebene beschäftigt sich mit sozialen Problematiken. Hierdurch entsteht ein Teufelskreis, in dem der Alkoholkonsum nur initial eine Lösung schafft und dauerhaft eine Verschärfung der Situation bewirkt (Abbildung 3) (Feuerlein et al. 2011).

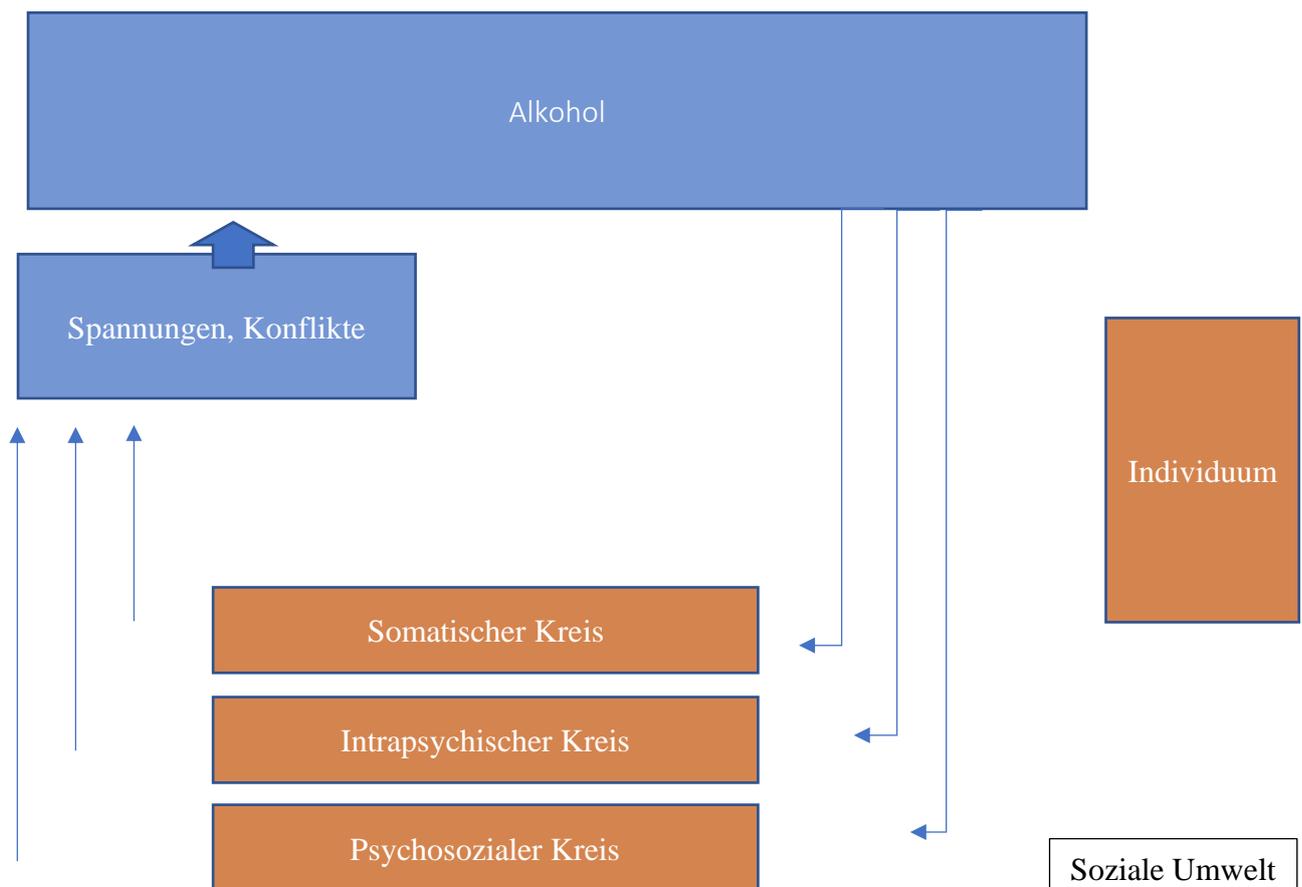


Abbildung 3: Teufelskreis der Abhängigkeit nach Kiefner 1981

Eine weitere Theorie die Bedingungen der Abhängigkeitsentstehung zusammenzuführen, ist das Dispositions-Expositions-Modell: Hier werden eine pharmakologische, psychologische und soziale Ebene unterschieden. Die Gewöhnung mündet in erhöhtem Substanzgebrauch und Entzugssymptomen, gegen welche wiederum mit der Substanz vorgegangen wird. Niedergeschlagenheit führt zum Substanzkonsum, welcher wiederum zur Verschlechterung dieser führen kann. Der Konsument fühlt sich auf sozialer Ebene vernachlässigt, was erneut einen Substanzgebrauch auslöst (Tölle et al. 2014).

1.1.5. Entstehung der Abhängigkeit: Synaptische Plastizität

Die gesteigerte Endorphin- bzw. Dopamin- Ausschüttung, sowie die Modulation der Neurotransmittersysteme durch Alkohol wurden bereits aufgeführt. Diese können durch eine Sequenz von drogeninduzierten synaptischen Plastizitätsstufen entstehen (Belin et al. 2008).

Synaptische Plastizität wird definiert als Modulation von Synapsen, explizit eine Veränderung der Intensität der synaptischen Übertragung bezüglich einer Zeitskala (Hallermann und Schmidt 2019).

Dieses Modell der Suchtentstehung beurteilt die Dopamin-Ausschüttung als zufälligen Detektor der synaptischen Plastizität in verschiedenen Hirnarealen (u.a. VTA, Substantia Nigra, dorsalem Striatum). Durch den Einfluss des Suchtmittels auf das Belohnungssystem, Lern- und Gedächtnisprozesse kommt es zu einer Automatisierung des Verhaltens (Tan et al. 2011).

1.1.6. Alkoholentzugssyndrom und Anticravingtherapie

Leitlinienbasiert können leichte Alkoholentzugssymptome bzw. sollen mittelschwere/ schwere Alkoholentzugssymptome behandelt werden (Kiefer 2020).

Das vegetative Entzugssyndrom beginnt 6-8 Stunden nach Beendigung des Alkoholkonsums und zeichnet sich durch Symptome bedingt durch erhöhten Sympathikotonus aus. Ein Peak wird nach etwa 10-30 Stunden, ein Nachlass nach 40-50 Stunden erwartet (Bock und Lengauer 2008; Shaw et al. 1998).

Die Wahrscheinlichkeit während des Alkoholentzugs an Krampfanfällen zu leiden, korreliert mit der Häufigkeit früherer Entgiftungen (Brown et al. 1988). Bei Patienten mit gehäuften Entzügen in der Krankheitsgeschichte kann eine intensivere Behandlung indiziert sein (Malcolm et al. 2002).

Benzodiazepine werden nach pharmakokinetischen Kriterien in kurz-, mittel- und langwirksame Präparate eingeteilt und dienen u.a. der Verringerung von Angstzuständen, Unterdrückung von epileptischen Anfällen bzw. Entspannung von Muskelkrämpfen (Tan et al. 2011).

Sie wirken auf biochemischer Ebene durch einen positiven allosterischen Mechanismus, der zu einer Verstärkung der Funktion des GABA A Rezeptors (ligandengesteuerter chloridselektiver Ionenkanal) führt (Griffin et al. 2013). Diese potenzierende Wirkung entsteht durch eine Konformationsänderung des Rezeptors, welche eine Erhöhung der Affinität für GABA zur Folge hat. Diazepam (ein Benzodiazepin) erhöht die Leitfähigkeit einzelner Kanäle bzw. die

Öffnungswahrscheinlichkeit einzelner Kanäle (Eghbali et al. 1997; Rogers et al. 1994). In Gegenwart von Benzodiazepinen sind GABA Neuronen stärker hyperpolarisiert (Schwabbauer 1975).

Einen Überblick von Wirkmechanismus, Indikation, sowie Kontraindikationen und Dosierung von Medikamenten zur Rückfallprophylaxe wird in der folgenden Tabelle dargestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Medikamentöse Optionen der Rückfallprophylaxe

	Wirkmechanismus	Indikation	Interaktionen/ Kontraindikationen	Dosierung
Acamprosat (Campral®)	Antagonist am Glutamat (NMDA-) Rezeptor	Rückfallprophylaxe bei Alkoholabhängigkeit	Darf nicht eingenommen werden bei: - Schwere Leber- oder Nierenfunktionsstörung	333mg / Tablette <60kg KG: 4 Tbl/ Tag auf 3 ED >60kg KG: 3x2 Tbl. /Tag Behandlungsdauer: 1 Jahr
Disulfiram (Antabus®)	Hemmung der Aldehyddehydrogenase (Hemmt den 2. Schritt des Alkoholabbaus) -> Abbauprodukt häuft sich an -> Übelkeit, Erbrechen, etc. In Extremfällen Atemdepression	Rückfallprophylaxe bei Alkoholabhängigkeit Aversionstherapie	Keine Kombi mit: - Metronidazol - Einige Antibiotika - MAO-Hemmer - Isoniazid - Amitryptilin	Zieldosis nach Aufdosierung: 200-500mg/d
Naltrexon (Nemexin®)	Antagonist am Opioidrezeptor	Rückfallprophylaxe bei Alkoholabhängigkeit Reduktion der Trinkmenge Entwöhnungsbehandlung bei Opiatabhängigkeit	Darf nicht eingenommen werden bei: - Akuter Intoxikation - Akute Hepatitis	50mg/ Tablette Übliche Dosis: 1 Tablette/ Tag
Nalmefen (Selincro®)	Antagonist am Opioidrezeptor	Reduktion des Alkoholkonsums bei Patienten mit Alkoholabhängigkeit Rückfallprophylaxe	Darf nicht eingenommen werden bei: - Behandlung mit Opioiden bzw. Opioidabhängigkeit - Schwere Leber- oder Nierenfunktionsstörung - Aktuelle Entzugserscheinungen	Wird nach Bedarf eingenommen. Maximale Dosis: eine Tablette 18 mg/Tag

Acamprosat wird seit einigen Jahren klinisch verwendet; der Wirkungsmechanismus geht hier auf Interaktion mit glutamatergen Neuronen zurück. Weitere Annahmen gehen davon aus, dass das Calciumatom des Moleküls des Medikaments die zentrale Wirkung hervorruft (Spanagel et

al. 2014). Disulfiram wird in der Bundesrepublik Deutschland aktuell nicht mehr vertrieben. Die Wirkung des Medikaments beruhte auf einer Intoleranz mit Alkohol (Soyka und Rösner 2021). Naltrexon und Nalmefen zählen zu Antagonisten des Opioidrezeptors, es handelt sich hier um komplexe neuronale Mechanismen, bei denen es zu einer Regulierung der Dopaminausschüttung kommt (Hansson et al. 2019).

1.2. Genetik

Die Alkoholabhängigkeit als heterogene Entität muss als sowohl genetisch multifaktorielle, sowie durch Umwelteinflüsse bedingte Erkrankung betrachtet werden (Singer et al. 2011). Zur Verifizierung von Vererbungsmustern oder genetischen Prädispositionen sind unterschiedliche Studiendesigns, wie Zwillings- und Adoptionsstudien, Untersuchungen von Phänotypen, so wie Genomentschlüsselungen erforderlich.

Schwedische Analysen mit großer epidemiologischer Zwillingspopulation zeigen die dominante Rolle der genetischen Disposition für den Alkoholkonsum und -missbrauch junger Männer auf, zugleich wird dem familiären Umfeld und weiteren Umweltfaktoren eine untergeordnete Bedeutsamkeit zugewiesen (Kendler et al. 1997).

Cloninger et al. führte groß angelegte Studien zur Prädisposition von Alkoholabhängigkeit und antisozialen Persönlichkeitszügen bei adoptierten Individuen durch. Sowohl hereditäre wie postnatale Aspekte wirken sich auf das Abhängigkeitsrisiko aus (Cloninger et al. 1981; Bohman et al. 1987). Weitere Adoptionsstudien, durchgeführt an Adoptivkindern mit einem leiblichen Elternteil mit klinisch gesicherter Alkoholgebrauchsstörung wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe (mit gesunden leiblichen Eltern) eine höhere Inzidenz an Alkoholproblemen auf. Ein Unterschied in Form von psychischen Erkrankungen konnte nicht geltend gemacht werden (Goodwin et al. 1973). Eine Differenz des Alkoholkonsums bei Geschwistern, ein Geschwisterteil bei den biologischen Eltern aufwachsend, der andere Teil adoptiert, zeigte sich nicht. Bei beiden Gruppen lag weitgehend ein hoher Konsum vor. Der Schweregrad der Erkrankung der Eltern zeigte eine positive Korrelation mit der Abhängigkeit der Kinder (Goodwin et al. 1974).

Zudem wurden verschiedene Ansätze zur Klassifizierung von Untergruppen Alkoholkranker angestrebt, die einen genetischen Einfluss miteinbeziehen. In Untergruppen mit einem hohen

Schweregrad der Erkrankung sollen genetische Faktoren eine schwerwiegendere Rolle verglichen mit Umwelteinflüssen spielen (Johnson et al. 1996).

Neben der Betrachtung von Zwillings- und Adoptionsstudien ist in Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei Alkoholgebrauchsstörungen / -abhängigkeit nicht um ein klar dominantes oder rezessives Vererbungsmuster handelt, die Untersuchung von Phänotypen wegweisend.

Ein Zusammenhang konnte zwischen Alkoholtoleranz und erblich bedingter Veranlagung hergestellt werden. Hierzu wurde die Toleranz (als Level of response bezeichnet) eines Studienkollektivs bestehend aus Kindern von Alkoholikern und Nicht-Alkoholikern untersucht. Es konnte eine Korrelation der Alkoholtoleranz mit positiver Familienanamnese erhoben werden. Probanden mit einem niedrigen Level of response, also einer nur gering bis moderat ausgeprägten Wirkung von Alkohol können mit einem verstärkten Konsum und somit auch mit einem erhöhten Risiko der Abhängigkeitsentstehung assoziiert werden (Schuckit und Smith 1996). Der Phänotyp Level of response gilt als vererbbarer Komponente. In genetischen Untersuchungen wurden mehreren Polymorphismen, definiert als Genvarianten innerhalb einer Population, untersucht. Hier zeigten sich Zusammenhänge zwischen serotonin transporter gene polymorphism (HTTLPR) L- und GABAA α 6 SER385-Allelen mit einem niedrigen Level of response und einhergehendem Alkoholismus (Hu et al. 2005).

Auf neurobiologischer Ebene gilt es die Vererbung des Gens zur Kodierung der Aldehyddehydrogenase – einem essenziellen Enzym des Abbauvorgangs von Ethanol- zu beachten. Eine bestimmte Genvariante codiert ein nicht funktionstüchtiges Enzym. Diese wurde nur in der asiatischen Bevölkerung festgestellt. Träger sind dementsprechend schlechter in der Lage Ethanol suffizient zu metabolisieren und haben ein geringeres Risiko für Alkoholabhängigkeit (Wall und Ehlers 1995).

GABA A Rezeptoren gelten als Vermittler physischer und verhaltensbezogener Wirkungen von Ethanol. Bezüglich der Codierung von GABA A Rezeptoren existieren unterschiedliche Genvarianten, die mittels Polymerase Kettenreaktion- (PCR) Test identifiziert werden können. Der Subtyp α 2 des GABA A Rezeptors steht mit dem genetischen Risiko für Alkoholabhängigkeit in Verbindung (Soyka et al. 2008). Die spezifische Wirkung von Ethanol auf den GABA-Rezeptor wurde bereits eingehend in Kapitel 1.3.2. erklärt. Weitere Aspekte zur Genetik des GABA A Rezeptors werden unter 2.3.3 diskutiert.

Genetische Polymorphismen, die sich auf Stoffwechselwege, sowie unterschiedliche Neurotransmittersysteme auswirken, gelten neben Persönlichkeit, Verhaltensweisen,

Impulskontrolle und Craving als einflussreiche Faktoren bei der Entstehung von Alkoholabhängigkeit (Pinto und Anseau 2009). Sie stellen jedoch bezüglich des stark multifaktoriellen Krankheitsbildes keine absolut zufriedenstellenden Kausalitäten dar. Ein neuer Erklärungsansatz durch die Epigenetik bzw. epigenetische Mechanismen soll in der vorliegenden Arbeit erörtert werden.

1.3. Epigenetik

1.3.1. Definition

Der Begriff Epigenetik kann grundlegend auf Conrad Waddington zurückgeführt werden und wurde verwendet, um die Kausalität zwischen Genen und ihren Produkten, die sich als Phänotyp äußern, zu erklären (Graw 2015). Zudem wurden genetische Gegebenheiten beschrieben, die nicht mit den Mendel'schen Regeln vereinbar waren (Graw 2020). Heute wird die Epigenetik unter genetischen Aspekten definiert als: Stabile Veränderungen in der Regulation der Genexpression die während der Entwicklung, Zelldifferenzierung und Zellproliferation entstehen und über Zellteilungen hinweg aufrechterhalten werden, wobei die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz nicht verändert wird (Jaenisch und Bird 2003). In zellbiologischem oder praktisch ausgelegtem Fokus geht man bezüglich epigenetischer Veränderungen und Mechanismen von parallel zur DNA stattfindenden Ereignissen aus, die auch auf weiteren zellulären Ebenen stattfinden können und somit beispielsweise erweiterte epigenetische Kontrollmechanismen wie die Transmission von small ribonucleic acid (RNA) von Zelle zu Zelle miteinschließen (Walter und Hümpel 2016).

1.3.2. Epigenetische Mechanismen

Um auf epigenetischen Mechanismen und deren Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit vertiefend einzugehen, wird im folgenden Abschnitt kurz der Aufbau und die Funktion der eukaryotischen DNA erklärt. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) gilt als Grundelement der Chromosomen. Der chemische Aufbau entspricht verschiedenen Nukleotiden, die aus Desoxyribose, einem Phosphatrest und einer heterozyklischen Base bestehen. Die DNA liegt als Doppelhelix mit zwei antiparallelen Strängen über Wasserstoffbrücken verbunden vor. Ausgehend von der selektiven Basenpaarung von Guanin und Cytosin, wie Adenin und Thymin

handelt es sich um komplementäre Stränge. Die Replikation der DNA ist auf ein semikonservatives Prinzip zurückzuführen. Die Basen der DNA bilden einen sogenannten Triplet Code. Über den intranukleären Zwischenschritt der Transkription mit Präsentation des codogenen Stranges und Bildung von messenger ribonucleic acid (mRNA) kann nachfolgend außerhalb des Zellkerns an Ribosomen die Proteinbiosynthese stattfinden. Im eukaryotischen Genom werden proteinkodierende und repetitive Sequenzen unterschieden. Hochrepetitive Sequenzen lassen sich unter anderem in heterochromatiden Chromosomabschnitten finden (Hennig 2002).

Neben der DNA liegen im Chromatin, welches die Chromosomen bildet, zwei Proteinklassen vor. Es werden Histon (fünf Typen H1, H2a, H2b, H3, H4) von Nicht-Histon-Proteinen differenziert (Tariverdian und Buselmaier 2004). Auf Ebene der Röntgenkristallstruktur können die sogenannten Nucleosomencores atomar dargestellt werden. Hierbei handelt es sich um ein Histonprotein-Oktamer aus den Typen H2A, H2B, H3, H4 und die Organisation von 146 Basenpaare der DNA, die um diesen Proteinkomplex gewickelt sind. Diese Organisation dient der Komprimierung der DNA (Tariverdian und Buselmaier 2004).

