

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



***Epigenetische Analyse des GABRA2-Rezeptorgens bei
alkoholabhängigen Patienten***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helga Ingrid Günther

aus

Lauf a. d. Pegnitz

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Peter Zill

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Rupp

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	12
1. Einleitung	16
1.1. Die (Volks-) Krankheit „Alkoholabhängigkeit“	16
1.1.1. Epidemiologie	16
1.1.2. Begriffsbestimmung	17
1.1.3. Metabolismus und Klinisches Erscheinungsbild	19
1.1.3.1. Metabolismus.....	19
1.1.3.2. Klinisches Erscheinungsbild der Alkoholabhängigkeit	20
1.1.3.2.1. Körperliche Untersuchung	20
1.1.3.2.2. Wirkungen auf die Organsysteme.....	20
1.1.3.2.2.1. Schädigung des Gastrointestinaltrakts	20
1.1.3.2.2.2. Leberschädigung	21
1.1.3.2.2.3. Kardiovaskuläre Störungen	21
1.1.3.2.2.4. Schädigungen des zentralen Nervensystems.....	21
1.1.3.2.3. Psychische Folgen.....	22
1.1.4. Wirtschaftliche und volkswirtschaftliche Folgen und Kosten.....	22
1.1.5. Behandlung und Therapie	22
1.1.6. Ursachen der (Alkohol-)Sucht.....	23
1.2. Epigenetik.....	24
1.2.1. Epigenetik und Sucht.....	25
1.2.2. DNA-Methylierung	27
1.2.3. Alkoholabhängigkeit und DNA-Methylierung	28
1.2.4. GABA, GABAA-Rezeptoren und GABRA2-Rezeptoren.....	29
1.2.4.1. GABRA2-Methylierung	30
1.3. Alkoholabhängigkeit und GABRA2-Rezeptoren	31
1.4. Fragestellung.....	32
2. Material und Methoden	32
2.1. Studienteilnehmer.....	32
2.1.1. Probanden	32
2.1.2. Kontrollgruppe	34

2.2. DNA-Präparation	34
2.3. Promotor CpG-Insel Analyse	34
2.4. Bisulfit-Sequenzierung genomischer DNA.....	35
2.5. Statistische Analyse.....	36
3. Ergebnisse	38
3.1. Die Probanden und Kontrollpersonen.....	38
3.1.1. Demografische Daten	38
3.1.2. Klinische Beschreibung	41
3.1.2.1. Tabakkonsum	41
3.1.2.2. Tägliche und maximale Trinkmenge	42
3.2. GABRA2-Methylierungen	43
3.2.1. CpG-Inselanalyse	43
3.2.2. Methylierungsmuster	44
3.2.2.1. Allgemeine Methylierung der GABRA2-CpG-Inselregion.....	44
3.2.2.2. Methylierung der 27 einzelnen CpG-Stellen in der GABRA2-CpG-Insel.....	45
3.2.2.3. Mittlerer Prozentsatz und Anzahl der methylierten GABRA2-CpG-Stellen ..	48
3.2.3. Einfluss von Alter, Geschlecht und Raucherstatus auf die GABRA2- Methylierung.....	51
3.2.3.1. Einfluss des Alters, des Geschlechts und des Raucherstatus auf die allgemeine Methylierung	51
3.2.3.2. Einfluss des mittleren Prozentsatzes der methylierten CpG-Stellen (MPGS) auf Alter, Geschlecht und Raucherstatus.....	56
3.2.3.3. Einfluss der mittleren Anzahl der methylierten CpG-Stellen (NMGS) auf Alter, Geschlecht und Raucherstatus	59
3.2.4. Einfluss von klinischen Variablen der alkoholabhängigen Probanden auf deren GABRA2-Methylierungsmuster	61
3.2.4.1. Einfluss von maximaler und täglicher Trinkmenge auf das GABRA2- Methylierungsmuster.....	61
3.2.4.2. Einfluss von Dauer der Alkoholabhängigkeit und körperlichem Entzug auf das GABRA2-Methylierungsmuster	64
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	67
4. Diskussion	67
4.1. Unterschiede der DNA-Methylierungsmuster des GABRA2 Rezeptorgens sowie der einzelnen CpG-Stellen zwischen alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden.....	67

4.2. Assoziation des GABAA-Rezeptors mit Alkohol und anderen Suchtmitteln.....	69
4.3. Unterschiede des mittleren Prozentsatzes und der Anzahl der methylierten GABRA2-CpG-Stellen zwischen alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden	72
4.4. Allgemeine DNA-Methylierung sowie Methylierung weiterer Kandidatengene im Zusammenhang mit Alkoholkonsum	73
4.5. Einfluss von Alter, Geschlecht und Raucherstatus auf epigenetische Veränderungen des GABAA-Rezeptors	76
4.5.1. Einfluss des Geschlechts auf eine epigenetische Veränderung des GABAA- Rezeptors	76
4.5.2. Einfluss des Alters auf eine epigenetische Veränderung des GABAA- Rezeptors	78
4.5.3. Einfluss des Raucherstatus auf eine epigenetische Veränderung des GABAA- Rezeptors	79
4.6. Einfluss klinischer Charakteristika auf den GABAA-Rezeptor sowie auf weitere (epi-) genetische Veränderungen	80
4.7. Studiendesign und Limitationen.....	82
5. Schlussfolgerung	84
Literaturverzeichnis.....	86
Danksagung	99
Affidavit	100

Zusammenfassung

Zahlreiche Hinweise deuten auf eine wichtige Rolle von epigenetischen Mechanismen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Alkoholmissbrauch und resultierender Alkoholabhängigkeit hin. Unter anderem wird seit einiger Zeit eine Beteiligung des GABAergen Systems in der Pathophysiologie der Alkoholkrankung intensiv diskutiert.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, Veränderungen der DNA-Methylierung im GABRA2-Rezeptorgen als epigenetischen Mechanismus bei alkoholabhängigen Patienten zu untersuchen.

Dazu wurden die Methylierungsmuster im Promotorbereich des GABRA2-Gens in peripheren Leukozyten von 85 alkoholabhängigen Patienten und 77 gesunden Kontrollpersonen, beide Kollektive alter- und geschlechtsgemischt, untersucht.

In diesem Ansatz konnten 27 relevante CpG-Stellen identifiziert werden, deren Methylierungsfrequenz zwischen Patienten und Kontrollen verglichen wurde und mögliche Korrelationen zu klinischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Raucherstatus, tägliche und maximale Trinkmenge, Dauer der Alkoholabhängigkeit und Entzugssymptomatik evaluiert wurden.

In der Analyse zeigte sich ein signifikanter Unterschied der allgemeinen DNA-Methylierung zwischen Patienten und Kontrollen im Sinne einer Hypomethylierung bei den alkoholabhängigen Individuen. Diese Beobachtung wurde bestätigt durch teilweise signifikante Unterschiede in der Einzelbetrachtung der 27 CpG-Stellen (CpGs). Vergleiche der mittleren Anzahl methylierter GABRA2-CpGs sowie des mittleren Prozentsatzes methylierter GABRA2-CpGs bestätigte tendenziell diese Beobachtung, war allerdings nicht mehr statistisch signifikant.

Darüber hinaus war das GABRA2-Gen der männlichen sowie der jüngeren Individuen der Kontrollgruppe außerdem signifikant hypomethyliert. Bei den alkoholabhängigen Probanden wurde diesbezüglich keine Signifikanz festgestellt.

Des Weiteren konnten keinerlei Korrelationen zwischen der allgemeinen Methylierung der GABRA2-CpGs, der mittleren Anzahl von methylierten GABRA2-CpGs sowie dem mittleren Prozentsatz von methylierten CpGs und den klinischen Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, tägliche und maximale Trinkmenge, Dauer der Alkoholabhängigkeit oder Entzugssymptomatik nachgewiesen werden.

Bei der vorliegenden explorativen Studie handelte es sich um eine Querschnitts- bzw. Pilotstudie. Zusammengenommen deuteten die Daten auf eine mögliche Beteiligung epigenetischer Mechanismen in Form von DNA-Methylierungen im GABRA2-Gen in der Ätiologie der Alkoholabhängigkeit hin.

Weitere Studien mit analogen Fragestellungen an größeren Probandenkollektiven wären wünschenswert. Weitere Faktoren, wie beispielsweise der Einfluss von Psychopharmakatherapien 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 ebenfalls weiterer 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.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Metabolismus von Alkohol.....	20
Abbildung 2	Beziehung zwischen erblicher Prädisposition, Umweltfaktoren, Exposition mit Suchtstoffen und Anfälligkeit für Suchterkrankungen	23
Abbildung 3	Transkriptionsmechanismus und epigenetische Regulation bei Drogenmissbrauch	26
Abbildung 4	DNA-Methylierung	27
Abbildung 5	Physiologie modulierende epigenetische Mechanismen GABRA2 – Hypothesen.....	30
Abbildung 6	Verteilung der Gruppen nach Geschlecht	39
Abbildung 7	Altersverteilung Kontrollen und Probanden	40
Abbildung 8	Tägliche Trinkmenge alkoholabhängiger Probanden	42
Abbildung 9	Maximale Trinkmenge alkoholabhängiger Probanden	43
Abbildung 10	Sequenz der (-1843/ -1533) Region (kursiv, unterstrichen) einschließlich der,27 untersuchten CpG-Inseln (fett).....	43
Abbildung 11	Allgemeine Methylierung der GABRA2-Inselregion bei alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen.....	44
Abbildung 12	Mittelwerte prozentuale Methylierung der CpG-Stellen bei alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen.....	46
Abbildung 13	mittlere prozentuale Methylierung GABRA2-CpG-Stellen bei Patienten	47
Abbildung 14	mittlere prozentuale Methylierung GABRA2-CpG-Stellen bei Kontrollen	47
Abbildung 15	Verteilung MPGS bei alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen	49
Abbildung 16	Verteilung NMGS bei alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen	50
Abbildung 17	Allgemeine Methylierung bzgl. Alter bezogen auf beide Gruppen ...	52
Abbildung 18	Allgemeine Methylierung bzgl. Alter bei alkoholabhängigen Probanden.....	53
Abbildung 19	Allgemeine Methylierung bzgl. Alter bei Kontrollen	54

Abbildung 20	Einfluss des Geschlechts und Raucherstatus der Gesamtgruppe auf die allgemeine Methylierung	55
Abbildung 21	Einfluss des Geschlechts und des Alters der Kontrollgruppe auf die allgemeine Methylierung	56
Abbildung 22	Einfluss des Alters, Geschlechts und Raucherstatus der Patienten auf den MPGS.....	58
Abbildung 23	Einfluss des Alters und Geschlechts der Kontrollgruppe auf den MPGS.....	59
Abbildung 24	Einfluss des Alters, Geschlechts und Raucherstatus der Patienten auf die NMGS.....	60
Abbildung 25	Einfluss des Alters und Geschlechts der Kontrollen auf die NMGS	61
Abbildung 26	Korrelation der täglichen und maximalen Trinkmenge mit der allgemeinen Methylierung	62
Abbildung 27	Korrelation der täglichen und maximalen Trinkmenge mit dem MPGS.....	63
Abbildung 28	Korrelation der täglichen und maximalen Trinkmenge mit der NMGS	64
Abbildung 29	Korrelation der Dauer der Alkoholabhängigkeit, der Anzahl der Entzugssymptome und des körperl. Entzugs mit der allgemeinen Methylierung	65
Abbildung 30	Korrelation der Dauer der Alkoholabhängigkeit, der Anzahl der Entzugssymptome und des körperl. Entzugs mit dem MPGS	66
Abbildung 31	Korrelation der Dauer der Alkoholabhängigkeit, der Anzahl der Entzugssymptome und des körperl. Entzugs mit der NMGS.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Prävalenz alkoholbezogener Störungen nach DSM-IV bei Erwachsenen	17
Tabelle 2	Kriterien für Missbrauch und Abhängigkeit nach DSM-IV und ICD-10.....	18
Tabelle 3	Demografische Variablen und klinischen Merkmale der alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen.....	33
Tabelle 4	Verteilung der Gruppen nach Geschlecht	38
Tabelle 5	Chi ² -Test für Geschlecht	39
Tabelle 6	Mann-Whitney-U-Test für Alter bzgl. Geschlecht	40
Tabelle 7	Mann-Whitney-U-Test für Alter bzgl. Gruppenverteilung.....	40
Tabelle 8	Raucher jemals bei alkoholabh. Probanden.....	41
Tabelle 9	Raucherstatus nach Geschlecht bei alkoholabh. Probanden	41
Tabelle 10	Chi ² -Test für Raucherstatus nach Geschlecht bei alkoholabhängigen. Probanden.....	42
Tabelle 11	Chi ² -Test für die Unterschiede der allgemeinen Methylierung innerhalb der GABRA2-Inselregion zwischen Patienten und Kontrollen	44/45
Tabelle 12	Methylierung der einzelnen CpG-Stellen bei Patienten und Kontrollen	46
Tabelle 13	Shapiro-Wilk-Test für den MPGS bei Patienten (ALC) und Kontrollen (CON).....	48
Tabelle 14	Shapiro-Wilk-Test für die NMGS bei Patienten (ALC) und Kontrollen (CON).....	48
Tabelle 15	Mann-Whitney-U-Test für den MPGS bei Patienten und Kontrollen	49
Tabelle 16	Mann-Whitney-U-Test für die NMGS bei Patienten und Konrollen.....	50
Tabelle 17	Korrelation des Alters beider Gruppen mit der allgemeinen Methylierung.....	51/52
Tabelle 18	Mann-Whitney-U-Test für das Alter beider Gruppen bzgl. der allgemeinen Methylierung	52

Tabelle 19	Mann-Whitney-U-Test für das Alter der Patienten bzgl. einer allgemeinen Methylierung	53
Tabelle 20	Mann-Whitney-U-Test für das Alter der Kontrollen bzgl. einer allgemeinen Methylierung	54
Tabelle 21	Auswirkungen von Alter, Geschlecht und Raucherstatus der Gesamtgruppe auf die allgemeine Methylierung	55
Tabelle 22	Auswirkungen von Alter und Geschlecht der Kontrollgruppe auf die allgemeine Methylierung.....	56
Tabelle 23	Regressionsanalyse alkoholabhängige Probanden bzgl. des MPGS.....	57
Tabelle 24	Auswirkungen von Alter, Geschlecht und Raucherstatus der Patienten auf den MPGS.....	57
Tabelle 25	Auswirkungen von Alter und Geschlecht der Kontrollen auf den MPGS.....	58
Tabelle 26	Auswirkungen von Alter, Geschlecht und Raucherstatus der alkoholabhängigen Probanden auf die NMGS	59
Tabelle 27	Auswirkungen von Alter und Geschlecht der Kontrollen auf die NMGS	60
Tabelle 28	Einfluss der Trinkmenge und weiterer klinischen Variablen der alkoholabhängigen Probanden auf deren GABRA2- Methylierungsmuster.....	62
Tabelle 29	Einfluss der Trinkmenge und weiterer klinischen Variablen der alkoholabhängigen Probanden auf deren MPGS	63
Tabelle 30	Einfluss der Trinkmenge und weiterer klinischen Variablen der alkoholabhängigen Probanden auf deren NMGS	64

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AD	alcohol dependence
ADH	Alkoholdehydrogenase
AGM	jede Methylierung der GABRA2 CpG-Stellen
ALD	alcoholic liver disease (Alkoholische Lebererkrankung)
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALSPAC	Avon Longitudinal Study of Parents and Children
ANKK1	Ankyrin repeat and kinase domain containing 1
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
ANP	Atrial natriuretic peptide
APA	Amerikanische Psychiatrische Association
ATP	Adenosintriphosphat
AUD	alcohol use disorder
AUDIT	Alcohol Use Disorder Identification Test
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BDZ	Benzodiazepine
bp	base pairs (deutsch: Basenpaare)
BPAD	bipolar (affective) disorder
C	Cytosin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CeA	central nucleus of amygdala
CHRM2	cholinergic receptor muscarinic 2
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
CLES	Common Language Effect Size
CMA	cumulative meta-analyses
COGA	Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CRF	corticotrophin-releasing factor
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter

DHS	Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V.
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid (deutsch: DNS – Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRD2	dopamine receptor D2
DSM	Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen bzw. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EtOH	ethyl alcohol (Ethanol)
EWAS	epigenome-wide association studies
FETeV	Fachgesellschaft für Ernährungstherapie und Prävention
G	Guanin
GABA	gamma-aminobutyric acid
GABBR1	Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 1 (GABA-B- Rezeptor, Untereinheit 1)
GABRD	Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta (GABA- A-Rezeptor, delta-Untereinheit)
GABRG1	gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit gamma1
GAD1	glutamate decarboxylase 1
GDAP	Ganglioside induced differentiation associated protein 1
GWAS	Genome-wide association study
HATs	histone acetyltransferases
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDACs	histone deacetylases
HDMs	histone demethylases
HERP	homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein
HMTs	histone methyltransferases
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HOXA1	Homeobox A1
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
iPSC	induced pluripotent stem cell

kb	kilobase
kpb	kilobase pairs
LINE	long interspersed nucleotide elements
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MBD-2	Methyl-CpG-Binding-Domain protein 2
mCpG	methylierte CpG-Stellen
MEF2	myocyte enhancing factor-2
MEM	Minimal Essential Medium
Min.	Minuten
miRNA	micro RNA
MPGS	mittlerer Prozentsatz methylierter GABRA2 CpG-Inseln
MTHFR	Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
NAD+	Nikotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NEUROD1	neuronal differentiation 1
NEUROD2	neuronal differentiation 2
NEUROD4	neuronal differentiation 4
NFκB	nuclear factor κB
ng	Nanogramm
NMGS	mittlere Anzahl methylierter GABRA2 CpG-Inseln
NPY	neuropeptide Y
NTRK2	neurotrophic receptor tyrosine kinase 2
OCDS	obsessive compulsive drinking scale
OPRM1	opioid receptor Mu 1/ μ-opioid receptor gene
OR(G)	generalized odds ratio
PACSIN1	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1
PBS	phosphate buffered saline (deutsch:phosphatgepufferte Salzlösung)
PGR	progesterone receptor gene
POL II	polymerase II
POMC	Pro-Opiomelanocortin
RVO	Reichsversicherungsordnung
SAMe	S-Adenosylmethionine
SAP	shrimp alkaline phosphatase
Sek.	Sekunden

SEP	socioeconomic position
SNPs	single nucleotide polymorphisms
SPECT	single-photon emission computed tomographic scan
SSAGA	Semi-Structured Assessment on the genetics in alcoholism
STK11	serine/threonine kinase 11
SYK	Spleen Associated Tyrosine Kinase
T	Thymin
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
Vif	Varianzinflationsfaktor
VS	ventral striatum
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1. Die (Volks-) Krankheit „Alkoholabhängigkeit“

1.1.1. Epidemiologie

Der Alkoholmissbrauch ist in unserer Bevölkerung eine relativ häufige Störung und ein durchaus gewichtiges Problem. Ausserdem ist er eine der größten Gesundheitsbelastungen für die Gesellschaft (Most et al. 2014). Laut des „Journals of Health Monitoring“ (Lange et al. 2016) zählt gesundheitsschädlicher Alkoholkonsum zu den fünf wesentlichen Risikofaktoren für Krankheiten, Beeinträchtigungen und Todesfälle weltweit. Im Jahr 2014 starben in Deutschland 20,8 von 100.000 Einwohnern ab 18 Jahren an einer direkt mit dem Alkoholkonsum assoziierten Erkrankung. Männer sind deutlich häufiger von alkoholbedingten Todesursachen betroffen als Frauen (Rommel et al. 2016). Der Alkoholmissbrauch rangiert in den Industriestaaten unter den ersten zehn Ursachen für vorzeitige Erkrankungen und Tod (WHO 2009).

Die Zahl der alkoholabhängigen Bevölkerung wird mit ca. 1,8 Millionen Menschen angegeben, weitere 1,6 Millionen betreiben einen schädlichen Gebrauch von Alkohol (Batra et al., Deutsches Ärzteblatt 17/2016). Zusätzlich konsumieren 5 Millionen Erwachsene Alkohol im potenziell gesundheitsschädlichen Bereich, der bei Männern bei 24 g (\approx 2-3 Gläser Wein zu 0,1 l oder 2 Flaschen Bier zu 0,33 l) und bei Frauen bei 12 g pro Tag liegt (Batra et al., Deutsches Ärzteblatt 17/2016, Seitz et al., Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (DHS)).

Den jährlichen Pro-Kopf-Konsum für Personen ab 15 Jahren, der von der Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen (DHS) unter Zuhilfenahme der Daten aus der Alkoholwirtschaft im Jahrbuch ermittelt wird, schätzte man in Deutschland 2018 auf 131,3 l, wobei dieser Wert ca. 10,7 l Reinalkohol beinhaltet. Der Löwenanteil entfällt dabei auf Bier (102,0 l), gefolgt von Wein (20,5 l). Im Bereich des riskanten Konsums bewegen sich ungefähr doppelt so viele Männer wie Frauen, im Bereich des gefährlichen Konsums ungefähr fünffach so viele, und innerhalb des Hochkonsums sind ca. ein Drittel mehr Männer als Frauen betroffen (Küfner und Kraus, Deutsches Ärzteblatt 14/2002).

Bei einer repräsentativen Stichprobe von Erwachsenen in Deutschland zwischen 2018 und 2019 lag die Prävalenz des regelmäßigen Alkoholkonsums bei 85% (Garnett et al. 2022).

Tabelle 1: Prävalenz alkoholbezogener Störungen nach DSM-IV bei Erwachsenen

Prävalenz alkoholbezogener Störungen nach DSM-IV bei Erwachsenen von 18 bis 64 Jahren (Atzendorf et al. 2019)

	Gesamt %	Männer %	Frauen %	Gesamt N	Gesamt N (95%-KI)
Missbrauch	2,8	4,0	1,5	1.400.000	(1.200.000-1.700.000)
Abhängigkeit	3,1	4,5	1,7	1.600.000	(1.400.000-1.900.000)

1.1.2. Begriffsbestimmung

Nach ICD-10 handelt es sich beim Abhängigkeitssyndrom um „eine Gruppe körperlicher, Verhaltens- und kognitiv-emotionaler Phänomene, bei denen der Konsum einer Substanz oder einer Substanzklasse für die betreffende Person Vorrang hat gegenüber anderen Verhaltensweisen, die von ihr früher höher bewertet wurden“. Ein entscheidendes Charakteristikum ist der oft starke, gelegentlich übermächtige Wunsch, Substanzen oder Medikamente (ärztlich verordnet oder nicht), Alkohol oder Tabak zu konsumieren (Soyka und Kufner 2008).

Das wesentliche Merkmal des Alkoholismus, der 1968 im Sinne der Reichsversicherungsordnung (RVO) – ursprüngliche Fassung 07/1911, letzte Änderung 10/2012 - als Krankheit anerkannt wurde, ist die körperliche und/oder psychische Abhängigkeit vom Alkohol. Der Terminus „(chronischer) Alkoholismus“ wurde 1852 von dem schwedischen Arzt Huss zur Bezeichnung körperlicher Folgeschäden von übermäßigem Alkoholkonsum geprägt (Soyka und Kufner 2008).

Der alte Begriff „Alkoholismus“ wurde durch den Begriff „Alkoholabhängigkeit“ ersetzt, um zusätzlich noch den „Missbrauch“ bzw. den „schädlichen Gebrauch“ unterscheiden zu können.

Zumeist werden zweierlei Begriffsbestimmungen der Abhängigkeit bzw. der Alkoholabhängigkeit herangezogen. Sowohl die ICD-10 der WHO als auch die DSM IV-Kriterien der Amerikanischen Psychiatrischen Association (APA) prägen den Begriff des Alkoholmissbrauchs.

Tabelle 2: Kriterien für Missbrauch und Abhängigkeit nach DSM-IV und ICD-10

DSM-IV	ICD-10
Kriterien für Missbrauch	Schädlicher Gebrauch
<ul style="list-style-type: none"> • Vernachlässigung von Pflichten • Alkohol trotz körperlicher Risiken • Alkohol trotz Problemen mit der Polizei • Alkohol trotz psychosozialer Probleme 	<ul style="list-style-type: none"> • Schädigung der psychischen oder physischen Gesundheit
Kriterien für Abhängigkeit (3 von 7 folgenden werden erfüllt)	Kriterien für Abhängigkeit (3 von 6 folgenden werden erfüllt)
<ul style="list-style-type: none"> • Toleranzentwicklung, definiert durch eines der folgenden Kriterien <ul style="list-style-type: none"> ❖ Verlangen nach ausgeprägter Dosissteigerung, um einen Intoxikationszustand oder erwünschten Effekt herbeizuführen ❖ deutlich verminderte Wirkung bei fortgesetzter Einnahme derselben Dosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Nachweis einer Toleranzentwicklung (gesteigerte Drogenaufnahme bei gleicher Wirkung)
<ul style="list-style-type: none"> • Entzugssymptome <ul style="list-style-type: none"> ❖ charakteristisches Entzugssyndrom der jeweiligen Substanz ❖ die gleiche oder eine ähnliche Substanz wird eingenommen, um Entzugssymptome zu lindern oder zu vermeiden 	<ul style="list-style-type: none"> • ein körperliches Entzugssyndrom bei Beendigung oder Reduktion des Konsums
<ul style="list-style-type: none"> • die Substanz wird häufig in größeren Mengen oder länger als beabsichtigt eingenommen 	<ul style="list-style-type: none"> • verminderte Kontrollfähigkeit bezüglich des Beginns, der Beendigung und der Menge des Konsums (unzureichende Kontrolle)
<ul style="list-style-type: none"> • anhaltender Wunsch oder erfolgloser Versuch, den Substanzgebrauch zu verringern oder zu kontrollieren 	<ul style="list-style-type: none"> • ein starker Wunsch oder eine Art Zwang, psychotrope Substanzen zu konsumieren (Suchtverlangen)
<ul style="list-style-type: none"> • viel Zeit für Aktivitäten, um die Substanz zu beschaffen, sie zu sich zu nehmen oder sich von ihrer Wirkung zu erholen 	
<ul style="list-style-type: none"> • wichtige soziale, berufliche oder Freizeitaktivitäten werden aufgrund des Substanzmissbrauchs aufgegeben oder eingeschränkt 	<ul style="list-style-type: none"> • fortschreitende Vernachlässigung anderer Vergnügen oder Interessen zugunsten des Substanzkonsums (Einengung des Verhaltens auf den Substanzkonsum)
<ul style="list-style-type: none"> • fortgesetzter Substanzmissbrauch trotz Kenntnis eines anhaltenden oder wiederkehrenden körperlichen oder psychischen Problems, das wahrscheinlich durch den Substanzmissbrauch verursacht oder verstärkt wird 	<ul style="list-style-type: none"> • anhaltender Substanzkonsum trotz eindeutig schädlicher Folgen im körperlichen, psychischen oder sozialen Bereich

Küfner/ Kraus, Deutsches Ärzteblatt, 14/2002 (99)

Alkoholabhängige Personen können darüber hinaus in verschiedene Typen eingeteilt werden, was eine weitere Option der Begriffsbestimmung der Alkoholabhängigkeit eröffnet.

Rietschel und Treutlein geben in ihrer Übersichtsarbeit über die Genetik des Alkoholismus einen Überblick über die phänotypischen Charakteristika der Alkoholsucht, die nach den jeweiligen Autoren bezeichnet werden (Rietschel und

Treutlein 2012). Jellinek teilt die jeweiligen Typen von Alpha bis Epsilon ein (Jellinek 1960), bei Cloninger und Kollegen sowie Sigvardsson und Kollegen gibt es Typ 1 und 2 plus einen „Sekundär-Typ“ mit jeweiligen phänotypischen Charakteristika (Cloninger et al. 1981, Sigvardsson et al. 1996, Cloninger, Sigvardsson 1996). Lesch und Kollegen sowie Lesch und Walter bezeichnen sogar 4 Typen (Lesch et al 1988, 1990 + 1993, Lesch und Walter 1996), nach Schuckit und Irwin sowie Irwin und Kollegen mit Barbor und Kollegen werden sowohl ein „Primär-“, und „Sekundär-Typ“ als auch ein Typ A und B beschrieben (Schuckit und Irwin, 1989, Irwin et al. 1990, Babor et al. 1992).

1.1.3. Metabolismus und Klinisches Erscheinungsbild

1.1.3.1. Metabolismus

Alkohole sind organische Verbindungen, die mit einer Hydroxyl (-OH)-Gruppe an ein Kohlenstoffatom gebunden sind. Die aliphatischen Alkohole werden durch die folgenden allgemeinen Formeln beschrieben: $C_n H_{2n+2} O$ bzw. $C_2 H_5 OH$. Ethanol, der psychoaktive Bestandteil von Alkohol, wird seit zehntausenden Jahren verwendet.

Ethanol wird in einer reversiblen Reaktion, katalysiert durch mehrere Alkoholdehydrogenasen (ADH), hauptsächlich zu Acetaldehyd, einem toxischen Zwischenprodukt, oxidiert. Dabei wird NAD^+ (Nikotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form) zu $NADH$ (Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form) reduziert. Das Acetaldehyd wird irreversibel durch eine Aldehyddehydrogenase (ALDH) zu Acetat oxidiert, wobei ein weiteres NAD^+ reduziert wird. Die wichtigste Aldehyddehydrogenase bei Säugetieren, die auf Acetaldehyd einwirkt, ist die mitochondriale ALDH2. Die Schlüssel-Enzyme des Ethanolstoffwechsels sind demnach Alkoholdehydrogenasen, die den Großteil der Oxidation zu Acetaldehyd katalysieren, und Aldehyddehydrogenasen, die Acetaldehyd zu Acetat oxidieren. Cytochrom P4502E1 (CYP2E1) und Katalase können ebenfalls Ethanol zu Acetaldehyd oxidieren, leisten aber normalerweise nur einen kleinen Beitrag zur Ausscheidung von Ethanol. Jedoch kann CYP2E1 zu einigen toxischen Wirkungen beitragen, indem es Sauerstoffradikale generiert, und ein Ort ist, an dem Ethanol- und Arzneimittelstoffwechsel interagieren. Der größte Teil (rund 90 %) der Oxidation von Ethanol findet in der Leber, ein kleinerer Teil auch im Magen statt (Edenberg und Foroud 2014).

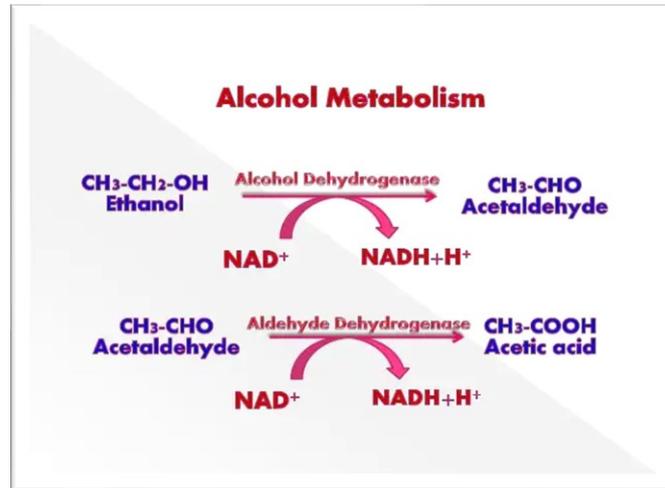


Abbildung 1: Metabolismus von Alkohol (Abbildung aus dem WWW: www.slideshare.net/YESANNA/alcohol-metabolism, Dr Rajeev Gandham, Assistant Professor, Dept. of Biochemistry, St. Peter's Medical College, Hospital & RI)

1.1.3.2. Klinisches Erscheinungsbild der Alkoholabhängigkeit

1.1.3.2.1. Körperliche Untersuchung

Auffällig bei der körperlichen Untersuchung können zum Beispiel eine Polyneuropathie, ein Foetor alcoholicus, ein Rhinophym, Spider naevi und Veränderungen der Facies sein. (Batra et al., Deutsches Ärzteblatt 17/2016)

1.1.3.2.2. Wirkungen auf die Organsysteme

Es gibt nahezu kein Organsystem das nicht früher oder später durch Alkohol geschädigt wird.

1.1.3.2.2.1. Schädigung des Gastrointestinaltrakts

Ösophagus, Magen und Pankreas stellen primäre Zielorgane alkoholinduzierter Erkrankungen dar. Ethanol verursacht im Ösophagus und Magen dosisabhängig Motilitätsstörungen und Mukosaläsionen, die unter akuten Bedingungen reversibel sind. Chronischer Alkoholkonsum ist mit einer deutlichen Risikosteigerung für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus vergesellschaftet. Diese Wirkungen werden hauptsächlich durch direkten Mukosakontakt mit Ethanol oder seines Metaboliten Azetaldehyd verursacht. (Siegmond und Singer 2005)

Alkohol induziert – wie oben beschrieben - eine Schleimhautschädigung im oberen Gastrointestinaltrakt und führt zu einer deutlichen Erhöhung der Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für Makromoleküle wie Endotoxin (Bode und Bode. 2005).

