

**Aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Abteilung: Allgemeine Psychiatrie und Psychotherapie mit
Poliklinik**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Buchkremer

**Untersuchung biologischer und genetischer Marker
auf ihren Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit und
deliranter Symptomatik im Rahmen der
Alkoholentgiftung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Ulrich Clemens Lutz
aus
Stuttgart-Bad Cannstatt**

2005

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. J. Gaertner

2. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1. Bedeutung des Alkoholismus	4
1.2. Beschreibung des Krankheitsbildes	5
1.3. Alkoholentzug und Delirium tremens (DT)	6
1.4. Neurobiologie	8
<i>1.4.1. Neurobiologie süchtigen Verhaltens</i>	8
<i>1.4.2. Neurobiologie des Alkohols</i>	9
<i>1.4.2.1. Dopaminerges System</i>	9
<i>1.4.2.2. Noradrenerges System</i>	11
1.5. Genetische Disposition zur Alkoholabhängigkeit	13
<i>1.5.1. Familienstudien</i>	13
<i>1.5.2. Zwillingsstudien</i>	14
<i>1.5.3. Adoptionsstudien</i>	15
<i>1.5.4. Molekulargenetische Identifizierung krankheitsdisponierender Genvariationen</i>	16
<i>1.5.4.1. Assoziationsuntersuchungen</i>	16
<i>1.5.4.2. Kopplungsuntersuchungen</i>	17
<i>1.5.4.3. Krankheitsdisponierende Genvarianten</i>	17
<i>1.5.5. Genetische und biologische Marker dieser Studie</i>	20
<i>1.5.5.1. Dopamin-beta-hydroxylase (DBH)</i>	20
<i>1.5.5.2. Dopaminrezeptor 4 (DRD4)</i>	21

1.5.5.3. Catecholamin-O-methyltransferase (COMT)	22
1.6. Fragestellung	24
2. Methoden	25
2.1. Probanden und Diagnostik	25
2.1.1. Alkoholabhängige Patienten mit DT während der Entgiftung	26
2.1.2. Alkoholabhängige Patienten mit leichten Entzugserscheinungen und ohne DT in der Vorgeschichte	27
2.1.3. Alkoholabhängige Patienten	28
2.1.4. Gesunde Kontrollpersonen ohne Alkoholabhängigkeit	28
2.2. Extraktion und Aufbereitung genomischer DNA	29
2.3. Molekulargenetische Untersuchungen	30
2.3.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.3.2. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	31
2.3.3. PCR-Kontaminationsprävention	32
2.3.4. Durchführung der Genotypisierung	32
2.3.4.1. Dopamin-beta-hydroxylase-Gen (DBH)	32
2.3.4.2. Dopaminrezeptor 4-Gen (DRD4)	33
2.3.4.3. Catecholamin-O-methyltransferase-Gen (COMT)	34
2.3.5. Agarosegelelektrophorese	34
2.4. Bestimmung der Dopamin-beta-hydroxylase (DβH)-Aktivität im Plasma	35
2.5. Statistische Auswertung	36

3. Ergebnisse	38
3.1. Dopamin-beta-hydroxylase: DBH*444g/a-Polymorphismus	38
3.1.1. <i>Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese</i>	38
3.1.2. <i>Statistische Ergebnisse</i>	39
3.1.2.1. <i>Genotypisierung</i>	39
3.1.2.1.1. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung</i>	39
3.1.2.1.2. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit gesunden Kontrollpersonen</i>	40
3.1.2.2. <i>DBH*444g/a-Polymorphismus und DβH-Plasma- aktivität</i>	42
3.1.2.2.1. <i>Der Einfluss des DBH*444g/a-Polymorphismus auf die DβH-Plasmaaktivität</i>	42
3.1.2.2.2. <i>Der Einfluss des DBH*444g/a-Polymorphismus auf die DβH-Plasmaaktivität in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten</i>	43
3.1.2.3. <i>DβH-Plasmaaktivität</i>	44
3.1.2.3.1. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung</i>	44
3.1.2.3.2. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit gesunden Kontrollpersonen</i>	46

3.2. Dopaminrezeptor 4-Gen (DRD4)	47
3.2.1. <i>Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese</i>	47
3.2.2. <i>Statistische Ergebnisse</i>	49
3.2.2.1. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugerscheinungen während der Entgiftung</i>	49
3.2.2.2. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit gesunden Kontrollpersonen</i>	51
3.3. Catecholamin-O-methyltransferase-Gen (COMT)	53
3.3.1. <i>Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese</i>	53
3.3.2. <i>Statistische Ergebnisse</i>	54
3.3.2.1. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugerscheinungen während der Entgiftung</i>	54
3.3.2.2. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit gesunden Kontrollpersonen</i>	55
3.4. Trinkmenge und Dauer der Alkoholabhängigkeit	56
3.4.1. <i>Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugerscheinungen während der Entgiftung</i>	56
3.4.1.1. <i>Trinkmenge</i>	57
3.4.1.2. <i>Dauer der Alkoholabhängigkeit</i>	58

4. Diskussion	60
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	60
4.2. Kritik an der Methode: Assoziation versus Kopplung	60
4.3. Diskussion der analysierten Gene im einzelnen	63
4.3.1. <i>Dopamin-beta-hydroxylase</i>	63
4.3.1.1. <i>Der DBH*444g/a-Polymorphismus</i>	63
4.3.1.2. <i>Der Einfluss des DBH*444g/a-Polymorphismus auf die DβH-Plasmaaktivität</i>	64
4.3.1.3. <i>Die DβH-Plasmaaktivität</i>	66
4.3.2. <i>Dopaminrezeptor 4 (DRD4)</i>	69
4.3.3. <i>Catecholamin-O-methyltransferase (COMT)</i>	71
4.4. Die Rolle der Trinkmenge und der Dauer der Alkoholabhängigkeit für das Auftreten des DTs	74
4.5. Schlussfolgerung und Ausblick	75
5. Zusammenfassung	78
6. Literaturverzeichnis	80
7. Anhang	97
7.1. Material	97
7.1.1. <i>Geräte</i>	97
7.1.2. <i>Hilfsmittel und Gefäße</i>	98
7.1.3. <i>Chemikalien</i>	98
7.1.4. <i>Enzyme</i>	99

7.1.5. <i>Puffer</i>	99
7.1.6. <i>Synthetische Oligonukleotide (Primer)</i>	100
7.2. Einzelergebnisse der Studienteilnehmer	101

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Azetaldehyddehydrogenase
ANOVA	Analysis of Variance
AUDIT	Alcohol Use Disorders Identification Test
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CIWA	Revised Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol Scale
COGA	Colaborative Study of the Genetics of Alcoholism
COMT	Catecholamin-O-methyltransferase
DAT	Dopamintransporter
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
D β H, DBH	Dopamin-beta-hydroxylase
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
del	Deletion
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DR(D1-5)	Dopaminrezeptor D1-5
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DT	Delirium tremens
dTTP	2'-Desoxythymine-5'-triphosphat
DZ	dizygote Zwillinge

EcoN I	Restriktionsenzym aus Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroencephalogramm
et al.	et alii (und andere)
fMRI	funktionelle Magnetresonanztomografie
g	Gramm
G	Guanin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Geschl.	Geschlecht
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie
HVA	Homovanillinsäure
ICD	International Classification of Diseases
ID	Identifikationsnummer
ins	Insertion
Kb	Kilobase
kg	Kilogramm
lod	logarithm of the odds
M	molar
mA	Milliampere
MAO	Monoaminoxidase
MB-COMT	membrangebundene Form der COMT
Met	Methionin
Mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHPG	3-methoxy-4-hydroxyphenylglykol
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPEG	3-methoxy-4-hydroxyethylenglykol

mRNA	Boten-RNA („messenger“)
Mrd.	Milliarden
MZ	monozygote Zwillinge
N. acc.	Nucleus accumbens
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NH ₄	Ammonium
<i>Nla</i> III	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria lactamica</i>
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
S-COMT	lösliche Form der COMT
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunden
SKID	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
vs	versus
VTA	ventrales Tegmentum-Bündel
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

1. Einleitung

1.1. Bedeutung des Alkoholismus

„Mach dich nicht selber hilflos durch Trinken in der Kneipe, damit sich nicht die Worte deiner Rede wiederholen und aus deinem Mund herausquellen, ohne dass du weißt, dass du sie geäußert hast. Du fällst hin, brichst Dir die Knochen, und keiner deiner Saufkumpanen gibt dir die Hand, um dir aufzuhelfen. Sie werden dir sagen: Raus mit dem Trunkenbold!“ (altägyptische Schrift um 1500 v. Chr.) (Möller et al., 2001).

Dieses Zitat macht deutlich, dass bereits im alten Ägypten die Folgen und Probleme des übermäßigen Alkoholkonsums bekannt waren.

Heute sind neben sozialen Auswirkungen des Alkoholismus, wie zum Beispiel schwere Konflikte und dauerhafte psychische Schäden, insbesondere bei Kindern betroffener Familien, Verkehrsunfällen oder Kriminalität (Feuerlein et al., 1998) auch die volkswirtschaftlichen Kosten des Alkoholkonsums, die in Deutschland im Jahr 2000 auf rund 20 Mrd. € geschätzt wurden (Bergmann und Horch, 2000), von erheblicher Bedeutung. Ferner besteht für die einzelnen Betroffenen die Gefahr von Folgekrankheiten wie Leberzirrhose, Pankreatitis, Kardiomyopathie u.a. (Ashley et al., 1977). So sterben jährlich rund 42.000 Personen direkt oder indirekt an den Folgen des Alkoholmissbrauchs (Bundesministerium für Gesundheit, 2002). Weitere epidemiologischen Studien zeigen, dass, bezogen auf die Lebenszeit, etwa 4,9% (3,2 Mio.) der erwachsenen Bundesbürger an einer Alkoholabhängigkeit leiden und 12,1% (8 Mio.) Alkoholmissbrauch betreiben (Küfner und Kraus, 2002). Mit einem Pro-Kopf-Konsum von 10,6 Litern reinen Alkohols pro Jahr stand Deutschland 1999 im internationalen Vergleich an fünfter Stelle (Küfner und Kraus, 2002).

1.2. Beschreibung des Krankheitsbildes

Eine Abgrenzung der Alkoholabhängigkeit von noch „normalem“ Trinkverhalten ist schwierig. Grundlage für Forschung und Therapie ist allerdings eine möglichst genaue diagnostische Differenzierung. In den diagnostischen Leitlinien, wie der Internationalen Klassifikation psychischer Störungen der Weltgesundheitsorganisation (ICD-10) und dem Diagnostischen und Statistischen Manual Psychischer Störungen (DSM IV), ist die psychische Abhängigkeit durch einen starken Wunsch oder eine Art Zwang, Alkohol zu konsumieren und die verminderte Kontrollfähigkeit bezüglich des Beginns, der Beendigung und der Menge des Konsums charakterisiert. Die körperliche Abhängigkeit ist definiert durch das Auftreten von Entzugserscheinungen bei Beendigung oder Reduktion des Alkoholkonsums und durch Toleranzentwicklung, ein Prozess, bei dem zum Erlangen einer durch den Alkohol hervorgerufenen und erwünschten Wirkung die ursprünglich notwendige Dosis gesteigert werden muss. Unter schädlichem Konsum wird ein Alkoholkonsum verstanden, der gegenüber der soziokulturellen Norm überhöht ist bzw. zu unpassender Gelegenheit erfolgt. Dies geht mit vorübergehenden, deutlichen Veränderungen der psychischen und physischen Funktionen des Konsumenten einher (ICD-10).

Durch strukturierte Leitlinien bei der Diagnosestellung wird erfasst, dass die Alkoholabhängigen keine homogene Gruppe darstellen. Die Anwendung von Subklassifizierungen soll dieser Inhomogenität entgegenwirken und homogene Untergruppen beschreiben.

Unter den Aspekten der Motivation, des Verlaufs und der Folgen des Alkoholkonsums postulierte Jellinek fünf Typen der Alkoholabhängigkeit (Jellinek, 1960). So werden Alpha- (Konflikttrinker), Beta- (Gelegenheitstrinker), Gamma- (süchtiger Trinker), Delta- (Gewohnheitstrinker) und Epsilon-Trinker (episodischer Trinker) unterschieden. Dagegen stellt die von Cloninger aufgrund von Familien- und Adoptionsstudien erarbeitete (Cloninger et al., 1981) Typologie einem stark genetisch determinierten Typ II mit eher ungünstigem Verlauf, biografisch früh einsetzendem Alkoholkonsum und

Abstinenzunfähigkeit (fast nur bei Männern auftretend) einen Typ I (bei beiden Geschlechtern gleich häufig) gegenüber. Bei diesem wird das Trinkverhalten stärker von Umweltfaktoren bestimmt und der Missbrauch entwickelt sich eher später als bei Typ II. Ferner zeichnet er sich durch ein Trinken mit Kontrollverlust und einen vergleichsweise gutartigen Verlauf aus. Durch Betrachtung von Persönlichkeitsfaktoren konnte Cloninger im Rahmen einer Folgestudie den Typ II genauer beschreiben und ein Risiko für eine Alkoholabhängigkeit auf der Basis genetisch determinierter Persönlichkeitsfaktoren postulieren: Alkoholiker des Typs II zeigen ein herabgesetztes Vermeidungsverhalten („harm avoidance“) und ein ausgeprägtes Suchen nach neuen Stimuli („novelty seeking“) (Cloninger, 1987). Schuckit kritisierte diese Art der Subtypisierung und forderte, den primären Alkoholismus von Formen, die sekundär als Folge anderer psychiatrischer Störungen auftreten, zu differenzieren. So erreichte er durch Ausschluss von Patienten mit dissozialer Persönlichkeitsstörung einen Trennschärfenverlust der Klassifikation Cloningers (Schuckit, 1994a).

1.3. Alkoholentzug und Delirium tremens (DT)

Als Alkoholentzugssyndrom werden Krankheitserscheinungen bezeichnet, die bei vollständiger Unterbrechung oder relativer Verminderung der Alkoholfuhr auftreten können. Sie bleiben aus, solange ein ausreichender Blutalkoholspiegel besteht. Das klinische Bild ist charakterisiert durch eine große Anzahl unterschiedlicher Symptome: internistische (gastrointestinale Störungen, Tachykardie), vegetative (vermehrte Schweißneigung, Schlafstörungen), neurologische (Tremor, Ataxie, epileptische Anfälle) und psychische (Angst, Reizbarkeit, Gedächtnisstörungen, Halluzinationen) (Feuerlein, 1972). Verläuft ein Alkoholentzug unkompliziert, dauern die Symptome üblicherweise nur wenige Tage. Wichtige Komplikationen des Alkoholentzugssyndroms sind, neben Kreislaufstörungen mit Tachykardie und Blutdrucksteigerungen, in erster Linie Herzrhythmusstörungen und

Elektrolytentgleisungen, aber auch Hypoglykämien und Pneumonien (Erwin et al., 1998; Feuerlein et al., 1998).

Das Delirium tremens (DT) kann als Teil und schwerste Form des Alkoholentzugssyndroms angesehen werden (Wetterling, 1994). Erfolgt keine medikamentöse Therapie während der Entgiftung, tritt ein DT bei rund 5% der alkoholabhängigen Patienten im Alkoholentzug auf (Erwin et al., 1998; Zilker, 1999). Unter großzügigem und frühzeitigem Einsatz von Clomethiazol lag die Rate bei rund 1% (Zilker, 1999). Die Prävalenz für Alkoholentzugsdelirien beträgt 35-50/100.000/Jahr (von Keyserlingk, 1978; Palsson, 1986). Hochgerechnet für Deutschland ist so mit etwa 25.000-40.000 Alkoholentzugsdelirien pro Jahr zu rechnen. Die Angaben zur Mortalitätsrate für das DT schwanken zwischen 5% und 15% (Erwin et al., 1998; Zilker, 1999).

Das DT stellt eine exogene Psychose dar. Die Patienten sind zeitlich, örtlich und situativ, manchmal auch zur Person desorientiert. Des Weiteren ist das klinische Bild geprägt von lebhaften optischen, zum Teil szenischen Halluzinationen, zum Beispiel in Form von Insekten oder kleinen Tieren. Seltener und vor allem bei schweren Verläufen können auch akustische, taktile oder olfaktorische Halluzinationen vorkommen. Die Stimmung ist schwankend, gekennzeichnet durch Angst und Reizbarkeit. Weiter findet sich eine psychomotorische Unruhe. Die beschriebenen Symptome werden durch ein stark ausgeprägtes vegetatives Alkoholentzugssyndrom begleitet (Croissant und Mann, 2000). Es gehen bis zu 35% der DT mit einem epileptischen Anfall vom Grand-mal-Typ einher (Soyka et al., 1989a).

Die Identifizierung von Risikofaktoren für die Entstehung eines DTs ist für die Entgiftungstherapie alkoholabhängiger Patienten von großer Bedeutung. So gaben die Patienten, die ein DT während der Entgiftung erlebten, im Gegensatz zu den Patienten ohne DT einen größeren maximalen Alkoholkonsum, eine höhere Anzahl von Entgiftungen in der Vorgeschichte und einen vermehrten nicht medizinischen Gebrauch von Sedativa an (Schuckit et al., 1995). Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen vorbestehenden körperlichen Krankheiten und Verletzungen und dem Auftreten eines DTs während der Entgiftung

festgestellt werden. Für die Schwere eines DTs scheint die Dauer der Alkoholabhängigkeit keine bedeutende Rolle zu spielen (Wojnar et al., 1999).

1.4. Neurobiologie

1.4.1. Neurobiologie süchtigen Verhaltens

In tierexperimentellen Untersuchungen spricht man von einem belohnenden Stimulus („Reinforcer“), wenn dessen Applikation die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein bestimmtes Verhalten wiederholt wird. Die Definition von „Reward“ ist ähnlich, impliziert aber eine positive Tönung (Koob, 1992).

Das „Reward-System“, das am Wohlbefinden, der Arterhaltung und in diesem Zusammenhang an Hunger, Durst und Sexualität beteiligt ist, kann als phylogenetisch alt angesehen werden. Von daher ist es verständlich, dass viele neuronale Bahnen und Neuronentypen das „Reward-System“ beeinflussen und kognitive, motivationale und motorische Systeme bei einer Belohnungsreaktion im Gehirn involviert sind (Rommelspacher, 1998).

So entfalten sowohl alle psychomotorisch stimulierenden als auch alle sedierenden Substanzen mit Abhängigkeitspotential ihre „Reward-Wirkung“ über das mesokortiko-limbische System. Dieses System beinhaltet Neurone, die in der ventralen Haube (Tegmentum, VTA) liegen und nach kranial in den Nucleus accumbens (N.acc.), den präfrontalen Cortex, das olfaktorische Tuberculum und weitere Hirnareale projizieren (Schultheis und Koob, 1994). Die Neurone sind dopaminerg, sie interagieren aber durch eine komplexe Aktivierung und Hemmung mit einer Vielzahl anderer Neuronentypen. So stehen sie zum Beispiel mit dem glutamatergen (Jones und Kauer, 1999), gabaergen und endogenen Opioid-System (McBride et al., 1999) in enger Verbindung.

Generell wirken dopaminerge Mechanismen psychomotorisch aktivierend. Injiziert man bei Ratten zum Beispiel Dopamin oder Amphetamin in den N.acc., führt dies zu einer Steigerung der motorischen Aktivität. Diese Wirkung kann durch Haloperidol aufgehoben werden (Kiraly und Van Ree, 1984). Unter der

Gabe niedriger Dosen eines Dopaminrezeptor-Antagonisten kommt es zu einer erhöhten Selbstapplikationsrate von Amphetamin und Kokain, was als teilweise Blockade der belohnenden Effekte des Kokains interpretiert wird, welche die Ratte durch vermehrte Selbstapplikation zu kompensieren versucht.

Um den abnormen Drang nach Suchtmitteln zu erklären, existieren zwei nicht zwingend gegensätzliche Modelle: Zum einen eine verringerte Ansprechbarkeit des „Reward-Systems“, welche durch Einnahme von Drogen kompensiert wird (sogenannte Defizit-Hypothese) und zum anderen eine vermehrte Ansprechbarkeit des Systems, so dass jede Einnahme eines Suchtmittels das Wohlbefinden besonders hebt (sogenannte Surfeit-Hypothese).

1.4.2. Neurobiologie des Alkohols

1.4.2.1. Dopaminerges System

In Tierversuchen zeigt sich ein biphasischer Effekt des Alkohols auf das dopaminerge System.

So führt die akute Alkoholzufuhr in niedriger Dosierung zu einer verstärkten Freisetzung von Dopamin (Darden und Hunt, 1977), einer gesteigerten Dopaminsynthese (Carlsson und Lindquist, 1973), einem beschleunigten Dopaminturnover (Carlsson et al., 1973) und erhöhten cerebralen Konzentrationen von Dopaminmetaboliten (Karoum et al., 1976; Fadda et al., 1980).

In hoher Dosierung allerdings vermindert Alkohol die Dopaminfreisetzung (Darden und Hunt, 1977) und stimuliert gleichzeitig die Dopaminsynthese (Carlsson und Lindquist, 1973). Ferner führen hohe Dosen des Alkohols durch eine Stimulation des gabaergen Systems zu einer indirekten Inhibierung dopaminerger Neurone (Ollat et al., 1988).

Es hat sich eine Fokussierung der Forschung auf die alkoholinduzierte Stimulation der dopaminergen Funktion im mesokortikolimbischen „Reward-System“ durchgesetzt. So erhöht Alkohol neben der Aktivität dopaminerger

Neurone im VTA (Gessa et al., 1985; Brodie et al., 1990), was als direkt-exzitatorische zelluläre Aktivierung gedeutet wurde (Brodie et al., 1999), auch die extrazellulären Dopaminkonzentrationen im N.acc. (Di Ciara und Imperato, 1988; Yoshimoto et al., 1992). Dies scheint nach neueren Untersuchungen kein Widerspruch zu sein, sondern kann als direkter Effekt auf die dopaminergen Neurone im VTA, und nicht als Wirkung auf die dopaminergen Nervenenden im N.acc. aufgefasst werden (Yim und Gonzales, 2000; Budygin et al., 2001).

Unter Ratten, die über Generationen nach dem Phänotyp *freiwillige Alkoholpräferenz* (>5g Ethanol/kg/die) bzw. *Nicht-Präferenz* (<1g Ethanol/kg/die) selektiert wurden, zeigte die präferierende Gruppe ein Dopamindefizit im N.acc. (McBride et al., 1995). Diese Tiere infundierten sich auch freiwillig Ethanol in das VTA, während die nicht-präferierenden Ratten dies fast überhaupt nicht taten (Gatto et al., 1994).

Manipulationen an der Genexpression von Dopaminrezeptoren und Knock-out-Methoden unterstreichen die Bedeutung des mesolimbischen Dopaminsystems für die „Reward-Wirkung“ des Alkohols. So konsumieren Knock-out-Mäuse ohne DRD1- oder DRD2- Rezeptor weniger Alkohol (Risinger et al., 2000; El-Ghundi et al., 1998). Weiter führt eine Injektion von DRD2-antisense Oligonukleotid in den N.acc. (Myers und Robinson, 1999) oder eine selektive Überexpression des DRD2-Gens im N.acc. mittels Adenovirenvektor (Thanos et al., 2001) zu einer Verminderung der Alkoholaufnahme und hebt die Alkoholpräferenz bei alkoholpräferierenden Ratten auf.

Die chronische Alkoholzufuhr führt zu einer verminderten Funktion des dopaminergen Systems, das heißt die stimulierende Wirkung des Alkohols auf die Dopaminsynthese ist abgeschwächt und die Dopaminfreisetzung ist reduziert (Tabakoff und Hoffmann, 1979; Fadda et al., 1980). Neuere Untersuchungen erklären die dopaminerge Hypofunktion während der chronischen Alkoholaufnahme mit einer Kombination aus verminderter Expression der Tyrosinhydroxylase, was zu einer verminderten Dopaminsynthese führt, und verstärkter Expression von DAT, was die synaptische Clearance des Dopamins beschleunigt (Rothblatt et al., 2001).

Im Alkoholentzug kommt es zu einer Verringerung der dopaminergen neuronalen Aktivität im VTA (Diana et al., 1992; Shen und Chiodo, 1993) und der extrazellulären Dopaminkonzentrationen im N.acc. (Rossetti et al., 1992; Weiss et al., 1996).

Im Gegensatz zu zahlreichen Tierbefunden haben sich nur relativ wenige Untersuchungen mit der Funktion des Dopaminsystems bei alkoholabhängigen Patienten befasst. Es zeigte sich ein Zusammenhang sowohl zwischen den Dopaminkonzentrationen im Plasma (Anokhina et al., 1985) als auch der Dopaminrezeptorsensitivität (Heinz et al., 1996) und der Schwere des frühen Alkoholentzugs. Inwieweit die Bestimmung der Dopaminkonzentrationen im Plasma allerdings die Verhältnisse im ZNS widerspiegelt, muss offen bleiben. Beim Vergleich von Blutspiegeln des Dopaminmetaboliten Homovanillinsäure (HVA) finden sich, im Verhältnis zu gesunden Kontrollpersonen, während der Entgiftung bei alkoholabhängigen Patienten mit DT erhöhte und bei solchen ohne DT erniedrigte Konzentrationen der HVA (Sano et al., 1992).

Die Befunde lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass die akute Alkoholaufnahme zu einer Stimulation des mesokortikolimbischen „Reward-Systems“ führt. Bei chronischen Intoxikationen erschöpft sich die funktionelle Kapazität dopaminergener Neurone. Dies wird aber durch die alkoholinduzierte Stimulation des dopaminergen Systems zunächst maskiert und nur im Alkoholentzug deutlich. Während des Alkoholentzugs ergibt sich eine Hypersensitivität von Dopaminrezeptoren als Folge der vorangegangenen dopaminergen Hypofunktion, die nicht durch inhibitorische Transmittersysteme kontrolliert werden kann.

1.4.2.2. Noradrenerges System

Neben dem dopaminergen kommt dem noradrenergen System eine entscheidende Bedeutung für das Verständnis der Neurobiologie des Alkohols zu. So ist das noradrenerge System an der „Reward-Wirkung“ der akuten Alkoholaufnahme (Amit und Brown, 1982) und an der Vermittlung wichtiger Aspekte des Alkoholentzugs (Hawley et al., 1985) beteiligt.

Einzeldosen von Alkohol stimulieren die Synthese und den Turnover von Noradrenalin im ZNS (Carlsson und Lindquist, 1973), ohne dabei die Konzentration zu verändern (Karoum et al., 1976). Diese Untersuchungen beziehen sich auf Messungen von Metaboliten (HVA, MHPG) im Hirngewebe von Ratten. Beim Menschen kann die Wirkung der akuten Alkoholaufnahme auf das noradrenerge System mit Hilfe der Bestimmung der Liquorkonzentration des Noradrenalinmetaboliten 3-methoxy-4-hydroxyethylenglykol (MOPEG) untersucht werden. Es zeigt sich, dass die MOPEG-Konzentration im Liquor bei alkoholabhängigen Probanden (Borg et al., 1981) ebenso wie bei gesunden Probanden (Borg et al., 1983b) positiv mit der Blutalkoholkonzentration korreliert. Zudem wurde beobachtet, dass nicht-intoxikierte Probanden mit einer familiären Belastung für Alkoholismus niedrigere MOPEG-Spiegel aufweisen als solche ohne (Borg et al., 1983b).

Bei chronischer Alkoholfuhr bleibt der Noradrenalin-Turnover erhöht (Pohorecky, 1974). Als Resultat werden adaptive Mechanismen wirksam. Alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren werden in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. Im Tierversuch zeigen sich bei chronischer Intoxikation relativ geringe Veränderungen an den alpha-Rezeptoren, während die Veränderungen an den beta-Rezeptoren in Form einer Desensibilisierung und einer Suppression der Downregulation deutlicher ausgeprägt sind (Ollat et al., 1988). Im Alkoholentzug dagegen steigt die Zahl der beta-Rezeptoren an (Banerjee et al., 1978, Kuriyama et al., 1981), ebenso deren Sensitivität (French und Morris, 1978). Auch beim Menschen kommt es während des Alkoholentzugs zu einer noradrenergen Hyperaktivität. So sind im Alkoholentzug die Liquorkonzentrationen von MOPEG bzw. MHPG (3-methoxy-4-hydroxyphenylglykol) nicht nur erhöht, sie korrelieren auch positiv mit dem Schweregrad verschiedener Entzugssymptome, wie zum Beispiel Tremor, Tachykardie, Hypertension und optischen Halluzinationen (Hawley et al., 1985; Borg et al., 1983a).

Nach abgeschlossener Entgiftung bleiben die Liquorkonzentrationen von Noradrenalin erniedrigt (Geraciotti et al., 1994). Außerdem zeigt sich eine Downregulation postsynaptischer noradrenerger Rezeptoren (Krystal et al.,

1996), was insgesamt als persistierende noradrenerge Hypofunktion bei alkoholabhängigen Patienten gedeutet werden kann.

1.5. Genetische Disposition der Alkoholabhängigkeit

1.5.1. Familienstudien

Ziel von Familienstudien ist, festzustellen, ob in der Familie einer erkrankten Person diese Erkrankung häufiger auftritt, als bei Verwandten gesunder Personen. Das durch die klassische Familienstudie zu ermittelnde familiäre Risiko beinhaltet eine Aussage sowohl über den genetischen Hintergrund, als auch über die gemeinsamen Umweltbedingungen.