Neben der Komprimierung der DNA sind die Nucleosome (Komplex bestehend aus Histonen und DNA) an der Regulation des Zugangs zur DNA verantwortlich und steuern somit positive und negative Mechanismen der Transkription, Replikation, aber auch Reparaturmechanismen (Clore und Venditti 2013).

Auf genetischer Ebene stellt die Modifikation der Histone eine epigenetische Regulationsoption dar. Chemische Veränderungen der Anfangs- und Endregionen (H3, H4) finden meist nach der Translation durch Acetylierungen, Methylierungen, Phospholierungen und Ubiquitinierungen statt. Es wurden bislang 140 Histon-Modifikationsvarianten identifiziert. Letztendlich kann durch Modifizierung der Zugang zum Chromatin gegeben oder blockiert werden, wodurch eine Exzitation oder Inhibition der Transkription resultiert (Walter und Hümpel 2016).

Die posttranskriptionale Regulation der Genexpression durch Bindung von nichtkodierenden RNAs (mikroRNAs) an Zielsequenzen von mRNA kann zudem die Proteinbiosynthese bzw. Translation bestimmter Peptide / Proteine inhibieren (Ziegler et al. 2018).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fokussieren sich primär auf den weiteren epigenetischen Regulationsmechanismus der DNA Methylierung. Die DNA Methylierung wirkt sich im menschlichen Genom auf die zelluläre Differenzierung aus pluripotenten Stammzellen, die Inaktivierung von X-Chromosomen, sowie die Entwicklung aus (Fuks et al. 2003). Es ist

davon auszugehen, dass im menschlichen Genom ca. 1% der heterozyklischen Basen der DNA postsynthetisch methyliert werden (Kriaucionis und Bird 2003). DNA Methylierung dient weitgehend als Silencing-Signal repetitiver DNA Strukturen und Transposons (Walter und Hümpel 2016).

DNA Methylierungen treten überwiegend an der Base Cytosin des Cytosin-Guanin-Dinukleotides (CpG) auf. Das „p“ der Abkürzung steht für Phosphatrest. Cytosin Methylierungen treten selten auch außerhalb der Guanin-Cytosin (GC) -Komplexe auf (Xie et al. 2012). Beim CpG Dinukleotid handelt es sich um einen chemischen Zusammenschluss von zwei Nukleotiden, welche die Basen Cytosin bzw. Guanin aufweisen (Hennig 2002). Auf biochemischer Ebene handelt es sich um einen Austausch eines Wasserstoffatoms durch eine Methylgruppe an Position 5' des Pyrimidinrings der Base Cytosin. Es resultiert 5'Methylcytosin (Löffler 2007). Die Methylgruppe wird hierbei von S-Adonosylmethionin auf den Cytosinrest der Dinukleotidsequenz CpG übertragen (Abdolmaleky et al. 2004).

Das Dinukleotid CpG ist im menschlichen Genom keineswegs gleichverteilt, so findet sich in 98% des Genoms eine CpG Sequenz pro 80 Dinukleotiden (Costello und Plass 2001).

Bei einem statistisch gehäuften Auftreten von CpG Dinukleotiden handelt es sich um sogenannte CpG-Inseln. CpGs befinden sich häufig in Promotorbereichen, an welchen Transkriptionsfaktoren binden. Eine Methylierung der CpG-reichen Promotorregion inhibiert den Beginn der Transkription und folglich die Expression des folgenden Gens (Arnemann 2019). CpG Inseln finden sich in 1-2% des Genoms und haben mit 500 bp bis 2kb eine stark variierende Länge / Größe (Isoun 1975). Im menschlichen Genom wird von etwa 45 000 CpG Inseln pro haploides Genom ausgegangen, die Genpromotoren und bzw. oder Exons enthalten (Antequera und Bird 1993).

Regulär zeigen CpG Inseln exprimierende Gene einen geringeren Methylierungsgrad, verglichen mit CpG Dinukleotiden außerhalb der Inseln (Bird et al. 1985; Bird 1992; Abdolmaleky et al. 2004). 70% der CpGs, untersucht an Wirbeltieren, zeigen eine Methylierung, während weniger als 30% der Promotorbereiche methyliert sind (Naveh-Many und Cedar 1981).

Es wird zudem tendenziell von einer steigenden Methylierung mit voranschreitendem Alter ausgegangen (Rath und Kanungo 1989). Dies betrifft auch Methylierungsänderungen im Alter bezüglich CpG Inseln im Promotor von Genen (Issa 2000).

Globale Methylierungen des Genoms spielen v.a. in der Embryonalentwicklung eine bedeutende Rolle (Haaf 2001). Epigenetische Regulierungen über DNA Methylierungen des gesamten Genoms wurden bis dato noch nicht hinreichend untersucht.

Die DNA Methylierung wird durch die De-Novo-Methyltransferasen (DNMT) 3A und DNMT3B katalysiert und durch die Methyltransferase maintenance-DNMT1 aufrechterhalten (Chen et al. 2005). Die postreplikatorische DNA Methylierung wird von verschiedenen Proteintypen durchgeführt, über eine Enzymkaskade von Remodeling Komplexen und histonmodifizierenden Katalysatoren werden repressive Chromatinstrukturen geschaffen. Zu den an die CpG Stellen bindenden Proteinen zählen neben den Methyl-CpG binding domain-Proteinen (MeCP)2, MBD1,2,4, auch die Kaiso-Proteinfamilie (Rottach et al. 2009). Das Protein MeCP2 führt neben anderen Mechanismen auch durch Interaktion mit der Histon-Deacetylase-Aktivität zur Änderung der Chromatinstruktur und resultierend zur Repression der Genexpression. MeCP2 kann somit als Verbindung der epigenetischen Mechanismen der Histon- Modifikation und der DNA Methylierung betrachtet werden (Fuks et al. 2003). Des Weiteren kann eine direkte Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA durch die räumliche Beziehung der Methylgruppe des 5'Methylcytosins in die große Furche der DNA-Doppelhelix aufgeführt werden (Hermann et al. 2004).

1.3.3. DNA Methylierung und Alkoholabhängigkeit

Die DNA Methylierung gilt einerseits als physiologischer Regulationsmechanismus der Genexpression. Es konnten jedoch auch pathologische Assoziationen von DNA Methylierungsmustern im Sinne von Hyper- oder Hypomethylierung mit psychischen Erkrankungen, wie Veränderungen der Methylierungsmuster von GABRB2, Human-Leukocyte-Antigen (HLA)-C Genen und Serotonin- und Glutamatrezeptoren bei Schizophrenie und bipolaren Störungen (Teroganova et al. 2016), sowie unterschiedliche Methylierungsmuster der Serotonin-Transporter- und Glucocorticoid-Rezeptor-Genen bei Stress und Depression (Bakusic et al. 2017) identifiziert werden.

Veränderungen der Genexpression durch epigenetische Veränderungen des Chromatins tragen jedoch im psychischen Entitätsbild nicht nur zu affektiven Störungen, sondern auch in klinischer Auswirkung hinsichtlich Sucht und Toxizität bei chronischem Alkoholkonsum bei. Hier bieten epigenetische Veränderungen neue Erklärungsansätze für Vererbung und Verhaltensweisen wie Rückfälligkeit (Costin und Miles 2014).

Ethanol gilt als modulierende Substanz des Epigenoms und hat Auswirkungen auf die DNA Methylierung, die Histonmodifikation, nicht codierende RNA und die Chromatindynamik. Diese Faktoren können zu Entwicklung von Abhängigkeit und Sucht, wie Entstehung von malignen Neoplasien führen (Dulman et al. 2020).

Die Assoziation von Alkoholabhängigkeit und epigenetischen Veränderungen wurde in verschiedenen Studien untersucht. Resultate zeigten eine Schlüsselrolle der Genexpression der Glycin-Rezeptoren (Liu und Wong-Riley 2013), wie die Hypermethylierung des Dopamintransporter-Promotors bei chronischem Konsum und Korrelation dieser untersuchten Methylierung und des Ausmaßes des Cravings (Hartl 2010).

Ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Homocysteingehalt im Blutplasma und chronischem Alkoholkonsum konnte festgestellt werden. Homocystein gilt als Agonist von NMDA-Rezeptoren. Bei Alkoholentzug und damit einhergehendem sinkenden Plasmaspiegel können Epilepsien resultieren. Es resultiert zudem eine Homocystein-assoziierte Hypermethylierung globaler Strukturen, sowie Cytosin-Guanin (CG)-Inseln (Muschler und Bleich 2008).

Auf die Mechanismen der DNA Methylierung wurde einleitend unter 2.3.2. eingegangen. Auch diese werden durch Alkohol beeinflusst. Es lässt sich eine Hemmung der DNMT-Aktivität bei Alkoholintoxikation feststellen (Krishnan et al. 2014). Zudem konnte eine Abnahme der DNMT3a und DNMT3b bei chronischem Alkoholkonsum gezeigt werden (Bönsch et al. 2006). Durch Ethanol kommt es zu einer allosterischen Modulation des GABAA Rezeptors, diese erklärt akute und chronische Wirkungen von Alkohol, wie Toleranz, Abhängigkeit und Entzug.

Die Gene, die für die Subtypen des GABA A Rezeptors codieren, sind auf Chromosomen in Clustern strukturiert. GABRB2, GABRA6, GABRA1, GABRAG2 sind Sequenzen des Chromosoms 5p, während GABRAG1, GABRA2, GABRA4 und GABRB1 auf Chromosom p412 lokalisiert sind (Rice et al. 1995).

Es liegen deutliche Hinweise für eine Assoziation von GABRA2 und Alkoholismus vor (Enoch 2008; Mallard et al. 2018). Diese kann als haplotypischer Zusammenhang zwischen dem Gen, das für die α 2 Untereinheit (GABRA2) kodiert und der Alkoholabhängigkeit definiert werden (Edenberg 2002). Konkret wurden genetische Variationen einer Domäne des Chromosoms 4p12, die neben Weiteren die Codierung einiger GABAA Untereinheiten GABRG1, GABRA2, GABRA4, GABRB1 enthält, mit Alkoholabhängigkeit in Zusammenhang gebracht (Lieberman et al. 2015). Diverse Untersuchungen von Einzelnukleid-Polymorphismen (SNPs) der codierenden

Regionen akzentuieren die Relevanz von polymorphen Variationen am GABRA-2-Lokus zum Risiko der Alkoholabhängigkeit (Covault et al. 2004).

Die aktuell am besten erforschten SNPs werden als rs279858 in Exon 5 und rs567926 in der 3-UTR bezeichnet und codieren für den Subtyp $\alpha 2$ (Li et al. 2014).

Mit Grundlage der Assoziation von Alkoholabhängigkeit und der Genvariabilität von GABRA2, sollten auch epigenetische Fragestellungen, explizit die DNA Methylierung von GABRA2, diskutiert werden. Eine zufällige stochastische Methylierung der GABRA2-CpG Inseln während der Reprogrammierung, sowie eine durch Methylierung induzierte verminderte Expression wurden festgestellt (Goetjen et al. 2020).

Die Reduktion der Expression der $\alpha 2$ Untereinheit im Cerebellum auf Grund von Methylierungen konnte durch Studien weitgehend bestätigt werden. Eine Schlüsselrolle wird zudem den GABAA Rezeptoren modulierenden Neurosteroiden zugesprochen, die wiederum aufgrund von DNA Methylierungen in geringerem Maße synthetisiert werden (Gatta et al. 2021).

Untersuchungen von Zusammenhängen von Alkoholabhängigkeit sowie GABRA2 stehen im wissenschaftlichen Fokus, obwohl codierende Genabschnitte für weitere Subunits eine nicht zu unterschätzende Relevanz zeigen, so konnten beispielsweise Hypermethylierungen der Gene GABRB3 und Proopiomelanocortin(POMC) in zwei CpGs Inseln bei Alkoholabhängigkeit durch Blutanalysen festgestellt werden (Zhang et al. 2013).

Einen hohen Stellenwert bezüglich des vorliegenden Projekts hat die epigenetische Modulation von GABRA4. GABRA4 codiert für die $\alpha 4$ Untereinheit des GABA Rezeptors Typ A.

Alkoholregulierte Gene können durch Alkoholkonsum und -entzug beeinflusst werden. Neuroadaptionen können auf epigenetische Veränderungen dieser alkoholabhängigen Gene zurückgeführt werden (Bekdash und Harrison 2015).

Veränderungen in der Expression von Untereinheiten der GABA Rezeptoren und eine Assoziation zur Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit wurden eingehend besprochen. Änderungen des neuronalen Verhaltens, wie zentrale Hyperexzitabilität während des Substanzentzuges können zu neuen Therapieansätzen von Alkoholkonsumstörungen führen (Sanna et al. 2003).

In Tierexperimenten konnten verschiedene Ergebnisse zur Untersuchung der Genexpression von GABRA4 erzielt werden: Bacopa monnieri (BME) führt zu einem Rückgang der reduzierten Genexpression von GABRA1, GABRA4, GABRA5 der GABA A Untereinheiten im Hippocampus

und der Amygdala während Ethanolabstinenz, durch diesen Rückgang wurde angsthähnliches Verhalten aufgehoben. (Gupta und Sharma 2019). Die Zufuhr von Ethanol im Tierexperiment führte zu einem Rückgang der messenger RNA der Proteinuntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, während im Entzug ein Anstieg von $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ verzeichnet werden konnte (Sanna et al. 2003). Studienprojekte mit experimentellen Untersuchungen von Mäuseuronen zeigten eine alkoholbedingte Plastizität von GABRA4 und eine Hochregulierung von GABRA4 unter Alkoholexposition. Im Fokus standen Untersuchungen von Alkoholentzug auf Veränderungen der Genexpression. So konnte eine Reduktion der Expression von GABRA4, sowie ein leichter Anstieg von GABRG2 und die Stagnation von GABRA1 festgehalten werden, diese Regulation kann teils auf Induktion durch mikroRNAs zurückgeführt werden und gilt somit als epigenetischer Regulationsmechanismus (Bekdash und Harrison 2015).

1.4. Fragestellung der Arbeit

Die Mechanismen der Regulierung einzelner Gene durch Alkohol auf zellulärer und subzellulärer Ebene bezüglich transkriptionischer, translatorischer und posttranslatorischer Vorgängen wurden in in-Vivo Studien wenig erforscht (Pignataro et al. 2009). Es liegen vor allem kaum longitudinale Studien von epigenetischen Mechanismen wie DNA Methylierungen in Kandidatengenen der Alkoholabhängigkeit während der akuten Entgiftungsphase vor.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Pilotstudie, daher wurden keine Hypothesen erstellt, sondern folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Zeigen sich Unterschiede in der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens während einer 2-wöchigen Entgiftungs- und Entzugsphase bei alkoholabhängigen Patienten?
2. Zeigen sich Einflüsse des Trinkverhaltens bzw. der durchschnittlich konsumierten Alkoholmenge vor Entgiftung auf die Methylierung in der Promotor DNA des GABRA4 Rezeptorgens?
3. Unterscheiden sich die analysierten Methylierungen von denen einer gesunden Kontrollgruppe?

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine klinisch-prospektiv durchgeführte Longitudinalstudie an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München. In dieser wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen, und bis zu 9 Monaten im Follow up, Patienten mit Alkoholgebrauchsstörung im stationären Entzug bezüglich des Zusammenhangs des alkoholischen Entzuges sowie des vorangegangenen Trinkverhaltens mit Veränderungen epigenetischer Biomarker zu mehreren festgelegten Messzeitpunkten untersucht. Die Untersuchungen wurden mit Analysen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Nach Zustimmung der Ethikkommission erfolgte die Patientenrekrutierung der Versuchsgruppe, sowie das Akquirieren der Probanden der Kontrollgruppe.

Alle Studienteilnehmer wurden über den Studienablauf und das Studienziel mündlich und schriftlich informiert, nach der Aufklärung wurde die schriftliche Einwilligung der Studienteilnehmer eingeholt. Die Studienteilnehmer wurden eingehend informiert, dass eine Beendigung der Teilnahme zu jedem Zeitpunkt ohne Angaben von Gründen möglich ist.

Der stationäre Entzug sowie die psychiatrische und medikamentöse Therapie der Patienten der Versuchsgruppe wurden durch die durchgeführte Studie nicht beeinflusst.

2.1.1 Versuchsgruppe

In die Studie wurden männliche Probanden im Alter zwischen 18 und 80 Jahren mit schriftlicher Einwilligungsfähigkeit eingeschlossen, bei denen seit mindestens zwei Jahren eine Alkoholabhängigkeit besteht, vorausgesetzt war ein mindestens 14-tätiger stationärer Aufenthalt zum Alkoholentzug in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Als Ausschlusskriterien wurden weiterer aktueller / vergangener Substanzabusus oder Konsum bei Substanzabhängigkeit (eingeschlossen Konsum synthetischer Drogen und Opioide), Einnahme von krampflösenden Medikamenten, Zustand nach Apoplex, nicht therapierte Koronare Herzkrankheiten, Zustand nach Leberzirrhose sowie weibliches Geschlecht definiert.

2.1.2. Kontrollgruppe

Um einen Vergleich der Studienergebnisse mit einer gesunden Vergleichsgruppe durchzuführen, wurde eine gesunde Kontrollgruppe (CNT) rekrutiert.

Es wurden Probanden aus der Allgemeinbevölkerung eingeschlossen. Voraussetzungen für den Studieneinschluss waren eine kaukasische Abstammung, männliches Geschlecht, sowie ein Alter zwischen dem 18. und 80. Lebensjahr.

Es wurden nur Probanden in die Studie aufgenommen, bei denen aktuell oder in der Vergangenheit keine psychiatrische Diagnose nach ICD-10, sowie eine negative Familienanamnese betreffend psychiatrische Erkrankungen (ICD F00-F99) vorlag. Des Weiteren wurde ein Alkoholkonsum von maximal 2 Bier / 1 Glas Wein pro Woche und kein weiterer Drogenabusus vorausgesetzt.

Im Studiendesign konnte kein Matching im Sinne einer Fall-Kohorten-Studie durchgeführt werden. Gründe hierfür sind der abweichende Rekrutierungsort, unterschiedlicher sozio-ökonomischer Status, unterschiedliche Gruppengrößen und Komorbiditäten in der Vergleichsgruppe. Eine Übereinstimmung in Geschlecht, Alterskategorie sowie ethnischer Abstammung wurde angestrebt.

2.1.3. Rekrutierung

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer der Versuchsgruppe (ALC) erfolgte auf der Station C4 der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München nach erfolgter Terminvergabe für die stationäre Entgiftung im Zeitraum Januar 2019 bis Dezember 2019. Patienten, die die definierten Einschlusskriterien erfüllten, wurden wie oben beschrieben über die wissenschaftlichen Untersuchungen aufgeklärt.

Die Rekrutierung der Kontrollgruppe (CNT) erfolgte über Informationsaushänge und Multi Level Marketing im Zeitraum März 2020 bis September 2020.

2.1.4. Studienablauf

Die ALC Probanden befanden sich während der prospektiven Phase der Studie im stationären Entzug auf der Station C4 – Schwerpunkt Abhängigkeitserkrankungen in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die ideale Studiendauer betrug 14 Tage. Die erste Visite erfolgte im direkten Anschluss nach Studieneinschluss, unmittelbar bei Aufnahme in die Entgiftung. Weitere Visiten erfolgten am 7. Tag (+/- 1 Tag), sowie am 13. Tag (+/- 1 Tag) bei Entlassung. Nach einem Zeitraum von 6 bis 9 Monaten erfolgte eine Follow Up Untersuchung (Tabelle 3). Zu jeder Visite wurde eine Blutentnahme von 7,5 ml EDTA-Vollblut durchgeführt, diese wurden auf epigenetische Marker laboranalytisch untersucht.