1.1.3.2.2.2. Leberschädigung

Neben dem geläufigen Endstadium der Alkoholzirrhose findet sich die Fettleber ohne Gelbsucht oder sonstige Zeichen der Leberinsuffizienz als Früh- und Zufallsbefund. Dabei können schon alle Stigmata einer chronischen Lebererkrankung vorhanden sein. (Martini und Dölle 1965)

1.1.3.2.2.3. Kardiovaskuläre Störungen

Stärkerer Alkoholkonsum führt zu Hypertonus und Kardiomyopathien. (Rubin und Thomas 1992) Bei akuten Alkoholexzessen kann es außerdem zu Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz und Palpitationen bis hin zum Vorhofflattern bzw. -flimmern kommen. (Soyka und Kufner 2008)

1.1.3.2.2.4. Schädigungen des zentralen Nervensystems

Die hepatische Enzephalopathie ist eine Komplikation der Leberzirrhose. (Labenz et al. 2017). Sie entsteht durch eine mangelhafte Elimination des Zellgifts Ammoniak.

Eine weitere Folge des exzessiven Alkoholkonsums ist die Wernicke-Enzephalopathie, die eine schwere und lebensbedrohliche Erkrankung ist. Sie lässt sich auf einen Mangel an Vitamin B1 (Thiamin) zurückführen. Wenn sie nicht richtig behandelt wird, können schwere neurologische Störungen wie Korsakoff-Psychose und sogar der Tod auftreten. Die klassische Trias klinischer Symptome (anormaler Geisteszustand, Ataxie und Ophthalmoplegie) wird bei der Erstuntersuchung nur bei 16–33 % der Patienten gefunden. (Ota et al. 2020)

Entzugskrampfanfälle oder ein Delirium tremens sind die schwerwiegendsten Komplikationen des Alkoholentzugssyndroms. Im unbehandelten Fall liegt die Wahrscheinlichkeit für einen letalen Verlauf beim Delirium tremens zwischen 5 und 15 % (Erwin et al. 1998, Zilker 1999, Deutsches Ärzteblatt 17/2016), die Wahrscheinlichkeit für ein epileptisches Ereignis im Rahmen des Entzugs wird mit etwa 10 % beziffert (Zilker 1999, Hillborn et al. 2003, Deutsches Ärzteblatt 17/2016).

1.1.3.2.3. Psychische Folgen

„Alkohol verbessert kurzfristig die Stimmungslage, hilft bei der Überwindung von sozialer Unsicherheit und Angst und distanziert von aktuellen negativen Emotionen. Langfristig entsteht jedoch unter anderem über die Beeinflussung des serotonergen und dopaminergen Systems ein höheres Risiko für eine depressive Störung.“ (Di Chiara und Imperato 1988, Duncan et al. 2012, Deutsches Ärzteblatt 17/2016)

Rich und Martin äußerten sich dazu wie folgt: Psychiatrische Komorbidität ist ein wichtiges Thema bei den meisten Patienten mit AUD (alcohol use disorder). Es besteht ein deutlich erhöhtes Rückfallrisiko, und die Prognose ist in der komorbiden Bevölkerung schlechter in Bezug auf Suizidalität und verschiedene andere Folgen (Rich und Martin 2014).

1.1.4. Wirtschaftliche und volkswirtschaftliche Folgen und Kosten

„In einer aktuellen Untersuchung beziffert der Gesundheitsökonom Dr. Tobias Effertz die direkten und indirekten Kosten des Alkoholkonsums in Deutschland auf rund 57,04 Milliarden Euro. Davon entfallen 16,59 Milliarden Euro auf direkte Kosten für das Gesundheitssystem (z.B. Behandlungskosten beim Arzt, Krankenhausaufenthalte und Medikamente) und 40,44 Milliarden Euro auf indirekte Kosten (z.B. Produktionsausfall durch krankheitsbedingte Arbeitsunfähigkeit, Arbeitslosigkeit, Frühverrentung und vorzeitiger Tod).“ (Effertz 2020, DHS)

Im Jahr 2020 betragen die Einnahmen aus der Alkoholsteuer 3.243 Millionen Euro. Diese steigerte sich im Vergleich zum Vorjahr um 3,3 % (2019: 3.139 Millionen Euro) (Bundesministerium der Finanzen, Berlin, DHS).

Für die Bewerbung alkoholischer Getränke wurden im Jahr 2020 z.B. 484 Millionen Euro ausgegeben, wobei der Hauptanteil wiederum auf Bier mit 300 Millionen Euro, gefolgt von Spirituosen mit 94 Millionen Euro, entfiel (Nielsen Media Research zitiert nach: Bundesverband der Deutschen Spirituosen-Industrie und –Importeure (2022): Daten aus der Alkoholwirtschaft, Bonn, DHS).

1.1.5. Behandlung und Therapie

Seit Januar 2015 existiert eine S3-Leitlinie zur Behandlung der Alkoholabhängigkeit. (AWMF, aktuelle Version 2020) In dieser Leitlinie werden Kurzinterventionen beschrieben, die Menschen mit problematischem Alkoholkonsum in nicht-spezialisierten Settings zu einer Trinkmengenreduktion oder ggf. zur Abstinenz motivieren sollen. Des

Weiteren finden sich darin Handlungsempfehlungen zur körperlichen Entgiftung, die eine qualifizierte Entzugsbehandlung sowie medikamentöse Unterstützungen beinhaltet. Zur Medikation bei Entzugssymptomen gehören z. B. die Benzodiazepine (BDZ) (Evidenzgrad A), Clomethiazol (Evidenzgrad B) und Haloperidol (in Kombination mit BDZ oder Clomethiazol).

Auch die Postakutbehandlung und Rehabilitation nach Entzug ist Bestandteil der Leitlinie. Die Rehabilitationsziele sind nur unter der Voraussetzung zu erreichen, dass es den suchtkranken Menschen durch die Rehabilitationsmaßnahme (Rehabilitationsbehandlung) gelingt, dauerhaft abstinent zu leben bzw. die Rückfallhäufigkeit, die Rückfalldauer und die Rückfallschwere zu minimieren (AWMF-Leitlinie).

1.1.6. Ursachen der (Alkohol-)Sucht

Die Sucht ist eine einschränkende psychiatrische Erkrankung mit einer komplexen Ätiologie, die die Interaktion zwischen erblicher Prädisposition und Umweltfaktoren einschließt. (Wong et al. 2011 – Abbildung 2).

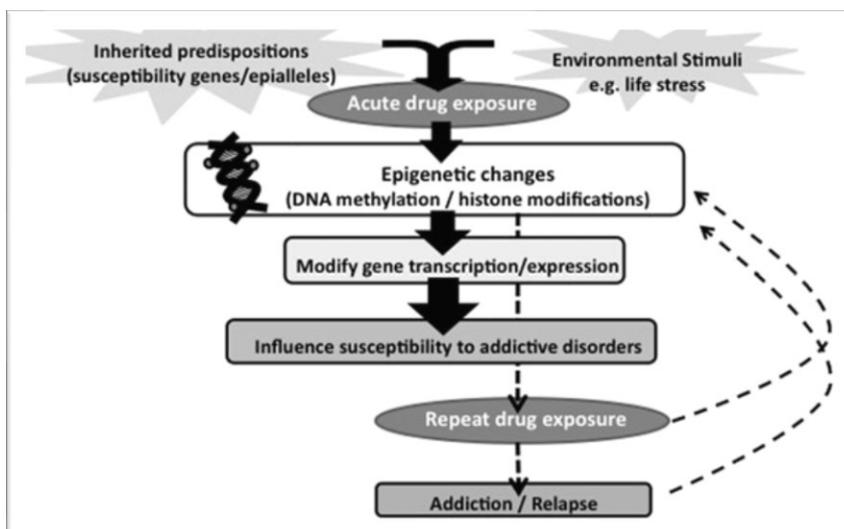


Abbildung 2: Beziehung zwischen erblicher Prädisposition, Umweltfaktoren, Exposition mit Suchtstoffen und Anfälligkeit für Suchterkrankungen. (Wong et al 2011).

Zur Erklärung der Missbrauchs- und Abhängigkeitsentwicklung sowie der Aufrechterhaltung geht man im Kern von einem Belohnungs- und einem Steuerungs- oder Kontrollsystem aus. Zum Teil wird auch das Stress-System einbezogen, das durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebenrinden-Achse definiert ist. (Soyka und Küfner 2008).

Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien deuten an, dass eine Vererblichkeit von Substanzmissbrauch moderat bis hoch ist (zwischen 0,3 und 0,7), wobei gemeinsame und nicht-gemeinsame Umweltfaktoren ebenfalls von Bedeutung sind. Die meisten ätiologischen Studien haben sich darauf konzentriert, genetische Varianten zu identifizieren, die ein Individuum zum Spektrum der Suchtstörung prädisponieren. Die Suche nach ursächlichen genetischen Variationen der Suchtprädisposition hat einige Erfolge erzielt, und Polymorphismen bei einer Anzahl von Neurotransmitter-System-Genen der Kandidaten waren mit Suchtanfälligkeit assoziiert. (Wong et al. 2011).

Adoptionsstudien können das familiäre Umfeld teilweise von der Genetik entkoppeln. Sie zeigen, dass das Risiko für Alkoholismus bei Adoptivkindern besser mit ihren biologischen Eltern (Genquelle) als mit ihren Adoptiveltern (Umwelteinflüsse) korreliert. Zwillingsstudien zeigen, dass monozygote Zwillinge ein ähnlicheres Risiko für Alkoholismus aufweisen als zweieiige Zwillinge, was ebenfalls auf eine wesentliche Rolle der Gene hindeutet. Zwillings- und Familienstudien legen nahe, dass etwa 45-65 % des Risikos genetisch bedingt sind. Die Tatsache, dass ein eineiiger Zwilling eines Alkoholikers oft nicht alkoholkrank ist, zeigt, dass Gene zwar das Risiko beeinflussen, aber auch andere nicht genetische Faktoren zur Anfälligkeit für Alkoholabhängigkeit beitragen. (Edenberg und Foroud 2014).

1.2. Epigenetik

Wir sind nicht auf Gedeih und Verderb unseren Genen ausgeliefert. Wir können zwar unsere Gene nicht einfach so verändern, aber wir haben es in gewisser Weise selbst in der Hand, schädliche Gene auszuschalten und gute Gene einzuschalten. Bestimmte Substanzen können Gene an- oder ausschalten. (Clarke 2017)

Der britische Biologe Conrad Waddington prägte als Erster Mitte des 20. Jahrhunderts den Begriff „Epigenetik“ (wörtlich übersetzt „Über-Genetik“) und führte das Konzept der epigenetischen Landschaft ein. Hierdurch beschrieb er die Art und Weise, in der sich das Schicksal der Zellen während der Entwicklung etabliert, damit aus einer initial undifferenzierten Zellmasse die Gewebe und Organe eines komplexen Organismus entstehen. (Wong et al. 2011).

Die Epigenetik untersucht, wie die Aktivität unserer Gene gesteuert wird (Strienz 2021). Cadet und Kollegen beschreiben die Epigenetik wie folgt: Epigenetik bezieht sich auf vererbare Transkriptionsveränderungen, die nicht auf veränderte DNA-

Sequenzen zurückzuführen sind. Diese sind multifaktoriell bedingt und umfassen Veränderungen in der Barrierefreiheit der DNA aufgrund unterschiedlicher Verpackungen und potenzieller Veränderungen bei Translationsprozessen. Zu den epigenetischen Veränderungen gehören Modifikationen von Histonen im Chromatin, DNA-Methylierung und DNA-Hydroxymethylierung. Weitere Histonmodifikationen, die sich auf die Genexpression auswirken können, sind Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung. Diese Veränderungen fördern Veränderungen in der Genexpression, indem sie die Chromatinkonformation verändern und die Rekrutierung von regulatorischen Faktoren an DNA-Sequenzen ermöglichen oder hemmen (Cadet et al. 2016).

Die DNA-Methylierung, die zu den epigenetischen Mechanismen zählt, spielt dabei vermutlich eine Rolle. Epigenetische Instrumente regulieren die Genexpression ohne das Genom selbst zu verändern. Es wurden DNA-Methylierungsmuster identifiziert, die vielleicht alkoholspezifisch sein könnten. Wünschenswert wäre eine Chance, durch die Identifikation solcher spezifischen epigenetischen Veränderungen in der Zukunft die Alkoholsucht gezielt zu diagnostizieren und zu therapieren.

1.2.1. Epigenetik und Sucht

In eukaryotischen Zellen wird die DNA organisiert, indem sie, um Nukleosomen zu formen, um Histonoktomere gewickelt wird. Die Nukleosomen werden dann weiter organisiert und verdichtet, um Chromosomen zu bilden (Abbildung 3, links). Nur durch Dekompaktierung des kompakten Chromatins kann die DNA eines spezifischen Gens der Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht werden. Drogen (Abbildung 3, rechts) wirken über synaptische Targets, um intrazelluläre Signalkaskaden zu verändern, was zu Aktivierung oder Inhibition von Transkriptionsfaktoren und von vielen anderen nuklearen Molekülen, einschließlich chromatinregulierender Proteine, führt. Die detaillierten Mechanismen, die bei letzterem eine Rolle spielen, werden noch wenig verstanden. Dies führt zur Induktion oder Unterdrückung bestimmter Gene, einschließlich die für nicht-kodierende RNAs. Eine veränderte Expression einiger dieser Gene kann wiederum weitere Gentranskriptionen regulieren. Es wird angenommen, dass einige dieser drogeninduzierten Veränderungen auf dem Chromatinlevel extrem stabil sind und dadurch den langanhaltenden Verhaltensweisen zugrunde liegen, die die Sucht definieren (Robison und Nestler 2011 – Abbildung 3).

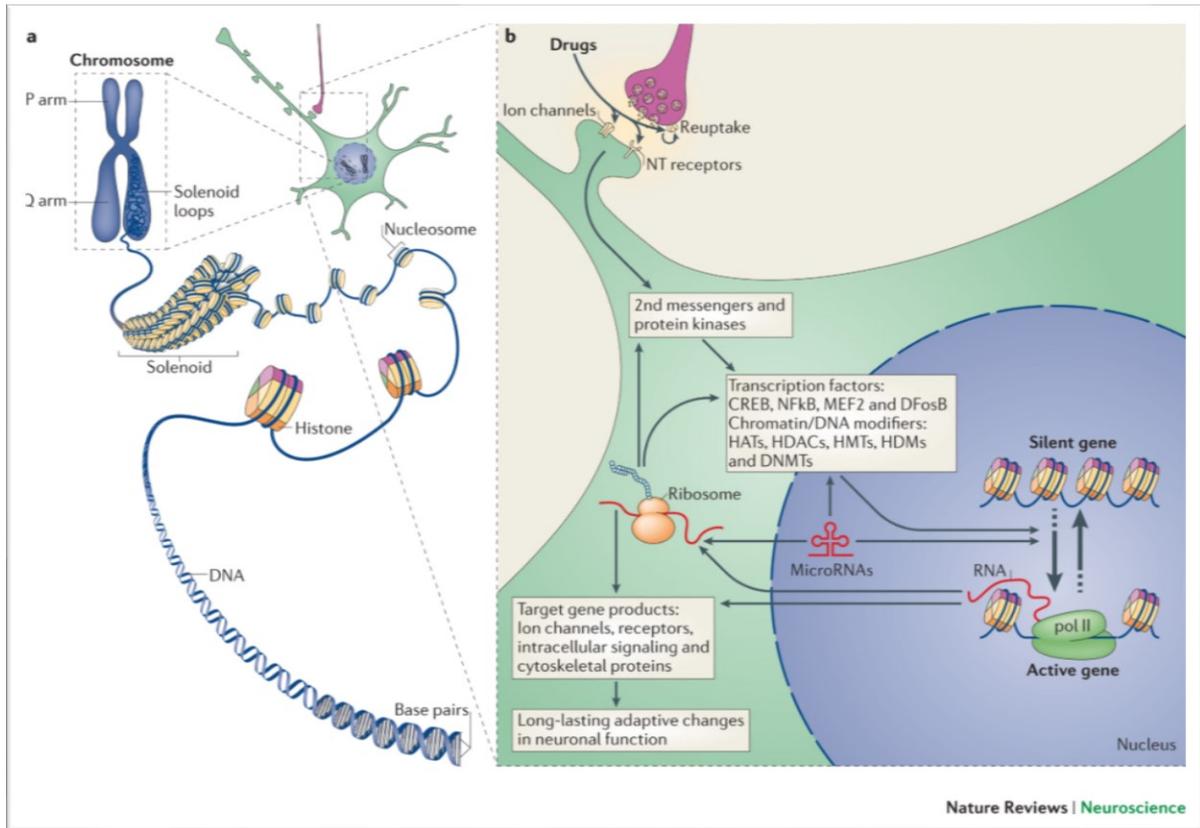


Abbildung 3: Transkriptionsmechanismus und epigenetische Regulation bei Drogenmissbrauch (Robison und Nestler 2011)

CREB: cAMP (cyclic adenosine monophosphate) -response element binding protein; DNMTs: DNA-methyltransferases; HATs: histone acetyltransferases; HDACs: histone deacetylases; HDMs: histone demethylases; HMTs: histone methyltransferases; MEF2: myocyte enhancing factor-2; NFkB: nuclear factor kB; pol II: polymerase II.

Mittlerweile existieren zahlreiche Untersuchungen sowohl an Menschen als auch an Tieren, die einen Zusammenhang zwischen epigenetischen Veränderungen und Suchtanfälligkeit belegen.

Bei Exposition mit schädlichen Umweltreizen haben Individuen, die Gene oder epigenetische Veränderungen, die zur Suchtanfälligkeit neigen, tragen, ein erhöhtes Risiko eine Suchterkrankung zu entwickeln. Akuter Drogenkonsum kann dauerhafte Veränderungen in der Genexpression via epigenetischer Veränderungen hervorrufen, die die Empfindlichkeit für Suchtstörungen beeinflussen. Eine erhöhte Anfälligkeit für Drogenmissbrauch kann im Rückschluss wiederum ein erhöhtes Risiko für zukünftigen Drogenkonsum bewirken (wie der gestrichelte Pfeil in Abbildung 2 zeigt), was wiederum weitere Modifikationen im Epigenom und der Genexpression mit sich bringt. (Wong et al 2011 – Abbildung 2).

Substanzinduzierte Veränderungen der Genexpression im gesamten Belohnungsschaltkreis des Gehirns sind wahrscheinlich Komponenten der Persistenz des drogenabhängigen Zustands. (Maze und Nestler 2011).

Ein Substanzmissbrauch kann ebenfalls epigenetische Veränderungen bewirken, die wiederum die Suchanfälligkeit erhöhen und – auch im Zusammenhang mit Umwelteinflüssen – nach Entzug zur vermehrten Rückfälligkeit führen können.

Eine dieser epigenetischen Veränderungen, die durch Sucht, beispielsweise durch Alkoholmissbrauch hervorgerufen werden, ist die DNA-Methylierung, die im Folgenden näher beschrieben wird.

1.2.2. DNA-Methylierung

Die Methylierung ist ein epigenetischer Mechanismus, wobei kleine Moleküle – sogenannte Methylgruppen (-CH₃) – an bestimmte Cytosine (C) der DNA angehängt werden. Das „Aufsetzen“ der Moleküle an den Basensequenzen katalysieren die DNA-Methyltransferasen. Am häufigsten sind in einer DNA die, auf eine Guanin-Base folgenden Cytosine methyliert. Diese Regionen werden dann CpG (Cytosinphosphatidyl-Guanin) -Inseln genannt, wobei das „p“ die Verbindung der DNA-Basen durch Phosphatgruppen bedeutet (Lehnert et al. 2018).

CpG-Inseln werden im Allgemeinen als 200-bp (base pairs)-Abschnitte der DNA mit einem C+G-Gehalt von 50 % und einem beobachteten CpG-/erwarteten CpG-Verhältnis von über 0,6 beschrieben (Jones und Peter-A., 2012). CpG-Inseln, die sich in den Promotor-Regionen von Genen befinden, können eine wichtige Rolle beim Gen-Silencing und -Imprinting spielen.

Werden diese CpG-Gruppen methyliert, also binden Proteine daran, so sind die Gene in diesem Abschnitt der DNA inaktiv und können nicht mehr abgelesen werden.

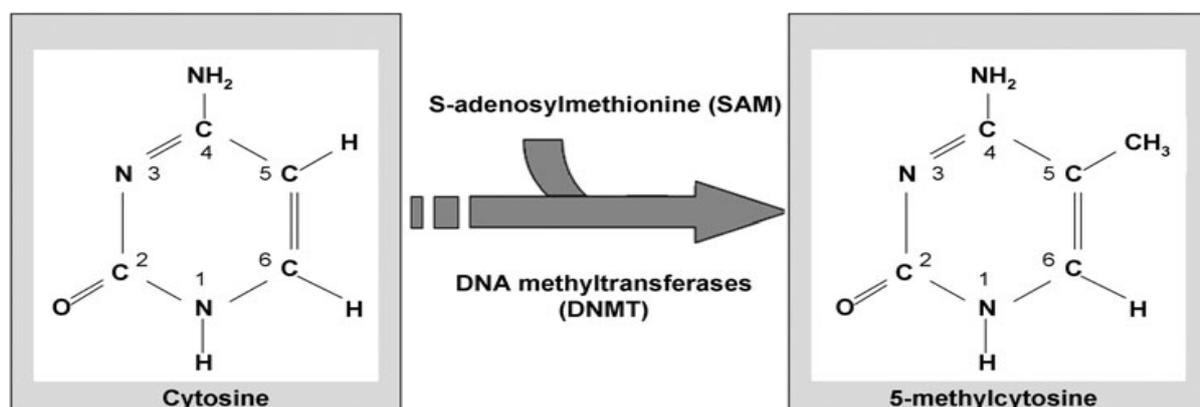


Abbildung 4: DNA-Methylierung (Wong et al. 2011).

Exogene Noxen wie z. B. Nikotin oder Alkohol können zu Veränderungen der DNA-Methylierung führen und haben somit einen direkten Effekt auf die epigenetischen Mechanismen. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass alkoholinduzierte Veränderungen der DNA-Methylierung wichtige Faktoren im komplexen Prozess der pathogenetischen Störungen des Alkoholkonsums sind. Starkman und Kollegen beschrieben, dass sowohl die akute als auch die chronische Ethanolexposition die Genexpression in spezifischen neuronalen Schaltkreisen verändern kann, die die Verhaltensfolgen in Bezug auf Toleranz und Abhängigkeit steuern (Starkman et al. 2012).

1.2.3. Alkoholabhängigkeit und DNA-Methylierung

Dragic und Kollegen werteten in der aktuellen Literatur verfügbare Studien über Alkoholkonsum und DNA-Methylierung im Blut von Erwachsenen systematisch aus. Sie schlossen 11 Querschnittsstudien mit zwischen 88 bis 9643 Teilnehmern ein. In den epigenomweiten Assoziationsstudien wurden bis zu 5458 differentiell methylierte Positionen identifiziert und 15 wurden in mindestens vier Studien beobachtet. Dragic und Kollegen folgerten daraus, dass potenzielle Methylierungsmarker für den Alkoholkonsum identifiziert wurden, doch es wäre eine weitere Validierung in großen Kohorten erforderlich (Dragic et al. 2021).

Von sechs früheren Studien zu alkoholbedingten Störungen im Zusammenhang mit globalen epigenetischen Veränderungen untersuchten zwei die globale DNA-Methylierung des peripheren Blutes als ein Biomarker der alkoholbedingten Störungen. Bönsch und Kollegen konnten zeigen, dass höhere Plasma-Homocystein-Konzentrationen die globale DNA-Methylierung in peripheren Blutzellen beeinflussen können. In einer kontrollierten Studie beobachteten sie einen signifikanten Anstieg (10 %) der genomischen DNA-Methylierung bei Patienten mit Alkoholismus, der auch signifikant mit ihren erhöhten Homocysteinspiegeln assoziiert war (Bönsch et al. 2004).

Eine spätere Studie von Kim und Kollegen evaluierte das Methylierungsniveau des sich wiederholenden Elements Alu der DNA des peripheren Blutes koreanischer Männer. Alu-Elemente beherbergen ein Viertel der CpG-Dinucleotide im Genom und fungieren als Proxies für die globale DNA-Methylierung. In dieser Studie wurde die Alu-Methylierung in der peripheren Blut-DNA von gesunden Probanden und Alkoholikern untersucht. Das Alu-Methylierungsniveau war bei Alkoholikern im Vergleich zu gesun-

den Kontrollen signifikant höher. Darüber hinaus wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Alu-Methylierung und dem Identifikationstest für Alkoholkonsumstörungen, dem Alkoholproblem und der Lebensposition gefunden. Insgesamt deuteten diese neuen Erkenntnisse darauf hin, dass die alkoholbedingte Erhöhung der Alu-Methylierung eine komplexe Rolle in der Ätiologie und Pathogenese der Alkoholabhängigkeit spielen könnte (Kim et al. 2016).

Eine größere Studie von Zhu und Kollegen an 1465 Personen mit sozialem Alkoholkonsum berichtet dem hingegen von einer umgekehrten Korrelation zwischen Alkoholkonsum und Alu-Methylierung (Zhu et al. 2012).

Shukla und Kollegen befassten sich auch mit den jüngsten Entwicklungen zu den epigenetischen Wirkungen von Ethanol. Ein großer Anteil der von ihnen erhobenen Daten stammte aus Studien bezogen auf die Leber und die neuronalen Systeme und beinhalteten posttranslationale Modifikationen in Histonen und Methylierungen in der DNA. Ethanol bewirkte eine ortsselektive Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung in Histonen. Experimentelle Beweise unterstützten die transkriptionelle Regulation von Genen in das ZNS durch DNA-Methylierungen (Shukla et al. 2008).

Jedoch fanden eine Menge an Studien keine Unterschiede in der globalen Methylierung der DNA des peripheren Blutes zwischen alkoholkranken Personen und Kontrollgruppen. Zhang und Kollegen konnten z.B. keine Assoziation mit Alter, Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum in der globalen Leukozyten-DNA-Methylierung finden (Zhang et al. 2011). Ono und Kollegen fanden ebenfalls keine statistisch signifikante Assoziation mit Alkoholkonsum (Ono et al. 2012). Eine post-mortem Studie von Manzardo und Kollegen an zehn Alkoholkranken und zehn zugewiesenen Kontrollpersonen berichtete auch von keinen signifikanten Unterschieden in der globalen Methylierung (Manzardo et al. 2012).

Während die Studien an der globalen Methylierung inkonsistent sind, schlagen einige der oben erwähnten Studien vor, dass der Alkoholkonsum in alkoholkranken Individuen eine Rolle bei den globalen epigenetischen Veränderungen spielen könnte.

1.2.4. GABA, GABAA-Rezeptoren und GABRA2-Rezeptorgen

GABA (γ -Aminobuttersäure) ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter im menschlichen Gehirn (Olsen und Sieghart 2009). Die schnelle hemmende Wirkung von GABA im reifen Nervensystem wird durch GABA-Typ-A (GABAA)-Rezeptoren

vermittelt, die heteropentamere ligandengesteuerte und für Chlorid durchlässige Ionenkanäle sind (Hevers und Lüddens, 1998). Der GABAA-Rezeptor ist der wichtigste inhibitorische Rezeptor im zentralen Nervensystem.

GABAA-Rezeptoren sind im gesamten Gehirn verteilt und bestehen aus einer Reihe von 19 Untereinheiten (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π und ρ 1-3), die in den verschiedenen Gehirnregionen unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Olsen und Sieghart, 2009).

Die Mehrheit der GABAA-Rezeptoren enthält zwei α -, zwei β - und eine γ -Untereinheit, wobei die Kombinationen α 1 β 2 γ 2 und α 2 β 3 γ 2 75-85 % der GABAA-Rezeptoren im erwachsenen Kortex ausmachen (Rudolph et al., 2001).

Im menschlichen Genom sind die meisten Gene der GABAA-Untereinheiten auf vier Chromosomen angeordnet: 4p12 (β 1, α 4, α 2, γ 1), 5q34 (β 2, α 6, α 1, γ 2), 15q11 (β 3, α 5, γ 3) und Xq28 (θ , α 3, ϵ) (Steiger und Russek, 2004). Das GABRA2-Rezeptorgen kodiert also die α 2-Untereinheit des GABAA-Rezeptors auf dem Chromosom 4p12.

1.2.4.1. GABRA2-Methylierung

Die unten aufgezeigte Grafik zeigt eine Hypothese der GABRA2-modulierenden epigenetischen Mechanismen:

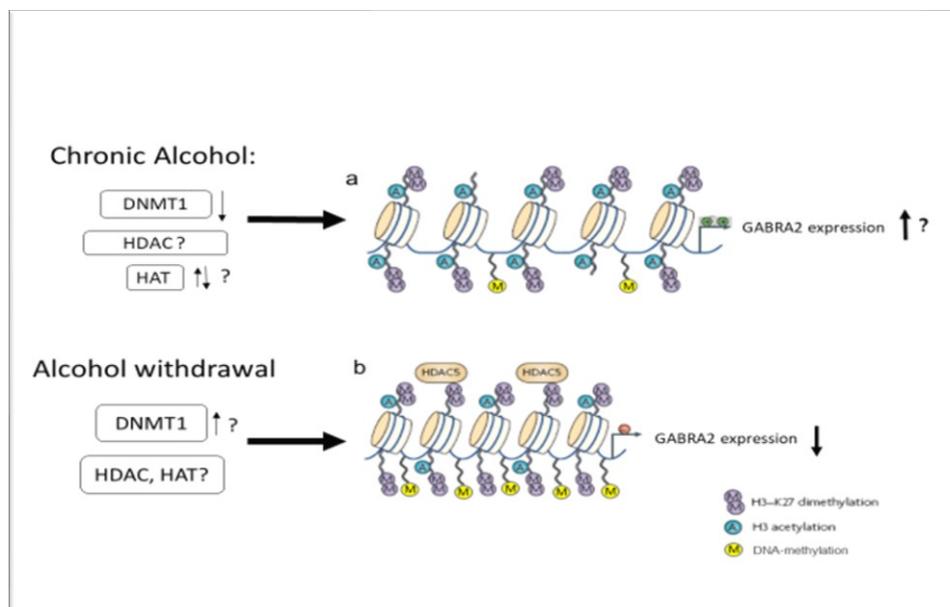


Abbildung 5: Physiologie modulierende epigenetische Mechanismen GABRA2 – Hypothesen.

DNMT: DNA-Methyltransferasen; HDAC: Histon-Deacetylasen; HAT: Histon-Acetyltransferasen

a: Chronischer Alkoholkonsum: GABRA2-Rezeptor-Gen aktiv bzw. GABRA2-Expression, d.h. das Gen ist hyperacetyliert und hypomethyliert.

b: Alkoholentzug: GABRA2 wird weniger exprimiert, durch erhöhte Histonmethylierung bedingt durch HDAC- und HAT- Modulation sowie erhöhte DNA Methylierung durch verstärkte DNMT1 Aktivität (Hypermethylierung).

1.3. Alkoholabhängigkeit und GABRA2-Rezeptorgen

GABRA2-Varianten sind wiederholt mit dem Risiko der Alkoholabhängigkeit in Verbindung gebracht worden (Preuss et al. 2022). Es wird angenommen, dass GABAA-Rezeptoren einige der physiologischen und verhaltensbezogenen Wirkungen von Alkohol vermitteln (Koulentaki und Kouroumalis 2018). Alkohol bindet an den GABAA-Rezeptor, produziert dadurch viele Effekte und führt z.B. zu einer Hyperpolarisation, wodurch die Aktionspotenzialfrequenz abnimmt. Klinisch dürfte die GABAerge Wirkung von Alkohol für Sedation, Anxiolyse, Störungen der Koordination, epileptische Anfälle und Entzugserscheinungen von Bedeutung sein. (Soyka und Kufner 2008).

Die GABA-Aktivität in der Amygdala ist durch die Exposition mit Alkohol verbessert und dann während des Alkoholentzugs verringert. Eine chronische Verabreichung von Ethanol, die ausreicht, um eine Abhängigkeit zu erzeugen, und eine erhöhte Ethanolaufnahme sind mit einer erhöhten GABA-Freisetzung in der Amygdala und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber GABA-Agonisten verbunden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass GABAerge Interaktionen mit dem Hirnstress-Neurotransmitter Corticotropin-Releasing-Faktor in spezifischen Elementen der erweiterten Amygdala eine wichtige Komponente für die Motivation zu exzessivem Trinken sein könnten, die mit dem Übergang vom sozialen Trinken zur Sucht verbunden ist (Koob 2004).

Tian und Kollegen zeigten, dass GABAA-Rezeptoren Ziele mehrerer wichtiger Medikamente, einschließlich Benzodiazepine sind, die als Anxiolytika, Sedativa, Antikonvulsiva und bei der Behandlung von Alkoholentzugssymptomen eingesetzt werden. Nicht-kodierende Variationen in GABRA2, also das Gen, das die alpha2-Untereinheit kodiert, sind mit dem Risiko für Alkoholismus assoziiert, was darauf hindeutet, dass regulatorische Unterschiede wichtig sind (Tian et al. 2005).

Nieratschker sowie Baumgartel und Kollegen machten z.B. eventuelle umwelt-assoziierte Gen-Interaktionen und subsegmentale Methylierungsveränderungen dafür verantwortlich: Gen-Umwelt-Interaktionen können durch epigenetische Mechanismen vermittelt werden. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Alkoholkonsum ein Umweltfaktor ist, der epigenetische Signaturen und damit verbundene Genexpressionsniveaus verändern kann (Nieratschker et al. 2013, Baumgartel et al. 2011).

1.4. Fragestellung

Die Aufgabe der vorliegenden Dissertation war die epigenetische Untersuchung und Analyse der Methylierung des GABRA2-Rezeptorgens bei Alkoholabhängigen. Dafür stand eine Stichprobe von 85 alkoholabhängigen Patienten und 77 gesunden Kontrollprobanden zur Verfügung.