Eine ausführliche Analyse von 39 verschiedenen Familienstudien konnte eine deutlich höhere Rate von Alkoholabhängigkeit bei den Eltern von Alkoholikern im Vergleich zu Eltern psychiatrisch erkrankter Personen oder gesunder Probanden zeigen. Unter allen beteiligten Eltern zeigte sich bei den Vätern eine Alkoholabhängigkeit etwa fünf mal so häufig wie bei den Müttern (Cotton, 1979). Ein erhöhtes Wiederholungsrisiko bei Söhnen von alkoholabhängigen Vätern konnte dargestellt werden (Goodwin, 1976). Verwandte ersten Grades von Alkoholabhängigen scheinen einem siebenfach erhöhten Risiko ausgesetzt zu sein, ebenfalls an einer Alkoholabhängigkeit zu erkranken (Merikangas, 1990). Neuere, prospektiv angelegte Familienstudien, die von gesunden biologischen Angehörigen von erkrankten Indexfällen ausgehen, können Indikatoren eines erhöhten Erkrankungsrisikos dann feststellen, wenn die Angehörigen vor Eintritt in die Risikoperiode erstmals untersucht werden. Diese Untersuchungen werden High-risk-Studien genannt. Es werden vorwiegend Kinder von Erkrankten über einen längeren Zeitraum beobachtet. Anhand einer solchen High-risk-Studie wurde festgestellt, dass Söhne von Alkoholikern, die im Mittel eine höhere Toleranz und eine geringere Reaktion auf einen Probetrunk mit Alkohol aufweisen, das höchste Risiko zeigen, später an Alkoholismus zu erkranken (Schuckit, 1994a; Schuckit, 1994b).

1.5.2. Zwillingsstudien

Eine genauere Beurteilung des genetischen Anteils an einer Erkrankung wird erst durch eine Sonderform der Familienuntersuchung, der Zwillingsstudie, möglich.

Monozygote Zwillinge (MZ) sind von der genetischen Ausstattung her identisch. Unterschiede zwischen den MZ werden folglich durch die Umwelt bedingt. Dizygote Zwillinge (DZ) haben wie andere Geschwisterpaare weniger Erbanlagen gemeinsam. Der Vergleich von MZ mit DZ erlaubt es, den genetischen Anteil an der beobachteten Ausprägung abzuschätzen. Der Anteil der in einem Merkmal übereinstimmenden Paare an der Gruppe eines Zwillingsstyps wird durch die Konkordanzrate angegeben. Durch die Differenz der Konkordanzrate der MZ und derjenigen der DZ lässt sich eine Aussage über den genetischen Hintergrund eines Merkmals treffen. Zwillingsstudien lassen es ebenfalls zu, die Heredität zu berechnen. Der Heritabilitätsquotient beschreibt den genetischen Anteil an der Gesamtvariabilität einer gemessenen Größe. Dieser ausschließlich durch genetische Faktoren zu erklärende Anteil an der Varianz wird in Prozenten angegeben.

Zwillingsstudien über Alkoholabhängigkeit ergaben Konkordanzraten zwischen 26% (Hrubec und Omenn, 1981) und 59% (Pickens et al., 1991) für männliche MZ und 26% für weibliche MZ (Kendler et al., 1992). Die Konkordanzraten waren bei diesen Studien für DZ um das 1,6- bis 2,2-fache geringer als bei MZ. Die höchste Heredität konnte mit 60% (Pickens et al., 1991) errechnet werden, die niedrigste lag bei 31% (Hrubec und Omenn, 1981). Nicht unerwähnt soll auch eine Studie bleiben, die keine Heredität nachweisen konnte (McGue et al., 1992). So ließ sich in deren Stichprobe aus weiblichen MZ und DZ in Bezug auf Alkoholismusraten kein signifikanter Unterschied feststellen. Der Stichprobenumfang war bei dieser Studie jedoch sehr gering (MZ n=44; DZ n=43).

Prescott und Kendler konnten anhand einer Untersuchung männlicher Zwillingspaare zeigen, dass genetische Faktoren eher einen Einfluss auf das Trinkverhalten als auf den eng eingegrenzten Begriff der Alkoholabhängigkeit

ausüben (Prescott und Kendler, 1999). Die Resultate stützen sich auf eine umfangreiche Stichprobe, die jedoch nur telefonisch exploriert wurde, deren Ergebnisse in ähnlichen Studien aber bestätigt wurden (Maes et al., 1999; Han et al., 1999).

Zusammenfassend können Zwillingsstudien einen starken genetischen Einfluss auf Alkoholkonsum und Alkoholabhängigkeit zeigen. Bei Konkordanzraten der MZ von maximal 60% fällt den Umgebungsfaktoren eine starke Bedeutung zu.

1.5.3. Adoptionsstudien

Auch Adoptionsstudien können Hinweise auf die Existenz genetischer Dispositionen für ein Merkmal geben, da genetische Einflüsse und das familiäre Milieu durch Adoption zu einem bestimmten Zeitpunkt getrennt werden. Während erste Adoptionsstudien (Roe, 1944), die nur über einen kleinen Stichprobenumfang verfügten (n=22), einer genetischen Disposition für Alkoholabhängigkeit nur eine geringe Bedeutung zuschrieben, konnte diese Aussage durch Studien jüngerer Datums relativiert werden. So wurde die Auffassung einer rein umweltbedingten Verursachung der Alkoholabhängigkeit nicht repliziert. Einige Studien wiesen jedoch weiterhin auf eine Beteiligung der Umgebungsfaktoren hin. Die Iowa-Adoptionsstudien zeigten einen Einfluss des familiären Milieus auf die Manifestation von Alkoholabhängigkeit insbesondere in den Fällen, in denen biologische Angehörige ersten Grades ein Alkoholproblem hatten (Cutrona et al., 1994).

Adoptionsstudien konnten die genetische Grundlage der Alkoholabhängigkeit bei Männern erneut belegen (Maier, 1995). Nicht zuletzt wurde, wie oben bereits beschrieben, aufgrund einer schwedischen Adoptionsstudie ein genetisch determinierter Untertyp der Alkoholabhängigkeit postuliert (Cloninger et al., 1981; Cloninger, 1987).

1.5.4. Molekulargenetische Identifizierung krankheitsdisponierender Genvariationen

Die molekulare Genetik ermöglicht es, eine interpersonelle genetische Variabilität darzustellen. Zur Klärung der Frage, ob diesen Unterschieden beim Menschen eine pathogenetische Bedeutung zugeschrieben werden kann, stehen zwei Analyseverfahren zur Verfügung: die Assoziations- und die Kopplungsuntersuchung. Obwohl ein polygenetischer Hintergrund der Suchterkrankungen angenommen wird, werden für die genetische Suchtforschung sowohl Assoziations- als auch Kopplungsanalysen als wichtig erachtet, da der Anteil der jeweiligen Gene an der Ausprägung eines Merkmals nicht bekannt ist (Uhl, 1999).

1.5.4.1. Assoziationsuntersuchungen

Bei einer Assoziationsuntersuchung werden Individuen aufgrund eines Phänotyps einer Gruppe zugeordnet, die dann mit einer Kontrollgruppe verglichen werden kann. Die Anzahl von Allelen und Genotypen in beiden Gruppen kann auf Unterschiede überprüft werden. Es lässt sich so errechnen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung bei Trägern eines Allels oder Genotyps ist. Bei Assoziationsstudien wird nicht das gesamte Genom untersucht. Es werden Marker für Gene verwendet, die von physiologischer oder biochemischer Relevanz für den Phänotyp oder die Erkrankung sein könnten. Diese Gene werden als „Kandidatengene“ bezeichnet. Bei einer signifikanten Assoziation muss jedoch nicht unbedingt der untersuchte Genabschnitt von pathogenetischer Bedeutung sein. Möglicherweise liegt er eng benachbart zu einer direkt am Krankheitsgeschehen beteiligten Sequenz. Es bestünde dann ein Kopplungsungleichgewicht.

1.5.4.2. Kopplungsuntersuchungen

Mit Hilfe einer Kopplungsuntersuchung kann das gesamte Genom systematisch untersucht werden. Hierzu bedient man sich genetischer Polymorphismen, die zwar nicht von pathogenetischer Relevanz sein müssen, deren chromosomale Lokalisation jedoch bekannt ist und die in regelmäßigen Abständen auf die zu untersuchenden Regionen verteilt sind. Während bei der Assoziationsstudie Gruppen miteinander verglichen werden, konzentriert sich die Kopplungsanalyse auf die Vererbung innerhalb von Familien. Tritt ein bestimmtes Markerallel überzufällig häufig mit einer Erkrankung innerhalb einer Familie auf, so ist von einer räumlichen Nähe des Markers und des genetischen Ortes der Erkrankung auszugehen. Es besteht eine Kopplung. Der „lod-score“ (logarithm of the odds) ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit einer bestehenden Kopplung.

1.5.4.3. Krankheitsdisponierende Genvarianten

Assoziationsstudien stützen sich auf Untersuchungen mit „Kandidatengenen“. Kandidatengene für Alkoholabhängigkeit stehen entweder in Zusammenhang mit dem Alkoholmetabolismus oder den Strukturen im Gehirn, über die der Alkohol wirkt oder die das Trinkverhalten steuern. So gelten Gene für Transporter, Rezeptoren und metabolisierende Enzyme der in das „Reward-System“ involvierten Transmitter oder Gene, die sekundär, z. B. über die „Second-Messenger“-Ebene Einfluss ausüben, als „Kandidatengene“ für Alkoholabhängigkeit. Aufgrund dieser weitgefassten Definition des „Kandidatengens“ gibt es eine Vielzahl an Assoziationsstudien über den genetischen Hintergrund der Alkoholabhängigkeit, die hier nur fragmentarisch wiedergegeben werden können.

Alkohol wird durch das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Azetaldehyd abgebaut. Dieses wird durch die Azetaldehyddehydrogenase (ALDH) metabolisiert. Hohe Azetaldehydspiegel führen zu einer vermehrten Katecholaminfreisetzung, die in Form von Tachykardie, Hyperventilation und

einer vermehrten Blutfülle im Gesicht („Flush“) aversiv als „Flushing-Syndrom“ erlebt wird (Asmussen et al., 1948).

ADH und ALDH sind genetisch polymorph. Funktionelle Polymorphismen kommen häufig im asiatischen Raum vor, sind jedoch bei Europäern sehr selten. Die enzymatische Konstellation, die nach Alkoholkonsum nicht zu hohen Azetaldehydspiegeln führt und keine aversive Flushing-Symptomatik herbeiführt, konnte vermehrt bei asiatischen Alkoholikern gefunden werden (Thomasson et al., 1991; Chen et al., 1996). Ein hoher Azetaldehydspiegel nach Alkoholkonsum scheint hingegen protektiv zu sein, bedingt durch eine schnelle ADH in Kombination mit einer inaktiven ALDH (Yin, 1994).

1990 konnte die erste signifikante Assoziation der Alkoholabhängigkeit mit einem Polymorphismus (Taq1, Allel A1) des DRD2-Rezeptor-Gens publiziert werden (Blum et al., 1990). Die Fallzahl war mit 35 Alkoholikern, die zudem noch unterschiedlicher Herkunft waren, äußerst gering. Nachdem nur einige der vielen Folgestudien mit höheren Fallzahlen die Ergebnisse von Blum replizieren konnten, blieb ein Konsens bislang aus (Goate und Edenburg, 1998).

Ein statistisch gesicherter und positiv replizierter Zusammenhang zwischen Alkoholabhängigkeit und den Genen für den DRD1- und DRD3-Rezeptor konnte bislang nicht gefunden werden. Ein Allel des DRD3-Rezeptors zeigte ein signifikantes Ergebnis, das jedoch der Korrektur für multiples Testen nicht standhielt (Sander et al., 1995).

Neue Ansatzmöglichkeiten stellen Analysen an homogenen Untergruppen der Alkoholiker dar. Einteilungskriterien können zum Beispiel an die Subtypisierung Cloningers angelehnte Persönlichkeitsmerkmale oder messbare biologische Variablen („Endophänotypen“) wie EEG-Muster oder Serumspiegel sein. Unterschiede im Krankheitsverlauf (z.B. Schwere der Entzugssymptomatik) stellen weitere Unterteilungsmöglichkeiten dar.

Eine signifikant geringere MAO-Aktivität konnte bei Alkoholikern vom Typ II nach Cloninger gefunden werden (Devor et al., 1993). Eine Studie weist auf einen Zusammenhang zwischen dem MAO-A Gen und dem früheren Erkrankungsbeginn hin (Vanyukov et al., 1995).

Ein Allel des an der Serotoninsynthese beteiligten Tryptophanhydroxylasegens tritt überzufällig häufig bei suizidalen alkoholabhängigen Finnen und bei alkoholabhängigen Taiwanern auf (Nielsen et al., 1998; Hsu et al., 1998).

Während das polymorphe Dopamintransportergen keine Assoziation mit Alkoholabhängigkeit zeigte, konnte ein signifikantes Ergebnis für die Untergruppe mit schwerem Alkoholentzug gefunden werden (Sander et al., 1997a). Eine erste Folgestudie konnte diese Ergebnisse nicht replizieren (Franke et al., 1999). Ein weiteres Gen, das mit schwerem Entzug in Form von DT signifikant assoziiert werden konnte, ist das für die Katecholaminbiosynthese verantwortliche Tyrosinhydroxylasegen (Sander et al., 1998b).

Mit Hilfe von Kopplungsanalysen lässt sich das Genom systematisch untersuchen. Im Rahmen der Colaborative Study of the Genetics of Alcoholism (COGA), die 1995 als Multizenterstudie in den Vereinigten Staaten begann, konnten 105 Familien mit 987 Individuen genetisch untersucht werden. Vier chromosomale Lokalisationen auf Chromosom 1 (lod-score=2,93), 2 (lod-score=1,81), 4 (lod-score=1,72) und 7 (lod-score=3,49) scheinen einen Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit aufzuweisen (Reich et al., 1998). Dem Locus auf Chromosom 4 wurde ein protektiver Effekt zugeschrieben. Interessanterweise liegt er in der Nähe der Gene für Alkoholdehydrogenase. Marker, die in chromosomaler Nähe zum DRD2-Rezeptor oder der MAO lagen, zeigten keine Signifikanz. Bei einer späteren Untersuchung im Rahmen des COGA-Projektes wurde für einen Marker auf Chromosom 16 ein lod-score von 4 errechnet (Foroud et al., 1998).

Eine andere Kopplungsanalyse wurde an 32 Familien mit 152 Individuen eines indianischen Stammes durchgeführt (Long et al., 1998). Einen hohen lod-score ergaben Marker auf Chromosom 11 (3,1; $p=0,00007$) und Chromosom 4 (2,8). Der Marker von Chromosom 4 liegt in der Nähe des Gens für den GABA-Rezeptor $\beta 1$. Man kann einen Bogen zu den Ergebnissen einiger Assoziationsstudien spannen, liegen doch die Gene des DRD4 Rezeptors und der Tyrosinhydroxylase ganz in der Nähe des signifikanten Markers auf Chromosom 11.

1.5.5. Genetische und biologische Marker dieser Studie

1.5.5.1. Dopamin-beta-hydroxylase (DBH)

Die Dopamin-beta-hydroxylase (D β H) katalysiert die Umwandlung von Dopamin zu Noradrenalin und wird insbesondere in zentralen und peripheren Zellen exprimiert, welche Noradrenalin und Adrenalin synthetisieren (Cooper et al., 1986).

Die D β H-Aktivität kann im Plasma und im Liquor cerebrospinalis bestimmt werden, wobei sie eine genetisch determinierte, interindividuelle, über längere Zeit stabile Variabilität aufweist (Fahndrich et al., 1982; Ross et al., 1973; Weinshilbom, 1978a).

Hinreichende Beweise aus Kopplungs- (Goldin et al., 1982; Wilson et al., 1988) und Assoziationsuntersuchungen (Cubells et al., 1998; Cubells et al., 2000; Köhnke et al., 2002; Wei et al., 1997; Zabetian et al., 2001) unterstützen die Annahme, dass der Locus, der für das D β H-Protein kodiert, nämlich DBH, das bedeutendste Gen ist, das die D β H-Aktivität kontrolliert. So scheint ein Zusammenhang zwischen dem DBH*444g/a-Polymorphismus und der D β H-Aktivität zu bestehen. Bei diesem Polymorphismus liegt entweder Guanidin oder Adenin an Position 444 der cDNA des DBH-Gens vor. Dieser Basenaustausch führt aber nicht zu einem Aminosäureaustausch: die Primärstruktur der D β H bleibt erhalten. Interessanterweise liegt der DBH*444g/a-Polymorphismus genau zwischen dem Exon 2 und dem Intron 2 des DBH-Gens (Kobayashi et al., 1989), wobei der Basenaustausch möglicherweise Einfluss auf das Splicing-Verhalten hat, und dadurch unterschiedliche Konzentrationen an D β H-mRNA hervorbringen würde (Cubells et al., 1998). Der Genotyp DBH*444a/a geht mit den niedrigsten mittleren D β H-Aktivitäten einher, DBH*444a/g und DBH*444g/g dann jeweils mit höheren (Cubells et al., 1998).

DBH-Knock-out-Mäuse zeigen in einem Zwei-Flaschen-Wahl Paradigma eine reduzierte Ethanolpräferenz. Zudem sind sie hypersensitiv für die sedativen und hypothermischen Effekte der systemischen Alkoholverabreichung (Weinshenker

et al., 2000). Diese Ergebnisse lassen eine genetische Variation des DBH-Gens vermuten, die die individuelle Reaktion auf Alkohol moduliert.

Beim Menschen brachten Studien in Bezug auf den Zusammenhang zwischen D β H-Plasmaaktivität und Alkohol widersprüchliche Ergebnisse hervor (La Grange et al., 1995; Schuckit et al., 1981; Lykouras et al., 1987). Eine Studie, die sich dem DBH-1021C \rightarrow T-Polymorphismus widmete, konnte keine Assoziation zur Alkoholabhängigkeit bzw. zum DT herstellen (Köhnke et al., 2002).

Allelische Assoziationsuntersuchungen zwischen dem DBH*444a/g-Polymorphismus und Alkoholabhängigkeit bzw. schweren Entzugserscheinungen wurden noch nicht durchgeführt.

1.5.5.2. Dopaminrezeptor 4 (DRD4)

Der DRD4 gehört neben DRD2 und DRD3 zu der Familie der DRD2-ähnlichen Dopaminrezeptoren. Es handelt sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der sieben Transmembrandomänen aufweist (Seeman, 1992). Die Verteilung des DRD4 im Gehirn zeigt regionale Unterschiede. So ist die Dichte von DRD4 im präfrontalen und entorhinalen Cortex, Hippocampus und Uncus höher als in anderen Hirnregionen. Im Gegensatz zu DRD2 wurde für DRD4 eine geringe Konzentration im Striatum gefunden (Da-La-Garza und Madras, 2000; Matsumoto et al., 1995; Primus et al., 1997).

Insgesamt konnten neun Polymorphismen, die das DRD4-Gen betreffen, identifiziert werden (Paterson et al., 1999). Ein Polymorphismus besteht aus einer variablen Anzahl von Tandem-Repeats, ein sogenannter VNTR-Polymorphismus, innerhalb des Exon 3 des DRD4-Gens. Dabei kann die 48 bp lange Repeat-Einheit ein- bis zehnmal vorkommen, wobei Allele mit vier und sieben Repeats bei der weißen Bevölkerung am häufigsten sind (Van Tol et al., 1992; Lichter et al., 1993). Die Allelfrequenzen des Vier- bzw. Sieben-Repeats sind weltweit in verschiedenen Bevölkerungsgruppen sehr variabel (von 0,16 bis 0,96 bzw. von 0,01 bis 0,78) (Chang et al., 1996). Der VNTR-Polymorphismus kodiert für Aminosäuren, die in der dritten cytoplasmatischen

Schleife des Rezeptors liegen – eine Region, die wichtig für die Kopplung mit dem G-Protein zu sein scheint. Von daher wurde ein möglicher Einfluss der VNTR-Varianten auf die Second-Messenger-Kopplung bzw. Signaltransduktion postuliert (Van Tol et al., 1992).

Eine aufgrund methodischer Schwächen (Paterson et al., 1999) fraglich signifikante Assoziation des VNTR-Polymorphismus mit dem Persönlichkeitsmerkmal „Novelty Seeking“ (\approx Neugierde) konnte gezeigt (Ebstein et al., 1996; Benjamin et al., 1996), jedoch nicht repliziert werden (Paterson et al., 1999). Es wird vermutet, dass Menschen, die Substanzmissbrauch betreiben, in psychologischen Tests höhere novelty-seeking-Werte haben als Kontrollpersonen (Bardo et al., 1996).

Es liegen einige, an unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen durchgeführte, Assoziationsstudien zum Thema Alkoholabhängigkeit und DRD4-VNTR-Polymorphismus vor. Lediglich in einer Studie (George et al., 1993) mit einem wegen methodischer Schwächen fraglich positiven Ergebnis ergaben sich bisher nach Korrektur durch multiples Testen keine signifikanten Assoziationen (Adamson et al., 1995; Muramatsu et al., 1996; Parsian et al., 1997; Geijer et al., 1997; Sander et al., 1997b; Chang et al., 1997).

Kandidatengenuntersuchungen bezüglich des DRD4-VNTR-Polymorphismus und schweren Entzugserscheinungen liegen bisher nicht vor.

1.5.5.3. Catecholamin-O-methyltransferase (COMT)

Die Catecholamin-O-methyltransferase (COMT) ist an der Metabolisierung des Dopamins, Noradrenalins und Adrenalins beteiligt (Guldberg und Marsden, 1975). Die COMT existiert zum einen als lösliche (S-COMT) und zum anderen als membrangebundene (MB-COMT) Form, die aber beide durch das selbe, auf Chromosom 22 lokalisierte, Gen kodiert werden (Bertocci et al., 1991; Grossman et al., 1992; Lundstrom et al., 1995). Im menschlichen Gehirn kommt es fast ausschließlich zur Expression der größeren MB-COMT (Tenhunen et al., 1994; Hong et al., 1998).

Was die Verteilung der COMT im menschlichen Gehirn angeht, können im Rückenmark die höchsten, in der Amygdala die niedrigsten und in den restlichen Regionen mittlere Gewebekonzentrationen nachgewiesen werden (Hong et al., 1998).

Frühere Studien der COMT-Enzymaktivität in Erythrocyten und in der Leber zeigten eine trimodale Verteilung der Enzymaktivität, die mit einem autosomal-kodominanten Erbgang vereinbar ist (Weinshilboum, 1978b; Boudikova et al., 1990).

Ein Einzel-Basenpaar-Austausch (von Guanin zu Adenin) in Exon 4 des COMT-Gens resultiert in einem Aminosäureaustausch (von Valin zu Methionin) an Codon 158 der MB-COMT und an Codon 108 der S-COMT. Bei diesem funktionellen Polymorphismus wird das Allel, das die thermostabile hochaktive COMT kodiert COMT*H (G; Val) und das Allel, das die thermolabile niedrigaktive COMT kodiert COMT*L (A; Met) genannt (Lachman et al., 1996b; Syvanen et al., 1997).

Bezüglich der COMT-Aktivität in Erythrocyten konnte kein Unterschied zwischen alkoholabhängigen Patienten und Kontrollpersonen festgestellt werden (Agarwal et al., 1983).

Untersuchungen zur Assoziation des COMT-Val/Met-Polymorphismus mit dem Alkoholismus bleiben widersprüchlich (Tiihonen et al., 1999; Wang et al., 2001; Hallikainen et al., 2000; Kauhanen et al., 2000). In einer in Japan durchgeführten Assoziationsstudie wurde auch die Schwere von Entzugserscheinungen (unter anderem das Auftreten des DTs) mitberücksichtigt. Es konnte aber kein Zusammenhang festgestellt werden (Ishiguro et al., 1999).

1.6. Fragestellung

Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien unterstützen die Bedeutung genetischer Faktoren in der Ätiologie der Alkoholabhängigkeit.

Diese Untersuchung zielt auf die Erforschung von genetischen und biologischen Markern ab, die an der dopaminergen und noradrenergen Neurotransmission beteiligt sind und eine übergeordnete disponierende Bedeutung für die Alkoholabhängigkeit und für schwere Entzugserscheinungen wie zum Beispiel das Delirium tremens vermuten lassen.

Die Fragestellungen im Einzelnen:

- 1.a. Besteht eine Assoziation der Alkoholabhängigkeit oder des DTs mit bestimmten Genotypen oder Allelen des DBH*444g/a-Polymorphismus?
- b. Kann die Beobachtung von Cubells (Cubells et al., 1998), dass es sich bei dem DBH*444g/a-Polymorphismus um einen funktionellen Polymorphismus handelt, anhand einer deutschen Stichprobe repliziert werden?
- c. Besteht ein Zusammenhang der D β H-Plasmaaktivität und der Alkoholabhängigkeit oder der Ausprägung eines DTs?
2. Gibt es eine Assoziation der Alkoholabhängigkeit oder des DTs mit bestimmten Allelen des DRD4-VNTR-Polymorphismus?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Alkoholabhängigkeit oder des DTs und bestimmten Genotypen oder Allelen des COMT-Val/Met-Polymorphismus?
4. Hat die Trinkmenge oder der Dauer der Alkoholabhängigkeit einen Einfluss auf die Entstehung eines DTs bei alkoholabhängigen Patienten?

2. Methoden

2.1. Probanden und Diagnostik

Das Studienprotokoll wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Untersuchung biologischer und genetischer Marker auf ihren Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit und schweren Entzugserscheinungen“ durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt.

Alle Probanden wurden sowohl über Wesen und Bedeutung der Studie als auch über mögliche Risiken und Nachteile, die durch die Untersuchung entstehen können, sowie über die anonyme Datendokumentation aufgeklärt. Eine schriftliche Einwilligung wurde von jedem Studienteilnehmer gegeben. Zur Diagnostik wurde mit allen eingeschlossenen Individuen ein Interview basierend auf der deutschen Version des Structured Clinical Interview for the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM IV (American Psychiatric Association, 1994), SKID (Wittchen et al., 1997) durchgeführt. Zusätzlich zu diesem Interview wurde bei allen Studienteilnehmern das Geburtsdatum, das Geschlecht, die Herkunft, die Medikamentenanamnese, die Familienanamnese in Bezug auf Alkoholismus und andere psychiatrische Erkrankungen erfasst und dokumentiert. Im Rahmen der Suchtanamnese der alkoholabhängigen Individuen wurden Fragen bezüglich Menge und Art der konsumierten alkoholischen Getränke und Beginn des Alkoholkonsums und der Abhängigkeit gestellt.

Nicht in die Studie eingeschlossen wurden Personen, bei denen schwere psychiatrische oder internistische Krankheiten, ein Anfallsleiden, ein Schädeltrauma in der Vorgeschichte oder eine Abhängigkeit von anderen Substanzen als Alkohol und Nikotin vorlagen.

Die in die Studie eingeschlossenen Individuen wurden zum Vergleich in die folgenden Gruppen eingeteilt:

1. alkoholabhängige Patienten mit DT während der Entgiftung in der Vorgeschichte
2. alkoholabhängige Patienten mit leichten Entzugserscheinungen und ohne DT in der Vorgeschichte
3. alkoholabhängige Patienten
4. gesunde Kontrollpersonen ohne Alkoholabhängigkeit

Um einen Untersucherbias zu vermeiden, wurde das Interview mit den Probanden vor der Genotypisierung durchgeführt. Alle eingeschlossenen Individuen waren nicht miteinander verwandt. Aufgrund der möglichen Heterogenität der Gene in verschiedenen ethnischen Gruppen wurden nur Individuen deutscher Herkunft eingeschlossen.

2.1.1. Alkoholabhängige Patienten mit DT während der Entgiftung

Diese Gruppe bestand aus 82 Patienten. Alle Patienten dieser Gruppe erfüllten die Kriterien der Alkoholabhängigkeit nach DSM IV.

Die Zuteilung in diese Gruppe beruhte auf der Dokumentation der behandelnden Psychiater. Es wurden sowohl solche Patienten in die Gruppe eingeschlossen, bei denen während der aktuellen Entgiftung in der Klinik ein DT auftrat, als auch solche, bei denen ein DT während vergangener Entgiftungen ärztlich dokumentiert worden war und anamnestisch bestätigt werden konnte.

57 Patienten wurden auf der Entgiftungs- bzw. Therapiestation für Alkoholabhängigkeit der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen (UKPP) aufgenommen. 25 Patienten konnten in der Fachklinik Wilhelmsheim (Dr. Kolb), Oppenweiler rekrutiert werden.

Unter den 82 Patienten waren 28, bei denen zusätzlich zu dem DT auch einen Krampfanfall während der Entgiftung auftrat.

Das durchschnittliche Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt des Einschlusses bei 45,8 Jahren, SD: 8,9 Jahre. Der jüngste Patient war 27, der älteste 63 Jahre alt. Die Gruppe gliederte sich in 10 Frauen und 72 Männer.

2.1.2. Alkoholabhängige Patienten mit leichten Entzugerscheinungen und ohne DT in der Vorgeschichte

97 Patienten konnten dieser Gruppe zugeteilt werden. Sie wurden auf den entsprechenden Stationen der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen rekrutiert.

Nach den Kriterien der DSM IV lag bei den Patienten eine Alkoholabhängigkeit, aber kein DT oder Krampfanfall während der Entgiftung, vor. Die Patienten dieser Gruppe erlebten während der Entgiftung nur leichte Entzugerscheinungen.

Mit Hilfe von Angaben der Patienten und entsprechender Untersuchung wurde der Schweregrad der Entzugerscheinungen unter Verwendung des „Revised Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol Scale“ (CIWA-Ar) (Sullivan et al., 1989) dokumentiert.

Diese Skala berücksichtigt das Auftreten von Übelkeit und Erbrechen, Tremor, Schweißausbrüchen, Ängstlichkeit, Erregung, Kopfschmerzen, Orientierungsstörungen, taktile, akustische oder visuelle Wahrnehmungsstörungen während der Entgiftung. Hierbei wird jedes Kriterium, außer „Orientierungsstörungen“ von 0 = „nicht vorhanden“ bis 7 = „voll ausgeprägt“, bewertet. Die Graduierung des Teiles „Orientierungsstörungen“ erfolgt in nur fünf Stufen. Es können maximal 67 Punkte erreicht werden.