Im Rahmen der Visiten wurden mit den Studienteilnehmern längere, strukturierte Gespräche unter Zuhilfenahme bewährter Skalen geführt, eine dieser soll im Folgenden im Detail aufgeführt werden. Weitere die Studie betreffende Daten/Informationen wurden aus den Patientenakten entnommen.

Im Anschluss wurde die Rekrutierung der Kontrollgruppe nach oben genannten Kriterien durchgeführt. Nach Aufklärung und Unterzeichnen einer Einwilligungserklärung wurde ein allgemeiner Gesundheitsfragebogen selbstständig ausgefüllt, sowie eine einzige Blutabnahme durchgeführt, welche analog zu den Proben der ALC Probanden laboranalytisch untersucht wurde. Einflussfaktoren wie Alter, Medikation und weitere psychiatrische Erkrankungen wurden im vorliegenden Pilotprojekt nicht betrachtet.

Tabelle 3: Darstellung der Visiten der Versuchsgruppe

Visite	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
Zeitpunkt	Tag 1 *	Tag 7 (+/- 1 Tag) *	13. Tag (+/- 1 Tag) *	6 – 9 Monate *

* Zu jeder Visite erfolgte eine Blutentnahme von 7,5 ml EDTA-Vollblut. Durchführung der Messinstrumente erfolgte staffelweise an Visite 1,2,3

2.2. Messinstrumente

Im Rahmen der Visiten im Zeitraum von 14 Tagen wurden strukturierte Interviews mithilfe unterschiedlicher Skalen geführt. Hierbei wurden die Barratt Impulsiveness Scale (BIS)-15, der Child Trauma Questionnaire (CTQ), das Family History Assessment Module (FHAM), der Impulsive Relapse Questionnaire (IRQ) und der Semi Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism (SSAGA) als Messinstrumente herangezogen.

Im Folgenden soll hier ausschließlich der Semi Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism (SSAGA) aufgeführt werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Messinstrumente

Messinstrument	Gemessene Symptomatik	Fremd- oder Selbstbeurteilung	Termin der Erhebung
SSAGE2A-1	Anamnese bezüglich Suchtverhalten	Selbstbeurteilung	Innerhalb des 14-tägigen stationären Aufenthalts (staffelweise an Visite1, Visite2, Visite3)

2.2.1. Semi Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism (SSAGA)

Systematische Bewertungen von semistrukturierten Interviews zur Stellung von psychiatrischen Diagnosen wurden eingehend untersucht. Eine höhere Validität für Diagnosen von Substanzmissbrauchsstörungen der Interviews verglichen mit klinischen Diagnosen im Rahmen der allgemeinen Tätigkeit von Fachpersonal zeigt die Relevanz der Aufnahme geeigneter Messinstrumente in den klinischen Alltag (Kranzler et al. 1995).

Der SSAGA dient als vielseitiges Messinstrument zur Erfassung unterschiedlicher Parameter durch Selbstbeurteilung. In einem Interview werden Informationen über den Probanden in mehrteiligen Items untergliedert in Sektionen A bis Q erfasst.

Der Fragebogen beginnt mit der Abfrage allgemeiner Informationen, wie Körpergröße und Gewicht, Beziehungsstatus, Familienstand, Bildungsweg und Beruf. Des Weiteren werden relevante Erkrankungen, die Krankengeschichte, Medikamenteneinnahme sowie psychische Erkrankungen und deren Behandlungen abgefragt. Folgend werden substanzgebundene

Abhängigkeiten wie Tabakkonsum, Alkoholkonsum (Trinkverhalten, Trinkgewohnheiten), Marihuana Konsum, Konsum weiterer Drogen (Kokain, Stimulanzien, Sedativa, Opioide, Amphetamine, Halluzinogene, weitere) erfasst. Zudem werden Fragen bezüglich Gewalttätigkeit, Kapitalverbrechen und Suizidgedanken gestellt.

Der SSAGA II, eine 1997 überarbeitete Version des ursprünglichen SSAGA I, ist ein polydiagnostisches Interview, das u.a. Alkoholmissbrauch / Alkoholabhängigkeit mit weiteren Diagnosesystemen (DSM-III R, DSM-IV, ICD-10) erfasst. Das Konzept des SSAGA II ermöglicht zudem auch Vergleiche mit Studien, die auf älteren Diagnosekriterien basieren. Zur Ermittlung von Informationen bezüglich Alkohols werden 45 mehrteilige Items verwendet.

Der Fokus der Kategorie E liegt auf dem Gebrauch und Konsum von alkoholischen Getränken. Das Trinkverhalten des Probanden wird durch Erfragung von Trinkmengen, Art der alkoholischen Getränke, Perioden der Abstinenz und Selbstwahrnehmung des Alkoholkonsums erfasst (Tabelle 5). Eine durchschnittliche Alkoholmenge in Angabe Gramm pro Tag wird im SSAGA nicht explizit erfragt und wurde mittels SSAGA Items E3A und E6B konstruiert und errechnet.

Tabelle 5: Ausgewählte Items der Kategorie E mit besonderer Relevanz für die vorliegende Studie

SSAGA Item	Beschreibung der Fragestellung	Angabe
E1A/E1B	Konsum von alkoholischen Getränken im Zeitraum unmittelbar vor stationärer Aufnahme und benötigter Zeitraum, um diese zu konsumieren	Anzahl der Getränke Bier, Wein, Schnaps, Andere und Zeitraum in Minuten
E3A/E3B	Konsum von alkoholischen Getränken in <u>einer normalen</u> Woche und benötigter Zeitraum, um diese zu konsumieren	Anzahl der Getränke Bier, Wein, Schnaps, Andere und Zeitraum in Minuten
E4	Beginn des regelmäßigen Alkoholkonsum, definiert als einmal im Monat für mind. 6 Monate oder mehr	Altersangabe in Jahren
E6	Periode in der täglich für mind. eine Woche oder mehr konsumiert wurde	Ja/Nein
E6B	Anzahl der alkoholischen Getränke, die durchschnittlich <u>täglich</u> (in der Periode definiert unter E6) konsumiert wurde	Angabe Anzahl
E6C	Dauer der Periode in der täglich für mind. eine Woche oder mehr konsumiert wurde	Angabe in Wochen
E8	Dauer der längsten Periode ohne Alkoholkonsum	Angabe in Monaten

Trotz weiter Verbreitung des SSAGA existiert keine Gesamtskala der Items zur Bewertung von internalisierenden Störungen, worunter u.a. Angststörungen fallen. Eine neu eingeführte, sich psychometrisch eignende Internalisierungsskala dient zur Untersuchung von Angststörungen und Alkohol / Substanzkonsumstörungen und könnte zur Identifizierung potenziell gefährdeter Patienten sowie für Behandlungskonzepte herangezogen werden (Acion et al. 2019).

Im Rahmen der Collaborative Studies on the Genetics of Alcoholism wurde die persönliche, sowie telefonische Durchführung des SSAGA II gegenübergestellt. Bezüglich der diagnostischen Prävalenzen von Alkoholabhängigkeit, sowie depressiven Störungen ist das persönliche Interview zu priorisieren (Kramer et al. 2009).

In multizentrischen genetischen Alkoholismus Studien mit Within- und Cross Center-Studiendesign zur Untersuchung der Reliabilität des SSAGA als umfassende multidiagnostische psychiatrische Befragung zeigte sich eine hohe Zuverlässigkeit für DSM-III-R-Substanzabhängigkeitsstörungen und eine moderate Zuverlässigkeit für Substanzmissbrauchsstörungen.

Anhand einer Kappa Statistik kann der Grad der Übereinstimmung verschiedener Beobachter ermittelt werden, wenn diese die gleiche Stichprobe bewerten. Kappa nimmt Werte im Bereich 0 (zufällige Übereinstimmung) bis +1 (perfekte Übereinstimmung) an (Viera und Garrett 2005). Die Kappa Statistik bei verschiedenen Interviewern des SSAGA zeigte Kappa Werte zwischen 0,86 für konstanten Konsum trotz Problemen sowie 0,83 für Entzug bis zu 0,64 für von mehr Konsum als beabsichtigt (Bucholz et al. 1994).

Eine weitere Studie untersuchte den SSAGA für Alkohol- und Drogenabhängigkeit sowie unter anderem für Depression und Angststörungen mit dem Vergleichsinstrument Schedule for Clinical Assessment in Neuropsychiatry (SCAN). Die Instrumente wurden in zufälliger Reihenfolge im Abstand von einer Woche angewendet. Die Sensitivität wurde mit 92,3%, die Spezifität mit 71,9% ermittelt. Die positiven bzw. negativen Vorhersagewerte lagen bei SSAGA bei 64,9% bzw. 95,3%. Es konnte ein Kappa Wert von 0,63 für Alkoholabhängigkeit evaluiert werden. (Hesselbrock et al. 1999). Der SSAGA gilt somit als valides Instrument für den Einsatz in Studien, die sich mit psychiatrischen Störungen einschließlich Alkoholgebrauchsstörungen befassen.

2.2.2. Allgemeiner Gesundheitsfragebogen

Zur Erkennung allgemeiner Erkrankungen wurde nach Aufklärung und Einholung des Einverständnisses in der Kontrollgruppe ein allgemeiner Gesundheitsfragebogen in Selbstregie ausgefüllt. Dieser dient zur Erfassung folgender Erkrankungen:

Herz- / Kreislauferkrankungen (Hoher Blutdruck, Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen, Herzinfarkt, Herzklappenersatz, Herzschrittmacher, Z.n. Herzoperationen, Endokarditis), infektiöse Erkrankungen (HIV-Infektionen, Hepatitis A/B/C, weitere Infektionskrankheiten), Anfallsleiden, Z.n. Schlaganfall, Z.n. Thrombose, Asthma / Lungenerkrankungen, Blutgerinnungsstörungen, Diabetes / Zuckerkrankheit, Augenerkrankungen (Grüner Star), Nierenerkrankungen, Schilddrüsenerkrankungen, Lebererkrankungen, Gelenkprothesen, Allergien bzw. Unverträglichkeiten (Antibiotika, Medikamentenunverträglichkeiten, Allergiepass), Tumorerkrankungen, Z.n. Radio- / Chemotherapie, Medikamenteneinnahme, Z.n. Organtransplantation, Z.n. Stammzelltransplantation, durchschnittlicher Alkoholkonsum pro Woche.

Die Bearbeitung des Gesundheitsfragebogens diente zur Abklärung etwaiger Risikofaktoren bezüglich der Blutabnahme sowie zur Aufdeckung potenzieller Ausschlusskriterien.

2.3. Laboranalyse

Sämtliche Labormessungen erfolgten in der Abteilung Epigenetik (Leiter: PD Dr. Peter Zill) des Labors für Molekulare Neurobiologie der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

DNA-Präparation

Die DNA wurde aus 7,5 ml Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Vollblut mittels des E.Z.N.A. SQ Blood DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, USA) nach Herstellerangaben extrahiert.

Analyse der DNA Methylierung in der Promotor CpG-Insel des GABRA4 Gens

Im Promotor Bereich des GABRA4 Gens befindet sich eine 743 bp lange CpG-Insel (Abbildung 4). Definitionsgemäß handelt es sich bei CpG-Inseln um mindestens 500 bp lange DNA-Regionen mit einem GC-Anteil größer 50% und einem Verhältnis zwischen beobachteter und

erwarteter CpG-Häufigkeit größer 65% (Illingworth und Bird 2009). Die Analyse der DNA Methylierung erfolgte mittels Pyrosequenzierung am PyroMark Q48 (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Genomische DNA wurde mithilfe des EpiTect Bisulfite Conversion Kit 48 (Qiagen, Hilden, Deutschland) zuerst bisulfitiert, wodurch unmethylierte Cytosine in der DNA chemisch zu Uracil umgewandelt werden. Uracil wird in der anschließenden Sequenzierung als Thymin nachgewiesen. Methylierte Cytosine bleiben nach Bisulfitierung unverändert. Die Bisulfitierung erfolgte nach Herstellerangaben. Stellvertretend für die Gesamt Methylierung der GABRA4-CpG-Insel wurden die Methylierung von 6 repräsentativen CpG-Stellen unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Assays bestimmt (PyroMark CpG Assay, Nr. PM00110761; Qiagen, Hilden, Deutschland). Auch hier erfolgte der Nachweis nach Herstellerangaben. Die CpG-Stellen befinden sich an den Positionen 4959, 4974, 4986, 4993, 4995 und 5000 (Abb. 4) (NCBI Reference Sequence: NG_011809.1). Die Positionen 4959, 4974, 4986, 4993, 4995 und 5000 werden im Folgenden als CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 und CpG6 bezeichnet.

Die Auswertung und Quantifizierung der CpG-Methylierung wurde mit der Q48 Autoprep Software 2.4.2 (CpG Analyse Modus) in Form von prozentualen Werten durchgeführt.

GGTCTCAAAGGTGGTTTGAGCCCGACTTGATCCCCCTCCTCACCA
CCGCTACCACCCGACGCCAGCAGTCCCCGTCACCCGCCCTTTCTCC
ACCTCCAACCTTGACTCTGGGTACAAACAGGTCCTCGCACAACCTGA
TGACAGAGGAGCTTCATTGGTTAGATCCAAATCCAGCGGAAGGGAG
GGGCCAGGAGGTAGGAGGACGAACACTGCTGTGGGCGGGGAGCCCA
CTTGGGGTCGGGGGCTGCGAAGCCGGAGGAGGGGCGAGAGACCCGT
TCCTCATCCCCGGAGTTACAGTCGGAACAAACTTGCCGAGTCTTGCA
GCGCAAGCGCGCGGATACGAACCCAGAACCTTCAGCGCGCGGGCAC
GAAAGGGTGTGGAGCGGTATACATAGCTCTACATACACATTGAGCGC
TGAGCGAGAAAGGAGGGGGCGAGGAAGGCAGGTTCCCGCTCCCTGG
CCCCGTGCACACACACGCCACCGCGGCTCGGGCTGGCTGAGCGCGG
GCGAGTGTGAGCGCGAGTGTGCGACCGCGGGAGCCTCTTGCCC
TCTCTCGCACCTGCTCAGGGCATCTGAAGAGCCTGAAACGTGAA
CAGGCTTGAAGTATGGCATGTTGCAAAGATGTTTCTGCCAAGAAGG
TACCCGCGATCGCTCTGTCCGCGGGGTCAGTTTCGCCCTCCTGCGC
TTCTGTGCCTGGCGGTTTGGTGAGTTCTCTGGGGTCGAGGAGGTG
GGCAACGGAAAGTGGAGAAATGGCTAGCTCCGGGACCCCTTTGGCCA
CTCGCTCCTCCCTGGGTGACTAGGTCTTCTTATCTCAGCTGTAAGA
GCAGGGGCCGAAGCCAGGCTTTCTGTGACCGCATAGATGCGGAGAG
CACCAAGGGCGCAGGATCCAAGAGGCGTGTGGGCACTGGGGTCTTG
CGGCGGGGCGCGCTTTTCTGACCATTTCTGTCTTCTGCATCCCAAC
CCCCAACCTCCTCCTTTAGCTTGGGGCAAGCGACTCTTTCCCTAG
AAAACAAACCTGTTTGACCTGTCTCTGATGGATTCTTAAAAATAAT
CTCCTCCGCCCCCGTTTTTTTTTTTTTCGCTTGCAGTTTAAACGAAT
CCCCAGGACAGAACCAAAAGGAGGAGAAATTGTGCACAGAAAATTTT
ACCCGCATCCTGGACAGTTTGCTCG

Abbildung 4: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz (Promotor) des humanen Gamma-Aminobuttersäure Typ A Rezeptors α 4-Untereinheit (GABRA4) auf Chromosom 4

*NCBI Reference Sequence: NG_011809.1; CpG-Insel: 4709-5452 (unterstrichen); CpGs (rot markiert), Position des Pryomark CpG-Assays (gelb hinterlegt).

2.4. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Statistical Package for Social Sciences (SPSS), Version 27 herangezogen. Es erfolgte die Festlegung des Signifikanzniveaus der α Fehlerwahrscheinlichkeit von Signifikanztests auf $\alpha = 0,05$.

Zur deskriptiven Datenanalyse wurden Häufigkeitsanalysen verwendet, die Daten werden in absoluten und relativen Häufigkeiten aufgeführt, es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) zur Darstellung herangezogen.

Die Beschreibung des Alkoholkonsums erfolgte in Alkohol in g / Tag. Die Angabe des Alkoholkonsums in g / Tag wurde durch die Items E3A und E6B des SSAGA für jeden Patienten individuell errechnet.

Wichtige Ergebnisse wurden in Boxplots dargestellt. Die Methylierungen der verschiedenen Positionen CpG1-CpG6 wurden mittels Q48 Autoprep Software 2.4.2. (siehe auch 2.3.) in prozentualen Angaben errechnet und mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die Analyse von Versuchs- und Kontrollgruppe erfolgte separat.

Zur statistischen Auswertung der Promotor DNA Methylierungen der GABRA4 CPG Island wurde das Repeated Measures Design ANOVA zur Verlaufsuntersuchung der Versuchsgruppe verwendet. Dieser Test mit repetitiven Messungen wird verwendet, um mehrere Messungen derselben Variablen an übereinstimmende Probanden unter verschiedene Bedingungen und / oder an mehreren Zeitpunkten durchzuführen. Die Versuchs- und Kontrollgruppe wurden mittels T-Test verglichen. Repeated Measures Design ANOVA und Greenhouse-Geisser Korrektur wurden zur Analyse von Zusammenhängen des Trinkverhaltens und der Methylierung der GABRA4 CpG Promotor Island herangezogen. Als Innersubjektfaktoren wurden die Veränderungen der prozentualen Methylierung zwischen den Messzeitpunkten definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Versuchsgruppenbeschreibung

Die deskriptiven Daten des Patientenkollektivs werden in Tabelle 6 dargestellt. Das Kollektiv umfasste 71 alkoholabhängige Patienten im stationären Entzug.

Bezüglich der soziodemografischen Daten lässt sich folgendes zusammenfassen: Im Patientenkollektiv waren 71 (100%) männliche Personen vertreten. Das durchschnittliche Alter der Versuchsgruppe betrug 46,8 (\pm 11) Jahre.

3.2. Kontrollgruppenbeschreibung

Entsprechend den Kriterien der Versuchsgruppe wurden ausschließlich männliche Studienteilnehmer in die Kontrollgruppe eingeschlossen. Die Kontrolle wurde an 51 (100%) Männern durchgeführt.

Die rekrutierte Kontrollgruppe zeigte keine psychiatrischen Diagnosen nach ICD-10. Der maximale Alkoholkonsum lag bei 2 Bier / 1 Glas Wein pro Woche, im optimalen Falle lebten die

Probanden der Kontrollgruppe abstinent. In der Kontrollgruppe kann somit von keinem regelmäßigen Alkoholkonsum ausgegangen werden.

Das durchschnittliche Alter der Kontrollgruppe betrug 42,8 (\pm 11) Jahre (Tabelle 6).

Zwischen dem Altersmittelwert der Probanden der Versuchsgruppe sowie jenem der Kontrollgruppe ergibt sich eine Differenz von 4 Jahren. Zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe gab es bezüglich des Alters einen signifikanten Unterschied ($t=1,98$, $p<0,05$ T-Test).

Die Kontrollen waren im Mittel jünger als die Probanden. Aufgrund der kleinen Differenz wurde kein Altersmatch durchgeführt.