Da es bislang wenig bis keine Untersuchungen zu epigenetischen Mechanismen im GABAergen System bei Alkoholismus gibt, wurden folgende Fragestellungen analysiert:

1. Gibt es einen Unterschied der DNA-Methylierungsmuster im Promotorbereich des GABRA2-Rezeptorgens zwischen alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden?
2. Gibt es einen Unterschied der Methylierung der 27 einzelnen GABRA2-CpG-Motive beider Gruppen im Vergleich?
3. Wie verhält es sich mit dem mittleren Prozentsatz und der Anzahl der methylierten GABRA2-CpG-Stellen zwischen alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden?
4. Wie beeinflusst das Alter, das Geschlecht und der Raucherstatus die Methylierung des GABRA2-Gens?
5. Beeinflusst die maximale und tägliche Trinkmenge das GABRA2-Methylierungsmuster?
6. Gibt es einen Einfluss von der Dauer der Alkoholabhängigkeit und dem körperlichen Entzug auf das GABRA2-Methylierungsmuster?

2. Material und Methoden

2.1. Studienteilnehmer

2.1.1. Probanden

Es wurden stationäre alkoholabhängige Patienten der Suchtbehandlungsstation der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München rekrutiert.

Personen, die eine chronische oder akute Achse I-Störung außer Alkohol- und Nikotinabhängigkeit hatten, wurden ausgeschlossen. Das Universitätsklinikum bot ein

stationäres „qualifiziertes Entgiftungsbehandlungsprogramm“ an, welches eine somatische Entgiftung, Individual- und Gruppen-Psychotherapie, Beratung für soziale und finanzielle Probleme und ebenso eine somatische medizinische Versorgung für 15 Tage enthielt. Dieser Ansatz steht mit den deutschen S3-Leitlinien für stationäre Behandlung im Einklang (Mann et al. 2017). Alle Individuen wurden nach kompletter Entgiftung und abgesetzter Entzugsmedikation (Oxazepam) rekrutiert. Zum Zeitpunkt der Rekrutierung wurden die Patienten nicht mehr psychopharmakologisch behandelt. Alle Patienten waren nicht verwandt, deutscher Abstammung, älter als 18 Jahre und erfüllten die ICD-10 und die DSM-IV-Kriterien der Alkoholabhängigkeit. Zusätzlich wurden sie mit einem strukturierten und standardisierten klinischen Gespräch SSAGA (Semi-Structured Assessment on the genetics in alcoholism) bewertet (Bucholz et al 1994).

Die demografischen Variablen und klinischen Parameter sind in nachfolgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 3: Demografische Variablen und klinische Merkmale der alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen

	<i>ALC</i>	<i>CON</i>	<i>p</i>
Geschlecht n (männl. /weibl.)	50/35	40/37	0,38
Alter (in Jahren, $\bar{x} \pm$ Std.-Abw.)	46,63 \pm 12,66	46,61 \pm 15,65	0,81
Rauchen jemals (%)	70,6	k.A.	
Mittlerer tägl. Alc-Konsum vor Aufnahme (g/d)	226,47 \pm 135,88		
Erkrankungsalter (in Jahren, $\bar{x} \pm$ Std.-Abw.)	32,16 \pm 11,95		
Abhängigkeitsdauer (in Jahren, $\bar{x} \pm$ Std.-Abw.)	14,37 \pm 10,56		
Anzahl akt. Entzugssymptome n	2,24 \pm 3,03		
Anzahl pos. DSM IV-Kriterien (n, $\bar{x} \pm$ Std.-Abw.)	5,91 \pm 1,34		
Maximaler Alkoholkonsum jemals (g/d)	506,40 \pm 382,95		

N: Anzahl; \bar{x} : Durchschnitt; Std.-Abw.: Standardabweichung; g/d: Gramm/Tag; p: Signifikanz (T-Test, Man-Whitney-U, χ^2 -Test)

Die Blutproben wurden nach 15 Tagen stationärer Behandlung abgenommen.

Die sachkundige schriftliche Zustimmung wurde von allen Patienten und Kontrollen nach vollständiger und umfassender Aufklärung über die Studie eingeholt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der LMU München geprüft und genehmigt sowie in Übereinstimmung mit der Helsinki-Deklaration (1964) durchgeführt.

2.1.2. Kontrollgruppe

Die Kontrollpersonen entstammten aus verschiedenen Orten der Allgemeinbevölkerung (z.B. Bibliotheken, Straßenbaustellen und Kaufhäuser). Diese Individuen repräsentierten eine Reihe von sozialen Klassen, von Hochschulabsolventen bis zu ungelerten Arbeitern. Alle Kontrollpersonen wurden umfassend bewertet, um medizinische und psychische Erkrankungen (einschließlich Achse I/II-Störungen) sowie Schizophrenie, Depressionen, Persönlichkeitsstörungen und jedwede Alkohol- und Substanzmissbräuche auszuschließen. Personen, die eine chronische Achse-I-Störung, Substanzmissbrauch – ausgenommen Nikotin – oder andere physische Erkrankungen aufzeigten, kamen nicht in die Gruppe. Die Menge des Alkoholkonsums im letzten Monat sowie der Raucherstatus wurden bewertet. Keine der Personen waren miteinander verwandt, alle waren deutscher Abstammung und verneinten Verwandte ersten Grades mit psychischen Störungen.

2.2. DNA-Präparation

Sämtliche Laborarbeiten wurden im Labor für Molekulare Neurobiologie, Sektion Epigenetik (Leiter: PD Dr. Peter Zill) der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München durchgeführt.

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

2.3. Promotor CpG-Insel Analyse

Zur Identifikation einer möglichen CpG-Insel wurde eine Region mit 10020 bp (-6334/+3686, bezogen auf die Startseite der ATG-Übersetzung von Transkriptionsvariante 1), die den mutmaßlichen Promotor und das Exon 1 der Transkriptionsvariante 1 des GABRA2-Gens enthielt, ausgewählt (NT_006238.12: nt 13546001 to 13556021). Die CpG-Inselanalyse wurde mit dem CpG-Island-Searcher durchgeführt (<http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx>) (Takai und Jones 2003).

Hier erfolgte die Definition der CpG-Inseln als eine Region mit mindestens 500bp, mit einem GC-Prozentsatz von mehr als 60 % und mit einem beobachteten/erwarteten CpG-Verhältnis von mehr als 65 %.

2.4. Bisulfit-Sequenzierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Vollblut von Patienten und Kontrollpersonen extrahiert. Die peripheren DNA-Proben von Patienten und Kontrollpersonen stammten aus mehreren genetischen Projekten. Daher waren keine Zellzahlen zur Unterscheidung der verschiedenen mononukleären Blutzellen verfügbar.

Anschließend wurden 750 ng genomische DNA unter Verwendung des EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben mit Natriumbisulfit behandelt und die DNA anschließend über Silica Säulen aufgereinigt.

Vier Oligonukleotid-(Primer-)Sets wurden entworfen um die CpG-Inselregion (-2095 bis -876, bezogen auf die Startseite der ATG-Übersetzung von Transkriptionsvariante 1) in überlappenden Fragmenten zu amplifizieren. Der Bereich zwischen -1468 bis -1079 (31 CpG-Stellen) konnte nicht PCR-amplifiziert werden, da sich nach der Bisulfatbehandlung sehr lange T-Sequenzbereiche ausbildeten, die das Design geeigneter PCR-Primer verhinderten.

Die Sequenzierung der einzelnen Fragmente zeigte ausschließlich im PCR-Fragment von Primer-Set 2 einen hohen Grad an DNA-Methylierung. Daher bezieht sich die folgende Methodenbeschreibung nur auf Primer-Set 2.

Beide Primer enthielten an ihrem 5'-Ende universelle Primer-Sequenzen, um die Sequenzierung zu erleichtern. Die folgenden Sequenzen wurden für Primer-Set 2 verwendet: Vorwärts-Primer (NT_006238.12: -1843/-1821, bezogen auf die Startseite der ATG-Übersetzung von Transkriptionsvariante 1): 5'-M13(-21)-TTT ATA GTA GGG TGA TGT TGG GG-3'; Rückwärts-Primer (NT_006238.12: -1554/-1533, bezogen auf die Startseite der ATG-Übersetzung von Transkriptionsvariante 1): 5'-M13(-29)-TCC CTC RAT CCC TAA CTA A-3'.

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl, das 1 µl Bisulfit-behandelte DNA, 200 µM jedes dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate), 5 mM MgCl₂, 2 µl Q-Lösung, 0,5 µM des Vorwärts- und Rückwärtsprimers und 0,5 Einheiten (Units) Taq-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) enthielt. Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Min. wurde ein erster Zyklus von fünf Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 30 Sek., Primer Anlagerung bei 58°C für 90 Sek. und Verlängerung bei 72°C für 120 Sek. durchgeführt. Der zweite PCR-Zyklus bestand aus 35 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 30 Sek., Primer Anlagerung bei 54°C für 90 Sek. und Verlängerung bei 72°C für 90 Sek.. Ein letzter Schritt erfolgte bei 72°C für 5 Min., um alle PCR-Stränge zu vervollständigen. Die PCR-

Produkte wurden nach Standardprotokollen (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durch SAP (shrimp alkaline phosphatase)-Behandlung gereinigt.

50ng (Nanogramm) des gereinigten PCR-Produkts wurden für die Sequenzierung mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in einem Endvolumen von 20µl verwendet, das 3µl Reaktionsmix und 0,16µM Primer enthielt.

Die Ergebnisse wurden durch bidirektionale Sequenzierung verifiziert. Die Zyklusbedingungen waren: 35 Zyklen Denaturierung bei 96°C für 10 Sek., Primer Anlagerung bei 50°C für 5 Sek. und Verlängerung bei 50°C für 4 Min.. Die amplifizierten Produkte wurden mit Ethanol/EDTA gereinigt. Die Sequenzierung der Proben erfolgte auf einem Kapillar-Sequenziergerät ABI 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Daten wurden mit Hilfe der Sequenzierungssoftware Version 5.3.1 unter Anwendung des KB-Base Caller 1.3 verarbeitet (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Die Methylierungsfrequenz von Cytosin an jeder CpG-Insel ist durch den Vergleich der Peakhöhe des Cytosin-Signals mit der Summe der Cytosin- und Thymidin-Peakhöhensignale berechnet worden, wie von Melki und Kollegen beschrieben (Melki et al. 1999). Die Validierung dieser Methode erfolgte durch Jiang und Kollegen, die nach einem Vergleich mit der Pyrosequencing- und Bilsulfatcloning-Sequenzierung bestätigen konnten, dass diese Verfahrensweise eine einfache und Hochdurchsatz-Methode ist, sowie eine zuverlässige Technologie zur Bestimmung des Methylierungsstatus spezifischer Gene darstellt. Bei der Verwendung der direkten Sequenzierung ist es jedoch oft schwierig Methylierungsniveaus <15 % aufgrund des variablen Sequenzierungshintergrundsignals zu beurteilen. So wurden CpG-Inseln mit Verhältnisbereichen von 0,00–0,02 als unmethyliert (0 %) und Bereiche zwischen 0,81–1,00 als vollständig methyliert (100 %) betrachtet. Für den Verhältnisbereich zwischen 0,21–0,80 sind die kalkulierten Frequenzen verwendet worden (Jiang et al. 2010).

2.5. Statistische Analyse

Nachfolgende statistische Analysen der klinischen und epigenetischen Datenergebnisse sind unter Verwendung von IBM SPSS Statistics Version 26 für Windows 10 durchgeführt worden. Zusätzlich wurde zur Berechnung der MPGS (mittlerer Prozentsatz der methylierten CpGs) Excel für Windows 10, in der Microsoft Office Standard Version 2019 verwendet.

Das Signifikanzniveau wurde in dieser Analyse auf 5 % angelegt, somit ergeben sich interpretierbare Ergebnisse bis zu einem p -Wert von $< .05$.

Um verschiedene Zusammenhänge darzustellen wurde je ein t-Test für unabhängige Stichproben gerechnet. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests ermittelt. Eine Diagnose über Ausreißerfreiheit wird über eine visuelle Inspektion von Boxplots vorgenommen. Die Annahme der Varianzhomogenität wird durch den Levene-Test ermittelt. War die Annahme der Normalverteilung nicht gegeben, wurde als nicht-parametrisches Äquivalent der Mann-Whitney-U Test berechnet. Für die Überprüfung kategorialer Variablen wurden Chi²-Tests und der exakte Test nach Fisher zur Auswertung herangezogen. Zusätzlich wurde zur Vorbereitung der Hypothesentestung die Korrelationsanalyse nach Spearman angewendet, um die Korrelationen zwischen zwei Variablen zu beleuchten. Die Methode nach Pearson wurde eingesetzt, wenn lineare Skalenniveaus vorlagen. Sofern mindestens ein ordinalskaliertes Skalenniveau vorlag, wurde die Methode nach Spearman oder Kendall-Tau angewendet (Embrechts, Lindskog & Mcneil, 2001; Universität Zürich).

Aufgrund der ordinalskalierten Skala des Alters, wird in der vorliegenden Arbeit auf das Verfahren zur Berechnung der Korrelation nach Spearman zurückgegriffen. Dabei ist die Messgröße der Korrelationskoeffizient (ρ). Der Korrelationskoeffizient liefert eine Aussage über die Beziehung zwischen zwei linearen Variablen, jedoch nicht, ob es sich um einen kausalen Zusammenhang handelt.

Mit einer Linearen Regressionen wurde berechnet, welchen Effekt unabhängige Variablen auf eine entsprechend abhängige Variable haben. Hierbei zeigte das R , der Korrelationskoeffizient, ob es einen Zusammenhang zwischen den getesteten unabhängigen Variablen und der abhängigen Variablen gab. Das R^2 , der Determinationskoeffizienten (Cohen 1988), gab dagegen an, wie hoch die Varianzaufklärung der abhängigen Variablen war. Zuletzt wurde ANOVA verwendet, um auszusagen, ob das Modell an sich signifikant geschätzt wurde. Bei positiver Ausprägung des Regressionskoeffizienten war der Effekt positiv, im Falle einer negativen Ausprägung des Koeffizienten, war der Effekt der unabhängigen auf die abhängige Variable negativ.

Mithilfe der logistischen Regression wurden die Odds Ratios der abhängigen Variable und deren Eintreten bzw. Nicht-Eintreten berechnet. Hierbei wurden Odds, die größer 1 waren eher für das Eintreten, Odds kleiner 1 eher für das Nicht-Eintreten definiert. Odds Ratios nahe der 1 wurden als ein nahezu gleich großes Verhältnis von Wahrscheinlichkeit zur Gegenwahrscheinlichkeit interpretiert.

Die Interpretation von Nagelkerkes R^2 (Nagelkerke 1991), abgewandelt nach Backhaus und Kollegen (Backhaus et al. 2006) stellte sich wie folgt dar: akzeptabel (kleiner Effekt) $R^2 > .2$; gut (mittlerer Effekt) $R^2 > .4$; sehr gut (großer Effekt) $R^2 > .5$.

Zusätzlich wurde auch der Hosmer-Lemeshow Test berechnet. Sofern das Ergebnis des Tests nicht signifikant war, konnte von einer hohen Anpassungsgüte ausgegangen werden.

Der Methylierungsgrad der CpG-Insel wurde als der durchschnittliche Prozentsatz an methylierten Cytosinen aus den untersuchten 27 CpG-Dinukleotide in der GABRA2-Promotor-Region definiert. Darüber hinaus sind Variablen wie „allgemeine Methylierung der GABRA2 CpGs“ (Methylierung ja/nein, AGM), die „mittlere Anzahl von methylierten GABRA2 CpGs“ (n, NMGS) sowie der „mittlere Prozentsatz von methylierten CpGs“ (percent, MPGS) in die Analyse eingeschlossen worden.

3. Ergebnisse

3.1. Die Probanden und Kontrollpersonen

3.1.1. Demografische Daten

Es wurden $n = 85$ alkoholabhängige Individuen und $n = 77$ gesunde Kontrollpersonen untersucht. Unter den Alkoholikern fanden sich $n = 50$ Männer und $n = 35$ Frauen, unter den Kontrollpersonen $n = 40$ Männer und $n = 37$ Frauen. Insgesamt sind $n = 162$ Personen beider Geschlechter getestet worden (Tabelle 4 + Abbildung 6). Es wurde ein χ^2 -Test für die Signifikanz des Geschlechts der Alkoholiker bzw. der Kontrollen durchgeführt. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Ausprägungen der Variablen ($\chi^2(1) = .773, p = .379$) (Tabelle 5).

Tabelle 4: Verteilung der Gruppen nach Geschlecht

Alkoholiker und Kontrollen * Geschlecht

		Geschlecht		Gesamt
		Männlich	Weiblich	
Alkoholiker oder Kontrollen	Alkoholiker	50	35	85
	Kontrollen	40	37	77
Gesamt		90	72	162

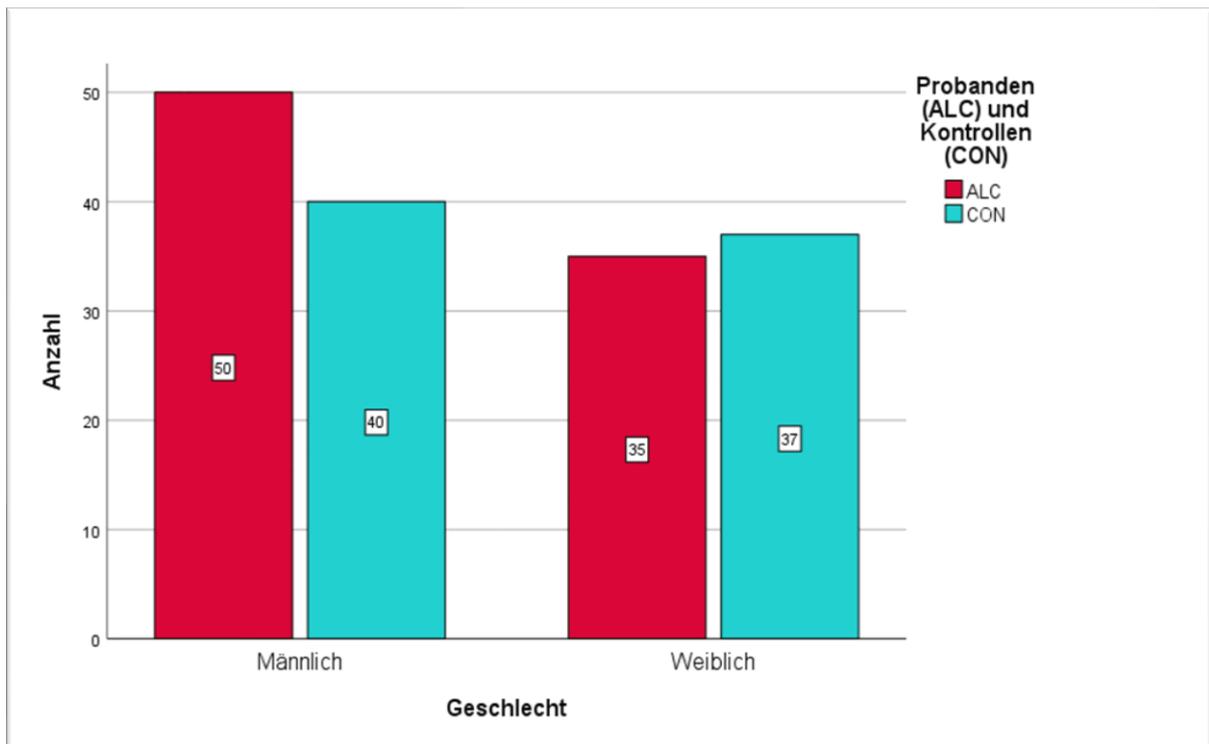


Abbildung 6: Verteilung der Gruppen nach Geschlecht

Tabelle 5: Chi²-Test für Geschlecht

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	.773a	1	.379		
Kontinuitätskorrektur b	.520	1	.471		
Likelihood-Quotient	.774	1	.379		
Exakter Test nach Fisher				.430	.235
Zusammenhang linear-mit-linear	.769	1	.381		
Anzahl der gültigen Fälle	162				

a. 0 Zellen (.0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 34.22.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Symmetrische Maße

		Wert	Näherungsweise Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi	.069	.379
	Cramer-V	.069	.379
Anzahl der gültigen Fälle		162	

Auch in Bezug auf das Alter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen alkoholabhängigen Individuen und gesunden Kontrollpersonen festgestellt ($U = 2652.500$, $p = .061$; $U = 3164.50$, $p = .814$) (Tabellen 6 + 7).

Bei den Kontrollpersonen zeigten sich tendenziell zwei Höhepunkte zwischen 20 und 30 Jahren und 60 und 70 Jahren. Das Durchschnittsalter lag aber bei beiden Gruppen zwischen $M = 46$ und $M = 47$ Jahren (Abbildung 7: Mittelwert Alter ALC = 46.63; CON = 46.61).

Tabelle 6: Mann-Whitney-U-Test für Alter bzgl. Geschlecht

	Alter
Mann-Whitney-U-Test	2652.500
Wilcoxon-W	6657.500
Z	-1.876
Asymp. Sig. (2-seitig)	.061

a. Gruppenvariable: Geschlecht

Tabelle 7: Mann-Whitney-U-Test für Alter bzgl. Gruppenverteilung

	Alter
Mann-Whitney-U-Test	3164.500
Wilcoxon-W	673.500
Z	-.235
Asymp. Sig. (2-seitig)	.814

a. Gruppenvariable: ALC od. CON

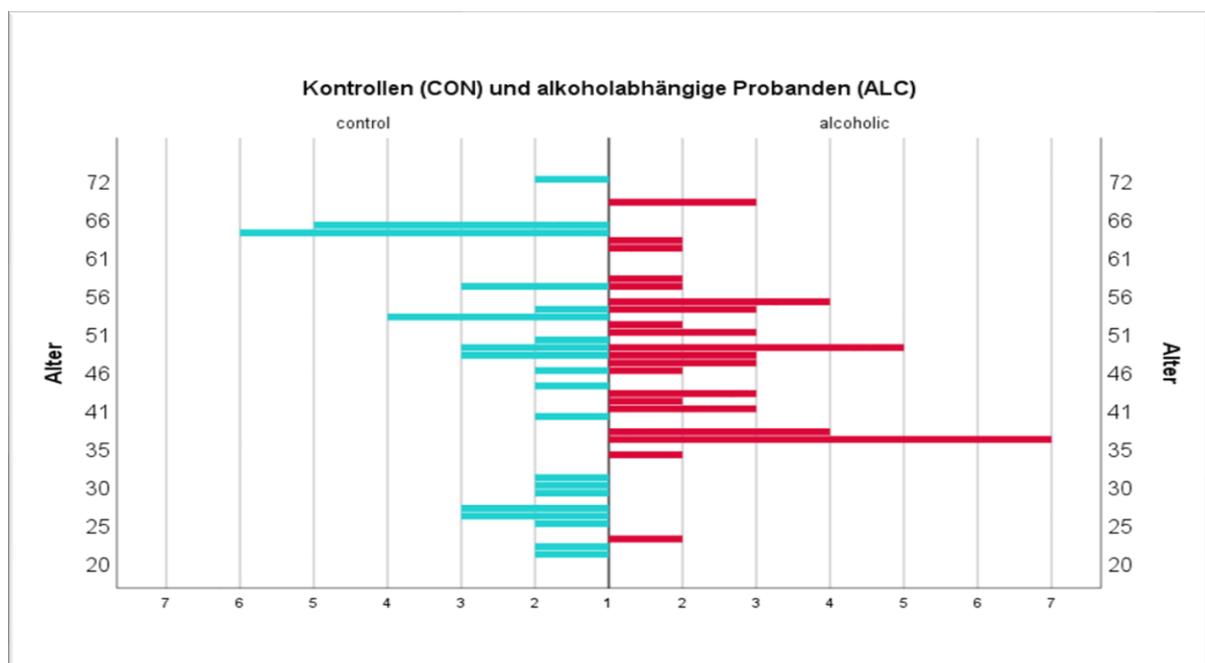


Abbildung 7: Altersverteilung Kontrollen und Probanden

3.1.2. Klinische Beschreibung

3.1.2.1. Tabakkonsum

Die alkoholabhängigen Probanden hatten eine signifikant höhere Rate an permanentem Tabakkonsum.

Insgesamt fanden sich unter den Patienten über 70 % ($n = 60$) Raucher oder Personen, die im Laufe ihres Lebens Tabak konsumiert hatten, wobei die Männer ($n = 38, 63.3\%$) deutlich häufiger rauchten als die Frauen ($n = 22, 36.7\%$) (Tabelle 8 + 9). Der Chi²-Test zeigte dabei allerdings keine Signifikanz ($X^2(1) = 1.190, p = .275$) (Tabelle 10).

Tabelle 8: Raucher jemals bei alkoholabhängigen Probanden

Raucher jemals bei ALC

		Häufigkeit	In Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Kein Raucher	22	25.9	26.8	26.8
	Raucher	60	70.6	73.2	10.0
	Gesamt	82	96.5	100.0	
Fehlend	System	3	3.5		
Gesamt		85	100.0		

Tabelle 9: Raucherstatus nach Geschlecht bei alkoholabhängigen Probanden

Raucherstatus nach Geschlechtern

			Geschlecht		Gesamt
			Männlich	Weiblich	
Raucher jemals	Kein Raucher	Anzahl	11	11	22
		% von Raucher jemals	50.0%	50.0%	100.0%
		% von Geschlecht	22.4%	33.3%	26.8%
	Raucher	Anzahl	38	22	60
		% von Raucher jemals	63.3%	36.7%	100.0%
		% von Geschlecht	77.6%	66.7%	73.2%
Gesamt		Anzahl	49	33	82
		% von Raucher jemals	59.8%	40.2%	100.0%
		% von Geschlecht	100.0%	100.0%	100.0%

Tabelle 10: Chi²-Test für Raucherstatus nach Geschlecht bei alkoholabhängigen Probanden

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	1.190a	1	.275		
Kontinuitätskorrektur b	.700	1	.403		
Likelihood-Quotient	1.177	1	.278		
Exakter Test nach Fisher				.316	.201
Zusammenhang linear-mit-linear	1.176	1	.278		
Anzahl der gültigen Fälle	82				

a. 0 Zellen (.0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 8.85.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

3.1.2.2. Tägliche und maximale Trinkmenge

Bezüglich der täglichen und maximalen Trinkmenge der alkoholkranken Individuen fiel ebenfalls auf, dass die Männer im Schnitt mehr tranken.

Die durchschnittliche tägliche Trinkmenge bei Männern lag zwischen 50 g und 640 g, die der Frauen zwischen 60 g und 380 g. Die maximale Trinkmenge bei Männern erstreckte sich bis zu 2000 g pro Tag, bei Frauen „nur“ bis zu 820 g pro Tag (Abbildungen 8 + 9).

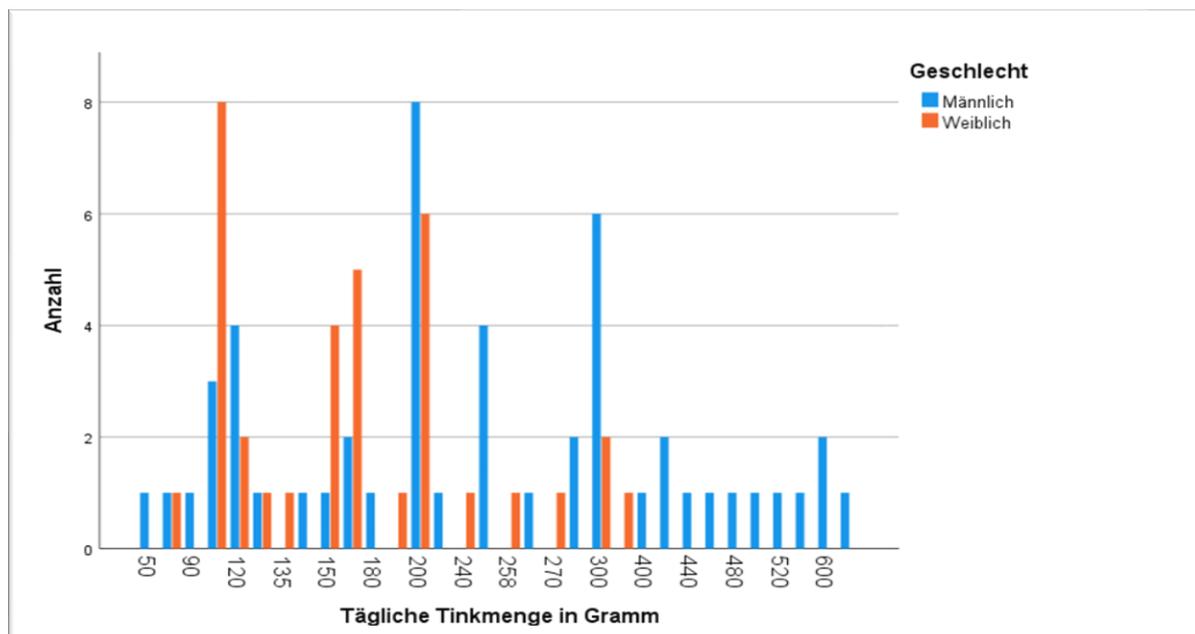


Abbildung 8: Tägliche Trinkmenge alkoholabhängiger Probanden

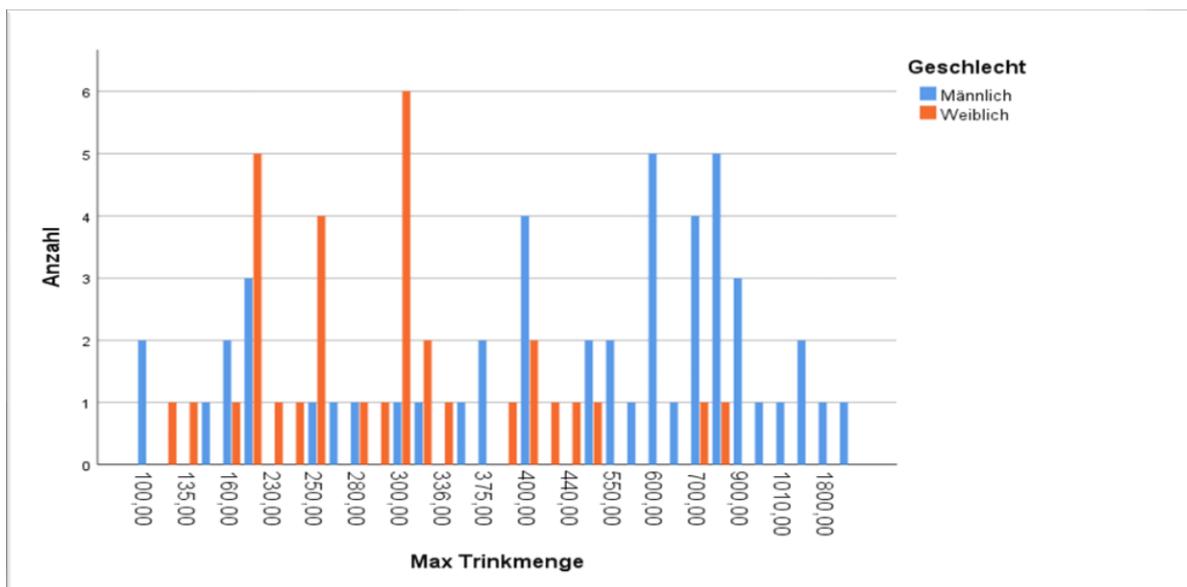


Abbildung 9: Maximale Trinkmenge alkoholabhängiger Probanden

3.2. GABRA2-Methylierungen

3.2.1. CpG-Inselanalyse

Die CpG-Inselanalyse einer 10020 bp großen Region im GABRA2-Gen, welche die mutmaßliche Promotorsequenz und Exon 1 der Transkriptionsvariante 1 enthält, zeigte eine 1219 bp CpG-Insel (-2095 bis -876, bezogen auf die Startseite der ATG-Translationsstelle 1 der Transkriptionsvariante 1). Nach der Bisulfit-Sequenzierung konnte eine intensive Methylierung zwischen Nukleotid -1843 bis -1533 nachgewiesen werden. In den anderen sequenzierten Teilen der CpG-Insel gab es keine bzw. sehr wenige, vernachlässigbare Methylierungen. Daher beziehen sich die folgenden Analysen und Bewertungen auf die methylierte Region von Nukleotid -1843 bis -1533. Diese Region enthält 30 CpG-Stellen, 27 von ihnen konnten durch Sequenzierung analysiert werden (Abbildung 10).

```

-1892 ttgccctcca gcaggagcgg aacctcttta cctcttagca gccacgtcgc tccacagtag
-1832 ggtgatgttg ggggacgggc ggcagggcgc ggccccaggg atctagggca tcaccgccac
-1772 actacattcc cggtttaca ccaacacca acagcagctc tgtcaggaac cttggggcct
-1712 ctcgggagcc ccagcaagcg gcctcgggga gcagcccagag gctgcgcgtg ggctccgctc
-1652 ctccggcgag gtgtgggcga ggggagcggc gctccgagcg cacccagggc cccgacgccg
-1592 cccgggtctg cgccgctgct agtgccaggc gggcgacggt cagttaccag ggatcgaggg
-1532 atcgaggcag gggagtgtgt gtgtgtgggg gggggggagg ggggggaggg ggggccctgc

```

Abbildung 10: Sequenz der (-1843/ -1533) Region (kursiv, unterstrichen) einschließlich der 27 untersuchten CpG-Dinukleotide (fett).