Als Einschlusskriterium für diese Gruppe wurde ein CIWA-Wert < 12 festgelegt. Dabei betrug der Mittelwert der Patienten 1,0 Punkte; Maximalwert: 11 und Minimalwert: 0. 78,35% der Patienten wiesen den Minimalwert 0 Punkte auf.

Als Maß für den Schweregrad der Entzugerscheinungen trug ebenfalls die Menge an benötigten Clomethiazol-Kapseln (Distraneurin®) während der Entgiftung bei.

76 der 97 Patienten nahmen keine Medikamente ein, die den Entzug abmilderten.

21 Patienten erhielten in den ersten 24 Stunden der Entgiftung Clomethiazol (Distraneurin®) mit einer durchschnittlichen Dosis von 1,05g (SD: 0,62g), um leichtere Entzugserscheinungen wie zum Beispiel Tachykardie und Übelkeit zu lindern.

Das Durchschnittsalter der Patienten dieser Gruppe betrug zum Zeitpunkt des Einschlusses 41,7 Jahre, SD: 7,9 Jahre. Der jüngste Patient war hier 27, der älteste 61 Jahre alt. Die Gruppe gliederte sich in 27 Frauen und 71 Männer.

2.1.3. Alkoholabhängige Patienten

Dieser Gruppe gehörten insgesamt 208 alkoholabhängige Patienten nach DSM IV an.

Sie setzte sich aus der Gruppe der Patienten mit leichten Entzugserscheinungen (n=97) und der Gruppe der Patienten mit DT während der Entgiftung (n=82) zusammen. Zu den 179 kamen noch 29 weitere alkoholabhängige Patienten, die während der Entgiftung unter schweren Entzugserscheinungen litten (CIWA-Wert ≥ 12) und kein DT hatten, und somit keiner der bisher aufgeführten Gruppen zugeordnet werden konnten.

Zum Zeitpunkt des Einschlusses lag das durchschnittliche Alter der Patienten bei 43,5 Jahren, SD: 8,5 Jahre. Die Altersspanne reichte von minimal 21 bis maximal 63 Jahren. Die Gruppe teilte sich in 39 Frauen und 169 Männer.

2.1.4. Gesunde Kontrollpersonen ohne Alkoholabhängigkeit

102 gesunde Kontrollpersonen konnten im Großraum Stuttgart rekrutiert werden. Personen, die eine positive Familienanamnese (d.h. Verwandte ersten und zweiten Grades) bezüglich einer Suchtkrankheit oder einer anderen psychiatrischen Erkrankung aufweisen, wurden nicht als Probanden eingeschlossen. Gleiches gilt für Personen, die psychotrope Medikamente einnahmen.

Die gesunden Kontrollpersonen wurden neben dem oben erwähnten Interview mittels der Kriterien des Fragebogens „Alcohol Use Disorders Identification Test“ (AUDIT) (Babor und Grant, 1989) exploriert. Dieser von der WHO empfohlene Test dient der Klärung der Frage, ob ein überhöhter Alkoholkonsum vorliegt. Es müssen zehn Fragen zu Folgen und Komplikationen des Trinkens, zur Trinkmenge und zum Trinkverhalten beantwortet werden. Es können bei jeder Frage zwischen null und vier Punkte erreicht werden. Maximal sind also 40 Punkte möglich. Werden über acht Punkte erzielt, so gilt – laut Definition – eine Alkoholabhängigkeit als wahrscheinlich.

Als Einschlusskriterium galt ein kleinerer Wert als acht Punkte im AUDIT – Test. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei 37,4 Jahren, SD: 10,7 Jahre. Der älteste Proband hatte ein Alter von 62, der jüngste eines von 24 Jahren. Die Gruppe gliederte sich in 36 Frauen und 66 Männer.

2.2. Extraktion und Aufbereitung genomischer DNA

Die DNA-Extraktion aus venösem Vollblut erfolgte nach einem standardisierten Verfahren (Miller et al., 1988).

Jedem Studienteilnehmer wurden 20 ml venöses Blut entnommen. Bis zur Weiterverarbeitung lagerte das mit EDTA antikoagulierte Blut bei -20°C . Für die Untersuchung wurden 10 ml Blut im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Zur Zellyse wurde das aufgetaute Blut mit 30 ml kaltem Lysispuffer in einem Zentrifugationsröhrchen vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4°C . Nachdem der Überstand verworfen wurde, resuspendierte man das Pellet in 10 ml Kernlysispuffer. Um native Proteine zu inaktivieren, wurde die Suspension auf 0,0066% SDS und 10 mg/ml Pronase eingestellt und unter leichtem Schütteln über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag gab man zu dem klaren Verdau 3,2 ml einer gesättigten NaCl-Lösung ($>6\text{M}$). Nach kräftigem Schütteln schlossen sich zwei 10-minütige Zentrifugationen bei 4.000 rpm und Raumtemperatur an. Die Pause zwischen den Zentrifugationsschritten

diente dazu, die Proben nochmals leicht aufzuschütteln. Das ausgefallene Protein in Form eines Pellets wurde im Zentrifugationsröhrchen zurückgelassen. Den Überstand, der die DNA enthielt, überführte man in ein neues Zentrifugationsröhrchen. Unter Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol (rund 12 ml) wurde der Ansatz bis zur Präzipitation der DNA geschwenkt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze die DNA in ein Kunststoffglasreagenzröhrchen übertragen und mit 400µl 70%igem Ethanol gereinigt. Anschließend wurde die DNA zusammen mit 400µl TE-4 in ein Kryoröhrchen gegeben. Zur Resuspension der DNA beließ man das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur, um es dann bei -20°C zu lagern. Zur Analyse der verschiedenen Marker wurden schließlich DNA-Konzentrationen von 10 ng/µl oder 100 ng/µl hergestellt.

Die Bestimmung von Reinheitsgrad und Konzentration der DNA-Lösungen wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers durchgeführt. Zur Messung verwendete man Mikroküvetten aus Quarzglas. Der Reinheitsgrad wurde durch den Quotienten A_{260}/A_{280} (Absorption bei 260 nm / Absorption bei 280 nm) bestimmt. Er lag im Bereich zwischen 1,4 und 1,8.

2.3. Molekulargenetische Untersuchungen

2.3.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierung genomischer DNA auf der Basis von Kandidatengen-Markern erfolgte durch das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Zur Amplifikation benötigt man als Starthilfe Oligonukleotide, sogenannte Primer. Dabei handelt es sich um kurze (15 bis 20 bp), einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer bestimmten Sequenz der DNA-Matrize (sogenannte *template*) sind. Die DNA-Polymerase verlängert unter geeigneten Reaktionsbedingungen und in

Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. All diese DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Für eine Wiederholung der Synthese ist es daher notwendig, die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze bei 95°C aufzuschmelzen und nach Abkühlen der Mischung auf 50-65°C die Primer wieder binden zu lassen (sogenanntes Annealing). Sobald die optimale Temperatur (z.B. 72°C) für die Enzymreaktion erreicht ist, verlängert die DNA-Polymerase die Primer. Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine neue Vermehrungsrunde. Dabei dienen auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrizen und tragen somit dazu bei, dass mit jedem neuen Zyklus die Konzentration der amplifizierten Ziel-Sequenzen exponentiell ansteigt.

Um bei schwierigen Verhältnissen zwischen den Primern und deren Zielsequenzen den Gehalt an unspezifischen Amplifikaten während der PCR zu verringern, ist es möglich, eine Änderung des üblichen Temperaturprofils vorzunehmen: sogenannte touchdown-PCR (Don et al., 1991). Hier wählt man bei den ersten Zyklen die Annealing-Temperatur z.B. 10°C über der idealen Annealing-Temperatur, um sie dann von Zyklus zu Zyklus jeweils um 1°C bis auf die ideale Annealing-Temperatur (z.B. 62°C) zu senken.

Um bei jedem Zyklus eine erneute Enzymzugabe zu vermeiden, verwendet man eine hitzestabile DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase. Dieses Enzym wird aus dem thermophilen, in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Das Optimum für die Polymerase-Aktivität liegt bei 75-80°C und ist abhängig von der zu vervielfältigenden Sequenz. Die Taq-Polymerase ist bis 95°C temperaturstabil.

2.3.2. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Bei dieser Methode amplifiziert man zunächst den DNA-Abschnitt, der die Sequenzvariation enthält. Dann wird das Produkt mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease geschnitten, in deren Erkennungssequenz die Mutation liegt. Je nach Vorhandensein der Mutation ergeben sich

Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge, die nach Auftrennung auf einem geeigneten Gel die genaue Bestimmung des Genotyps der betreffenden Person zulassen.

2.3.3. PCR-Kontaminationsprävention

Die hohe Sensitivität der PCR verlangte zur Vorbeugung von Kontaminationen folgende Maßnahmen:

1. Die Pipettenspitzen wurden 20 min bei 1,4 bar und 125°C autoklaviert.
2. Die für die PCR benötigten Lösungen und die DNA wurden getrennt voneinander aufbewahrt.
3. Die Präparation der DNA für die PCR erfolgte in einem anderen Raum wie die Durchführung der PCR.
4. Als Kontrollen wurden bei der PCR Positiv- und Negativkontrollen mitamplifiziert.
5. Das Tragen von Handschuhen war obligat.

2.3.4. Durchführung der Genotypisierung

2.3.4.1. Dopamin-beta-hydroxylase-Gen (DBH)

Bei diesem RFLP-Polymorphismus kommt es zu einem Basenaustausch an Position 444 von G→A in Exon 2 des Gens (Kobayashi et al., 1989). Das 207 bp lange PCR-Produkt wird während des Verdauens entweder in ein 169 bp und 38 bp DNA-Fragment gespalten (DBH*444g) oder so belassen (DBH*444a). Nach vorausgegangenen Untersuchungen von Cubells et al. geht der Genotyp DBH*444a/a mit den niedrigsten mittleren DβH-Aktivitäten einher, DBH*444a/g und DBH*444g/g dann jeweils mit höheren (Cubells et al., 1998).

Für die PCR wurden 25 ng DNA, je 0,5 µM der Primer, 1,5 mM MgCl₂, 250 µM dATP, dCTP, dTTP, dGTP und 1,5 Units Taq-Polymerase verwendet. In dem Gesamtvolumen von 21 µl waren 2,1 µl PCR-Buffer und 1 µl DMSO enthalten.

Der erste Schritt der PCR war die Denaturierung bei 95°C für fünf Minuten. Es folgten 35 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec touchdown Annealing von 72°C auf 63°C, die restlichen 25 Zyklen dann bei 62°C und 30 sec Elongation bei 72°C. Abschließend führte man fünf Minuten einen Elongationsschritt bei 72°C durch.

7 µl des PCR-Produktes wurden im Anschluß in einem Gesamtvolumen von 17µl unter Zugabe von 1,7 µl NE-Buffer 4 und drei Units der Restriktionsendonuklease *EcoN* I vier Stunden bei 37°C verdaut.

2.3.4.2. Dopaminrezeptor 4-Gen (*DRD4*)

Der hier verwendete VNTR-Polymorphismus besteht aus einem 48 bp DNA-Element, das in variabler Anzahl (zwei- bis zehnfach) als sog. tandem repeats innerhalb der Sequenz des Exons 3 des *DRD4*-Gens vorkommt. Die Allelklassifikation entspricht der Anzahl der Elementwiederholungen (*DRD4**2–*10) (Lichter et al., 1993).

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 21µl durchgeführt. Darin enthalten waren 25 ng DNA, jeweils 0,5 µM der Primer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dATP, dCTP, dTTP, 100 µM dGTP, 100 µM 7-deaza-GTP und 1 Unit Taq-Polymerase. 10% des Gesamtvolumens, also jeweils 2,1 µl, bestand aus PCR-Buffer bzw. DMSO.

Die 37 PCR-Thermozyklen setzten sich zusammen aus einem dreiminütigem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C, gefolgt von 2 Zyklen 30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min touchdown Annealing von 65°C auf 64°C und 1 min Elongation bei 72°C. Es schlossen sich 35 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 60°C und 1 min Elongation bei 72°C an. Eine Elongationsphase von 10 min bei 72°C beendete das Programm.

2.3.4.3. *Catecholamin-O-methyltransferase-Gen (COMT)*

Dieser RFLP-Polymorphismus ergibt sich aus einem Basenaustausch von G→A in Exon 4 des Gens. Durch den Verdau eines 169 bp langen PCR-Produktes kann neben zwei gemeinsamen Fragmenten (26 bzw. 29 bp) entweder ein 114 bp (G; COMT*H) oder ein 96 bp (A; COMT*L) langes Fragment entstehen (Lachman et al., 1996b; Daniels et al., 1996).

Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 21,5 µl und enthielt 30ng DNA, jeweils 0,5 µM der Primer, 2,5 mM MgCl₂, 250 µM dATP, dCTP, dTTP, dGTP und 1,5 Units Tap-Polymerase. Als günstig erwies sich ferner die Zugabe von 3,75 µl 4M Betaine und 2,1 µl PCR-Buffer.

Das Temperaturprofil der PCR begann mit einer fünfminütigen Denaturierung bei 94°C. Anschließend wurden 34 Zyklen, jeweils bestehend aus 45 sec Denaturierungsphase bei 94°C, 1 min Annealingphase bei 60°C und 1 min Elongationsphase bei 72°C durchgeführt. Das Programm schloss mit einer zehnminütigen Elongation bei 72°C ab.

Man benötigte fünf Units der Restriktionsendonuklease *Nla* III, um 11 µl des PCR-Produktes in einem Volumen von insgesamt 21 µl bei 37°C vier Stunden zu verdauen. Zusätzlich wurden dem Ansatz 2,1 µl NE-Buffer 4 und 1,5 µl 10x BSA beigefügt.

2.3.5. *Agarosegelelektrophorese*

Die Gelelektrophorese stellt ein einfaches Verfahren dar, durch das geladene Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit getrennt werden können.

Nukleinsäuren sind durch ihre chemische Zusammensetzung negativ geladen. Trägt man die aufzutrennenden Proben auf einer Seite des Gels auf und legt eine elektrische Spannung an, so wandern die Nukleinsäuren zur Anode, und zwar um so schneller, je kleiner sie sind. Agarosegele wirken aufgrund ihrer Porenstruktur wie molekulare Siebe, die die Wanderung von Molekülen je nach ihrer Größe verlangsamen. Die Porengröße wird durch die Konzentration der

Agarose bestimmt. So entstehen charakteristische Banden gleich großer Moleküle. Diese Banden sind allerdings ohne Anfärbung nicht sichtbar. Sie lassen sich mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches die Eigenschaft hat, in die DNA zu interkalieren und unter UV-Licht zu fluoreszieren, darstellen. Der Verlauf der Gelelektrophorese kann durch bromphenolblauhaltigen Ladebuffer kontrolliert werden.

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte entweder in einer kleinen (11 x 8 cm) oder in einer großen (21 x 20 cm) Flachbettgelkammer. Die Agarosekonzentration lag bei 3%, das heißt man löste 3 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer. Die Gele waren auf 0,3 µg/ml Ethidiumbromid eingestellt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. In jede Geltasche wurde ein Gemisch aus 6 µl PCR-Produkt und 3 µl Ladebuffer pipettiert.

Bei jeder Gelelektrophorese wurde eine 100 bp DNA-Leiter zum Zweck der Größenbestimmung der DNA-Fragmente mit aufgetragen. Diese Leiter besteht aus 15 Fragmenten, deren Größe in 100 bp-Schritten von 100 bis 1500 bp zunimmt und einem zusätzlichen 2072 bp-Fragment.

Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V und 100 mA durchgeführt. Nach einer Zeit von 35 min in der kleinen bzw. 90 min in der großen Kammer wurde die DNA mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und das Ergebnis mit einer Polaroidkamera dokumentiert.

2.4. Bestimmung der Dopamin-beta-hydroxylase(DβH)-Aktivität im Plasma

Für die Bestimmung der Aktivität der DβH im Plasma konnte von insgesamt 191 Studienteilnehmern venöses Blut gewonnen werden. Darunter waren 53 gesunde Kontrollpersonen und 138 alkoholabhängige Patienten. Die Gruppe der alkoholabhängigen Patienten teilte sich in 57 Patienten mit DT, 70 Patienten mit leichten Entzugserscheinungen und 11 mit Krampfanfall während der Entgiftung.

Den alkoholabhängigen Patienten wurde erst nach 22 Tagen Alkoholabstinenz Blut abgenommen. Keiner der Probanden nahm psychotrope Medikamente ein.

Die venöse Blutentnahme (Antikoagulation mit Ammoniumheparin) erfolgte zwischen 7:00 und 8:00 Uhr morgens am nüchternen Probanden. Binnen 30 Minuten wurde das Blut zentrifugiert und das Plasma daraufhin bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der Plasma D β H-Aktivität wurde von einer kooperierenden Arbeitsgruppe (Prof. Joseph F. Cubells, Yale University School of Medicine und Dr. George M. Anderson, Yale Child Study Center, New Haven, CT, USA) mit Hilfe der High Performance Liquid chromatographic-fluorometric (HPLC-F) Methode durchgeführt (Cubells et al., 1998).

2.5. Statistische Auswertung

Die Allelfrequenzen des DBH*444 a/g- und COMT*L/*H- Polymorphismus in den jeweiligen Gruppen wurden mit Hilfe des zweiseitigen Fisher's Exakten Tests verglichen. Auch der DRD4-VNTR-Polymorphismus wurde nach Zusammenfassung auf vier Felder in dieser Art verglichen.

Wurden für eine Kontingenztafel mehr als vier Felder benötigt, wie zum Beispiel für den Vergleich der Allelfrequenzen des DRD4-VNTR-Polymorphismus und den der Genotypfrequenzen des DBH*444 a/g- und COMT*L/*H-Polymorphismus, so erfolgte die Analyse mit Hilfe des Pearson-Tests.

Der Rangsummentest nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis wurde dazu verwendet, die jeweiligen Gruppen auf Unterschiede hinsichtlich der D β H-Plasmaaktivität, Trinkmenge und Dauer der Alkoholabhängigkeit zu prüfen. Die Untersuchung der Genotyp-Phenotyp-Korrelation in Beziehung auf den DBH*444-Polymorphismus wurde auch mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurde die Genotyp-Phenotyp-Korrelation des DBH*444g/a-Polymorphismus in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten untersucht.

Da sich die D β H-Plasmaaktivität als nicht normalverteilt erwies, erfolgte eine Transformation der Werte mit Quadratwurzel.

Zur Kontrolle eines Auswahl-, Rekrutierungs- bzw. Methodenfehlers erfolgte die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für die diallelischen Marker

(COMT*L/*H- und DBH*444g/a-Polymorphismus) mit Hilfe des HWSIM-Programms (<http://krunch.med.yale.edu/hwsim>) und für den multiallelischen Marker (DRD4-VNTR-Polymorphismus) mit Hilfe der sogenannten Monte Carlo Tests und des CLUMP-Programms (Sham und Curtis, 1995).

Generell galt ein p-Wert, der kleiner als 0,05 war, als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1. Dopamin-beta-hydroxylase: DBH*444g/a-Polymorphismus

3.1.1. Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese wurden die Produkte des Verdauens aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Abbildung 1 zeigt die möglichen Ergebnisse. Bei 310 Probanden konnte die Genotypisierung erfolgreich durchgeführt werden.

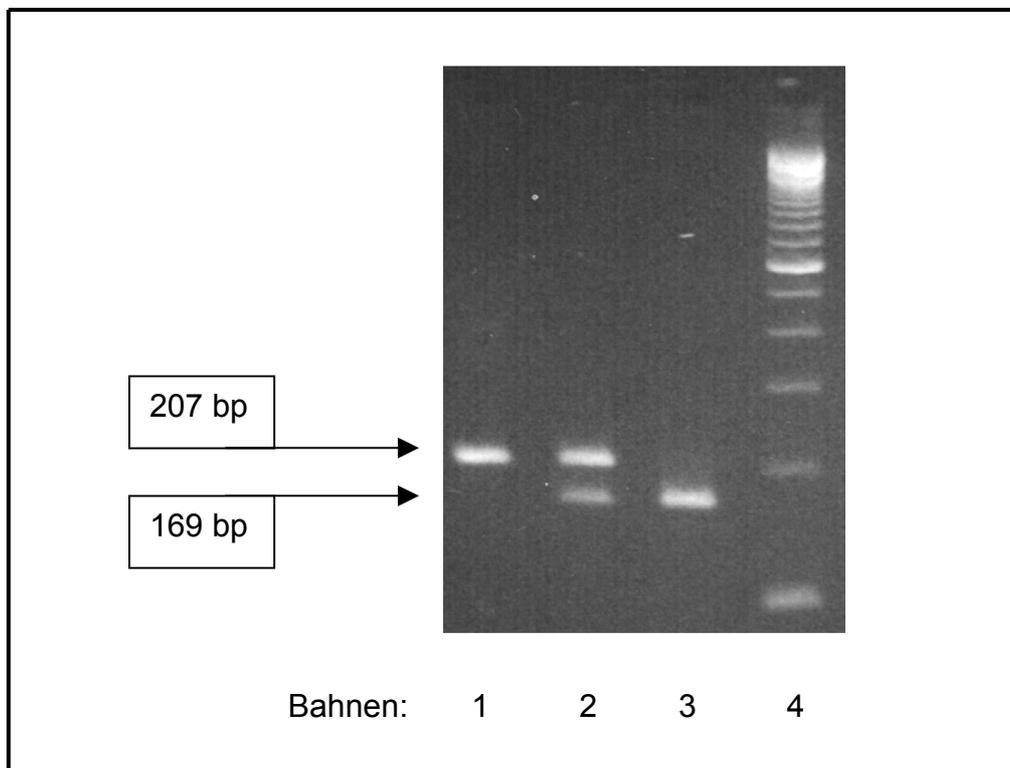


Abbildung 1. *Eco*N I – Restriktionsendonuklease-Verdau des DBH*444a/g – RFLPs. Die Allele werden entweder DBH*444a (bei 207 bp) oder DBH*444g (bei 169 bp und 38 bp) genannt. Die Bahnen 1 bis 3 zeigen die möglichen Ergebnisse der Genotypisierung. Bahn 1 zeigt als Resultat ein Individuum mit einem Genotyp DBH*444a/a; Bahn 2: DBH*444a/g; Bahn 3: DBH*444g/g. In Bahn 4 ist eine 100 bp – DNA-Leiter als Größenstandard zu sehen.

3.1.2. Statistische Ergebnisse

3.1.2.1. Genotypisierung

3.1.2.1.1. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung

Die beiden Vergleichsgruppen bestanden aus 82 alkoholabhängigen Patienten mit DT während der Entgiftung und 97 alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung in der Vorgeschichte.

Es wurde betrachtet, wie häufig die Allele a und g in den beiden Gruppen zu finden waren.

Mittels Fisher's Exaktem Test (zweiseitig) wurde die Verteilung auf Signifikanz untersucht. Es konnten keine signifikanten Werte errechnet werden ($p=0,833$).

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse.

	MIT DT	LEICHTER ENTZUG	Σ
ALLEL g	78 (47,56%)	90 (46,39%)	168
ALLEL a	86 (52,44%)	104 (53,61%)	190
Σ	164 (100%)	194 (100%)	358

Tabelle 1. Häufigkeit der Allele a und g in beiden Untersuchungsgruppen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede (Fisher's Exakter Test (zweiseitig): $p=0,833$).

Die beiden Gruppen wurden auch hinsichtlich der Genotypenfrequenzen verglichen. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Pearson-Tests durchgeführt. Es gab keine signifikanten Unterschiede ($\chi^2=0,14$; $p=0,932$) (Tabelle 2). In beiden Gruppen wichen die Genotypfrequenzen nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab ($p>0,05$).

	MIT DT	LEICHTER ENTZUG	Σ
GENOTYP gg	17 (20,73%)	18 (18,56%)	35
GENOTYP ag	44 (53,66%)	54 (55,67%)	98
GENOTYP aa	21 (25,61%)	25 (25,77%)	46
Σ	82 (100%)	97 (100%)	179

Tabelle 2. Häufigkeit der Genotypen gg, ag und aa in beiden Untersuchungsgruppen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Genotypen in der jeweiligen Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede (Pearson-Test: $\chi^2=0,14$; $p=0,932$).

3.1.2.1.2. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit gesunden Kontrollpersonen

Die Vergleichsgruppen bestanden aus 208 alkoholabhängigen Patienten und 102 gesunden Kontrollpersonen.

Es wurde betrachtet, wie häufig die Allele a und g in den beiden Gruppen zu finden waren.

Mittels Fisher's Exaktem Test (zweiseitig) wurde die Verteilung auf Signifikanz untersucht. Verglichen mit der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen war die Frequenz des Allels a in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten signifikant höher ($p=0,008$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

	ALKOHOLIKER	KONTROLLPERSONEN	Σ
ALLEL g	193 (46,39%)	118 (57,84%)	311
ALLEL a	223 (53,61%)	86 (42,16%)	309
Σ	416 (100%)	204 (100%)	620

Tabelle 3. Häufigkeit der Allele a und g in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe. Es besteht ein signifikanter Unterschied (Fisher's Exakter Test (zweiseitig): $p=0,008$).

Die beiden Gruppen wurden auch bezüglich der Genotypenfrequenzen untersucht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Pearson-Tests durchgeführt. Es konnte ein signifikanter Wert ermittelt werden ($\chi^2=10,27$; $p=0,006$). Im Vergleich zu der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen hatten die Genotypen aa und ag in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten eine höhere Frequenz. Der Genotyp gg dafür eine niedrigere (Tabelle 4). In beiden Gruppen wichen die Genotypfrequenzen nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab ($p>0,05$).

	ALKOHOLIKER	KONTROLLPERSONEN	Σ
GENOTYP gg	39 (18,75%)	36 (35,29%)	75
GENOTYP ag	115 (55,29%)	46 (45,10%)	161
GENOTYP aa	54 (25,96%)	20 (19,61%)	74
Σ	208 (100%)	102 (100%)	310

Tabelle 4. Häufigkeit der Genotypen gg, ag und aa in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten und der gesunden Kontrollpersonen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Genotypen in der jeweiligen Gruppe. Es besteht ein signifikanter Unterschied (Pearson-Test: $\chi^2=10,27$; $p=0,006$).

3.1.2.2. DBH*444g/a-Polymorphismus und D β H-Plasmaaktivität

3.1.2.2.1. Der Einfluss des DBH*444g/a-Polymorphismus auf die D β H-Plasmaaktivität

Von 191 Probanden (138 alkoholabhängige Patienten und 53 gesunde Kontrollpersonen) konnte die D β H-Plasmaaktivität bestimmt werden.

Es wurde untersucht, ob eine Genotyp-Phenotyp Korrelation besteht. Mit Hilfe eines Rangsummentests (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test) konnte ein hochsignifikantes Ergebnis errechnet werden ($\chi^2=30,14$, $p<0,0001$) (Abbildung 2 und Tabelle 5.a./5.b.). Auch eine gesonderte Analyse der Genotyp-Phenotyp Korrelation innerhalb der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen durch einen Rangsummentest (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test) ergab ein signifikantes Ergebnis ($\chi^2=9,29$; $p=0,01$) (keine Abbildung).

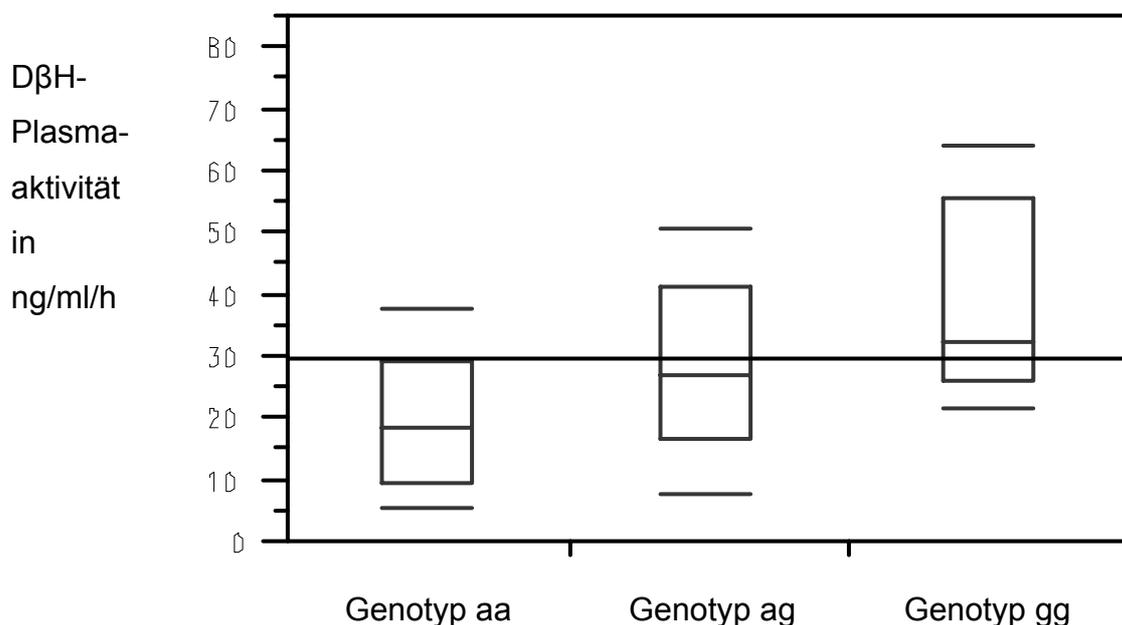


Abbildung 2. Die D β H-Aktivität im Plasma in Abhängigkeit des Genotyps. Das Boxdiagramm stellt die Quantilen (10%, 25%, 50%, 75% und 90%) dar. Die Genotyp-Gruppen unterscheiden sich hochsignifikant voneinander (Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test: $\chi^2= 30,14$; $p<0,0001$).