Tabelle 6: *Alter der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe bei Blutabnahme(n)*

Alter	Versuchsgruppe (ALC)	Kontrollgruppe (CNT)
N	71	51
Mittelwert	46,8	42,8
Std. Abweichung	11	11

3.3. Therapie

Die 71 rekrutierten Patienten nahmen an einer stationären Entgiftung mit einer regulären Dauer von 14 Tagen teil. Die Entgiftung wurde leitliniengerecht mit Unterstützung von Oxazepam je nach Schweregrad des Entzugssyndroms sowie auftretenden Nebenwirkungen durchgeführt. Im Falle von entzugsbedingten epileptischen Anfällen in der Vorgeschichte wurde Levetiracetam verabreicht. Die individuelle Vormedikation wurde während der Studiendauer fortgeführt.

3.4. Drop Outs

Probanden, die in wissenschaftlichen Untersuchungen bzw. klinischen Studien mit prospektivem Design akquiriert werden, jedoch vor Studienabschluss ausscheiden, werden als Drop Outs bezeichnet. Es wurden initial 71 Patienten und 51 Kontrollen rekrutiert. 71 Patienten (100%) erhielten Blutabnahmen zu den ersten drei Visiten. Eine Follow Up Untersuchung nach einem Zeitraum von 6 bis 9 Monaten konnte bei 7 Patienten (9,6%) durchgeführt werden.

Aufgrund des Studiendesigns konnten seitens der Kontrollgruppe keine Drop Outs entstehen (Abbildung 5).

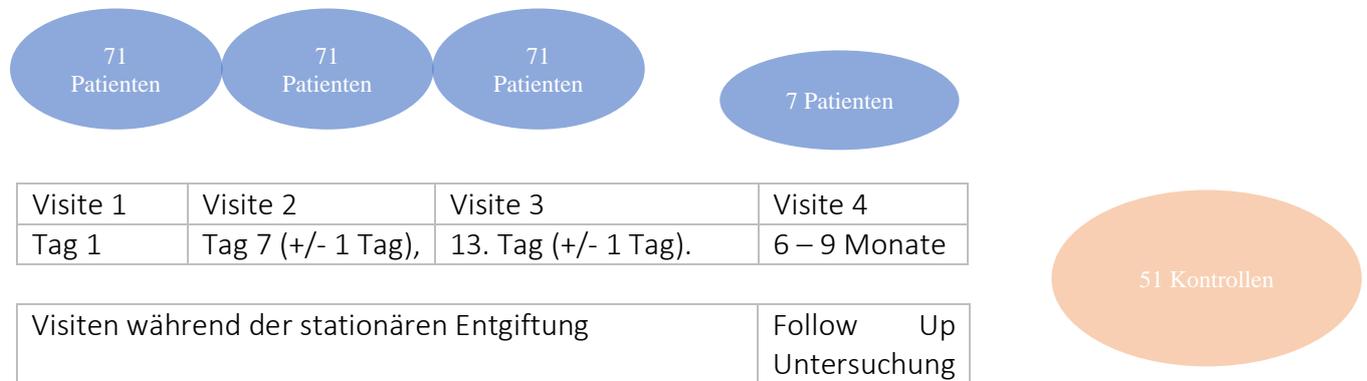


Abbildung 5: Anzahl der Studienprobanden (Versuchs- und Kontrollgruppe) im Verlauf

3.5. Analyse der Messinstrumente

Analysen der Barratt Impulsiveness Scale (BIS)-15, des Child Trauma Questionnaire (CTQ), des Family History Assessment Module (FHAM), des Impulsive Relapse Questionnaire (IRQ), die während des stationären Aufenthalts des Patientenkollektivs durchgeführt wurden, werden hier nicht weiter aufgeführt.

Die Analyse des SSAGA fokussierte sich auf alkoholbezogene mehrteilige Items der Kategorie E. Das Anfangsalter eines regelmäßigen Alkoholkonsums, definiert als Konsum einmal pro Monat für mindestens sechs Monate oder mehr lag bei 24,9 (+/-9,77) Jahren. Die Periode mit täglichem Alkoholkonsum dauerte durchschnittlich 195,58 (+/-314,06) Wochen. Die Probanden der Versuchsgruppe wiesen im Durchschnitt einen Alkoholkonsum von 156,73 (+/-108,98) g pro Tag vor stationärer Aufnahme auf (Tabelle 7). Dieser durchschnittliche Mengenwert wurde mittels SSAGA Items E3A und E6B konstruiert und errechnet. Die Periode der maximalen Dauer ohne Alkoholkonsum lag im Durchschnitt bei 12,91(+/-24,11) Monaten.

Tabelle 7: Deskriptive Datenanalyse gesonderter Items der Kategorie E des SSAGA (Versuchsgruppe N=71)

Itemname SSAGA	Beginn des regelmäßigen Alkoholkonsum (Alter in Jahren) vgl. SSAGA E4	Periode mit täglichem Alkoholkonsum (in Wochen) vgl. SSAGA E6C	Angabe des durchschnittlichen Alkoholkonsum (in g/Tag) *	Periode der längsten Dauer ohne Alkoholkonsum (in Monaten) vgl. SSAGA E8
Mittelwert	24,90	195,58	156,73	12,91
Std.-Abweichung	9,77	314,06	108,98	24,11

* Dieser durchschnittliche Mengewert wurde mittels SSAGA Items E3A und E6B konstruiert und errechnet.

3.6. Auswertung der Laboranalysen

Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Analysen der abgenommenen EDTA Vollblut Proben zu den Zeitpunkten Visite 1, 2, 3 (entspricht ALC1, ALC2, ALC3), sowie der Follow Up Untersuchung (ALC4) der Versuchsgruppe (ALC). Die Definition der Zeitpunkte findet sich unter Material und Methoden, im Folgenden werden diese als Visite 1 bis 4 bzw. ALC1 – ALC4 bezeichnet. Es wurden die DNA Methylierungen von 6 GpC Stellen im GABRA4 - Promotorgen gemessen, die im Folgenden CpG1 bis CpG6 genannt werden.

Die Kontrollen wurden einmalig gemessen (CNT), auch hier erfolgte die Untersuchung der sechs CpG-Stellen im GABRA4-Promotor, die analog CpG1-CpG6 bezeichnet werden.

Das Kollektiv der Versuchsgruppe (ALC) mit 71 Blutabnahmen zeigt eine prozentuale DNA Methylierung von 8,0 (\pm 3,8) % an CpG1, 8,5 (\pm 6,2) % an CpG2, 4,6 (\pm 4,0) % an CpG3, 6,6 (\pm 3,2) % an CpG4, 4,3 (\pm 2,8) % an CpG5, sowie 6,8 (\pm 3,6) % an CpG6 bei Visite 1 / ALC1.

Die prozentualen Methylierungsanalysen bei Visite 2 / ALC2 ergaben 9,7 (\pm 4,8) % an CpG1, 11,6 (\pm 8,6) % an CpG2, 5,3 (\pm 2,8) % an CpG3, 8,2 (\pm 5,4) % an CpG4, 5,0 (\pm 3,1) % an CpG5 und 8,4 (\pm 4,0) % an CpG6.

Bei Visite 3 / ALC3 zeigten sich DNA Methylierungen von 9,1 (\pm 4,0) % an CpG1, 11,0 (\pm 6,9) % an CpG2, 5,4 (\pm 3,3) % an CpG3, 7,2 (\pm 3,9) % an CpG4, 5,3 (\pm 3,4) % an CpG5, 8,3 (\pm 4,7) % an CpG6.

Die Follow Up Untersuchung (entspricht Visite 4 / ALC4) nach einem Zeitraum von 6 bis 9 Monaten konnte bei 7 Patienten durchgeführt werden. Hier ergaben sich prozentuale DNA

Methylierungswerte von 7,5 (\pm 2,6) % an CpG1, 6,9 (\pm 2,4) % an CpG2, 4,0 (\pm 1,6) % an CpG3, 5,5 (\pm 1,6) % an CpG4, 3,8 (\pm 1,6) % an CpG5, 5,6 (\pm 2,4) % an CpG6.

Bei den Kontrollen (CNT) betrug die DNA Methylierung der GABRA4 CpG-Stellen im Promotor 8,5 (\pm 3,8) % an CpG1, 8,7 (\pm 6,2) % an CpG2, 5,2 (\pm 4,0) % an CpG3, 8,0 (\pm 3,2) % an CpG4, 5,2 (\pm 2,8) % an CpG5 und 7,4 (\pm 3,6) % an CpG6 (Tabelle 8).

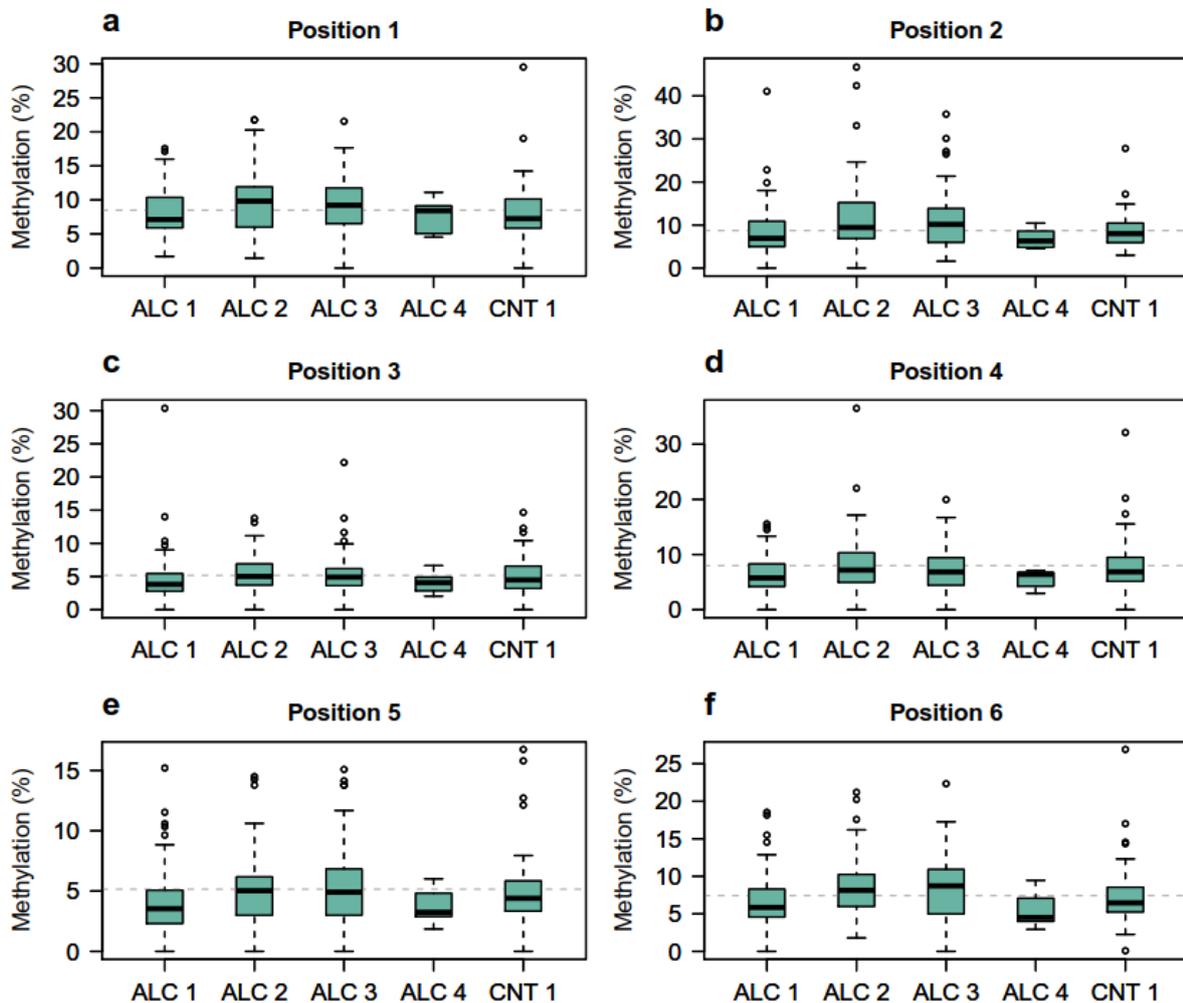


Abbildung 6: Promotor DNA Methylierung der untersuchten GABRA4 CpG-Positionen der Versuchs- und Kontrollgruppe

*ALC = Versuchsgruppe; CNT = Kontrollgruppe; ALC1 - ALC4 / Visite 1 - Visite 4 = Zeitpunkte der Probenentnahme der ALC / Versuchsgruppe; CNT 1 = Probe der CNT / Kontrollgruppe; Position 1-6 = CpG1 – CpG6 (Positionen der CpG Insel, die ausgewertet wurden).

In Abbildung 6 wird die Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens in prozentualer Angabe an CpG1 bis CpG 6 dargestellt. ALC 1, ALC 2, ALC 3 und ALC 4 bezeichnen die Messungen an den Zeitpunkten Visite 1 bis Visite 4 der Versuchsgruppe (ALC). Hierbei entspricht Zeitpunkt 4 der Follow Up Untersuchung von 7 Patienten.

CNT 1 zeigt die einmalige Messung der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde durch eine waagrechte graue Linie als Referenz eingefügt.

3.6.1. Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens der Versuchsgruppe während Alkoholentgiftung

Zur Untersuchung eines signifikanten Unterschiedes der Promotor DNA Methylierung der GABRA4 Rezeptorgen CpG-Stellen wurde eine Repeated Measures ANOVA mit in Tabelle 8 gezeigten Ergebnissen herangezogen.

Tabelle 8: Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens (in %) an CpG1-CpG6 im Verlauf der Entgiftung (ALC), Promotor DNA Methylierung des GABRA 4 Rezeptorgens (in%) an CpG1-CpG6 der Messung der CNT-Gruppe

	Visite	ALC1	ALC2	ALC3	ALC4	
	CpG	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	p-Wert
ALC	CpG1	8,0 (3,8)	9,7 (4,8)	9,1 (4,0)	7,5 (2,6)	0,016
	CpG2	8,5 (6,2)	11,6 (8,6)	11,0 (6,9)	6,9 (2,4)	0,001
	CpG3	4,6 (4,0)	5,3 (2,8)	5,4 (3,3)	4,0 (1,6)	0,301
	CpG4	6,6 (3,2)	8,2 (5,4)	7,2 (3,9)	5,5 (1,6)	0,033
	CpG5	4,3 (2,8)	5,0 (3,1)	5,3 (3,4)	3,8 (1,6)	0,018
	CpG6	6,8 (3,6)	8,4 (4,0)	8,3 (4,7)	5,6 (2,4)	0,003
	Visite	ALC1	ALC2	ALC3	ALC4	
CNT	CpG1	8,5 (3,8)				
	CpG2	8,7 (6,2)				
	CpG3	5,2 (4,0)				
	CpG4	8,0 (3,2)				
	CpG5	5,2 (2,8)				
	CpG6	7,4 (3,6)				

ALC = Versuchsgruppe; CNT = Kontrollgruppe; CpG = Position des Cytosin-Guanin Dinukleotids, die ausgewertet wurde; Angaben der Methylierung in %; SD = Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzniveau bei $\alpha=0,05$. Es sind die deskriptive Statistik sowie der p-Wert dargestellt.

ALC 4 / Visite 4 wird hier grau dargestellt und ist in den p-Wert Berechnungen nicht berücksichtigt.

Ein signifikantes Ergebnis ($p<0,05$) gibt an, dass es im zeitlichen Verlauf statistisch signifikante Unterschiede der CpG1-CpG6 Promotor DNA Methylierungen des GABRA4 Rezeptorgens gab. Es zeigte sich eine statisch signifikante Änderung der DNA Methylierung an CpG1 ($p=0,016$), CpG2 ($p=0,001$), CpG4 ($p=0,033$), CpG5 ($p=0,018$), sowie CpG6 ($p=0,003$) im zeitlichen Verlauf

(Tab 8). Hierbei erfolgt keine Aussage darüber, zwischen welchen Messzeitpunkten diese Differenzen auftreten.

Lediglich bei CpG3 konnte mit $p=0,301$ kein statistisch signifikantes Resultat nachgewiesen werden.

Bei Einschluss der Messungen der 7 untersuchten Probanden konnte keine Signifikanz festgestellt werden, diese werden in Tabelle 8 zur Vollständigkeit grau dargestellt.

Ausgehend von meinen Ergebnissen im zeitlichen Verlauf kann ich postulieren, dass sich ein Anstieg der Mittelwerte der prozentualen DNA Methylierung der analysierten GABRA4 CpG-Stellen (abgesehen CpG3) von Visite1 / ALC 1 zu Visite 2 / ALC 2 zeigte, sowie ein leichter Abfall der Mittelwerte der prozentualen DNA Methylierung von Visite2 / ALC 2 zu Visite3 / ALC 3.

(Eine Ausnahme stellt hier Position 5 / CpG5 dar) (Abbildung 7).

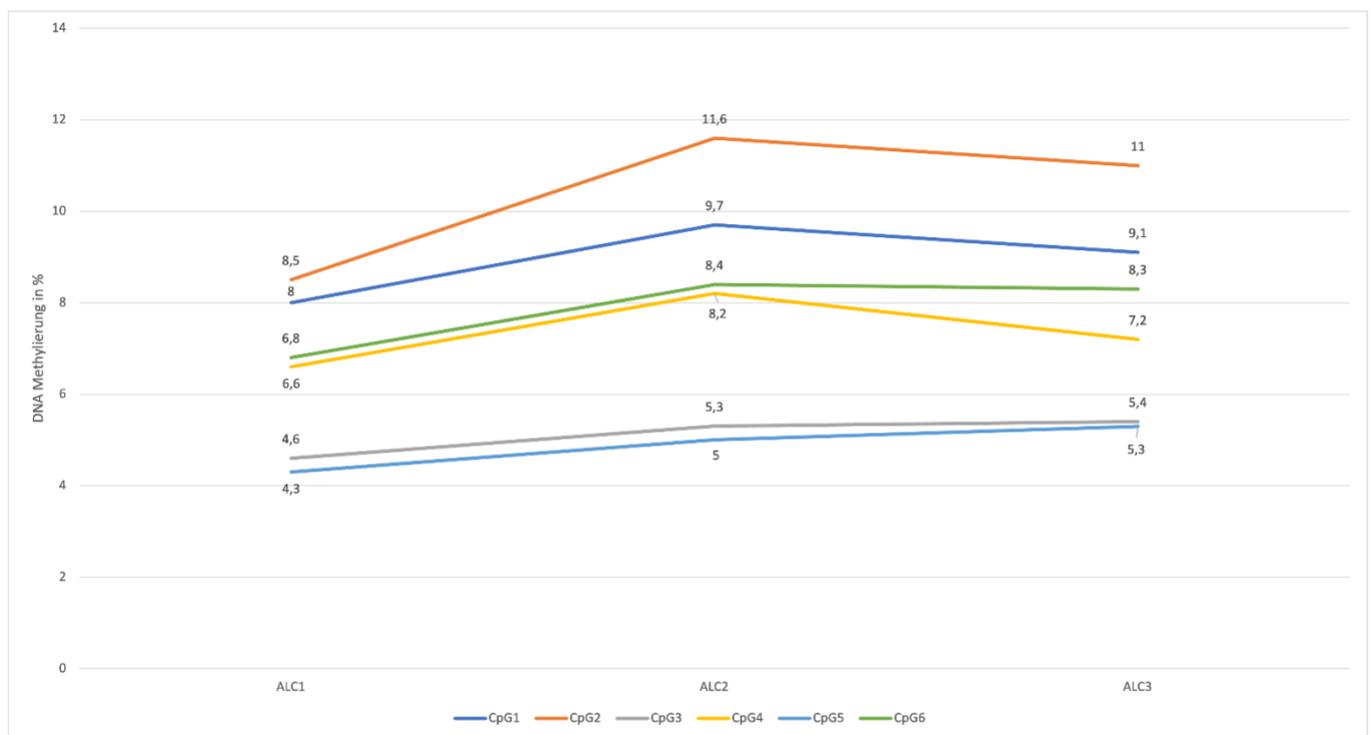


Abbildung 7: Promotor DNA Methylierung der analysierten CpG1-6 des GABRA4 Rezeptorgens der Versuchsgruppe

ALC 1, ALC 2, ALC 3 = Visite 1, Visite 2, Visite 3 der Versuchsgruppe; CPG1-CpG6 = Positionen des Cytosin-Guanin Dinukleotids, die ausgewertet wurden; Angaben der Methylierung in %

Zwischen Visite 1 / ALC 1 und Visite 3 / ALC 3 konnte ein Anstieg der prozentualen DNA Methylierung an CpG1 bis CpG6 beobachtet werden.