3.2.2. Methylierungsmuster

Die Untersuchung des DNA-Methylierungsmusters in der 5'-Region des GABRA2-Gens erfolgte in peripherer Leukozyten-DNA aus dem Blut von 85 alkoholabhängigen Probanden und 77 Kontrollen.

3.2.2.1. Allgemeine Methylierung der GABRA2-CpG-Inselregion

Es konnte ein signifikanter Unterschied der generellen DNA-Methylierungsfrequenz zwischen alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen festgestellt werden. Die Kontrollgruppe zeigt einen signifikant höheren Methylierungsgrad die Patienten ($\chi^2 (1) = 6.463, p < 0.05, V = .200$) (Tabelle 11). Diese allgemeine Hypomethylierung der untersuchten GABRA2-CpG-Inselregion verdeutlicht folgende Abbildung (Abbildung 11).

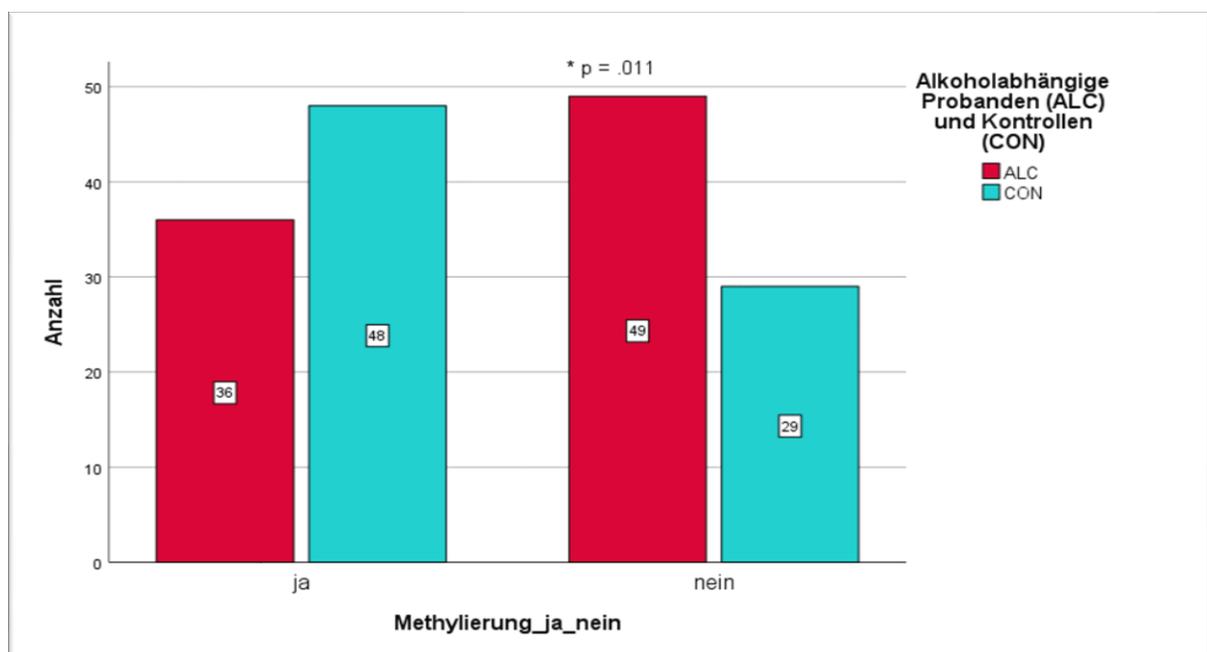


Abbildung 11: Allgemeine Methylierung der GABRA2-Inselregion bei alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen

Tabelle 11: Chi²-Test für die Unterschiede der allgemeinen Methylierung innerhalb der GABRA2-Inselregion zwischen Patienten und Kontrollen

Methylierung_ja_nein *alkoholabh. Probanden und Kontrollen

Anzahl	Probanden od. Kontrollen		
	ALC	CON	Gesamt
Methylierung_ja_nein ja	36	48	84
nein	49	29	78
Gesamt	85	77	162

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische		
			Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	6.463 ^a	1	.011		
Kontinuitätskorrektur b	5.687	1	.017		
Likelihood-Quotient	6.511	1	.011		
Exakter Test nach Fisher				.012	.008
Zusammenhang linear-mit-linear	6.423	1	.011		
Anzahl der gültigen Fälle	162				

a. 0 Zellen (.0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 37.07.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Symmetrische Maße

		Näherungsweise	
		Wert	Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	-.200	.011
Nominalmaß	Cramer-V	.200	.011
Anzahl der gültigen Fälle		162	

3.2.2.2. Methylierung der 27 einzelnen CpG-Stellen in der GABRA2-CpG-Insel

Zusätzlich ergaben gruppenübergreifende Vergleiche signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen einzelnen GABRA2-CpG-Methylierungsstellen, wie in den folgenden Grafiken dargestellt (Abbildungen 12-14, Tabelle 12). Von den 27 CpG-Stellen waren vier bei alkoholabhängigen Personen überhaupt nicht methyliert, statistisch signifikant hypomethyliert war die CpG-Stelle 22 und grenzwertig signifikant hypomethyliert waren die CpG-Stellen 15,17 und 23. CpG 25 war bei den Patienten prozentual deutlich und die Stellen 1 bis 5 waren im Mittel höher methyliert als bei den Kontrollen. Alle übrigen CpG-Stellen waren bei den alkoholabhängigen Probanden mehr oder weniger signifikant hypomethyliert.

Insgesamt ließ sich auch hier eine signifikante, prozentuale Hypomethylierung der einzelnen GABRA2-CpG-Stellen bei den alkoholabhängigen Probanden ableiten.

Tabelle 12: Methylierung der einzelnen CpG-Stellen bei Patienten und Kontrollen (Mittelwerte)

CpG-Stelle	Mann-Whitney Statistik	Signifikanz	Mittelwert /SD* Patienten	Mittelwert /SD* Kontrollen
1	21.00	0.048	47.88 (14.30)	36.36 (10.31)
2	198.50	0.906	46.07 (20.05)	44.24 (14.32)
3	96.00	0.347	40.92 (10.09)	38.50 (13.26)
4	119.50	0.544	38.38 (9.94)	37.81 (12.75)
5	404.00	0.744	40.56 (17.17)	38.65 (13.99)
6	3.00	0.696	32.00 (/)	50.00 (19.82)
7	/	/	/	41.80 (15.14)
8	7.50	0.241	26.67 (2.89)	37.00 (16.91)
9	/	/	/	39.00 (19.80)
10	/	/	/	42.00 (15.65)
11	/	/	/	31.78 (7.81)
12	2.00	0.614	29.00 (/)	36.17 (10.78)
13	2.00	0.099	24.67 (4.16)	35.00 (11.73)
14	36.00	0.115	28.00 (7.35)	33.93 (11.34)
15	0.00	0.053	26.00 (1.41)	52.60 (13.47)
16	7.00	0.434	27.00 (2.45)	33.60 (13.87)
17	14.50	0.052	25.80 (2.39)	34.36 (11.23)
18	10.50	0.161	30.80 (6.65)	44.00 (16.35)
19	10.00	0.839	30.00 (0.00)	35.18 (10.97)
20	179.00	0.497	31.59 (7.27)	35.58 (11.90)
21	184.50	0.833	28.25 (5.07)	30.46 (8.84)
22	17.50	0.026	28.75 (7.44)	40.64 (12.90)
23	20.00	0.057	26.71 (2.36)	36.75 (12.40)
24	275.00	0.916	32.10 (7.14)	35.04 (13.89)
25	8.00	0.462	65.00 (49.50)	40.50 (14.25)
26	384.50	0.236	34.61 (15.16)	38.80 (16.63)
27	134.50	0.663	28.79 (5.94)	31.81 (11.29)

*SD=Standard-Abweichung

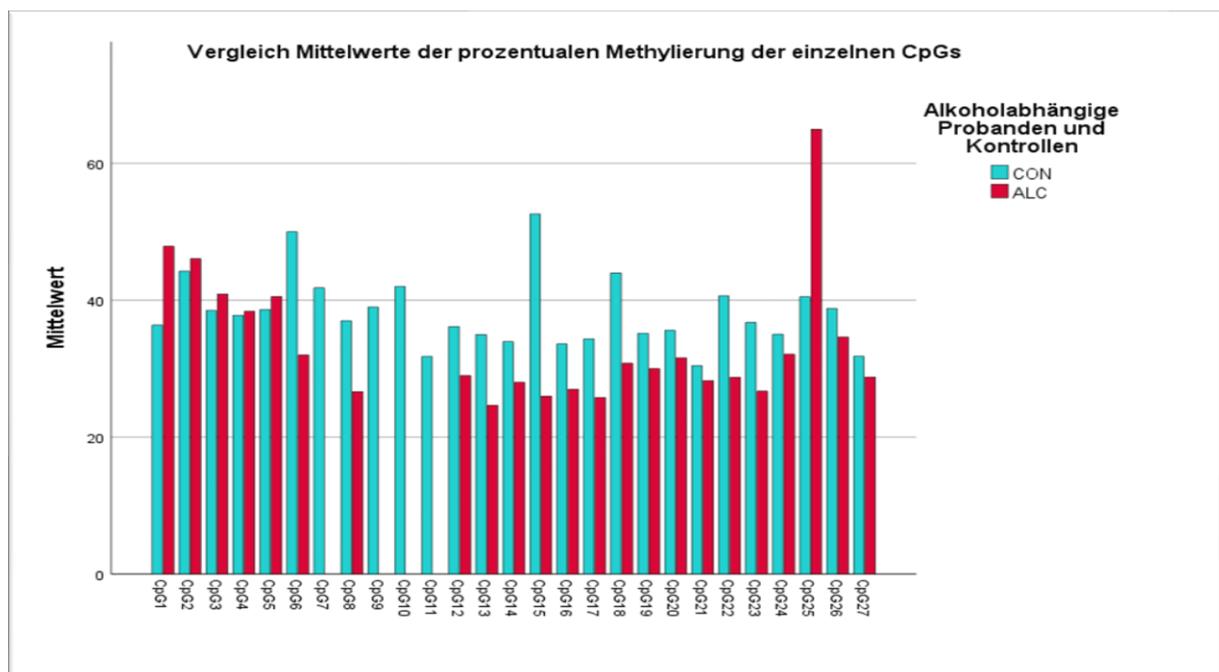


Abbildung 12: Mittelwerte prozentuale Methylierung der CpG-Stellen bei alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen

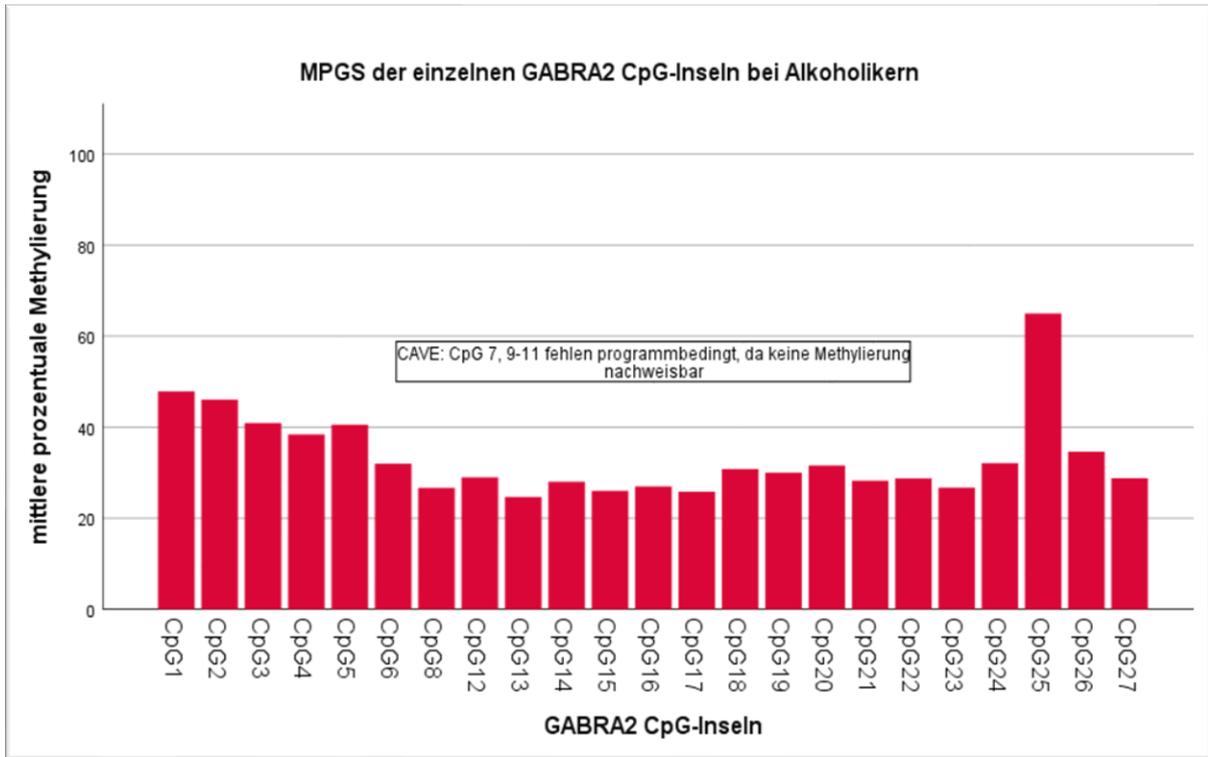


Abbildung 13: **mittlere prozentuale Methylierung GABRA2-CpG-Stellen bei Patienten**

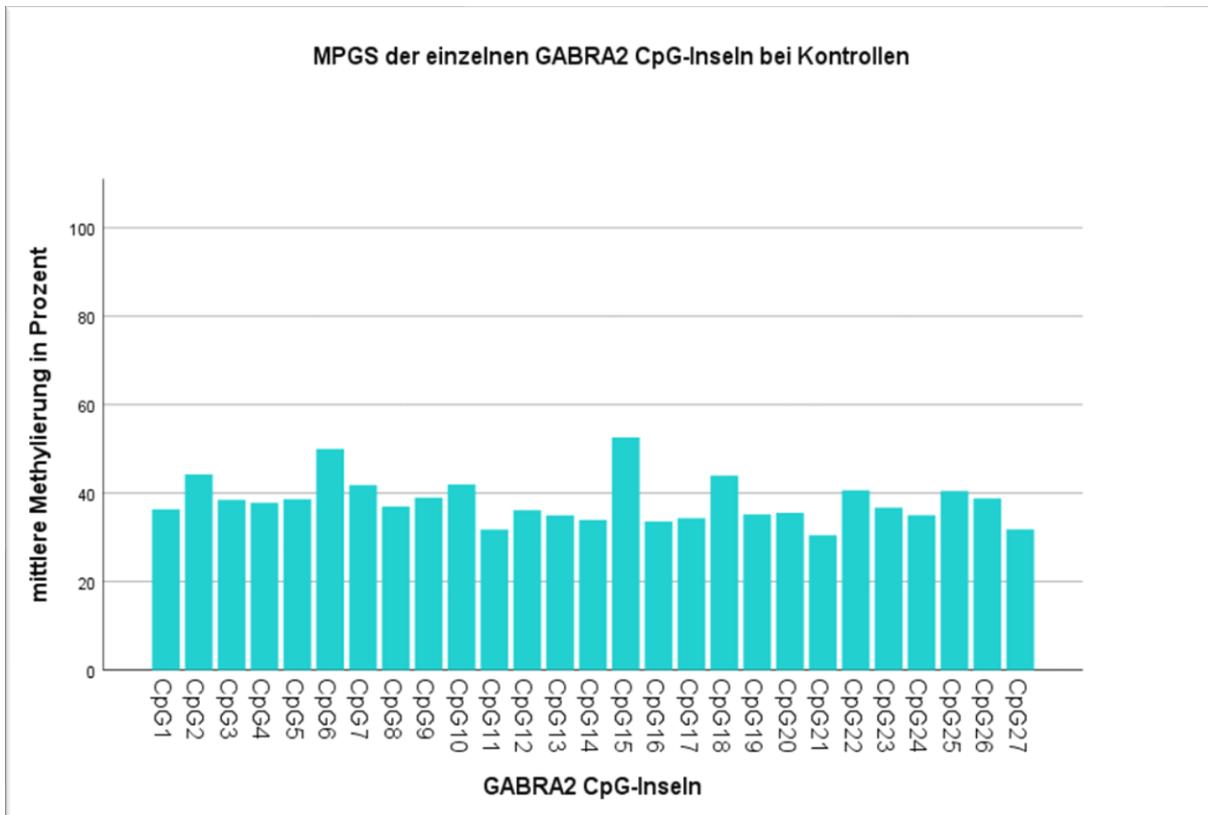


Abbildung 14: **mittlere prozentuale Methylierung GABRA2-CpG-Stellen bei Kontrollen.**

3.2.2.3. Mittlerer Prozentsatz und Anzahl der methylierten GABRA2-CpG-Stellen

Sowohl der mittlere Prozentsatz (MPGS) als auch die Anzahl (NMGS) der methylierten GABRA2-CpG-Stellen wichen sowohl bei Alkoholikern als auch bei den Kontrollen signifikant von einer Normalverteilung ab. Dies wurde ermittelt und bestätigt durch den Shapiro-Wilk-Test: Das Ergebnis bestätigt eine nicht normalverteilte Datenlage des MPGS und der NMGS bei Alkoholikern und Kontrollen ($p < .01$) (Tabellen 13 + 14).

Tabelle 13: Shapiro-Wilk-Test für den MPGS bei Patienten (ALC) und Kontrollen (CON)

Tests auf Normalverteilung

	Patienten od. Kontrollen	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statisti		Signifi	Statisti		Signifi
		k	df	kanz	k	df	kanz
Mittlerer Prozentsatz der methylierten CpGs	ALC	.244	36	.000	.610	36	.000
	CON	.127	48	.051	.925	48	.005

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 14. Shapiro-Wilk-Test für die NMGS bei Patienten (ALC) und Kontrollen (CON)

Tests auf Normalverteilung

	Patienten od. Kontrollen	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statisti		Signifi	Statisti		Signifikan
		k	df	kanz	k	df	z
Anzahl methylierter CpGs	ALC	.189	36	.002	.875	36	.001
	CON	.142	48	.017	.935	48	.010

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Es wurde ein Mann-Whitney-U-Test gerechnet, um zu untersuchen, ob sich die Gruppen (ALC/CON) signifikant hinsichtlich des MPGS und der NMGS unterscheiden. In beiden Fällen konnten allerdings keine signifikanten Ergebnisse festgestellt werden ($U = 798.00$, $p = .551$; $U = 731.500$, $p = .230$) (Tabellen 15 + 16 und Abbildungen 15 + 16).

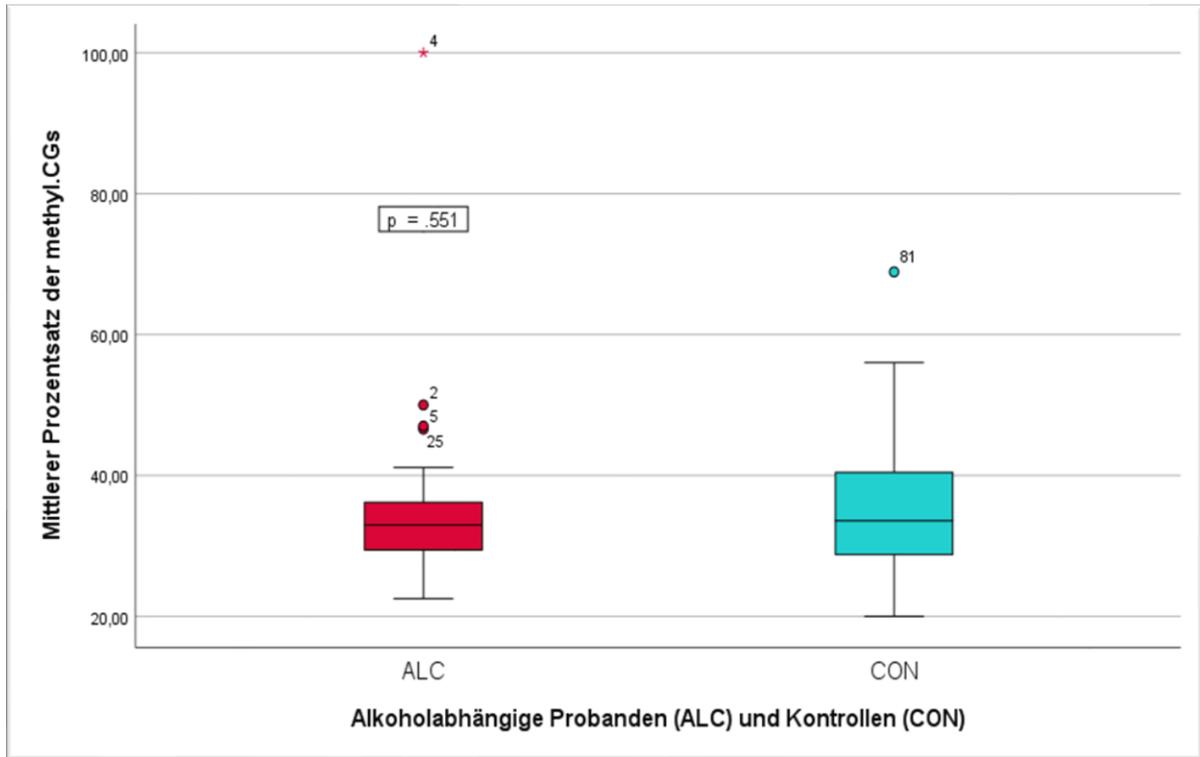


Abbildung 15: Verteilung MPGS bei alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen

Tabelle 15: Mann-Whitney-U-Test für den MPGS bei Patienten und Kontrollen

Ränge

	Patienten oder Kontrollen	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Mittlerer Prozentsatz der methylierter CpGs	ALC	36	40.67	1464.00
	CON	48	43.88	2106.00
	Gesamt	84		

	Mittlerer Prozentsatz der methylierten CpGs
Mann-Whitney-U-Test	798.000
Wilcoxon-W	1464.000
Z	-.597
Asymp. Sig. (2-seitig)	.551

a. Gruppenvariable: Patienten oder
Kontrollen

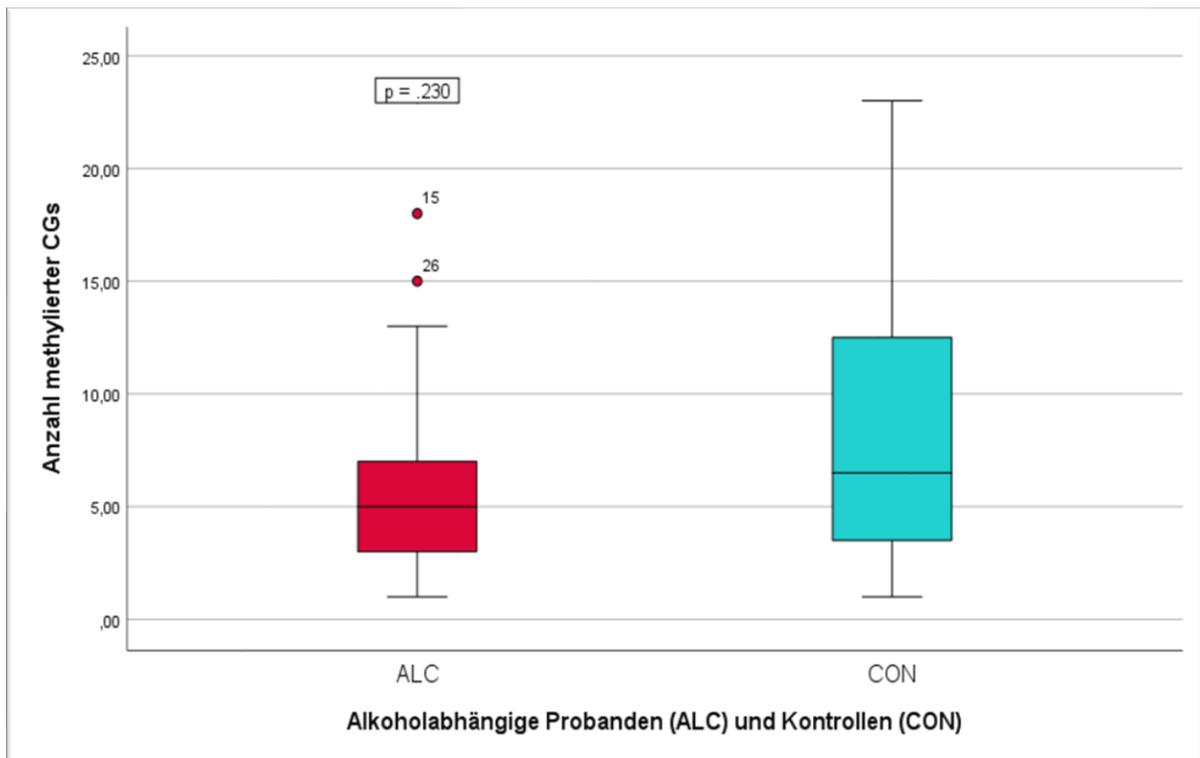


Abbildung 16: Verteilung NMGS bei alkoholabhängigen Probanden und Kontrollen

Tabelle 16: Mann-Whitney-U-Test für die NMGS bei Patienten und Kontrollen

Ränge

	Patienten oder Kontrollen	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Anzahl methylierter CpGs	ALC	36	38.82	1397.50
	CON	48	45.26	2172.50
	Gesamt	84		

	Anzahl methylierter CpGs
Mann-Whitney-U-Test	731.500
Wilcoxon-W	1397.500
Z	-1.201
Asymp. Sig. (2-seitig)	.230

a. Gruppenvariable: Patienten oder
Kontrollen

3.2.3. Einfluss von Alter, Geschlecht und Raucherstatus auf die GABRA2-Methylierung

3.2.3.1. Einfluss des Alters, des Geschlechts und des Raucherstatus auf die allgemeine Methylierung

Um zu überprüfen, ob sich das Alter auf eine Gesamtmethylierung der CpG-Inseln auswirkt, wurde ein t-Test gerechnet. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass es einen Unterschied der Methylierung im Hinblick auf das Alter in der Gesamtgruppe (ALC + CON) gibt ($t(159) = 1.758, p < .05, d = .277$). Anhand der deskriptiven Parameter ist ersichtlich, dass diejenigen, bei denen eine Methylierung auftrat, ein höheres Durchschnittsalter hatten ($M = 48.51, SD = 13.58$) als diejenigen, bei denen keine Methylierung nachzuweisen war ($M = 44.62, SD = 14.54$). (Tabelle 17) Da die Annahme der Normalverteilung nicht gegeben war, wurde zusätzlich ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test berechnet, welcher das Ergebnis nicht bestätigte ($U = 2697.50, p = .068$) (Tabelle 18 + Abbildung 17).

Tabelle 17: Korrelation des Alters beider Gruppen mit der allgemeinen Methylierung

Gruppenstatistiken											
	Methylierung	ja	nein	N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes				
Alter	ja			83	48.51	13.538	1.486				
	nein			78	44.62	14.540	1.646				

Test bei unabhängigen Stichproben											
		Levene-Test der Varianz- gleichheit		t-Test für die Mittelwertgleichheit							
		F	Sig.	T	df	Signifikanz Ein- seiti- ges p	Signifikanz Zwei- seiti- ges p	Mitt- lere Diffe- renz	Diffe- renz für Standard- fehler	95% Kon- fidenzintervall der Differenz	
										Unte- rer Wert	Obe- rer Wert
Alter	Varianzen sind gleich	.499	.481	1.758	159	.040	.081	3.891	2.213	-.480	8.261
	Varianzen sind nicht gleich			1.754	156.211	.041	.081	3.891	2.218	-.490	8.271

Effektgrößen bei unabhängigen Stichproben

		Standard- disierer ^a	Punktschätzung	95% Konfidenzintervall	
				Unterer Wert	Oberer Wert
Alter	Cohen's d	14.032	.277	-.034	.587
	Hedges' Korrektur	14.099	.276	-.034	.585
	Glass' Delta	14.540	.268	-.045	.579

a. Der bei der Schätzung der Effektgrößen verwendete Nenner.

Cohen's d verwendet die zusammengefasste Standardabweichung.

Hedges' Korrektur verwendet die zusammengefasste Standardabweichung und einen Korrekturfaktor.

Glass' Delta verwendet die Standardabweichung einer Stichprobe von der Kontrollgruppe.

Tabelle 18: Mann-Whitney-U-Test für das Alter beider Gruppen bzgl. der allg. Methylierung

<i>Teststatistiken^a</i>	
	Alter
Mann-Whitney-U-Test	2697.500
Wilcoxon-W	5778.500
Z	-1.826
Asymp. Sig. (2-seitig)	.068

a. Gruppenvariable:

Methylierung_ja_nein

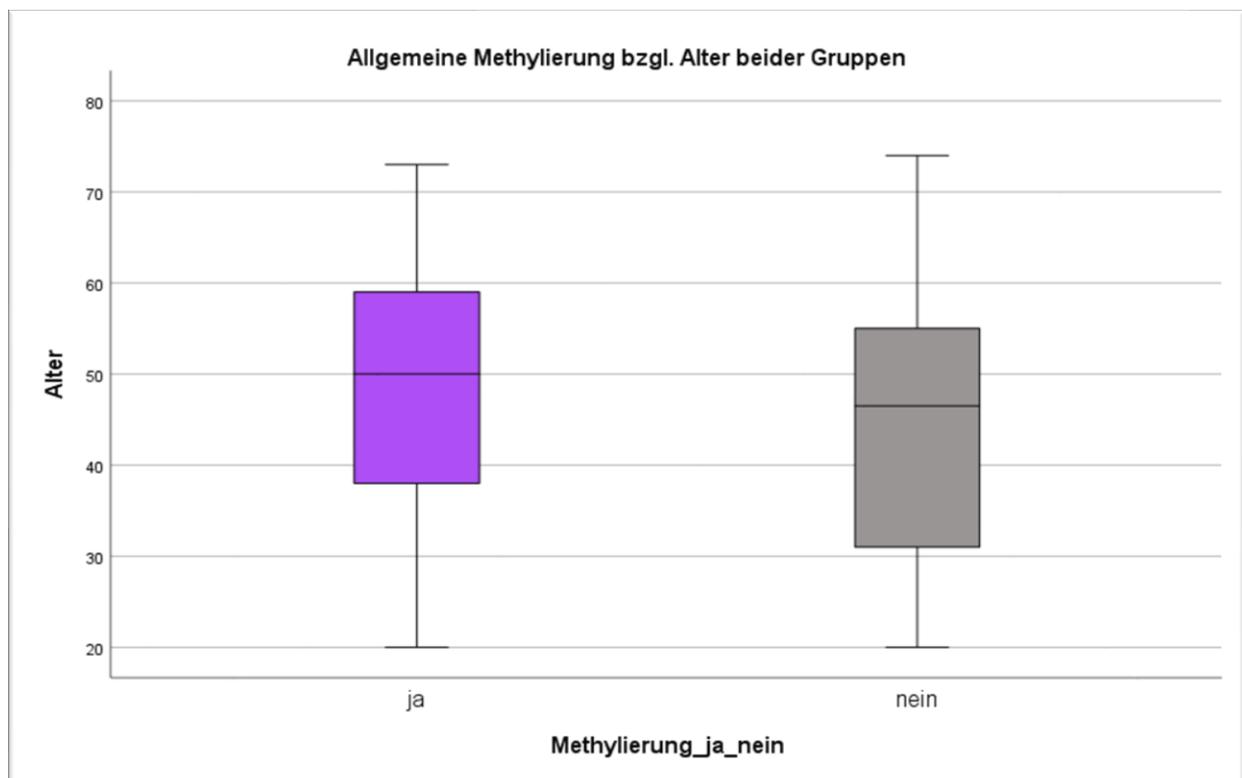


Abbildung 17: Allgemeine Methylierung bzgl. Alter bezogen auf beide Gruppen

Auch bei den Patienten fand sich keine Relation zwischen der Methylierung und dem Alter ($U = 737,00$, $p = .274$) (Tabelle 19 + Abbildung 18).