	MINIMUM	10%	25%	MEDIAN	75%	90%	MAXIMUM
GENOTYP aa	1,66	5,43	9,71	18,7	29,3	37,82	71,7
GENOTYP ag	2,64	7,99	16,65	27,3	41,35	50,66	84,7
GENOTYP gg	18,2	21,65	25,97	32,65	55,77	64,34	84,1

Tabelle 5.a. Lage und Streuung der Werte für die D β H-Plasmaaktivität (in ng/ml/h) in der jeweiligen Genotyp-Gruppe. Die einzelnen Genotyp-Gruppen unterscheiden sich bezüglich der D β H-Plasmaaktivität hochsignifikant voneinander (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=30,14$; $p<0,0001$ für das arithmetische Mittel).

	Beobachtungen	Arithmetisches Mittel	SD
GENOTYP aa	45	20,59	14,71
GENOTYP ag	106	29,49	16,43
GENOTYP gg	40	41,21	17,53

Tabelle 5.b. Arithmetisches Mittel und Standardabweichung (SD) der Werte für die D β H-Plasmaaktivität (in ng/ml/h) in der jeweiligen Genotyp-Gruppe. Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen den Genotyp-Gruppen (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=30,14$; $p<0,0001$ für das arithmetische Mittel).

3.1.2.2.2. Der Einfluss des DBH*444g/a-Polymorphismus auf die D β H-Plasmaaktivität in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten

Es wurde zusätzlich untersucht, ob speziell in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten der Genotyp des DBH*444g/a-Polymorphismus die signifikant erniedrigte D β H-Plasmaaktivität bedingt. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) konnte auch für diesen Fall ein signifikantes Ergebnis errechnet werden (F-Ratio=9,57, $p<0,0001$) (keine Abbildung).

3.1.2.3. D β H-Plasmaaktivität

3.1.2.3.1. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung

Von 57 alkoholabhängigen Patienten mit DT und 70 alkoholabhängigen Patienten mit leichten nur Entzugserscheinungen während der Entgiftung lagen die Werte der D β H-Plasmaaktivität vor.

Die beiden Gruppen wurden auf Unterschiede hinsichtlich der D β H-Plasmaaktivität geprüft. Hierzu wurde ein Rangsummentest (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test) verwendet. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($\chi^2=0,44$; $p=0,506$) (Abbildung 3 und Tabelle 6.a./6.b.). Auch nach Transformation der Werte mit Quadratwurzel ergab sich kein signifikantes Ergebnis (t-Test: $p=0,6$) (keine Abbildung).

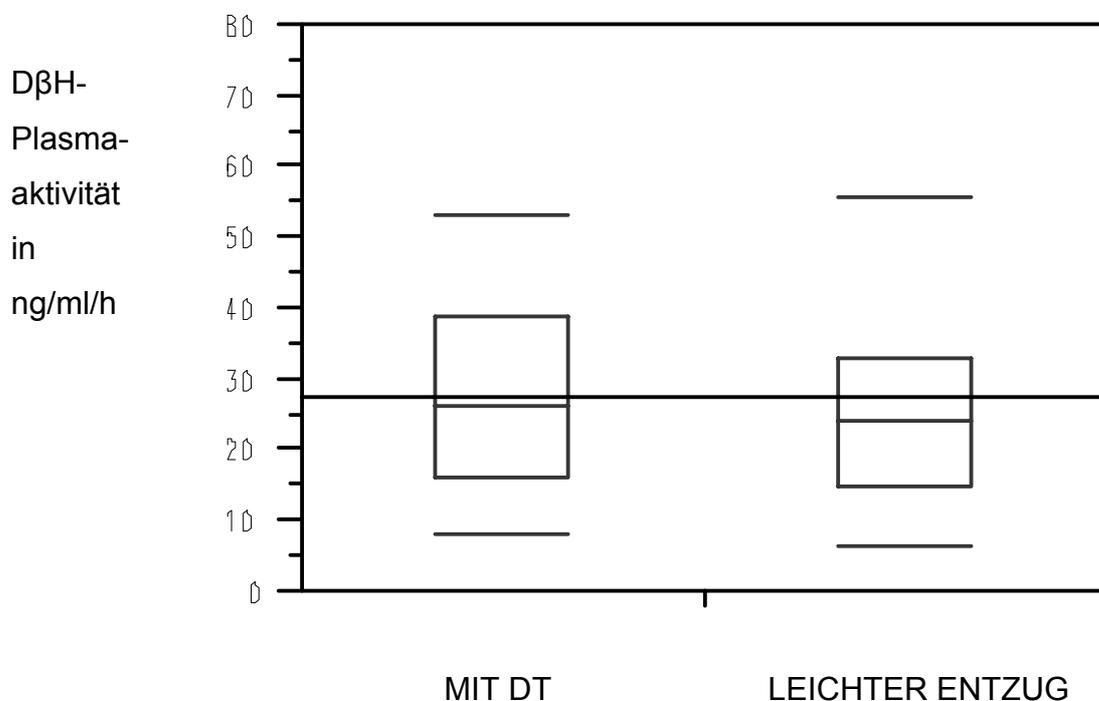


Abbildung 3. Die D β H-Plasmaaktivität in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten mit DT und der alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung. Das Boxdiagramm stellt die Quantilen (10%, 25%, 50%, 75% und 90%) dar. Keine signifikanten Unterschiede (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=0,44$; $p=0,506$).

	MINIMUM	10%	25%	MEDIAN	75%	90%	MAXIMUM
MIT DT	2,64	8,02	16,25	26,3	38,95	53,16	76,8
LEICHTER ENTZUG	3,32	6,54	15,07	24,15	33,20	55,73	73,4

Tabelle 6.a. Lage und Streuung der Werte für die D β H-Plasmaaktivität (in ng/ml/h) in der jeweiligen Gruppe. Zwischen den beiden Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=0,44$; $p=0,506$ für das arithmetische Mittel).

	Beobachtungen	Arithmetisches Mittel	SD
MIT DT	57	28,44	17,48
LEICHTER ENTZUG	70	26,69	16,60

Tabelle 6.b. Arithmetisches Mittel und Standardabweichung (SD) der Werte für die D β H-Plasmaaktivität (in ng/ml/h) in der jeweiligen Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=0,44$; $p=0,506$ für das arithmetische Mittel).

3.1.2.3.2. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit gesunden Kontrollpersonen

Von 138 alkoholabhängigen Patienten und 53 gesunden Kontrollpersonen lagen die Werte der D β H-Plasmaaktivität vor.

Die beiden Gruppen wurden auf Unterschiede hinsichtlich der D β H-Plasmaaktivität geprüft. Mit Hilfe eines Rangsummentests (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test) konnte ein signifikantes Ergebnis festgestellt werden ($\chi^2=7,76$; $p=0,005$) (Abbildung 4 und Tabelle 7.a./7.b.). Das signifikante Ergebnis blieb auch nach Transformation der Werte mit Quadratwurzel bestehen (t-Test: $p=0,009$) (keine Abbildung).

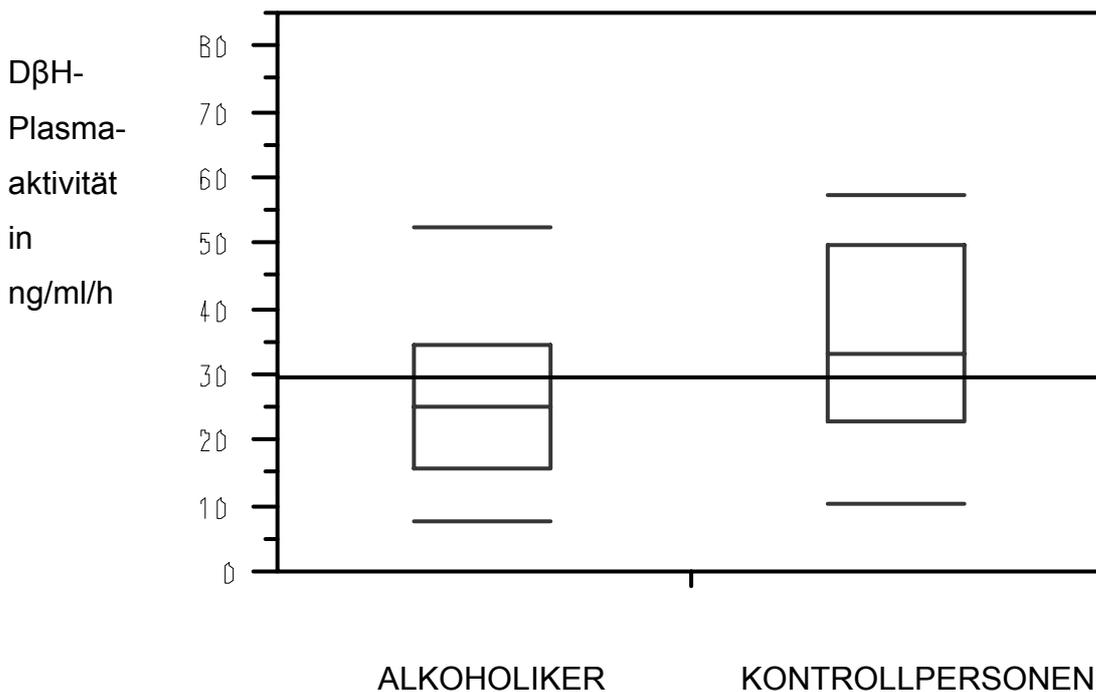


Abbildung 4. Die D β H-Plasmaaktivität in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Das Boxdiagramm stellt die Quantilen (10%, 25%, 50%, 75% und 90%) dar. Zwischen den Gruppen existiert ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=7,76$; $p=0,005$).

	MINIMUM	10%	25%	MEDIAN	75%	90%	MAXIMUM
ALKOHOLIKER	2,64	7,95	15,97	25,45	34,57	52,77	76,80
KONTROLL- PERSONEN	1,66	10,65	23,00	33,30	49,90	57,56	84,70

Tabelle 7.a. Lage und Streuung der Werte für die D β H-Plasmaaktivität (in ng/ml/h) in der jeweiligen Gruppe. Zwischen den beiden Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=7,76$; $p=0,005$ für das arithmetische Mittel).

	Beobachtungen	Arithmetisches Mittel	SD
ALKOHOLIKER	138	27,64	16,65
KONTROLLPERSONEN	53	35,60	18,85

Tabelle 7.b. Arithmetisches Mittel und Standardabweichung (SD) der Werte für die D β H-Plasmaaktivität (in ng/ml/h) in der jeweiligen Gruppe. Es existiert ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=7,76$; $p=0,005$ für das arithmetische Mittel).

3.2. Dopaminrezeptor 4-Gen (DRD4)

3.2.1. Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht (Abbildung 5). Die Allelklassifikation des VNTR-Polymorphismus erfolgt nach der Anzahl der 48 bp-DNA Elementwiederholungen in Exon 3 (DRD4 *2-*8 und *10).

Bei 310 Probanden konnte die Genotypisierung erfolgreich durchgeführt werden.

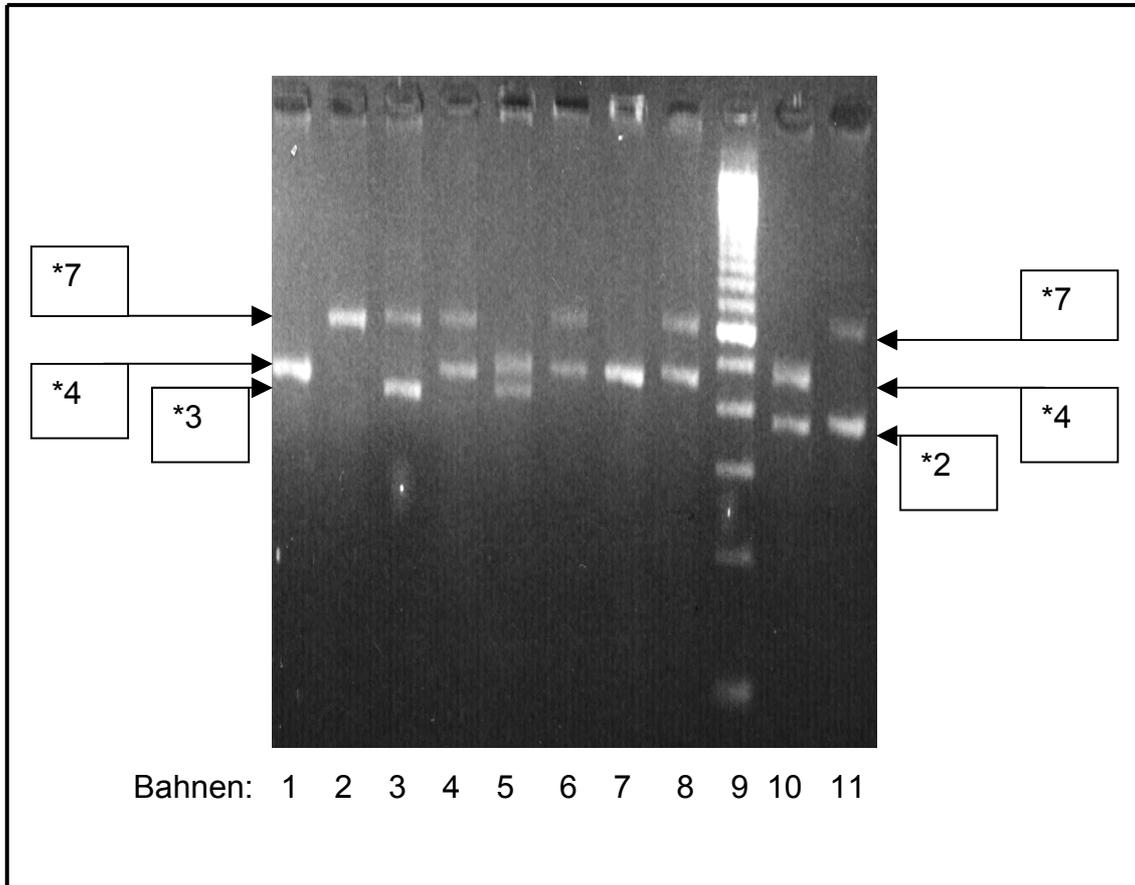


Abbildung 5. Agarosegelelektrophorese mit PCR-Produkten des DRD4-Gens. *2 ist bei ca. 370 bp, *3 bei ca. 420 bp usw. zu finden. Die Bahnen 1 bis 11 zeigen als Beispiel einige der möglichen Resultate. In Bahn 1 liegt ein Individuum mit einem Genotyp $DRD4$ *4/*4 vor. Bahn 2: $DRD4$ *7/*7; Bahn 3: $DRD4$ *3/*7; Bahn 4: $DRD4$ *4/*7; Bahn 5: $DRD4$ *3/*4; Bahn 6: $DRD4$ *4/*7; Bahn 7: $DRD4$ *4/*4; Bahn 8: $DRD4$ *4/*7; Bahn 10: $DRD4$ *2/*4; Bahn 11: $DRD4$ *2/*7. In Bahn 9 ist eine 100 bp DNA-Leiter als Größenstandard zu sehen.

3.2.2. Statistische Ergebnisse

3.2.2.1. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung

Die zu vergleichenden Gruppen bestanden aus 82 alkoholabhängigen Patienten mit DT während der Entgiftung und 97 alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung in der Vorgeschichte.

Es wurde untersucht, wie die Allele DRD4 *2-*8 und *10 in beiden Gruppen verteilt waren. Dies geschah mit Hilfe des Pearson-Tests. Es ergaben sich keine signifikanten Werte ($\chi^2=7,80$; $p=0,350$). Die Aussagekraft des Tests ist allerdings eingeschränkt, da es bei den Allelen *5, *6, *8, *10 in beiden Gruppen jeweils weniger als 5 Beobachtungen gab. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse. In beiden Gruppen wichen die Genotypfrequenzen nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab (T1-Test: $\chi^2=7,80$; T4-Test: $\chi^2=4,72$; $p>0,05$).

	MIT DT	OHNE DT	Σ
ALLEL *2	14 (8,54%)	7 (3,61%)	21
ALLEL *3	9 (5,49%)	12 (6,19%)	21
ALLEL *4	111 (67,68%)	133 (68,56%)	244
ALLEL *5	1 (0,61%)	0	1
ALLEL *6	0	2 (1,03%)	2
ALLEL *7	28 (17,07%)	38 (19,59%)	66
ALLEL *8	1 (0,61%)	1 (0,52%)	2
ALLEL *10	0	1 (0,52%)	1
Σ	164 (100%)	194 (100%)	358

Tabelle 8. Häufigkeit der Allele DRD4 *2-*8 und *10 in beiden Untersuchungsgruppen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe. Es konnte kein signifikantes Ergebnis festgestellt werden (Pearson-Test: $\chi^2=7,80$; $p=0,350$)

Für eine weitere Analyse wurden die Allele *2-*5 als „kurze“ Allele und *6-*10 als „lange“ Allele zusammengefasst, da diese sich in Bezug auf ihre Funktionalität unterscheiden sollen (Agshari et al., 1995). Dadurch war es möglich, einen Vierfeldertest (Fisher's Exakter Test (zweiseitig)) durchzuführen. Es konnte kein signifikantes Ergebnis festgestellt werden ($p=0,356$) (Tabelle 9).

	MIT DT	LEICHTER ENTZUG	Σ
KURZ	135 (82,32%)	152 (78,35%)	287
LANG	29 (17,68%)	42 (21,65%)	71
Σ	164 (100%)	194 (100%)	358

Tabelle 9. Häufigkeit der Allele „kurz“ (*2-*5) und „lang“ (*6-*10) in beiden Untersuchungsgruppen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (Fisher's Exakter Test (zweiseitig): $p=0,356$).

Bei einer weiteren Berechnung wurde betrachtet, ob es einen Unterschied bezüglich der Anwesenheit des Allels DRD4 *7 gibt. Dieses Allel zeigt in vorausgegangenen Untersuchungen im Vergleich zu den anderen Varianten ein abweichendes Rezeptorbindungsverhalten für Dopamin (Sanyal und Van Tol, 1997). Es wurde ein Fisher's Exakter Test (zweiseitig) angewendet. Die beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p=0,267$). In Tabelle 10 sind die Ergebnisse dargestellt.

	MIT DT	LEICHTER ENTZUG	Σ
*7 ANWESEND	23 (28,05%)	35 (36,08%)	58
*7 ABWESEND	59 (71,95%)	62 (63,92%)	121
Σ	82 (100%)	97 (100%)	179

Tabelle 10. Häufigkeit der Eigenschaft „Allel *7 anwesend“ in beiden Untersuchungsgruppen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Beobachtungen in der jeweiligen Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede (Fisher’s Exakter Test (zweiseitig): $p=0,267$).

3.2.2.2. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit gesunden Kontrollpersonen

Die Vergleichsgruppen setzten sich aus 208 alkoholabhängigen Patienten und 102 gesunden Kontrollpersonen zusammen. Bei der Analyse der Verteilung der Allele DRD4 *2-*8 und *10 in den beiden Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Pearson-Test: $\chi^2=8,59$; $p=0,284$) (Tabelle 11). Auch hier ist die Aussagekraft des Tests eingeschränkt, da es bei den Allelen *5, *6, *8, *10 in beiden Gruppen jeweils weniger als 5 Beobachtungen gab. In beiden Gruppen wichen die Genotypfrequenzen nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab (T1-Test: $\chi^2=8,58$; T4-Test: $\chi^2=6,85$; $p>0,05$).

	ALKOHOLIKER	KONTROLLPERSONEN	Σ
ALLEL *2	25 (6,01%)	22 (10,78%)	47
ALLEL *3	23 (5,53%)	8 (3,92%)	31
ALLEL *4	285 (68,51%)	132 (64,71%)	417
ALLEL *5	2 (0,48%)	3 (1,47%)	5
ALLEL *6	2 (0,48%)	0	2
ALLEL *7	76 (18,27%)	36 (17,65%)	112
ALLEL *8	2 (0,48%)	2 (0,98%)	4
ALLEL *10	1 (0,24%)	1 (0,49%)	2
Σ	416 (100%)	204 (100%)	620

Tabelle 11. Häufigkeit der Allele DRD4 *2-*8 und *10 in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Pearson-Test: $\chi^2=8,59$; $p=0,284$).

Es folgte eine Zusammenfassung der Allele *2-*5 als „kurze“ Allele und *6-*10 als „lange“ Allele.

Mit Hilfe des Fisher's Exakten Tests (zweiseitig) konnte kein signifikanter Wert ($p=1,000$) für die unterschiedliche Verteilung in Bezug auf die Gruppen errechnet werden (Tabelle 12).

	ALKOHOLIKER	KONTROLLPERSONEN	Σ
KURZ	335 (80,53%)	165 (80,88%)	500
LANG	81 (19,47%)	39 (19,12%)	120
Σ	416 (100%)	204 (100%)	620

Tabelle 12. Häufigkeit der Allele „kurz“ (*2-*5) und „lang“ (*6-*10) in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe. Kein signifikanter Unterschied (Fisher's Exakter Test (zweiseitig): $p=1,000$).

Es wurde ferner untersucht, ob eine unterschiedliche Verteilung in Bezug auf die Anwesenheit des Allels DRD4 *7 existiert. Anhand des Fisher's Exakten Tests (zweiseitig) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=1,000$) (Tabelle 13).

	ALKOHOLIKER	KONTROLLPERSONEN	Σ
*7 ANWESEND	67 (32,21%)	33 (32,35%)	100
*7 ABWESEND	141 (67,79%)	69 (67,65%)	210
Σ	208 (100%)	102 (100%)	310

Tabelle 13. Häufigkeit der Eigenschaft „Allel *7 anwesend“ in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Beobachtungen in der jeweiligen Gruppe. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Fisher's Exakter Test (zweiseitig): $p=1,000$).

3.3. Catecholamin-O-methyltransferase-Gen (COMT)

3.3.1. Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese wurden die Produkte des Verdau aufgetrennt und mit Hilfe von UV-Licht dargestellt (Abbildung 6). Bei 310 Probanden wurde die Genotypisierung erfolgreich durchgeführt.

Durch den Verdau eines 169 bp langen PCR-Produktes kann neben zwei gemeinsamen Fragmenten (26 bzw. 29 bp) entweder ein 114 bp (COMT*H) oder ein 96 bp (COMT*L) langes Fragment entstehen. Das Allel COMT*H kodiert für die thermostabile, hochaktive Form der COMT. Im Gegensatz dazu kodiert das COMT*L-Allel für die thermolabile, niedrigaktive Form der COMT.

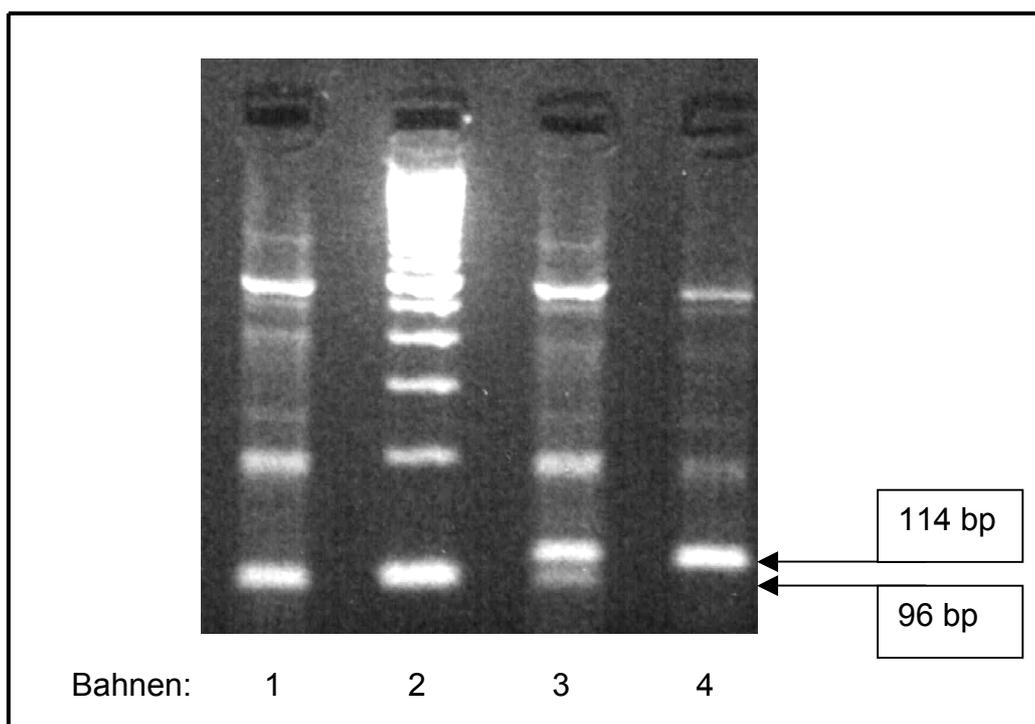


Abbildung 6. *Nla* III – Restriktionsendonuklease-Verdau des COMT*L/*H – RFLPs. Die Bahnen 1, 3 und 4 zeigen die möglichen Ergebnisse der Genotypisierung. Bei den nicht beschrifteten Banden dieser Bahnen handelt es sich um unspezifische PCR-Produkte. In Bahn 1 ist ein Individuum mit einem Genotyp COMT*L/L dargestellt. Bahn 3: COMT*L/H; Bahn 4: COMT*H/H. Bahn 2 beinhaltet eine 100 bp DNA-Leiter als Größenstandard.

3.3.2. Statistische Ergebnisse

3.3.2.1. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung

Die beiden Vergleichsgruppen setzten sich aus 82 alkoholabhängigen Patienten mit DT während der Entgiftung und 97 alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung zusammen.

Es wurde analysiert, ob ein Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf die Allelfrequenzen besteht. Hierzu wurde der Fisher's Exakte Test (zweiseitig) verwendet. Es konnten keine signifikanten Werte errechnet werden ($p=0,460$) (Tabelle 14).

	MIT DT	LEICHTER ENTZUG	Σ
ALLEL L	78 (47,56%)	100 (51,55%)	178
ALLEL H	86 (52,44%)	94 (48,45%)	180
Σ	164 (100%)	194 (100%)	358

Tabelle 14. Häufigkeit der Allele COMT*L und COMT*H in beiden Untersuchungsgruppen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe. Zwischen den beiden Gruppen existiert kein signifikanter Unterschied (Fisher's Exakter Test (zweiseitig): $p=0,460$).

Die Gruppen wurden auch auf Unterschiede bezüglich der Genotypenfrequenzen untersucht. Für die statistische Analyse wurde der Pearson-Test angewendet. Es bestand kein signifikanter Unterschied ($\chi^2=0,69$; $p=0,708$). In Tabelle 15 sind die Ergebnisse dargestellt. In beiden Gruppen wichen die Genotypfrequenzen nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab ($p>0,05$).

	MIT DT	LEICHTER ENTZUG	Σ
GENOTYP LL	18 (21,95%)	24 (24,74%)	42
GENOTYP LH	42 (51,22%)	52 (53,61%)	94
GENOTYP HH	22 (26,83%)	21 (21,65%)	43
Σ	82 (100%)	97 (100%)	179

Tabelle 15. Häufigkeit der Genotypen COMT*L/*L, COMT*L/*H und COMT*H/*H in beiden Untersuchungsgruppen. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der beobachteten Genotypen in der jeweiligen Gruppe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Pearson-Test: $\chi^2=0,69$; $p=0,708$).

3.3.2.2. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit gesunden Kontrollpersonen

Die zu vergleichenden Gruppen bestanden aus 208 alkoholabhängigen Patienten und 102 gesunden Kontrollpersonen.

Es wurde betrachtet, ob die Allele COMT*L und COMT*H unterschiedlich häufig in beiden Gruppen vorkommen. Mit Hilfe des Fisher's Exakten Tests (zweiseitig) konnte kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden ($p=0,669$) (Tabelle 16).

	ALKOHOLIKER	KONTROLLPERSONEN	Σ
ALLEL L	214 (51,44%)	109 (53,43%)	323
ALLEL H	202 (48,56%)	95 (46,57%)	297
Σ	416 (100%)	204 (100%)	620

Tabelle 16. Häufigkeit der Allele COMT*L und COMT*H in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe. Kein signifikanter Unterschied (Fisher's Exakter Test (zweiseitig): $p=0,669$).

Die Gruppen wurden auch hinsichtlich der Genotypenfrequenzen verglichen. Die statistische Analyse mittels Pearson-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($\chi^2=2,75$; $p=0,253$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt. Innerhalb beider Gruppen wichen die Genotypfrequenzen nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab ($p>0,05$).

	ALKOHOLIKER	KONTROLLPERSONEN	Σ
GENOTYP LL	53 (25,48%)	33 (32,35%)	86
GENOTYP LH	108 (51,92%)	43 (42,16%)	151
GENOTYP HH	47 (22,60%)	26 (25,49%)	73
Σ	208 (100%)	102 (100%)	310

Tabelle 17. Häufigkeit der Genotypen COMT*L/*L, COMT*L/*H und COMT*H/*H in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der beobachteten Genotypen in der jeweiligen Gruppe. Zwischen den beiden Gruppen existieren keine signifikanten Unterschiede (Pearson-Test: $\chi^2=2,75$; $p=0,253$).

3.4. Trinkmenge und Dauer der Alkoholabhängigkeit

3.4.1. Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT mit alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung

Die beiden Vergleichsgruppen setzten sich aus 82 alkoholabhängigen Patienten mit DT in der Vorgeschichte und 97 alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Entgiftung zusammen.

3.4.1.1. Trinkmenge

Es wurde untersucht, ob ein Unterschied zwischen beiden Gruppen in Bezug auf die zuletzt (vor stationärer Aufnahme zur Entgiftung) konsumierte Alkoholmenge pro Tag besteht. Die statistische Analyse mittels Rangsummentest (Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test) ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($\chi^2=4,28$; $p=0,039$) (Abbildung 7 und Tabelle 18).

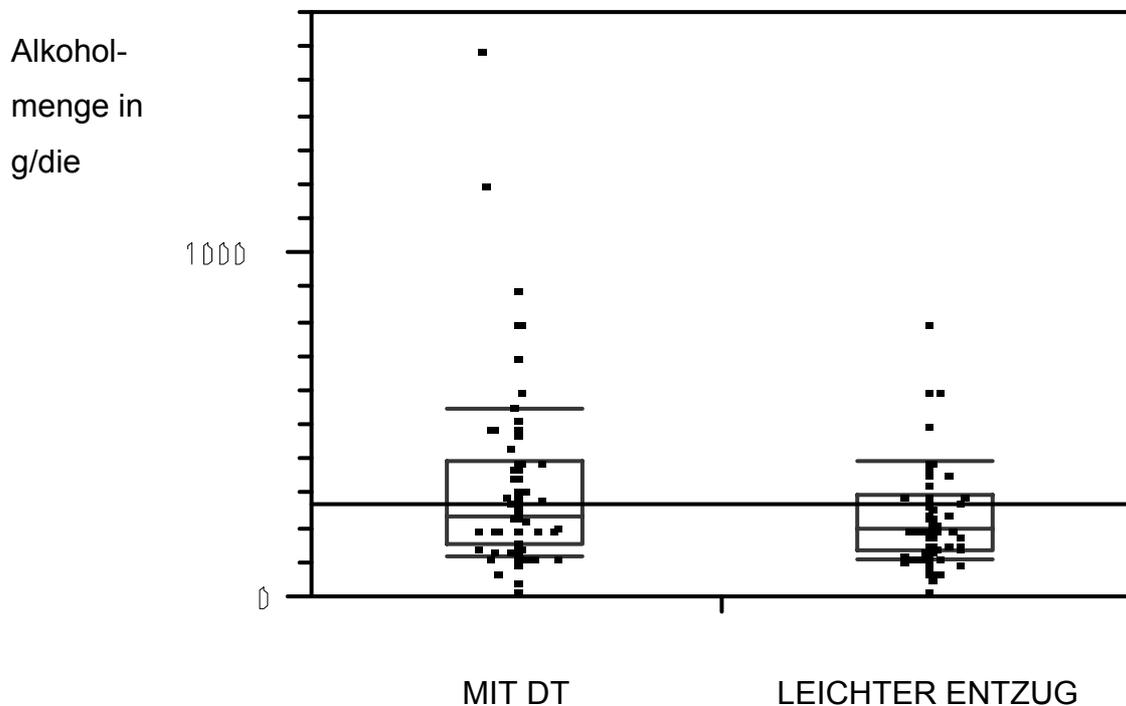


Abbildung 7. Die zuletzt konsumierte Alkoholmenge in g/die in beiden Gruppen. Das Boxdiagramm stellt die Quantilen (10%, 25%, 50%, 75% und 90%) dar. Die Punkte stellen die jeweilige Trinkmenge der einzelnen Probanden dar. Zwischen den Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=4,28$; $p=0,039$).

	Beobachtungen	Arithmetisches Mittel	SD
MIT DT	82	311,7	247,7
LEICHTER ENTZUG	97	239,0	149,0

Tabelle 18. Arithmetisches Mittel und Standardabweichung (SD) der Werte (Alkoholmenge in g/die) in der jeweiligen Gruppe. Es existiert ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=4,28$; $p=0,039$).

3.4.1.2. Dauer der Alkoholabhängigkeit

Die beiden Gruppen wurden auf Unterschiede hinsichtlich der Dauer der Alkoholabhängigkeit geprüft. Mit „Dauer der Alkoholabhängigkeit“ wird die Anzahl der Jahre bis zum ersten Delir, bzw. in der anderen Gruppe, die Anzahl der Jahre bestehender Abhängigkeit bis zur Blutentnahme bezeichnet.

Mit Hilfe eines Rangsummentests (Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($\chi^2=2,43$; $p=0,119$) (Abbildung 8 und Tabelle 19).

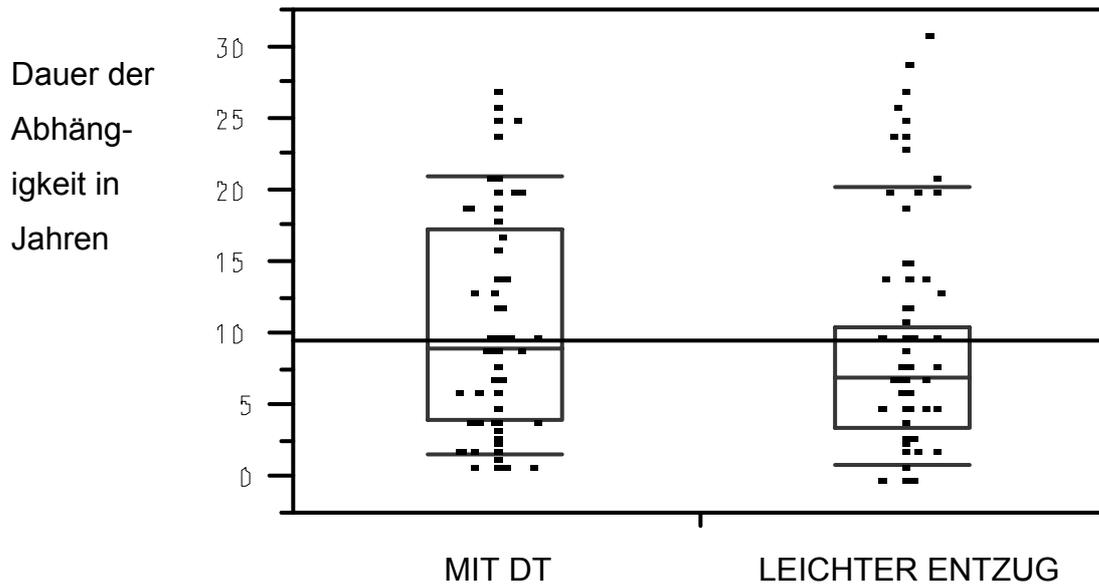


Abbildung 8. Dauer der Alkoholabhängigkeit in beiden Gruppen. Das Boxdiagramm stellt die Quantilen (10%, 25%, 50%, 75% und 90%) dar. Die Punkte stellen die Dauer der Alkoholabhängigkeit der einzelnen Probanden dar. Kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=2,43$; $p=0,119$).

	Beobachtungen	Arithmetisches Mittel	SD
MIT DT	82	10,56	7,59
LEICHTER ENTZUG	97	8,70	7,14

Tabelle 19. Arithmetisches Mittel und Standardabweichung (SD) der Werte (in Jahren) in der jeweiligen Gruppe. Kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test: $\chi^2=2,43$; $p=0,119$).

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die wichtigsten Befunde dieser Studie seien zu Beginn der Diskussion kurz zusammengefasst:

Der DBH*444g/a-Polymorphismus des DBH-Gens konnte mit signifikantem Ergebnis mit der D β H-Plasmaaktivität assoziiert werden. Auch in einer gesonderten Analyse der alkoholabhängigen Patienten konnte eine erniedrigte D β H-Plasmaaktivität als wahrscheinlich genotypabhängig dargestellt werden.

Signifikante Unterschiede existieren zwischen alkoholabhängigen Patienten und gesunden Kontrollpersonen sowohl bezüglich der Allelverteilung des DBH*444g/a-Polymorphismus, als auch der D β H-Plasmaaktivität. Die Gruppe der alkoholabhängigen Patienten mit DT und die der alkoholabhängigen Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen während der Alkoholentgiftung unterscheidet sich nicht signifikant im Hinblick auf den DBH*444g/a-Polymorphismus und die D β H-Plasmaaktivität.

Weder der COMT-Val/Met- noch der DRD4-VNTR-Polymorphismus konnten mit der Diagnose „Alkoholabhängigkeit“ bzw. mit schweren Entzugserscheinungen in Form des DTs assoziiert werden.

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des DTs während der Entgiftung und der vor dem stationären Aufenthalt täglich konsumierten Alkoholmenge konnte festgestellt werden, jedoch nicht für die Dauer der Alkoholabhängigkeit.

4.2. Kritik an der Methode: Assoziation versus Kopplung

Genetische Faktoren spielen in der Ätiologie der Alkoholabhängigkeit eine wichtige Rolle. Aber welche Methoden eignen sich am besten, um diese zu erforschen?

Wenn innerhalb einzelner Familien ein einziges Gen einen hohen ätiologischen Anteil an der Krankheit hat, erkennbar an der familiären Segregation der

Krankheit, so sollte es möglich sein, das Gen mit Kopplungsanalysen im menschlichen Genom zu lokalisieren, das Genprodukt zu identifizieren und so einen Einblick in das Krankheitsgeschehen zu erhalten. Ist der Beitrag einzelner Gene eher gering, oder spielen bei verschiedenen Erkrankten unterschiedliche Gene eine Rolle bzw. führt das Zusammenspiel verschiedener Gene zur Erkrankung (polygene Krankheitsentstehung), wie für die Alkoholabhängigkeit angenommen, dann haben Kopplungsuntersuchungen eine sehr viel geringere Aussagekraft, die Wirksamkeit eines Gens aufzudecken. In der Vergangenheit durchgeführte Kopplungsstudien mit der klassischen lod-score Methode (zur Übersicht: Ott, 1992) zeigten die Anfälligkeit dieser Methode für das Problem, den exakten Erkrankungsstatus einzelner Individuen innerhalb der Stammbäume zu erkennen.

Eine Alternative zur Kopplungsanalyse stellt die Assoziationsanalyse dar. Voraussetzung für die Validität der Ergebnisse ist dabei eine Homogenität der untersuchten Stichprobe in Bezug auf die ethnische Herkunft, das Geschlecht und das Alter. In der vorliegenden Studie stammen alle Probanden aus dem Großraum Stuttgart. Ein Kriterium für die Aussagekraft einer Assoziationsstudie ist die Größe der Stichprobe. Mit 208 alkoholabhängigen Patienten und 102 gesunden Kontrollpersonen ist es in dieser Studie gelungen, eine große Stichprobe zusammenzustellen. Für eine zuverlässigere Einschätzung der Bedeutung von seltenen Genvarianten, wie sie vor allem bei dem DRD4-VNTR-Polymorphismus vorkommen, wäre eine noch größere Stichprobe allerdings von Vorteil. Bei der Wahl der Kandidatengene sollte stets bedacht werden, inwiefern diese zur Pathogenese der Alkoholabhängigkeit oder des DTs beitragen können. So werden viele Gene als Kandidatengene bezeichnet, deren Funktion nicht klar und tatsächliche Aktivität nicht nachprüfbar oder messbar ist und deren Bedeutung somit fraglich bleibt. Konsequenterweise konzentriert sich diese Studie vor allem auf die Untersuchung sogenannter funktioneller Polymorphismen. Hier gehen die unterschiedlichen Ausprägungen der Polymorphismen mit messbaren Funktions- bzw. Aktivitätsveränderungen einher.

Eine mögliche Ursache falsch positiver Resultate ergibt sich aus der extrem hohen Anzahl potentieller Kandidatengene. Die folgende Überlegung soll dies verdeutlichen: Angenommen es existierten bei insgesamt 20.000 Kandidatengenen 5 Suszeptibilitätsgene für die Alkoholabhängigkeit und man nähme einen p-Wert von 0,05 an, so würden bei der hypothetischen Analyse sämtlicher 20.000 Kandidatengene 995 falsch positive Resultate produziert werden. Dies entspräche einer Rate falsch positiver Ergebnisse von 99,5%, was natürlich unakzeptabel wäre (Crowe, 1993). Deshalb wird von manchen Autoren ein niedrigerer p-Wert von $4,9 \times 10^{-5}$ für polygenetische Erkrankungen gefordert (Paterson et al., 1999). Zumindest sollte, um die Aussagekraft einer Studie zu stärken, ein positives Resultat einer Assoziationsanalyse repliziert werden.

Andererseits schließt ein negatives Ergebnis einer Kandidatengenanalyse die Beteiligung des Gens an der Ätiologie der Erkrankung nicht aus. Da die Proteinbiosynthese aus zahlreichen Einzelschritten besteht, ist es denkbar, dass trotz gleicher DNA-Sequenz zum Beispiel auf der Ebene der Expression oder des Splicings eines Gens Unterschiede zwischen Individuen bestehen, die dann disponierende Faktoren für die Erkrankung darstellen.

Eine weitere Erklärung für mögliche falsch negative Ergebnisse ist in der Heterogenität des Krankheitsbildes „Alkoholismus“ zu suchen. Angenommen nur bestimmte Subtypen der Alkoholabhängigkeit sind mit einem Kandidatengen assoziiert, bleibt diese Assoziation unentdeckt, solange unterschiedliche Subtypen der Alkoholabhängigkeit für eine Untersuchung zusammengefasst werden. Auf Grund dessen ist es notwendig, in Studien zu versuchen, Subtypen der Alkoholabhängigkeit zu erfassen, um der oben erwähnten Möglichkeit Rechnung zu tragen.

4.3. Diskussion der analysierten Gene im einzelnen

4.3.1. Dopamin-beta-hydroxylase

Aufgrund Ihrer Expression in zentralen und peripheren noradrenalin- und adrenalinsynthetisierenden Zellen (Cooper et al., 1986) und der beschriebenen Dysregulation des katecholaminergen Systems in verschiedenen Stadien der Alkoholabhängigkeit (Ollat et al., 1988) und des Alkoholentzugs (Hawley et al., 1985; Krystal et al., 1996) kann die DBH als Kandidatengen für Alkoholabhängigkeit und schwere Entzugserscheinungen in Form eines DTs betrachtet werden.

*4.3.1.1. Der DBH*444g/a-Polymorphismus*

Bei dem untersuchten Polymorphismus des DBH-Gens handelt es sich möglicherweise um einen funktionellen Polymorphismus. Dabei geht der Genotyp DBH*444a/a mit den niedrigsten mittleren D β H-Aktivitäten im Plasma bzw. Liquor cerebrospinalis, DBH*444g/a und DBH*444g/g dann mit jeweils höheren, einher (Cubells et al., 1998).

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Zusammenhang zwischen dem DBH*444g/a-Polymorphismus und der Alkoholabhängigkeit bzw. dem DT untersucht. Verglichen mit gesunden Kontrollpersonen war die Frequenz des Allels a in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten signifikant höher. Eine positive Assoziation mit dem DT konnte nicht festgestellt werden. Da kein Trend erkennbar war, ist das Fehlen der Assoziation eher nicht auf eine unzureichende Stichprobengröße zurückzuführen.

Im Gegensatz zu dem positiven Befund des DBH*444g/a-Polymorphismus konnte an der selben Stichprobe weder die Alkoholabhängigkeit noch das DT mit einem anderen Polymorphismus des DBH-Gens, dem DBH-1021C \rightarrow T-Polymorphismus, assoziiert werden (Köhnke et al., 2002).

Ob das positive Ergebnis für den DBH*444g/a-Polymorphismus speziell bei der Alkoholabhängigkeit oder auch bei anderen Suchterkrankungen bzw. generell

bei psychiatrischen Krankheitsbildern zu finden ist, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Ein Hinweis darauf gibt eine Studie, bei der der DBH*444g/a-Polymorphismus in Kombination mit dem DBH*5'-ins/del-Polymorphismus als Haplotypanalyse mit der kokaininduzierten Paranoia assoziiert werden konnte (Cubells et al., 2000).

*4.3.1.2. Der Einfluss des DBH*444g/a-Polymorphismus auf die DβH-Plasmaaktivität*

Im Rahmen dieser Studie konnte sowohl bei den gesunden Kontrollpersonen als auch bei den alkoholabhängigen Patienten ein Zusammenhang des DBH*444g/a-Polymorphismus mit der DβH-Plasmaaktivität dargestellt werden. Dieser Befund entspricht damit den Ergebnissen von Cubells et al., die ebenfalls die Genotypen des DBH*444g/a-Polymorphismus mit der DβH-Aktivität im Serum und im Liquor cerebrospinalis positiv assoziieren konnten (Cubells et al., 1998).

Dass die DβH-Aktivität vor allem durch genetische Faktoren determiniert wird, ist bereits seit längerer Zeit durch Geschwister- (Weinshilboum et al., 1973) und Familienanalysen (Weinshilboum et al., 1975) bekannt. Moderne molekulargenetische Methoden erlauben es, Polymorphismen des DBH-Gens zu identifizieren und deren möglichen Einfluss auf die DβH-Plasmaaktivität zu klären. Eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnte bisher außer für den DBH*444g/a-Polymorphismus auch für den DBH*5'-ins/del- (Cubells et al., 2000), den (GT)_n-Dinukleotid-Repeat- (Wei et al., 1997) und den DBH-1021C→T-Polymorphismus (Köhnke et al., 2002; Zabetian et al., 2001) an Probanden europäischer oder amerikanischer Abstammung gezeigt werden.

Bei dem in dieser Studie untersuchten DBH*444g/a-Polymorphismus des DBH-Gens handelt es sich um einen stummen Polymorphismus. Das bedeutet, die primäre DβH-Proteinstruktur bleibt vom Genotyp unbeeinflusst. Daher scheint ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem untersuchten DBH*444g/a-Polymorphismus und der beobachteten Veränderung der DβH-Plasmaaktivität eher unwahrscheinlich.

Indem man die Daten der SNP-Datenbanken von GenBank analysiert, finden sich im DBH-Gen in Nachbarschaft zu dem DBH*444g/a-Polymorphismus auch nicht-synonyme SNPs, welche eine Allelfrequenz größer als zehn Prozent aufweisen und zu einer Veränderung des D β H-Proteins führen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). So ist es möglich, dass ein solcher nicht-synonymer SNP für die beobachtete Veränderung der D β H-Plasmaaktivität verantwortlich ist, und der Zusammenhang zu dem DBH*444g/a-Polymorphismus über ein sogenanntes linkage disequilibrium, also die physikalische Nähe auf dem Chromosom zustande kommt. Allerdings konnte für zwei der in Frage kommenden nicht-synonymen SNPs (DBH*197a/t und DBH*304a/s) beim Menschen bislang keine Korrelation mit der D β H-Plasmaaktivität hergestellt werden (Cubells und Zabetian, 2004), wohl aber für den DBH*535r/c-Polymorphismus (Zabetian et al., 2001).

Dass ein synonymer SNP die mRNA-Stabilität beeinflussen kann und sich dadurch funktionelle Konsequenzen ergeben, konnte für den *957c/t-Polymorphismus des Dopamin-2-Rezeptor (DRD2) gezeigt werden (Duan et al., 2003). Ob ein solcher Mechanismus möglicherweise auch für den DBH*444g/a-Polymorphismus und die D β H-Plasmaaktivität in Frage kommt, lässt sich nur in weiteren Studien klären, die die Untersuchung der mRNA-Stabilität berücksichtigen. Ebenso ist es notwendig, die tatsächliche Bedeutung der oben erwähnten nicht-synonymen SNPs für die D β H-Plasmaaktivität weiter zu klären.

Im Gegensatz zur Genetik wird die Bedeutung von Umweltfaktoren für die Ausprägung der D β H-Aktivität als eher gering eingeschätzt. So haben weder das Rauchen (Nagaya et al., 1992) noch psychotrope Medikation (Cubells et al., 1998) einen wesentlichen Einfluss auf die Höhe der D β H-Aktivität. Auch eine massive Manipulation des sympathischen Systems, hervorgerufen zum Beispiel durch Belastungstraining (Peronnet et al., 1985) geht mit keiner signifikanten Änderung der D β H-Aktivität einher. Trotzdem erfolgte, um mögliche Störfaktoren zu kontrollieren, in dieser Studie die Blutentnahme zwischen 7.00 und 8.00 Uhr morgens am nüchternen Probanden. Keiner der Probanden nahm psychotrope Medikamente ein. Die Erforschung der

Polymorphismen des DBH-Gens und deren mögliche Funktionalität erlaubt es, potentielle Veränderungen der D β H-Aktivität, die durch Krankheit, Medikation oder den Einfluss anderer genetischer Faktoren bedingt sind, zu erkennen und klarer zu interpretieren.

4.3.1.3. Die D β H-Plasmaaktivität

Trotz ausgeprägter Spannbreite der Werte konnte eine insgesamt signifikant verminderte D β H-Plasmaaktivität bei alkoholabhängigen Patienten 22 Tage nach abgeschlossener Entgiftung beobachtet werden.

Keine Unterschiede hinsichtlich der D β H-Plasmaaktivität ergaben sich beim Vergleich der alkoholabhängigen Patienten mit DT und der alkoholabhängigen Patienten ohne DT während der Entgiftung.

Bisher veröffentlichte Studien, die sich dem Zusammenhang zwischen der D β H-Plasmaaktivität und Alkohol widmeten, brachten keine eindeutigen Resultate hervor.

Bei 60 gesunden College-Studentinnen konnte ein positiver Zusammenhang zwischen einer gesteigerten D β H-Plasmaaktivität und erhöhtem Alkoholkonsum gefunden werden (La Grange et al., 1995).

Ein nichtsignifikanter Trend zu niedrigeren D β H-Plasmaaktivitäten zeigte sich bei 22 alkoholabhängigen Patienten mit einer familiären Belastung für Alkoholismus im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Schuckit et al., 1981).

In einer anderen Studie konnte kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die D β H-Plasmaaktivität zwischen 27 nichtabstinenten alkoholabhängigen Männern und 24 gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden (Lykouras et al., 1987).

Da für bis zu 80% der Varianz der D β H-Plasmaaktivität die Erblichkeit verantwortlich sein soll (Cubells et al., 1998), ist es nicht überraschend, dass die vorangegangenen Studien zur D β H-Plasmaaktivität widersprüchlich bleiben, weil keine den DBH-Genotyp mitberücksichtigt. Ferner ist die Stichprobengröße der genannten Studien eher gering. Mit insgesamt 191

Bestimmungen der D β H-Plasamaaktivität ist das Resultat der vorliegenden Studie statistisch aussagekräftiger.

Das Ergebnis dieser Studie steht damit im Einklang mit anderen Befunden, die auf einen reduzierten Noradrenalin- und Dopaminmetabolismus bei alkoholabhängigen Patienten nach der Entgiftung hinweisen (Fulton et al., 1995; Heinz et al., 1999; Geraciotti et al., 1994).

Eine mögliche Erklärung der positiven Assoziation der D β H-Plasmaaktivität mit der Alkoholabhängigkeit bietet die Surfeit-Hypothese der Sucht, bei der von einer vermehrten Ansprechbarkeit des „Reward-Systems“ ausgegangen wird. In diesem Sinne könnte eine genetisch determinierte Verminderung der D β H-Aktivität zu einer verringerten Metabolisierung des Dopamins nach dessen Ausschüttung, und somit im Vergleich zu Menschen mit einer höheren D β H-Aktivität und Dopaminmetabolisierung zu einem übermäßig gesteigerten Wohlbefinden zum Beispiel nach Alkoholaufnahme führen.

Trotz der vorherrschenden Determination der D β H-Plasmaaktivität durch genetische Faktoren ist nicht auszuschließen, dass die beobachtete Verringerung der D β H-Plasmaaktivität bei alkoholabhängigen Patienten auf einen neurotoxischen Effekt der langjährigen Alkoholaufnahme und einer damit verbundenen Abnahme der Neuronenzahl und der möglichen Syntheseleistung zurückzuführen ist. So konnte in neuropathologischen Untersuchungen eine Reduktion der Anzahl und Dichte von pigmentierten, noradrenalinsynthetisierenden Neuronen im Locus coeruleus demonstriert werden (Arango et al., 1994). Aus der vorliegenden Studie ergeben sich Hinweise, dass die D β H-Plasmaaktivität auch bei den alkoholabhängigen Patienten möglicherweise vom Genotyp des DBH*444g/a-Polymorphismus beeinflusst wird. Die bei den alkoholabhängigen Patienten beobachtete Verringerung der D β H-Plasmaaktivität scheint damit weniger wahrscheinlich durch die Neurotoxizität des Alkohols bedingt zu sein.

Interessante Befunde stammen auch aus In-vitro-Untersuchungen, die Veränderungen der Genexpression an humanen Neuroblastomzellen unter Alkoholgabe analysieren (Thibault et al., 2000). Die DBH zeigte dabei mit einer dosisabhängigen, maximal fünf- bis sechsfachen Steigerung die größte relative

Expressionsveränderung der rund 6.000 analysierten Gene. Ein Anstieg der DBH mRNA-Konzentrationen konnte auch in vivo an „alkoholbehandelten“ Mäusen gezeigt werden. Diese Resultate stehen im Einklang mit der in der Einleitung beschriebenen dopaminergen Hypofunktion unter chronischem Alkoholkonsum (Fadda et al., 1980; Rothblat et al., 2001).

Eine Verbindung zu der vorliegenden Studie und somit eine weitere Erklärung der positiven Assoziation der D β H-Plasmaaktivität und der Alkoholabhängigkeit ist insoweit denkbar, als dass es möglicherweise bei den alkoholabhängigen Patienten nach der Entgiftung innerhalb von 22 Tagen bis zur Blutentnahme zu einer Regulation der DBH-Expression von einer Überexpression während des chronischen Alkoholkonsums zu einer verringerten Expression kommt. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten Untersuchungen zum Verlauf der D β H-Aktivität bei alkoholabhängigen Patienten in verschiedenen Zuständen (zum Beispiel 15 Tage tägliche Blutentnahme ab dem ersten Tag der Entgiftung und ein Jahr nach abgeschlossener Entgiftung) durchgeführt werden. Leider fehlen bei den In-vitro-Untersuchungen Angaben darüber, inwieweit sich die DBH-Genexpression unter Alkoholentzug verändert (Thibault et al., 2000).

Eine mögliche Assoziation der D β H-Plasmaaktivität und des Schweregrades des Alkoholentzugs wurde in dieser Studie zum ersten mal untersucht.

Obwohl einige signifikante Assoziationen zwischen dem DT und den Plasma- bzw. Liquorkonzentrationen von Dopamin oder dessen Metaboliten Homovanillinmandelsäure (HVA) festgestellt werden konnten (Sano et al., 1992; Heinz et al., 1996; Fujimoto et al., 1983), ergab sich kein Zusammenhang zur D β H-Plasmaaktivität. Die Effekte des akuten Alkoholentzugs auf die D β H-Plasmaaktivität könnten nur dann für die beobachteten Unterschiede zwischen den alkoholabhängigen Patienten und den gesunden Kontrollpersonen verantwortlich sein, wenn die Wirkung des Alkoholentzugs auf die D β H-Plasmaaktivität lang anhielte, da die Blutentnahme 22 Tage nach Absetzen des Alkohols erfolgte.

Zusammenfassend lassen die Daten eine alkoholabhängigkeits-assozierte Verminderung der D β H-Plasmaaktivität, die möglicherweise durch den Genotyp des DBH*444g/a-Polymorphismus beeinflusst wird, vermuten, obwohl es keinen

Hinweis aus Kopplungsanalysen für die Bedeutung des Chromosoms 9 gibt, auf dem das DBH-Gen lokalisiert ist.

4.3.2. Dopaminrezeptor 4 (DRD4)

Bei dem untersuchten Polymorphismus des DRD4-Gens handelt es sich um einen sogenannten VNTR-Polymorphismus. Eine 48 bp lange Tandem-Repeat Einheit kann dabei zwischen ein- und zehnmal vorkommen (Lichter et al., 1993). Der VNTR-Polymorphismus kodiert für Aminosäuren, die sich in der dritten cytoplasmatischen Schleife des Rezeptors befinden. Dies scheint eine Region zu sein, die für die Kopplung mit dem G-Protein wichtig ist. Auf Grund dessen wurde ein Einfluss des DRD4-VNTR-Polymorphismus auf die Second-Messenger-Kopplung bzw. Signaltransduktion und damit auch eine mögliche Funktionalität angenommen (Van Tol et al., 1992).

Es wird vermutet, dass Menschen, die Substanzmissbrauch betreiben, in psychologischen Tests höhere Werte für das Persönlichkeitsmerkmal Novelty-Seeking aufweisen, als Kontrollpersonen (Bardo et al., 1996).

Da ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Novelty-Seeking-Wertes und dem DRD4-VNTR-Polymorphismus postuliert wurde (Ebstein et al., 1996; Benjamin et al., 1996), ist und war der DRD4-VNTR-Polymorphismus Gegenstand zahlreicher Kandidatengenuntersuchungen bezüglich der Alkoholabhängigkeit.

In dieser Studie zeigt sich keine signifikante Assoziation zwischen dem DRD4-VNTR-Polymorphismus und der Diagnose „Alkoholabhängigkeit“.

Dieses Resultat stimmt somit mit einem Großteil der vorangegangenen Assoziationsstudien für die Alkoholabhängigkeit überein.

So ergaben Studien an japanischen (Muramatsu et al., 1996), finnischen (Adamson et al., 1995), US-amerikanischen (Parsian et al., 1997), skandinavischen (Geijer et al., 1997), taiwanesischen (Chang et al., 1997), brasilianischen (Bau et al., 1999) und deutschen (Sander et al., 1997b) alkoholabhängigen Patienten keine positive Assoziation mit dem DRD4-VNTR-Polymorphismus.

Weder eine Haplotyp-Untersuchung von sechs DRD4-Polymorphismen (einschließlich des VNTR) (Chang et al., 1997), noch der Subtypisierungsversuch der alkoholabhängigen Patienten (Muramatsu et al., 1996), erbrachte ein positives Ergebnis bezüglich der Assoziation.

Bislang liegt nur eine Studie vor, bei der dargestellt werden konnte, dass alkoholabhängige Patienten aus Kanada höhere Frequenzen des Drei- und Sechs-Repeat-Allels haben (George et al., 1993). Allerdings wurden die Daten nicht mit den Allelfrequenzen einer Kontrollgruppe verglichen. Als Referenz dienten lediglich publizierte Allelfrequenzen aus einer kaukasischen (Petronis et al., 1992) und japanischen (Nanko et al., 1993) Stichprobe. Angesichts der ausgeprägten, weltweiten Variabilität der DRD4-VNTR-Allelfrequenzen (Paterson et al., 1999) ist es als erhebliche methodische Schwäche auszulegen, Allelfrequenzen aus verschiedenen Bevölkerungsgruppen zu poolen und zu vergleichen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer ethnisch homogenen Stichprobe.

Keine andere Studie beschäftigte sich bisher mit der Untergruppe der alkoholabhängigen Patienten, die während der Entgiftung schwere Entzugserscheinungen in Form eines DTs hatten. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem DRD4-VNTR-Polymorphismus und dem Auftreten des DTs.

Bei der Analyse des DRD4-VNTR-Polymorphismus ist zu bedenken, dass neben der variablen Anzahl der Tandem-Repeats auch innerhalb eines Tandem-Repeats zahlreiche Sequenzunterschiede bestehen können (Lichter et al., 1993). Eine Analyse allein der Allellängen unterschlägt die Existenz von Allelen, die zwar dieselbe Länge, aber trotzdem, aufgrund der DNA-Sequenzvariation, eine andere Aminosäuresequenz aufweisen. Ein negatives Resultat der Allellängenanalyse, wie in dieser Studie beobachtet, schließt somit eine Assoziation des DRD4-VNTR-Polymorphismus mit der Alkoholabhängigkeit bzw. dem DT nicht aus. Geht man weiterhin von einem hohen Stellenwert des DRD4 in der Pathogenese der Alkoholabhängigkeit oder des DTs aus, sollte eine Sequenzanalyse angestrebt werden. Dies würde sich

aber sehr aufwendig gestalten, da eine sehr große Stichprobe erforderlich ist, um vernünftige statistische Aussagen treffen zu können.

Als weitere Erklärung für das negative Ergebnis und als Hinweis auf eine mögliche Überschätzung des DRD4-Gens in der Ätiologie der Alkoholabhängigkeit und des DTs dient die Beobachtung von Probanden mit einer Mutation des DRD4-Gens, die die Synthese eines Nonsense-Proteins zur Folge hat, und damit bei Vorliegen in Homozygotie einem DRD4-Knock-out gleichkommt. Heterozygote Träger sind bei gesunden Kontrollpersonen und bei Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen gleich häufig zu finden. Es wird von einem homozygoten Träger berichtet, der keine psychiatrischen Auffälligkeiten aufweist (Nöthen et al., 1994).

Obwohl Kopplungsanalysen (Long et al., 1998) und die Verteilung des DRD4 im Gehirn (De-la-Garza et al., 2000) auf eine Beteiligung des DRD4-Gens an der Genese der Alkoholabhängigkeit hinweisen, können Assoziationsstudien, die sich auf den DRD4-VNTR-Polymorphismus konzentrieren, inklusive der vorliegenden, den angenommenen Einfluss des DRD4 auf die Vulnerabilität für Alkoholabhängigkeit und DT nicht feststellen.

4.3.3. Catecholamin-O-methyltransferase (COMT)

Bei dem untersuchten COMT-Val/Met-Polymorphismus handelt es sich um einen funktionellen Polymorphismus. Dabei kodiert das Allel COMT G (Val) für eine hochaktive, und das Allel COMT A (Met) für eine niedrigaktive COMT (Lachman et al., 1996b; Syvanen et al., 1997).

Die Überlegung für einen möglichen Zusammenhang des COMT-Val/Met-Polymorphismus und der Pathogenese der Alkoholabhängigkeit stützt sich auf die Surfeit-Hypothese der Sucht: Individuen mit dem COMT*L/L-Genotyp würden, bedingt durch eine verringerte Dopamin- und Noradrenalinaktivierung, eine länger anhaltende und wirkungsvollere Dopamin- und Noradrenalinausschüttung auch im mesolimbischen System und somit einen intensiveren „Reward“-Effekt des Alkohols erfahren. Genausogut könnten auch angenommene positive Assoziationen des COMT*H/H-Genotyps

mit der Alkoholabhängigkeit gemäß der Defizit-Hypothese der Sucht erklärt werden (Blum et al., 2000). Eine beschleunigte Metabolisierung der Katecholamine Dopamin und Noradrenalin hätte einen Dopamin- und Noradrenalinmangel zur Folge, der durch die Alkoholaufnahme und eine damit verbundene Dopamin- und Noradrenalinausschüttung kompensiert würde.

Als mögliche Ursache eines DTs könnte die durch den COMT-Val/Met-Polymorphismus determinierte verlangsamte Inaktivierung des Noradrenalins und Dopamins in Betracht kommen. Diese werden während des Entzugs massiv peripher und zentral ausgeschüttet und können so zu Entzugerscheinungen führen (Hawley et al., 1985).

Die COMT wird aber auch für andere psychiatrische Erkrankungen und Symptome als Kandidatengen betrachtet. Männliche COMT-Knock-out-Mäuse zeigen ein aggressiveres Verhalten als Kontrollmäuse (Gogos et al., 1998). Bei schizophrenen Patienten wurde eine Assoziation zwischen dem COMT*L-Allel und gewalttätigem (Strous et al., 1997) bzw. suizidalem (Nolan et al., 2000) Verhalten vermutet.

In dieser Studie konnte in Bezug auf den funktionellen COMT-Val/Met-Polymorphismus weder eine Assoziation zur Diagnose „Alkoholabhängigkeit“ noch zum DT dargestellt werden.

Dieser Befund steht im Einklang mit einer Studie, die an japanischen alkoholabhängigen Patienten durchgeführt wurde. Auch hier ergab sich sowohl für die Alkoholabhängigkeit als auch den Schweregrad der Entzugssymptome (auch DT) oder dissoziale Verhaltensweisen keine signifikante Assoziation bezüglich des COMT-Val/Met-Polymorphismus (Ishiguro et al., 1999).

Ebenso konnte in einer finnischen Stichprobe der COMT-Val/Met-Polymorphismus nicht mit Typ2-Alkoholkonsum nach Cloninger assoziiert werden (Hallikainen et al., 2000).

Im Gegensatz dazu existieren aber zum Teil familienbasierte Assoziationsanalysen, die positive Zusammenhänge zwischen dem COMT*L-Allel und der Entstehung des Typ1- (Tiihonen et al., 1999) bzw. Typ2-Alkoholismus (Wang et al., 2001) herstellen konnten.

Es liegt eine Studie zur Assoziation zwischen COMT-Val/Met-Polymorphismus und Alkoholkonsum nicht bei alkoholabhängigen Patienten, sondern bei der allgemeinen männlichen Bevölkerung vor. Dabei berichteten Finnen mit COMT*LL-Genotyp über einen signifikant höheren Alkoholkonsum als die beiden anderen Genotypgruppen (Kauhanen et al., 2000).

Zusammenfassend ergibt sich kein einheitliches Bild der Resultate.

Eine mögliche Erklärung für die negativen Ergebnisse kann darin gesehen werden, dass die durch den COMT-Val/Met-Polymorphismus beeinflussten Unterschiede in der COMT-Aktivität keine wesentliche Bedeutung für die HVA- oder MHPG-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis (Jönsson et al., 1997) bzw. für die HVA-Konzentration im Plasma (Köhnke et al., 2003) haben, was darauf hindeutet, dass die COMT-Aktivität den Monoamin-Turnover und die Bildung von Metaboliten, trotz gegenteiliger Beschreibung bei COMT-Knock-out-Mäusen (Gogos et al., 1998), nicht signifikant beeinflusst. Dies liegt wahrscheinlich an der hohen Verfügbarkeit der COMT, die dadurch nicht limitierend für den Monoamin-Abbau und die HVA-/MHPG-Bildung wird (Jönsson et al., 1997).

Ferner ist nicht auszuschließen, dass neben dem COMT-Val/Met-Polymorphismus noch andere für die Funktion relevante Varianten des COMT-Gens existieren. Es könnten auch unidentifizierte Varianten der Genregulation vorkommen, die die Menge und/oder Art (MB-COMT vs. S-COMT) der COMT-Expression beeinflussen.

Aus Kopplungsanalysen (Reich et al., 1998; Long et al., 1998) gibt es bisher keinen Hinweis auf eine positive Kopplung der Alkoholabhängigkeit mit Chromosom 22, auf dem das COMT-Gen lokalisiert ist (Grossman et al., 1992). Dies schließt eine Beteiligung der COMT in der Ätiologie der Alkoholabhängigkeit bzw. des DTs nicht aus, macht sie – zusammen mit den zum Teil negativen Ergebnissen der Assoziationsstudien – aber weniger wahrscheinlich.

4.4. Die Rolle der Trinkmenge und der Dauer der Alkoholabhängigkeit für das Auftreten des DTs

Die alkoholabhängigen Patienten mit DT während der Entgiftung berichteten im Gegensatz zu den Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen über signifikant höhere konsumierte Alkoholmengen vor dem stationären Aufenthalt. Dies entspricht einer Feststellung von Schuckit (Schuckit et al., 1995) bzw. Wojnar (Wojnar et al., 1999b), die in wesentlich größeren Stichproben (Schuckit: n=1648 bzw. Wojnar: n=1179 alkoholabhängige Patienten) bei alkoholabhängigen Patienten mit DT einen größeren maximalen Alkoholkonsum beobachteten. Dies deutet darauf hin, dass das Risiko für die Entstehung eines DTs möglicherweise weniger von genetischen Faktoren als von der Toxizität des chronischen Alkoholkonsums abhängt.

Die Dauer der Alkoholabhängigkeit konnte, wie auch schon in vorangegangenen Studien (Wojnar et al., 1999; Brown et al., 1988), nicht mit dem Auftreten eines DTs in Zusammenhang gebracht werden.

Es sollte darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den Angaben zur Trinkmenge und zur Dauer der Alkoholabhängigkeit um retrospektiv erhobene, auf Patientenaussagen beruhende Daten handelt. Bei dieser Art der Datengewinnung besteht die Möglichkeit, dass mit Fehlern behaftete Resultate entstehen. So ist es oft nicht leicht, den exakten Beginn der Alkoholabhängigkeit zu eruieren, da der Übergang von Alkoholmissbrauch zur Abhängigkeit oft fließend ist.

Der beschriebene Risikofaktor für die Entstehung des DTs – der nichtmedizinische Benzodiazepin- /Sedativgebrauch – konnte nicht analysiert werden, da alkoholabhängige Patienten, die Gebrauch der genannten Substanzen betrieben, nicht in die Studie eingeschlossen wurden. Ebenfalls nicht eingeschlossen wurden die Patienten, bei denen Risikofaktoren wie zum Beispiel Verletzungen oder körperliche Erkrankungen bestanden (Schuckit et al., 1995; Wojnar et al., 1999).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die komplexe Ätiologie des DTs weitere Studien zur Identifikation von Risikofaktoren erforderlich macht.

4.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Da genetische Faktoren alleine die Ätiologie der Alkoholabhängigkeit bzw. des DTs nicht ausreichend klären können, muss weiterhin von einer multifaktoriellen Genese der Krankheitsbilder ausgegangen werden.

Signifikante Unterschiede existieren zwischen alkoholabhängigen Patienten und gesunden Kontrollpersonen sowohl bezüglich der Allelverteilung des DBH*444g/a-Polymorphismus, als auch der D β H-Plasmaaktivität. So weist das Allel a in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten eine höhere Frequenz auf als in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Trotz dieser signifikanten Assoziation stellt der DBH*444g/a-Polymorphismus keinen eindeutigen Marker in Form eines „Alkoholiker-Gens“ dar, weil das Allel a auch in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen eine Frequenz von 42,16%, und das Allel g in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten noch eine Frequenz von 46,39% besitzt. Ein hypothetischer Test auf die Eigenschaft „Alkoholabhängigkeit“ mit Hilfe des DBH*444g/a-Polymorphismus wäre damit aufgrund einer zu geringen Spezifität und Sensitivität nicht verwertbar.

Zukünftige Studien zur Klärung der Relevanz der DBH für die Alkoholabhängigkeit könnten im Rahmen von Familienuntersuchungen durchgeführt werden. Dabei wäre es sinnvoll, den DBH*444g/a-Genotyp und den Krankheitsstatus bezüglich der Alkoholabhängigkeit der Kinder und, wenn möglich, der Eltern, zu erfassen und zu analysieren.

Das a priori hohe Risiko von falsch positiven Assoziationsbefunden infolge multipler Testungen (verschiedene Kandidatengene, mehrere Polymorphismen eines Gens, unterschiedliche Phänotypen) schränkt die Validität positiver Assoziationsbefunde ein. Unabhängige Replikationen sind für die Bestätigung positiver Assoziationen daher unerlässlich. Dabei könnte man versuchen, bei großen Stichproben ($n > 200$) zu prüfen, ob sich die Assoziation für bestimmte Subtypen der Alkoholabhängigkeit (z.B. Ausmaß des Cravings, Rückfall vs. Abstinenz usw.) unterscheidet.

In Bezug auf die Klärung der Ätiologie des DTs, aber auch der Alkoholabhängigkeit, ist die Analyse weiterer Kandidatengene und deren Zusammenfassung als Haplotypen sinnvoll.

Auch der Frage nach der Bedeutung der Toxizität des Alkohols für die Entstehung des DTs sollte weiterhin nachgegangen werden. Hierzu könnte anhand einer postmortem-Studie geprüft werden, inwieweit sich alkoholabhängige Patienten mit nur leichten Entzugserscheinungen und alkoholabhängige Patienten mit DT hinsichtlich neuropathologischer Veränderungen unterscheiden.

Was sich in dieser Studie als sinnvoll erwiesen hat und in zukünftigen Assoziationsstudien berücksichtigt werden sollte, ist, dass im Hinblick auf die Frage der Funktionalität eines Kandidatengens oder Polymorphismus nicht nur der Genotyp bestimmt werden sollte, sondern nach Möglichkeit auch eine Assoziation mit einem phänotypischen Marker durchgeführt wird. Dies kann, wie in der vorliegenden Studie, die Bestimmung der Plasmaaktivität des untersuchten Enzyms sein, es sind aber auch die Analyse anderer Metaboliten oder der Einsatz bildgebender Verfahren, wie z.B. das fMRI oder die Nuklearmedizin, denkbar.

Könnte die molekulargenetische Forschung in Zukunft den Zusammenhang zwischen bestimmten genetischen Faktoren und der Alkoholabhängigkeit oder des DTs verdeutlichen, würden die Ursachen besser verstanden werden, und es eröffneten sich neue Hilfsmöglichkeiten für Personen mit entsprechender „risikoreicher“ genetischer Ausstattung. Genetisch bedingte Veränderungen auf Enzym- oder Rezeptorebene könnten zum Beispiel gezielt durch Medikamente ausgeglichen werden. Neben den sozial- und psychotherapeutischen Ansätzen stünde dann ein biologisch geprägtes Therapie- und möglicherweise Präventionskonzept zu Verfügung, welches die betroffenen Personen, deren Angehörige und die Gesellschaft vor den Folgen der Alkoholabhängigkeit bewahren könnte.

Gegenüber der Genforschung bestehen allerdings auch Bedenken (Müller-Hill, 1993). Solange Gentests auf freiwilliger Basis beruhen, wird die Gesellschaft mit neuen genetischen Erkenntnissen umgehen können. Große ethische

Vorbehalte aber würden sich ergeben, wenn zum Beispiel Ergebnisse von „Pflichtgentests“ in die Risikoberechnung von Versicherungen eingingen oder als Einstellungskriterien für Arbeitgeber dienten.

Dem Missbrauch neuerer genetischer Erkenntnis muss auch durch entsprechende politische Richtlinien vorgebeugt werden, wozu am ehesten eine möglichst wissenschaftliche, neutrale Aufklärung der Gesellschaft und ethische Reflexion der verantwortlichen Wissenschaftler und der Öffentlichkeit beiträgt.

5. Zusammenfassung

Tiermodelle, Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien belegen, dass genetische Faktoren neben Umwelteinflüssen eine bedeutende Rolle bei der Genese der Alkoholabhängigkeit spielen. Ebenso geht man von einer multifaktoriellen Ätiologie bei der Entstehung des DTs während der Alkoholentgiftung aus.

Ziel der Assoziationsstudie war es, einzelne disponierende Gene bzw. serologische Marker der Alkoholabhängigkeit und des DTs zu identifizieren. Dabei wurden mit Hilfe der PCR und anschließend Restriktionsendonukleasenverdau Kandidatengene analysiert, denen eine gewisse Funktionalität zugesprochen wird.

Es konnten 208 nach DSM IV alkoholabhängige Patienten und 102 gesunde Kontrollpersonen rekrutiert werden. 82 der alkoholabhängigen Patienten litten während der Alkoholentgiftung unter schweren Entzugerscheinungen in Form eines DTs.

Weder für den funktionellen Val/Met-Polymorphismus des katecholaminabbauenden Enzyms COMT noch für einen 48bp-VNTR-Polymorphismus des Dopaminrezeptors DRD4 konnte eine signifikante Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit bzw. dem DT hergestellt werden.

Es stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem DBH*444g/a-Polymorphismus und der D β H-Plasmaaktivität dar.

Der DBH*444g/a-Polymorphismus ist mit der Diagnose „Alkoholabhängigkeit“ assoziiert: das Allel a weist eine signifikant höhere Frequenz in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten auf. Ferner zeigte sich nach mindestens 22 Tagen Abstinenz eine signifikant erniedrigte D β H-Plasmaaktivität bei den alkoholabhängigen Patienten.

Zwischen den Patienten mit DT und den Patienten mit nur leichten Entzugerscheinungen während der Entgiftung konnte bezüglich des DBH*444g/a-Polymorphismus und der D β H-Plasmaaktivität kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Daten deuten auf eine Alkoholabhängigkeit-assoziierte Verminderung der D β H-Plasmaaktivität hin, die möglicherweise durch den DBH*444g/a-Polymorphismus beeinflusst wird.

Nach der vorliegenden Studie ergibt sich kein Hinweis auf eine Beteiligung der untersuchten Polymorphismen für die Ätiologie des DTs.

6. Literaturverzeichnis

Adamson, M.D., Kennedy, J., Petronis, A., Dean, M., Virkkunen, M., Linnoila, M., Goldman, D. (1995). DRD4 dopamine receptor genotype and CSF monoamine metabolites in Finnish alcoholics and controls. *Am. J. Med. Genet.* 60, 199-205

Agarwal, D.P., Philippu, G., Milech, U., Ziemsen, B., Schrappe, O., Goedde, H.W. (1983). Platelet monoamine oxidase and erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in alcoholism and controlled abstinence. *Drug Alcohol Depend.* 12, 85-91

Agshari, V., Sanyal, S., Buchwaldt, S., Paterson, A., Jovanovic, V., Van Tol, H.H.M. (1995). Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J. Neurochem.* 65, 1157-1165

American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4.Aufl., DSM-IV., American Psychiatric Press, Washington DC

Amit, Z., Brown, Z.W. (1982). Actions of drugs of abuse on brain reward systems: a reconsideration with specific attention to alcohol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17, 233-238

Anokhina, I.P., Panchenko, L.F., Kogan, B.M., Brusov, O.S. (1985). Catecholamine and opiate receptor systems in alcoholism. 127-145 in: Parves, H.: *Progress in alcohol research*. 1. Aufl., VNU Science Press

Arango, V., Underwood, M.D., Mann, J.J. (1994). Fewer pigmented neurons in the locus coeruleus of uncomplicated alcoholics. *Brain Res.* 650, 1-8

Ashley, M.J., Olin, J.S., Le Riche, W.H., Kornaczewski, A., Schmidt, W., Rankin, W. (1977). Morbidity in alcoholics: evidence for accelerated development of physical disease in women. *Arch. Intern. Med.* 137, 883-887

Asmussen, E., Hald, J., Larsen, V. (1948). The pharmacological action of acetaldehyde on the human organism. *Acta Pharmacol.* 4, 311-320

Babor, T.F., Grant, M. (1989). From clinical research to secondary prevention: international collaboration in the development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT). *Alcohol Health Res. World* 13, 371-374

Banerjee, S., Sharma, V.K., Khanna, J.M. (1978). Alterations in beta-adrenergic receptor binding during ethanol withdrawal. *Nature* 276, 407-408

Bardo, M.T., Donohew, R.L., Harrington, N.G. (1996). Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav. Brain Res.* 77, 23-43

Bau, C.H.D., Roman, T., Almeida, S., Hutz, M.H. (1999). Dopamine D4 receptor gene and personality dimensions in Brazilian male alcoholics. *Psychiatr. Genet.* 9, 139-143

Benjamin, J., Patterson, C., Greenberg, B.D., Murphy, D.L., Hamer, D.H. (1996). Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of novelty seeking. *Nat. Genet.* 12, 81-84

Bergmann, E., Horch, K. (2000). Ökonomische Bewertung von gesundheitlichen Folgen des Alkoholismus. *Sucht aktuell* 2, 14-18

Bertocci, B., Miggiano, V., Da Prada, M., Dembic, Z., Lahm, H.W., Malherbe, P. (1991). Human catechol-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1416-1420

Blum, K., Noble, E.P., Sheridan, P.J., Montgomery, A., Ritchie, T., Jagadeeswaran, P., Nogami, H., Briggs, A.H., Cohn, J.B. (1990). Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA* 263, 2055-2060

Blum, K., Braverman, E.R., Holder, J.M., Lubar, J.F., Monastra, V.J., Miller, D., Lubar, J.O., Chen, T.J., Comings, D.E. (2000). Reward deficiency syndrome: a biogenetic model for the diagnosis and treatment of impulsive, addictive, and compulsive behaviors. *J. Psychoactive Drugs* 32 Suppl., 1-112

Borg, S., Kvande, H., Sedvall, G. (1981). Central norepinephrine metabolism during alcohol intoxication in addicts and healthy volunteers. *Science* 213, 1135-1137

Borg, S., Czarnecka, A., Kvande, H., Mossberg, D., Sedvall, G. (1983a). Clinical conditions and concentrations of MOPEG in the cerebrospinal fluid and urine of male alcoholic patients during withdrawal. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 7, 411-415

Borg, S., Kvande, H., Mossberg, D., Valverius, P., Sedvall, G. (1983b). Central nervous system noradrenaline metabolism and alcohol consumption in man. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18, Suppl. 1, 375-378

Boudikova, B., Szumlanski, C., Maidak, B., Weinshilboum, R.M. (1990). Human liver catecholamine-O-methyltransferase pharmacogenetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 48, 381-389

Brodie, M.S., Shefner, S.A., Dunwiddie, T.V. (1990). Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Res.* 508, 65-69

Brodie, M.S., Pesold, C., Appel, S.B. (1999). Ethanol directly excites dopamineergic ventral tegmental area reward neurons. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23, 1848-1852

Brown, M.E., Anton, R.F., Malcolm, R., Ballenger, J.C. (1988). Alcohol detoxification and withdrawal seizures: clinical support for a kindling hypothesis. *Biol. Psychiatry* 23, 507-514

Budygin, E.A., Phillips, P.E., Wightman, R.M., Jones, S.R. (2001). Terminal effects of ethanol on dopamine dynamics in rat nucleus accumbens: an in vitro voltammetric study. *Synapse* 42, 77-79

Bundesministerium für Gesundheit und Soziale Sicherung (2002). Drogen- und Suchtbericht 2002. www.bmgs.bund.de/

Carlsson, A., Lindquist, M. (1973). Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain in vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* 25, 437-440

Carlsson, A., Magnusson, T., Svensson, T.H., Waldeck, B. (1973). The effect of subhypnotic doses of ethanol on regional catecholamine turn-over. *Psychopharmacologia (Berl.)* 30, 27-36

Chang, F.M., Kidd, J.R., Livak, K.J., Pakstis, A.J., Kidd, K.K. (1996). The worldwide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum. Genet.* 98, 91-101

Chang, F.M., Ko, H.C., Lu, R.B., Pakstis, A.J., Kidd, K.K. (1997). The dopamine D4 receptor gene (DRD4) is not associated with alcoholism in three Taiwanese populations: six polymorphisms tested separately and as haplotypes. *Biol. Psychiatry* 41, 394-405

Chen, W.J., Loh, E.W., Hsu, Y.P.P., Chen, C.C., Yu, J.M., Cheng, A.T.A. (1996). Alcohol-metabolising genes and alcoholism among Taiwanese Han men: independent effect of ADH2, ADH3 and ALDH2. *Br. J. Psychiatry* 8, 762-767

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

Cloninger, C.R. (1987). Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 236, 410-416

Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H. (1986). *The biochemical basis of neuropharmacology.*, Oxford University Press, New York

Cotton, N.S. (1979). The familial incidence of alcoholism: a review. *J. Stud. Alcohol* 40, 89-116

Croissant, B., Mann, M. (2000). Alkoholentzug und seine Behandlung. *Ther. Umsch.* 57, 257-260

Crowe, R.R. (1993). Candidate genes in psychiatry: an epidemiological perspective. *Am. J. Med. Genet.* 48, 74-77

Cubells, J.F., van Kammen, D.P., Kelley, M.E., Anderson, G.M., O'Connor, D.T., Price, L.H., Malison, R., Rao, P.A., Kobayashi, K., Nagatsu, T., Gelernter, J. (1998). Dopamine-beta-hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at the structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation. *Hum. Genet.* 102, 533-540

Cubells, J.F., Kranzler, H.R., McCance-Katz, E., Anderson, G.M., Malison, R.T., Price, L.H., Gelernter, J. (2000). A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol. Psychiatry* 5, 56-63

Cubells, J.F., Zabetian, C.P. (2004). Human genetics of plasma dopamine β -hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology* 174, 463-476

Cutrona, C.E., Cadoret, R.J., Suhr, J.A., Richards, C.C., Troughton, E., Schutte, K., Woodworth, G. (1994). Interpersonal variables in the prediction of alcoholism among adoptees: evidence for gene-environment interactions. *Compr. Psychiatry* 35, 171-179

Daniels, J.K., Williams, N.M., Williams, J., Jones, L.A., Cardno, A.G., Murphy, K.C., Spurlock, G., Riley, B., Scambler, P., Asherson, P., McGuffin, P., Owen, M.J. (1996). No evidence for allelic association between schizophrenia and a polymorphism determining high and low catechol O-methyltransferase activity. *Am. J. Psychiatry* 153, 268-270

Darden, J.A., Hunt, W.A. (1977). Reduction of striatal dopamine release during an ethanol withdrawal syndrome. *J. Neurochem.* 29, 1143-1145

De-la-Garza, R., Madras, B.K. (2000). [(3)H] PNU-101958, a D(4) dopamine receptor probe, accumulates in prefrontal cortex and hippocampus of non-human primate brain. *Synapse* 37, 232-244

Devor, E.J., Cloninger, C.R., Hoffman, P.L., Tabakoff, B. (1993). Association of monoamine oxidase (MAO) activity with alcoholism and alcoholic subtypes. *Am. J. Med. Genet.* 48, 209-213

Diana M., Pistis, M., Carboni, S., Gessa, G.L., Rossetti, Z.L. (1992). Profound decrement of mesolimbic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7966-7969

Di Chiara, G., Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5274-5278

Dilling, H., Mombour, W., Schmidt, M.H. (1993). ICD-10. Internationale Klassifikation psychischer Störungen. 2. Aufl., Huber-Verlag, Bern

Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S. (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 20, 4008

Duan, J., Wainwright, M.S., Comeron, J.M., Saitou, N., Sanders, A.R., Gelernter, J., Gejman, P.V. (2003). Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum. Mol. Genet.* 12, 205-216

Ebstein, R.P., Novick, O., Umansky, R., Priel, B., Osher, Y., Blaine, D., Bennett, E.R., Nemanov, L., Katz, M., Belmaker, R.H. (1996). Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. *Nat. Genet.* 12, 78-80

El-Ghundi, M., George, S.R., Drago, J., Fletcher, P.J., Fan, T., Nguyen, T., Liu, C., Sibley, D.R., Westphal, H., O'Dowd, B.F. (1998). Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. *Eur. J. Pharmacol.* 353, 149-158

Erwin, W.E., Williams, D.B., Speir, W.A. (1998). Delirium Tremens. *South. Med. J.* 91, 425-432

Fadda, F., Argiolas, A., Melis, M.R., Serra, G., Gessa, G.L. (1980) Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate nucleus and substantia nigra. *Life Sci.* 27, 979-986

Fahndrich, E., Muller-Oerlinghausen, B., Coper, H. (1982). Longitudinal assessment of MAO-, COMT-, and DBH- activity in patients with bipolar depression. *Int. Pharmacopsychiat.* 17, 8-17

Feuerlein, W. (1972). Zur Frage des Alkoholentzug-Syndroms. *Nervenarzt* 43, 247

Feuerlein, W., Kufner H., Soyka M. (1998). Alkoholismus – Missbrauch und Abhängigkeit: Entstehung – Folgen – Therapie. 5. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart

Foroud, T., Bucholz, K.K., Edenberg, H.J., Goate, A., Neuman, R.J., Porjesz, B., Koller, D.L., Rice, J., Reich, T., Bierut, L.J., Cloninger, C.R., Nurnberger, J.I., Li, T.-K., Conneally, P.M., Tischfield, J.A., Crowe, R., Hesselbrock, V., Schuckit, M., Begleiter, H. (1998). Linkage of an alcoholism-related severity phenotype to chromosome 16. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22, 2035-2042

Franke, P., Schwab, S.G., Knapp, M., Gänsicke, M., Delmo, C., Zill, P., Trixler, M., Lichtermann, D., Hallmayer, J., Wildenauer, D.B., Maier, W. (1999). DAT1 gene polymorphism in alcoholism: a family-based association study. *Biol. Psychiatry* 45, 652-654

French, S.W., Morris, J.R. (1978). Ethanol dependence in the rat induced by non-intoxication levels of ethanol. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.* 4, 221-223

Fujimoto, A., Nagao, T., Ebara, T., Sato, M., Otsuki, S. (1983). Cerebrospinal fluid monoamine metabolites during alcohol withdrawal syndrome and recovered state. *Biol. Psychiatry* 18, 1141-1152

Fulton, M.K., Kramer, G., Moeller, F.G., Chae, Y., Isbell, P.G., Petty, F. (1995). Low plasma homovanillic acid levels in recently abstinent alcoholic men. *Am. J. Psychiatry* 152, 1819-1820

Gatto, G.J., McBride, W.J., Murphy, J.M., Lumeng, L., Li, T.K. (1994). Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol* 11, 557-564

Geijer, T., Jonsson, E., Neiman, J., Persson, M.L., Brene, S., Gylander, A., Sedvall, G., Rydberg, U., Wasserman, D., Terenius, L. (1997). Tyrosine hydroxylase and dopamine D4 receptor allelic distribution in Scandinavian chronic alcoholics. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 21, 35-39