Bei Betrachtung der DNA Methylierung zu Visite 4 / ALC 4 fiel ein genereller tendenzieller Abfall der prozentualen Mittelwerte auf, dies bezieht sich sowohl auf Visite 3 / ALC 3, wie auf die Baseline Visite 1 / ALC 1, dieser war statistisch nicht signifikant.

Zusammengefasst kann von einem Anstieg der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens an den analysierten CpG Positionen CpG1, CpG2, CpG4, CpG5, CpG6 im 14-tägigen Beobachtungszeitraum ausgegangen werden. Ein Peak wurde in der ALC 2 Analyse festgestellt. Nach 6-9 Monaten kam es tendenziell zu einem Abfall der untersuchten CpG Positionen.

3.6.2. Zusammenhänge des Trinkverhaltens der Probanden der Versuchsgruppe und der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens

Die Altersangabe zu Beginn des regelmäßigen Alkoholkonsum (SSAGA E4), Angabe der durchschnittlich täglich konsumierten Alkoholmenge, Periode mit täglichem Alkoholkonsum in Wochen (SSAGA E6C), sowie Anzahl der Monate ohne Alkoholkonsum (SSAGA E8), erhoben durch semistrukturierte Interviews mittels SSAGA, zeigten keinen Einfluss auf die DNA Methylierung der sechs CpG-Stellen im GABRA4 Promotor in meiner Stichprobe ($F(17,102)=0694, p=0,570$). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, so dass auf post-hoc Testen verzichtet wurde.

3.6.3. Vergleich der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens von Versuchsgruppe und Kontrollgruppe

Die Messungen der Patientengruppe zu Visite 1, 2, 3 / ALC 1, ALC 2, ALC 3 wurden mit der einmaligen Messung der Kontrollgruppe (CNT 1) verglichen und auf signifikante Unterschiede untersucht.

Tabelle 9: Unterschiede der Promotor DNA Methylierungen des GABRA4 Rezeptorgens (in %) der ALC und CNT-Gruppe

Visite	CpG	ALC Mittelwert	CNT 1 Mittelwert	p-Wert
ALC 2	CpG2	11,6	8,7	0,01928
ALC 3	CpG2	11	8,7	0,02427
ALC 4	CpG4	5,5	8,7	0,01356

*ALC = Versuchsgruppe; ALC 2, ALC 3, ALC 4 entspricht Visite 2, Visite 3, Visite 4 der Versuchsgruppe; CNT 1 = Probe der Kontrollgruppe; CpG = Position der CpG Insel, die ausgewertet wurde; Angabe der Methylierung in %; p-Wert: Signifikanzniveau bei $\alpha=0,05$.

Der Vergleich der einmaligen Messung der CNT (CNT 1) und der Visite 1 der ALC-Gruppe (ALC 1) ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der prozentualen GABRA4 Promotor DNA Methylierung feststellen. Dies galt für alle 6 gemessenen CpG-Positionen (CpG1 bis CpG6).

Signifikante Unterschiede zeigten sich im Vergleich der einmaligen Messung der CNT-Gruppe (CNT 1) zur Visite 2 / ALC 2 der ALC-Gruppe an CpG2 ($p=0,01928$), im Vergleich der einmaligen Messung der CNT-Gruppe (CNT 1) und der Visite 3 / ALC 3 der ALC-Gruppe ebenso an CpG2 ($p=0,02427$), sowie im Vergleich der einmaligen Messung der CNT-Gruppe (CNT 1) und der Visite 4 / ALC 4 der ALC-Gruppe an CpG4 ($p=0,01356$) (Tabelle 9).

Im Vergleich der Versuchsgruppe und Kontrollgruppe ergaben sich signifikante Unterschiede an vereinzelt analysierten CpG Positionen an Visite 2 / ALC 2, Visite 3 / ALC 3 und Visite 4 / ALC 4.

Nach Adjustierung auf multiples Testen sind die aufgeführten Resultate nicht signifikant.

4. Diskussion

Die Diskussion soll zuerst Aspekte des Studienablaufes beinhalten. Des Weiteren sollen die eingangs erläuterten Fragestellungen der explorativen Studie erörtert werden.

Zum aktuellen Zeitpunkt existiert wenig Literatur zu der speziellen Fragestellung der DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens unter Alkoholeinfluss / Alkoholentzug. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden somit auch mit Studienergebnissen experimenteller Ansätze, sowie mit Publikationen verwandter Thematiken diskutiert.

4.1. Versuchsgruppe

Der durchschnittliche tägliche Alkoholkonsum lag 2015 bei Männern zwischen 18 und 59 Jahren bei 16 g Reinalkohol / Tag, bei gleichaltrigen Frauen bei 9 g. 18 % der Männer und 14 % der Frauen nahmen riskante Mengen Alkohol zu sich (>20 g Reinalkohol/Tag für Männer und >10 g Reinalkohol/Tag für Frauen). Der Pro-Kopf-Verbrauch von Reinalkohol der über 15-jährigen

Bevölkerung lag im Jahr 2014 bei 11,0 Litern (5,9L Bier, 3,1L Wein/Schaumwein, 2,1L Spirituosen). Damit liegt Deutschland etwas über dem durchschnittlichen Alkoholkonsum der EU-Mitgliedstaaten von 10,6 Litern. (Deutsches Krebsforschungszentrum und Pabst Science Publishers 2017).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass männliche Personen unserer Gesellschaft größere Mengen Alkohol sowie häufiger konsumieren.

Die Versuchsgruppe bestand ausschließlich aus männlichen Patienten mit chronischem Alkoholabusus bestehend seit mindestens zwei Jahren. Somit wird das epidemiologische Geschlechterverhältnis in der rekrutierten Versuchsgruppe nicht wiedergespiegelt. Ein Einschluss von weiblichen Probandinnen in die Studie ließ sich jedoch u.a. auf Grund von hormonellen Einflussfaktoren nicht umsetzen.

Das Alter der Menschen in Deutschland mit dem vergleichsweise höchsten Alkoholkonsum von durchschnittlich 70 g täglich (männliche Bevölkerung) und 43 g täglich (weibliche Bevölkerung) liegt zwischen dem 50. und 65. Lebensjahr (Griswold et al. 2018).

Der Altersdurchschnitt der untersuchten Versuchsgruppe ist mit 46 (+/-11) Jahren jünger.

In der vorliegenden Studie wurden jedoch Probanden mit diagnostizierter Alkoholgebrauchsstörung untersucht. Hier konnte die durchschnittliche Trinkmenge von 156 (+/-108) g pro Tag ermittelt werden. Die große Standardabweichung drückt die starke Streuung dieser Variable aus. Repräsentative Studien zur Trinkmenge von Alkoholikern liegen nach meinen Erkenntnissen zum aktuellen Zeitpunkt nicht vor. Dies könnte unter anderem durch eine Verharmlosung der realen Konsummenge und großen interindividuellen Unterschieden im Trinkverhalten begründet sein.

Die Untersuchung ausschließlich männlicher Probanden, das durchschnittlich jüngere Alter des Patientenkollektivs im Vergleich zu Daten der Allgemeinbevölkerung, sowie das individuelle Trinkverhalten der Probanden muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.2. Kontrollgruppe

Das durchschnittliche Alter der Versuchsgruppe lag bei 46 (+/- 11) Jahren, die Kontrollen waren im Schnitt 42 (+/-11) Jahre alt. Es konnte eine signifikante Altersdifferenz nachgewiesen werden. Bei einer Differenz des Altersdurchschnitts von 4 Jahren wurden störende

Einflussfaktoren wie Stoffwechselerkrankungen etc. vernachlässigt. Auf eine potenziell diskutabile Vergleichbarkeit der Einflussgrößen Alter soll nicht weiter eingegangen werden.

Etwa 3-10% der deutschen Bevölkerung lebt absolut alkoholabstinent (Deutsches Krebsforschungszentrum und Pabst Science Publishers 2017; Tölle et al. 2014). Weitere Studien belegen, dass Deutschland mit einer Prävalenz von 94% (männliche Bevölkerung), sowie 90% (weibliche Bevölkerung) unter den ersten fünf Ländern bezüglich des verbreiteten Alkoholkonsums liegt. Aufgrund einer geringen Anzahl abstinent lebender Menschen wurde in der vorliegenden Studie das Einschlusskriterium eines Alkoholkonsums von maximal 2 Bier / 1 Glas Wein (etwa 20 – 35 g Alkohol) pro Woche für die Kontrollgruppe definiert.

Resultate der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) belegen einen riskanten Alkoholkonsum von durchschnittlich täglich mehr als 10 g (Frauen) / 20 g (Männer) Reinalkohol von 13,1% der weiblichen und 18,5% der männlichen Bevölkerung (Robert Koch-Institut 2016b).

Der festgelegte maximale Alkoholkonsum der Kontrollgruppe entspricht somit einer deutlich geringeren Konsumierung verglichen mit dem der deutschen Bevölkerung mit tendenziell riskantem Konsum und wurde im Studiendesign definiert, um die Rekrutierung einer möglichst großen repräsentativen Fallzahl zu gewährleisten. Die Teilnehmer der Kontrollgruppe können somit als Referenz bezüglich der untersuchten DNA Methylierungen herangezogen werden. Ein Einschluss alkoholabstinent lebender Studienteilnehmer wäre wünschenswert gewesen, ließ sich aber auf Grund der oben dargestellten Statistiken und den weiter definierten Einschlusskriterien nicht umsetzen.

4.3. Medikamentöse Therapie mittels Benzodiazepine

Das Studiendesign der vorliegenden Studie sah keinen Einfluss auf die Therapie der Patienten nach stationärer Aufnahme vor. Die körperliche Entgiftung und somit die Behandlung der Alkoholintoxikation mit körperlich-neurologischen Symptomen sowie die qualifizierte Entzugsbehandlung mit dem essenziellen Ziel mit psycho- und soziotherapeutischen bzw.

psychosozialen Interventionen eine Änderungsbereitschaft der Patienten zu erreichen, wurde durch die Studie nicht beeinträchtigt.

Die medikamentöse Therapie wurde leitliniengerecht mit Benzodiazepinen durchgeführt. Diese führen zu einer Reduktion der Ausprägung der Entgiftungssymptomatik, sowie einem geminderten Auftreten von Delir und Krampfanfällen (Amato et al. 2011).

Die Medikamente wurden durch die Stationsärzte verordnet und wenn indiziert angepasst. Des Weiteren wurden die Vitalfunktionen sichergestellt und Komplikationen, wie Krampfanfälle medikamentös therapiert.

Der GABA A Rezeptor gilt als Hauptziel für die zentrale Wirkung von Benzodiazepinen, dies ist bereits seit längerem bekannt (Haefely et al. 1975). Deswegen sollen an dieser Stelle die Auswirkungen von Benzodiazepinen, die den Patienten der Versuchsgruppe während der Entgiftung verabreicht wurden, auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie diskutiert werden.

Die Bindestelle von Benzodiazepinen entspricht nicht der Bindestelle des Neurotransmitters GABA. Dies konnte in Struktur-Funktions-Studien gezeigt werden (Chang et al. 2000), dementsprechend entspricht sie auch nicht der Bindestelle von Ethanol. Bezüglich der Bindestelle der Benzodiazepine handelt es sich um eine Tasche, die von der α - und γ -Untereinheit gebildet wird. Die Bindestelle des Agonisten GABA befindet sich zwischen der α - und β - Untereinheit (Ris et al. 1975). Ausschlaggebend für die Wirkung von Benzodiazepinen sind spezifische Histidinreste H101, H126 und H105 der α_1 , α_2 , α_3 , α_5 Untereinheiten (Mulrennan et al. 1975). Weitere Studien belegen, dass GABA A Rezeptoren, die Isoformen der α_4 - und α_6 Untereinheit enthalten unempfindlich für Benzodiazepine sind. Dieses Phänomen ist durch einen Argininrest an der bereits erläuterten Position zu erklären (Benson et al. 1998; Korpi und Seeburg 1993). In Tierversuchen konnte festgestellt werden, dass Mäuse mit punktmutierten α_2 GABA A Rezeptor-Untereinheiten eine Resistenz bezüglich der anxiolytischen Wirkung von Benzodiazepinen im Rahmen von konditionierten emotionalen Reaktionen aufwiesen. Diese Ergebnisse sprechen für die Vermittlung der anxiolytischen Wirkung von Benzodiazepinen durch die α_2 Subunit (Dixon et al. 2008). Über epigenetische Mechanismen, wie Histonacetylierung und DNA Methylierungen durch Benzodiazepine, die zu einer geringeren Regulierung der GABA A Rezeptor Untereinheiten führen, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt wenig bekannt. Eine 10-14-tägige Behandlung mit steigender Dosierung von Diazepam in Rattenversuchen zeigte eine antikonvulsive Toleranz, sowie die Reduktion der Expression von mRNA und der α_1 -Untereinheit im Bereich des frontalen Kortex (Libíková et al.

1975; Uusi-Oukari und Korpi 2010). In weiteren Studien wurden die Mechanismen der Histon-Acetylierung und DNA Methylierungen ebenfalls im Rattenexperiment untersucht. Einerseits zeigen die Resultate, dass die Expression der mRNA der α 1-Untereinheit durch Diazepam, jedoch nicht durch Imidazenil verringert wird. Andererseits konnte postuliert werden, dass es durch Diazepam zu einer Erhöhung der Expression der Histondeacetylase HDAC1 und HDAC2 kommt (Auta et al. 2018; Sanna et al. 2003). Es konnte in kultivierten Hippocampus Neuronen nachgewiesen werden, dass ein Ersatz von Ethanol mit Diazepam den durch den Ethanol-Entzug induzierten Anstieg der Expression der α 4 Untereinheit verhinderte. Die durch den Ethanolentzug induzierte Zunahme der α 4 Rezeptoren kann somit durch Medikamente blockiert werden, die bei Entzugssyndromen Einsatz finden (Sanna et al. 2003).

Aufgrund des wichtigen Stellenwertes der Hauptwirkung der Medikamentengruppe auf den GABA A Rezeptor, sowie den aufgeführten molekularen Wirkungsmechanismus u.a. auf die Rezeptor Untereinheiten codierenden Gene GABRA2 und GABRA4 kann von einer Einflussnahme der medikamentösen Behandlung durch Benzodiazepine im Rahmen des stationären Aufenthaltes auf die vorliegende Studie ausgegangen werden.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit soll auf den Zusammenhängen des Alkoholkonsums sowie des Alkoholentzugs auf Veränderungen der DNA Methylierung des GABRA4 Gens liegen.

Korrelationen von Benzodiazepinen im Alkoholentzug auf epigenetische Veränderungen des GABRA4 wurden im vorliegenden Projekt leider nicht untersucht, könnten jedoch von großem Interesse für weitere Studien dieser noch kontroversen Thematik sein.

Benzodiazepine gelten in der Entgiftungsphase einer Suchterkrankung als Goldstandard. Hinsichtlich des zunehmenden Verständnisses und des Suchtpotentials von Benzodiazepinen könnte der Einsatz dieser in der Therapie evaluiert werden (Tan et al. 2011).

4.4. Drop Outs

Innerhalb des Zeitraums des 14-tägigen stationären Aufenthaltes der Patienten bzw. des Zeitraums der ersten drei Visiten entstanden erfreulicherweise keine verfrühten Ausscheidungen aus der Studie.

Bezüglich der Follow Up Untersuchungen konnten jedoch nur 7 Patienten des ursprünglichen Kollektivs kontaktiert und für eine weitere Blutabnahme akquiriert werden.

Psychologische Studien mit longitudinalem Design zeigen u.a. aufgrund von emotionaler Belastung der Probanden hohe Drop Out Anzahlen. So zeigten sich in Studien zur Thematik der posttraumatischen Belastungsstörungen Drop Out Raten von bis zu 50% (Schottenbauer et al. 2008). Bezüglich der durchgeführten Studie müssen zudem weitere Faktoren der körperlichen Entgiftung und die Entlassung nach stationärem Aufenthalt berücksichtigt werden. Da die Follow-Up Untersuchungen nach einem Zeitraum von 6-9 Monaten ambulant durchgeführt wurden, kann hier in Anbetracht von mangelnder Kooperation ein großer Drop Out verzeichnet werden.

Die Aussagekraft der Analysen der Follow Up Untersuchung ALC 4 ist möglicherweise zudem durch den großen zeitlich gesetzten Rahmen von 6 bis 9 Monaten mit einer potenziellen Differenz von 3 Monaten reduziert. Die definierten Zeitpunkte ALC 1, ALC 2, ALC 3 bieten im Sinne einer short-term Untersuchung hier besser zu interpretierende Resultate.

Trotz der kleinen Patientenzahl, die zusätzlich für eine vierte Visite rekrutiert werden konnte, wurden die Ergebnisse dieser Blutanalyse als long-term Analyse dargelegt. Für die Aussagekraft einer klinischen Studie ist jedoch eine gewisse Stichprobengröße erforderlich.

Bezüglich einer Änderung der DNA Methylierung im Verlauf der Studie wurden die Daten des Follow Ups zur Berechnung des Signifikanzniveaus exkludiert, da sich mit inkludierten Daten keine Signifikanz feststellen ließ. Bei kleinen Stichproben steigt das Risiko nicht aufgedeckter signifikanter Zusammenhänge.

Der Vergleich der Follow Up Untersuchung mit der Untersuchung der Kontrollgruppe ergab hingegen einen signifikanten DNA Methylierungsunterschied ($p=0,013$), und soll unter 5.5 weiter diskutiert werden.

Aus Gründen der Übersicht wurden die Ergebnisse der Visite 4 in Tabelle 8 grau dargestellt.

4.5. Laboranalysen

Zum aktuellen Zeitpunkt liegen wenige Erkenntnisse zu Untersuchungen von Promotor DNA Methylierungen des GABRA4 Rezeptorgens und Alkoholabhängigkeit vor. Eine prospektive Beobachtungsstudie/Fall-Kohorten-Studie zu dieser Thematik ist meines Wissensstandes nach bislang einzigartig. Die Ergebnisse werden somit in den Kontext von in-vivo Studien mit differentem Design sowie Tiermodellstudien gesetzt.

4.5.1. Potenzieller Einfluss weiterer genetischer und epigenetischer Mechanismen auf die Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens

4.5.1.1. GABRA2

Untersuchungen der Untereinheiten von Chromosom 4p12 in 36 menschlichen neuronalen Zelllinien zeigten eine Korrelation der RNA-Expression zwischen den vier aufeinanderfolgenden GABA A Subunit-Genen (GABRG1, GABRA2, GABRA4, GABRB1) und unterstützen die Hypothese, dass sich alkoholasoziierte Genvariationen von GABRA2 auch auf Expressionen anderer Subunits des 4p12 auswirken könnten (Lieberman et al. 2015).