Tabelle 19: Mann-Whitney-U-Test für das Alter der Patienten bzgl. einer allg. Methylierung

Ränge				
	Methylierung ja nein	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Alter	ja	35	39.06	1367.00
	nein	49	44.96	2203.00
Gesamt		84		

Teststatistiken ^a	
	Alter
Mann-Whitney-U-Test	737.000
Wilcoxon-W	1367.000
Z	-1.094
Asymp. Sig. (2-seitig)	.274

a. Gruppenvariable:
Methylierung_ja_nein

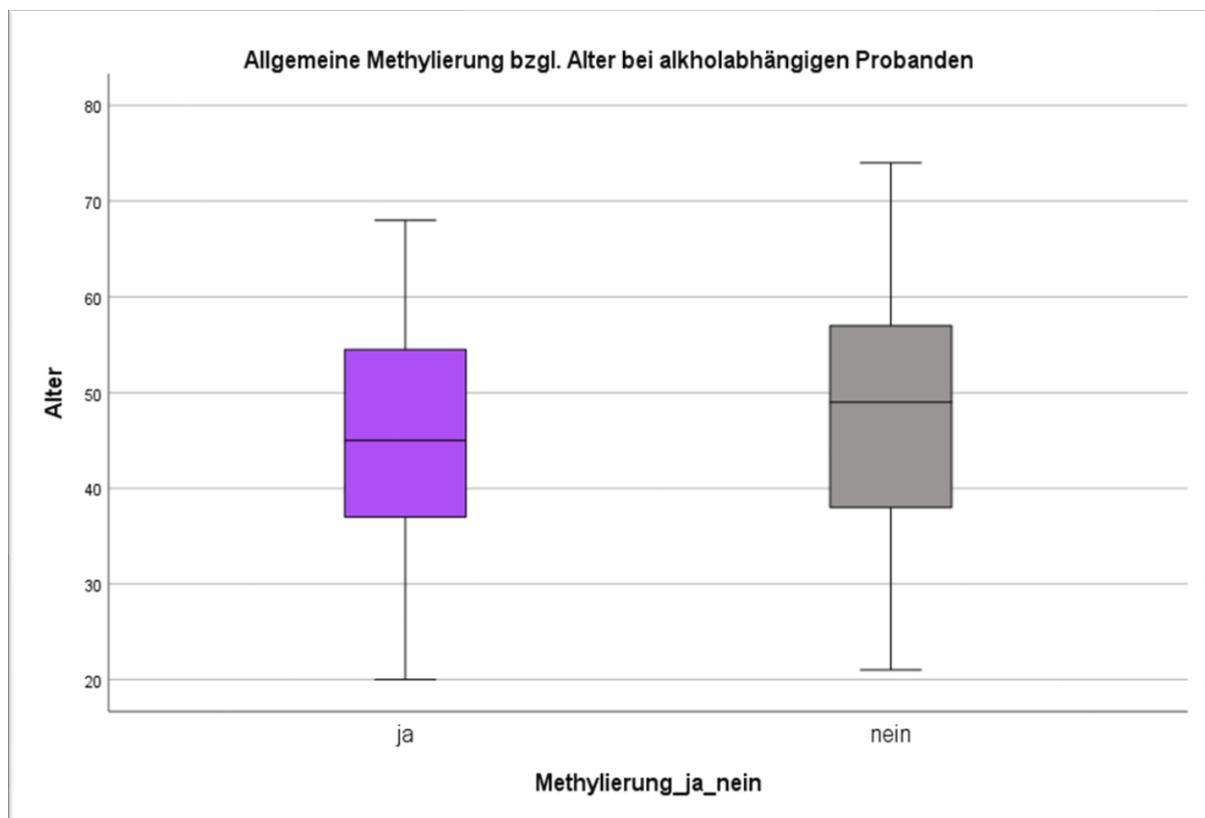


Abbildung 18: Allgemeine Methylierung bzgl. Alter bei alkoholabhängigen Probanden

Allerdings unterschied sich die allgemeine Methylierung in der Kontrollgruppe bezüglich des Alters erheblich. Bei älteren Personen fand sich eine signifikant höhere Methylierung als bei jüngeren ($U = 383,00$, $p = .001$) (Tabelle 20 + Abbildung 19).

Tabelle 20: Mann-Whitney-U-Test für das Alter der Kontrollen bzgl. einer allg. Methylierung

Ränge				
	Methylierung ja nein	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Alter	ja	48	45.52	2185.00
	nein	29	28.21	818.00
Gesamt		77		

Teststatistiken ^a	
	Alter
Mann-Whitney-U-Test	383.000
Wilcoxon-W	818.000
Z	-3.293
Asymp. Sig. (2-seitig)	.001

a. Gruppenvariable:
Methylierung_ja_nein

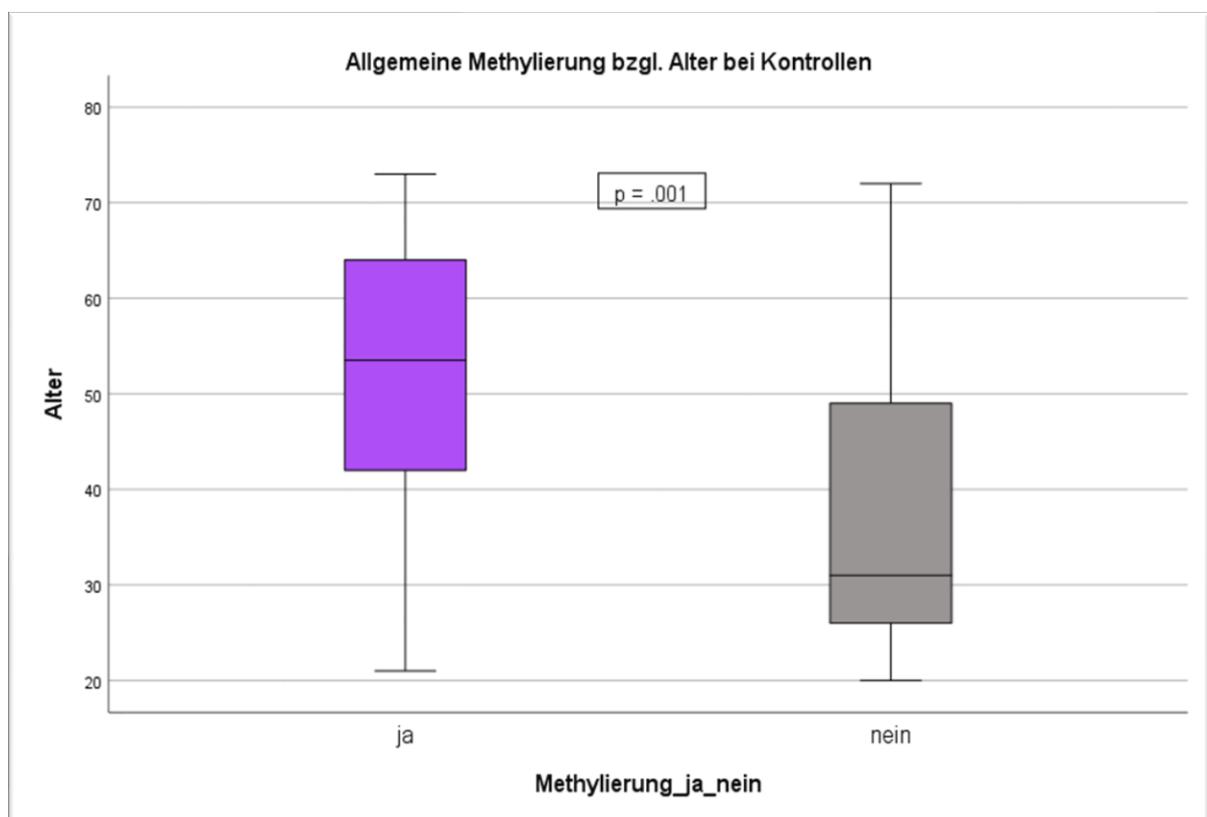


Abbildung 19: Allgemeine Methylierung bzgl. Alter bei Kontrollen

Zur Bestimmung eines Effekts des Geschlechts und des Raucherstatus der Gesamtgruppe, der Alkoholiker sowie der Kontrollgruppe auf die allgemeine Methylierung der GABRA2-CpG-Stellen wurde je eine logistische Regression gerechnet.

Bezogen auf die Gesamtgruppe konnte dabei kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Tabelle 21 + Abbildung 20).

Tabelle 21: Auswirkungen von Alter, Geschlecht und Raucherstatus der Gesamtgruppe auf die allg. Methylierung

Variablen in der Gleichung

		Regres- sions- koeffizient B	Stan- dard- fehler	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
								Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt 1a	Geschlecht (1)	-.166	.474	.123	1	.726	.847	.335	2.143
	Alter	.015	.020	.511	1	.475	1.015	.975	1.056
	Raucher jemals (1)	.224	.549	.167	1	.683	1.251	.427	3.668
	Konstante	-.402	1.157	.121	1	.728	.669		

a. In Schritt 1 eingegebene Variablen: Geschlecht, Alter, Raucher jemals

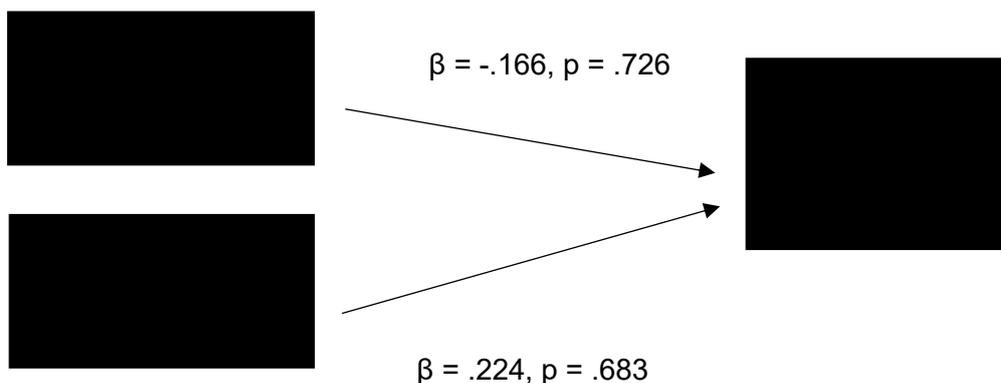


Abbildung 20: Einfluss des Geschlechts und Raucherstatus der Gesamtgruppe auf die allgemeine Methylierung

Auch ein Einfluss des Geschlechts und des Raucherstatus der Alkoholiker auf die allgemeine Methylierung der GABRA2-CpG-Stellen konnte nicht nachgewiesen werden. Die Werte unterschieden sich nicht von denen der Gesamtgruppe (Tabelle 21 + Abbildung 20).

Allerdings konnte in der Kontrollgruppe – wie oben bereits für das Alter beschrieben - eine signifikante Hypomethylierung bei den männlichen Probanden festgestellt werden. Das heißt, in der Kontrollgruppe fand sich bei den Frauen eine höhere allgemeine Methylierung der GABRA2-CpG-Inseln (Tabelle 22 + Abbildung 21). Der Raucherstatus ist bei den Kontrollen nicht erhoben worden.

Tabelle 22: Auswirkungen von Alter und Geschlecht der Kontrollgruppe auf die allg. Methylierung

Variablen in der Gleichung

		Regres- sions- koeffi- zient B	Stan- dard- fehler	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% Konfi- denzintervall für EXP(B)	
								Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt 1a	Geschlecht (1)	-1.067	.532	4.026	1	.045	.344	.121	.976
	Alter	-.053	.018	8.898	1	.003	.949	.917	.982
	Konstante	2.345	.858	7.468	1	.006	10.435		

a. In Schritt 1 eingegebene Variablen: Geschlecht , Alter.

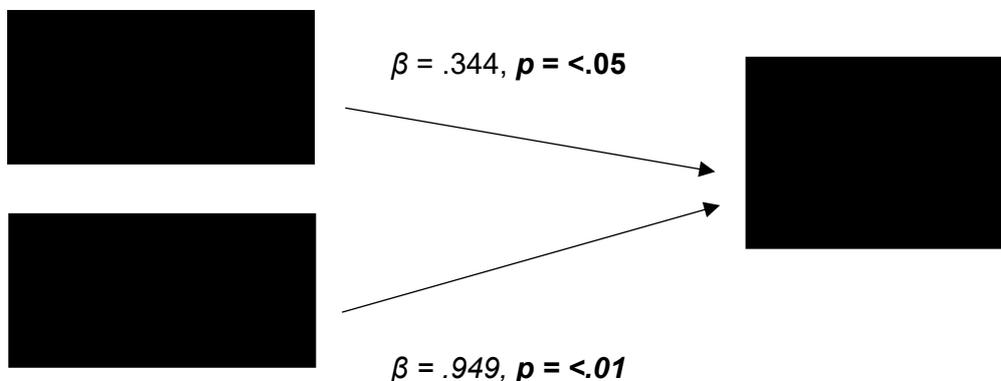


Abbildung 21: Einfluss des Geschlechts und des Alters der Kontrollgruppe auf die allgemeine Methylierung

3.2.3.2. Einfluss des mittleren Prozentsatzes der methylierten CpG-Stellen (MPGS) auf Alter, Geschlecht und Raucherstatus

Um den direkten Einfluss von Alter, Geschlecht und Raucherstatus auf den mittleren Prozentsatz der methylierten CpG-Stellen (mCPGs) zu ermitteln wurde je eine lineare Regression berechnet. Diese wurden getrennt für Patienten und Kontrollen gerechnet. Für die alkoholabhängigen Patienten wurde herausgefunden, dass das Modell an sich

nicht signifikant geschätzt werden konnte ($F(3,29) = .734, p = .540$) (Tabelle 23). Daher musste bereits erahnt werden, dass die Regressionskoeffizienten wahrscheinlich keinen signifikanten Einfluss darstellen. Die Regressionsanalyse hat dies bestätigt.

Tabelle 23: Regressionsanalyse alkoholabhängige Probanden bzgl. des MPGS

ANOVA^a

Modell		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
1	Regression	35.873	3	11.958	.734	.540 ^b
	Nicht standardisierte Residuen	472.187	29	16.282		
	Gesamt	508.061	32			

a. Abhängige Variable: Anzahl methylierter CGs

b. Einflussvariablen: (Konstante), Raucher jemals, Geschlecht, Alter

Bei den Patienten stellten sowohl das Alter ($\beta = -.064, p = .815$), das Geschlecht ($\beta = -.221, p = .972$) als auch der Raucherstatus ($\beta = 3.624, p = .527$) (Tabelle 24) keine signifikanten Effekte in Bezug auf den mittleren Prozentsatz der mCpGs dar. Das Regressionsmodell wird in Abbildung 22 visualisiert.

Tabelle 24: Auswirkungen von Alter, Geschlecht und Raucherstatus des Patienten auf den MPGS

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		Sig.	95,0% Konfidenzintervalle für B		Kollinearitätsstatistik	
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T		Untergrenze	Obergrenze	Toleranz	VIF
1	(Konstante)	35.523	11.734		3.027	.005	11.524	59.522		
	Alter	-.064	.270	-.056	-.236	.815	-.617	.489	.591	1.692
	Geschlecht	-.221	6.197	-.008	-.036	.972	-12.896	12.453	.626	1.599
	Raucher jemals	3.624	5.660	.122	.640	.527	-7.952	15.201	.923	1.083

a. Abhängige Variable: Mittlerer Prozentsatz der methylierter CpGs

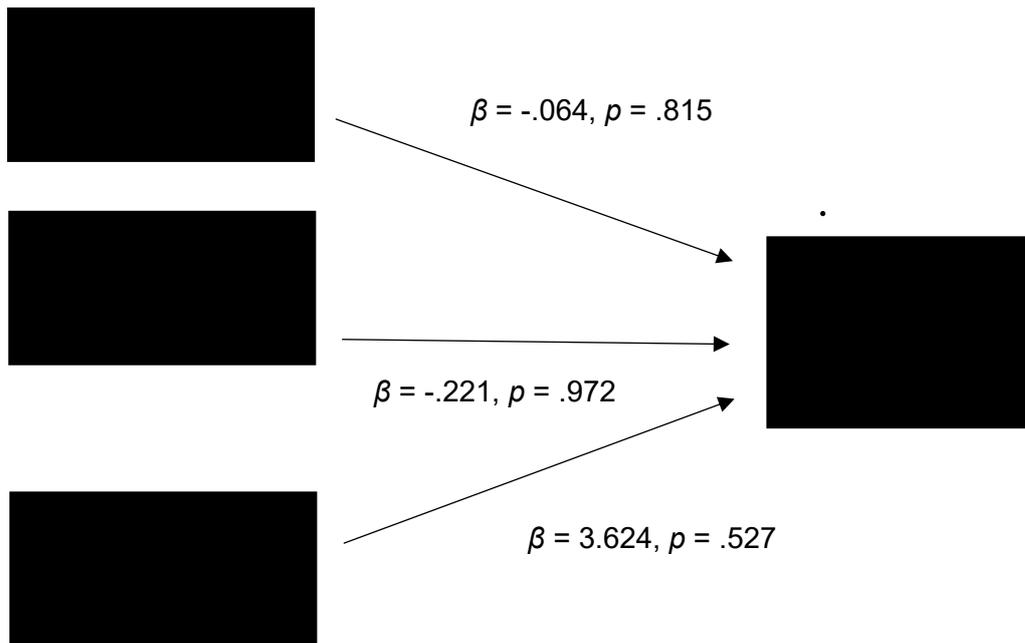


Abbildung 22: Einfluss des Alters, Geschlechts und Raucherstatus der Patienten auf den MPGS

Auch bei der Kontrollgruppe fanden sich keine signifikanten Effekte von Alter ($\beta = .044, p = .688$) und Geschlecht ($\beta = -1.855, p = .541$) (Tabelle 25) in Bezug auf den mittleren Prozentsatz der mCpGs. Das Regressionsmodell wurde in Abbildung 23 visualisiert.

Tabelle 25: Auswirkungen von Alter und Geschlecht der Kontrollen auf den MPGS

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		95,0% Konfidenzintervalle für B		Kollinearitätsstatistik		
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T	Sig.	Untergrenze	Obergrenze	Toleranz	VIF
1	(Konstante)	36.360	7.583		4.795	.000	21.087	51.634		
	Alter	.044	.108	.060	.404	.688	-.174	.262	.999	1.001
	Geschlecht	-1.855	3.011	-.091	-.616	.541	-7.919	4.209	.999	1.001

a. Abhängige Variable: Mittlerer Prozentsatz der methylierten CpGs

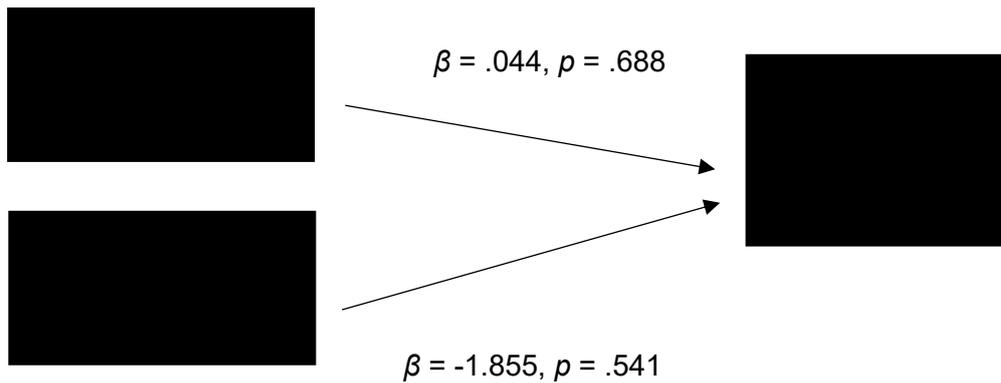


Abbildung 23: Einfluss des Alters und Geschlechts der Kontrollgruppe auf den MPGS

3.2.3.3. Einfluss der mittleren Anzahl der methylierten CpG-Stellen (NMGS) auf Alter, Geschlecht und Raucherstatus

Demzufolge kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass Alter und Geschlecht sowie der Raucherstatus keinen Einfluss auf die NMGS haben. Nach Betrachtung des Regressionskoeffizienten kann dies bestätigt werden.

Sowohl das Alter ($\beta = -.062, p = .435$), das Geschlecht ($\beta = 1.974, p = .281$) als auch der Raucherstatus ($\beta = 1.227, p = .461$) (Tabelle 26) der alkoholabhängigen Probanden stellten keine signifikanten Effekte in Bezug auf die Anzahl der mCpGs dar. Das Regressionsmodell wurde in Abbildung 24 visualisiert.

Tabelle 26: Auswirkungen von Alter, Geschlecht und Raucherstatus der alkoholabhängigen Probanden auf die NMGS

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		95,0% Konfidenzintervalle für B		Kollinearitätsstatistik		
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T	Sig.	Untergrenze	Obergrenze	Toleranz	VIF
1	(Konstante)	5.385	3.403		1.582	.124	-1.575	12.344		
	Alter	-.062	.078	-.185	-.793	.435	-.222	.098	.591	1.692
	Geschlecht	1.974	1.797	.249	1.099	.281	-1.701	5.650	.626	1.599
	Raucher jemals	1.227	1.641	.139	.748	.461	-2.129	4.584	.923	1.083

a. Abhängige Variable: Anzahl methylierter CpGs

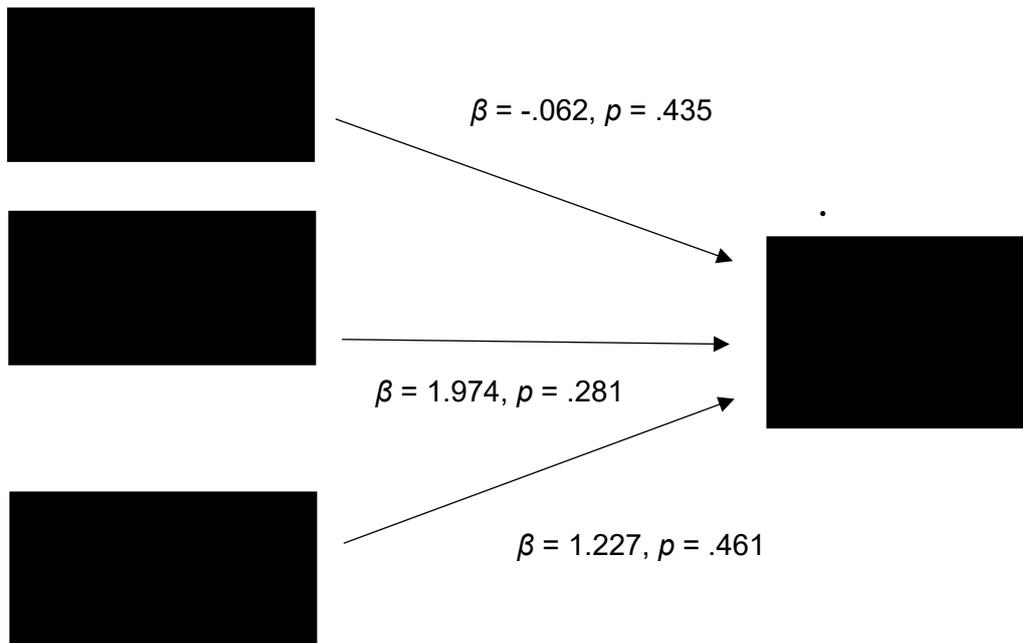


Abbildung 24: Einfluss des Alters, Geschlechts und Raucherstatus der Patienten auf die NMGS

Auch bei der Kontrollgruppe fanden sich keine signifikanten Effekte von Alter ($\beta = .054, p = .356$) und Geschlecht ($\beta = -1.231, p = .452$) (Tabelle 27) in Bezug auf die Anzahl der mCpGs dar. Das Regressionsmodell wurde in Abbildung 25 visualisiert.

Tabelle 27: Auswirkungen von Alter und Geschlecht der Kontrollen auf die NMGS

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		95,0% Konfidenzintervalle für B		Kollinearitätsstatistik		
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T	Sig.	Untergrenze	Obergrenze	Toleranz	VIF
1	(Konstante)	7.168	4.086		1.754	.086	-1.062	15.398		
	Alter	.054	.058	.137	.932	.356	-.063	.172	.999	1.001
	Geschlecht	-1.231	1.622	-.111	-.759	.452	-4.499	2.036	.999	1.001

a. Abhängige Variable: Anzahl methylierter CpGs

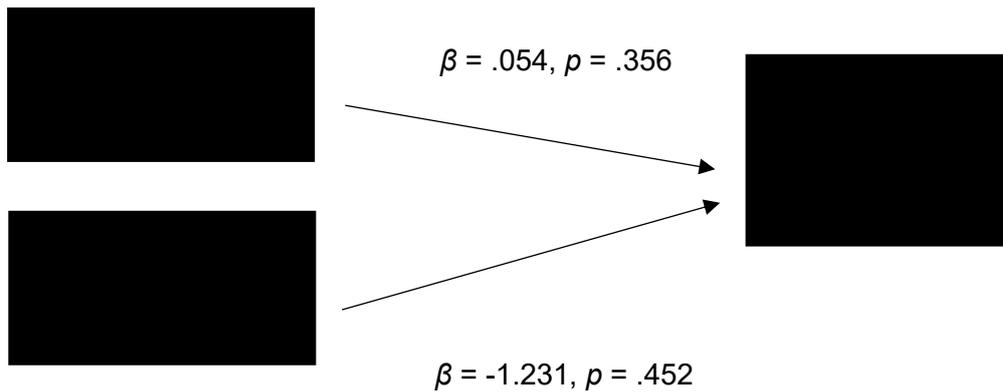


Abbildung 25: Einfluss des Alters und Geschlechts der Kontrollen auf die NMGS

3.2.4. Einfluss von klinischen Variablen der alkoholabhängigen Probanden auf deren GABRA2-Methylierungsmuster

3.2.4.1. Einfluss von maximaler und täglicher Trinkmenge auf das GABRA2-Methylierungsmuster

Um die Einflüsse der täglichen und maximalen Trinkmenge auf die Frage nach einer allgemeinen Methylierung zu überprüfen, wurde statt einer linearen eine logistische Regression gerechnet.

Es zeigte sich, dass die tägliche und die maximale Trinkmenge keinen Einfluss auf die allgemeine Methylierung der GABRA2-CpGs haben. Nach der Betrachtung des Regressionskoeffizienten konnte dies bestätigt werden ($OR = 1.00$, $p = .883$, $OR = 1.00$, $p = .983$) (Tabelle 28 + Abbildung 26).

Tabelle 28: Einfluss der Trinkmenge und weiterer klinischer Variablen der alkoholabhängigen Probanden auf deren GABRA2-Methylierungsmuster

Variablen in der Gleichung

		Regres- sions- koeffi- zient B	Stan- dard- fehler	Wald	df	Sig.	Exp (B)	95% Konfidenz- intervall für EXP(B)	
								Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt 1 ^a	Tägliche Trinkmenge in Gramm	.000	.002	.022	1	.883	1.000	.996	1.004
	Max Trinkmenge	.000	.001	.000	1	.983	1.000	.998	1.002
	Dauer der Alkoholabhängigkeit. (Jahre)	.049	.026	3.483	1	.062	1.050	.998	1.106
	Körperliches Entzugssyndrom (1)	.110	.661	.028	1	.868	1.116	.306	4.075
	Anzahl der DSMIV Entzugssymptome	-.201	.215	.871	1	.351	.818	.536	1.247
	Konstante	.838	1.069	.614	1	.433	2.312		

a. In Schritt 1 eingegebene Variablen: Tägliche Trinkmenge in Gramm, Max Trinkmenge, Dauer der Alkoholabhängigkeit (Jahre), Körperliches Entzugssyndrom, Anzahl der DSMIV-Alkoholabhängigkeitskriterien

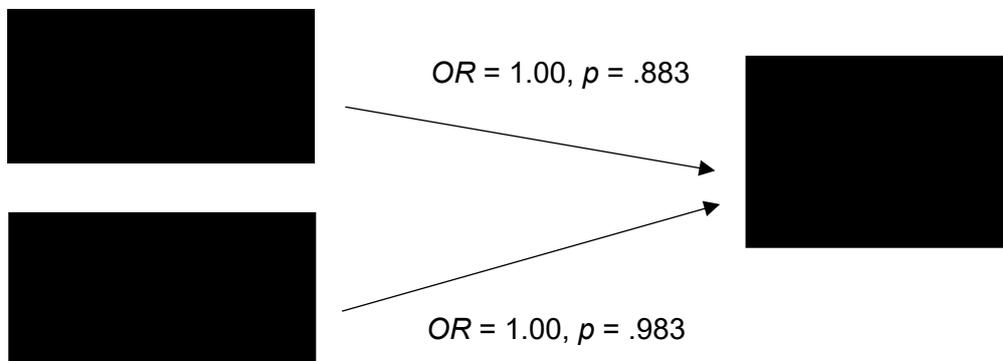


Abbildung 26: Einfluss der täglichen und maximalen Trinkmenge auf die allgemeine Methylierung

Es konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die tägliche und die maximale Trinkmenge keinen Einfluss auf den mittleren Prozentsatz als auch die Anzahl der mCpGs haben. Nach der Betrachtung des Regressionskoeffizienten konnte dies bestätigt werden. Hierfür wurde eine lineare Regression berechnet.

Sowohl die tägliche Trinkmenge ($\beta = -.015$, $p = .569$) als auch die maximale Trinkmenge ($\beta = .018$, $p = .192$) (Tabelle 29) stellten keine signifikanten Effekte in Bezug auf den MPGS dar. Das Regressionsmodell wurde in Abbildung 27 visualisiert.

Tabelle 29: Einfluss der Trinkmenge und weiterer klinischen Variablen der alkoholabhängigen Probanden auf deren MPGS

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		95,0% Konfidenzintervalle für B		Kollinearitätsstatistik		
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T	Sig.	Untergrenze	Obergrenze	Toleranz	VIF
1	(Konstante)	24.537	11.469		2.139	.042	1.004	48.070		
	Tägliche Trinkmenge in Gramm	-.015	.026	-.188	-.576	.569	-.069	.039	.296	3.380
	Max Trinkmenge	.018	.014	.416	1.338	.192	-.010	.047	.326	3.068
	Dauer der Alkoholabhängigkeit (Jahre)	-.360	.362	-.216	-.994	.329	-1.102	.383	.666	1.502
	Körperliches Entzugssyndrom	-4.968	6.751	-.145	-.736	.468	-18.819	8.883	.807	1.239
	Anzahl der DSMIV Entzugssymptome	2.276	2.160	.219	1.054	.301	-2.156	6.708	.731	1.368

a. Abhängige Variable: Mittlerer Prozentsatz der methylierter CpGs

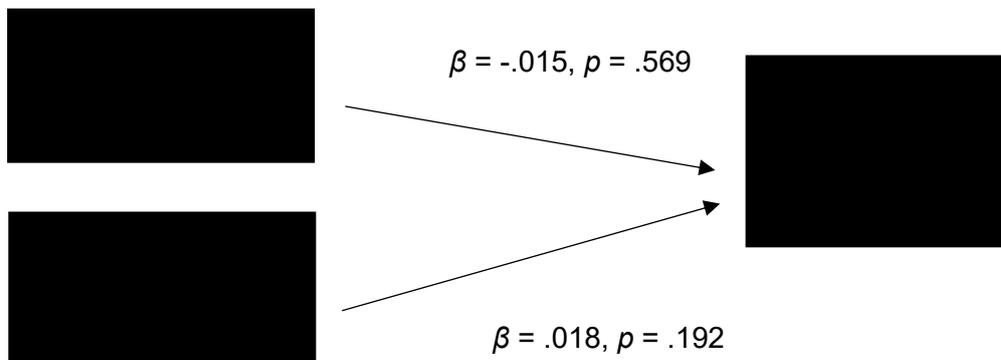


Abbildung 27: Korrelation der täglichen und maximalen Trinkmenge mit dem MPGS

Auch bezüglich der täglichen Trinkmenge ($\beta = .004$, $p = .582$) und der maximalen Trinkmenge ($\beta = -.003$, $p = .450$) (Tabelle 30) konnten keine signifikanten Effekte in Bezug auf die NMGS gefunden werden. Das Regressionsmodell wurde in Abbildung 28 visualisiert.

Tabelle 30: Einfluss der Trinkmenge und weiterer klinischen Variablen der alkoholabhängigen Probanden auf deren NMGS

Koeffizienten^a

Modell	Nicht standardisierte Koeffizienten	Standardisierte Koeffizienten	Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.	95,0% Konfidenzintervalle für B		Kollinearitätsstatistik	
						Untergrenze	Obergrenze	Toleranz	VIF
1 (Konstante)	14.437	3.220		4.483	.000	7.830	21.045		
Tägliche Trinkmenge in Gramm	.004	.007	.171	.557	.582	-.011	.019	.296	3.380
Max Trinkmenge	-.003	.004	-.225	-.767	.450	-.011	.005	.326	3.068
Dauer der Alkoholabhängigkeit (Jahre)	-.055	.102	-.111	-.540	.594	-.263	.154	.666	1.502
Körperliches Entzugssyndrom	-.971	1.896	-.095	-.512	.613	-4.860	2.919	.807	1.239
Anzahl der DSMIV Entzugssymptome	-1.050	.606	-.339	-1.732	.095	-2.295	.194	.731	1.368

a. Abhängige Variable: Anzahl methylierter CpGs

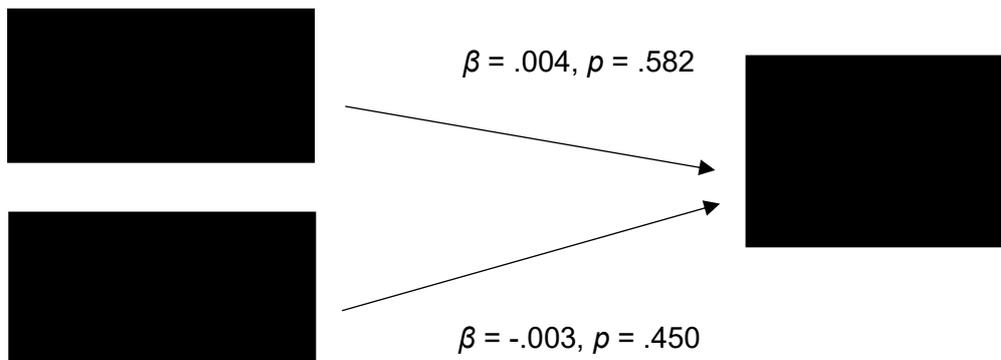


Abbildung 28: Korrelation der täglichen und maximalen Trinkmenge mit der NMGS

3.2.4.2. Einfluss von Dauer der Alkoholabhängigkeit und körperlichem Entzug auf das GABRA2-Methylierungsmuster

Um die Einflüsse der Dauer der Alkoholabhängigkeit, der Anzahl der Entzugssymptome und die körperlichen Entzugserscheinungen auf die allgemeine Methylierung zu überprüfen, wurde statt einer linearen eine logistische Regression gerechnet.