George, S.R., Cheng, R., Nguyen, T., Israel, Y., O'Dowd, B.F. (1993). Polymorphisms of the D4 dopamine receptor alleles in chronic alcoholism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 107-114

Geraciotti, T.D., Loosen, P.T., Ebert, M.H., Ekhtor, N.N., Burns, D., Nicholson, W.E., Orth, D.N. (1994). Concentrations of Corticotropin-Releasing Hormone, Norepinephrine, MHPG, 5-Hydroxyindoleacetic Acid, and tryptophan in the cerebrospinal Fluid of Alcoholic Patients: serial sampling studies. *Neuroendocrinology* 60, 635-642

Gessa, G.L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L., Mereu, G. (1985). Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *Brain Res.* 348, 201-203

Goate, A.M., Edenberg, H.J. (1998). The genetics of alcoholism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 282-286

Gogos, J.A., Morgan, M., Luine, V., Santha, M., Ogawa, S., Pfaff, D., Karayiorgou, M. (1998). Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9991-9996

Goldin, L.R., Gershon, E.S., Lake, C.R., Murphy, D.L., McGinniss, M., Sparkes, R.S. (1982). Segregation and linkage studies of plasma dopamine-beta-hydroxylase (DBH), erythrocyte catechol-O-methyltransferase (COMT), and platelet monoamine oxidase (MAO): possible linkage between the ABO locus and a gene controlling DBH activity. *Am. J. Hum. Genet.* 34, 250-262

Goodwin, D.W. (1976). *Is alcoholism hereditary?*, Oxford University Press, New York

Grossman, M.H., Emanuel, B.S., Budarf, M.L. (1992). Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1-q11.2. *Genomics* 12, 822-825

Guldberg, H.C., Marsden, C.A. (1975). Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol. Rev.* 27, 135-206

Hallikainen, T., Lachman, H., Saito, T., Volavka, J., Kauhanen, J., Salonen, J.T., Ryyanen, O.P., Koulu, M., Karvonen, M.K., Pohjalainen, T., Syvalahti, E., Hietala, J., Tiihonen, J. (2000). Lack of association between the functional variant of the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene and early-onset alcoholism associated with severe antisocial behavior. *Am. J. Med. Genet.* 96, 348-352

Han, C., McGue, M.K., Iacono, W.G. (1999). Lifetime tobacco, alcohol and other substance use in adolescent Minnesota twins: univariate and multivariate behavioural genetic analyses. *Addiction* 94, 981-993

Hawley, R.J., Major, L.F., Schulman, C.A., Linnoila, M. (1985). Cerebrospinal fluid 3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol and norepinephrine levels in alcohol withdrawal. *Arch. Gen. Psychiatry* 42, 1056-1062

Heinz, A., Schmidt, K., Sällström Baum, S., Kuhn, S., Dufeu, P., Schmidt, L.G., Rommelspacher, H. (1996). Influence of dopaminergic transmission on severity of withdrawal syndrome in alcoholism. *J. Stud. Alcohol* 57, 471-474

Heinz, A., Weingartner, H., George, D., Hommer, D., Wolkowitz, O.M., Linnoila, M. (1999). Severity of depression in abstinent alcoholics is associated with monoamine metabolites and dehydroepiandrosterone-sulfate concentrations. *Psychiatry Res.* 89, 97-106

Hong, J., Shu-Leong, H., Tao, X., Lap-Ping, Y. (1998). Distribution of catechol-O-methyltransferase expression in human central nervous system. *Neuroreport* 9, 2861-2864

Hrubec, Z., Omenn, G.S. (1981). Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among male veterans. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 5, 207-215

Hsu, Y.P., Tai, J.J., Seow, S.V., Chen, C.C., Yu, J.M., Cheng, A.T. (1998). Allelic association of tryptophan hydroxylase with alcoholism in five Taiwanese ethnic groups. *Mol. Psychiatry* 3, 213-214

Ishiguro, H., Haruo-Shibuya, T., Toru, M., Saito, T., Arinami, T. (1999). Association study between high and low activity polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcoholism. *Psychiatr. Genet.* 9, 135-138

Jellinek, E.M. (1960). *The disease concept of alcoholism*. Hillhouse-Verlag, New Haven

Jönsson, E.G., Goldman, D., Spurlock, G., Gustavsson, J.P., Nielsen, D.A., Linnoila, M., Owen, M.J., Sedvall, G.C. (1997). Tryptophan hydroxylase and catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms: relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 247, 297-302

Jones, S., Kauer, J.A. (1999). Amphetamine depresses excitatory synaptic transmission via serotonin receptors in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 19, 9780-9787

Karoum, F., Wyatt, R.J., Majchrowicz, E. (1976). Brain concentrations of biogenic amine metabolites in acutely treated and ethanol dependent rats. *Br. J. Pharmacol.* 56, 403-411

Kauhanen, J., Hallikainen, T., Tuomainen, T.P., Koulu, M., Karvonen, M.K., Salonen, J.T., Tiihonen, J. (2000). Association between the functional polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcohol consumption among social drinkers. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24, 135-139

Kendler, K.S., Heath, A.C., Neale, M.C., Kessler, R.C., Eaves, L.J. (1992). A population-based twin study of alcoholism in women. *JAMA* 268, 1877-1882

von Keyserlingk, H. (1978). Zur Epidemiologie des Delirium tremens im Bezirk Schwerin. *Psychiat. Neurol. Med. Psychol.* 30, 483-490

Kiraly, I., van Ree, J.M. (1984). Non-opiate beta-endorphin fragments and dopamine—VI. Behavioural analysis of the interaction between gamma-type endorphins and dopaminergic systems in the nucleus accumbens of rats. *Neuropharmacology* 23, 511-516

Kobayashi, K., Kurosawa, Y., Fujita, K., Nagatsu, T. (1989). Human dopamine β -hydroxylase gene: two mRNA types having different 5'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* 17, 1089-1102

Köhnke, M.D., Zabetian, C.P., Anderson, G.M., Kolb, W., Gaertner, I., Buchkremer, G., Vonthein, R., Schick, S., Lutz, U., Köhnke, A.M., Cubells, J.F. (2002). A genotype-controlled analysis of plasma dopamine β -hydroxylase in healthy and alcoholic subjects: evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function. *Biol. Psychiatry* 52, 1151-1158

Köhnke, M.D., Wiatr, G., Kolb, W., Köhnke, A.M., Schick, S., Lutz, U., Vonthein, R., Gaertner, I. (2003). Plasma homovanillic acid: a significant association with alcoholism is independent of a functional polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase gene. *Neuropsychopharmacology* 28, 1004-1010
Koob, G.F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 177-184

Krystal, J.H., Webb, E., Cooney, N.L., Kranzler, H.R., Southwick, S.W., Heninger, G.R., Charney, D.S. (1996). Serotonergic and noradrenergic dysregulation in alcoholism: m-chlorophenylpiperazine and yohimbine effects in recently detoxified alcoholics and healthy comparison subjects. *Am. J. Psychiatry* 153, 83-92

Küfner, H., Kraus, L. (2002). Epidemiologische und ökonomische Aspekte des Alkoholismus. *Dtsch. Arztebl.* 99, 936-945

Kuriyama, K., Muramatsu, M., Aiso, M., Vend, E. (1981). Alterations in beta adrenergic receptor binding in brain, lung and heart during morphine and alcohol dependence and withdrawal. *Neuropharmacology* 20, 659-666

Lachman, H.M., Papolos, D.F., Saito, T., Yu, Y.M., Szumlanski, C.L., Weinshilboum, R.M. (1996b). Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6, 243-250

La Grange, L., Jones, T.D., Erb, L., Reyes, E. (1995). Alcohol consumption: biochemical and personality correlates in a college student population. *Addict. Behav.* 20, 93-103

Lichter, J.B., Barr, C.L., Kennedy, J.L., Van Tol, H.H.M., Kidd, K.K., Livak, K.J. (1993). A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum. Mol. Genet.* 2, 767-773

Long, J.C., Knowler, W.C., Hanson, R.L., Robin, R.W., Urbanek, M., Moore, E., Bennett, P.H., Goldman, D. (1998). Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from autosome-wide scan in an American Indian population. *Am. J. Med. Genet.* 81, 216-221

Lundstrom, K., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Karhunen, T., Panula, P., Ulmanen, I. (1995). Cloning, expression and structure of catechol-O-methyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1251, 1-10

Lykouras, E., Moussas, G., Markianos, M. (1987). Platelet monoamine oxidase and plasma dopamine-beta-hydroxylase activities in non-abstinent chronic alcoholics : relation to clinical parameters. *Drug Alcohol Depend.* 19, 363-368

Maes, H.H., Woodard, C.E., Murrelle, L., Meyer, J.M., Silberg, J.L., Hewitt, J.K., Rutter, M., Simonoff, E., Pickles, A., Carbonneau, R., Neale, M.C., Eaves, L.J. (1999). Tobacco, alcohol and drug use in eight- to sixteen-year-old twins: the Virginia twin study of adolescent behavioural development. *J. Stud. Alcohol* 60, 293-305

Maier, W. (1995). Mechanismen der familiären Übertragung von Alkoholabhängigkeit und Alkoholabusus. *Z. Klin. Psychol.* 24, 147-158

Matsumoto, M., Hidaka, K., Tada, S., Tasaki, Y., Yamaguchi, T. (1995). Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 29, 157-162

McBride, W.J., Bodart, B., Lumeng, L., Li, T.K. (1995). Association between low contents of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens and high alcohol preference. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19, 1420-1422

McBride, W.J., Murphy, J.M., Ikemoto, S. (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav. Brain Res.* 101, 129-152

McGue, M., Pickens, R.W., Svikis, D.S. (1992). Sex and age effects on the inheritance of alcohol problems: a twin study. *J. Abnorm. Psychol.* 101, 3-17

Merinkangas, K.R. (1990). The genetic epidemiology of alcoholism. *Psychol. Med.* 20, 11-22

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215

Möller, H.J., Laux, G., Deister, A. (2001). *Psychiatrie und Psychotherapie*. 2. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart

Müller-Hill, B. (1993). The shadow of genetic injustice. *Nature* 362, 491-492

Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350

Muramatsu, T., Higuchi, S., Murayama, M., Matsushita, S., Hayashida, M. (1996). Association between alcoholism and the dopamine D4 receptor gene. *J. Med. Genet.* 33, 113-115

Myers, R.D., Robinson, D.E. (1999). Mu and D2 receptor antisense oligonucleotides injected in nucleus accumbens suppress high alcohol intake in genetic drinking HEP rats. *Alcohol* 18, 98-109

Nagaya, T., Takahashi, A., Yoshida, I., Yokoyama, M. (1992). Biphasic effects of smoking on human serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Toxicol. Lett.* 60, 325-328

Nanko, S., Hattori, M., Ikeda, K., Sasaki, T., Kazamatsuri, H., Kuwata, S. (1993). Dopamine D4 receptor polymorphism and schizophrenia. *Lancet* 341, 689-690

Nielsen, D.A., Virkkunen, M., Lappalainen, J., Eggert, M., Brown, G.L., Long, J.C., Goldman, D., Linnoila, M. (1998). A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 593-602

Nöthen, M.M., Cichon, S., Hemmer, S., Hebebrand, J., Remschmidt, H., Lehmkuhl, G., Poustka, F., Schmidt, M., Catalano, M., Fimmers, R., Korner, J., Rietschel, M., Propping, P. (1994). Human dopamine D4 receptor gene: frequent occurrence of a null allele and observation of homozygosity. *Hum. Mol. Genet.* 3, 2207-2212

Nolan, K.A., Volavka, J., Czobor, P., Cseh, A., Lachman, H., Saito, T., Tiihonen, J., Putkonen, A., Hallikainen, T., Kotilainen, I., Räsänen, P., Isohanni, M., Järvelin, M.-R., Karvonen, M.K. (2000). Suicidal behavior in patients with schizophrenia is related to COMT polymorphism. *Psychiatr. Genet.* 10, 117-124

Ollat, H., Parvez, H., Parvez, S. (1988). Alcohol and central neurotransmission. *Neurochem. Int.* 13, 275-300

Ott, J. (1992). *Analysis of human genetic linkage.*, The John Hopkins University Press, Baltimore

Palsson, A. (1986). The efficacy of early chlomethiazole medication in the prevention of delirium tremens. A retrospective study of the outcome of different drug treatment strategies at the Halsingborg psychiatric clinics. *Acta Psychiatr. Scand.* 73, Suppl 329: 140-145

Parsian, A., Chakraverty, S., Fisher, L., Cloninger, C.R. (1997). No association between polymorphisms in the human dopamine D3 and D4 receptors genes and alcoholism. *Am. J. Med. Genet.* 74, 281-285

Paterson, A.D., Sunohara, G.A., Kennedy, J.L. (1999). Dopamine D4 receptor gene: novelty or nonsense? *Neuropsychopharmacology* 21, 3-16

- Peronnet, F., Cleroux, J., Perrault, H., Thibault, G., Cousineau, D., de Champlain, J., Guillard, J.C., Klepping, J. (1985). Plasma norepinephrine, epinephrine, and dopamine beta-hydroxylase activity during exercise in man. *Med. Sci. Sports Exerc.* 17, 683-688
- Petronis, A., Van Tol, H.H.M., Livak, K.J., Siderberg, D.G., Macciardi, F.M., Kennedy, J.L. (1992). Genetic analysis of variable repeat sequence in DRD4 gene exon. *Am J. Hum. Genet.* (Abstract) A198, 779
- Pickens, R.W., Svikis, D.S., McGue, M., Lykken, D.T., Heston, L.L., Clayton, P.J. (1991). Heterogeneity in the inheritance of alcoholism. A study of male and female twins. *Arch. Gen. Psychiatry* 48, 19-28
- Pohorecky, L.A. (1974). Effects of ethanol on central and peripheral noradrenergic neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 189, 380-391
- Prescott, C.A., Kendler, K.S. (1999). Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins. *Am. J. Psychiatry* 156, 34-40
- Primus, R.J., Thurkauf, A., Xu, J., Yevich, E., McInerney, S., Shaw, K., Tallman, J.F., Gallagher, D.W. (1997). Localization and characterization of dopamine D4 binding sites in rat and human brain by use of the novel, D4 receptor-selective ligand [3H]NGD 94-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1020-1027
- Reich, T., Edenberg, H.J., Goate, A., Williams, J.T., Rice, R.P., van Eerdewegh, P., Foroud, T., Hesselbrock, V., Schuckit, M.A., Bucholz, K., Pojesz, B., Li, T.-K., Conneally, P.M., Nurnberger, J.I., Tischfield, J.A., Crowe, R., Cloninger, C.R., Wu, W., Shears, S., Carr, K., Crone, C., Willig, C., Begleiter, H. (1998). A genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *Am. J. Med. Genet.* 81, 207-215
- Risinger, F.O., Freeman, P.A., Rubinstein, M., Low, M.J., Grandy, D.K. (2000). Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 152, 343-350
- Roe, A. (1944). The adult adjustment of children of alcoholic parents raised in fosterhomes. *Q. J. Stud. Alcohol* 5, 378-393
- Rommelspacher, H. (1998). Welche neurobiologischen Mechanismen erklären Aspekte süchtigen Verhaltens? 41-52 in: Mann, K., Buchkremer, G.: *Sucht: Grundlagen, Diagnostik, Therapie.* 2. Aufl., Gustav Fischer-Verlag, Lübeck, Stuttgart, Jena, Ulm
- Ross, S.B., Wetterberg, L., Myrhed, M. (1973). Genetic control of plasma dopamine-beta-hydroxylase. *Life Sci.* 12, 529-532

Rossetti, Z.L., Hmaidan, Y., Gessa, G.L. (1992). Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 221, 227-234

Rothblat, D.S., Rubin, E., Schneider, J.S. (2001). Effects of chronic alcohol ingestion on the mesostriatal dopamine system in the rat. *Neurosci. Lett.* 300, 63-66

Sander, T., Harms, H., Podschus, J., Finckh, U., Nickel, B., Rolfs, A., Rommelspacher, H., Schmidt, L.G. (1995). Dopamine D1, D2 and D3 receptor genes in alcohol dependence. *Psychiatr. Genet.* 5, 171-176

Sander, T., Harms, H., Podschus, J., Finckh, U., Nickel, B., Rolfs, A., Rommelspacher, H., Schmidt, L.G. (1997a). Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism in alcohol dependence with withdrawal seizures or delirium. *Biol. Psychiatry* 41, 299-304

Sander, T., Harms, H., Dufeu, P., Kuhn, S., Rommelspacher, H., Schmidt, L.G. (1997b). Dopamine D4 receptor exon III alleles and variation of novelty seeking in alcoholics. *Am. J. Med. Genet.* 74, 483-487

Sander, T., Harms, H., Rommelspacher, H., Hoehe, M., Schmidt, L.G. (1998b). Possible allelic association of a tyrosine hydroxylase polymorphism with vulnerability to alcohol-withdrawal delirium. *Psychiatr. Genet.* 8, 13-17

Sano, H., Suzuki, Y., Ohara, K., Yazaki, R., Ishigaki, T., Yokoyama, T., Ohara, K. (1992). Circadian variation in plasma homovanillic acid level during and after alcohol withdrawal in alcoholic patients. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 16, 1047-1051

Sanyal, S., Van Tol, H.H.M. (1997). Dopamine D4 receptor-mediated inhibition of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production does not affect prolactin regulation. *Endocrinology* 138, 1871-1878

Saß, H., Wittchen, H.U., Zaudig, M. (1996). Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen DSM-IV. Hogrefe-Verlag, Göttingen

Schuckit, M.A., O'Connor, D.T., Duby, J., Vega, R., Moss, M. (1981). Dopamine- β -hydroxylase activity levels in men at high risk for alcoholism and controls. *Biol. Psychiatry* 16, 1067-1075

Schuckit, M.A. (1994a). A clinical model of genetic influences in alcohol dependence. *J. Stud. Alcohol* 55, 5-17

Schuckit, M.A. (1994b). Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. *Am. J. Psychiatry* 151, 184-189

Schuckit, M.A., Tipp, J.E., Reich, T., Hesselbrock, V.M., Bucholz, K.K. (1995). The histories of withdrawal convulsions and delirium tremens in 1648 alcohol dependent subjects. *Addiction* 90, 1335-1347

Schulteis, G., Koob, G. (1994). Dark side of drug dependence. *Nature* 371, 108-109

Seeman, P. (1992). Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology* 7, 261-284

Sham, P.C., Curtis, D. (1995). Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann. Hum. Genet.* 59, 97-105

Shen, R.Y., Chiodo, L.A. (1993). Acute withdrawal after repeated ethanol treatment reduces the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.* 622, 289-293

Soyka, M., Lutz, W., Kauert, G., Schwarz, A., Steinberg, R. (1989a). Epileptische Anfälle im Alkoholentzug. *Psycho* 15, 244-255

Strous, R.D., Bark, N., Parsia, S.S., Volavka, J., Lachman, H.M. (1997). Analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association with aggressive and antisocial behavior. *Psychiatry Res.* 69, 71-77

Sullivan, J.T., Sykora, K., Schneiderman, J., Naranjo, C.A., Sellers, E.M. (1989). Assessment of alcohol withdrawal: the revised clinical institute withdrawal assessment for alcohol scale (CIWA-Ar). *Br. J. Addict.* 84, 1353-1357

Syvanen, A.C., Tilgmann, C., Rinne, J., Ulmanen, I. (1997). Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT): correlation of genotype with individual variation of S-COMT activity and comparison of the allele frequencies in the normal population and parkinsonian patients in Finland. *Pharmacogenetics* 7, 65-71

Tabakoff, B., Hoffmann, P.L. (1979). Development of functional dependence on ethanol in dopaminergic systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 216-222

Tenhunen, J., Salminen, M., Lundstrom, K., Kiviluoto, T., Savolainen, R., Ulmanen, I. (1994). Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur. J. Biochem.* 223, 1049-1059

Thanos, P.K., Volkow, N.D., Freimuth, P., Umegaki, H., Ikari, H., Roth, G., Ingram, D.K., Hitzemann, R. (2001). Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self-administration. *J. Neurochem.* 78, 1094-1103

Thibault, C., Lai, C., Wilke, N., Duong, B., Olive, M.F., Rahman, S., Dong, H., Hodge, C.W., Lockhart, D.J., Miles, M.F. (2000). Expression profiling of neural cells reveals specific patterns of ethanol-responsive gene expression. *Mol. Pharmacol.* 52, 1593-1600

Thomasson, H.R., Edenberg, H.J., Crabb, D.W., Mai, X.L., Jerome, R.E., Li, T.K., Wang, S.P., Lin, Y.T., Ly, R.B., Yin, S.J. (1991). Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 677-681

Tiihonen, J., Hallikainen, T., Lachman, H., Saito, T., Volavka, J., Kauhanen, J., Salonen, J.T., Ryyanen, O.P., Koulu, M., Karvonen, M.K., Pohjalainen, T., Sivalahti, E., Hietala, J. (1999). Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism. *Mol. Psychiatry* 4, 286-289

Uhl, R.U. (1999). Molecular genetics of substance abuse vulnerability: a current approach. *Neuropsychopharmacology* 20, 3-9

Van Tol, H.H.M., Wu, C.M., Guan, H.C., Ohara, K., Bunzow, J.R., Civelli, O., Kennedy, J., Seeman, P., Niznik, H.B., Jovanovic, V. (1992). Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358, 149-152

Vanyukov, M.M., Moss, H.B., Yu, L.M., Tarter, R.E., Deka, R. (1995). Preliminary evidence for an association of a dinucleotide repeat polymorphism at the MAOA gene with early onset alcoholism/substance abuse. *Am. J. Med. Genet.* 60, 122-126

Wang, T., Franke, P., Neidt, H., Cichon, S., Knapp, M., Lichtermann, D., Maier, W., Propping, P., Nothen, M.M. (2001). Association study of the low-activity allele of catechol-O-methyltransferase and alcoholism using a family-based approach. *Mol. Psychiatry* 6, 109-111

Wei, J., Ramchand, C.N., Hemmings, G.P. (1997). Possible control of dopamine beta-hydroxylase via a codominant mechanism associated with the polymorphic (GT)_n repeat at its gene locus in healthy individuals. *Hum. Genet.* 99, 52-55

Weinshenker, D., Rust, N.C., Miller, N.S., Palmiter, R.D. (2000). Ethanol-associated behaviors of mice lacking norepinephrine. *J. Neurosci.* 20, 3157-3164

Weinshilboum, R.M., Raymond, F.A., Elveback, L.R., Weidman, W.H. (1973). Serum dopamine-beta-hydroxylase activity: sibling-sibling correlation. *Science* 181, 943-945

- Weinshilboum, R.M., Schorott, H.G., Raymond, F.A., Weidman, W.H., Elveback, L.R. (1975). Inheritance of very low serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Am. J. Hum. Genet.* 27, 573-585
- Weinshilboum, R.M. (1978a). Serum dopamine β -hydroxylase. *Pharmacol. Rev.* 30, 133-166
- Weinshilboum, R.M. (1978b). Human biochemical genetics of plasma dopamine-beta-hydroxylase and erythrocyte catechol-O-methyltransferase. *Hum. Genet. Suppl.* 1, 101-112
- Weiss, F., Parsons, L.H., Schulteis, G., Lorang, M.T., Hyytiä, P., Bloom, F.E., Koob, G.F. (1996). Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and serotonin release in dependent rats. *J. Neurosci.* 16, 3474-3485
- Wetterling, T. (1994). Delir – der Stand der Forschung. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 62, 280-289
- Wilson, A.F., Elston, R.C., Siervogel, R.M., Tran, L.D. (1988). Linkage of a gene regulating dopamine-beta-hydroxylase activity and the ABO blood group locus. *Am. J. Hum. Genet.* 42, 160-166
- Wittchen, H.U., Zaudig, M., Fydrich, T. (1997). SKID. Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV., Testzentrale, Göttingen
- Wojnar, M., Bizon, Z., Wasilewski, D. (1999b). The role of somatic disorders and physical injury in the development and course of alcohol withdrawal delirium. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23, 209-213
- Yim, H.J., Gonzales, R.A. (2000). Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. *Alcohol* 22, 107-115
- Yin, S.J. (1994). Alcohol dehydrogenase: enzymology and metabolism. *Alcohol Alcohol. Suppl.*, 2113-2119
- Yoshimoto, K., McBride, W.J., Lumeng, L., Li, T.K. (1992). Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 16, 781-785
- Zabetian, C.P., Anderson, G.A., Buxbaum, S.G., Elston, R.C., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kim, K.-S., Kim, C.-H., Malison, R.T., Gelernter, J., Cubells, J.F. (2001). A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine β -hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J. Hum. Genet.* 68, 515-522

Zilker, T. (1999). Alkoholentzugssyndrom und Delirium tremens. M.M.W.
Fortschr. Med. 141, 26-30

7. Anhang

7.1. Material

7.1.1. Geräte

Autoklav	Typ CV – EL 10L	CertoClav, Traun, Österreich
Elektrophoresekammer	GNA-100 Submarine Unit	Pharmacia, Freiburg
	GNA-200 Submarine Unit	Pharmacia, Freiburg
	Gator A2	Owl, Portsmouth, USA
Gefrierschrank	-20° C	Liebherr, Ochsenhausen
	-70° C	Heraeus, Hanau
Gelkamera	GelCam	Polaroid, St. Albans, UK
Kühlschrank		Linde, Köln
Laborwaage	PM 4600	Mettler, Giessen
	770	Kern, Albstadt
Mikrowelle	Compact Y50	Moulinex, Solingen
PCR-Gerät	Personal Cyclor 20	Biometra, Göttingen
	T1 Thermocycler 96	Biometra, Göttingen
Pipette	0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
	10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg
	100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	50 – 5000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Transferpipette 8	Brand, Wertheim
Schüttelwasserbad	Typ 1083	GFL, Burgwedel
Spannungsgerät	EPS 300	Pharmacia, Freiburg
	EPS 3501	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer	PM6	Zeiss, Oberkochen
UV-Transilluminator	Macro Vue UV20	Hoefler, San Francisco, USA
Vortex-Gerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

Wärmeschrank	T6060	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Universal 16R	Hettich, Tuttlingen

7.1.2. Hilfsmittel und Gefäße

Blutentnahmemonovette EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Blutentnahmemonovette NH ₄ -Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfcup 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Kunststoffglasreagenzröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
PCR-Reaktionsgefäße	Biometra, Göttingen
Polaroidfilm Typ 667	Polaroid, St. Albans, UK
Quarzglasküvette	Merck Eurolab, Bruchsal
Wachsfolie	American National Can, Chicago, USA
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg

7.1.3. Chemikalien

1 Kb DNA-Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
100 bp DNA-Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose NA	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Aqua ad iniectabilia	Delta Pharma, Pfullingen
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Betaine	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Pharmacia, Freiburg
BSA	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Deaza-dGTP	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Desoxynukleotidtriphosphate	Gibco BRL, Karlsruhe
DMSO	Sigma, Deisenhofen

EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
NE-Buffer 4	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PCR-Buffer	Gibco BRL, Karlsruhe
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
SDS	Sigma, Deisenhofen
Titriplex EDTA III	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton X 100	Sigma, Deisenhofen

7.1.4. Enzyme

DNA Taq Polymerase	Gibco BRL, Karlsruhe
<i>Eco</i> N I	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Nla</i> III	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Pronase	Roche, Mannheim

7.1.5. Puffer

Lysispuffer für eingefrorenes Blut	10 mM	Tris
	5 mM	MgCl ₂
	1 %	Triton X 100
	320 mM	Saccharose

Lysispuffer für frisches Blut	155 mM	Ammoniumchlorid
	10 mM	Kaliumhydrogencarbonat
	0,1 mM	EDTA
Kernlysispuffer	10 mM	TrisHCl, pH 8,0
	400 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
TE4-Puffer	10 mM	Tris
	0,1 mM	EDTA
10 x TBE-Puffer	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	25 mM	Titriplex EDTA III
Ladepuffer für Agarosegele	1,5 ml	0,25 M EDTA, pH 8,0
	2 ml	Glycerin
	0,4 ml	BPB 0,5%ig in Aqua

7.1.6. Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech in Ebersberg hergestellt. Die Sequenzen der Primer stammen von Angaben aus der Literatur.

DBH (Cubells et al., 1998):

DBH2-1s 5'-CCT GGA GCC CAG TGC TTG TC-3'

DBH2-1a 5'-ACG CCC TCC TGG GTA CTC GC-3'

DRD4 (Lichter et al., 1993):

D4-3 5'-GCG ACT ACG TGG TCT ACT CG-3'

D4-42 5'-AGG ACC CTC ATG GCC TTG-3'

COMT (Daniels et al., 1996):

COMT-1s 5'-ACT GTG GCT ACT CAG CTG TG-3'

COMT-1a 5'-CCT TTT TCC AGG TCT GAC AA-3'

7.2. Einzelergebnisse der Studienteilnehmer

Tabelle 20. Erhobene Daten für die alkoholabhängigen Patienten.

ID: Identifikationsnummer (fehlende Nummern: ausgeschlossene, nicht untersuchte Probanden); Geschl.: Geschlecht (m: männlich; f: weiblich); Alter: Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme; Status: Status bezüglich des Schweregrades der Entgiftung (D: Delirium tremens; K: Krampfanfall; DK: Delirium tremens und Krampfanfall; A: Alkoholabhängigkeit, leichte Entzugserscheinungen); Dauer: Dauer der Alkoholabhängigkeit (bei den Patienten mit DT: Anzahl der Jahre seit Beginn der Abhängigkeit bis zum ersten DT; bei Patienten ohne DT: Anzahl der Jahre seit Beginn der Abhängigkeit bis zur Blutentnahme); Menge: vor Aufnahme zur Entgiftung konsumierte Alkoholmenge in g Alkohol /die; Clomethiazol: Anzahl der benötigten Clomethiazol-Kapseln während der ersten 24 Stunden der Entgiftung; CIWA: erreichter Wert des CIWA-Tests; UB: unbekannt

ID	Geschl.	Alter	Status	Dauer	Menge	Clomethiazol	CIWA
1	m	61	D	12	800	18	25
2	m	45	K	17	900	20	11
3	m	40	DK	6	200	12	9
4	m	60	D	20	320	18	16
5	m	51	D	2	160	12	12
6	m	41	DK	2	135	8	3
7	m	43	DK	2	1600	12	13
8	m	30	A	1	800	4	3
9	m	41	A	4	135	0	3
10	m	41	A	20	280	0	0
11	m	50	A	31	200	6	3
12	m	47	K	26	160	6	10
13	f	55	DK	7	350	6	11
14	m	45	A	4	160	7	9
15	m	44	D	21	440	0	4

16	m	59	D	20	400	11	22
17	m	53	D	19	1200	12	14
18	m	32	D	6	500	10	22
19	m	42	D	2	100	12	24
20	m	46	D	26	400	14	34
21	f	42	D	2	152	16	18
22	m	39	K	11	450	12	10
23	m	46	K	3	160	14	24
24	m	45	A	6	140	0	6
25	f	45	K	8	60	8	6
26	m	39	K	7	104	8	2
27	m	56	D	14	400	2	UB
28	m	35	D	16	200	18	40
29	m	57	A	5	140	0	2
30	m	45	A	24	300	0	0
31	f	47	A	3	400	0	0
32	m	40	A	26	200	12	11
33	f	32	A	6	380	8	10
34	m	49	A	23	200	0	0
35	m	47	A	7	300	0	0
36	m	56	A	4	160	6	7
37	m	43	A	2	110	0	0
38	m	49	A	8	240	0	0
39	m	38	A	5	110	2	4
40	m	50	A	10	130	0	0
42	m	48	DK	25	120	14	22
43	f	39	K	20	400	7	4
44	m	43	D	9	280	18	29
45	m	62	DK	25	160	19	25
46	m	52	A	6	180	0	0
47	m	32	A	2	360	0	0
48	m	48	K	25	150	0	4
49	m	35	A	10	200	0	0
50	f	27	A	3	150	0	0
51	m	54	A	24	200	7	3
53	m	43	A	8	280	0	0
54	m	38	D	13	200	0	8
55	f	58	A	20	120	6	6
56	m	43	A	27	800	0	0
57	f	37	A	5	100	0	0
58	f	41	A	20	120	4	4
59	m	40	A	8	200	2	2
62	m	42	A	2	300	0	0
63	m	33	A	3	200	0	0
64	m	41	D	20	170	14	16

66	m	36	A	8	400	2	3
67	f	51	A	2	600	0	0
68	m	36	A	15	600	2	3
69	m	34	A	14	60	12	8
70	f	50	A	5	160	0	0
71	m	36	A	1	120	0	0
72	m	36	A	8	300	1	2
73	m	34	A	8	160	4	5
75	m	31	A	10	200	0	0
76	m	36	A	8	250	0	0
77	m	34	D	10	210	18	26
78	m	54	D	26	400	16	20
79	m	38	DK	19	500	12	UB
80	f	31	DK	2	200	12	UB
82	m	47	D	4	120	14	UB
83	f	61	D	20	480	11	UB
84	m	61	DK	20	120	14	UB
85	m	43	D	10	600	10	UB
86	f	28	D	1	160	10	UB
88	m	45	A	8	400	0	0
89	m	41	DK	14	350	24	UB
90	f	51	D	9	290	18	UB
91	m	49	DK	5	146	16	UB
92	m	49	DK	5	240	8	16
93	m	52	D	17	120	9	UB
94	m	62	D	14	230	5	UB
95	m	40	A	11	160	0	0
96	m	48	A	5	400	0	0
97	f	42	A	8	400	0	4
98	f	46	A	3	200	0	0
99	f	30	A	2	280	0	0
100	m	30	A	6	400	0	0
101	m	36	K	11	400	8	UB
103	m	60	D	6	80	16	20
104	f	36	A	6	190	0	0
105	m	48	A	19	340	0	0
106	m	34	A	14	200	0	0
107	f	63	D	6	120	9	6
108	m	57	DK	14	144	16	14
109	m	54	DK	12	150	15	20
110	m	46	K	19	300	16	UB
111	m	37	K	12	400	10	UB
112	m	43	DK	19	900	16	21
113	m	43	D	10	120	20	21
114	m	41	DK	7	400	14	UB

115	m	42	D	10	140	4	UB
116	m	31	D	6	200	10	UB
117	f	54	DK	21	160	8	UB
118	m	47	A	13	300	8	UB
119	m	38	A	12	120	0	0
120	f	38	A	6	120	0	0
121	m	36	A	6	130	0	0
122	m	50	A	7	120	0	0
123	m	31	A	7	120	0	0
124	f	39	A	10	800	0	0
125	f	61	A	9	120	0	0
126	f	50	A	2	240	0	0
127	m	41	D	19	120	4	UB
128	m	38	DK	4	240	10	UB
129	m	51	D	8	400	8	UB
130	m	30	D	1	520	UB	UB
131	m	38	DK	1	500	UB	UB
132	m	27	DK	10	260	UB	UB
133	m	35	DK	18	400	UB	UB
134	m	45	D	3,5	200	UB	UB
135	m	46	D	16	200	UB	UB
136	m	42	D	9	300	UB	UB
137	m	41	D	5	240	UB	UB
138	m	53	D	13	380	UB	UB
139	m	42	DK	1	320	UB	UB
140	m	47	D	4	120	UB	UB
141	m	46	D	9	240	16	18
142	m	42	DK	3	280	UB	UB
143	m	45	D	1	200	UB	UB
144	f	37	DK	10	140	UB	UB
145	m	58	D	5	160	UB	UB
146	m	59	DK	6	240	UB	UB
147	m	38	D	7	700	UB	UB
148	m	45	D	9	100	UB	UB
149	m	47	D	1	240	UB	UB
150	m	36	K	0	280	8	12
151	m	51	K	0	400	8	4
152	m	49	K	0	600	10	11
153	m	44	K	0	120	14	15
154	m	46	A	29	200	0	0
155	m	32	DK	2,5	300	20	25
156	m	38	A	10	300	0	0
157	m	37	A	4	200	0	0
158	m	38	A	8	240	0	0
159	m	48	A	21	180	0	0

160	m	35	A	2	340	0	0
161	m	58	A	25	120	0	0
162	m	34	A	5	160	0	0
163	m	53	A	10	160	0	0
164	f	28	A	7	360	0	0
165	m	33	A	11	510	0	0
166	f	42	A	6	160	0	0
167	m	52	K	12	200	UB	UB
168	f	33	A	6	270	0	0
169	f	37	A	5	200	0	0
170	m	43	D	27	250	0	0
171	m	45	D	14	800	UB	UB
172	m	36	K	0	400	UB	UB
173	m	43	DK	6	300	15	24
174	m	31	A	10	240	0	0
175	f	46	A	10	80	0	0
176	m	52	D	10	280	0	0
178	m	41	A	10	150	0	0
179	m	41	A	5	180	0	0
182	m	50	K	0	273	8	8
184	m	62	K	0	200	0	0
185	f	41	K	0	160	8	UB
186	m	43	D	25	200	8	32
187	m	40	K	0	110	8	0
188	m	45	A	10	216	0	0
189	m	43	K	0	400	0	0
190	m	50	K	0	250	14	15
191	m	56	A	12	400	0	0
192	m	42	A	10	160	10	0
195	f	48	A	11	21	0	0
196	m	21	K	0	380	2	0
197	m	44	K	0	310	8	22
198	m	38	A	1	280	0	0
199	m	47	A	1	96	0	0
202	m	50	D	4	200	8	17
203	m	41	D	4	380	UB	UB
204	m	40	D	1	500	UB	UB
205	m	37	DK	18	350	UB	UB
206	f	52	D	24	26	UB	UB
207	m	47	D	9	560	UB	UB
208	m	40	K	0	280	14	0
209	m	59	D	1,5	50	4	11
210	f	41	A	2	80	0	0
211	m	41	A	10	140	0	0
212	m	31	A	3	220	0	0

213	m	36	A	8	142	2	0
214	m	31	A	14	250	0	0
215	m	47	A	15	260	0	0
216	f	32	A	2,5	300	6	0
217	f	55	A	0	80	0	0
219	m	54	K	0	80	0	0
220	m	33	K	13	400	11	17
221	m	35	K	1	220	0	0
222	m	44	A	0	300	4	0
223	m	55	A	0	200	0	0
224	m	31	A	0	220	0	0
225	f	47	A	0	80	0	0
226	m	45	A	0	200	0	0

Tabelle 21. Ergebnisse der Genotypisierung und der Bestimmung der D β H-Plasmaaktivität für die alkoholabhängigen Patienten.

ID: Identifikationsnummer (fehlende Nummern: ausgeschlossene, nicht untersuchte Probanden); Geschl.: Geschlecht (m: männlich; f: weiblich); Alter: Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme; Status: Status bezüglich des Schweregrades der Entgiftung (D: Delirium tremens; K: Krampfanfall; DK: Delirium tremens und Krampfanfall; A: Alkoholabhängigkeit, leichte Entzugserscheinungen); D β H: D β H-Plasmaaktivität in ng/ml/h gemessen nach 22 Tagen Alkoholabstinenz; DBH*444g/a: Genotyp bezüglich des DBH*444g/a-Polymorphismus (G: Guanidin; A: Adenin); COMT-Val/Met: Genotyp bezüglich des COMT-Val/Met-Polymorphismus (L: Low-Activity; H: High-Activity); DRD4-VNTR Allel 1/2: Anzahl der Wiederholungen der 48 bp-Sequenz des DRD4-VNTR-Polymorphismus; UB: unbekannt

ID	Geschl.	Alter	Status	D β H	DBH*444g/a	COMT-Val/Met	DRD4-VNTR Allel 1	DRD4-VNTR Allel 2
1	m	61	D	UB	A/G	L/H	4	4
2	m	45	K	8	A/G	L/L	2	7
3	m	40	DK	UB	G/G	L/H	4	7
4	m	60	D	4,71	A/G	L/H	4	7
5	m	51	D	10,1	A/G	H/H	7	7

6	m	41	DK	UB	A/G	L/H	4	7
7	m	43	DK	28,2	G/G	L/L	4	4
8	m	30	A	9,14	A/G	L/L	2	4
9	m	41	A	4,68	A/G	L/L	3	4
10	m	41	A	27,4	A/G	L/L	4	7
11	m	50	A	7,97	A/G	H/H	4	7
12	m	47	K	19,8	A/A	L/L	3	4
13	f	55	DK	23	G/G	L/L	4	7
14	m	45	A	50,8	A/G	L/L	4	4
15	m	44	D	17,7	A/A	H/H	4	7
16	m	59	D	39,8	A/G	L/H	4	4
17	m	53	D	71,7	A/A	H/H	2	4
18	m	32	D	15,6	A/G	L/L	3	4
19	m	42	D	UB	A/A	L/L	7	7
20	m	46	D	UB	A/G	H/H	4	4
21	f	42	D	41,3	A/G	L/H	7	7
22	m	39	K	23,2	A/G	H/H	4	5
23	m	46	K	UB	A/G	L/H	4	4
24	m	45	A	UB	A/A	L/H	3	4
25	f	45	K	34,5	A/A	L/H	2	4
26	m	39	K	59,5	A/G	L/H	4	7
27	m	56	D	21,2	A/A	L/H	2	4
28	m	35	D	UB	A/G	H/H	4	7
29	m	57	A	UB	A/A	L/H	4	4
30	m	45	A	UB	A/G	L/H	4	4
31	f	47	A	34,5	A/G	L/H	4	4
32	m	40	A	24,3	A/G	L/H	4	4
33	f	32	A	UB	A/A	L/H	4	4
34	m	49	A	26,9	A/G	L/H	2	7
35	m	47	A	29,2	G/G	L/H	4	4
36	m	56	A	25,5	G/G	L/H	4	4
37	m	43	A	13,1	A/G	L/L	4	4
38	m	49	A	51,3	G/G	L/H	7	7
39	m	38	A	25,4	A/A	L/H	4	4
40	m	50	A	17,8	A/G	L/H	3	4
42	m	48	DK	31,3	A/G	L/L	4	7
43	f	39	K	28,7	A/A	L/L	4	4
44	m	43	D	10,3	A/A	H/H	2	4
45	m	62	DK	25,1	A/A	L/L	4	4
46	m	52	A	17,1	A/A	L/H	4	4
47	m	32	A	16,7	A/G	L/L	4	7
48	m	48	K	31,3	G/G	L/H	4	4
49	m	35	A	30,4	A/G	H/H	4	4
50	f	27	A	3,78	A/G	H/H	4	4
51	m	54	A	31,9	A/G	L/L	2	4

53	m	43	A	26,6	A/G	H/H	4	4
54	m	38	D	11,4	A/A	L/H	3	4
55	f	58	A	32,8	A/G	L/L	4	7
56	m	43	A	20,8	G/G	L/H	4	4
57	f	37	A	15,9	A/G	L/L	4	4
58	f	41	A	20,2	A/G	L/H	4	4
59	m	40	A	6,25	A/A	L/L	4	7
62	m	42	A	58,5	G/G	L/L	4	7
63	m	33	A	25,8	A/G	L/H	4	4
64	m	41	D	20,7	A/G	L/H	3	4
66	m	36	A	5,79	A/G	H/H	4	4
67	f	51	A	14,4	A/A	L/H	7	7
68	m	36	A	47,8	A/G	L/H	6	7
69	m	34	A	17,2	A/G	L/L	4	4
70	f	50	A	22	A/G	L/H	4	4
71	m	36	A	56,3	A/G	L/L	4	7
72	m	36	A	6,4	A/A	L/L	4	7
73	m	34	A	57,4	G/G	H/H	4	4
75	m	31	A	50,8	G/G	L/H	2	7
76	m	36	A	5,68	A/G	L/H	4	4
77	m	34	D	31	A/G	L/H	4	4
78	m	54	D	2,8	A/G	L/H	4	4
79	m	38	DK	UB	A/G	L/H	3	3
80	f	31	DK	43,6	A/G	L/H	4	4
82	m	47	D	21,5	G/G	L/H	2	4
83	f	61	D	40,4	A/G	L/H	3	4
84	m	61	DK	38,5	A/G	H/H	4	4
85	m	43	D	64,5	G/G	H/H	4	4
86	f	28	D	23,2	A/G	L/H	4	4
88	m	45	A	15,3	A/G	H/H	4	7
89	m	41	DK	20,6	G/G	H/H	4	4
90	f	51	D	23,8	A/G	H/H	4	7
91	m	49	DK	36,7	A/G	L/H	4	4
92	m	49	DK	23,1	A/G	L/H	2	4
93	m	52	D	23,3	A/G	H/H	4	4
94	m	62	D	63,8	A/G	H/H	4	4
95	m	40	A	23,6	A/A	L/L	4	4
96	m	48	A	15,3	A/G	L/H	4	4
97	f	42	A	8,88	A/A	L/H	4	7
98	f	46	A	52,4	G/G	L/H	4	4
99	f	30	A	73,4	A/G	H/H	4	7
100	m	30	A	29,1	G/G	L/L	4	4
101	m	36	K	38,9	A/G	L/H	4	4
103	m	60	D	66,3	G/G	L/H	2	7
104	f	36	A	57,4	A/G	L/H	3	3

105	m	48	A	24	A/G	L/H	3	4
106	m	34	A	45,2	A/G	L/H	4	4
107	f	63	D	UB	G/G	L/L	3	4
108	m	57	DK	43,3	A/G	L/H	4	7
109	m	54	DK	2,76	A/A	H/H	4	4
110	m	46	K	UB	A/G	L/L	4	4
111	m	37	K	19,1	A/A	L/H	4	4
112	m	43	DK	76,8	G/G	L/L	4	4
113	m	43	D	UB	G/G	L/L	4	5
114	m	41	DK	UB	A/A	L/H	4	4
115	m	42	D	2,64	A/G	L/H	3	4
116	m	31	D	UB	A/A	L/H	4	4
117	f	54	DK	UB	A/A	H/H	4	4
118	m	47	A	7,84	A/A	H/H	2	4
119	m	38	A	20	A/A	L/H	4	7
120	f	38	A	19,2	A/A	L/H	3	4
121	m	36	A	56,1	G/G	H/H	4	4
122	m	50	A	29,2	A/A	L/H	4	4
123	m	31	A	10,8	A/G	H/H	4	7
124	f	39	A	11	A/A	L/L	2	4
125	f	61	A	17,7	A/G	H/H	4	7
126	f	50	A	31,9	A/A	L/H	4	4
127	m	41	D	39,4	G/G	H/H	2	4
128	m	38	DK	UB	G/G	L/L	2	7
129	m	51	D	UB	A/G	L/H	4	4
130	m	30	D	33,2	A/G	L/H	4	7
131	m	38	DK	18,2	G/G	L/H	4	4
132	m	27	DK	34,8	A/G	L/H	4	7
133	m	35	DK	50,5	A/G	H/H	2	4
134	m	45	D	27,4	A/G	L/H	4	4
135	m	46	D	29,5	A/A	L/H	4	4
136	m	42	D	26,3	A/G	L/H	2	2
137	m	41	D	30,1	G/G	L/L	4	4
138	m	53	D	8,75	A/A	H/H	7	7
139	m	42	DK	UB	A/G	L/H	7	7
140	m	47	D	16,5	A/G	L/L	2	7
141	m	46	D	32,1	A/G	H/H	4	4
142	m	42	DK	10	A/A	L/L	4	4
143	m	45	D	42,7	A/G	L/H	4	7
144	f	37	DK	30,7	G/G	L/L	4	4
145	m	58	D	16	A/G	L/H	4	4
146	m	59	DK	19,1	A/A	L/H	4	8
147	m	38	D	48,3	A/A	L/L	2	4
148	m	45	D	29,4	A/A	H/H	4	4
149	m	47	D	12,4	A/A	L/H	4	4

150	m	36	K	UB	A/A	L/L	4	4
151	m	51	K	UB	A/G	L/L	4	4
152	m	49	K	UB	A/G	L/H	3	7
153	m	44	K	UB	A/A	H/H	4	4
154	m	46	A	32,8	A/A	H/H	4	7
155	m	32	DK	5,12	A/G	L/H	3	4
156	m	38	A	8,29	A/G	H/H	4	4
157	m	37	A	34,4	A/G	H/H	4	4
158	m	38	A	19,6	A/G	H/H	4	4
159	m	48	A	59	G/G	L/H	4	4
160	m	35	A	32	G/G	L/H	7	8
161	m	58	A	13,7	A/A	L/H	4	4
162	m	34	A	45	A/G	L/L	3	4
163	m	53	A	25,5	A/G	L/H	4	7
164	f	28	A	3,32	A/G	L/H	7	10
165	m	33	A	40	A/G	L/L	4	4
166	f	42	A	27,2	A/G	L/L	6	7
167	m	52	K	29,7	A/G	L/H	2	7
168	f	33	A	18,7	A/A	L/H	4	4
169	f	37	A	22	A/G	L/H	4	4
170	m	43	D	9	A/G	H/H	4	4
171	m	45	D	31,3	G/G	L/L	4	4
172	m	36	K	32	A/G	L/H	7	7
173	m	43	DK	UB	A/G	L/H	4	4
174	m	31	A	UB	A/G	L/H	3	4
175	f	46	A	UB	G/G	L/L	4	4
176	m	52	D	UB	A/A	L/H	4	4
178	m	41	A	UB	A/A	L/H	4	7
179	m	41	A	UB	A/G	L/H	4	4
182	m	50	K	UB	A/G	L/H	4	4
184	m	62	K	UB	G/G	L/L	4	7
185	f	41	K	UB	A/G	H/H	4	4
186	m	43	D	UB	A/A	L/H	4	7
187	m	40	K	UB	A/G	L/H	4	4
188	m	45	A	UB	G/G	L/H	4	7
189	m	43	K	UB	A/G	L/L	4	4
190	m	50	K	UB	A/G	L/L	4	4
191	m	56	A	UB	A/G	L/H	4	4
192	m	42	A	UB	G/G	L/L	4	4
195	f	48	A	UB	A/G	L/L	4	7
196	m	21	K	UB	A/G	L/H	4	4
197	m	44	K	UB	G/G	H/H	4	7
198	m	38	A	UB	A/A	L/H	4	4
199	m	47	A	UB	A/G	L/H	4	4
202	m	50	D	UB	A/G	L/L	4	7

203	m	41	D	UB	A/G	L/H	4	4
204	m	40	D	UB	A/G	H/H	4	4
205	m	37	DK	UB	A/A	L/L	4	4
206	f	52	D	UB	A/G	H/H	2	4
207	m	47	D	UB	G/G	L/H	4	7
208	m	40	K	UB	A/A	L/H	4	7
209	m	59	D	UB	A/G	L/H	4	4
210	f	41	A	UB	A/A	L/H	4	7
211	m	41	A	UB	G/G	L/H	4	4
212	m	31	A	UB	A/G	L/H	4	7
213	m	36	A	UB	A/G	H/H	4	4
214	m	31	A	UB	A/G	H/H	7	7
215	m	47	A	UB	A/G	H/H	3	7
216	f	32	A	UB	A/A	H/H	3	4
217	f	55	A	UB	G/G	L/H	4	7
219	m	54	K	UB	A/A	L/H	4	4
220	m	33	K	UB	A/G	L/L	4	7
221	m	35	K	UB	G/G	L/L	2	4
222	m	44	A	UB	A/A	L/H	2	7
223	m	55	A	UB	A/G	L/H	4	7
224	m	31	A	UB	G/G	L/H	3	4
225	f	47	A	UB	A/A	L/L	4	4
226	m	45	A	UB	A/G	H/H	4	7

Tabelle 22. Ergebnisse der Genotypisierung und der Bestimmung der D β H-Plasmaaktivität für die gesunden Kontrollpersonen.

ID: Identifikationsnummer (fehlende Nummern: ausgeschlossene, nicht untersuchte Probanden); Geschl.: Geschlecht (m: männlich; f: weiblich); Alter: Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme; Status: Status in Bezug auf das Vorliegen der Alkoholabhängigkeit (N: gesund, keine Alkoholabhängigkeit); D β H: D β H-Plasmaaktivität in ng/ml/h; DBH*444g/a: Genotyp bezüglich des DBH*444g/a-Polymorphismus (G: Guanidin; A: Adenin); COMT-Val/Met: Genotyp bezüglich des COMT-Val/Met-Polymorphismus (L: Low-Activity; H: High-Activity); DRD4-VNTR Allel 1/2: Anzahl der Wiederholungen der 48 bp-Sequenz des DRD4-VNTR-Polymorphismus; UB: unbekannt

ID	Geschl.	Alter	Status	D β H	DBH*444g/a	COMT-Val/Met	DRD4-VNTR Allel 1	DRD4-VNTR Allel 2
801	m	55	N	39,3	A/G	L/H	4	4
802	f	41	N	23,8	G/G	L/H	4	7
803	f	55	N	53	A/G	L/H	2	7
804	m	29	N	54,8	G/G	L/L	4	4
805	m	39	N	52,9	A/G	L/H	4	7
806	f	35	N	59,4	A/A	L/L	4	7
807	m	34	N	49,7	A/G	L/H	2	7
808	f	29	N	29	A/G	L/L	4	4
809	m	38	N	15,8	A/A	H/H	4	4
810	f	34	N	84,7	A/G	L/L	4	4
811	m	40	N	15,4	A/G	L/L	3	4
812	m	28	N	1,8	A/A	L/H	4	4
813	f	31	N	12,5	A/G	L/L	4	4
814	m	30	N	28,5	A/G	H/H	4	4
815	f	26	N	22,3	A/G	L/L	4	7
816	f	51	N	9,43	A/A	L/L	2	7
817	f	46	N	13,6	A/G	L/L	4	7
818	f	35	N	53,7	G/G	H/H	4	4
819	f	30	N	50,1	A/G	L/L	4	4
820	m	38	N	35,2	A/G	L/H	4	4
821	m	30	N	43,1	A/G	H/H	4	4
822	m	31	N	1,66	A/A	L/L	4	4
823	f	32	N	25,6	A/G	H/H	2	4
824	m	25	N	50,6	A/G	L/H	4	7
825	m	29	N	52,8	G/G	L/H	2	4

826	m	30	N	41,5	A/G	L/L	4	7
827	f	30	N	42,8	A/A	H/H	4	5
828	m	37	N	62,4	G/G	H/H	4	4
829	m	35	N	41,7	A/G	L/L	2	4
830	m	39	N	41,3	A/G	L/L	7	7
831	f	38	N	84,1	G/G	H/H	2	5
832	m	40	N	33,3	A/A	L/H	4	7
833	m	26	N	23	G/G	L/L	2	4
834	m	28	N	24,4	G/G	L/L	4	4
835	m	26	N	8,92	A/A	L/L	4	10
836	f	38	N	62,9	G/G	L/H	4	7
837	f	40	N	24,3	G/G	L/L	2	7
838	m	27	N	45	A/G	L/H	4	4
839	m	28	N	23	A/G	L/H	4	4
840	f	25	N	22,6	A/G	L/H	4	7
841	f	24	N	26,4	A/G	L/H	2	4
842	f	27	N	30,4	A/A	L/H	4	7
843	f	24	N	43,4	G/G	L/L	4	7
844	m	32	N	33,3	G/G	H/H	4	4
845	f	26	N	43,7	A/G	H/H	4	7
846	m	36	N	30,1	A/G	H/H	4	7
847	m	30	N	12,9	A/A	L/L	2	4
848	f	25	N	52,6	A/G	L/L	4	4
849	m	59	N	43,7	G/G	H/H	2	4
852	f	37	N	48,3	A/G	H/H	4	4
853	m	57	N	27,4	G/G	L/L	7	8
854	m	46	N	4,19	A/A	L/H	4	4
855	m	37	N	30,7	G/G	L/H	4	4
856	f	49	N	UB	G/G	L/H	4	7
857	m	30	N	UB	G/G	L/L	2	7
858	f	54	N	UB	G/G	L/H	4	8
859	m	56	N	UB	G/G	L/L	2	4
860	m	38	N	UB	A/G	L/H	4	4
861	m	44	N	UB	A/A	L/L	4	7
863	m	29	N	UB	A/G	L/L	3	4
864	f	28	N	UB	A/G	L/H	4	7
865	m	24	N	UB	G/G	L/H	2	5
866	m	25	N	UB	A/G	L/H	4	4
867	m	26	N	UB	G/G	L/H	4	7
868	m	26	N	UB	A/A	L/H	3	4
870	m	60	N	UB	A/A	L/H	2	7
871	m	40	N	UB	G/G	L/H	4	4
872	m	29	N	UB	A/A	L/H	7	7
873	f	26	N	UB	A/A	L/H	4	4
874	m	30	N	UB	A/A	H/H	4	7

875	m	39	N	UB	G/G	H/H	4	7
876	m	39	N	UB	G/G	H/H	4	4
877	f	27	N	UB	G/G	L/L	3	4
878	f	51	N	UB	A/G	L/H	2	2
879	m	49	N	UB	A/G	L/H	4	4
880	m	52	N	UB	A/G	H/H	4	4
881	f	57	N	UB	G/G	H/H	4	4
884	m	30	N	UB	A/G	H/H	4	4
885	m	53	N	UB	A/G	H/H	4	4
888	m	31	N	UB	A/G	L/H	3	4
889	f	50	N	UB	A/A	L/H	4	4
890	m	49	N	UB	A/G	L/H	4	4
891	m	38	N	UB	G/G	L/H	2	7
892	m	28	N	UB	A/G	L/L	4	4
893	m	36	N	UB	A/G	L/L	7	7
894	m	38	N	UB	A/G	H/H	4	4
895	m	39	N	UB	A/G	L/H	2	4
896	f	54	N	UB	A/G	L/L	4	4
897	m	57	N	UB	G/G	L/H	2	7
898	m	62	N	UB	G/G	H/H	4	4
899	f	54	N	UB	G/G	H/H	4	4
900	m	41	N	UB	A/G	L/H	2	7
901	m	34	N	UB	G/G	H/H	3	4
902	m	26	N	UB	G/G	L/L	4	4
903	m	25	N	UB	A/G	L/L	4	4
904	m	26	N	UB	A/G	L/H	4	4
905	f	28	N	UB	G/G	L/H	4	4
906	m	49	N	UB	G/G	H/H	3	4
907	f	41	N	UB	G/G	H/H	3	4
908	m	48	N	UB	G/G	L/H	4	4
909	m	59	N	UB	A/A	L/H	4	4
910	f	54	N	UB	A/A	L/L	4	4

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M.D. Köhnke, der mir nicht nur dieses interessante Thema überlassen hat, sondern durch seinen wertvollen Rat und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Priv.-Doz. Dr. I. Gaertner, Herrn Professor Dr. H.J. Gaertner und Herrn Professor Dr. G. Buchkremer als Klinikdirektor danke ich herzlich für ihre stetige Unterstützung.

Sehr dankbar bin ich auch Herrn Dr. W. Kolb für seine Mithilfe bei der Rekrutierung der Probanden in der Fachklinik Wilhelmheim in Oppenweiler.

Herrn Dr. R. Vonthein danke ich für die freundliche Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ferner möchte ich allen Probanden herzlich danken, die bereitwillig an dieser Studie teilgenommen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ulrich Clemens Lutz
Geburtsdatum: 23.03.1978
Geburtsort: Stuttgart-Bad Cannstatt
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1984 – 1988 Grundschole Grunbach
1988 – 1997 Remstalgymnasium Weinstadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1997 – 1998 Zivildienst in den Neckartalwerkstätten des
Caritasverbandes Stuttgart
Seit 1998 Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
29.08.2000 Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001 Erste ärztliche Prüfung
11.09.2003 Zweite ärztliche Prüfung
23.11.2004 Dritte ärztliche Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

Seit 01.01.2005 wissenschaftlicher Angestellter in der
Universitätsklinik für Psychiatrie und
Psychotherapie in Tübingen