In einer Metaanalyse wurden die Daten von 4739 Fällen und 4924 Kontrollen bezüglich Korrelationen von Alkoholabhängigkeit und den codierenden Abschnitten der Rezeptorsubtypen auf 4p12 untersucht. Hierbei wurden nur 5 der 8 Clustergene aufgrund von unzureichender Datenlage untersucht, und in diesem Zuge die Analyse von GABRA4 ausgeschlossen. Es konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit des Risikoallels von GABRA rs567926 zu 30% in der Kontrollgruppe und zu 44% bei betroffenen Personen nachgewiesen werden konnte. Das Verhältnis bei GABRA rs279858 zeigte sich zu 41% in den Kontrollgruppen, zu 46% bei betroffenen Personen (Li et al. 2014).

Untersuchungen von Atemalkoholspiegeln, sowie Blutproben von GABRA2 in Zusammenhang mit den Auswirkungen des Alkohols in einer groß angelegten Zwillingsstudie mit 372 Probanden zeigten Assoziationen aller Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP)s des Blocks zwischen rs567926 und rs1442059 und Körperschwankungen / Gleichgewicht (Lind et al. 2008).

Untersuchungen an postmortalen Proben des adulten Gehirns ergaben keine Korrelationen von alkoholasoziierten Genotyp Effekten auf die GABRA Expression von Chromosom 4p12. Dies könnte in Zusammenhang mit einer nachgewiesenen Korrelation in pluripotenten Stammzellen darauf hindeuten, dass Risiken für substanzbezogene Erkrankungen über entwicklungsbedingte Mechanismen gesteigert werden könnten (Lieberman et al. 2015). Eine Querschnittstudie beschäftigte sich mit der Analyse von Speichelproben, um Effekte von GABRA2 auf simultanen Alkohol- und Drogenkonsum zu erforschen. Es wurden Überwachungsprotokolle mit Genotypisierungsverfahren von 28263 Ereignissen angefertigt. Zudem konnten nicht nur Zusammenhänge zwischen den Probanden, sondern auch innerhalb der Person in Form einer longitudinalen Beobachtung angestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass GABRA2

Varianten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Konsums illegaler Drogen verbunden war (Mallard et al. 2018). Das Studiendesign der letztgenannten Untersuchung stimmt mit dem vorliegenden Projekt bezüglich des longitudinalen Verlaufes überein. Die heterogene Versuchsgruppe sowie die Messungen von Speichelproben bieten keine vergleichbare Basis.

4.5.1.2 DeNovoMethyltransferase

Im Fokus weiterer Untersuchungen zur Assoziation von Alkohol und DNA Methylierungen steht die DeNovo Methyltransferase (DNMT) Aktivität. Zhang et. al konnte in Astrozytenuntersuchungen im Tiermodell eine Reduktion der DNA Methylierung des Gewebeplasminogenaktivators sowie eine Abnahme von DNMT3A, nicht jedoch von DNMT1 nach Ethanolexposition nachweisen. Dies betont den Stellenwert von Astrozyten in der Hemmung der neuronalen Plastizität durch Alkoholabusus (Zhang et al. 2013).

Zudem konnte eine Hemmung der DNMT-Aktivität durch akute Ethanol-Verabreichung in der Amygdala in Mäusen nachgewiesen werden (Krishnan et al. 2014). Die unterschiedliche Regulierung der mRNA verschiedener DNMT-Isoformen weist auf einen unterschiedlichen Stellenwert verschiedener Isoformen bezüglich alkoholverursachter Wirkungen hin (Krishnan et al. 2014; Moonat et al. 2013).

Die mRNA-Expression von DNMT3a und DNMT3b wurde zudem in Blutproben von alkoholabhängigen Patienten sowie einer Kontrollgruppe untersucht. Hier konnte eine signifikante Abnahme der Expression beider DeNovo Methyltransferasen (DNMT3a und DNMT3b) der Alkoholikergruppe mit 459 Probanden verglichen mit der Kontrollgruppe von 466 Probanden festgestellt werden. Ein Unterschied der Expression der DNMT1 konnte nicht gezeigt werden. Eine höhere Blutalkoholkonzentration ging mit einer geringeren Expression der DNMT3b einher. Alkoholabhängige Patienten zeigten eine Erhöhung der genomischen DNA Methylierung in Vollblutzellanalysen, der mit reduzierten DNMT3 mRNA Konzentrationen auftrat und somit Hinweise auf Regulierungen durch Rückkopplungsmechanismen erlaubt (Bönsch et al. 2006).

Untersuchungen von chronischen Alkoholikern mit akuter Intoxikation, verglichen mit Patienten im Alkoholentzug zeigen eine deutliche Differenz des Homocysteinspiegels im Plasma (Bleich et al. 2000). In Verbindung mit der Funktion von Homocystein als Methylgruppendonator kann hier auch eine Assoziation zu DNA Methylierungen erwogen werden.

Faktoren, die zum Anstieg der DNA Methylierung der CpG Insel des GABRA4 Promotors führen könnten, sind die Regulierung von DNMT und der Homocysteinspiegel. Die spezifische Rolle der DNMT-Aktivität, die zu einer epigenetischen Modulation führen könnte, ist bis heute wenig erforscht und bietet Ansatz für weitere Studien. Im vorliegenden Projekt wurde die Untersuchung von Monozyten im Blut herangezogen, die eine wegweisende Richtung bezüglich in-vivo Longitudinalstudien aufweisen könnte.

4.5.1.4. GABRA4

Die eingangs aufgeführten Ergebnisse zur aktuellen Studienlage von DNA Methylierungen im GABRA4 Gen sollen nun bezüglich der eigenen Ergebnisse diskutiert und interpretiert werden. In folgenden Tierexperimenten wurde die Rolle von GABRA4 im akuten Alkoholentzug experimentell untersucht:

Untersuchungen der mRNA der GABA A Untereinheiten im Mausmodell zeigten einen signifikant starken Anstieg der Häufigkeit der $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ mRNA mit einem Höhepunkt 3h nach Beginn des Entzugs und einen Rückgang auf das Niveau der Kontrollgruppe nach 9-12h. (F für $\alpha 4 = 23.46$; $p < 0,001$). Dagegen zeigten Analysen der $\alpha 1$ Untereinheit mRNA eine Reduktion nach Ethanolbehandlung und eine konstante Reduktion 3 h nach Beginn des Alkoholentzugs (Sanna et al. 2003).

Weitere Studien wiesen ebenfalls einen signifikanten Anstieg des mRNA Spiegels der $\alpha 4$ Untereinheit im Ethanol Entzug nach (Devaud et al. 1995; Sanna et al. 2003).

In der vorliegenden Studie wurde jedoch nicht die mRNA, sondern die Methylierungen der DNA analysiert. In den meisten Fällen korreliert das Ausmaß der DNA Methylierung mit dem Ausmaß der Geninaktivierung (Abdolmaleky et al. 2004). Mit diesem Hintergrund würden sich die Ergebnisse dieser Studie und meiner Resultate widersprüchlich gegenüberstehen. Diese Widersprüche finden unter Umständen ihre Ursache in der Methodik, sowie in der Untersuchung der mRNA, die komplexen Regulationsmechanismen unterliegt.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Herabregulation von GABRA4 in kortikalen Neuronen sowie im somatosensorischen Kortex von Mäusen. Die verwendeten Alkoholmengen können mit Intoxikationen gleichgesetzt werden, die jedoch von chronischen Alkoholikern toleriert werden. Es konnte eine signifikante Reduktion der GABRA4 Expression in kortikalen Neuronen zwischen 3 und 24 Stunden nach Beginn des Entzuges aufgedeckt werden. Im somatosensorischen Kortex war die GABRA4 Expression nach 11 Stunden deutlich erniedrigt.

Die Resultate dieser Studie lassen sich nur bedingt mit dem vorliegenden Projekt vergleichen. Gemeinsam ist das Grundergebnis einer verminderten Expression während Alkoholentzug. Unterschiede finden sich vor allem in der Methodik eines Tierexperimentes und einer in vivo Studie, sowie der Untersuchung unterschiedlicher Zellen (Neuronen vs. Monozyten) und der Ursachen der verminderten GABRA4 Expression. Meine Studie richtet das Hauptaugenmerk auf die DNA Methylierung, während die Autoren sich auf die Expression und mikroRNA konzentrieren (Bekdash und Harrison 2015).

Die dargelegten Studien verfolgten zudem das Ziel short-term Veränderungen von epigenetischen Mechanismen bzw. Genexpressionen aufzuzeigen. Die Probenentnahmen und -analysen erfolgten im Abstand von wenigen Stunden.

Mein Studiendesign sah einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen (bis zu 6-9 Monaten im Follow-Up) vor. Diskrepanzen in der Entwicklungstendenz der Genexpression könnten auch in unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten begründet werden. Es könnte davon ausgegangen werden, dass bei Visite 1 (entsprechend ALC 1) in gewissen Fällen noch Alkoholintoxikation vorlag. Eine longitudinale Betrachtung von Veränderungen der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens in der Akutphase der Entgiftung in den ersten Stunden wurde nicht im Studiendesign berücksichtigt und kann somit nicht beurteilt werden.

4.5.2. Veränderung der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens der Versuchsgruppe

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Anstieg der durchschnittlichen Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens in den analysierten CpG-Stellen der ALC-Gruppe im Verlauf der Alkoholentgiftung (Visite 1 bis Visite 3) gezeigt werden. An 5 der 6 untersuchten CpG Positionen konnte ein signifikanter Unterschied der DNA Methylierung festgestellt werden. Lediglich an CpG3 konnte zwar ein Anstieg beobachtet werden, dieser war jedoch nicht signifikant.

Eine zunehmende DNA Methylierung ist generell mit einer verminderten Genexpression assoziiert.

Wir analysierten sechs repräsentative CpG Stellen im GABRA4 Promotor. Ob im vorliegenden Fall zwangsläufig auch eine verminderte Genexpression mit der DNA Methylierung einherging, können wir nicht bestätigen, da keine funktionellen Analysen durchgeführt wurden.

Limitierend ist aufzuführen, dass die Anzahl von 6 analysierten CpG Positionen nicht die Untersuchung jeglicher funktionell relevanter CpGs beinhaltet.

Dennoch postulieren wir, dass die untersuchten 6 CpG-Promotor Islands die Gesamtheit der CpGs innerhalb der GABRA4 CpG-Insel repräsentieren könnten und die Ergebnisse einer zunehmenden DNA Methylierung der hier analysierten CpG-Stellen meines explorativen Projektes somit auf das gesamte Gen transferiert werden könnten. Somit würde eine zunehmende Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens im Alkoholentzug mit einer Reduktion der Genexpression der GABA4 Rezeptor Untereinheit einhergehen. Dies hätte mit anderen Einflussfaktoren auch Auswirkungen auf das dopaminerge System und könnte neue Ansätze bezüglich des Verständnisses von Alkoholentzugssyndromen und deren Behandlung schaffen.

Eine zunehmende Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens in der Datenanalyse konnte nach Adjustieren auf multiples Testen nicht mehr gezeigt werden. Dies ist unter anderem in der zu kleinen Stichprobe begründet. Eine Anpassung des p-Werts auf Multiples Testen kann auf Grund des explorativen Charakters der vorliegenden Pilotstudie vernachlässigt werden. Hierzu sind unter Umständen weitere Studien mit analoger Fragestellung nötig.

4.5.3. Zusammenhänge des Trinkverhaltens der Probanden der Versuchsgruppe und der Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens

Das Trinkverhalten der Probanden wurde über das klinische Messinstrument SSAGA aufgenommen. Explizit wurden ausgewählte Items der Kategorie mit auf Alkoholkonsum bezogenen Fragestellungen herangezogen.

Es konnten keine Assoziationen des Lebensalters zu Beginn des regelmäßigen Alkoholkonsums, der Periode mit täglichem Alkoholkonsum, der durchschnittlich täglich konsumierten Alkoholmenge, sowie der Dauer der Periode ohne Alkoholkonsum auf die prozentuale DNA Methylierung der untersuchten CpG-Stellen im GABRA4 Promotor meiner Stichprobe nachgewiesen werden.

Es handelt es sich bei den angegebenen durchschnittlichen Alkoholmengen um errechnete Mengen zu Perioden des regelmäßigen Alkoholkonsums der Probanden, definiert als täglichen Alkoholkonsum für mindestens eine Woche oder mehr. Die Dauer dieser Periode zeigt hohe Standardabweichungen in der vorliegenden Studie. Perioden mit diesem durch den SSAGA

definierten Konsum stimmen nicht zwangsläufig mit dem Trinkverhalten der Probanden unmittelbar vor dem stationären Aufenthalt überein.

Der SSAGA und die daraus erhobenen Daten beruhen zudem auf Selbstbeurteilung der Probanden und können nicht verifiziert werden.

Eine objektive Erfassung des Alkoholkonsums gestaltet sich auf Grund individueller Suchtmuster trotz klinischer Messinstrumente in einer in vivo Studie mit Probanden als schwierig.

4.5.4. Vergleich der Promotor DNA Methylierungen des GABRA4 Rezeptorgens von Versuchsgruppe und Kontrollgruppe

Bei Aufnahme der alkoholabhängigen Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede der DNA Methylierungsrate der untersuchten CpG-Stellen im GABRA4 Promotor verglichen mit der Kontrollgruppe gesunder Probanden festgestellt werden. Es kann erwogen werden, dass zu Visite 1 / ALC 1 noch eine Alkoholintoxikation der Probanden der Versuchsgruppe bestand.

Während des Alkoholentzugs konnten zu den weiteren erhobenen Messzeitpunkten signifikante Unterschiede einzelner CpG-Stellen im GABRA4 Promotor zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe ausgemacht werden.

Dies resultiert in einer Veränderung der Promotor DNA Methylierung der untersuchten GABRA4 CpGs im zeitlichen Verlauf des Alkoholentzugs. Da jedoch nur einzelne der untersuchten GABRA4 CpG Stellen, präzisier CpG2 zur zweiten und dritten Visite sowie CpG4 zur vierten Visite eine verringerte DNA Methylierungsrate aufweisen, muss berücksichtigt werden, dass dies nicht mit einer DNA Methylierung aller CpG Stellen der gesamten CpG-Insel im GABRA4 Promotor korreliert sein muss.

Die letzte Messung konnte lediglich an 7 Probanden durchgeführt werden, hier dominiert eine hohe Differenz der durchschnittlichen DNA Methylierungsrate der untersuchten GABRA4 CpGs im Vergleich zur Kontrolle. Limitierende und zu diskutierende Faktoren sind hier die Betrachtung eines kleinen Kollektivs (n=7). Für aussagekräftigere Resultate müssten Longitudinalstudien mit größeren Probandenzahlen durchgeführt werden. Zudem bestand während des stationären Aufenthalts und der in diesen Zeitraum erfolgten Probenentnahmen die Gewissheit der Abstinenz der Probanden. Von diesem Umstand kann 6-9 Monate nach Entlassung / nach körperlicher Entgiftung nicht zwangsläufig ausgegangen werden.

Es wird von einer Rückfallquote von bis zu 85% ausgegangen, falls sich an die Entgiftung keine weiteren Therapiemaßnahmen anschließen (Boothby und Doering 2005). Aufgrund dieses Aspektes und der Compliance von Suchterkrankten muss ein Abbruch der konsequenten Alkoholabstinenz in Betracht gezogen werden.

Eine Signifikanz der DNA Methylierungsunterschiede der untersuchten GABRA 4 CpGs zwischen Versuchsgruppe (ALC) und Kontrollgruppe (CNT) konnte nach Adjustieren auf multiples Testen nicht gezeigt werden. Die Anpassung des p-Werts kann jedoch aufgrund des explorativen Charakters des vorliegenden Pilotprojektes außer Acht gelassen werden.

4.5.5. Limitationen

Die vorliegende prospektive Studie wurde akkurat geplant und durchgeführt. Ungeachtet dessen müssen Limitationen der Studie aufgeführt werden, die ggf. bei der Planung weiterführender oder auf dieser Thematik aufbauender Studien nützlich sind.

Um eine Aussagekraft der Ergebnisse zu erzielen, muss eine gewisse Kollektivgröße erreicht werden. Mit einer Studienpopulation von n=71 und einer Kontrollgrößengruppe n=51 konnten statistisch signifikante Ergebnisse ausgewertet werden. Die statistisch signifikanten Unterschiede setzten sich im Rahmen der multiplen Testung aufgrund der vermutlich zu geringen Fallzahlen nicht durch. Die Anzahl der Studienteilnehmer kann somit als moderat bewertet werden. Die fehlenden Angaben bezüglich der Auswertungen des klinischen Messinstrumentes SSAGA stellen eine weitere Einschränkung dar. Durch den hohen Drop Out kann die Follow Up Untersuchung nur eingeschränkt bewertet werden.

In die Studie wurde ausschließlich ein männliches Patientenkollektiv eingeschlossen. Der epidemiologischen Geschlechterverteilung konnte somit nicht gerecht werden. Die Aussagen der Studie können somit nur bedingt auf die allgemeine Bevölkerung übertragen werden.

Weitere Einflussfaktoren wie Nikotinabusus, Lifestyle Faktoren, sowie individuelle Vormedikation auf die DNA Methylierung wurden in der vorliegenden Studie nicht weiter berücksichtigt, diese könnten jedoch interessante Zusammenhänge aufdecken.

Von weiterem Interesse wäre die Untersuchung von Zusammenhängen der stationären spezifischen medikamentösen Therapie mit Benzodiazepinen (Oxazepam), sowie Antiepileptika (Levetiracetam) und der DNA Methylierung des GABRA4 Gens, die leider in der Studie nicht erörtert wurden.

Zuletzt könnte die Studiendauer die Aussagekraft der Ergebnisse limitieren. Die gewählte Studiendauer umfasste im Zeitraum der ersten drei Visiten den Zeitraum des stationären Aufenthalts, um Aussagen über die Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens während des Entzugs zu treffen. Weitere Blutuntersuchungen / bzw. Follow-Ups könnten interessante Erkenntnisse liefern.

Zusammenfassung

Vielfache Hinweise deuten auf eine bedeutende Rolle von epigenetischen Mechanismen bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Alkoholgebrauchsstörungen. Ziel dieser Arbeit war es, die Promotor DNA Methylierung im GABRA4 Rezeptorgen als epigenetischen Aspekt zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Blutproben von männlichen Probanden, die eine stationäre qualifizierte Entgiftung von Alkohol durchführten, mit Proben gesunder männlicher Kontrollen verglichen. Den Probanden der Versuchsgruppe wurde während des stationären Alkoholentzugs zu vier Zeitpunkten Blut abgenommen. Dies erfolgte unmittelbar bei Aufnahme in die Entgiftung, 7 Tage nach Beginn der Entgiftung, bei Entlassung nach insgesamt 14-tägigem stationärem Aufenthalt sowie 6 bis 9 Monate nach Entlassung (Follow Up). Während der Entgiftung auftretende Entzugssymptome wurden mit Benzodiazepinen behandelt. Die jeweilige Vormedikation wurde weiterverordnet. Klinisch relevante Daten wurden mithilfe des Semi Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism (SSAGA) erhoben. Die Blutabnahme der gesunden Probanden (Kontrollgruppe) erfolgte lediglich zu einem Zeitpunkt. In allen Blutproben wurde mittels Pyrosequenzierung die Promotor DNA Methylierung des GABRA4 Rezeptorgens an sechs Cytosin-Guanin-Dinukleotid (CpG) Stellen untersucht. Die DNA Methylierung der sechs CpG-Positionen wurde zu jedem der vier Messpunkte sowohl im zeitlichen Verlauf der Entgiftung (ANOVA), sowie gegenübergestellt zur Kontrollgruppe (t-Test) verglichen.