Sowohl die Dauer der Alkoholabhängigkeit ($OR = 1.050, p = .062$), die Anzahl der Entzugssymptome ($OR = .818, p = .351$) als auch der körperliche Entzug ($OR = 1.116, p = .868$) (Tabelle 28) hatten keine signifikante Relation zur allgemeinen Methylierung. Das Regressionsmodell ist in Abbildung 29 visualisiert.

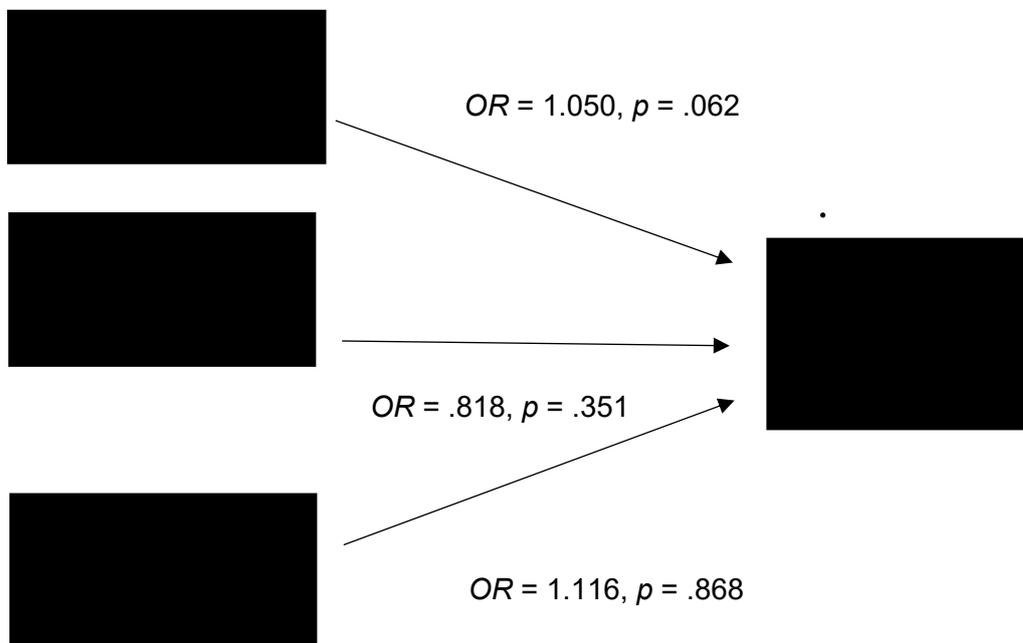


Abbildung 29: Korrelation der Dauer der Alkoholabhängigkeit, der Anzahl der Entzugssymptome und des körperlichen Entzugs mit der allgemeinen Methylierung

Um die Einflüsse der Dauer der Alkoholabhängigkeit, der Anzahl der Entzugssymptome und den körperlichen Entzugserscheinungen auf die Frage nach dem MPGS und der NMGS zu klären, wurde eine lineare Regression berechnet.

Es muss auch hier davon ausgegangen werden, dass sowohl die Dauer der Alkoholabhängigkeit, die Anzahl der Entzugssymptome als auch der körperliche Entzug keinen Einfluss auf den MPGS und die NMGS haben. Nach Betrachtung des Regressionskoeffizienten kann dies bestätigt werden.

Sowohl die Dauer der Alkoholabhängigkeit ($\beta = -.360, p = .329$), die Anzahl der Entzugssymptome ($\beta = 2.276, p = .301$) als auch der körperliche Entzug ($\beta = -4.968, p = .468$) zeigten keine Relation zum MPGS (Tabelle 29). Das Regressionsmodell ist in Abbildung 30 visualisiert.

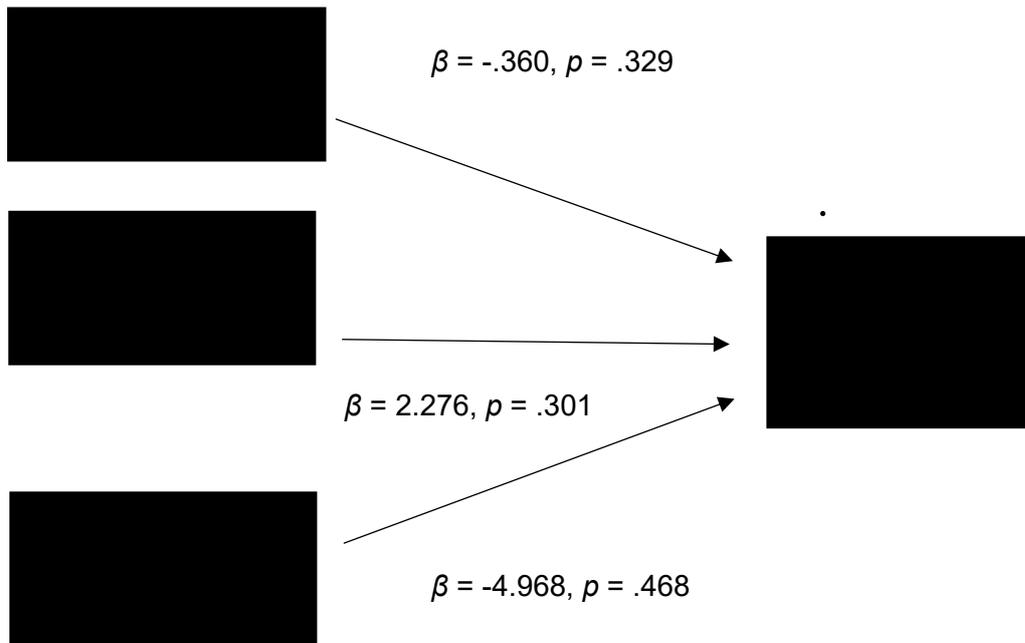


Abbildung 30: Korrelation der Dauer der Alkoholabhängigkeit, der Anzahl der Entzugssymptome und des körperlichen Entzugs mit dem MPGS

Sowohl die Dauer der Alkoholabhängigkeit ($\beta = -.055, p = .594$), die Anzahl der Entzugssymptome ($\beta = 1.050, p = .095$) als auch der körperliche Entzug ($\beta = -.971, p = .613$) zeigten keine Relation zur NMGS dar (Tabelle 30). Das Regressionsmodell ist in Abbildung 31 visualisiert.

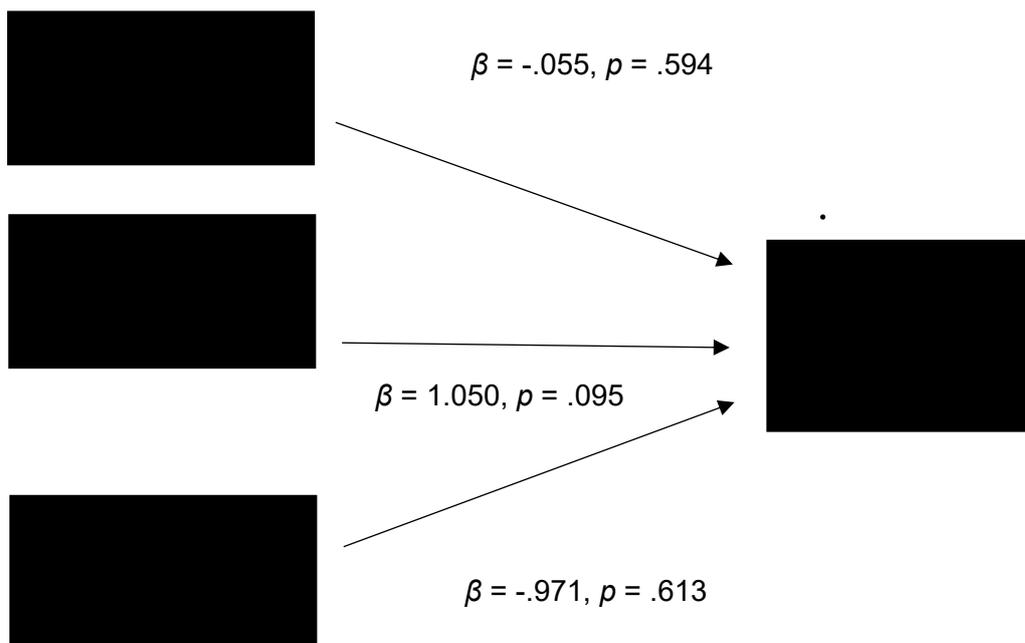


Abbildung 31: Korrelation der Dauer der Alkoholabhängigkeit, der Anzahl der Entzugssymptome und des körperlichen Entzugs mit der NMGS

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Messungen der GABRA2-Promotor-DNA-Methylierungsveränderungen neben einer signifikanten allgemeinen Hypomethylierung der GABRA2-CpG-Stellen, ebenfalls eine der einzelnen CpG-Stellen bei alkoholabhängigen Patienten ergaben. Außerdem zeigte sich eine Assoziation der GABRA2-Methylierung mit dem Alter und dem Geschlecht in der Kontrollgruppe. Des Weiteren konnten keinerlei Korrelationen zwischen dem durchschnittlichen Prozentsatz an methylierten Cytosinen, der mittleren Anzahl von methylierten GABRA2-CpGs (NMGS) sowie dem mittleren Prozentsatz von methylierten CpGs (MPGS) und den klinischen Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, tägliche Trinkmenge, Dauer der Alkoholabhängigkeit oder Entzugssymptomatik nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1. Unterschiede der DNA-Methylierungsmuster des GABRA2 Rezeptorgens sowie der einzelnen CpG-Stellen zwischen alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

Das wichtigste Resultat der vorliegenden Dissertation ist die allgemeine Hypomethylierung in der regulatorischen Region des GABRA2-Gens bei alkoholabhängigen Probanden im Vergleich zu Kontrollen. Des Weiteren waren bei alkoholabhängigen Personen im Vergleich zu Kontrollen auch eine Reihe spezifischer GABRA2-CpG-Stellen signifikant hypomethyliert.

Über die Rollen jeder einzelnen CpG-Stelle innerhalb der GABRA2-Promotorregion und ihre klinische Relevanz ist jedoch wenig bekannt. Diese Studie zeigt eine Methode zur Definition eines potenziell relevanten Clusters von CpG-Stellen innerhalb des GABRA2-Promotors, dessen Methylierung eventuell mit klinischen Variablen der Alkoholabhängigkeit wie die Schwere des Krankheitsverlaufs, der Entzugssymptomatik oder Alter und Geschlecht korreliert. Epigenetische Veränderungen der GABAergen Gene können auf vielfältige Weise durch chronischen Alkoholkonsum beeinflusst werden. Durch die Hypomethylierung des Rezeptors wird eine erhöhte Expression desselben erwartet, wobei damit vermehrt GABA gebunden würde, was

wiederum zu einer inhibitorischen Wirkung auf die entsprechenden Nervenzellen führen könnte. Dadurch käme es zu einer Dämpfung des zentralen Nervensystems. Ergebnisse früherer Studien zu Unterschieden in der globalen DNA-Methylierung zwischen Alkoholikern und Kontrollen und dem Einfluss von Alter und Geschlecht sind nicht einheitlich. In den meisten Publikationen war die globale Methylierung – im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit bzgl. des GABRA2-Rezeptorgens - bei Alkoholabhängigen erhöht (Bönsch et al. 2004; Kim et al. 2016). Allerdings ist der GABRA2-Rezeptor dahingehend noch nicht so ausführlich analysiert worden.

Tian und Kollegen untersuchten in der Vergangenheit GABRA2-mRNAs aus dem gesamten menschlichen Gehirn und aus drei Hirnregionen. Es wurde ein komplexes Muster von alternativem Spleißen und alternativer Promotornutzung der menschlichen GABRA2-mRNA nachgewiesen. Dies könnte auch mit veränderten GABRA2-mCpG-Methylierungsmustern zusammenhängen (Tian et al. 2005).

Gatta und Kollegen beschäftigten sich mit der GABAergen Neurotransmission und entdeckten, dass dahingehende alkoholbedingte Beeinträchtigungen durch eine verminderte Neurosteroid-Biosynthese, höchstwahrscheinlich über eine DNA-Hypermethylierung, fundiert beeinflusst werden könnten (Gatta et al. 2020).

Dass die Ergebnisse in den verschiedenen Untersuchungen doch so inhomogen bezüglich einer Hyper- oder Hypomethylierung bei Alkoholmissbrauch sind, könnte eventuell auch an der Zusammensetzung der jeweiligen Gruppen bezüglich des Geschlechts und des Alters sowie am Studiendesign gelegen haben.

Auch die Anzahl der untersuchten Probanden unterschied sich in den einzelnen Studien, was ebenfalls die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Eine größere bzw. kleinere Kohorte könnte zu unterschiedlich signifikanten Methylierungen führen, da die Anzahl der untersuchten Probanden zumeist das Resultat einer Probe beeinflusst (Krickhahn und Poß, 2018).

Zudem muss man selbstverständlich berücksichtigen, dass in der hier analysierten Studie ein bestimmtes Cluster von CpG-Stellen der Promotorregion des GABRA2-Rezeptorgens untersucht wurde, das sich im Aufbereitungsverfahren geeignet erwies. Trotzdem könnte es natürlich weitere Cluster von CpG-Stellen geben, die eine Relevanz bezüglich Alkoholkonsum hätten. Ob diese dann eher hyper- oder hypomethyliert wären, sei dahingestellt.

Nichtsdestotrotz konnte hier ein CpG-Cluster des GABRA2-Rezeptors gefunden werden, welches eine signifikante Hypomethylierung bei alkoholtrinkenden Probanden

zeigte. Da das GABRA2-Gen bisher als Kandidatengen eher wenig Aufmerksamkeit genoss, könnten diese Ergebnisse durchaus relevant sein und verdienen sicher weitere Forschungsarbeit.

4.2. Assoziation des GABAA-Rezeptors mit Alkohol und anderen Suchtmitteln

GABAA-Rezeptoren unterliegen einer allosterischen Modulation durch Ethanol, Anästhetika, Benzodiazepinen und Neurosteroiden. Sie sind zusätzlich sowohl an den akuten als auch an den chronischen Wirkungen von Ethanol, einschließlich Toleranzentwicklung, Abhängigkeit und Entzug, beteiligt.

Medikamente, die auf GABAA-Rezeptoren wirken, lindern die Symptome des akuten Entzugs. Ethanol induziert eine Plastizität der GABAA-Rezeptoren: Toleranz ist mit einer allgemein verringerten GABAA-Rezeptoraktivierung und einer unterschiedlich veränderten Expression der Untereinheiten verbunden (Enoch 2008).

In dieser, der Dissertation zugrunde liegenden Studie, zeigte sich bei den alkoholabhängigen Individuen eine signifikante allgemeine Hypomethylierung der untersuchten GABRA2-CpG-Stellenregion. Damit könnte eine Verknüpfung des GABRA2-Rezeptorgens mit der Alkoholabhängigkeit vermutet werden.

In weiteren publizierten molekulargenetischen Analysen fanden sich ebenfalls Assoziationen des GABRA2-Gens mit der Alkoholsucht. In einer aktuellen Studie von Moe und Kollegen deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass untersuchte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) aus Kandidatengenstudien in einer bevölkerungsbasierten Stichprobe aus einer norwegischen Kohorte in Genen, die mit der GABA-erger Signalübertragung in Verbindung standen, für das Ausmaß einer psychischen Belastung verantwortlich waren. Unter anderem zeigte sich auch eine Assoziation des GABRA2-Rezeptorgens mit Alkoholkonsum (Moe et al. 2021).

Natürlich kann man an oben beschriebener Studie kritisieren, dass es sich ausschließlich um norwegische Testpersonen handelt und damit die getesteten Personen eher homogen waren, allerdings wurden ebenfalls beide Geschlechter einbezogen. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen fand sich eine Assoziation des GABRA2-Rezeptorgens mit Alkoholkonsum, was die hier vorgestellte Arbeit auch vermuten lässt, wobei wiederum nur Personen deutscher Abstammung untersucht wurden. Damit könnte eine Beteiligung des GABRA2-Gens unabhängig von ethnischen Einflüssen bei alkoholassoziierten Störungen vermutet werden. In der

vorliegenden Arbeit wurden keine SNPs untersucht, trotzdem konnte eine Assoziation mit Alkohol festgestellt werden.

Die Rolle von SNPs und Genotypen könnte auch durch die Resultate von Uhart und Kollegen als auch in denen von Zintzaras, Boyd, Gajos sowie Haughey und Kollegen untermauert werden. Es zeigte sich eine indirekte Auswirkung vor allem des rs279858 im GABRA2-Gen auf den Alkoholkonsum. Diese Ergebnisse lieferten die Hypothese, dass der Genotyp von rs279858 des GABRA2-Gens die stimulierende Wirkung von Alkohol mildert und dass dieser Effekt das Trinken vermittelt (Uhart et al. 2013; Zintzaras 2012; Boyd et al. 2015; Gajos et al. 2019; Haughey et al. 2008).

Damit könnte eventuell auch erklärt werden, dass in der hier vorliegenden Studie nicht sämtliche CpG-Stellen der GABRA2-Inselregion bei Alkoholkranken hypomethyliert waren, sondern der rs279858 Genotyp modulierend mitwirkt. Vielleicht spielen hier die Major- beziehungsweise Minor-Allel-Genotypen sowie die SNPs eine Rolle und beeinflussen die jeweilige Ausprägung der Methylierung und damit den Alkoholkonsum. Leider wurden in dieser Dissertation keine Einzelnukleotid-Polymorphismen und Genotypen untersucht, daher kann darüber keine Aussage getroffen werden. Trotzdem kann vermutet werden, dass eventuell dieselben SNPs eine Rolle spielen könnten wie bei sämtlich o.g. Autoren beschrieben.

Zahlreiche weitere Studien berichten von Assoziationen des GABRA2-Rezeptorgens mit der Alkoholauswirkung (Mallard et al. 2018; Lieberman et al. 2015; Enoch 2013; Roh et al. 2011; Villafuerte et al. 2012; Kareken et al. 2010; Bierut et al. 2010; Enoch et al. 2009; M.-A. Enoch 2008; Reich et al. 1998).

Diese Ergebnisse liefern weitere Beweise dafür, dass genetische und epigenetische Varianten innerhalb von GABRA2 mit abgeschwächten negativen Reaktionen auf Alkohol verbunden sind.

Li und Kollegen untersuchten den GABAA-Rezeptor in Zusammenhang mit Alkoholmissbrauch in einer Metaanalyse genetischer Varianten in den GABAA-Rezeptorgenen. Ein signifikanter Zusammenhang wurde zwischen dem GABRA6 SNP rs3219151 und Alkoholabhängigkeit beobachtet. Ihre Studien wurden ausschließlich mit Individuen europäischer Abstammung durchgeführt. Erkenntnisse aus dieser umfangreichen Metaanalyse von fünf GABAA-Rezeptorgenen und Substanzmissbrauch unterstützen ihre Beteiligung (mit der besten Evidenz für GABRA2) an der Pathogenese der Alkoholabhängigkeit (Li et al. 2014).

Lind und Kollegen verglichen die Daten über die Reaktionen auf Alkohol aus der „Alcohol Challenge Twin Study“ (Martin et al. 1985) mit den Informationen über Allele und Haplotypen, die durch die Typisierung von 41 Einzelnukleotid-Polymorphismen im oder in der Nähe des GABRA2-Gens gewonnen wurden. Nominell signifikante allelische Assoziationen wurden für Körperschwankungen, motorische Koordination, Vorwärtsstreben und arithmetisches Rechnen sowie für die neurotische Persönlichkeitsdimension gefunden (Lind et al. 2008).

Es geht im oben Beschriebenen zwar eher um die Reaktionen auf Alkoholkonsum, dennoch kann schlussfolgernd eine Beziehung des GABRA2-Gens zu Alkohol auch hier vermutet werden.

Bereits viele ältere Arbeiten beschäftigten sich mit Alkohol und GABRA2. Einige Autoren konnten schon früher diesbezügliche Zusammenhänge erkennen (Krystal et al. 2006; Saba et al. 2005; Edenberg et al. 2004; Kumar et al. 2004; Covault et al. 2004).

Außerdem zeigte sich auch ein Zusammenhang von GABRA2 mit Drogenabhängigkeit. Die Ergebnisse von Agrawal und Kollegen deuteten auf eine Assoziation zwischen Marihuana-Abhängigkeit und Abhängigkeit von illegalen Drogen mit SNPs im GABRA2-Gen hin (Agrawal et al. 2006).

Dagegen konnten Onori und Kollegen bei 149 italienischen Alkoholikern (98 Alkoholabhängige und 51 Alkoholmissbraucher) und 278 Kontrollpersonen auf Allel-, Genotyp-, Haplotyp- oder Diplotyp-Ebene keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen den untersuchten 3'-GABRA2-Polymorphismen und Alkoholismus finden (Onori et al. 2010). Warum die Autoren hier – als eine der wenigen Untersuchungen – keine Assoziation von Alkohol mit GABRA2 entdecken konnten, darüber lässt sich nur spekulieren. Vielleicht hing es mit der ethnischen Zusammensetzung der Gruppen (ausschließlich Personen italienischer Abstammung) zusammen, vielleicht auch mit der Gruppengröße, des CpG-Clusters oder eventuell mit der Untersuchungsmethode. Wahrscheinlich kann eine Interaktion des gesamten GABAergen Systems mit seinen verschiedenen Rezeptoruntereinheiten mit Alkohol und auch weiteren Drogen postuliert werden.

Insgesamt konnte die überwiegende Anzahl von Arbeiten im Vorfeld den GABAA-Rezeptor mit Alkohol in Verbindung bringen, was in der hier beschriebenen Studie ebenfalls vermutet wird. Allerdings geht es in dieser Dissertation um epigenetische Veränderungen des GABAA-Rezeptors, respektive um die Untereinheit GABRA2. Es

gibt bereits einige Arzneimittel (z.B. Benzodiazepine), die auf den GABAA-Rezeptor einwirken und damit das GABAerge System beeinflussen können. Auch die Wirkung von Alkohol könnte dadurch verändert werden. Vielleicht wäre es möglich, dass Nachkommen von chronischen Alkoholabhängigen bereits genetische und epigenetische Veränderungen am GABAA-Rezeptor haben, die eine erhöhte Alkoholtoleranz implizieren. Das fetale Alkoholsyndrom beziehungsweise die Alkoholembryopathie ist ja ein schon bekanntes Phänomen eines missbräuchlichen Alkoholkonsums in der Schwangerschaft. Eventuell könnte man auch auf diesem Gebiet weitere Forschungen zu epigenetischen und genetischen GABAergen Veränderungen anstellen, um damit die neurobiologische Modulation durch Alkohol weiter zu analysieren.

Da die Forschungen bezüglich der GABRA2-Genetik bisher noch keine hinreichenden Ergebnisse lieferten, könnte eventuell eine epigenetische Analyse weiteren Aufschluss über mögliche Zusammenhänge des GABRA2-Rezeptorgens mit Alkoholmissbrauch bringen. Im Folgenden wird auf epigenetische Veränderungen, respektive die DNA-Methylierung, näher eingegangen.

4.3. Unterschiede des mittleren Prozentsatzes und der Anzahl der methylierten GABRA2-CpG-Stellen zwischen alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

In der vorliegenden Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede des MPGS und der NMGS zwischen alkoholabhängigen Probanden und Kontrollpersonen festgestellt werden. Dies bezieht sich sowohl auf die Methylierung als auch auf Alter, Geschlecht und Raucherstatus sowie auf klinische Charakteristika wie Trinkmenge oder Dauer der Alkoholabhängigkeit.

Da es ja bezüglich der realen Werte zu einem signifikanten Ergebnis kommt, könnte dies natürlich an der Spezifität dieser statistischen Werte liegen, die jeweils einen Mittelwert bilden und vergleichen. Nichtsdestotrotz könnten diese spezifischen statistischen Parameter eventuell auch ein Hinweis dafür sein, dass es für die Erhebung der realen Werte umfangreichere Gruppen bräuchte, um die Signifikanz zu bestätigen. Trotzdem sind die realen Werte hier insofern relevant, da der GABRA2-Rezeptor auch im Vorfeld schon in Verbindung mit Alkohol gebracht werden konnte.

In der Literatur lassen sich keine Studien finden, die diese statistischen Werte erheben und vergleichen, deshalb können diese Ergebnisse nicht weiter verglichen und diskutiert werden, was aber am allgemeinen Resultat nichts ändert.

4.4. Allgemeine DNA-Methylierung sowie Methylierung weiterer Kandidatengene im Zusammenhang mit Alkoholkonsum

Stephenson und Kollegen fanden in einer EWAS (epigenome-wide association studies) eine signifikante Verbindung von Alkoholkonsum mit einer Methylierung an 24 CpG-Stellen des gesamten Genoms. Bei eineiigen Zwillingen wurden vier CpG-Stellen aus der EWAS repliziert und 23 zusätzliche Stellen identifiziert. Diese Analysen gaben Aufschluss über die Zusammenhänge zwischen epigenetischen Varianten und dem Ausmaß des Alkoholkonsums im jungen Erwachsenenalter (Stephenson et al. 2021). Dugué und Kollegen hatten eine groß angelegte genomweite DNA-Methylierungs-Assoziationsstudie zum Alkoholkonsum mit wiederholten Messungen im Abstand von mehreren Jahren durchgeführt. In den Querschnittsanalysen wurden 1414 CpGs identifiziert, die hochsignifikant mit dem Alkoholkonsum assoziiert waren, 1243 davon waren zuvor noch nicht berichtet worden. Diese Studie zeigt, dass der Alkoholkonsum mit weit verbreiteten Veränderungen der DNA-Methylierung im gesamten Genom verbunden ist (Dugué et al. 2021).

Li und Kollegen analysierten in einer großen Studie zur epigenomweiten Assoziation von CpG-Methylierung im Zusammenhang mit Alkoholkonsum den GABBR- und GABRD-Rezeptor und identifizierten eine differentielle Methylierung in GABRD- und GABBR1-Untereinheiten (GABRD: Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta; GABBR1: Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 1). Es wurde eine Hypermethylierung einer einzelnen CpG-Stelle (cg04781796) bei GABRD berichtet, während GABBR1 CpG (cg09577455) eine geringere Methylierung aufwies. Zusammenfassend hatten die Autoren ein robustes DNA-Methylierungsmuster identifiziert und den potenziellen Nutzen der DNA-Methylierung als einen nützlichen klinisch-diagnostischen Test zur Aufdeckung des kritischen Alkoholkonsums aufgezeigt (Liu et al. 2016). Auch hier wurde eine Hypermethylierung – allerdings nicht des GABRA2-Rezeptors – beschrieben, sondern CpG-Stellen von GABRD und GABBR identifiziert. Dies stützt allerdings wieder die Vermutung, dass das GABAerge System vielfältig in die alkoholassoziierten Wirkungsweisen eingebunden ist.

Es wurden einige Methylierungsveränderungen genomweit und für einzelne Kandidatengene in Assoziation mit Alkohol beschrieben – das GABRA2-Rezeptorgen wird dabei seltener erwähnt.

Im Review von Zhang und Gelernter bzgl. des Zusammenhangs einer DNA-Methylierung mit Alkoholmissbrauch fanden sich in zwei Studien erhöhte globale DNA-

Methylierungswerte bei Patienten mit chronischer Alkoholabhängigkeit. Fünfzehn Kandidatengen-Studien zeigten eine Hypermethylierung der Promotorregionen von sechs Genen (AVP, DNMT3B, HERP, HTR3A, OPRM1 und SNCA) oder eine Hypomethylierung der GDAP1-Promotorregion bei alkoholabhängigen Patienten. Fünf genomweite DNA-Methylierungsstudien zeigten weit verbreitete DNA-Methylierungsveränderungen im gesamten Genom bei alkoholabhängigen Patienten. Sechs Studien fanden signifikante Korrelationen der DNA-Methylierung mit der Genexpression bei alkoholabhängigen Patienten. Drei Studien berichteten von interaktiven Effekten bei genetischen Varianten und DNA-Methylierungen auf die Anfälligkeit für Alkoholabhängigkeit. Die meisten Studien analysierten Alkoholabhängigkeit assoziierte DNA-Methylierungsveränderungen im peripheren Blut; einige wenige Studien untersuchten DNA-Methylierungsveränderungen in postmortalen Gehirnen von alkoholabhängigen Patienten (Zhang und Gelernter 2017). Die Promotorregion des GABRA2-Rezeptorgens wurde in der oben genannten Analyse wiederum nicht erwähnt.

Die Resultate von Hillemacher und Kollegen zeigten, dass die Hypermethylierung des DAT (dopamine transporter gene)-Promotors eine wichtige Rolle bei der dopaminergen Neurotransmission spielen könnte und damit mit einem verminderten Alkohol-Suchtverhalten verbunden wäre (Hillemacher et al. 2009). Dagegen kamen Nieratschker und Kollegen zu dem Ergebnis, dass eine Hypermethylierung des DAT bei alkoholabhängigen Patienten eher eine Folge als eine Ursache der Störung ist (Nieratschker et al. 2012).

Eine vorangegangene Studie von Zhu und Kollegen fand eine umgekehrte Korrelation zwischen der LINE-1 (long interspersed nucleotide elements)-Methylierung, als Marker für die globale Methylierung, und dem Alkoholkonsum (Zhu et al. 2012). Daneben berichteten Philibert und Kollegen über eine erhöhte genomweite Methylierung mit einem insgesamt höheren Alkoholkonsum bei Frauen mit unterschiedlichen Trinkmustern, eingeteilt in starken, mäßigen und leichten Alkoholkonsum. Diese Studie umfasste allerdings nur Frauen (Philibert et al. 2012), während die in dieser Dissertation analysierte Studie beide Geschlechter einschloss.

Bleich und Kollegen beobachteten einen signifikanten Anstieg der HERP (homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein)-Promotor-DNA-Methylierung bei Patienten mit Alkoholabhängigkeit im Vergleich zu gesunden Kontrollen, der signifikant mit ihren erhöhten Homocysteinspiegeln verbunden war. Außerdem fanden

sie eine signifikant niedrigere HERP-mRNA-Expression bei Patienten mit Alkoholabhängigkeit im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Bleich et al. 2006).

Bönsch und Kollegen berichteten ebenfalls von höheren globalen Methylierungsniveaus bei Alkoholikern zusammen mit einem erhöhten Level von Plasma-Homocysteinen. In einer folgenden Untersuchung stellten sie fest, dass der Anstieg der genomischen DNA-Methylierung bei Patienten mit Alkoholismus signifikant mit ihrer verminderten DNMT-3b-mRNA-Expression verbunden war (Bönsch et al. 2004 + 2006).

Hillemacher und Kollegen fanden eine signifikant erhöhte promotorbezogene DNA-Methylierung des Vasopressin-Gens bei Patienten mit Alkoholabhängigkeit. Die ANP (atrial natriuretic peptide)-mRNA-Expression war bei alkoholabhängigen Patienten signifikant erhöht, während die Promotor-bezogene DNA-Methylierung von ANP sichtbar verringert war (Hillemacher et al. 2009).

Im Gegensatz dazu fanden mehrere Studien überhaupt keinen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und globaler Methylierung. Dies berichteten Terry und Kollegen zum Beispiel von mehreren Studien, die keine Assoziation zwischen Alkoholkonsum und LINE1-Methylierung fanden. Allerdings beschrieben sie, dass die genspezifische DNA-Methylierung nicht umfassend in Verbindung mit Alkoholkonsum untersucht wurde (Terry et al. 2011).

Eine Studie von Manzardo und Kollegen benutzte methylierungsspezifische Microarrays der DNA, die aus dem frontalen Kortex von zehn Alkoholikern und Kontrollen isoliert wurden. Wieder wurden keine Unterschiede in der globalen Methylierung zwischen den Gruppen aufgedeckt (Manzardo et al. 2012).

Die meisten Studien berichteten über eine Hypermethylierung von CpG-Stellen einiger Kandidatengene, die eine Herunterregulierung der Genexpression zur Folge hatte.

Dagegen konnten auch in einigen wenigen Studien Hypomethylierungen bestimmter Kandidatengene festgestellt werden. Fünfzehn Kandidatengen-Studien im Review von Zhang und Gelernter zeigten eine Hypermethylierung der Promotorregionen von sechs Genen oder eine Hypomethylierung der GDAP1-Promotorregion bei AUD-Patienten (Zhang und Gelernter 2017).

Des Weiteren wurden einige unterschiedliche Kandidatengene und genomweite DNA-Methylierungen analysiert, was zusätzlich dazu führen könnte, dass es entweder zu einer Hyper- oder zu einer Hypomethylierung kommt. Dahingehend müsste es weiterführende genspezifische Forschungsarbeiten geben.

4.5. Einfluss von Alter, Geschlecht und Raucherstatus auf epigenetische Veränderungen des GABAA-Rezeptors

4.5.1. Einfluss des Geschlechts auf eine epigenetische Veränderung des GABAA-Rezeptors

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss des Geschlechts auf eine GABRA2-Methylierung festgestellt werden. Das GABRA2-Gen der männlichen Probanden der Kontrollgruppe war allerdings signifikant hypomethyliert. In der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten konnte diesbezüglich keine Signifikanz festgestellt werden.