Die männlichen Probanden (n=71) waren im Schnitt 46,8 Jahre alt, die gesunden Kontrollen (n=51) 42,8 Jahre. Im Vorfeld der Aufnahme lag der tagesdurchschnittliche Konsum von reinem Alkohol der Probanden bei 156,7g. Im Verlauf der Alkoholentgiftung (Tag 1 – 14) zeigte sich eine signifikante Zunahme der DNA Methylierung der untersuchten GABRA4 CpG Promotor

Stellen der Versuchsgruppe. Die Follow Up Untersuchung wurde bei 7 Probanden durchgeführt. Sie zeigten keine signifikanten Veränderungen der DNA Methylierung der GABRA4 CpG Promotor Positionen. Hinsichtlich des Vergleichs mit den Proben der Kontrollgruppe konnten vereinzelte signifikante Unterschiede der DNA Methylierung der CpG Promotor Positionen ermittelt werden. Eine Signifikanz nach Adjustierung auf multiples Testen konnte nicht gezeigt werden. Es konnten keine Assoziationen der konsumierten Alkoholmengen vor stationärem Aufenthalt auf die DNA Methylierungen der GABRA4 CpG Stellen nachgewiesen werden.

Die Analyse der Daten stellt ein Pilotprojekt dar. Unter Umständen wäre es sinnvoll, analoge Fragestellungen an einem größeren Probandenkollektiv zu untersuchen. Weitere Faktoren, wie beispielsweise das Alter modifizierend auf epigenetische Veränderungen sowie der Einfluss von Anticravingmedikamenten könnten ebenfalls in einer größeren Stichprobe geprüft werden. In der Literatur ist die Datenlage bezüglich epigenetischer Veränderungen, die durch Alkoholkonsum entstehen bisher nicht ausreichend. Diesbezüglich besteht weiter Forschungsbedarf.

Die Kenntnis der epigenetischen Veränderungen im Zusammenhang mit Alkoholkonsum könnten zu einem besseren Verständnis der Neurobiologie von Substanzkonsumstörungen beitragen und so auch mögliche neue Wege der Behandlung aufzeigen.

Literaturverzeichnis

- Abdolmaleky, Hamid Mostafavi; Smith, Cassandra L.; Faraone, Stephen V.; Shafa, Rahim; Stone, William; Glatt, Stephen J.; Tsuang, Ming T. (2004): Methylomics in psychiatry: Modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 127B (1), S. 51–59. DOI: 10.1002/ajmg.b.20142.
- Abi-Dargham, A.; Krystal, J. H.; Anjilvel, S.; Scanley, B. E.; Zoghbi, S.; Baldwin, R. M. et al. (1998): Alterations of benzodiazepine receptors in type II alcoholic subjects measured with SPECT and 123Iiomazenil. In: *The American journal of psychiatry* 155 (11), S. 1550–1555. DOI: 10.1176/ajp.155.11.1550.
- Acion, Laura; Kramer, John; Liu, Xiangtao; Chan, Grace; Langbehn, Douglas; Bucholz, Kathleen et al. (2019): Reliability and validity of an internalizing symptom scale based on the adolescent and adult Semi-Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism (SSAGA). In: *The American journal of drug and alcohol abuse* 45 (2), S. 151–160. DOI: 10.1080/00952990.2018.1476520.
- Amato, Laura; Minozzi, Silvia; Davoli, Marina (2011): Efficacy and safety of pharmacological interventions for the treatment of the Alcohol Withdrawal Syndrome. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (6), CD008537. DOI: 10.1002/14651858.CD008537.pub2.
- Antequera, F.; Bird, A. (1993): Number of CpG islands and genes in human and mouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (24), S. 11995–11999. DOI: 10.1073/pnas.90.24.11995.
- Arnemann, J. (2019): CpG-Island. In: Axel M. Gressner und Torsten Arndt (Hg.): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer Reference Medizin), S. 628–629.
- Atzendorf, Josefine; Rauschert, Christian; Seitz, Nicki-Nils; Lochbühler, Kirsten; Kraus, Ludwig (2019): The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines: An Estimate of Consumption and Substance-Related Disorders in Germany. In: *Deutsches Arzteblatt international* 116 (35-36), S. 577–584. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0577.
- Auta, James; Gatta, Eleonora; Davis, John M.; Pandey, Subhash C.; Guidotti, Alessandro (2018): Potential role for histone deacetylation in chronic diazepam-induced downregulation of $\alpha 1$ -GABAA receptor subunit expression. In: *Pharmacology research & perspectives* 6 (4), e00416. DOI: 10.1002/prp2.416.
- Bakusic, Jelena; Schaufeli, Wilmar; Claes, Stephan; Godderis, Lode (2017): Stress, burnout and depression: A systematic review on DNA methylation mechanisms. In: *Journal of psychosomatic research* 92, S. 34–44. DOI: 10.1016/j.jpsychores.2016.11.005.
- Bekdash, Rola A.; Harrison, Neil L. (2015): Downregulation of Gabra4 expression during alcohol withdrawal is mediated by specific microRNAs in cultured mouse cortical neurons. In: *Brain and behavior* 5 (8), e00355. DOI: 10.1002/brb3.355.
- Belin, David; Mar, Adam C.; Dalley, Jeffrey W.; Robbins, Trevor W.; Everitt, Barry J. (2008): High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. In: *Science (New York, N.Y.)* 320 (5881), S. 1352–1355. DOI: 10.1126/science.1158136.
- Benson, Jack A.; Löw, Karin; Keist, Ruth; Mohler, Hanns; Rudolph, Uwe (1998): Pharmacology of recombinant γ -aminobutyric acid A receptors rendered diazepam-insensitive

- by point-mutated α -subunits. In: *FEBS Letters* 431 (3), S. 400–404. DOI: 10.1016/s0014-5793(98)00803-5.
- Bird, Adrian (1992): The essentials of DNA methylation. In: *Cell* 70 (1), S. 5–8. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90526-i.
- Bird, Adrian; Taggart, Mary; Frommer, Marianne; Miller, Orlando J.; Macleod, Donald (1985): A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. In: *Cell* 40 (1), S. 91–99. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90312-5.
- Bleich, S.; Spilker, K.; Kurth, C.; Degner, D.; Quintela-Schneider, M.; Javaheripour, K. et al. (2000): Oxidative stress and an altered methionine metabolism in alcoholism. In: *Neuroscience Letters* 293 (3), S. 171–174. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)01505-6.
- Bloomfield, Kim; Kraus, Ludwig; Soyka, Michael (2008): Themenheft 40 "Alkoholkonsum und alkoholbezogene Störungen". Unter Mitarbeit von Robert Koch-Institut.
- Bock, Christoph; Lengauer, Thomas (2008): Computational epigenetics. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 24 (1), S. 1–10. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm546.
- Bode, Christiane; Parlesak, Alexandr; Bode, J. Christian (2005): Alkohol und Darm. In: Manfred V. Singer und Stephan Teysen (Hg.): Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, S. 193–202.
- Bohman, Michael; Cloninger, R.; Knorring, A.-L. von (1987): The genetics of alcoholisms and related disorders. In: *Journal of Psychiatric Research* 21 (4), S. 447–452. DOI: 10.1016/0022-3956(87)90092-6.
- Bönsch, D.; Lenz, B.; Fiszer, R.; Frieling, H.; Kornhuber, J.; Bleich, S. (2006): Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 113 (9), S. 1299–1304. DOI: 10.1007/s00702-005-0413-2.
- Boothby, Lisa A.; Doering, Paul L. (2005): Acamprosate for the treatment of alcohol dependence. In: *Clinical therapeutics* 27 (6), S. 695–714. DOI: 10.1016/j.clinthera.2005.06.015.
- Brown, Martha E.; Anton, Raymond F.; Malcolm, Robert; Ballenger, James C. (1988): Alcohol detoxification and withdrawal seizures: Clinical support for a kindling hypothesis. In: *Biological Psychiatry* 23 (5), S. 507–514. DOI: 10.1016/0006-3223(88)90023-6.
- Bucholz, K. K.; Cadoret, R.; Cloninger, C. R.; Dinwiddie, S. H.; Hesselbrock, V. M.; Nurnberger, J. I. et al. (1994): A new, semi-structured psychiatric interview for use in genetic linkage studies: a report on the reliability of the SSAGA. In: *Journal of studies on alcohol* 55 (2), S. 149–158. DOI: 10.15288/jsa.1994.55.149.
- Bühler, Mira; Mann, Karl (2011): Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 35 (10), S. 1771–1793. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2011.01540.x.
- Chang, Y.; Covey, D. F.; Weiss, D. S. (2000): Correlation of the apparent affinities and efficacies of gamma-aminobutyric acid(C) receptor agonists. In: *Molecular pharmacology* 58 (6), S. 1375–1380. DOI: 10.1124/mol.58.6.1375.
- Chen, Zhao-Xia; Mann, Jeffrey R.; Hsieh, Chih-Lin; Riggs, Arthur D.; Chédin, Frédéric (2005): Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. In: *Journal of cellular biochemistry* 95 (5), S. 902–917. DOI: 10.1002/jcb.20447.

- Cloninger, C. R.; Bohman, M.; Sigvardsson, S. (1981): Inheritance of alcohol abuse. Cross-fostering analysis of adopted men. In: *Archives of general psychiatry* 38 (8), S. 861–868. DOI: 10.1001/archpsyc.1981.01780330019001.
- Clore, G. Marius; Venditti, Vincenzo (2013): Structure, dynamics and biophysics of the cytoplasmic protein-protein complexes of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. In: *Trends in biochemical sciences* 38 (10), S. 515–530. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.08.003.
- Costello, J. F.; Plass, C. (2001): Methylation matters. In: *Journal of medical genetics* 38 (5), S. 285–303. DOI: 10.1136/jmg.38.5.285.
- Costin, B. N.; Miles, M. F. (2014): Molecular and neurologic responses to chronic alcohol use. In: *Handbook of clinical neurology* 125, S. 157–171. DOI: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00010-0.
- Covault, Jonathan; Gelernter, Joel; Hesselbrock, Victor; Nellissery, Maggie; Kranzler, Henry R. (2004): Allelic and haplotypic association of GABRA2 with alcohol dependence. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 129B (1), S. 104–109. DOI: 10.1002/ajmg.b.30091.
- Cowen, Michael S.; Lawrence, Andrew J. (1999): The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. In: *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 23 (7), S. 1171–1212. DOI: 10.1016/s0278-5846(99)00060-3.
- Davies, Martin (2003): The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. In: *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 28 (4), S. 263–274.
- Deutsches Krebsforschungszentrum; Pabst Science Publishers (2017): Alkoholatlas Deutschland 2017. 1. Auflage. Lengerich: Pabst Science Publishers.
- Devaud, L. L.; Smith, F. D.; Grayson, D. R.; Morrow, A. L. (1995): Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of gamma-aminobutyric acidA receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. In: *Molecular pharmacology* 48 (5), S. 861–868.
- Dixon, C. I.; Rosahl, T. W.; Stephens, D. N. (2008): Targeted deletion of the GABRA2 gene encoding alpha2-subunits of GABA(A) receptors facilitates performance of a conditioned emotional response, and abolishes anxiolytic effects of benzodiazepines and barbiturates. In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90 (1), S. 1–8. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.01.015.
- Drexler, B.; Grasshoff, C.; Rudolph, U.; Unertl, K.; Antkowiak, B. (2006): Die GABA(A)-Rezeptor-Familie: Möglichkeiten für die Entwicklung besserer Anästhetika. In: *Der Anaesthetist* 55 (3), S. 287–295. DOI: 10.1007/s00101-005-0950-y.
- Dulman, Russell S.; Wandling, Gabriela M.; Pandey, Subhash C. (2020): Epigenetic mechanisms underlying pathobiology of alcohol use disorder. In: *Current pathobiology reports* 8 (3), S. 61–73. DOI: 10.1007/s40139-020-00210-0.
- Edenberg, Howard J. (2002): The Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism: An Update. In: *Alcohol Research & Health* 26 (3), S. 214–218.
- Eghbali, M.; Curmi, J. P.; Birnir, B.; Gage, P. W. (1997): Hippocampal GABA(A) channel conductance increased by diazepam. In: *Nature* 388 (6637), S. 71–75. DOI: 10.1038/40404.

- Enoch, Mary-Anne (2008): The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism. In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90 (1), S. 95–104. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.03.007.
- Ernst, Margot; Sieghart, Werner (2015): GABAA receptor subtypes: structural variety raises hope for new therapy concepts. In: *e-Neuroforum* 6 (4), S. 97–103. DOI: 10.1007/s13295-015-0016-9.
- Feuerlein, W.; Küfner, H.; Soyka, M.; Dittmann, V.; Haller, R. (2011): Alkoholismus - Mißbrauch und Abhängigkeit: Entstehung - Folgen - Therapie: Thieme. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=4tj44FKIOdsC>.
- Feuerlein, Wilhelm (1999): Alkoholismus. Warnsignale, Vorbeugung, Therapie. Orig.-Ausg., 3., neubearb. Aufl. München: Beck (Beck'sche Reihe C. H. Beck Wissen, 2033). Online verfügbar unter <http://www.socialnet.de/rezensionen/isbn.php?isbn=978-3-406-45533-9>.
- Fils-Aime, M. L.; Eckardt, M. J.; George, D. T.; Brown, G. L.; Mefford, I.; Linnoila, M. (1996): Early-onset alcoholics have lower cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid levels than late-onset alcoholics. In: *Archives of general psychiatry* 53 (3), S. 211–216. DOI: 10.1001/archpsyc.1996.01830030029006.
- Fuks, Francois; Hurd, Paul J.; Wolf, Daniel; Nan, Xinsheng; Bird, Adrian P.; Kouzarides, Tony (2003): The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (6), S. 4035–4040. DOI: 10.1074/jbc.M210256200.
- Gatta, Eleonora; Guidotti, Alessandro; Saudagar, Vikram; Grayson, Dennis R.; Aspesi, Dario; Pandey, Subhash C.; Pinna, Graziano (2021): Epigenetic Regulation of GABAergic Neurotransmission and Neurosteroid Biosynthesis in Alcohol Use Disorder. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 24 (2), S. 130–141. DOI: 10.1093/ijnp/pyaa073.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes (Hg.) (2021): Alkohol verlust lebensjahre - Vorzeitige Sterblichkeit Tod unter 65 70 Jahren mit ohne Altersstandardisierung ab 1998. Online verfügbar unter https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gast&p_aid=86176635&p_sprache=D&p_he lp=3&p_indnr=562&p_indsp=&p_ityp=H&p_fid=, zuletzt aktualisiert am 26.09.2021, zuletzt geprüft am 26.09.2021.
- Goetjen, Alexandra; Watson, Maegan; Lieberman, Richard; Clinton, Kaitlin; Kranzler, Henry R.; Covault, Jonathan (2020): Induced pluripotent stem cell reprogramming-associated methylation at the GABRA2 promoter and chr4p12 GABAA subunit gene expression in the context of alcohol use disorder. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 183 (8), S. 464–474. DOI: 10.1002/ajmg.b.32824.
- Goodwin, D. W.; Schulsinger, F.; Hermansen, L.; Guze, S. B.; Winokur, G. (1973): Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. In: *Archives of general psychiatry* 28 (2), S. 238–243. DOI: 10.1001/archpsyc.1973.01750320068011.
- Goodwin, D. W.; Schulsinger, F.; Moller, N.; Hermansen, L.; Winokur, G.; Guze, S. B. (1974): Drinking problems in adopted and nonadopted sons of alcoholics. In: *Archives of general psychiatry* 31 (2), S. 164–169. DOI: 10.1001/archpsyc.1974.01760140022003.
- Graw, Jochen (2015): Epigenetik. In: Jochen Graw (Hg.): *Genetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 291–338.

- Graw, Jochen (2020): Epigenetik. In: Jochen Graw (Hg.): Genetik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 361–422.
- Griffin, Charles E.; Kaye, Adam M.; Bueno, Franklin Rivera; Kaye, Alan D. (2013): Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System–Mediated Effects. In: *The Ochsner Journal* 13 (2), S. 214–223.
- Griswold, Max G.; Fullman, Nancy; Hawley, Caitlin; Arian, Nicholas; Zimsen, Stephanie R. M.; Tymeson, Hayley D. et al. (2018): Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. In: *The Lancet* 392 (10152), S. 1015–1035. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31310-2.
- Gupta, Girdhari Lal; Sharma, Lalit (2019): Bacopa monnieri abrogates alcohol abstinence-induced anxiety-like behavior by regulating biochemical and Gabra1, Gabra4, Gabra5 gene expression of GABAA receptor signaling pathway in rats. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 111, S. 1417–1428. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.01.048.
- Haefely, W.; Kulcsár, A.; Möhler, H.; Pieri, L.; Polc, P.; Schaffner, R. (1975): Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. In: *Advances in biochemical psychopharmacology* (14), S. 131–151. DOI: Review.
- Hallermann, S.; Schmidt, R. F. (2019): Synaptische Plastizität. In: Ralf Brandes, Florian Lang und Robert F. Schmidt (Hg.): Physiologie des Menschen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 115–120.
- Hansson, Anita C.; Gründer, Gerhard; Hirth, Natalie; Noori, Hamid R.; Spanagel, Rainer; Sommer, Wolfgang H. (2019): Dopamine and opioid systems adaptation in alcoholism revisited: Convergent evidence from positron emission tomography and postmortem studies. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 106, S. 141–164. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.09.010.
- Hartl, Thomas (2010): Alkoholabhängigkeit und die spezifische Methylierung des Dopamin-Transporter-Gens. Erlangen-Nürnberg.
- Heinz, A.; Higley, J. D.; Gorey, J. G.; Saunders, R. C.; Jones, D. W.; Hommer, D. et al. (1998): In vivo association between alcohol intoxication, aggression, and serotonin transporter availability in nonhuman primates. In: *The American journal of psychiatry* 155 (8), S. 1023–1028. DOI: 10.1176/ajp.155.8.1023.
- Hennig, Wolfgang (2002): Genetik. Mit 72 Tabellen und 34 Technik-Boxen. 3., überarb. und erw. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/webclient/DeliveryManager?pid=1473428&custom_att_2=simple_viewer.
- Hermann, A.; Gowher, H.; Jeltsch, A. (2004): Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61 (19-20), S. 2571–2587. DOI: 10.1007/s00018-004-4201-1.
- Hesselbrock, M.; Easton, C.; Bucholz, K. K.; Schuckit, M.; Hesselbrock, V. (1999): A validity study of the SSAGA--a comparison with the SCAN. In: *Addiction (Abingdon, England)* 94 (9), S. 1361–1370. DOI: 10.1046/j.1360-0443.1999.94913618.x.
- Hu, Xianzhang; Oroszi, Gabor; Chun, Jeffrey; Smith, Tom L.; Goldman, David; Schuckit, Marc A. (2005): An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 29 (1), S. 8–16. DOI: 10.1097/01.ALC.0000150008.68473.62.