Auch Dick und Kollegen widmeten sich diesem Thema und kamen zu folgenden Ergebnissen. Sie führten für den am meisten untersuchten und replizierten SNP in GABRA2 rs279858 zusätzliche geschlechterspezifische Testungen durch. Nur Frauen, die für das Major-Allel homozygot waren, zeigten einen großen Sprung in der Trunkenheit zwischen 18 und 19 Jahren. Männer, die homozygot für das Major-Allel waren, wiesen auch die höchsten Werte der Trunkenheit auf, allerdings beschränkte sich die Signifikanz nur auf einen SNP. Männer zeigten insgesamt ein höheres Maß an Trunkenheit auf, was dazu beitrug, dass es keine signifikanten genotypischen Unterschiede gab (Dick et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden keine GABRA2-SNP-Analysen durchgeführt, die möglicherweise die Ergebnisse präzisieren hätten können. Trotzdem kann man auch hier von einem Hinweis auf geschlechterspezifische Veränderungen sprechen, die zwar nicht genetisch, aber auf epigenetischer Grundlage zu erklären wären.

Die Ergebnisse aus einer aktuellen Studie von Meyer-Bockenamp und Kollegen zeigen geschlechtsspezifische Auswirkungen von Alkoholmissbrauch (AUD) auf die Methylierung des GABBR1-Promotors. Insbesondere CpG-4 zeigte signifikante gewebeunabhängige Veränderungen und signifikant verringerte Methylierungsniveaus für die AUD-Gruppe in der Amygdala und den Mamillarkörpern von Männern. In allen untersuchten Geweben konnten sie auffällige und konsistente Veränderungen von CpG-4 feststellen. Bei Frauen wurden keine signifikanten Loci beobachtet (Meyer-Bockenamp et al. 2023).

In der vorliegenden Arbeit konnte die GABRA2-Promotorregion signifikante Ergebnisse bezüglich einzelner CpG-Stellen liefern. Diese Stellen müssen im Einzelnen noch näher analysiert werden und könnten in der Zukunft auch ein möglicher therapeutischer Ansatz in der Behandlung eines chronischen Alkoholmissbrauchs sein. Geschlechtsspezifische Unterschiede konnten auch hier

beobachtet werden, allerdings waren Männer der Kontrollgruppe signifikant hypomethyliert.

Meyer-Bockenkamp und Kollegen beobachteten ähnliche Phänomene bei alkoholkranken Männern in einem spezifischen Locus des GABBR1-Promotors (Meyer-Bockenkamp et al. 2023). Genomweite Methylierungsanalysen lieferten vergleichbare Beobachtungen. In einer Studie mit 161 Individuen hatten jedoch die weiblichen Probanden niedrigere globale Methylierungen als die männlichen, wobei der Alkoholkonsum nicht signifikant korrelierte (Zhang et al. 2011).

Dagegen berichteten Philibert und Kollegen über eine erhöhte genomweite Methylierung mit einem insgesamt höheren Alkoholkonsum bei Frauen mit unterschiedlichen Trinkmustern, eingeteilt in starken, mäßigen und leichten Alkoholkonsum. Diese Studie umfasste allerdings nur Frauen (Philibert et al. 2012). Im Umkehrschluss könnte man hier interpretieren, dass Männer eher eine genomweite Hypomethylierung aufweisen würden. Das deckt sich wiederum mit den hier beschriebenen Ergebnissen, wobei die signifikante Hypomethylierung bei Männern der Kontrollgruppe auftrat. Natürlich könnte man das auf das spezifische CpG-Cluster des GABRA2-Promotors schieben, das hier untersucht wurde – Philibert und Kollegen stellten genomweite Forschungen an. Trotzdem finden sich auch hier Andeutungen, das Geschlecht bei der Beurteilung von epigenetischen Veränderungen nicht außer Acht zu lassen.

Dass die geschlechtsspezifischen Ergebnisse in den verschiedenen Untersuchungen doch so inhomogen bezüglich einer Hyper- oder Hypomethylierung bei Alkoholmissbrauch sind, könnte eventuell auch an der Zusammensetzung der jeweiligen Gruppen und der Anzahl der Probanden gelegen haben. Manche Studien untersuchten nur Frauen (Philibert et al. 2012), einige nur Männer (Kim et al. 2016, Semmler et al. 2015). In der vorliegenden Untersuchung wurden beide Geschlechter nahezu gleichermaßen berücksichtigt. Auch hier fand sich eine Signifikanz einer Hypomethylierung bei männlichen Individuen der Kontrollgruppe.

Es könnte auch hypothetisiert werden, dass das Geschlecht tatsächlich Einfluss auf eine epigenetische Veränderung bestimmter Kandidatengene, einschließlich GABAA, haben könnte. Die Gruppengrößen müssten allerdings größer sein als in der vorliegenden Arbeit, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Dennoch scheint eher das männliche Geschlecht vielleicht mit einer Assoziation in Bezug auf epigenetische Veränderungen, respektive einer Methylierung bei Alkoholmissbrauch, verbunden zu sein.

4.5.2. Einfluss des Alters auf eine epigenetische Veränderung des GABAA-Rezeptors

Es zeigte sich - ebenfalls in der Kontrollgruppe - eine altersabhängige Methylierung, wobei ältere Patienten im Vergleich zu jüngeren höher methyliert waren.

Tatsächlich fanden sich in zwei oben schon erwähnten Studien von Stephenson bzw. Dugué und Kollegen ebenfalls tendenzielle Zusammenhänge einer Methylierung mit dem Alter, allerdings beschrieben sie jeweils genomweite Methylierungsanalysen. Während bei Stephenson und Kollegen von epigenetischen Varianten, respektive einer Methylierung, und dahingehende Veränderungen im jungen Erwachsenenalter sprechen (Stephenson et al. 2021), stellten Dugué und Kollegen fest, dass sich der Methylierungsstatus von alkoholassoziierten CpGs mit dem Alkoholkonsum im Erwachsenenalter ändern kann (Dugué et al. 2021).

Zhu und Kollegen fanden heraus, dass das Alter und der Alkoholkonsum umgekehrt assoziiert mit der Alu-Methylierung waren (Zhu et al. 2012). Das würde also heißen, dass ältere und alkoholabhängige Menschen eher eine Alu-Hypomethylierung aufweisen. Zhu und Kollegen erwähnen aber nicht direkt, ob Alter und Alkoholkonsum korrelierten, oder einzeln untersucht wurden.

Ein progressiver Methylierungsanstieg mit fortschreitendem Alter konnte von Siegmund und Kollegen unter anderem auch für GABRA2 gezeigt werden. Sie untersuchten den DNA-Methylierungsstatus an 50 Loci im temporalen Neokortex von 125 Probanden im Alter zwischen der 17. Schwangerschaftswoche (postmortales fetales Hirngewebe) und 104 Jahren. Ein robuster und progressiver Anstieg der DNA-Methylierungswerte über die Lebensspanne wurde für 8/50 Loci beobachtet, darunter GABRA2, GAD1, HOXA1, NEUROD1, NEUROD2, PGR, STK11 und SYK, typischerweise in Verbindung mit sinkenden Werten der entsprechenden mRNAs. Weitere 16 Loci wurden durch einen starken Anstieg der DNA-Methylierungswerte innerhalb der ersten Monate oder Jahre nach der Geburt definiert. In oben genannter Untersuchung wurden DNA-Methylierungen ohne Alkoholeinfluss in verschiedenen Lebensphasen dargestellt (Siegmund et al. 2007).

Kim sowie Semmler und Kollegen entdeckten ebenfalls höhere globale Methylierungsniveaus im Zusammenhang mit erhöhtem Alkoholkonsum bei Männern, die entweder hinsichtlich des Alters übereinstimmten, oder das Alter hing nicht mit dem Methylierungsmuster zusammen (Kim et al. 2016, Semmler et al. 2015). Auch bei Zhang und Kollegen hatten die männlichen Probanden höhere globale Methylierungen

als die weiblichen, allerdings korrelierten das Alter sowie der Alkoholkonsum nicht signifikant (Zhang et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit fand sich ebenfalls eine signifikant höhere Methylierung des GABRA2-Promotors bei älteren Personen der Kontrollgruppe, was die Untersuchung von Siegmund und Kollegen untermauern würde. Man könnte dabei zu der Annahme gelangen, dass der Methylierungsgrad bestimmter Gene im Alter – unabhängig von Umwelteinflüssen – zunimmt. Ein vermehrter Alkoholkonsum könnte so wieder zu einer Hypomethylierung, zum Beispiel auch des GABRA2-Gens, führen. Im Umkehrschluss könnte man erwägen, ob jüngere Menschen, die nach oben erwähnten Ergebnissen von vornherein in bestimmten Genen eine Hypomethylierung aufweisen, vielleicht anfälliger für einen Alkoholmissbrauch wären. Zusätzlich zeigen diese und andere Ergebnisse – wie oben bereits besprochen - eine signifikante Hypomethylierung bei männlichen Individuen der Kontrollgruppe. Dies würde wieder die statistischen Zahlen bestätigen, dass der Alkoholkonsum bei jüngeren Männern deutlich höher ist als bei den Frauen.

So variieren die globalen Methylierungsmessungen in der Blut-DNA in Abhängigkeit von bestimmten individuellen und Lebensstilmerkmalen, einschließlich Alter, Geschlecht und Alkoholkonsum. Sie können gruppenspezifisch auch von der Komorbidität somatischer und psychischer Störungen abhängig sein.

Es wäre dahingehend möglich, dass sich epigenetische Varianten, wie zum Beispiel eine DNA-Methylierung im Alterungsprozess verändern könnten. Ob dabei auch Umwelteinflüsse eine Rolle spielen, sei dahingestellt. Vielleicht könnten Forschungen eine Möglichkeit aufzeigen, wie bei Jüngeren bereits durch therapeutische Maßnahmen in epigenetische Prozesse eingegriffen werden könnte, um dann eventuell „negative“ Veränderungen im Alter abzuwenden.

4.5.3. Einfluss des Raucherstatus auf eine epigenetische Veränderung des GABAA-Rezeptors

Eine Studie von Staley und Kollegen mit SPECT-Analyse (single-photon emission computed tomographic scan) im Gehirn zeigte, dass die (123)I-Iomazenil-Aufnahme in mehreren kortikalen Regionen, einschließlich im Hippocampus und der Amygdala, aber insbesondere im frontalen Kortex, erhöht war. Es könnte wahrscheinlich als Ausdruck einer reduzierten GABAA-Rezeptorfunktion interpretiert werden. Dies wurde insbesondere bei nichtrauchenden Alkoholikern im Vergleich zu Rauchern mit

Alkoholabhängigkeit nach einer Woche Alkoholabstinenz gefunden. Bei Rauchern mit Alkoholabhängigkeit wurden keine signifikanten Zusammenhänge beobachtet. Eventuell kann die reduzierte GABAA-Rezeptorfunktion auf eine Methylierung desselben hindeuten (Staley et al. 2005).

Die oben genannte Studie zeigt hier keinen Zusammenhang einer reduzierten GABAA-Rezeptorfunktion mit Nikotinkonsum. Im Gegenteil – eine Downregulation des Rezeptors, und damit eine eventuelle Methylierung, findet sich eher bei Nichtrauchern. Dies deckt sich mit der Untersuchung der vorliegenden Dissertation, in der ebenfalls kein Zusammenhang zwischen einer Methylierung des GABRA2-Promotors und dem Raucherstatus gefunden werden konnte.

Auch Kim und Kollegen fanden keine Assoziation von Zigarettenrauchen, Alkoholkonsum sowie Fettleibigkeit mit der DNA-Methylierung der Leukozyten (Kim et al. 2009).

Dagegen stellten Semmler und Kollegen einen Zusammenhang der globalen DNA-Methylierung mit Alkoholkonsum und Rauchen fest. Die DNA-Methylierung war weder mit den Homocystein- oder Vitamin-Plasmaspiegeln noch mit den getesteten genetischen Varianten des Homocystein-Stoffwechsels korreliert. Dies deutete auf einen direkten Effekt von Alkoholkonsum und Rauchen auf die DNA-Methylierung hin, der nicht durch Effekte von Alkohol auf den Homocystein-Stoffwechsel vermittelt wird (Semmler et al. 2015).

Auch was den Nikotinkonsum mit oder ohne Alkoholmissbrauch betrifft, müsste noch gezielt weiter geforscht werden. In den oben genannten Analysen wurden meist globale DNA-Methylierungen in diesem Kontext untersucht, wobei sich Staley und Kollegen ebenfalls dem GABAA-Rezeptor widmeten. Trotzdem sind die Aussagen darüber inhomogen. Die hier vorliegende Analyse des GABRA2-Rezeptorgens kann diesbezüglich ebenfalls keine valide Aussage treffen, da der Raucherstatus bei der Kontrollgruppe nicht erhoben wurde und somit Vergleichswerte fehlen.

4.6. Einfluss klinischer Charakteristika auf den GABAA-Rezeptor sowie auf weitere (epi-) genetische Veränderungen

In dieser Arbeit konnte kein Einfluss jedweder klinischen Charakteristika, einschließlich täglicher und maximaler Trinkmenge, Entzugssymptomatik, Dauer der Alkoholabhängigkeit und Schweregrad des körperlichen Entzugs auf die GABRA2-Methylierung festgestellt werden. Allerdings war die Dauer der Alkoholabhängigkeit grenzwertig

signifikant ($p = .062$) mit einer allgemeinen Hypomethylierung des GABRA2-Promotors verknüpft. Daraus wäre schon abzuleiten, dass ein längerer Alkoholabusus über Jahre eventuell doch einen Einfluss auf die DNA-Methylierung hätte.

Eine Studie von Brückmann und Kollegen berichtet über einen negativen Zusammenhang zwischen der GDAP1-Methylierung und den Jahren der Alkoholabhängigkeit auf einem statistischen Trendniveau (Brückmann et al. 2016). Das würde wiederum die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung untermauern, um eventuell eine progrediente Hypomethylierung mit der Dauer der Alkoholabhängigkeit in Verbindung zu bringen, allerdings untersuchten Brückmann und Kollegen nicht GABRA2 sondern GDAP1, deshalb sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar, könnten aber auf eine allgemeine DNA-Hypomethylierung mit zunehmender Dauer der Alkoholabhängigkeit hinweisen.

Dagegen berichteten Nieratschker und Kollegen über eine signifikante und inverse Beziehung zu klinischen Variablen wie Dauer der Alkoholabhängigkeit, Alkoholkonsum und Entzugsschwere, die darauf hinweisen kann, dass ein schwererer Verlauf der Alkoholabhängigkeit zu einem niedrigeren GABRA2-mCpG führen kann. Obwohl statistisch nicht signifikant, neigten Personen mit einer Kombination aus erhöhtem Alkoholkonsum, längerer Dauer und schwerwiegenderem Entzug zu einem niedrigeren GABRA2-mCpG. Chronischer und langfristiger Alkoholkonsum könnte daher bei alkoholabhängigen Probanden zu einer geringeren GABRA2-CpG-Methylierung und einer höheren Genexpression führen (Nieratschker et al 2013). Das deckt sich wiederum mit den, in dieser Analyse gefundenen Ergebnissen, wo ebenfalls eine grenzwertig signifikante allgemeine GABRA2-Hypomethylierung in Korrelation mit der Dauer der Alkoholabhängigkeit auftrat. Demnach ist auch hier eine aussagekräftige epigenetische Veränderung durch einen langjährigen Alkoholmissbrauch zu vermuten.

Außerdem konnten Krishnan und Kollegen zeigen, dass die durch akute Ethanol-Exposition hervorgerufene Anxiolyse mit einer Dekondensation des Chromatins verbunden ist. Wiederholte Ethanolexposition führe allmählich zu einem anhaltenden Trinkphänotyp und beim Entzug zu einer Chromatinkondensation und einer verstärkt ängstlichen Persönlichkeit, was wiederum einen erhöhten Konsum fördere (Krishnan et al. 2014). Die Veränderung in der vorangegangenen erwähnten Arbeit bezieht sich zwar primär nicht auf eine Methylierung, zeigt aber, dass sich mit progredientem

Alkoholkonsum über die Jahre eine erhöhte Transkriptionsaktivität der DNA also eventuell auch eine erhöhte Genexpression entwickeln könnte.

Ausmaß und Dauer des Alkoholkonsums sowie die Schwere des Alkoholentzugs könnten mehrere Kandidatengen-CpG-Hypomethylierungen beeinflussen und zu einer veränderten Genexpression bei diesen Personen führen, um entweder mit chronischem und hohem Alkoholkonsum oder mit der Schwere des Entzugs umgehen zu können (Brückmann et al. 2016, Varela-Rey et al. 2013).

Staley und Kollegen fanden ebenfalls in ihrer SPECT-Analyse nach einer Woche Alkoholabstinenz eine Korrelation der frontalen (123)I-Iomazenil-Aufnahme mit dem Schweregrad des Alkoholentzugs und der Anzahl der Tage seit dem Konsum des letzten alkoholischen Getränks (Staley et al. 2005).

Wie oben beschrieben, decken sich die meisten Ergebnisse mit der vorliegenden Studie, die eine grenzwertig signifikante Korrelation einer Hypomethylierung mit der Dauer der Alkoholabhängigkeit fand. Weitere Forschungen könnten diesbezüglich in die Richtung gehen, Hypomethylierungen bestimmter Gene zum Beispiel medikamentös prophylaktisch zu unterdrücken, um die Expression dieser Gene zu verringern, um damit wiederum einen fortlaufenden Alkoholmissbrauch zu verhindern.

4.7. Studiendesign und Limitationen

Diese Dissertation befasst sich mit zwei Kriterien. Zuerst wurde die globale GABRA2-Promotor-Methylierung in einer Gruppe alkoholabhängiger Personen gemessen. Es zeigte sich eine allgemeine Hypomethylierung des GABRA2-Rezeptorgens sowie der einzelnen GABRA2-CpGs bei Alkoholikern. Des Weiteren korrelierte die allgemeine GABRA2-Methylierung in dieser Probe nicht mit dem Alter, während die männlichen Probanden der Kontrollgruppe eine signifikant niedrigere generelle Methylierung hatten als die weiblichen. Zusätzlich trat in der Kontrollgruppe eine höhere allgemeine Methylierung mit zunehmendem Alter auf.

Natürlich hat die Studie mehrere Einschränkungen, zum Beispiel eine eher kleine Stichprobengröße. Daher kann die Verallgemeinerung der Ergebnisse begrenzt sein. Trotzdem wurden beide Geschlechter in einem ausgewogenen Verhältnis berücksichtigt sowie homogene Gruppen bezüglich Alter und Geschlecht gebildet. Dies ist wiederum ein guter Querschnitt der Bevölkerung und könnte den Ergebnissen durchaus Relevanz einräumen.

Zweitens entsprechen die DNA-Methylierungswerte in den peripheren Blutzellen möglicherweise nicht denen im Hirngewebe. Da die belohnende bzw. euphorisierende Wirkung von Alkohol durch das Belohnungszentrum des Gehirns vermittelt wird, wäre es unter Umständen angemessener, menschliches postmortales Hirngewebe zu verwenden, um die DNA-Methylierung im Zusammenhang mit dem Risiko einer Alkoholabhängigkeit zu untersuchen. Da Alkohol jedoch nicht nur auf das Gehirn, sondern auf den ganzen Körper wirkt, könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass es trotz der zelltyp-spezifischen Natur der DNA-Methylierungsmuster eine signifikante Überschneidung zwischen den Methylierungsveränderungen im Gehirn und im peripheren Blut geben könnte. Auch in der schon vorhandenen Literatur gibt es einige Arbeiten, die DNA aus peripherem Blut gewinnen und damit Ihre Ergebnisse liefern (z.B. Liu et al. 2016). Da auch hier ein signifikantes Ergebnis präsentiert werden kann, scheint es dahingehend keine relevanteren Einschränkungen zu geben.

Auch in einer Übersichtsarbeit von Zhang und Gelernter analysierten die meisten Studien DNA-Methylierungsveränderungen alkoholabhängiger Individuen im peripheren Blut (Zhang und Gelernter 2017). Somit scheint es nicht notwendig, die DNA ausschließlich aus Stammzellen bzw. zerebral zu extrahieren.

Darüber hinaus ist die Verwendung von peripherem Gewebe ein valider Ansatz, da es eine Notwendigkeit für die Identifizierung von Biomarkern mit potenziellem klinischem Nutzen darstellt. Um diese Biomarker zu identifizieren, benötigt man ein Material, das leicht zugänglich ist und in großen Proben von Patienten und Kontrollpersonen untersucht werden kann. Peripheres Blut zeigt sich dafür als ein geeignetes und bequemes Gewebe für diesen Zweck (Nieratschker et al. 2013).

Ferner wurde die Hypomethylierung von GABRA2-CpGs nicht durch Genexpression von GABRA2-Untereinheiten überprüft. Es wird vermutet, dass eine geringere Methylierung zu einer höheren GABRA2-Genexpression führen kann. Dies muss jedoch der zukünftigen Forschung vorbehalten bleiben, wobei es durchaus Arbeiten gibt, die eine Verbindung zwischen einer Hypo- bzw. Hypermethylierung und einer erhöhten bzw. verminderten Genexpression beschreiben (z.B. Khalid et al., 2014, Zhang und Gelernter, 2017).

Der Zeitpunkt und die Stabilität der Methylierung könnte ein weiterer kritischer Punkt in epigenetischen Studien sein. Für eine angemessene Bewertung der epigenetischen Veränderungen unter dem Einfluss des Alkoholkonsums im Laufe der Zeit sind Längsschnittstudien erforderlich.

Zudem muss man selbstverständlich berücksichtigen, dass in der hier analysierten Studie ein bestimmtes Cluster von CpG-Stellen der Promotorregion des GABRA2-Rezeptorgens untersucht wurde, das sich im Aufbereitungsverfahren geeignet erwies. Trotzdem könnte es natürlich weitere Cluster von CpG-Stellen geben, die eine Relevanz bezüglich Alkoholkonsum hätten. Ob diese dann eher hyper- oder hypomethyliert wären, sei dahingestellt.

Nichtsdestotrotz konnte hier ein CpG-Cluster des GABRA2-Rezeptors gefunden werden, welches eine signifikante Hypomethylierung bei alkoholtrinkenden Probanden zeigte. Da das GABRA2-Gen bisher als epigenetisches Kandidatengen eher wenig Aufmerksamkeit genoss, könnten diese Ergebnisse durchaus relevant sein und verdienen sicher weitere Forschungsarbeit. Darüber hinaus repräsentieren die Ergebnisse der explorativen Studie dieser Dissertation einen guten Ausgangspunkt für weitere Analysen in größeren und noch umfassender charakterisierten Kollektiven.

5. Schlussfolgerung

Neuere Studien haben eindeutig erwiesen, dass GABAA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Alkoholabhängigkeit spielen und die funktionellen Eigenschaften des GABAA-Rezeptors nach chronischer Ethanolverabreichung verändert sind. Allerdings sind die genauen Mechanismen, die für die Veränderungen der GABAA-Rezeptorfunktion nach chronischer Ethanolverabreichung verantwortlich sind, noch nicht geklärt. Die Mechanismen, die für die Anpassung der GABAA-Rezeptoren an die chronische Ethanol-Exposition verantwortlich sind, könnten ethanolinduzierte Veränderungen der Zelloberflächen-Expression, der subzellulären oder der synaptischen Lokalisation, der Rezeptor-Phosphorylierung, der Neurosteroid- und/oder Veränderungen in der Zusammensetzung der GABAA-Rezeptor-Untereinheiten beinhalten.

Die Forschungen bezüglich der genetischen und/oder epigenetischen GABRA2-Varianten und deren Assoziation mit dem Alkoholabhängigkeitsrisiko sind jedoch nicht einstimmig und eher erst am Anfang und zum Teil widersprüchlich.

Über die Rollen jeder einzelnen CpG-Stelle innerhalb der GABRA2-Promotorregion und ihre klinische Relevanz ist jedoch wenig bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern ein potenziell relevantes Cluster von CpG-Stellen innerhalb des GABRA2-Promotors, dessen Methylierung eventuell mit Alkoholmissbrauch bzw.

Mechanismen der Alkoholabhängigkeitsentstehung korreliert. Epigenetische Veränderungen der GABAergen Gene können nachweislich auf vielfältige Weise durch chronischen Alkoholkonsum beeinflusst werden.

Da auch weitere Kandidatengene dahingehend untersucht wurden, könnte das Aufschluss darüber geben, dass einzelne Gene nicht gleich auf erhöhten Alkoholkonsum beziehungsweise auf weitere Noxen oder Umwelteinflüsse reagieren. Es könnten im Verlauf Vorteile für eventuelle Therapieansätze sein, wenn bestimmte Kandidatengene mit speziellen Noxen in Verbindung gebracht werden könnten. Vielleicht wäre in Zukunft durch mehr Transparenz eine gezielterer Therapieansatz für Suchtkranke möglich.

Obwohl in der vorliegenden Dissertation keine GABRA2-Genexpressionsanalysen durchgeführt wurden, könnte eine Hypomethylierung bei Probanden mit Alkoholkrankheit auf eine höhere Expression dieser GABAA-Rezeptor-Untereinheit hinweisen.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen eine Assoziation des GABRA2-Rezeptors mit Alkoholmissbrauch. Auch ein Einfluss des Geschlechts, des Alters und der Dauer der Alkoholabhängigkeit ist vermutbar und verdient sicher weiterer Aufmerksamkeit.

Vielleicht wäre sogar ein pränataler Ansatz diesbezüglich möglich, um schon früh in eventuelle Auswirkungen von epigenetischen Merkmalen eingreifen zu können. In näherer Zukunft gäbe es damit eventuell Therapieansätze, um Alkoholmissbrauch und weitere Suchterkrankungen behandeln zu können.

Zukünftige Forschungsarbeiten sind erforderlich, um potenzielle Beteiligungen epigenetischer Mechanismen im GABRA2-Gen mit Auswirkungen auf die GABRA2-Genexpression in der Pathophysiologie der Alkoholabhängigkeit besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

Agrawal, A., Edenberg, H.J., Foroud, T., Bierut L.J., Dunne, G., Hinrichs, A.L., Nurnberger, J.L., Crowe, R., Kuperman, S., Schuckit, M.A., Begleiter, H., Porjesz, B., Dick, D.M., 2006, Association of GABRA2 with drug dependence in the collaborative study of the genetics of alcoholism sample, *Sep*; 36(5):640-50. doi: 10.1007/s10519-006-9069-4.

Atzendorf, J., Rauschert, C., Seitz, NN., Lochbühler, K., Kraus, L., 2019, The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines: An Estimate of Consumption and Substance-Related Disorders in Germany. *Deutsches Ärzteblatt*, 116(35-36), 577-584 2019 Sep 2;116(35-36): 577-584. doi: 10.3238/arztebl.2019.0577.

AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften), Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN), Deutsche Gesellschaft für Suchtforschung und Suchttherapie e.V. (DG-SUCHT) unter Leitung von Prof. Dr. Falk Kiefer, Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, S3-Leitlinie: „Screening, Diagnose und Behandlung alkoholbezogener Störungen“, AWMF-Register Nr. 076-001

Babor, T.F., Hofmann, M., DelBoca, F.K., Hesselbrock, V., Meyer, R.E., Dolinsky, Z.S., Rounsaville, B., 1992, Types of alcoholics, I. Evidence for an empirically derived typology based on indicators of vulnerability and severity. *Arch. Gen. Psychiatr.* 49: 599–608

Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., & Weiber, R., 2006. *Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung* (11th ed.). Berlin: Springer.

Batra, A., Müller, C. A., Mann, K., Heinz, A., *Deutsches Ärzteblatt* 17/2016, Abhängigkeit und schädlicher Gebrauch von Alkohol; Jahrgang 113: 301-0; doi: 10.3238/arztebl.2016.0301.

Baumgartel, K., Zelazny, J., Timcheck, T., Snyder, C., Bell, M., Conley, Y., 2011, *Molecular genomic research designs*. doi: 10.1891/0739-6686.29.1.

Bierut, L.J., Agrawal, A., Bucholz, K.K., Doheny, K.F., Laurie, C., Pugh, E., Fisher, S., Fox, L., Howells, W., Bertelsen, S., Hinrichs, A.L., Almasy, L., Breslau, N., Culverhouse, R.C., Dick, D.M., Edenberg, H.J., Foroud, T., Gruzca, R.A., Hatsukami, D., Hesselbrock, V., Johnson, E.O., Kramer, J., Krueger, R.F., Kuperman, S., Lynskey, M., Mann, K., Neuman, R.J., Nöthen, M.M., Nurnberger, J.I. Jr, Porjesz, B., Ridinger, M., Saccone, N.L., Saccone, S.F., Schuckit, M.A., Tischfield, J.A., Wang, J.C., Rietschel, M., Goate, A.M., Rice, J.P., 2010, A genome-wide association study of alcohol dependence. *Mar* 16;107(11):5082-7. doi: 10.1073/pnas.0911109107. Epub 2010 Mar 2.

Bleich, S., Lenz, B., Ziegenbein, M., Beutler, S., Frieling, H., Kornhuber, J., Bönsch, D., 2006, Epigenetic DNA hypermethylation of the HERP gene promoter induces down-regulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependence Apr;30(4):587-91. doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00068.x.

Bode und Bode 2005, Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? 2005 Nov;29(11 Suppl):166S-71S. doi: 10.1097/01.alc.0000189280.19073.28.

Bönsch, D., Lenz, B., Reulbach, U., Kornhuber, J., Bleich, S., 2004, Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. Dec;111(12): 1611-6. doi: 10.1007/s00702-004-0232-x,

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, Sep; 113(9):1299-304. doi: 10.1007/s00702-005-0413-2. Epub 2006 Feb 6.

Boyd, S.J., Schacht, J.P., Prisciandaro, J.J., Voronin, K., Anton, R.F., 2015, Alcohol-Induced Stimulation Mediates the Effect of a GABRA2 SNP on Alcohol Self-Administered among Alcohol-Dependent Individuals; Alcohol and Alcoholism, 2016, 51(5) 549–554 doi: 10.1093/alcalc/agw024 Advance Access Publication Date: 27 April 2016.

Brückmann, C. Di Santo, A., Karle, K.N., Batra, A., Nieratschker, V., 2016, Validation of differential GDAP1 DNA methylation in alcohol dependence and its potential function as a biomarker for disease severity and therapy outcome. Jun 2;11(6):456-63. doi: 10.1080/15592294.2016.1179411. Epub 2016 Apr 29.

Bucholz, K.K., Cadoret, R., Cloninger, C.R., Dinwiddie, S.H., Hesselbrock, V.M., Nurnberger, J.L. Jr, Reich, T., Schmidt, I., Schuckit, M.A., 1994, A new, semi-structured psychiatric interview for use in genetic linkage studies: a report on the reliability of the SSAGA. Mar;55(2):149-58. doi: 10.15288/jsa.1994.55.149.

Bundesministerium der Finanzen: Kassenmäßige Steuereinnahmen nach Steuerarten (2021). Berlin, Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen, Süchte, Alkohol: Zahlen, Daten, Fakten.

Cadet, J.L., McCoy, M.T., Jayanthi, S., 2016, Epigenetics and Addiction, Review, Clin. Pharmacol Ther. 2016 May; 99(5):502-11. doi: 10.1002/cpt.345.Epub 2016 Feb 22. PMID: 26841306, PMCID: PMC8252834, doi: 10.1002/cpt.345.

Clarke, B.Y., Kleine Tode (Roman), MEPS (Medical Event & Publisher Services GmbH), Nürnberg, 1. Auflage 2017, ISBN 978-3-945267-04-2, Seiten 220-221.

Cloninger, C.R., Bohman, M., Sigvardsson, S., 1981, Inheritance of alcohol abuse. Cross-fostering analysis of adopted men. Arch. Gen. Psychiatr. 38: 861–868.

Cloninger, C.R., Sigvardsson, S., 1996, Type I and Type II Alcoholism: An Update, 1996;20(1):18-23. PMID: 31798167 PMCID: PMC6876531.

Cohen, J., 1988, Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences (2nd ed.). Routledge. doi.org/10.4324/9780203771587.

Covault, J., Gelernter, J., Hesselbrock, V., Nellissery, M., Kranzler, H.R., 2004, Allelic and haplotypic association of GABRA2 with alcohol dependence. Aug 15;129B (1):104-9. doi: 10.1002/ajmg.b.30091.

Di Chiara, G., Imperato, A., 1988, Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats, 1988 Jul;85(14):5274-8. doi: 10.1073/pnas.85.14.5274.

Dick, D.M., Cho, S.B., Latendresse, S.J., Aliev, F., Nurnberger, J.I. Jr, Edenberg, H.J., Schuckit, M., Hesselbrock, V.M., Porjesz, B., Bucholz, K., Wang, J.-C., Goate, A., Kramer, J.R., Kuperman, S., 2013, Genetic influences on alcohol use across stages of development: GABRA2 and longitudinal trajectories of drunkenness from adolescence to young adulthood. doi:10.1111/adb.12066.

Dragic, D., Chang, S.-L., Ennour-Idrissi, K., Durocher, F., Severi, G., Diorio, C., 2022, Association between alcohol consumption and DNA methylation in blood: a systematic review of observational studies, 2022 Jun;14(12):793-810. doi: 10.2217/epi-2022-0055. Epub 2022 Jun 28.