- Huganir, Richard L.; Nicoll, Roger A. (2013): AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. In: *Neuron* 80 (3), S. 704–717. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.10.025.
- Illingworth, Robert S.; Bird, Adrian P. (2009): CpG islands--'a rough guide'. In: *FEBS Letters* 583 (11), S. 1713–1720. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.04.012.
- Isoun, T. T. (1975): The histopathology of experimental disease produced in mice infected with *Trypanosoma vivax*. In: *Acta tropica* 32 (3), S. 267–272.
- Issa, J. P. (2000): CpG-island methylation in aging and cancer. In: *Current topics in microbiology and immunology* 249, S. 101–118. DOI: 10.1007/978-3-642-59696-4_7.
- Jaenisch, Rudolf; Bird, Adrian (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. In: *Nature genetics* 33 Suppl, S. 245–254. DOI: 10.1038/ng1089.
- Johnson, E. O.; van den Bree, M. B.; Pickens, R. W. (1996): Subtypes of alcohol-dependent men: a typology based on relative genetic and environmental loading. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 20 (8), S. 1472–1480. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1996.tb01151.x.
- Kendler, K. S.; Prescott, C. A.; Neale, M. C.; Pedersen, N. L. (1997): Temperance board registration for alcohol abuse in a national sample of Swedish male twins, born 1902 to 1949. In: *Archives of general psychiatry* 54 (2), S. 178–184. DOI: 10.1001/archpsyc.1997.01830140090015.
- Kerr, D.I.B.; Ong, J. (1995): GABAB receptors. In: *Pharmacology & Therapeutics* 67 (2), S. 187–246. DOI: 10.1016/0163-7258(95)00016-A.
- Kessler, Ronald C.; Angermeyer, Matthias; Anthony, James C.; Graaf, Ron de; Demyttenaere, Koen; Gasquet, Isabelle et al. (2007): Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. In: *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)* 6 (3), S. 168–176. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18188442/>.
- Kiefer, Falk (2020): S3-Leitlinie Screening, Diagnostik und Behandlung alkoholbezogener Störungen. Hg. v. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN). Online verfügbar unter <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/076-001.html>, zuletzt aktualisiert am 01.01.2021, zuletzt geprüft am 10.06.2023.
- Korpi, Esa R.; Seeburg, Peter H. (1993): Natural mutation of GABAA receptor $\alpha 6$ subunit alters benzodiazepine affinity but not allosteric GABA effects. In: *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 247 (1), S. 23–27. DOI: 10.1016/0922-4106(93)90133-t.
- Kramer, John R.; Chan, Grace; Kuperman, Samuel; Bucholz, Kathleen K.; Edenberg, Howard J.; Schuckit, Marc A. et al. (2009): A comparison of diagnoses obtained from in-person and telephone interviews, using the semi-structured assessment for the genetics of alcoholism (SSAGA). In: *Journal of studies on alcohol and drugs* 70 (4), S. 623–627. DOI: 10.15288/jsad.2009.70.623.
- Kranzler, Henry R.; Kadden, Ronald M.; Bursleson, Joseph A.; Babor, Thomas F.; Apter, Andrew; Rounsaville, Bruce J. (1995): Validity of psychiatric diagnoses in patients with substance use disorders: Is the interview more important than the interviewer? In: *Comprehensive Psychiatry* 36 (4), S. 278–288. DOI: 10.1016/s0010-440x(95)90073-x.
- Kriaucionis, Skirmantas; Bird, Adrian (2003): DNA methylation and Rett syndrome. In: *Human molecular genetics* 12 Spec No 2, R221-7. DOI: 10.1093/hmg/ddg286.

- Krishnan, Harish R.; Sakharkar, Amul J.; Teppen, Tara L.; Berkel, Tiffani D. M.; Pandey, Subhash C. (2014): The epigenetic landscape of alcoholism. In: *International review of neurobiology* 115, S. 75–116. DOI: 10.1016/B978-0-12-801311-3.00003-2.
- Li, Dawei; Sulovari, Arvis; Cheng, Chao; Zhao, Hongyu; Kranzler, Henry R.; Gelernter, Joel (2014): Association of gamma-aminobutyric acid A receptor $\alpha 2$ gene (GABRA2) with alcohol use disorder. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (4), S. 907–918. DOI: 10.1038/npp.2013.291.
- Libíková, H.; Pogády, J.; Wiedermann, V.; Breier, S. (1975): Search for herpetic antibodies in the cerebrospinal fluid in senile dementia and mental retardation. In: *Acta virologica* 19 (6), S. 493–495.
- Lieberman, Richard; Kranzler, Henry R.; Joshi, Pujan; Shin, Dong-Guk; Covault, Jonathan (2015): GABRA2 Alcohol Dependence Risk Allele is Associated with Reduced Expression of Chromosome 4p12 GABAA Subunit Genes in Human Neural Cultures. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 39 (9), S. 1654–1664. DOI: 10.1111/acer.12807.
- Lind, Penelope A.; MacGregor, Stuart; Montgomery, Grant W.; Heath, Andrew C.; Martin, Nicholas G.; Whitfield, John B. (2008): Effects of GABRA2 variation on physiological, psychomotor and subjective responses in the alcohol challenge twin study. In: *Twin research and human genetics : the official journal of the International Society for Twin Studies* 11 (2), S. 174–182. DOI: 10.1375/twin.11.2.174.
- Liu, Qiuli; Wong-Riley, Margaret T.T. (2013): Postnatal development of glycine receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, and β immunoreactivity in multiple brain stem respiratory-related nuclear groups of the rat. In: *Brain research* 1538. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.09.028.
- Löffler, Georg (Hg.) (2007): Biochemie und Pathobiochemie. Mit ... 192 Tabellen, [+ online specials, lehrbuch-medizin.de. 8., völlig neu bearb. Aufl. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl. (Springer-Lehrbuch).
- Malcolm, R.; Myrick, H.; Roberts, J.; Wang, W.; Anton, R. F.; Ballenger, J. C. (2002): The Effects of Carbamazepine and Lorazepam on Single versus Multiple Previous Alcohol Withdrawals in an Outpatient Randomized Trial. In: *J Gen Intern Med* 17 (5), S. 349–355. DOI: 10.1046/j.1525-1497.2002.10201.x.
- Mallard, Travis T.; Ashenurst, James R.; Harden, K. Paige; Fromme, Kim (2018): GABRA2, alcohol, and illicit drug use: An event-level model of genetic risk for polysubstance use. In: *Journal of abnormal psychology* 127 (2), S. 190–201. DOI: 10.1037/abn0000333.
- Martini, G. A.; Doelle, W. (1965): KRANKHEITSBILDER BEI LEBERSCHAEDIGUNG DURCH ALKOHOL. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 90, S. 793–799. DOI: 10.1055/s-0028-1111419.
- Mihic, S. J.; Ye, Q.; Wick, M. J.; Koltchine, V. V.; Krasowski, M. D.; Finn, S. E. et al. (1997): Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. In: *Nature* 389 (6649), S. 385–389. DOI: 10.1038/38738.
- Moonat, Sachin; Sakharkar, Amul J.; Zhang, Huaibo; Tang, Lei; Pandey, Subhash C. (2013): Aberrant histone deacetylase2-mediated histone modifications and synaptic plasticity in the amygdala predisposes to anxiety and alcoholism. In: *Biological Psychiatry* 73 (8), S. 763–773. DOI: 10.1016/j.biopsych.2013.01.012.
- Mulrennan, J. A.; Lamdin, J. M.; Bolton, H. T.; Hammond, C. L. (1975): Atmospheric levels of propoxur aboard submarines after residual spraying. In: *Journal of economic entomology* 68 (6), S. 755–760. DOI: 10.1093/jee/68.6.755.

- Muschler, Marc; Bleich, Stefan (2008): Einfluss von Alkohol auf Homocystein-Metabolismus und Epigenetik. In: *Psychosom Konsiliarpsychiatr* 2 (1), S. 44–49. DOI: 10.1007/s11800-007-0083-z.
- Naveh-Many, T.; Cedar, H. (1981): Active gene sequences are undermethylated. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (7), S. 4246–4250. DOI: 10.1073/pnas.78.7.4246.
- Pignataro, Leonardo; Varodayan, Florence P.; Tannenholz, Lindsay E.; Harrison, Neil L. (2009): The regulation of neuronal gene expression by alcohol. In: *Pharmacology & Therapeutics* 124 (3), S. 324–335. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.09.002.
- Pinto, E.; Anseau, M. (2009): Facteurs génétiques de l'alcool-dépendance Revue des principales données de la littérature. In: *L'Encephale* 35 (5), S. 461–469. DOI: 10.1016/j.encep.2008.03.008.
- Rath, P. C.; Kanungo, M. S. (1989): Methylation of repetitive DNA sequences in the brain during aging of the rat. In: *FEBS Letters* 244 (1), S. 193–198. DOI: 10.1016/0014-5793(89)81191-3.
- Rice, J. P.; Reich, T.; Bucholz, K. K.; Neuman, R. J.; Fishman, R.; Rochberg, N. et al. (1995): Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 19 (4), S. 1018–1023. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1995.tb00983.x.
- Ris, M. M.; Deitrich, R. A.; Wartburg, J. P. von (1975): Inhibition of aldehyde reductase isoenzymes in human and rat brain. In: *Biochemical pharmacology* 24 (20), S. 1865–1869. DOI: 10.1016/0006-2952(75)90405-0.
- RKI (2017): Alkoholkonsum bei Erwachsenen in Deutschland: Riskante Trinkmengen.
- Robert Koch-Institut (2016a): Alkoholbedingte Mortalität bei Erwachsenen.
- Robert Koch-Institut (2016b): Alkoholkonsum von Erwachsenen in Deutschland: Riskante Trinkmengen, Folgen und Maßnahmen.
- Rogers, C. J.; Twyman, R. E.; Macdonald, R. L. (1994): Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture. In: *The Journal of physiology* 475 (1), S. 69–82. DOI: 10.1113/jphysiol.1994.sp020050.
- Rottach, Andrea; Leonhardt, Heinrich; Spada, Fabio (2009): DNA methylation-mediated epigenetic control. In: *Journal of cellular biochemistry* 108 (1), S. 43–51. DOI: 10.1002/jcb.22253.
- Sanna, Enrico; Mostallino, Maria Cristina; Busonero, Fabio; Talani, Giuseppe; Tranquilli, Stefania; Mameli, Manuel et al. (2003): Changes in GABA A Receptor Gene Expression Associated with Selective Alterations in Receptor Function and Pharmacology after Ethanol Withdrawal. In: *J. Neurosci.* 23 (37), S. 11711–11724. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-37-11711.2003.
- Schneider, Antonius; Hilbert, Bernadett; Hörlein, Elisabeth; Wagenpfeil, Stefan; Linde, Klaus (2013): The effect of mental comorbidity on service delivery planning in primary care: an analysis with particular reference to patients who request referral without prior assessment. In: *Deutsches Arzteblatt international* 110 (39), S. 653–659. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0653.
- Schottenbauer, Michele A.; Glass, Carol R.; Arnkoff, Diane B.; Tendick, Vanessa; Gray, Sheila Hafter (2008): Nonresponse and dropout rates in outcome studies on PTSD: review and methodological considerations. In: *Psychiatry* 71 (2), S. 134–168. DOI: 10.1521/psyc.2008.71.2.134.

- Schuckit, M. A.; Smith, T. L. (1996): An 8-year follow-up of 450 sons of alcoholic and control subjects. In: *Archives of general psychiatry* 53 (3), S. 202–210. DOI: 10.1001/archpsyc.1996.01830030020005.
- Schwabbauer, M. L. (1975): Use of the latent image technique to develop and evaluate problem-solving skills. In: *The American journal of medical technology* 41 (12), S. 457–462.
- Shaw, G. K.; Waller, S.; Latham, C. J.; Dunn, G.; Thomson, A. D. (1998): The detoxification experience of alcoholic in-patients and predictors of outcome. In: *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 33 (3), S. 291–303. DOI: 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008393.
- Siegmund, S. V.; Singer, M. V. (2005): Wirkungen von Alkohol auf den oberen Gastrointestinaltrakt und das Pankreas--Eine aktuelle Übersicht. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 43 (8), S. 723–736. DOI: 10.1055/s-2005-858257.
- Silbereisen, Rainer K.; Reese, Anneke (2001): Substanzgebrauch: Illegale Drogen und Alkohol. In: Jürgen Raithel (Hg.): *Risikoverhaltensweisen Jugendlicher*. Wiesbaden: VS Verlag für Sozialwissenschaften, S. 131–153.
- Simon, Joseph; Wakimoto, Hironobu; Fujita, Norihisa; Lalande, Marc; Barnard, Eric A. (2004): Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (40), S. 41422–41435. DOI: 10.1074/jbc.M401354200.
- Singer, M. V.; Batra, Anil; Mann, Karl (2011): Genetik der Alkoholabhängigkeit. In: Manfred V. Singer, Anil Batra, Karl Mann, Manfred V. Singer, Anil Batra und Karl Mann (Hg.): *Alkohol und Tabak*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Soyka, M.; Preuss, U. W.; Hesselbrock, V.; Zill, P.; Koller, G.; Bondy, B. (2008): GABA-A2 receptor subunit gene (GABRA2) polymorphisms and risk for alcohol dependence. In: *Journal of Psychiatric Research* 42 (3), S. 184–191. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2006.11.006.
- Soyka, Michael; Batra, Anil; Heinz, Andreas; Moggi, Franz; Walter, Marc (2018): *Suchtmedizin*: Elsevier.
- Soyka, Michael; Küfner, Heinrich (2008): *Alkoholismus –Missbrauch und Abhängigkeit*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Soyka, Michael; Rösner, Susanne (2021): Pharmakotherapie der Alkoholentwöhnung: Update und neue Entwicklungen. In: *Der Nervenarzt* 92 (1), S. 57–65. DOI: 10.1007/s00115-020-00954-5.
- Spanagel, Rainer; Vengeliene, Valentina; Jandeleit, Bernd; Fischer, Wolf-Nicolas; Grindstaff, Kent; Zhang, Xuexiang et al. (2014): Acamprosate produces its anti-relapse effects via calcium. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (4), S. 783–791. DOI: 10.1038/npp.2013.264.
- Stephenson, F. A. (1995): The GABAA receptors. In: *The Biochemical journal* 310 (Pt 1), S. 1–9. DOI: 10.1042/bj3100001.
- Tan, Kelly R.; Rudolph, Uwe; Lüscher, Christian (2011): Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. In: *Trends in neurosciences* 34 (4), S. 188–197. DOI: 10.1016/j.tins.2011.01.004.
- Tariverdian, Gholamali; Buselmaier, Werner (2004): *Humangenetik*. 3., aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Teroganova, Nina; Girshkin, Leah; Suter, Catherine M.; Green, Melissa J. (2016): DNA methylation in peripheral tissue of schizophrenia and bipolar disorder: a systematic review. In: *BMC genetics* 17, S. 27. DOI: 10.1186/s12863-016-0332-2.

- Ticku, M. K.; Burch, T. P.; Davis, W. C. (1983): The interactions of ethanol with the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 18, S. 15–18. DOI: 10.1016/0091-3057(83)90140-5.
- Tölle, Rainer; Windgassen, Klaus; Lempp, Reinhart; Du Bois, Reinmar (2014): Psychiatrie. Einschließlich Psychotherapie. 17., überarb. und erg. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Tsai, G.; Gastfriend, D. R.; Coyle, J. T. (1995): The glutamatergic basis of human alcoholism. In: *The American journal of psychiatry* 152 (3), S. 332–340. DOI: 10.1176/ajp.152.3.332.
- Uusi-Oukari, Mikko; Korpi, Esa R. (2010): Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. In: *Pharmacological reviews* 62 (1), S. 97–135. DOI: 10.1124/pr.109.002063.
- Viera, Anthony J.; Garrett, Joanne M. (2005): Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. In: *Family medicine* 37 (5), S. 360–363.
- Wall, Tamara L.; Ehlers, Cindy L. (1995): Genetic Influences Affecting Alcohol Use Among Asians. In: *Alcohol Health and Research World* 19 (3), S. 184–189.
- Walter, Jörn; Hümpel, Anja (2016): Einführung in die Epigenetik. In: Reinhard Heil, Stefanie B. Seitz, Harald König und Jürgen Robiński (Hg.): Epigenetik. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, S. 15–33.
- Xie, Wei; Barr, Cathy L.; Kim, Audrey; Yue, Feng; Lee, Ah Young; Eubanks, James et al. (2012): Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. In: *Cell* 148 (4), S. 816–831. DOI: 10.1016/j.cell.2011.12.035.
- Zhang, Huiping; Herman, Aryeh I.; Kranzler, Henry R.; Anton, Raymond F.; Zhao, Hongyu; Zheng, Wei; Gelernter, Joel (2013): Array-based profiling of DNA methylation changes associated with alcohol dependence. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 37 Suppl 1, E108-15. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2012.01928.x.
- Ziegler, Christiane; Schiele, Miriam A.; Domschke, Katharina (2018): Patho- und Therapieepigenetik psychischer Erkrankungen. In: *Der Nervenarzt* 89 (11), S. 1303–1314. DOI: 10.1007/s00115-018-0625-y.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein ausdrücklicher Dank gilt den Studienteilnehmern, die sich bereit erklärt haben an diesem Projekt teilzunehmen und somit diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

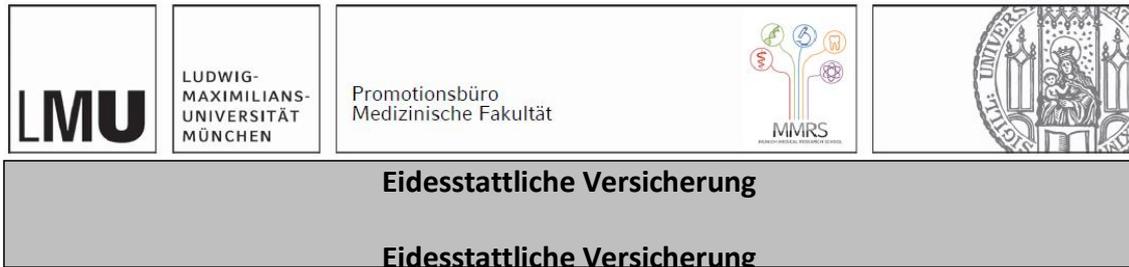
Besonderer Dank gilt den Betreuern meiner Doktorarbeit Frau Prof. Dr. Gabriele Koller und Herrn PD. Dr. Peter Zill für Ihre hervorragende Unterstützung, Förderung und nicht zuletzt Geduld, die mir in den letzten Jahren zuteilwurde.

Mein Dank geht an den Direktor der Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München Prof. Dr. Peter Falkai für die Möglichkeit der Promotion in diesem Hause.

Zudem möchte ich meinen Dank an das gesamte Laborteam für die freundliche Hilfestellung und die Auswertung der Laborproben äußern.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Peggy Schmidt und Sarah Ruhdorfer für die hilfreiche Unterstützung und Bemühungen zur Erstellung dieser Arbeit. Ich danke zudem Krisi Manz für konstruktive statistische Beratung.

Affidavit



Bergmann, Wilhelm

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Epigenetische Analyse des GABRA4 Rezeptorgens bei alkoholabhängigen Patienten:
Die Rolle der Promotor DNA-Methylierung in der Pathogenese und während der
Alkoholentgiftung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.01.2024

Ort, Datum

Wilhelm Bergmann

Unterschrift Doktorand

Publikationsliste

1. Koller G, Zill P, Soyka M, Adorjan K, Weiss C, Kern A, Nguyen-Thien ML, Kamp F, Proebstl L, Krause D, Ruhdorfer S, Bergmann W, Preuss UW. Short-term changes in global methylation and hydroxymethylation during alcohol detoxification. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2019 Jul;29(7):897-903. doi: 10.1016/j.euroneuro.2019.05.001. Epub 2019 May 25. PMID: 31133368.