Dugué, P.-A., Wilson, R., Lehne, B., Jayasekara, H., Wang, X., Jung, CH., Joo, JiiHoon E., Makalic, E., Schmidt, DF., Baglietto, L., Severi, G., Gieger, C., Ladwig, K.-H., Peters, A., Kooner, JS., Southey, MC., English, DR., Waldenberger, M., Chambers, JC., Giles, GG., Milne, RL., 2021, Alcohol consumption is associated with widespread changes in blood DNA methylation: Analysis of cross-sectional and longitudinal data, 2021 Jan;26(1):e12855. doi: 10.1111/adb.12855. Epub 2019 Dec 2.

Duncan, J., Johnson, S., Ou, X.-M., 2012, Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism., 2012 Jun;6(3):112-22. PMID: 22890201

Edenberg, H.J., Dick, D.M., Xuei, X., Tian, H., Almasy, L., Bauer, L.O., Crowe, R.R., Goate, A., Hesselbrock, V., Jones, K., Kwon, J., Li, T.K., Nurnberger, J.I. Jr, O'Connor, S.J., Reich, T., Rice, J., Schuckit, M.A., Porjesz, B., Foroud, T., Begleiter, H., 2004, Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations; Abstract. doi:10.1086/383283 PMCID: PMC1181946, Am J Hum Genet. 2004 Apr; 74(4): 705-14. Epub 2004 Mar 12.

Edenberg, H.J., Foroud, T., 2014, Genetics of alcoholism; 125:561-71. doi: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00032-X.

Effertz, T., 2020, Die volkswirtschaftlichen Kosten von Alkohol- und Tabakkonsum in Deutschland. In: Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (Hrsg.): DHS Jahrbuch Sucht 2020. Lengerich: Pabst Science Publishers.

Embrechts, P., Lindskog, F., McNeil, A., 2001, Modelling Dependence with Copulas and Applications to Risk Management, Department of Mathematics ETHZ, CH-8092 Zürich, Switzerland

Enoch, M.A., Hodgkinson, C.A., Yuan, Q., Albaugh, B., Virkkunen, M., Goldman, D., 2009, GABRG1 and GABRA2 as independent predictors for alcoholism in two populations; *Apr*;34(5):1245-54. doi: 10.1038/npp.2008.171. Epub 2008 Sep 24.

Enoch, Mary-Anne, 2008, The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism; *Jul*;90(1):95-104. doi: 10.1016/j.pbb.2008.03.007. Epub 2008 Mar 15.

Enoch, Mary-Anne, 2013, Genetic Influences on the Development of Alcoholism; *Curr Psychiatry Rep.* 2013 November; 15(11): 412. doi:10.1007/s11920-013-0412-1.

Enoch, Mary-Anne, 2013, Genetic influences on response to alcohol and response to pharmacotherapies for alcoholism; *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 123 (2014) 17–24 2014 Aug; 123: 17-24. doi: 10.1016/j.pbb.2013.11.001. Epub 2013 Nov 9.

Erwin, W.E., Williams, D.B., Speir, W.A., 1998, Delirium tremens, 1998 *May*;91(5):425-32. doi: 10.1097/00007611-199805000-00003.

Felsenfeld, Gary, 2014, The evolution of epigenetics, *Winter* 2014;57(1):132-48. doi: 10.1353/pbm.2014.0004.

Gajos, J.M., Russell, M.A., Cleveland, H.H., Vandenberg, D.J., Feinberg, M.E., 2019, Romantic Partner Alcohol Misuse Interacts with GABRA2 Genotype to Predict Frequency of Drunkenness in Young Adulthood; 2019 February; 35(1): 7–20. doi: 10.1177/1043986218810578.

Garnett, C., Kastaun, S., Brown, J., Kotz, D., 2022, Alcohol consumption and associations with sociodemographic and health-related characteristics in Germany: A population survey, *Seite* 8, 2022 Feb; 125: 107159. doi: 10.1016/j.addbeh.2021.107159. Epub 2021 Oct 19.

Gatta, E., Guidotti, A., Saudagar, V., Grayson, D.R., Aspesi, D., Pandey, S.C., Pinna, G., 2020, Epigenetic Regulation of GABAergic Neurotransmission and Neurosteroid Biosynthesis in Alcohol Use Disorder; *International Journal of Neuropsychopharmacology* (2021) 24(2): 130–141; doi:10.1093/ijnp/pyaa073.

Haughey, H.M., Ray, L.A., Finan, P., Villanueva, R., Niculescu, M., Hutchison, K.E., 2008, Human γ -aminobutyric acid A receptor $\alpha 2$ gene moderates the acute effects of alcohol and brain mRNA expression; *Jun*;7(4): 447-54. doi: 10.1111/j.1601-183X.2007.00369.x. Epub 2007 Dec 18.

Hevers, W., Lüddens, H., 1998, The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes, 1998 Aug;18(1):35-86. doi: 10.1007/BF02741459.

Hillbom, M., Pieninkeroinen, I., Leone, M., 2003, Seizures in alcohol-dependent patients: epidemiology, pathophysiology and management. CNS Drugs 2003;17(14):1013-30. doi: 10.2165/00023210-200317140-00002.

Hillemacher, T., Frieling, H., Luber, K., Yazic, A., Muschler, M.A., Lenz, B., Wilhelm, J., Kornhuber, J., Bleich, S., 2009, Epigenetic regulation and gene expression of vasopressin and atrial natriuretic peptide in alcohol withdrawal; May;34(4):555-60. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.10.019. Epub 2008 Nov 28 (2).

Hillemacher, T., Frieling, H., Hartl, T., Wilhelm, J., Kornhuber, J., Bleich, S., 2009, Promoter specific methylation of the dopamine transporter gene is altered in alcohol dependence and associated with craving; Jan;43(4):388-92. doi: 10.1016/j.jpsychires.2008.04.006. Epub 2008 May 27.

Hsiung, D.T., Marsit, C.J., Houseman, E.A., Eddy, K., Furniss, C.S., McClean, M.D., Kelsey, K.T., 2007, Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma; Jan;16(1): 108-14. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0636.

Irwin, M., Schuckit, M., Smith, T.L., 1990, Clinical importance of age at onset in type 1 and type 2 primary alcoholics. Arch. Gen. Psychiatr. 47: 320–324

Jellinek, E.M., 1960, Alcoholism, a genus and some of its species. Can Med. Assoc. J. 83: 1341–5. PubMed PMID:13789799; PubMed Central PMCID: PMC1939063.70 Ann.

Jiang, M., Zhang, Y., Fei, J., Chang, X., Fan, W., Qian, X., Zhang, T., Lu, D., 2010, Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces; Lab Invest 90: 282-290; 2010 Feb; 90(2): 282-90. doi: 10.1038/labinvest.2009.132. Epub 2009 Dec 14.

Jones, P.-A. 2012, Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond, 2012 May 29;13(7):484-92. doi: 10.1038/nrg3230.

Kareken, D.A., Liang, T., Wetherill, L., Dzemidzic, M., Bragulat, V., Cox, C., Talavage, T., O'Connor, S.J., Foroud, T., 2010, A polymorphism in GABRA2 is associated with the medial frontal response to alcohol cues in an fMRI study; Dec;34(12):2169-78. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01293.x.

Kegel, B., Epigenetik, Vierte Auflage 2018, DuMont Buchverlag Köln, ISBN 978-3-8321-6318-1, Seite 81, Zeilen 16-20.

Khalid, O., Kim, J.J., Kim, H.S., Hoang, M., Tu, T.G., Elie, O., Lee, C., Vu, C., Horvath, S., Spigelman, I., Kim, Y. Gene expression signatures affected by alcohol-induced DNA methylomic deregulation in human embryonic stem cells, *Stem Cell Res.* 2014 May;12(3):791-806. doi: 10.1016/j.scr.2014.03.009. Epub 2014 Apr 12. PMID: 24751885

Kim, K.Y., Kim, D.S., Lee, S.K., Lee, I.K., Kang, J.H., Chang, Y.S., Jacobs, D.R., Steffes, M., Lee, D.H., 2009, Association of low-dose exposure to persistent organic pollutants with global DNA hypomethylation in healthy Koreans; 2010 Mar;118(3): 370-4. doi: 10.1289/ehp.0901131. Epub 2009 Nov 6.

Kim, D.S., Kim, Y.H., Lee, W.K., Na, Y.K., Hong, H.S., 2016, Effect of alcohol consumption on peripheral blood Alu methylation in Korean men; 21(3): 243-8. doi: 10.3109/1354750X.2015.1134661. Epub 2016 Feb 5.

Koob, G.F., 2004, A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol; *Biochem.Pharmacol.*2004 Oct 15; 68(8), 1515-25. doi: 10.1016/j.bcp.2004.07.031.

Koulentaki, M., Kouroumalis, E., 2018, GABAA receptor polymorphisms in alcohol use disorder in the GWAS era, 2018 Jun;235(6):1845-1865. doi: 10.1007/s00213-018-4918-4. Epub 2018 May 2.

Krickhahn, T., Poß D., Statistik kompakt für Dummies, 1. Nachdruck 2018, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, ISBN 978-3-527-71154-3

Krishnan, H.R., Sakharkar, A.J., Teppen, T.L., Berkel, T.D., Pandey, S.C., 2014, The Epigenetic Landscape of Alcoholism; 115: 75–116. doi: 10.1016/B978-0-12-801311-3.00003-2.

Krystal, J.H., Staley, J., Mason, G., Petrakis, I.L., Kaufman, J., Harris, R.A., Gelernter, J., Lappalainen, J., 2006, Gamma-aminobutyric acid type A receptors and alcoholism: intoxication, dependence, vulnerability, and treatment; *Sep*;63(9): 957-68. doi: 10.1001/archpsyc.63.9.957.

Küfner, H., Kraus, L., *Deutsches Ärzteblatt*, 14/2002, Serie: Alkoholismus - Epidemiologische und ökonomische Aspekte des Alkoholismus; Jahrgang 99: S.936/Medizin, A-936/ B-782/ C-729.

Kumar, S., Fleming, R.L., Morrow, A.L., 2004, Ethanol regulation of γ -aminobutyric acid_A receptors: genomic and nongenomic mechanism; *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 101, Issue 3, March 2004, Pages 211-226; doi: org/10.1016/j.pharmthera.2003.12.001.

Labenz, C., Wörns, M.A., Schattenberg, J.M., Huber, Y., Galle, P.R., Labenz, J., 2017, Epidemiology of hepatic encephalopathy in german hospitals - the EpHE study, *Aug*;55(8):741-747. doi: 10.1055/s-0043-114671. Epub 2017 Jul 12.

Lange, C., Manz, K., Rommel, A., Schienkiewitz, A., Mensink, G.B.M., Alcohol consumption of adults in Germany: Harmful drinking quantities, consequences and measures, 2016, *Journal of Health Monitoring* 2016 1(1), DOI 10.17886/RKI-GBE-2016-025, Robert Koch-Institut, Berlin.

Lehnert, H., Kirchner, H., Kirmes, I., Dahm, R., 2018, *Epigenetik – Grundlagen und klinische Bedeutung*, Springer Verlag, 1. Auflage 2018, ISBN 978-3-662-54022-0.

Lesch, O.M., Dietzel, M., Musalek, M., Walter, H., Zeiler, K., 1988, The course of alcoholism. Long-term prognosis in different types. *Forensic. Sci. Int.* 36: 121–138.

Lesch, O.M., Kefer, J., Lentner, S., Mader, R., Marx, B., Musalek, M., Nimmerrichter, A., Preinsberger, H., Puchinger, H., Rustembegovic, A., 1990, Diagnosis of chronic alcoholism--classificatory problems, PMID: 2259714, 1990;23(2):88-96. doi: 10.1159/000284644.

Lesch, O.M., Ades, J., Badawy, A., Pelc, I., Sasz, H., 1993, Alcohol dependence--classificatory considerations. *Alcohol Alcohol Suppl.* 2: 127–131.

Lesch, O.M., Walter, H., 1996, Subtypes of alcoholism and their role in therapy. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1: 63–67.

Li, D., Sulovari, A., Cheng, C., Zhao, H., Kranzler, H.R., Gelernter, J., 2014, Association of Gamma-Aminobutyric acid_A Receptor α 2 Gene (GABRA2) with Alcohol Use Disorder; *Neuropsychopharmacology* (2014) 39, 907–918; doi: 10.1038/npp.2013.291; published online 13 November 2013.

Lieberman, R., Kranzler, H.R., Joshi, P., Shin, D.G., Covault, J., 2015, GABRA2 alcohol dependence risk allele is associated with reduced expression of chromosome 4p12 GABAA subunit genes in human neural cultures; *Alcohol Clin Exp Res.* 2015 September; 39(9): 1654–1664. doi: 10.1111/acer.12807.

Lind, P.A., MacGregor, S., Montgomery, G.W., Heath, A.C., Martin, N.G., Whitfield, J.B., 2008, Effects of GABRA2 Variation on Physiological, Psychomotor and Subjective Responses in the Alcohol Challenge Twin Study; 2008 Apr;11(2): 174-82. doi: 10.1375/twin.11.2.174.

Liu, C., Marioni, R.E., Hedman, Å.K., Pfeiffer, L., Tsai, P.C., Reynolds, L.M., Just, A.C., Duan, Q., Boer, C.G., Tanaka, T., Elks, C.E., Aslibekyan, S., Brody, J.A., Kühnel, B., Herder, C., Almlí, L.M., Zhi, D., Wang, Y., Huan, T., Yao, C., Mendelson, M.M., Joehanes, R., Liang, L., Love, S.A., Guan, W., Shah, S., McRae, A.F., Kretschmer, A., Prokisch, H., Strauch, K., Peters, A., Visscher, P.M., Wray, N.R., Guo, X., Wiggins, K.L., Smith, A.K., Binder, E.B., Ressler, K.J., Irvin, M.R., Absher, D.M., Hernandez, D., Ferrucci, L., Bandinelli, S., Lohman, K., Ding, J., Trevisi, L., Gustafsson, S., Sandling, J.H., Stolk, L., Uitterlinden, A.G., Yet, I., Castillo-Fernandez,

J.E., Spector, T.D., Schwartz, J.D., Vokonas, P., Lind, L., Li, Y., Fornage, M., Arnett, D.K., Wareham, N.J., Sotoodehnia, N., Ong, K.K., van Meurs, J.B.J., Conneely, K.N., Baccarelli, A.A., Deary, I.J., Bell, J.T., North, K.E., Liu, Y., Waldenberger, M., London, S.J., Ingelsson, E., Levy, D., 2016, A DNA methylation biomarker of alcohol consumption; *Molecular Psychiatry* advance online publication, 15 November 2016; doi: 10.1038/mp.2016.192.

Mallard, T.T., Ashenhurst, J.R., Harden, K.P., Fromme, K., 2018, GABRA2, alcohol, and illicit drug use: an event-level model of genetic risk for polysubstance use; *J Abnorm Psychol.* 2018 February; 127(2): 190–201. doi: 10.1037/abn0000333.

Mann, K., Batra, A., Fauth-Bühler, M., Hoch, E., and the Guideline Group, 2017, *Diagnosis and Treatment of Alcohol Use Disorders*; 23(1): 45-60. doi: 10.1159/000455841. Epub 2017 Feb 9 German Guidelines on Screening.

Manzardo, A.M., Henkhaus, R.S., Butler, M.G., 2012, Global DNA promoter methylation in frontal cortex of alcoholics and controls; 2012 Apr 25; 498(1): 5-12. doi: 10.1016/j.gene.2012.01.096. Epub 2012 Feb 13.

Maunakea, A.K., Nagarajan, R.P., Bilenky, M., Ballinger, T.J., D'Souza, C., Fouse, S.D., Johnson, B.E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V.M., Rowitch, D.H., Xing, X., Fiore, C., Schillebeeckx, M., Jones, S.J., Haussler, D., Marra, M.A., Hirst, M., Wang, T., Costello, J.F., 2010, Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters, 2010 Jul 8;466(7303):253-7. doi: 10.1038/nature09165.

Martin, N.G., Perl, J., Oakeshott, J.G., Gibson, J.B., Starmer, G.A., Wilks, A.V., 1985, A twin study of ethanol metabolism; 1985 Mar;15(2): 93-109. doi: 10.1007/BF01065891.

Martini, G.A., Dölle, W., 1965, Krankheitsbilder bei Leberschädigung durch Alkohol, *Dtsch Med Wochenschr* 1965; 90(18): 793-799 DOI: 10.1055/s-0028-1111419

Maze, I., Nestler, E.J., 2011, The epigenetic landscape of addiction; *Ann N Y Acad Sci.* 2011 January; 1216: 99–113. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05893.x.

Melki, J.R., Vincent, P.C., Clark, S.J., 1999, Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia; *Cancer Res* 59: 3730-3740; PMID: 10446989.

Meyer-Bockenkamp, F., Proskynitopoulos, P.J., Glahn, A., Muschler, M., Hagemeyer, L., Preuss, V., Klintschar, M., Achenbach, J., Frieling, H., Rhein, M. 2023, Cytosine methylation in GABA B1 receptor identifies alcohol-related changes for men in blood and brain tissues, 2023 May 9;58(3):308-314. doi: 10.1093/alcalc/agad022.

Moe, J.S., Bolstad, I., Mørland, J.G., Bramness, J.G., 2021, GABAA subunit single nucleotide polymorphisms show sex-specific association to alcohol consumption and mental distress in a Norwegian population-based sample; 2022 Jan; 307: 114257. doi: 10.1016/j.psychres.2021.114257. Epub 2021 Nov 14.

Most, D., Ferguson, L., Harris, R.A., 2014, Molecular basis of alcoholism; 125:89-111. doi: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00006-9.

Nagelkerke, N. J. D., 1991, A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika*, 78(3), 691–692. doi:10.1093/BIOMET/78.3.691.

Neurotransmitter 3/2013, 24(3), M. Soyka, München/Meiringen; Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V. (DHS); Deutsche Gesellschaft für Ernährung; Epidemiologie und Behandlung der Alkoholabhängigkeit: Nicht nur die Leber ist in Gefahr; doi.org/10.1007/s15016-013-0102-6.

Nielsen Media Research nach: Bundesverband der Deutschen Spirituosen-Industrie und –Importeure (2022): Daten aus der Alkoholwirtschaft, Bonn, Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen, Süchte, Alkohol: Zahlen, Daten, Fakten.

Nieratschker, V., Grosshans, M., Frank, J., Strohmaier, J., von der Goltz, C., El-Maarri, O., Witt, S.H., Cichon, S., Nöthen, M.M., Kiefer, F., Rietschel, M., 2012, Epigenetic alteration of the dopamine transporter gene in alcohol-dependent patients is associated with age; doi: 10.1111/j.1369-1600.2012.00459.x.

Nieratschker, V., Batra, A., Fallgatter, A.J., 2013, Genetics and epigenetics of alcohol dependence; Jul 11;1(1):11. doi: 10.1186/2049-9256-1-11 eCollection 2013.

Olsen, R.W., Sieghart, W., 2009, GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology, 2009 Jan;56(1):141-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.045. Epub 2008 Aug 8.

Omega Bio-tek, Inc.400Pinna, cle Way, Suite 450, Norcross, GA 30071.

Ono, H., Iwasaki, M., Kuchiba, A., Kasuga, Y., Yokoyama, S., Onuma, H., Nishimura, H., Kusama, R., Ohnami, S., Sakamoto, H., Yoshida, T., Tsugane, S., 2012, Association of dietary and genetic factors related to one-carbon metabolism with global methylation level of leukocyte DNA; Dec;103(12): 2159-64. doi: 10.1111/cas.12013. Epub 2012 Oct 17.

Onori, N., Turchi, C., Solito, G., Gesuita, R., Buscemi, L., Tagliabracci, A., 2010, GABRA2 and Alcohol Use Disorders: No Evidence of an Association in an Italian Case–Control Study; doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.01135.x, *Alcohol Clin Exp Res*, Vol 34, No 4, 2010: pp 659–668.

Ota, Y., Capizzano, A.A., Moritani, T., Naganawa, S., Kurokawa, R., Srinivasan, A., 2020, Comprehensive review of Wernicke encephalopathy: pathophysiology, clinical symptoms and imaging findings, 2020 Sep;38(9):809-820. doi: 10.1007/s11604-020-00989-3.

Philibert, R.A., Plume, J.M., Gibbons, F.X., Brody, G.H., Beach, S.R., 2012, The impact of recent alcohol use on genome wide DNA methylation signatures; Apr 10;3:54. doi: 10.3389/fgene.2012.00054. eCollection 2012.

Preuss, U.W., Koller, G., Zill, P., 2022, Prospective DNA Methylation Analysis of the CpG GABRA2 Receptor Subunit in Alcohol Dependence during Detoxification, 2022 Nov 15;58(11):1653. doi: 10.3390/medicina58111653.

Qiagen 02/2020, EpiTect® Bisulfite Handbook 02/2020.

Reich, T., Edenberg, H.J., Goate, A., Williams, J.T., Rice, J.P., Van Eerdewegh, P., Foroud, T., Hesselbrock, V., Schuckit, M.A., Bucholz, K., Porjesz, B., Li, T.K., Conneally, P.M., Nurnberger, J.I.Jr, Tischfield, J.A., Crowe, R.R., Cloninger, C.R., Wu, W., Shears, S., Carr, K., Crose, C., Willig, C., Begleiter, H., 1998, Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence, 1998 May 8;81(3):207-15, PMID: 9603606.

Rich, S. J., Martin, P.R., 2014, Co-occurring psychiatric disorders and alcoholism Handbook of Clinical Neurology; Vol. 125 (3rd series) Alcohol and the Nervous System E.V. Sullivan and A. Pfefferbaum, Editors © 2014 Elsevier B.V., Schlussfolgerung.

Rietschel, M., Treutlein, J., 2012, The genetics of alcohol dependence; Seite 41, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06794.x Ann. N.Y. Acad. Sci. 1282 (2013) 39–70 c 2012 New York Academy of Sciences.

Robison, A.J., Nestler E.J., 2011, Transcriptional and Epigenetic Mechanisms of Addiction. Nat Rev Neurosci.; 12(11): 623–637. doi: 10.1038/nrn3111.

Roh, S., Matsushita, S., Hara, S., Maesato, H., Matsui, T., Suzuki, G., Miyakawa, T., Ramchandani, V.A., Li, T.K., Higuchi, S., 2011, Role of GABRA2 in moderating subjective responses to alcohol; Alcohol Clin Exp Res. 2011; 35(3):400–7. [PubMed: 21118274], 2011 Mar;35(3): 400-7. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01357.x. Epub 2010 Nov 30.

Rommel, A., Saß, A.-C., Rabenberg, M., 2016, Alkoholbedingte Mortalität bei Erwachsenen, Journal of Health Monitoring · 2016 1(1), DOI 10.17886/RKI-GBE-2016-022, Robert Koch-Institut, Berlin.

Rubin, E., Thomas, A.P., 1992, Effects of alcohol on the heart and cardiovascular system. In: Mendelson, J.H., Mello, N.K. (Hrsg.): Medical Diagnosis and Treatment of Alcoholism. McCraw-Hill, New York 1992.

Rudolph, U., Crestani, F., Möhler, H., 2001, GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. 2001 Apr;22(4):188-94. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01646-1.

Saba, L., Porcella, A., Sanna, A., Congeddu, E., Marziliano, N., Mongeau, R., Grayson, D., Pani, L., 2005, Five mutations in the GABA A alpha6 gene 5' flanking region are associated with a reduced basal and ethanol-induced alpha6 upregulation in mutated Sardinian alcohol non-preferring rats; Jun 13;137(1-2):252-7. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.07.024. Epub 2005 Apr 18.

Schuckit, M.A., Irwin, M., 1989. An analysis of the clinical relevance of type 1 and type 2 alcoholics. Br. J. Addict. 84: 869–876.

Seitz, H.K., Lesch, O.M., Spanagel, R., Beutel, M., Redecker, T., Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V., Alkoholabhängigkeit, Suchtmedizinische Reihe, Band 1.

Semmler, A., Heese, P., Stoffel-Wagner, B., Muschler, M., Heberlein, A., Bigler, L., Prost, J.C., Frieling, H., Kornhuber, J., Banger, M., Bleich, S., Hillemacher, T., Linnebank, M., 2015, Alcohol abuse and cigarette smoking are associated with global DNA hypermethylation: results from the German Investigation on Neurobiology in Alcoholism (GINA); Mar;49(2):97-101. doi: 10.1016/j.alcohol.2015.01.004. Epub 2015 Jan 20.

Shukla, S.D., Velazquez, J., French, S.W., Lu, S.C., Ticku, M.K., Zakhari, S., 2008, Alcoholism: Clinical and Experimental Research Vol. 32, No. 9 September 2008, Emerging Role of Epigenetics in the Actions of Alcohol; 2008; Sep; 32(9):1525-34. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00729.x. Epub 2008 Jul 9.

Siegmund, K.D., Connor, C.M., Campan, M., Long, T.I., Weisenberger, D.J., Biniszkiwicz, D., Jaenisch, R., Laird, P.W., Akbarian, S., 2007, DNA Methylation in the Human Cerebral Cortex Is Dynamically Regulated throughout the Life Span and Involves Differentiated Neurons; PLoS ONE 2(9): e895. doi: 10.1371/journal.pone.0000895.

Siegmund, S.V., Singer, M.V., 2005, Wirkungen von Alkohol auf den oberen Gastrointestinaltrakt und das Pankreas - Eine aktuelle Übersicht, Zeitschrift für Gastroenterologie 43 (8), Zusammenfassung, DOI. 10.1055/s-2005-858257.

Sigvardsson, S., Bohman, M., Cloninger, C.R., 1996, Replication of the Stockholm Adoption Study of alcoholism. Confirmatory cross-fostering analysis. Arch. Gen. Psychiatr. 53: 681–687.

Soyka, M., Küfner, H. „Alkoholismus – Missbrauch und Abhängigkeit“, 6. Auflage 2008, Georg Thieme Verlage KG, Stuttgart, ISBN 978-3-13-520906-7.

Soyka, M., Preuss, U.W., Hesselbrock, V., Zill, P., Koller, G., Bondy, B., 2007, GABA-A2 receptor subunit gene (GABRA2) polymorphisms and risk for alcohol dependence; 2008 Feb;42(3):184-91. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.11.006. Epub 2007 Jan 17.

Staley, J.K., Gottschalk, C., Petrakis, I.L., Gueorguieva, R., O'Malley, S., Baldwin, R., Jatlow, P., Verhoeff, N.P., Perry, E., Weinzimmer, D., Frohlich, E., Ruff, E., van Dyck, C.H., Seibyl, J.P., Innis, R.B., Krystal, J.H., 2005, Cortical gamma-aminobutyric acid type A-benzodiazepine receptors in recovery from alcohol dependence: relationship to features of alcohol dependence and cigarette smoking; Aug; 62(8): 877-88. doi: 10.1001/archpsyc.62.8.877.

Starkman, B.G., Sakharkar, A.J., Pandey, S.C., 2012, Epigenetics—Beyond the Genome in Alcoholism; Alcohol Res. 2012; 34(3): 293–305.; PMID: 23134045; PMC3860414.

Steiger, J.L., Russek, S.J., 2004, GABAA receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. 2004 Mar;101(3):259-81. doi: 10.1016/j.pharmthera.2003.12.002.

Stephenson, M., Bollepalli, S., Cazaly, E., Salvatore, J.E., Barr, P., Rose, R.J., Dick, D., Kaprio, J., Ollikainen, M., 2021, Associations of Alcohol Consumption with Epigenome-Wide DNA Methylation and Epigenetic Age Acceleration: Individual-Level and Co-twin Comparison Analyses, Alcohol Clin Exp Res. 2021 February; 45(2): 318–328. doi:10.1111/acer.14528.

Strienz, J., 2021, Epigenetik in der hausärztlichen Praxis: Grundlagen und praktische Anwendungen, 2021 epubli (eBook) ISBN: 9783754123140.

Takai, D., Jones, P.A., 2003, The CpG island searcher: a new WWW resource. In Silico Biol 3: 235-240.

Terry, M.B., Delgado-Cruzata, L., Vin-Raviv, N., Wu, H.C., Santella, R.M., 2011, DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies; Jul;6(7):828-37. doi: 10.4161/epi.6.7.16500. Epub 2011 Jul 1.

Tian, H., Chen, H.J., Cross, T.H., Edenberg, H.J., 2005, Alternative splicing and promoter use in the human GABRA2 gene; Jun 13; 137(1-2): 174-83. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.03.001. Epub 2005 Apr 8.

Uhart, M., Weerts, E.M., McCaul, M.E., Guo, X., Yan, X., Kranzler, H.R., Li, N., Wand, G.S., 2013, GABRA2 markers moderate the subjective effects of alcohol; Mar; 18(2): 357-69. doi: 10.1111/j.1369-1600.2012.00457.x. Epub 2012 Apr 13.

Varela-Rey, M., Woodhoo, A., Martinez-Chantar, M.L., Mato, J.M., Lu, S.C., 2013, Alcohol, DNA methylation, and cancer; 2013; 35(1): 25-35, PMID: 24313162 PMCID: PMC3860423.

Villafuerte, S., Heitzeg, M.M., Foley, S., Yau, W.Y., Majczenko, K., Zubieta, J.K., Zucker, R.A., Burmeister, M., 2012, Impulsiveness and insula activation during reward anticipation are associated with genetic variants in GABRA2 in a family sample enriched for alcoholism; *Mol Psychiatry*. 2012; 17(5): 511–9. [PubMed: 21483437], 2012 May;17(5): 511-9. doi: 10.1038/mp.2011.33. Epub 2011 Apr 12.

Wagner, J.R., Busche, S., Ge, B., Kwan, T., Pastinen, T., Blanchette, M., 2014, The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts, 2014 Feb 20;15(2): R37. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r37.

WHO 2009, global health risks, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks, ISBN 978 92 4 156387 1.

Wong, C.C., Mill, J., Fernandes, C., 2011, Drugs and addiction: an introduction to epigenetics, 2011 Mar; 106(3): 480-9. doi: 10.1111/j.1360-0443.2010.03321.x.

Zhang, H., Gelernter, J., 2017, Review: DNA methylation and alcohol use disorders: Progress and challenges; Aug;26(5): 502-515. doi: 10.1111/ajad.12465. Epub 2016 Oct 19.

Zhang, F.F., Cardarelli, R., Carroll, J., Fulda, K.G., Kaur, M., Gonzalez, K., Vishwanatha, J.K., Santella, R.M., Morabia, A., 2011, Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood; May; 6(5): 623-9. doi: 10.4161/epi.6.5.15335.

Zhu, Z.Z., Hou, L., Bollati, V., Tarantini, L., Marinelli, B., Cantone, L., Yang, A.S., Vokonas, P., Lissowska, J., Fustinoni, S., Pesatori, A.C., Bonzini, M., Apostoli, P., Costa, G., Bertazzi, P.A., Chow, W.H., Schwartz, J., Baccarelli, A., 2012, Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis; Feb; 41(1): 126-39. doi: 10.1093/ije/dyq154. Epub 2010 Sep 15.

Zilker T., 1999, Alkoholentzugssyndrom und Delirium tremens. *MMW* 1999; 141: 26–30. PMID: 10726125.

Zintzaras, E., 2012, Gamma-aminobutyric acid A receptor, α -2 (GABRA2) variants as individual markers for alcoholism: a meta-analysis; Aug;22(4): 189-96. doi: 10.1097/YPG.0b013e328353ae53.

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Zill danken, der mir diese Dissertation ermöglicht und mich jederzeit unterstützt hat. Sämtlichen Fragen meinerseits hat sich Herr Dr. Zill mit Geduld gewidmet und mir immer weitergeholfen – auch, wenn es mal nicht so vorwärts ging oder technische Fragen zu lösen waren.

Desweiteren gebührt mein Dank von ganzem Herzen meiner Freundin Sylvia De Jonge. Ohne sie wäre ich vermutlich gar nicht an diese Arbeit gekommen. Außerdem hat sie alle meine Fragen rund um labortechnische Probleme bereitwillig und geduldig beantwortet, mir statistische Tipps gegeben und sogar bei komplizierten fachspezifischen Übersetzungen aus dem Englischen geholfen.

Zusätzlich möchte ich an dieser Stelle auch Frau Sabine Sondermaier danken, die sich mit viel Engagement, Einsatz und umfangreichem Wissen den Fragen zu meiner Statistik angenommen hat und mir hierbei eine wertvolle Hilfe war.

Auch meine Schwester, Frau Dr. Ina Wolf mit ihren beiden Töchtern, Annika und Maya Wolf sowie ihr Ehemann, Herr Roland Wolf, sollen hier nicht unerwähnt bleiben. Vielen Dank, dass Ihr diese Überraschung habt gelingen lassen! Und danke Dir Ina, dass du Dir die Zeit genommen hast, meine Diskussion durchzulesen und mir diesbezüglich hochwertige Tipps gegeben hast!

Last but not least will ich nicht vergessen, hier noch meinen Lebensgefährten, Herrn Dr. Christian Scheffler zu nennen, der mich fortwährend unterstützt, motiviert und bestärkt hat. Außerdem nahm er sich die Zeit, diese Dissertation Korrektur zu lesen und mir bei der Formatierung zu helfen. Danke Dir ganz lieb dafür!

Diese Dissertation widme ich meinen lieben Eltern, Herrn und Frau Dres. Helmuth und Ingrid Günther. Die Doktorarbeit soll eine Überraschung für sie sein. Sie haben vermutlich nicht mehr daran geglaubt, dass ich das noch bewerkstellige.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Günther, Helga Ingrid

Name, Vorname

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

Epigenetische Analyse des GABRA2-Rezeptorgens bei alkoholabhängigen Patienten

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.

Puchheim, 22.04.2024

Ort, Datum

Helga Günther

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand