Aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen
Abteilung Allgemeine Psychiatrie und Psychotherapie mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Buchkremer

Kandidatengene für Alkoholabhängigkeit und ihr Zusammenhang mit zerebralen Krampfanfällen im Rahmen der Alkoholentgiftung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sandra Maurer
geb. Schick
aus
Stuttgart

2005

Dekan:	Professor Dr. C. D. Clausen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. J. Gaertner
2. Berichterstatter:	Professor Dr. O. Rieß

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	**Einleitung**	1
1.1.	Kurzbeschreibung des Krankheitsbildes und der Genetik der Alkoholabhängigkeit	1
1.2.	Typologie der Alkoholkranken	2
1.3.	Das Alkoholentzugssyndrom	3
1.4.	Pathogenese des Alkoholentzugssyndroms	3
1.5.	Dopamin - und GABA - assoziierte Gene als Kandidatengene für den Alkoholentzug	6
1.5.1.	*DAT1*	6
1.5.1.1.	*Lokalisation des DAT1*	8
1.5.1.2.	*Bekannte Polymorphismen des DAT1*	8
1.5.2.	*GABBR1*	8
1.5.2.1.	*Lokalisation des GABBR1*	9
1.5.2.2.	*Bekannte Polymorphismen des GABBR1*	9
1.6.	Fragestellung	10
2.	**Patientenkollektiv und Methodik**	11
2.1.	Rekrutierung der Studienteilnehmer	11
2.2.	Labormethoden	13
2.2.1.	*DNA-Isolierung*	13
2.2.2.	*DNA-Analyse/ PCR*	15
2.2.3.	*Elektrophorese*	19
2.3.	Statistische Methoden	19
2.3.1.	*Statistische Einteilung der Gruppen*	20
2.3.2.	*Assoziationsstudie in Form des Vierfeldertests*	21
2.3.3.	*t-Test*	22
3.	**Ergebnisse**	23
3.1.	Testergebnisse der Studienteilnehmer	23

3.2. Ergebnisse für DAT1 23
3.2.1. Elektrophoretische Banden des DAT1 23
3.2.2. Statistische Ergebnisse beim Vergleich des DAT1-Allels A9 mit den übrigen Allelen bei Patienten mit Krampfanfall 24
3.2.3. Statistische Ergebnisse für das DAT1-Allel A9 bei Patienten mit der Diagnose Alkoholabhängigkeit 25
3.2.4. Ergebnisse beim Vergleich der DAT1-Allelverteilung mit der täglichen Trinkmenge 26
3.3. Ergebnisse für den Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1-Gens (rs29230) 27
3.3.1. Elektrophoretische Ergebnisse für den Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1 (rs29230) 27
3.3.2. Statistische Ergebnisse beim Vergleich von Allel2 im Exon 11 des GABBR1 (rs29230) mit dem Allel1 bei Patienten mit Krampfanfall 29
3.3.3. Statistische Ergebnisse beim Vergleich von Allel2 im Exon 11 des GABBR1 (rs29230) mit dem Allel1 bei Alkoholkranken und gesunden Kontrollpersonen 30
3.4. Ergebnisse für den Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1-Gens (rs1805057) 31
3.4.1. Elektrophoretische Ergebnisse für den Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057) 31
3.4.2. Statistische Ergebnisse des Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057) 32
3.5. Trinkmengen und Ergebnis 32

4. Diskussion 34
4.1. Interpretation der Ergebnisse 34
4.1.1. Molekulare Grundlagen 34
4.1.2. DAT1 35
4.1.2.1. Physiologische und pathologische Bedeutung des DAT1 35
4.1.2.2. Frühere Untersuchungen und Ergebnisse dieser Studie 36

4.1.3. GABBR1 41
4.1.3.1. Physiologische Bedeutung des Neurotransmitters GABA 41
4.1.3.2. Ergebnisse dieser Untersuchung diskutiert im Zusammenhang mit der Literatur 43
4.1.4. Auswirkungen der Trinkmenge auf die Entzugsschwere 45

5. Zusammenfassung 46

6. Literaturverzeichnis 48

7. Anhang 55
7.1. Ergebnisse der Gelelektrophorese 55
7.2 Verteilung der Allele 68
7.2.1. DAT1-Allele 68
7.2.2. Allele des Polymorphismus des GABBR1 im Bereich von Exon 11 (rs29230) 69
7.3. Material 69
7.3.1. Geräte 69
7.3.2. Zubehör und Gefäße 70
7.3.3. Chemikalien 70
7.3.4. Enzyme 71
7.3.5. Primer 71

8. Danksagung 72

9. Lebenslauf 73

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Acetaldehyddehydrogenase
AUDIT	Alcohol Use Disorder Identification Test
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CIWA-Ar	Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol
DAT1	Dopamintransporter-Gen
DNA	Desoxyribonukleidacid
dNTP	Desoxyribonuklosidtriphosphat
DSM	Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen
DT	Delirium tremens
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobutyric acid
GABBR1	$GABA_B$-Rezeptor-Gen
$GABA_BR1a$	Subunit 1 des GABBR1
$GABA_BR2b$	Subunit 2 des GABBR2
g/d	Gramm pro Tag
Geschl	Geschlecht
GEPR	Genetically Epilepsy-Prone Rat
h	Stunden
ICD	International Classification of Diseases
ID	Identifikationsnummer
IGE	Idiopathische Generalisierte Epilepsie
KA	Krampfanfall

kb	1000 Basenpaare
km	Kilometer
Kontr	Kontrollgruppe
l	Liter
M	Mol/l
m	männlich
min	Minuten
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	rounds per minute
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
sec	Sekunden
SCID	Structured Clinical Interview for DSM IV
SPECT	Single Photon Emission Computer Tomographie
T	Thymin
TDT	Transmissions-Disequilibrium-Test
U	Units
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
w	weiblich

1. Einleitung

„Das ist ja gerade der Fluch des Alkohols, dass er nicht nur den unglücklich macht, der ihn übermäßig genießt, sondern dass die Sünden der Väter an den Kindern heimgesucht werden, die, wie die Statistik lehrt, zu Epilepsie, Idiotie, Hysterie und allerhand anderen Geisteskrankheiten neigen.“
*A*us: Der Weg zur Gesundheit 1925

1.1. Kurzbeschreibung des Krankheitsbildes und der Genetik der Alkoholabhängigkeit

Zur Erleichterung der Abgrenzung der Alkoholabhängigkeit von noch normalem Trinkverhalten, oder schädlichem Gebrauch von Alkohol, wurden die Dimensionen Trinkmuster, psychische Abhängigkeit, soziale und gesundheitliche Folgen des Alkoholkonsums und die Entzugssymptomatik bei Ausbleiben des Alkoholkonsums postuliert (Feuerlein 1997). Sie finden sich auch in den diagnostischen Leitlinien der Weltgesundheitsorganisation (ICD-10) und dem Diagnostischen und Statistischen Manual Psychischer Störungen (DSM IV) wieder.

Eine familiäre Häufung der Alkoholkrankheit wurde in vielen Untersuchungen bestätigt. Ein starker genetischer Einfluss ließ sich in Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien belegen:
Aus Zwillingsstudien über Alkoholabhängigkeit ging hervor, dass bei einem hohen Anteil von Zwillingspaaren beide an der Alkoholkrankheit litten. Die Konkordanzraten lagen zwischen 26 % (Hrubec und Omenn 1981) und 59 % (Pickens et al. 1991) bei eineiigen Zwillingen. Eine Adoptionsstudie deutet in dieselbe Richtung: 50 % der adoptierten Söhne, deren biologische Eltern alkoholkrank waren, wurden selbst wieder alkoholabhängig, aber nur 7 % von den Adoptierten, die von Nichtalkoholkranken abstammten. (Cloninger et al. 1981, Cadoret et al. 1980).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Verwandte ersten Grades von Alkoholabhängigen einem siebenfach erhöhten Risiko ausgesetzt sind, selbst alkoholkrank zu werden (Merikangas 1990).
Der Erbgang gestaltet sich multifaktoriell und polygen, das heißt, dass nicht ein einzelnes Gen für die Vererbung der Prädisposition der Alkoholabhängigkeit verantwortlich zu sein scheint. Nicht jeder potentielle Genträger wird eine Suchterkrankung entwickeln, da von unterschiedlich ausgeprägter Penetranz ausgegangen werden kann. Eine familiäre Häufung von Alkoholismus ist nicht gleichzusetzen mit hereditärer Belastung, da neben den individuellen genetischen Veranlagungen, den physiologischen und psychologischen Faktoren des Individuums, bei der Suchtentwicklung auch die Wirkung der Droge sowie das soziale Umfeld eine entscheidende Rolle spielen (Übersicht bei Feuerlein 1969).

1.2. Typologie der Alkoholkranken

Die Alkoholabhängigkeit stellt eine chronische Erkrankung dar. Es existieren verschiedene Einteilungen, um die Formen der Alkoholabhängigkeit zu klassifizieren.
Eine dieser Einteilungen ist die nach **Cloninger** (1987, Cloninger et al. 1996). Gestützt auf beobachtbare Persönlichkeitsausprägungen und Adoptionsstudien hat er zwei Formen der Alkoholkrankheit postuliert, die sich unter anderem deutlich im Erkrankungsalter unterscheiden:

Der *Typ I* manifestiert sich erst in späteren Lebensjahren nach einigen Jahren „starken Trinkens“. Hauptziel des Trinkens ist die Angstminderung. Psychische Probleme, wie z.B. Schuldgefühle, stehen mehr im Vordergrund als genetische oder umweltbedingte Prädispositionen.

Dem *Typ II* sind meistens Männer zugeordnet, deren Väter bereits Alkoholiker waren. Häufig findet man bei ihnen antisoziales und kriminelles Verhalten. Die Alkoholabhängigkeit beginnt häufig bereits in der Adoleszenz oder vor dem 25.

Lebensjahr. Bei diesem Typ wird eine Vererbung der Veranlagung zur Alkoholkrankheit diskutiert. Der Umwelteinfluss ist schwach.

1.3. Das Alkoholentzugssyndrom

Durch Reduktion oder Unterbrechung der täglich getrunkenen Alkoholmenge kann es zu einem Alkoholentzugssyndrom kommen, welches ein typisches Kennzeichen der körperlichen Abhängigkeit ist. Es tritt in Abhängigkeit vom Blutalkoholspiegel wenige Stunden nach der Unterbrechung der Alkoholzufuhr auf. Das klinische Bild ist charakterisiert durch eine Vielzahl von Symptomen aus verschiedenen Gebieten der klinischen Medizin (Feuerlein 1972, Soyka 1995):

Bei leichteren Erscheinungen kommt es zu **vegetativen Symptomen** wie Magen-Darm-Störungen, Kreislaufstörungen wie Hypertonie und Tachykardie, Schwitzen, Tremor, Mydriasis, Gesichtsrötung und evtl. Fieber. Auch leichte psychopathologische Auffälligkeiten wie Schlaflosigkeit, Angst, Euphorie und psychomotorische Unruhe können auftreten.

Bei schwereren Entzugserscheinungen können vereinzelt **zerebrale Krampfanfälle** auftreten. Es existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben über die Häufigkeit, einige Autoren sprechen von einem Entzugskrampfanfall bei bis zu 35% der Entzüge (Wetterling und Veltrup 1997).

Eine besonders schwere Form des Entzugs ist ein **Delirium tremens**, welches bei etwa 5 % der Patienten im Alkoholentzug auftritt. Dabei treten zusätzlich zu den anderen Symptomen Halluzinationen, Bewusstseinsstörungen und Desorientiertheit auf.

1.4. Pathogenese des Alkoholentzugssyndroms

Für das Verständnis des Alkoholentzugssyndroms ist zunächst das Verständnis des biphasischen Effekts von Alkohol von Bedeutung: Während unter Alkoholeinfluss Stoffwechselvorgänge im ZNS eher gehemmt sind, kommt es

beim absoluten oder relativen Alkoholentzug zu einer Phase vermehrter Erregbarkeit .
Auf neurochemischer Ebene kommt es beim Alkoholentzugssyndrom zu einer verminderten Aktivität inhibitorischer Neurotransmitter, in erster Linie von Gamma-Aminobuttersäure (GABA), sowie zu einer vermehrten Funktion exzitatorischer Neurotransmitter, zu denen unter anderem Dopamin gezählt wird (Übersicht bei Soyka 1995).
Die inhibitorischen GABAergen Rezeptoren scheinen eine Rolle bei der Entstehung der Entzugskrämpfe zu spielen, da es unter chronischer Gabe von Ethanol zu einer Hyperpolarisation und gleichzeitig zu einer Abnahme der Zahl der GABAergen Rezeptoren kommt. Unter Alkoholentzug fördert diese Konstellation durch den Wegfall der Ethanolinhibierung die Auslösung von Entzugskrämpfen (Metha und Ticku 1988).
Weitere Befunde deuten auch auf einen Einfluss von Dopamin auf Wahnvorstellungen und Halluzinationen während des Entzuges hin (Heinz et al. 1996).

Die Veränderungen durch Alkohol sollen hauptsächlich die tieferen Regionen des Gehirns, wie z.B. den Hirnstamm und die Corpora mamillaria, und weniger die Areale der Hirnrinde betreffen.
Wesentliche Faktoren, welche die Mehrheit der Veränderungen im Gehirn bedingen, sind die tägliche Alkoholaufnahme und die Dauer der Alkoholabhängigkeit (Brailowsky und Garcia 1999).
Für den Verlauf der Alkoholkrankheit, die Entwicklung von Alkoholtoleranz sowie das Auftreten und die Art von Entzugssymptomen wird eine genetische Disposition diskutiert (Crabbe et al. 1999). Eine direkte Vererbung des „Alkoholismus“ als einheitliches Merkmal ist allerdings nicht wahrscheinlich. Als **Kandidatengene für Alkoholabhängigkeit und Alkoholentzug** gelten Gene für Transporter, Rezeptoren und metabolisierende Enzyme von Transmittern, die mit der Verarbeitung von Alkoholeffekten in Zusammenhang stehen. Es werden auch die Gene dazugezählt, die sekundär, z.B. über die „second-messenger“-Ebene, Einfluss ausüben. Diese Kandidatengene steuern die

Metabolisierung von Alkohol oder vermitteln zentrale Alkoholwirkungen im Gehirn.

Bereits beim Abbau des Alkohols durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd und der weiteren Metabolisierung durch die Acetaldehyddehydrogenase (ALHD) können genetische Polymorphismen eine Verzögerung bzw. Beschleunigung im Alkoholstoffwechsel bewirken (Crabb et al. 1989). Bei Menschen mit einer genetisch bedingten Verlangsamung des Alkoholabbaus über die ALHD steigt der toxische Metabolit Acetaldehyd an und verursacht subjektiv unangenehme Wirkungen, welche die Betroffenen vor einem exzessiven Alkoholkonsum und der Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit bewahren können. Die entsprechenden Genotypen finden sich allerdings fast ausschließlich bei asiatischen Menschen (Thomasson et al. 1991).

Gene, die mit dem Dopaminstoffwechsel in Verbindung stehen, werden ebenfalls als Kandidatengene für Alkoholabhängigkeit betrachtet. 1990 wurde die erste signifikante Assoziation der Alkoholabhängigkeit mit einem Polymorphismus des Dopamin D2-Rezeptor-Gens publiziert (Blum et al. 1990). Die Fallzahl war mit 35 Alkoholikern, die zudem noch unterschiedlicher ethnischer Herkunft waren, äußerst gering. Nachdem nur einige der vielen Folgestudien mit höheren Fallzahlen die Befunde von Blum replizieren konnten, blieb ein Konsens bislang aus (Übersicht bei Goate und Edenburg 1998). Kidd wies auf die großen ethnischen Unterschiede in der Allelverteilung des Taq1 Polymorphismus hin und sieht darin einen bedeutenden Störfaktor bei inhomogenen Stichproben (Kidd et al. 1996). Blum zeigte durch spätere Studien, dass das A1 Allel für Auffälligkeiten des „Belohnungssystems“ und nicht spezifisch für eine bestimmte Abhängigkeit verantwortlich ist (Blum et al. 1995). Für die weiteren Dopaminrezeptoren D1, D3 und D4 konnte bisher keine signifikante Korrelation gefunden werden (Sander et al. 1995, Übersicht bei Paterson et al. 1999).

Die Monoaminooxidase (MAO) ist ein Enzym, das am Abbau von Serotonin und Dopamin beteiligt ist. Eine signifikant geringere MAO-Aktivität konnte bei Alkoholikern vom Subtyp II nach Cloninger gefunden werden (Devor et al.

1994). Eine weitere Studie weist auf einen Zusammenhang zwischen dem MAO-A-Gen und frühem Erkrankungsbeginn für Alkoholabhängigkeit hin (Vanyukov et al. 1995).
Bei Alkoholkranken mit dissozialer Persönlichkeit wurde ein besonderes Allel des Serotonintransportergens vermehrt gefunden (Sander et al. 1998). Dieser Befund konnte von einer anderen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (Jorm et al. 1998). In einer weiteren Studie wurde das Serotonintransportergen jedoch gehäuft bei Alkoholikern mit frühem Erkrankungsbeginn und impulsivem Verhalten gefunden (Hallikainen et al. 1999).

1.5. Dopamin - und GABA - assoziierte Gene als Kandidatengene für den Alkoholentzug

1.5.1. DAT1

Der Dopamintransporter ist verantwortlich für die präsynaptische Wiederaufnahme von Dopamin und reguliert somit die synaptische Aktivität. Der Dopamintransporter gilt neben prä- und postsynaptischen Rezeptoren als das entscheidende regulatorische Element der dopaminergen Transmission (Überblick bei Maelicke 1996). Vor dem Hintergrund der oben dargestellten dopaminergen Entzugshypothese bei Alkoholabhängigkeit mit Disposition zu Rückfällen, Craving und psychotischem Erleben, kann ihm daher eine Bedeutung für die Suchtgenese hypothetisch zugeschrieben werden. Tierversuche an genetisch bedingt zur Epilepsie veranlagten Ratten (GEPR) legen zudem Nahe, dass der Dopamintransporter einen Einfluss auf die Ausprägung von Krampfanfällen hat (Szot et al. 1996). Ein Überschuss an Dopamin, bedingt z.B. durch abnorme DAT-Aktivität, kann zu psychotischen Symptomen, u.a. im Entzug von abhängig machenden Substanzen, führen (Gelernter et al. 1994, Sander et al. 1997)
Ein Überblick über die Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem Dopamintransporter-Gen (DAT1) Allel A9 und schweren Alkoholentzugserscheinungen untersucht haben, ist in Tabelle 1 dargestellt:

Autor	Sander et al. (1997)	Schmidt et al. (1998)	Franke et al. (1999)	Gorwood et al. (2002)
Studiendesign/ Statistische Auswertung	Assoziations-studie	Assoziations-studie	Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT)	Assoziations-studie
Fallzahl	n = 293	n = 48	n = 87	n = 120
P	0,003	0,05	0,771	0,023
Korrelation zwischen A9 und schwerem Entzug	+	+	-	+

Tabelle 1. Überblick über die relevanten Studien, welche einen Zusammenhang zwischen dem DAT1-Allel A9 und schweren Alkoholentzugserscheinungen untersucht haben. Fallzahl = Anzahl der in die Studie aufgenommenen Alkoholkranken, P = p-Wert, Korrelation zwischen A9 und schwerem Entzug: „+“ = positive Korrelation, „-“ = negative Korrelation.

Sander und Mitarbeiter (1997) haben in einer Assoziationsstudie eine signifikant erhöhte Anzahl des Allels A9 des Dopamintransporter-Gens (DAT1) bei Alkoholabhängigen mit schweren Entzugserscheinungen (Delirium tremens oder Krampfanfall) gefunden. In einer Studie von Schmidt et al. (1998) wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Entzugserscheinungen und der Anwesenheit des DAT1-Allels A9 festgestellt. Eine weitere Arbeitsgruppe (Franke et al. 1999) konnte dieses Ergebnis nicht bestätigen, doch Gorwood und Mitarbeiter (2002) haben in einer vierten Assoziationsstudie das Allel A9 signifikant gehäuft bei Alkoholikern mit schwerem Entzug gefunden. Es besteht der Verdacht, dass alkoholabhängige Patienten mit dem Allel A9 des DAT1 aufgrund von maladaptiven Vorgängen für Entzugssyndrome vulnerabler sind als Individuen, denen diese Genvariante fehlt (Schmidt et al. 1998).

1.5.1.1. Lokalisation des DAT1

DAT1 liegt auf dem Chromosom 5q15.3 (Vandenbergh et al. 1992a) und gilt als Kandidatengen für die Alkoholabhängigkeit sowie für den Alkoholentzug. Das Gen umfasst 15 Exons über eine Spanne von 64 kb. Das 620 Aminosäuren enthaltende Protein enthält 12 transmembrane Domänen und gehört zu der Na/Cl-abhängigen Transporterfamilie.

1.5.1.2. Bekannte Polymorphismen des DAT1

Mehrere Polymorphismen dieses Gens sind bekannt: ein TaqI VNTR-Polymorphismus (= Variable Number of Tandem Repeats) des Intron 8 (Byerley et al. 1993) und ein 40-bp VNTR-Polymorphismus in der 3`- nicht translatierten Region (Sano et al. 1993, Vandenbergh et al. 1992a). Diese VNTR-Sequenz, auch Minisatellit genannt, ist ein aus einer Basis-DNA-Sequenz aufgebauter repetitiver DNA-Abschnitt, dessen Gesamtlänge durch die Anzahl der Wiederholungen dieser Grundeinheit bestimmt wird.
Weiter ist ein biallelischer TaqI Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) („Taq 492“)(Vandenbergh et al. 1992b) bekannt.

1.5.2. GABBR1

Der Neurotransmitter Gammaaminobuttersäure (GABA) hat eine hemmende Wirkung auf das zentrale Nervensystem.
Durch chronischen Alkoholkonsum wird das körpereigene GABA-System herunterreguliert, da Ethanol GABA-ähnliche Wirkung besitzt.
Im Entzug entfällt nun die supprimierende Wirkung des Alkohols und es kommt zu einer verminderten Hemmung des Erregungsniveaus des ZNS. Dies führt in 5 - 35 % zu Alkoholentzugskrampfanfällen (Soyka et al. 1989).

Ergebnisse einer Assoziationsstudie von Parsian und Zhang (1999) geben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des $GABA_B$-Rezeptor-Gens (GABBR1) an der Genese der Alkoholkrankheit.

1.5.2.1. Lokalisation des GABBR1

Das Gen, welches den $GABA_B$-Rezeptor kodiert, liegt auf Chromosom 6p21.3. Die beiden alternativen Transkripte $GABA_B$R1a und $GABA_B$R2b leiten sich beide von demselben Lokus HLA-F ab, unterscheiden sich allerdings in ihren 5`-Exonen (Peters et al. 1998). Der $GABA_B$R2b-Subtyp bildet mit einer Untereinheit $GABA_B$R1a Heterodimere durch Interaktion an ihren intrazellulären Carboxy-Enden. Diese Co-Expression formt einen voll funktionsfähigen GABBR1 an der Zelloberfläche (White et al. 1998).
In derselben Region liegt ein Gen für die Anlage der idiopathischen generalisierten Epilepsie (IGE). Aus Versuchen mit Tieren ließ sich vermuten, dass der $GABA_B$-Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Entstehung der IGE spielt. Studien, die GABBR1 als Kandidatengen für IGE darstellen wollten, konnten diese These allerdings nicht beweisen (Sander et al. 1999a).

1.5.2.2. Bekannte Polymorphismen des GABBR1

Es sind bisher 114 Variationen des GABBR1 bekannt . Drei Polymorphismen wurden von der Arbeitsgruppe Sander (1999a) im Zusammenhang mit der IGE untersucht. Die Polymorphismen sind an Exon 1a1 (rs1805056), Exon 7 (rs1805057) und Exon 11 (rs29230) beschrieben worden. Nach der Translation konnte jeweils ein Aminosäureaustausch nachgewiesen werden.
Ziel der vorliegenden Studie war es, die beiden oben genannten Polymorphismen von GABBR1 für den Alkoholentzug hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Entzugsschwere, insbesondere das Auftreten von Alkoholentzugskrampfanfällen, zu überprüfen und ihrern Zusammenhang mit der Alkoholabhängigkeit näher zu betrachten.

1.6. Fragestellung

Viele Studien weisen auf einen genetischen Einfluss bei der Entstehung der Alkoholabhängigkeit hin. Der Schweregrad einer Alkoholentzugssymptomatik ist individuell sehr unterschiedlich. Einige Alkoholkranke haben keinerlei Beschwerden oder nur leichte Entzugssymptome wie Zittern und Schwitzen. Andere reagieren mit einem Delirium tremens, mit oder ohne Krampfanfall. Manche bekommen plötzlich einen isolierten Krampfanfall, ohne dass zuvor ein Anfallsleiden bekannt war. Aufgrund der Studienlage ist davon auszugehen, dass die Ausprägung der Entzugssymptome durch die individuelle Trinkmenge, die Dauer der Abhängigkeit und eine genetische Disposition beeinflusst werden. In der vorliegenden Studie untersuchten wir einen Polymorphismus des DAT1, die Polymorphismen des GABBR1 im Bereich von Exon 7 (rs1805057) und Exon 11 (rs29230), sowie die tägliche Trinkmenge auf ihren Einfluss auf die Schwere der Entzugssymptomatik in der Alkoholentgiftung und auf ihren Einfluss auf die Ausprägung einer Alkoholabhängigkeit.

Daraus leitete sich folgende Fragestellung ab:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Allelverteilung bzw. dem Genotyp der untersuchten Gene und der Ausprägung eines Krampfanfalles im Entzug?

2. Treten bestimmte Allele oder Genotypen der untersuchten Polymorphismen überzufällig häufig bei Patienten mit Alkoholabhängigkeit auf?

3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus des Dopamintransporters und der täglich konsumierten Alkoholmenge?

4. Korreliert die Diagnose Krampfanfall im Entzug mit der täglich konsumierten Alkoholmenge?

2. Patientenkollektiv und Methodik

2.1. Rekrutierung der Studienteilnehmer

Die alkoholkranken Patienten befanden sich alle zur stationären Entgiftung bzw. zur Entwöhnungsbehandlung in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie in Tübingen (Ärztlicher Direktor Herr Prof. Dr. Buchkremer) oder in der Fachklinik Wilhelmsheim in Oppenweiler (Chefarzt Herr Dr. Kolb). Sie erfüllten alle Kriterien einer Alkoholabhängigkeit nach DSM IV und ICD10. Der CIWA-Ar Score (Sullivan et al. 1989) bewertete die Schwere des Entzuges. Ein CIWA-Ar Score $\leq$ 11 beschrieb einen leichten Entzug, höhere Werte wurden als eine schwere Entzugssymptomatik gewertet.

Die Kontrollpersonen kamen aus dem Großraum Stuttgart und waren untereinander nicht verwandt. Eine psychische oder schwere internistische Erkrankung lag bei ihnen in der Anamnese nicht vor. Das Mindestalter, um in die Studie eingeschlossen zu werden, betrug 24 Jahre. Bei den Kontrollpersonen bestand keine positive Familienanamnese für Suchterkrankungen (außer Nikotin) bei Verwandten ersten und zweiten Grades. Mit allen Alkoholkranken und gesunden Kontrollpersonen, wurde ein standardisiertes Interview geführt, welches sich an das SCID (Ventura et al. 1998) anlehnte. Im Anschluss daran wurde jedem Studienteilnehmer 2 x 10 ml Blut in EDTA – Monovetten abgenommen.

Der Fragebogen des Interviews setzte sich wie folgt zusammen, wobei nicht alle erhobenen Daten in dieser Arbeit analysiert wurden:

1. Aufklärungsbogen, in dem das beabsichtigte Ziel der Studie dargestellt wurde

2. Einverständniserklärung

3. Fragebogen über die Trinkgewohnheiten (AUDIT; Alcohol Use Disorder Identification Test, Babor und Grant 1989)

4. Fragebogen zum Ausschluss weiterer psychiatrischer Erkrankungen (BPRS; Brief Psychiatric Rating Scale, Ventura et al. 1993)

5. Persönliche Angaben der Probanden

   Bei der Gruppe der Alkoholkranken:

   - Patientenname und Identifikationsnummer (ID)
   - Diagnose, Ausschluss von bekannten Anfallsleiden und weiteren psychiatrischen Erkrankungen
   - Dauer des aktuellen stationären Aufenthalts
   - letzter Alkoholkonsum, Blutalkoholkonzentration bei Aufnahme
   - subjektive Beurteilung des letzten Entzuges anhand einer Skala (ohne Symptome – schwerer Entzug)
   - aktuelle Medikamente, explizit die Menge an eingenommenem Clomethiazol
   - Frage nach Komplikationen wie Delir und Krampfanfall während der Entgiftung, ggf. Beschreibung des Delirs
   - Dauer der Alkoholabhängigkeit, Alter beim ersten Alkoholkontakt
   - Menge und Art des vor dem Entzug getrunkenen Alkohols
   - Abfragen von leichten Entzugssymptomen wie Zittern, Schwitzen, Schlaflosigkeit und deren erstem Auftreten
   - Frage nach bekannten Folgeerkrankungen wie Leberzirrhose, Ösophagusvarizen
   - Familienanamnese bezüglich Alkoholabhängigkeit
   - Co-Abhängigkeit von Nikotin

   Bei der Kontrollgruppe:

   - Frage nach Anfallsleiden oder weiteren neurologischen Erkrankungen
   - derzeitige Medikamente

- Familienanamnese bezüglich Alkoholkrankheit und anderen psychiatrischen Erkrankungen
- Nikotinabhängigkeit

6. Bei Patienten, bei denen die Diagnose der Alkoholabhängigkeit von einem Psychiater gestellt worden war, wurden nochmals die Kriterien der Abhängigkeit anhand DSM IV und ICD 10 überprüft.

7. Eine Beurteilung der Entzugssymptomatik erfolgte anhand des CIWA-Ar- Scores.

Probanden mit psychiatrischen Störungen, schwerwiegenden organischen Erkrankungen (z.B. Epilepsie) oder Substanzmissbrauch, außer Alkohol und Nikotin, wurden nicht in die Studie eingeschlossen.
Jedem Studienteilnehmer wurde eine Code-Nummer zugeordnet, unter welcher die Proben anonym verschlüsselt registriert wurden.

2.2. Labormethoden

2.2.1. DNA-Isolierung

Methodik modifiziert nach Miller et al. (1988):
Die Herstellerangaben für verwendete Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien finden sich im Anhang (7.3. Material).

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die EDTA-Blutröhrchen, im Anschluss an die Blutentnahme, bei – 20°C eingefroren. Nach dem Auftauen der Röhrchen wurden 10 ml EDTA-Blut in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gefüllt. Dazu wurden 30 ml kalter Lysispuffer (10 Mm Tris; 5 mM $MgCl_2$; 1 % Triton X 100; 320 mM Saccharose) gegeben. Das Röhrchen wurde mehrmals geschwenkt und dann mit der Lösung für 10 min auf Eis gestellt. Die klare Lösung wurde 20 min bei 4°C zentrifugiert mit einer Rotation von 4000 rpm (2451 RZB), um die

DNA enthaltenden Zellen von unbrauchbaren flüssigen Blutbestandteilen zu trennen.

Der Überstand wurde anschließend auf einmal abgekippt. Im Röhrchen blieb der Bodensatz in Form eines Pellet, welchem 10 ml Kernlysispuffer (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA), 660 µl SDS (Sodiumdodecylsulfat 10 g/100 ml Aqua) und 500 µl Pronase (0,2 g/10 ml) zugegeben wurden. Nach mehrmaligem kräftigen Schütteln wurden die Proben mit der Pronase über Nacht bei 37°C im rotierenden Wasserbad weiter verdaut. Etwa 12 h später wurde den Proben 3,2 ml gesättigte NaCl-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde kräftig geschüttelt und im Anschluss daran 2 x 10 min bei Raumtemperatur und 4000 rpm (2451 RZB) zentrifugiert. Ziel der Zentrifugation war es, vorhandene Zelltrümmer von der die DNA enthaltenden Lösung zu trennen. Die Zellreste setzten sich am Boden des Falcon-Röhrchens als Sediment ab. Die Pause zwischen den Zentrifugationsschritten diente dazu, die Proben nochmals leicht aufzuschütteln. Der die DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben – dazu kam das gleiche Volumen Isopropanol. Anschließend wurde das Röhrchen langsam geschwenkt, bis sich ein weißer DNA-Faden herausbildete. Danach wurde die DNA in ein Reagenzglas gegeben, wo sie mit 70%iger Ethanollösung ausgewaschen wurde. Die gereinigte DNA kam daraufhin in ein Kryoröhrchen, in dem sie in 400 µl TE-4 (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA) gelöst und über Nacht zur besseren Lösung bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde. Die Bestimmung von Reinheitsgrad und Konzentration der DNA-Lösungen wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers durchgeführt. Zur Messung verwendete man Miniküvetten aus Quarzglas. Der Reinheitsgrad wurde durch den Quotienten A_{260}/A_{280} (Absorbtion bei 260 nm/ Absorbtion bei 280 nm) bestimmt. Das Ergebnis sollte möglichst über 1,8 liegen, da ein kleinerer Quotient Verunreinigungen durch Proteine anzeigt.

Nachdem aus den DNA-Proben Konzentrationen von 10 ng/µl hergestellt worden sind, wurden sie bei –20°C gelagert.

2.2.2. DNA-Analyse/ PCR

Die Amplifizierung der Gensequenzen der zu untersuchenden Gene wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die PCR ist eine Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte vervielfältigen kann.
Zunächst wurden, je nach Gen, mit unterschiedlichen Primern versehene PCR-Ansätze hergestellt. Primer sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer bestimmten Sequenz der DNA-Matrize sind. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in Tabelle 2 aufgeführt. Die für die Amplifikation notwendigen Primersequenzen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

	DAT 1	**GABBR1, Polymorphismus im Exon 11 (rs29230)**	**GABBR1, Polymorphismus im Exon 7 (rs1805057)**
PCR - Protokoll	Sano et al. 1993	Sander et al. 1999a	Sander et al. 1999a
Ansatzmenge insgesamt	30 µl	20 µl	20 µl
Inhalt	1,38 mM $MgCl_2$ 180 µM je dNTP 22 pmol je Primer 1,1 U Taq-Polymerase 2,5 µl DNA [10ng/µl] 1,29 µl DMSO 20,3 µl H_20	2,5 mM $MgCl_2$ 200 µM je dNTP 10 pmol je Primer 1U Taq-Polymerase 10 µl DNA [10ng/µl] 2 µl Betaine [4M] 7,4 µl H_2O	2,5 mM $MgCl_2$ 200 µM je dNTP 10 pmol je Primer 2 U Taq-Polymerase 10 µl DNA [10ng/µl] 3 µl Betaine [4M] 12 µl H_2O

Tabelle 2. PCR Ansätze

	DAT 1	rs29230	rs1805057
Amplifikations-Zyklen	35	35	35
Denaturierung	94°C für 3 min	95°C für 3 min	95°C für 3 min
Annealing-temperatur	72°C für 1 min	57°C für 1 min	60°C für 1 min
Elongation	72°C für 1 min	72°C für 1 min	72°C für 1 min
Finale Elongation	72°C für 5 min	72°C für 5 min	72°C für 5 min

Tabelle 2. Fortsetzung PCR-Ansätze.

	Primersequenzen	Produktlänge in bp
DAT1	5´-TGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAGA-3´ 5´-TGTTGGTCTGCAGGCTGCCTGCAT–3´	A6: 290 bp A9: 410 bp A10: 450 bp A11: 490 bp A12: 530 bp
GABBR1 Polymorphismus im Exon 11 (rs29230)	5´- ATTCTCTCTCCCTCTCACC-3´ 5´- GAGGAAGGGCAGAGAATCAT-3´	279 bp
GABBR1 Polymorphismus im Exon 7 (rs1805057)	5´- AACAGTAACACAAACCCATCC-3` 5´- GCATGTTTGTAGAAGGTGCC-3´	441 bp

Tabelle 3. Primersequenzen der Gene für die Amplifikation.

Der PCR-Ansatz wurde in 8er Testreihen in einen Thermocycler gegeben. Durch Temperaturerhöhung kam es zur Denaturierung der DNA. An die Einzelstränge wurden die spezifischen Primer hybridisiert. Die Taq-Polymerase verlängert unter geeigneten Reaktionsbedingungen und unter Gegenwart von Desoxyribonuklosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der nun denaturierten und einzelsträngigen DNA-Matrize.

Für GABBR1, bzw. die Polymorphismen im Exon 7 (rs1805057) und im Exon 11 (rs29230), ist nach der PCR noch ein Restriktions-Verdau von 12 Stunden notwendig, um die Gensequenzen endgültig darstellen zu können.
Das PCR-Produkt wird hier mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease geschnitten, in deren Erkennungssequenz der Polymorphismus liegt. Je nach Vorhandensein des Polymorphismus ergeben sich Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge.

Für den Restriktions-Verdau wurden folgende Lösungen hergestellt (Tabelle 4).

	GABBR1 Polymorphismus im Exon 11 (rs29230)	**GABBR1 Polymorphismus im Exon 7 (rs1805057)**
Restriktions-Verdau modifiziert nach Sander et al.1999a	10 µl PCR-Produkt 5 U Endonuklease 1,7 µl Restriktionspuffer 1,5 µl BSA	10 µl PCR-Produkt 3 U Endonuklease 1,7 µl Restriktionspuffer
Änderung der Primärsequenz	Phen658→Phen658	Gly489→Ser489
Wildtyp-Sequenzen mit Nukleotidaustausch	5´-GAACCAGTT[C/T]CC-3´	5´-C[A/G]GCCG-3`

Tabelle 4. Restriktions-Verdau von rs1805057 und rs29230

	rs29230	rs1805057
Schnittstellen der Endonuklease	Xmn I 5´- GAANN´NNTTC-3´ 3`- CTTNN´NNAAG-5´	Eag I 5´- C´GGCCG-3´ 3´- GCCGG´C-5´
Restriktionspuffer	NEB 2: pH 7,9 50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM $MgCl_2$ 1 mM DTT	NEB 3: pH 7,9 100 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM $MgCl_2$ 1 mM DTT

Fortsetzung Tabelle 4. Restriktions-Verdau von rs1805057 und rs29230

Die Lösung mit dem PCR-Produkt von rs1805057 und rs29230 wurde ebenfalls in 8er Testreihen gefüllt und in den Thermocycler gegeben. Dort wurden die Proben 12 h bei 37°C inkubiert. Für DAT1 war kein Verdau erforderlich. Mögliche Ergebnisse nach dem Restriktions-Verdau sind in Tabelle 5 aufgelistet. Das Allel2 des GABBR1 Polymorphismus im Exon 7 (rs1805057) konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden.

	Banden nach der PCR:	Mögliche Banden nach dem Restriktions-Verdau:
GABBR1 Polymorphismus im Exon 7 (rs1805057)	441 bp	258 bp +183 bp (Allel1) 441 bp (Allel2)**
GABBR1 Polymorphismus im Exon 11 (rs29230)	279 bp	279 bp (Allel1) 178 bp +101 bp (Allel2)

Tabelle 5. Basenpaarlänge bp von rs1805057 und rs29230 nach der PCR und nach dem anschließenden Restriktions –Verdau. Die Fraktionierung der PCR-Produkte erfolgte in 3% Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht. Als Referenz diente eine 100 bp-Leiter. ** = nicht nachgewiesen.

2.2.3. Elektrophorese

Zunächst war die Herstellung eines Agarosegels notwendig:
150 ml 1 x TBE (890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 25 mM Triplex EDTA III; pH 8,0; auf 1/10 mit Aqua verdünnt) wurde mit 4,5 g Agarose für etwa 2 min unter mehrmaligem Umrühren in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem die dickflüssige Masse leicht abgekühlt war, wurden unter dem Abzug drei 50 ml Falcon-Röhrchen, in die zuvor je 0,7 µl Ethidiumbromid pipettiert wurde, mit der Agarose gefüllt. Nach mehrmaligem Schwenken kam die Agarose in die Trägerform der Flachbettapparatur von 20 x 20 cm bzw. 8 x 11 cm Größe.
Die Geltaschen wurden mit 3 µl Auftragspuffer (0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol; 30% Glycerol) und 6,5 µl des PCR-Produktes bzw. des verdauten PCR-Produktes beladen. Als Referenz diente eine 100 bp Leiter, von der 1 µl anstelle des PCR-Produktes aufgegeben wurde. Die Elektrophoresekammer wurde mit 2 l 1 x TBE gefüllt. Die Laufzeit der Gelelektrophorese betrug zwischen 45 min (DAT1) und 90 min (GABBR1) bei 120 V. Aufgrund der Länge der Basen konnten die verschiedenen Allele auf dem Agarosegel aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Segmente mit kurzer Basenabfolge war schneller als die der längeren Segmente. Die 100 bp DNA-Leiter diente als Maßstab zur Größenbestimmung der Fragmente. Sie teilte sich in 15 Banden zwischen 100 bp und 1500 bp auf. Ein zusätzliches Fragment war bei 2072 bp zu sehen. Anschließend konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Nachdem die Basenpaare der Allele dargestellt und ausgewertet waren, konnten die Ergebnisse statistisch analysiert werden. Die Verteilung der Basenpaare ist im Anhang dargestellt.

2.3. Statistische Methoden

Bei der statistischen Auswertung kamen folgende Analyseformen zur Anwendung: Mittels Fisher´s Exaktem Test (JMP 3.2.1., SAS Institute Inc.1989-1997) wurden die Frequenzen der Allele und der Genotypen der einzelnen

Polymorphismen der jeweiligen Gruppen miteinander verglichen. Da Fisher´s Exakter Test ein Vierfeldertest ist, wurden immer jeweils zwei der unter 2.3.1. genannten Gruppen miteinander verglichen. Da die tägliche Trinkmenge keine Normalverteilung aufzeigte, wurde eine logarithmische Transformation zur parametrischen Darstellung angewandt.

2.3.1 Statistische Einteilung der Gruppen

Die rekrutierten Personen wurden, wie in Tabelle 6 dargestellt, in 4 Gruppen aufgeteilt:

	N	**Entzug**	**CIWA-Ar Score (Mittelwert / SD)**	**Geschlecht w/m**	**Alter (Mittelwert /SD) in Jahren**
a) Alkoholkranke mit leichtem Entzug (CIWA≤11)	97	Ohne KA Ohne DT	1,02 / ± 2,35	26/71	41,7 / ± 7,94
b) Alkoholkranke mit Krampfanfall	71	Mit KA	12,12 / ± 9,12	11/60	43 / ± 9,02
c) Alkoholabhängige Patienten	221	Mit KA / DT sowie ohne KA/DT	6,55 / ± 9,3	42/179	43 / ± 8,7
d) Gesunde Kontrollgruppe	102	-	0	36/66	37,4 / ± 20,7

Tabelle 6. Einteilung der Gruppen zur statistischen Analyse. N = Fallzahl; Entzug : KA = Krampfanfall, DT = Delirium tremens; Geschlecht: w = weiblich, m = männlich; Alter in Jahren, CIWA-Ar-Score = Bewertung des Entzugssyndroms mittels Clinical Institute Withdrawal Assessment Scale.

Im Vierfeldertest wurden folgende Personengruppen miteinander verglichen:

1.Alkoholkranke mit leichtem Entzug (a) mit Alkoholikern, die eine schwere Entzugssymptomatik aufwiesen (b).
2. Die Gruppe der Alkoholabhängigen (c) wurde mit einer gesunden Kontrollgruppe (d) verglichen.

2.3.2. Assoziationsstudie in Form des Vierfeldertests

Der Fisher´s Exakter Test wurde zur Berechnung zweier unabhängiger Stichproben angewandt. Voraussetzung ist die Normalverteilung beider Gruppen. Bei einem Chi-Quadrat (X^2) > 3,841 gilt das Ergebnis als signifikant, entsprechend einem p-Wert von unter 0,05.
Der Fisher´s Exakte Test fand Anwendung bei der Berechnung der Verteilung des DAT1-A9-Allels im Vergleich mit dem Vorkommen der anderen DAT1-Allele A6, A9, A10, A11 und A12. Damit sollte untersucht werden, ob das Allel A9 bei Alkoholikern mit schwerem Entzug häufiger zu finden ist als bei Alkoholikern mit leichtem Entzug, bzw. ob alkoholkranke Personen dieses Allel häufiger tragen als die Probanden der gesunden Kontrollgruppe.
Auch der Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1 (rs29230) wurde mit diesem Test untersucht.

Beim Auftreten von signifikanten Ergebnissen (p-Wert < 0,05) wurde die odds ratio nach Gart berechnet (StatsDirect statistical software 1.9.2., I.E. Buchan 2001). Das approximierte relevante Risiko (odds ratio) ist eine Schätzung des relevanten Risikos. Relevantes Risiko = 1 bedeutet Unabhängigkeit, also kein ätiologischer Faktor.

2.3.3. t-Test

Der t-Test (JMP 3.2.1., SAS Institute Inc.1989-1997) für unverbundene Stichproben wird angewandt, um zwei Stichproben mit Mittelwert und Standardabweichung miteinander zu vergleichen.
Der t-Test wurde herangezogen, um die zuvor logarithmierte Trinkmenge mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Krampfanfalls zu berechnen.

3. Ergebnisse

3.1. Testergebnisse der Studienteilnehmer

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese der einzelnen Probanden befindet sich im Anhang (7.1 und 7.2).

3.2. Ergebnisse für DAT1

3.2.1. Elektrophoretische Banden des DAT1

In der vorliegenden Studie konnten die in Tabelle 7 aufgelisteten DAT1-Allele gefunden werden.

Allel	**A6**	**A9**	**A10**	**A11**	**A 12**
Basenlänge	290 bp	410 bp	450 bp	490 bp	530 bp

Tabelle 7. Allele des DAT1. A = Allel, bp = Basenpaare.

Bei 322 Studienteilnehmern konnte die Genotypisierung erfolgreich durchgeführt werden.

In Abbildung 1 sind die Ergebnisse der Elektrophorese des DAT1 dargestellt.

Die Banden des PCR-Produktes wurden mittels Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

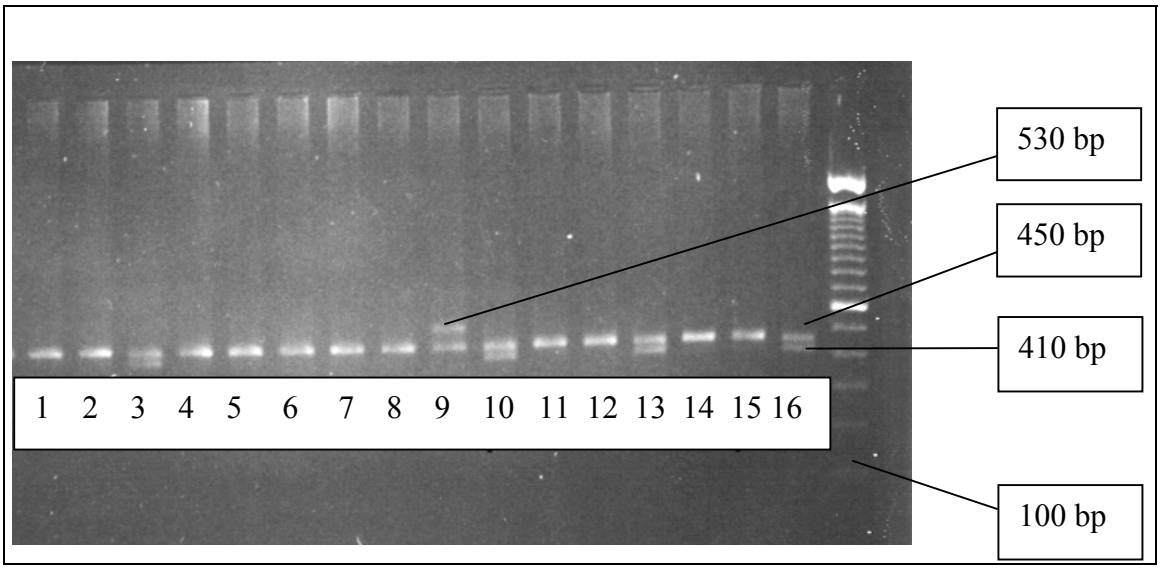

Abbildung 1. Agarosegelelektrophorese des polymorphen DAT1.
Als Referenz diente eine 100 bp Leiter (ganz rechts dargestellt).
Homozygot (450 bp): Bandennummern 1, 2, 4 bis 8 , 11, 12 sowie 14 und 15
Heterozygot (410 bp / 450 bp): Bandennummern 3,10,13,16
Heterozygot (450 bp / 530 bp): Bandennummer 9

3.2.2. Statistische Ergebnisse beim Vergleich des DAT1- Allels A9 mit den übrigen Allelen bei Patienten mit Krampfanfall

Die Gruppe der Patienten mit Krampfanfall bestand aus 71 Personen, diese wurden mit der Gruppe der Alkoholkranken mit leichtem Entzug (n = 97) verglichen.
Es sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Entzugssymptome und dem Vorkommen des DAT1 - Allels A9 im Genotyp besteht.

Mittels Fisher`s Exaktem Test wurden die Gruppen miteinander verglichen und auf ein signifikantes Vorkommen des DAT1-Allels A9 in der Gruppe der Alkoholkranken mit Krampfanfall untersucht. Ein p-Wert unter 0,05 konnte nicht ermittelt werden ($p = 0{,}2122$; $X^2 = 1{,}67$).

In Tabelle 8 ist die Kreuztabelle dargestellt:

	Allel A9	**Sonstige Allele**	**Σ**	**p**	**X²**
Patienten mit KA	41 *58,57%*	29 *41,43%*	70 *100%*	0,2122	1,67
Leichter Entzug	47 *48,45%*	50 *51,55%*	97 *100%*		
Σ	88	79			

Tabelle 8. Kreuztabelle: Vergleich der Frequenz der DAT1 – Allel A9-Träger mit den Frequenzen der Träger der restlichen Allele des DAT1-Polymorphismus bei Patienten mit Krampfanfall. Die A9-Allelträger (homo- und heterozygot) wurden mit A6-, A10-, A11-, sowie A12-Trägern verglichen, die unter dem Begriff „Sonstige Allele“ zusammengefasst wurden. Die Prozentangaben nehmen Bezug auf die Gesamtzahl der Allele in der entsprechenden Gruppe. Σ = Spaltensumme bzw. Zeilensumme. p-Wert, X²: berechnet nach Fisher´s Exaktem Test.

3.2.3. Statistische Ergebnisse für das DAT1- Allel A9 bei Patienten mit der Diagnose Alkoholabhängigkeit

221 Patienten mit der Diagnose Alkoholabhängigkeit wurden 102 Probanden aus der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Es sollte überprüft werden, ob es eine Signifikanz in der Verteilung des Allels A9 zwischen den beiden Gruppen gibt. Als statistischer Test diente Fisher´s Exakter Test. Tabelle 9 stellt das Vorkommen des DAT1-Allels A9 bei Alkoholkranken und Kontrollgruppe dar.
Das Testergebnis war mit p = 0,0056 (X² = 7,739) signifikant:
48,86 % der Alkoholabhängigen sind Träger des DAT1-Allels A9. In der gesunden Kontrollgruppe kommen Träger des Allels A9 seltener vor (32,35 %).

Um das Chancenverhältnis, A9-Träger zu sein, beurteilen zu können, wurde die odds ratio nach Gart berechnet (OR = 2, Konfidenzintervall 1,2 – 3,4). Demnach ist die Wahrscheinlichkeit bei Alkoholkranken das A9-Allel zu finden nahezu doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe.

	Allel A9	**Sonstige Allele**	**Σ**	**P**	**X²**
Alkoholiker	108 *48,86%*	113 *51,14%*	221 *100%*	0,0056	7,739
Kontrollgruppe	33 *32,35%*	69 *67,65%*	102 *100%*		
Σ	141	182	323		

Tabelle 9. Tabelle für die Frequenz des DAT1-Allels A9 bei Alkoholkranken und bei der Kontrollgruppe verglichen mit dem Vorkommen der anderen DAT1-Allele. Die Prozentangaben sind in Bezug auf die Gesamtzahl der Allele in der jeweiligen Gruppe zu sehen. Σ = Spaltensumme bzw. Zeilensumme. p-Wert, X²: berechnet nach Fisher´s Exaktem Test.

3.2.4. Ergebnisse beim Vergleich der DAT1-Allelverteilung mit der täglichen Trinkmenge

Die Gruppe der Alkoholkranken (n = 220) wurde mittels t-Test auf einen Zusammenhang zwischen der Verteilung der täglichen Trinkmenge (in g Alkohol) und dem Auftreten des DAT1-Allels A9 untersucht. für die Berechnung wurden die Werte der täglichen Trinkmenge in g Alkohol logarithmiert um eine Normalverteilung zu erhalten.

Es konnte gezeigt werden, dass Träger des Allels A9 keinen signifikant erhöhten Alkoholkonsum aufwiesen, verglichen mit den Alkoholkranken ohne diesen Polymorphismus (p = 0,7224). In Tabelle 10 wird die täglich getrunkene

Alkoholmenge bei Alkoholkranken mit dem Allel A9 im Genotyp mit Alkoholkranken ohne das DAT1-A9-Allel vergleichend gegenübergestellt.

	Anzahl der Alkoholiker	Tägl. Alkoholkonsum in g Mittelwert	P
A9-Allelträger	**n = 113**	**230,25**	**0,7224**
sonstige Allele	**n = 107**	**223,38**	
Σ	**n = 220**		

Tabelle 10. Darstellung der Mittelwerte der täglich getrunkenen Alkoholmenge in g bei Alkoholikern mit dem DAT1-Allel A9 im Vergleich mit den Alkoholabhängigen ohne diesen Polymorphismus. A9-Allelträger = Alkoholkranke mit dem DAT1-A9-Polymorphismus homo- oder heterozytot im Genotyp, sonstige Allele = Alkoholkranke ohne das A9-Allel im Genotyp; n = Anzahl der Alkoholabhängigen der jeweiligen Gruppe. Σ = Spaltensumme. p-Wert berechnet mittels t-Test.

3.3. Ergebnisse für den Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1 (rs29230)

3.3.1. *Elektrophoretische Ergebnisse für den Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1 (rs29230)*

Beim Polymorphismus des GABBR1 im Exon 11 sind zwei Allele bekannt. Das Wildtyp-Allel1 hat eine Bande von 279 bp. Beim Allel2 sind zwei Banden zu finden, welche eine Länge von 178 bp und 101 bp haben. In Abbildung 2 ist das Gel nach Auftrennung der PCR–Produkte dargestellt. Alle Produkte zeigen eine Bande bei 279 bp. Die endgültige Zuordnung der Allele ist nach einem Verdau von 12 Stunden mit dem Restriktionsenzym Xmn I möglich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 zu sehen.

Für 320 Studienteilnehmer konnte der Genotyp bestimmt werden.

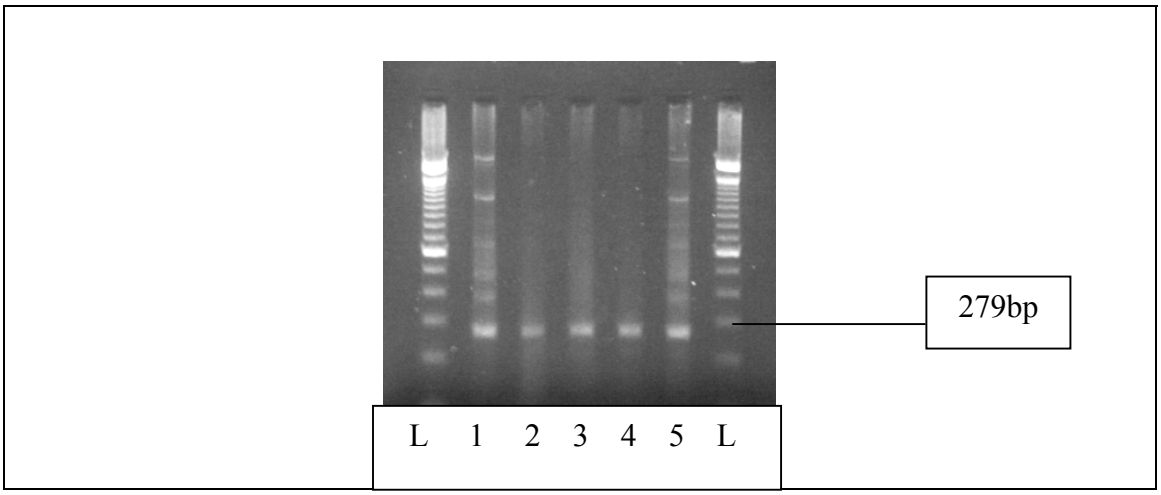

Abbildung 2. PCR - Produkte des Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1 (rs29230) nach elektrophoretischer Auftrennung, Produktgröße 279 bp. Als Referenz diente eine 100 bp-Leiter (L).

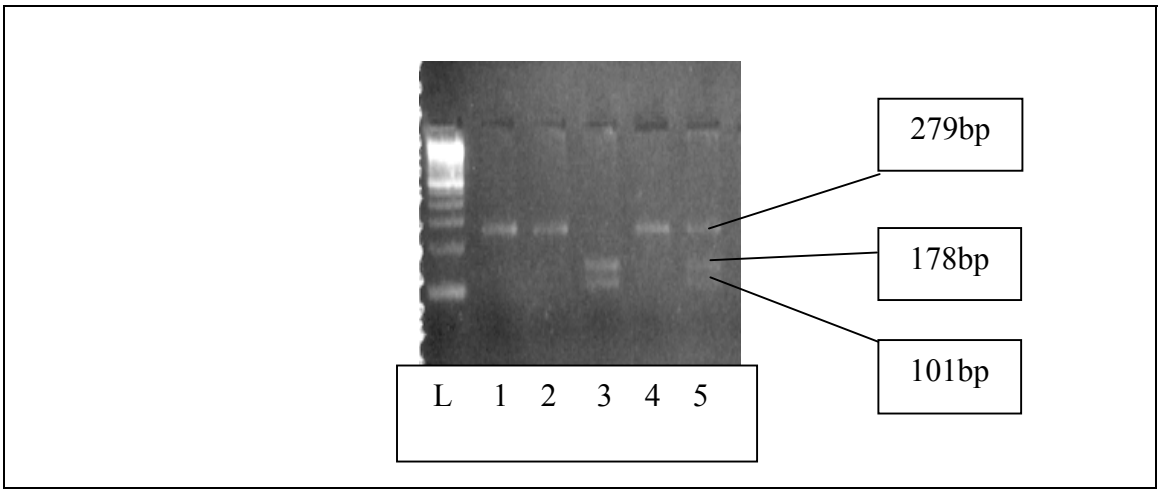

Abbildung 3. Verdau der PCR-Produkte des Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1 (rs29230) durch das Restriktionsenzym Xmn I:
Homozygot (279 bp): Position 1,2 und 4
Homozygot (101 bp / 178 bp): Bandennummer 3
Heterozygot (279bp + 101 bp / 178 bp):Position 5
Als Referenz diente eine 100 bp-Leiter (L)

3.3.2. Statistische Ergebnisse beim Vergleich von Allel2 im Exon 11 des GABBR1 (rs29230) mit dem Allel1 bei Patienten mit Krampfanfall

Verglichen wurden 55 Patienten, die einen Krampfanfall im Entzug erlebt hatten, mit 77 Alkoholkranken ohne schwere Entzugserscheinungen.
Ziel dieser Gegenüberstellung war es herauszufinden, ob Patienten, welche häufiger einen Krampfanfall erleiden, Träger des Allel2 sind, als die Probanden, bei denen das Allel1 in homozygotem Zustand vorliegt.
Für diese Berechung wurde der Fisher´s Exakte Test durchgeführt. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der einzelnen Felder dargestellt.

Es konnte kein signifikanter Wert nachgewiesen werden (p = 0,56; X^2 = 0,387).

	Allel1/Allel1 **279 bp/ 279 bp**	**Allel1/Allel2; Allel2/Allel2** **279 bp/ 178 bp+101 bp** **178 bp+101bp/ 178 bp+101 bp**	**Σ**	**P**	**X^2**
Krampfanfall	38 *69,09%*	17 *30,91%*	55 *100%*	0,56	0,387
Leichter Entzug	57 *74,03%*	20 *25,97%*	77 *100%*		
Σ	95	37	132		

Tabelle 11. Ergebnis des Vierfeldertests: Allelverteilung des Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1 (rs29230). Verglichen wurden Alkoholkranke mit Krampfanfall in der Entgiftung mit Alkoholkranken, die einen leichten Entzug durchgemacht haben. Wildtyp-Allel1 = 279 bp, Allel2 = 178 bp+101 bp. Die Angaben in Prozent beziehen sich auf die Allelverteilung in den einzelnen Gruppen. Σ = Spaltensumme bzw. Zeilensumme. p - Wert, X^2: Ergebnis berechnet nach Fisher´s Exaktem Test.

3.3.3 *Statistische Ergebnisse beim Vergleich von Allel2 im Exon 11 des GABBR1 (rs29230) mit dem Allel1 bei Alkoholkranken und gesunden Kontrollpersonen*

173 Patienten mit bekannter Alkoholkrankheit und 101 gesunde Kontrollpersonen wurden bezüglich des Allel2 von GABBR1 im Bereich von Exon 11 miteinander verglichen um festzustellen, ob es eine Korrelation zwischen dem Vorkommen dieser Variation und dem Auftreten der Alkoholkrankheit gibt .

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des Allel2 und der Diagnose Alkoholabhängigkeit mittels Fisher´s Exaktem Test berechnet werden ($p = 0{,}119$; $X^2 = 2{,}81$).

Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

	Allel1/Allel1 279 bp/ 279 bp	**Allel1/Allel2; Allel2/Allel2 279 bp/ 178 bp+101 bp 178 bp+101bp/ 178 bp+101 bp**	**Σ**	**P**	**X²**
Alkohol-kranke	121 *69,94%*	62 *30,06%*	173 *100%*	0,119	2,81
Gesunde Kontrollen	80 *79,21%*	21 *20,79%*	101 *100%*		
Σ	21	73	274		

Tabelle 12. Verteilung der Genotypen des Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1 (rs29230). Verglichen wurden Alkoholkranke mit gesunden Kontrollen. Wildtyp-Allel1 = 279 bp, Allel2 = 178 bp+101 bp. Die Angaben in Prozent beziehen sich auf die Genotypenverteilung in den einzelnen Kategorien. Σ = Spaltensumme bzw. Zeilensumme. p-Wert, X²: berechnet nach Fisher´s Exaktem Test.

3.4. Ergebnisse für den Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057)

3.4.1. Elektrophoretische Ergebnisse für den Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057)

Für den Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1-Gens sind bisher zwei unterschiedliche Allele beschrieben worden. Um die einzelnen Allele unterscheiden zu können, war ein Restriktions-Verdau des PCR-Produktes über 12 Stunden mit dem Restriktionsenzym Eag I erforderlich. Das Wildtyp-Allel1 des Gens stellt sich in der Elektrophorese mit zwei Banden dar, welche bei 258 bp und 183 bp liegen. Beim Allel2 findet sich nur eine Bande mit 441 bp. Die Genotypisierung war bei 180 Probanden erfolgreich. Aufgrund der Tatsache, dass bei über 150 durchgeführten DNA-Analysen von rs1805057 nur das Allel1 nachgewiesen werden konnte, und sich das Allel2 bei keinem der Studienteilnehmer fand, wurde die Genotypisierung wegen mangelnder statistischer Aussagekraft abgebrochen. Abbildung 4 zeigt das PCR-Produkt nach elektrophoretischer Auftrennung. Der Gelausschnitt in Abbildung 5 zeigt das Ergebnis nach dem Verdau.

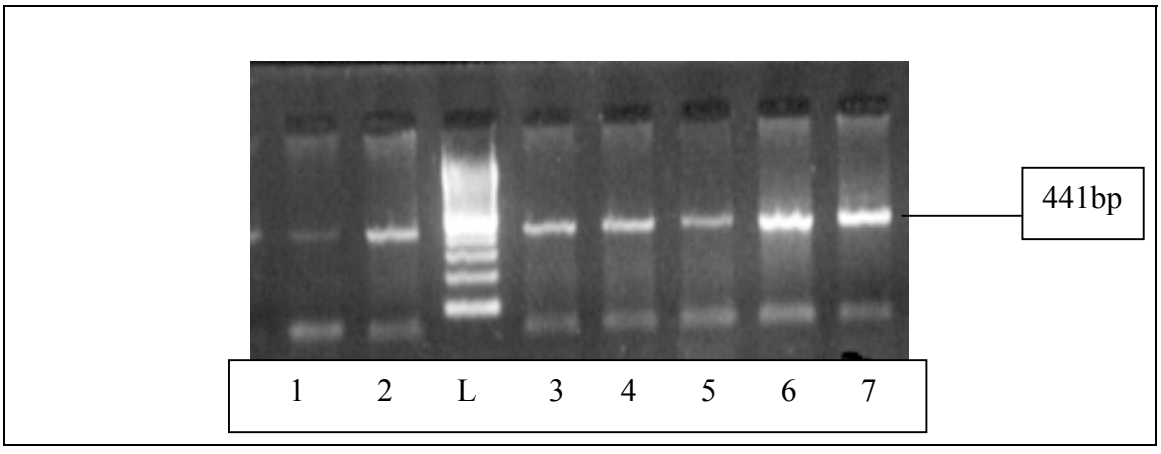

Abbildung 4. PCR-Produkt des Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057) vor dem Verdau. Die Banden liegen allesamt bei 441 bp. Eine 100 bp-Leiter (L) diente als Referenzparameter.

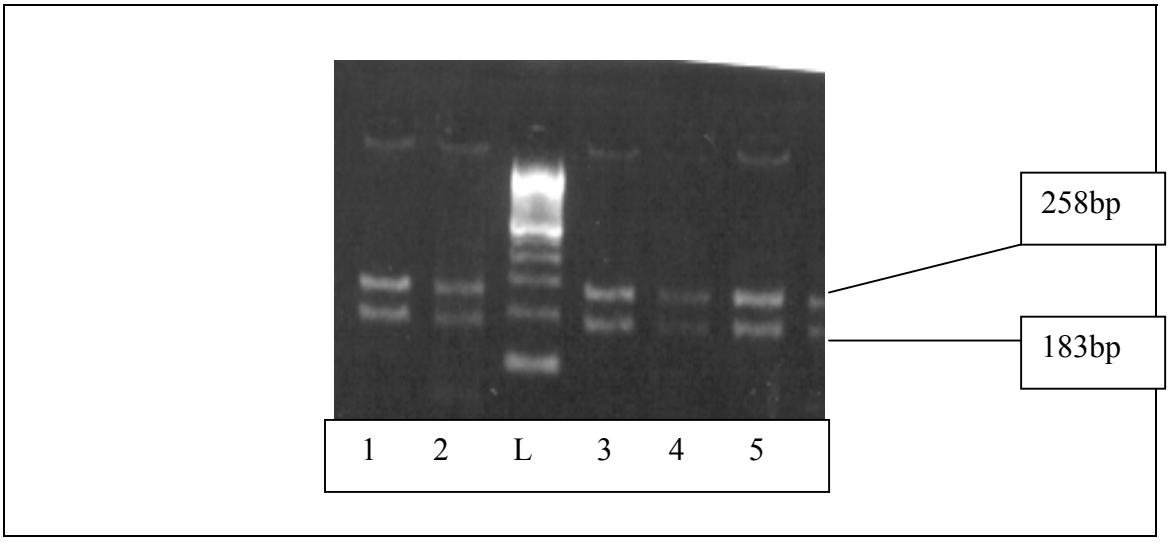

Abbildung 5. Das Gel zeigt die PCR-Produkte des Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057) nach dem Verdau. Alle in dieser Studie aufgenommenen Individuen sind Träger des Allel1 = 258+183 bp. Heterozygote oder für den Polymorphismus homozygote Genotypen konnten nicht gefunden werden. In der Mitte wurde die Referenzleiter (L) aufgetragen.

3.4.2. Statistische Ergebnisse des Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057)

Bei der Genotypisierung des Gens konnte nur ein Allel nachgewiesen werden, woraufhin die Analyse abgebrochen wurde. Eine differenzierende statistische Auswertung war daher nicht möglich.

3.5. Trinkmengen und Ergebnis

Eine Gruppe von 97 Patienten mit leichtem Entzug wurde mit 69 Patienten, die einen Krampfanfall in der Entgiftung hatten, bezüglich der konsumierten Alkoholmenge mit Hilfe des t-Tests verglichen. Das Ergebnis war mit p = 0,02

signifikant. Um die tägliche Trinkmenge auswerten zu können, wurden die Werte logarithmiert, um eine Normalverteilung der Angaben zu erhalten.

Beim Vergleich der logarithmierten Mittelwerte in den beiden Gruppen (Dif = -0,095) ergab sich, dass die Alkoholkranken ohne Entzugskrampfanfall täglich 25 % weniger getrunken haben, als die Alkoholkranken mit Krampfanfall. In Tabelle 13 wird der tägliche Alkoholkonsum von Alkoholabhängigen mit Krampfanfall verglichen mit dem der Probanden mit leichtem Entzug.

	Anzahl der Alkoholiker	**Tägl. Alkoholkonsum in g Mittelwert**	**P**
Pat. mit leichtem Entzug	n = 97	238,97	
Pat. mit Krampfanfall	n = 69	308,84	0,02
Σ	n = 166		

Tabelle 13. Vergleich des täglichen Alkoholkonsums zwischen Alkoholkranken mit leichtem Entzug und Probanden mit Krampfanfall. n = Anzahl der Alkoholabhängigen der jeweiligen Gruppe. Σ = Spaltensumme. p-Wert berechnet mittels t-Test.

4. Diskussion

4.1. Interpretation der Ergebnisse

4.1.1. Molekulare Grundlagen

Dank der molekularen Genetik ist es möglich, individuelle genetische Variabilität aufzuzeigen. Um klären zu können, ob diese Unterschiede beim Menschen eine pathogenetische Bedeutung haben, stehen zwei Analyseverfahren zur Verfügung: die Assoziations- und die Kopplungsuntersuchung.

In Assoziationsuntersuchungen können Individuen anhand ihres Phänotyps einer Gruppe zugeordnet werden, die dann einer Kontrollgruppe gegenübergestellt und mit ihr verglichen wird. Das Auftreten bestimmter Allele und Genotypen in beiden Gruppen kann anschließend auf Unterschiede überprüft werden. So lässt sich errechnen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung bei den Trägern des Allels oder Genotyps ist.
In Assoziationsstudien wird auf eine Untersuchung des gesamten Genoms verzichtet. Es werden nur die Marker für bekannte Gene verwendet. Meist handelt es sich um Gene, die für den Phänotyp der Erkrankung relevant sein könnten und daher als Kandidatengene bezeichnet werden.
Bei einem signifikanten Ergebnis muss jedoch nicht unbedingt der untersuchte Genabschnitt von Bedeutung sein, möglicherweise liegt er in enger Nachbarschaft zu einer am Krankheitsgeschehen beteiligten Sequenz. Es besteht dann ein Kopplungsungleichgewicht.

Im Gegensatz dazu wird bei einer Kopplungsstudie das gesamte Genom systematisch untersucht. Auch fokussiert die Kopplungsanalyse auf Vererbung innerhalb von Familien, während bei der Assoziationsstudie Gruppen miteinander verglichen werden. Um die verschiedenen Untergruppen der Alkoholkranken untereinander und mit der gesunden Kontrollgruppe bezüglich eines Merkmals vergleichen zu können, wurde hier eine

Assoziationsuntersuchung anhand von polymorphen Genen durchgeführt, die für die Genese einer Abhängigkeitserkrankung oder eines Anfallsleidens von Bedeutung sein könnten.

4.1.2. DAT1

4.1.2.1. Physiologische und pathologische Bedeutung des DAT1

Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Alkoholabhängigkeit kommt der dopaminergen Neurotransmission eine Schlüsselrolle zu. Das sogenannte dopaminerge Belohnungssystem ist eines der entwicklungsgeschichtlich ältesten Systeme. Dopaminerge Stimulation des ventralen Striatums, des Kernbereichs des hirneigenen Belohnungssystems, führt zum verstärkten Auftreten all jener Verhaltensweisen, die die Dopaminausschüttung verursacht haben. Wie andere Drogen mit Abhängigkeitspotential stimuliert Alkohol die Dopaminfreisetzung und verstärkt so den Alkoholkonsum (Wise 1988). Die alkoholinduzierte Dopaminausschüttung spielt daher eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Alkoholverlangens („Cravings“) und beeinflusst das Auftreten von Entzugssymptomen (Blum et al. 1990). In prospektiven Studien war das Ausmaß der Veränderung der dopaminergen Neurotransmission mit einem hohen Rückfallrisiko verbunden (Heinz et al. 1995, 1996).
Dieses hirneigene Verstärkungssystem wird durch die wiederholte Aufnahme von Alkohol immer empfindlicher. Daher können selbst kleine Mengen konsumierten Alkohols und Reize, die mit einem früheren Alkoholkonsum in Verbindung stehen, eine verstärkte dopaminerge Neurotransmission auslösen, die sich als Alkoholverlangen und verminderte Kontrolle über den Alkoholkonsum zeigt.
Bei chronischer Alkoholbelastung sind Dopaminsynthese und –freisetzung niedrig, der Dopamin-Umsatz bleibt allerdings hoch (Ollat et al. 1988). Dies führt zu einer erhöhten Sensitivität der Dopaminrezeptoren, welche die im akuten Entzug auftretenden Halluzinationen und Wahnsymptome erklärt.

Gelernter und Mitarbeiter (1994) haben eine Assoziationsstudie von DAT1 mit kokaininduzierter Paranoia durchgeführt und ein signifikant häufigeres Auftreten des Allel A9 bei den Probanden mit Paranoia gefunden.

Der Dopamintransporter ist verantwortlich für die Wiederaufnahme von Dopamin aus dem synaptischen Spalt in die Vesikel der Präsynapse und begrenzt somit die dopaminerge Aktivität im synaptischen Spalt.
Eine reduzierte dopaminerge Funktion kann auf einer erhöhten Transporteraktivität oder einer erhöhten Dichte der Dopamintransporter beruhen.
Es konnte anhand von SPECT-Untersuchungen eine veränderte Dichte der Dopamintransporter bei Alkoholabhängigkeit festgestellt werden (Tiihonen et al. 1995). Bei Alkoholkranken ohne Gewaltbereitschaft fand sich eine auffallend geringere Dichte an striatalen Dopamintransportern als bei gesunden Kontrollpersonen ($p < 0,001$), wohingegen gewaltbereite Alkoholiker eine leicht erhöhte Dopamintransporterdichte als die Kontrollgruppe vorwiesen ($p < 0,10$).

4.1.2.2. Frühere Untersuchungen und Ergebnisse dieser Studie

In einer in Japan durchgeführten Studie (Muramatsu und Higuchi 1995) wurde das DAT1 - Allel A7 in auffallend höherer Frequenz ($X^2 = 3,867$, $p < 0,05$) bei heterozygoten Alkoholikern gefunden, die durch eine Punktmutation ein inaktives Allel des Alkoholdehydrogenase 2-Genes (ALDH2*2) hatten. Diese Gruppe wurde verglichen mit gesunden Kontrollen und mit Alkoholkranken, die homozygot für das aktive ALDH2*1 waren.

Sander konnte mit seiner Arbeitsgruppe 1997 anhand einer Assoziationsstudie, die Alkoholkranke mit gesunden Kontrollen verglich, als erster zeigen, dass das Allel A9 signifikant häufiger ($p = 0,003$) bei Alkoholkranken mit schweren Entzugserscheinungen (Delirium tremens oder Krampfanfall) vorkommt.
Beim Vergleich der Subtypen der Alkoholkranken in Bezug auf das Auftreten schwerer Entzugssymptome wurde bei Typ II-Alkoholabhängigen mit 55,2 % ein

signifikant häufigeres Vorkommen als bei Typ I-Alkoholabhängigen (27 %) beobachtet (p = 0,002). Daraus wurde geschlossen, dass das stark ausgeprägte Trinkverhalten bei dem genetisch stärker beeinflussten Typ II-Alkoholabhängigen für die schwereren Entzugserscheinungen verantwortlich gemacht werden kann.
Unter den Typ II-Alkoholkranken wurde gegenüber der gesunden Kontrollgruppe eine signifikante Anzahl an A9-Allelträgern gefunden.
Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit allen Alkoholabhängigen der Studie sowie mit den Untergruppen der Alkoholabhängigen mit positiver Familienanamnese für Alkoholabhängigkeit, frühem Beginn der Erkrankung, antisozialem Verhalten und dem „Typ I“ und „Typ II“ nach Cloninger (1987) wurde kein signifikantes Ergebnis gefunden.
Es besteht der Verdacht, dass alkoholabhängige Patienten mit dem Allel A9 des DAT1 aufgrund von maladaptiven Vorgängen für Entzugssyndrome vulnerabler sind als Individuen, denen diese Genvariante fehlt (Schmidt et al. 1998).

Franke und Mitarbeiter untersuchten 1999 diesen Polymorphismus erneut im Hinblick auf einen Zusammenhang mit der Alkoholkrankheit. Allerdings wählten sie für ihre Untersuchung mit dem Transmissions-Disequilibrium-Test ein anderes statistisches Analyseverfahren, das die Vererbung von Allelen innerhalb von Familien berücksichtigt. In diese Studie wurden Alkoholkranke und ihre leiblichen Eltern aufgenommen. Es erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen: Die erste Gruppe beinhaltete Alkoholabhängige, die homo- oder heterozygote Träger des DAT1-Allels A9 waren, in der zweiten Gruppe befanden sich keine A9-Allelträger. Weiter wurden die Alkoholkranken in zwei Untergruppen aufgeteilt: in eine Gruppe mit Alkoholkranken, die einen leichten Entzug hatten, und in eine Gruppe mit Patienten, die ein Delirium tremens oder einen Krampfanfall durchgemacht hatten. Beim Vergleich der Alkoholkranken-Untergruppen mit dem relativen Erkrankungsrisiko konnte nicht nachgewiesen werden, dass A9-Allelträger häufiger einen schweren Entzug gehabt hätten als andere DAT1-Allelträger (p = 0,771). Da dieser Studie von Franke et al. (1999) allerdings, wie oben bereits erwähnt, ein anderes Analyseverfahren zugrunde

liegt, ist ein Vergleich mit den von Sander et al. (1997), Schmidt et al. (1998), und Gorwood et al. (2002) durchgeführten Untersuchungen, ebenso wie mit den aktuell vorliegenden Ergebnissen, nicht günstig.

2002 gelang es Gorwood und seinen Mitarbeitern als dritte Arbeitsgruppe, nach Sander et al. 1997 und Schmidt et al. 1998, einen Zusammenhang zwischen dem DAT1-Allel A9 und schweren Entzugserscheinungen nachzuweisen. Besonders Alkoholiker, die Alkohol tranken, um ihre Entzugserscheinungen zu lindern, fanden sich gehäuft unter den A9-Allelträgern ($p = 0,023$).

In der vorliegenden Studie wurde das Allel A9 signifikant häufiger bei Alkoholikern (48,87 %) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (32,35 %) gefunden ($p = 0,0056$). Nach der odds ratio (OR = 2, Konfidenzintervall 1,2-3,4) liegt bei einem Alkoholiker die Wahrscheinlichkeit bei 50 %, A9-Allelträger zu sein. In der Normalbevölkerung beträgt die Chance, Allelträger für das A9-Allel zu sein, lediglich 1:2.
Untersuchungen in dieser Studie, ob DAT1-A9-Allelträger mehr trinken als Träger anderer DAT1-Allele und somit das Auftreten eines Krampfanfalls provozieren, blieben ohne signifikantes Ergebnis.
Im Gegensatz zu den oben genannten vorherigen Untersuchungen konnte hier kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Allel A9 von DAT1 und schweren Entzugserscheinungen gefunden werden. Beim Vergleich der Alkoholiker mit leichtem Entzug mit denen mit Krampfanfall konnte lediglich ein nicht signifikanter p-Wert von 0,2122 ermittelt werden. Zieht man jedoch in Betracht, dass Sander Alkoholiker mit DT mit gesunden Kontrollpersonen und nicht mit Alkoholikern mit leichtem Entzug verglich, stehen die Ergebnisse beider Studien nicht in Widerspruch. In dieser Studie wurde, wie oben bereits erwähnt, ebenfalls das Allel A9 signifikant häufiger bei der Gruppe der Alkoholiker als bei den gesunden Probanden gefunden.
Aus Tierversuchen an Ratten geht außerdem hervor, dass der Dopamintransporter die Ausprägung von Krampfanfällen beeinflussen kann. Der Gehalt an Dopamin in der Präsynapse wird durch verschiedene Proteine

reguliert, welche die Dopaminsynthese, und -wiederaufnahme und den Transport in die Vesikel beeinflussen. Auf Ebene der mRNA werden für die Synthese verantwortliche Enzyme und Proteine beeinflusst. Bei einer Untergruppe der genetisch bedingt zur Epilepsie veranlagten Ratten (GEPR-3) fand sich ein auffallend erniedrigter mRNA-Spiegel beim Vergleich mit einer anderen Untergruppe der Ratten mit Veranlagung zu epileptischen Anfällen (GEPR-9) und Sprague-Dawley Ratten, dem Stamm, aus dem die GEPR gezüchtet wurden. Dieses Ergebnis könnte ein Zeichen für einen möglichen Einfluss von Dopamin auf die Regulation der Krampfbereitschaft der Tiere sein (Szot et al. 1996).

Strukturelle und funktionelle Bildgebungsverfahren ermöglichen die Lokalisation von zentralnervösen Läsionen degenerativer, metabolischer und struktureller Genese. Die Single Photon Emission Computer Tomographie (SPECT) ist ein rechnergestütztes Schichtaufnahmeverfahren zur Darstellung von Radioaktivitätsverteilungen im Organismus. Es wird in Einzelmessungen die Radioaktivitätsverteilung im interessierenden Areal aufgezeichnet und computergestützt berechnet. Aufgrund der langen Halbwertszeit der Radioisotope ist es möglich, die Verfügbarkeit von Rezeptoren und Transportern im Gleichgewicht zu messen.
Die Dichte der Dopamintransporter bei Alkoholkranken wird kontrovers diskutiert. Es wurde eine erhöhte Anzahl an Dopamintransportern bei nicht gewaltbereiten Alkoholkranken im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden, während bei gewaltbereiten Alkoholabhängigen im Vergleich zur Kontrollgruppe die Zahl der Transporter erniedrigt ist (Tiihonen et al. 1995). Eine niedrigere Anzahl an DAT-Protein in der Präsynapse bei Typ I-Alkoholkranken wurde in einer weiteren Studie bestätigt (Repo et al. 1999). Eine verminderte Transporterdichte wird auch als Konsequenz akuter Entzugssymptome nach starkem Alkoholkonsum betrachtet (Liane et al. 1999). Bei einer Studie, welche die Verfügbarkeit des DAT-Proteins im Striatum bei Alkoholkranken mit dem VNTR - Polymorphismus untersuchte, wurde eine geringere Anzahl von DAT-Transportern bei A9-Allelträgern gefunden (Heinz et al. 2000). Mittels SPECT

und der Plasmakonzentration des Radioliganden I-123 β-CIT wurde versucht, die DAT-Protein – Verfügbarkeit bei abstinenten Alkoholkranken und gesunden Kontrollen zu quantifizieren. Probanden, die heterozygot für die DAT1 – Allele A9 und A10 waren, hatten durchschnittlich 22 % weniger DAT-Protein zur Verfügung als die Personen mit dem homozygoten Genotyp A10/A10. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen Alkoholismus und DAT-Dichte hergestellt werden, somit beeinflusst der VNTR-Polymorphismus des DAT1 die Translation des DAT- Proteins, welches wiederum die extrazelluläre Dopaminkonzentration reguliert. Diese Reduktion der DAT - Verfügbarkeit bei Alkoholabhängigen kann für das Auftreten schwerer Entzugssymptome relevant sein, da dann plötzliche Schwankungen in der Dopaminfreisetzung auftreten (Rosetti et al. 1992).

Die verminderte Anzahl von Dopamintransportern bei A9-Allelträgern kann die Entfernung von Dopamin aus dem synaptischen Spalt verzögern und somit einen erhöhten Dopaminspiegel zwischen Prä- und Postsynapse zur Folge haben. Dieser dauerhaft erhöhte Dopaminspiegel kann das Suchtverhalten im Sinne einer positiven Verstärkung unterstützen und aufrechterhalten. Die Aktivierung des Belohnungssystems führt zum Auftreten all jener Verhaltensweisen, die den Dopaminspiegel ansteigen lassen. Alkohol verstärkt als belohnender Stimulus die Dopaminfreisetzung und –wirkung und somit auch den Alkoholkonsum.

Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass in der vorliegenden Studie keine signifikant erhöhte täglich konsumierte Alkoholmenge bei A9-Allelträgern, im Vergleich zu Alkoholkranken ohne dieses Allel, gefunden werden konnte ($p = 0,7224$).

Mittlerweile wurde ein weiterer Polymorphismus des DAT1 gefunden, der eine signifikante Assoziation mit der Alkoholkrankheit aufweist ($p = 0,019$) (Ueno et al. 1999). Dieses G2319A-Allel wurde in der 3´- nicht translatierten Region gefunden, die an den in dieser Studie untersuchten 3´-VNTR - Polymorphismus angrenzt (Wernicke et al. 2002).

4.1.3. GABBR1

4.1.3.1. Physiologische Bedeutung des Neurotransmitters GABA

Der Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) hat eine hemmende Wirkung auf das zentrale Nervensystem.
Durch chronischen Alkoholkonsum wird das körpereigene GABA-System herunterreguliert („Down-Regulation“), da Ethanol GABA-ähnliche Wirkung besitzt. Im Entzug fällt nun die supprimierende Wirkung des Alkohols weg, und es kommt daher zu einer verminderten Hemmung des Erregungsniveaus des ZNS, was in 5-35% zu Alkoholentzugskrampfanfällen führt (Soyka et al. 1989).

Die Homöostase des Gehirns wird durch die Sedierung mit Alkohol aus dem Gleichgewicht gebracht. Als autoregulatives Organ reagiert es mit einer regulatorischen Verminderung der $GABA_A$-Rezeptoren, über die ein wichtiger Teil der sedierenden Wirkung von Alkohol vermittelt wird.
Bei Unterbrechen der Alkoholzufuhr ist das Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung gestört: Im Entzug trifft der exzitatorische Botenstoff Glutamat auf eine erhöhte Zahl glutamaterger Rezeptoren, wohingegen sein Gegenspieler, der sedierende Neurotransmitter GABA, nur auf eine reduzierte Rezeptorenzahl einwirken kann.
Durch diese Verschiebung kann es durch die übermäßige Erregung unter anderem zu Krampfanfällen kommen.
Auch bei der Pathogenese der Epilepsie spielt dieser Mangel an Hemmungsfähigkeit durch Verminderung von GABA eine wichtige Rolle. Auf molekularer Ebene sind Veränderungen in Membraneigenschaften einzelner Neurone zu beobachten, die aufgrund spontaner Depolarisationen zu Entladungsserien fortgeleiteter Nervenimpulse führen. Dabei sind die physiologischen GABAergen Hemmungsvorgänge zwischen den Zellen abgeschwächt, oder exzitatorische Transmittersubstanzen werden vermehrt freigesetzt. Diese spontane Depolarisation einer Zelle breitet sich aufgrund der

mangelnden Inhibition zu weiteren Zellen in der Nachbarschaft, später auch über größere Distanzen, aus.

Bisher wurden drei verschiedene GABA-Rezeptoren identifiziert:

$GABA_A$ mit ionotropem Charakter findet sich meist an postsynaptischen Membranen. Ein Grossteil der GABAergen Effekte beruht auf der Bindung an diesen Rezeptor. Durch Gabe von $GABA_A$-Agonisten (z.B. Benzodiazepine) können die u.a. durch Alkoholmissbrauch hervorgerufenen Entzugssymptome effektiv verringert werden (Frye et al. 1986).

$GABA_B$, ein metabotroper Rezeptor, ist gewöhnlich an Prä- und Postsynapse lokalisiert. Der $GABA_B$-Rezeptor, der zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, moduliert die synaptische Transmission durch Verringerung der Neurotransmitterabgabe in der Präsynapse (Isaacson und Hille 1997; Wu und Saggau 1997; Brenowitz et al. 1998). Ein anderer Weg der Inhibition durch $GABA_B$ ist eine postsynaptische Zunahme der K^+-Leitfähigkeit, welche für die langanhaltende Hemmung postsynaptischer Potentiale verantwortlich ist.
Eine Zunahme der $GABA_B$-Rezeptorbindung und Suppression der funktionellen Verbindung zwischen $GABA_B$-Rezeptor und Adenylatcyclase wurde während der Alkoholabhängigkeit beobachtet (Kuriyama et al. 1994). Während der Abhängigkeit scheint die chronische Alkoholzufuhr bei Ratten die durch $GABA_B$-Rezeptoren gesteuerte präsysnaptische GABA-Freisetzung im Hippocampus negativ zu beeinträchtigen (Peris et al. 1997).

Des weiteren existiert ein *$GABA_C$-Rezeptor* (Johnston 1986), der bisher nur an der Retina gefunden wurde und dessen Funktion noch nicht bekannt ist.

4.1.3.2. Ergebnisse dieser Untersuchung diskutiert im Zusammenhang mit der Literatur

Sander et al. untersuchten 1999 zum ersten mal den Zusammenhang von Polymorphismen des GABBR1 und der erhöhten Prädisposition für Alkoholabhängigkeit:
Beim Vergleich von einer Gruppe Alkoholabhängiger mit einer gesunden Kontrollgruppe kam es weder bei der Exon1-Variante noch bei dem Polymorphismus im Bereich des Exon 7 (rs1805057) zu einer signifikanten Verteilung der Allele, wohingegen die Variation im Exon 11 (rs29230) häufiger bei den Alkoholkranken als in der Kontrollgruppe vorkam ($p = 0,032$).

Bei der vorliegenden Untersuchung von GABBR1 konnte, wie bereits 1999 bei der Studie der von Sander geführten Arbeitsgruppe aus Berlin, kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem Auftreten von schweren Entzügen festgestellt werden ($p = 0,56$). Allerdings verglich Sander eine Gruppe von Alkoholkranken ($n = 108$) mit unterschiedlichen Entzugserscheinungen, also auch Delirium tremens, mit den gesunden Kontrollen ($n = 234$). Eine genaue Angabe über den Anteil der Probanden, welche nur einen Krampfanfall im Entzug hatten, liegt nicht vor, da diese Gruppe als Alkoholkranke mit Krampfanfall und bzw. oder Delirium tremens zusammengefasst wurde.
In der aktuell durchgeführten Studie wurden Alkoholkranke mit Krampfanfall im Entzug ($n = 55$) Alkoholkranke mit leichten Entzugserscheinungen ($n = 77$) gegenübergestellt, ohne dass ein signifikantes Ergebnis ermittelt werden konnte.

Auch Parsian und Zhang (1999) ermittelten wie Sander et al. (1999b) eine positive Assoziation zwischen Alkoholabhängigkeit und GABBR1 ($p = 0,0043$). Diese Untersuchung bezog sich jedoch, im Gegensatz zu der Untersuchung von der Arbeitsgruppe von Sander, auf ein $GABA_B$-Rezeptor-Gen, welches auf

dem kurzen Arm des Chromosom 4 lokalisiert ist. Somit ist ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen dieser Studie ungünstig.

In der vorliegenden Untersuchung wurde im Gegensatz zu den von Sander und Mitarbeitern (1999b) und Parsian und Zhang (1999) durchgeführten Studien, keine signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus des GABBR1 (rs29230) und der Diagnose „Alkoholkrankheit“ gefunden (p = 0,119).

Man stellt sich die Frage, ob GABBR1 weiterhin als Kandidatengen für den schweren Entzug, insbesondere den Krampfanfall, postuliert werden sollte, da bisherige Untersuchungen wenig aussagekräftig waren. Sinnvoller wäre es, die Rolle des $GABA_B$-Rezeptors bezüglich der Alkoholabhängigkeit weiter zu untersuchen, da die Studien von Sander (1999b) und Parsian und Zhang (1999) diesbezüglich eine signifikante Korrelation ermittelten.

Bei der Genotypisierung des Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057), von 97 Alkoholikern und 83 Kontrollpersonen, konnte nur das Allel1 gefunden werden. Aufgrund dessen wurde wegen mangelnder statistischer Aussagekraft die DNA-Analyse des GABBR1 Polymorphismus im Exon 7 (rs1805057) eingestellt. Bei der von Sander und Mitarbeitern (1999b) durchgeführten Studie bezüglich des GABBR1 und Alkoholabhängigkeit fand sich das Allel2 bei 13 % der Alkoholiker mit schwerem Entzug (n = 108) und bei 6,8 % der Kontrollpersonen (n = 234). Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Sander lassen sich entweder durch ethnisch-regionale Unterschiede oder durch Mängel in der Methodik erklären. Auffallend war, dass das Allel1 durch die Restriktionsendonukleasen gespalten (258 bp + 183 bp) werden konnte, das Allel2 stellt sich allerdings elektrophoretisch mit nur einer Bande von 441 bp dar. Da vor dem Restriktions-Verdau alle Banden, für das Allel1 wie für das Allel2, 441 bp lang waren, und sich nach dem Verdau ausschließlich zwei Banden mit 258 bp und 183 bp darstellen ließen, ist ein grober Fehler im Rahmen des Restriktions-Verdaus unwahrscheinlich. Ein methodischer Fehler im Vorfeld erscheint unwahrscheinlich, kann aber nicht gänzlich ausgeschossen

werden. Da die Stichprobe von Sander aus einer etwa 1000 km entfernten Region stammt sehen wir darin eine mögliche Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse.

4.1.4. Auswirkung der Trinkmenge auf die Entzugsschwere

Exzessives Trinken von Alkohol kann epileptische Anfälle provozieren (Marchal 1999). Beim Vergleich einer Gruppe mit Alkoholikern ohne Krampfanfall mit einer Gruppe von Alkoholkranken, die einen Krampfanfall im Entzug hatten, konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass die Alkoholiker mit schwerem Entzug 25 % mehr Alkohol am Tag getrunken haben als die Alkoholiker mit nur leichten Symptomen.
Inwieweit dieses Ergebnis objektivierbar ist, lässt sich nicht sagen, da die Information der täglich konsumierten Alkoholmenge aus subjektiven Angaben der Erkrankten besteht. Auch muss hierbei berücksichtigt werden, dass sich die Dauer der Abhängigkeit ebenfalls auf das Erleiden eines Krampfanfalls im Entzug auswirkt und der Alkoholkonsum selten über Jahre konstant bleibt.

5. Zusammenfassung

Bei Unterbrechung oder Verminderung der Alkoholzufuhr kann es bei Alkoholabhängigen zu einem Alkoholentzugssyndrom kommen. Die Ausprägung dieses Krankheitsbildes ist individuell unterschiedlich und kann von leichten Symptomen bis hin zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie Krampfanfällen und Delirium tremens führen. Faktoren wie Dauer der Abhängigkeit, täglich getrunkene Alkoholmenge und eine genetisch bedingte Veranlagung scheinen hierbei unter anderem eine Rolle zu spielen.

Zwillings- und Adoptionsstudien belegen einen genetischen Einfluss auf die Ausprägung der Alkoholabhängigkeit. In dieser Studie wurde untersucht, ob genetische Polymorphismen des DAT1 und des GABBR1 mit schweren Entzugserscheinungen bei Alkoholabhängigen (insbesondere mit dem Alkoholentzugskrampfanfall) oder mit der Diagnose Alkoholabhängigkeit assoziiert sind. Auch wurde die tägliche Trinkmenge in Bezug auf das Auftreten eines Krampfanfalls analysiert.

Beim Vergleich der Gruppe von Alkoholikern mit gesunden Kontrollpersonen konnte ein signifikant häufigeres Auftreten des DAT1-Allels A9 bei alkoholabhängigen Individuen gefunden werden.
Signifikante genetische Unterschiede der in dieser Studie untersuchten Kandidatengene zwischen Alkoholikern mit leichten Entzugserscheinungen und denen mit Krampfanfall in der Entgiftung konnten nicht nachgewiesen werden.

Für die die Polymorphismen des GABBR1 im Bereich von Exon 7 (rs1805057) bzw. Exon 11 (rs29230) konnten keine signifikanten Ergebnisse hinsichtlich ihres Einflusses auf den Alkoholentzug und auf die Ausprägung einer Alkoholabhängigkeit berechnet werden.
Bei der Genotypisierung des Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1 (rs1805057) konnte nur ein Allel nachgewiesen werden. Aufgrund dessen

wurde wegen mangelnder statistischer Aussagekraft die weitere Analyse abgebrochen. Ein grober Fehler im Rahmen des Restriktions-Verdaus ist unwahrscheinlich. Ein Grund dafür, dass in der vorliegenden Untersuchung nur ein Allel gefunden werden konnte, könnte durch ethnisch-regionale Unterschiede erklärt werden, da die Stichprobe von Sander aus einer etwa 1000 km entfernten Region stammt.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung kann davon ausgegangen werden, dass die Schwere der Entzugssymptome während der Alkoholentgiftung von der täglichen Trinkmenge bestimmt wird.
Beim Vergleich der Trinkmenge mit dem Auftreten des DAT1-Allels A9 konnte kein signifikanter Zusammenhang beschrieben werden.

6. Literaturverzeichnis

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 Res Health 13, 371-374

Ballenger J.C., Post R.M. (1978): Kindling as a model for alcohol withdrawal syndromes. Br J Psychiatry 133, 1-14

Blum K., Noble E., Sheriden P., Montgomery A., Ritchie T., Jagadeeswaran P., Nogami H., Briggs A., Cohn J. (1990): Allelic association of human D_2 Dopamine receptor gene in alcoholism. Am J Med 263, 2055-2060

Blum K., Sheridan P.J., Wood R.C. (1995): Dopamine D2 receptor gene variants: association and linkage studies in impulsive-addictive-compulsive behavior. Pharmacogenetics 5, 121-141

Brailovsky S., Garcia O. (1999): Ethanol, GABA and Epilepsy. Arch Med Res 30, 3-9

Brenowitz S., David J., Trussel L. (1998): Enhancement of synaptic efficacy by presynaptic $GABA_B$ receptors. Neuron 20, 135-141

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

Byerley W., Hoff M., Holik J., Caon M.G., Giros B. (1993): VNTR polymorphism for the human dopamine transporter gene (DAT1). Hum Mol Genet 2, 335

Cadoret R.J., Cain D.A., Grove W.M. (1980): Development of alcoholism in adoptees raised apart from alcoholic biologic relatives. Arch Gen Psychiatry 37, 561

Cloninger C., Bohmann M., Sigverdsson S. (1981): Inheritance of alcohol abuse: cross-fostering analysis of adopted men. Arch Gen Psychiat 38, 861-868

Clonigner C. (1987): Neurogenetic adaptive mechanism in alcoholism. Science 236, 412-420

Cloninger C., Sigverdsson S., Bohman M. (1996): Type I and type II alcoholism: an update. Alcohol Wld 20, 18-20

Crabb D.W., Edenberg H.J., Bosron W.F., Li T.K. (1989): Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2 allele is dominant. J Clin Invest 83, 314-316

Crabbe J.C., Phillips T.J., Buck K.J. (1999): Identifying genes for alcohol and drug sensibility: recent progress and future directions. Trends Neurosci 22, 173-179

Croissant B., Mann K. (2000): Alkoholentzug und seine Behandlung. Ther Umsch 4, 257-260

Devor E.J, Cloninger C.R., Hoffman P.L., Tabakoff B. (1994): Association of monoamine oxidase (MAO) activity with alcoholism and alcoholic subtypes. Am J Med Genet 48, 209-213

Dunnen J.R., Antonarakis S.E. (2001): Nomenclature for the description of sequence variations. Hum Genet 109 (1), 121-124

Feuerlein W. (1969): Sucht und Süchtigkeit. Münch Med Wschr 111, 2593

Feuerlein W. (1972): Zur Frage des Alkoholentzugs-Syndroms. Nervenarzt 43, 247

Feuerlein W. (1997): Alkoholismus – Missbrauch und Abhängigkeit. Thieme, Stuttgart, New York

Franke P., Schwat S.G., Knapp M., Gansicke 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

Frye G.D., McCown T.J., Breese G.R., Peterson S.I. (1986): GABAergic modulation of inferior colliculus excitability: role in the ethanol withdrawal audiogenic seizures. J Pharmacol Exp Ther 237, 478-485

Gelernter J., Kranzler H.R., Satel S.L., Rao P.A. (1994): Genetic association between dopamine transporter protein alleles and cocaine-induced paranoia. Neuropsychopharmacology 11, 195-200

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

Gorwood P., Limosin F., Batel P., Hamon M., Ades J., Boni C. (2002): The A9 Allele of the DAT Gene is Associated with Delirium Tremens and Alcohol-Withdrawal Seizure. Biol Psychiatry 53, 85-92

Hall W., Zador D. (1997): The alcohol withdrawal syndrome. Lancet 349, 1897 – 1900

Hallikainen T., Saito T., Lachmann H.M., Volavka J., Pohjalainen T., Pyynanen O.P., Kauhanen J., Syvalahti E., Hietala J., Tiihonen J. (1999): Association between low activity serotonin transporter promoter genotype and early onset alcoholism with habitual impulsive violent behavior. Mol Psychiatry 4, 385-388

Heinz A., Dufeu P., Kuhn S., Dettling M., Graf K., Kurten I., Rommelspacher H., Schmidt L.G. (1995): Psychopathological and behavioral correlates of dopaminergic sensitivity in alcohol-dependent patients. Arch Gen Psychiatry 53, 1123-1128

Heinz A., Schmidt K., Sällström S. (1996): Influence of Dopaminergic Transmission on Severity of Withdrawal Syndrom in Alcoholism. J Stud Alcohol 57, 471-474

Heinz A., Goldman D., Jones D.W., Palmour R., Hommer D., Gorey J.G., Lee K.S., Linniola M., Weinberger D.R. (2000): Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. Neuropsychopharmacology 22, 133-139

Hrubec Z., Omenn G.S. (1981): Evidence of genetic predisopsition 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

Isaacson J.S., Hille B. (1997): $GABA_B$-mediated presynaptic inhibition of excitatory transmission and synaptic vesicle dynamics in cultured hippocampal neurons. Neuron 18, 143-152

Johnston G.A.R. (1986): Multiplicity of GABA receptors. S. 57-71
In: Alan R.: Receptor Biochemistry and Methodology; 5. Aufl., Olsen R.W & Venter, Lissabon

Jorm A.F., Henderson A.S., Jacomb P.A., Christensen H., Korten A.E., Rodgers B., Tan X., Easteal S. (1998): An association study of a functional polymorphism of the serotonin transporter gene with personality and psychiatric symptoms. Mol Psychiatry 3, 449-451

Kang A.M., Palmatier A., Kidd K.K. (1999): Global Variation of a 40-bp VNTR in the 3´-Untranslated Region of the Dopamine Transporter Gene (SLC6A3). Society of Biological Psychiatry 46, 151-160

Kidd K.K., Pakstis J.J., Castiglione C.M. (1996): DRD2 haplotypes containing the TaqI A1 allele: implications for alcoholism research. Alcohol Clin Exp Res 20, 697-705

Küfner H., Kraus L. (2002): Epidemiologische und ökonomische Aspekte des Alkoholismus. Dtsch Arztebl 14, 936-945.

Kuriyama K., Mizutani H., Hirochi M., Ichida T., Hashimoto T. (1994): Alteration in cerebral $GABA_B$ receptor function during formation of alcohol dependence. Alcohol 2, 193-197

Liane T., Ahonen A., Heikkilä J, Pyhtinen J,.Räsänen P. (1999): Dopamine transporters increase in human brain after alcohol withdrawal. Mol Psychiatry 4, 189-191

Maelicke A. (1996): Kontrolle des Dopaminspiegels und Kokainabhängigkeit. Nachr Chem Tech Lab 44, 388-389

Mann K. (2001): Neurobiologie der Alkoholabhängigkeit. Dtsch Arztebl 36, 2279-2283

Marchal C. (1999): Alcohol and epilepsy. Rev Prat 49, 383-386

Mehta A., Ticku M.K. (1988): Ethanol potentiation for GABAergic transmission in cultured spinal cord neurons involves GABA A-gated chloride channels. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics 246, 558-564

Merikangas 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. Nucleid Acids Res 16,1215

Muramatsu T., Higuchi S. (1995): Dopamine transporter gene polymorphism and alcoholism. Biochem Biophys Res Commun 211, 28-32

Nakatome M., Honda K., Islam M.N., Terada M., Yamazaki M., Kuroko H., Ogura Y., Bai H., Wakasugi C. (1995) : Amplification of DAT1 (Human Dopamine Transporter Gene) 3´ Variable Region in the Japanise Population. Hum Hered 45, 262-265

Ollat H., Parvez H., Parvez Z. (1988): Alcohol and central neurotransmission. Neurochem Int 13, 533-538

Parsian A., Zhang Z.H. (1999): Human Chromosomes 11p15 and 4p12 and Alcohol Dependence: Possible Association With the GABRB1 Gene. Am J Med Gen 88, 533-538

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

Peris J., Eppler B., Hu M., Walker D.W., Hunter B.E., Mason K. (1997): Effects of chronic ethanol exposure on GABA receptors and $GABA_B$ receptor modulation of 3-H-GABA release in hippocampus. Alcohol Clin Exp Res 21, 1047-1052

Peters H.C., Kammerer G., Volz A., Kaupmann K., Ziegler A., Bettler B., Epplen J.T., Sander T., Riess O. (1998): Mapping, genomic structure, and polymorphism of the human $GABA_BR1$ receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. Neurogenetics 2, 47-54

Pickens R.W., Sviskis D.S., Mc Gue 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

Repo E., Kuikka J.T., Bergström K.A., Karhu J., Hiltunen J., Tiihonen J. (1999): Dopamine transporter and D2-receptor density in late-onset alcoholism. Psychopharmacology 147, 314-318

Röder A. (2001): Alkoholmissbrauch – die Deutsche Krankheit. Der Allgemeinarzt 15, 1126-1128

Rommelspacher H. (1996): Welche neurobiologischen Mechanismen erklären Aspekte süchtigen Verhaltens? S. 42-51
In: Mann K., Buchkremer G. (Hrsg.): Sucht. Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Fischer, Stuttgart

Rossetti Z.L., Melis F., Carboni S., Diana M., Gessa G.L. (1992): Alcohol withdrawal in rats is associated with marked fall in extraneural dopamine. Alcohol Clin Exp Res 16, 529-532

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. (1997): 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., Hoehe M., Lesch K.P., Rommelspacher H., Schmidt L.G. (1998) : Serotonin transporter gene variants in alcohol-dependent subjects with dissocial personality disorder. Biol Psychiatry 43, 908-912

Sander T., Peters C., Kämmerer G., Samochowiec J., Zirra M., Mischke D., Ziegler A., Kaupmann K., Bettler B., Epplen J.T., Riess O. (1999a): Association Analysis of Exonic Variants of the Gene Encoding the $GABA_B$ Receptor and Idiopathic Generalized Epilepsy. Am J Med Genet 88, 305-310

Sander T., Samochowiec J., Ladehoff M., Smolka M., Peters C., Riess O., Rommelspacher H., Schmidt L.G. (1999b): Association analysis of exonic variants of the gene encoding the $GABA_B$ receptor and alcohol dependence. Psychiatr Genet 9, 69-73

Sano A., Kondoh K., Kakimoto Y., Kondo I. (1993): A 40-nucleotide repeat polymorphism in the human dopamine transporter gene. Hum Genet 91, 405-406

Schmidt L.G., Harms H., Kuhn S., Rommelspacher H., Sander T. (1998): Modification of Alcohol Withdrawal by the A9 Allele of the Dopamine Transporter Gene. Am J Psychiatry 155, 174-178

Schmidt L.G., Sander T. (2000): Genetics of alcohol withdrawal. Eur Psychiatry 15, 135-139

Soyka M., Lutz W., Kauert G., Schwarz A. (1989): Epileptic seizures and alcohol withdrawal: significance of additional use (and misuse) of drugs and electroencephalographic findings. J Epilepsy 2, 109-113, 163-174

Soyka M. (1995): Wirksamkeit von Acamprosat in der Rückfallprophylaxe der Alkoholabhängigkeit. Nervenheilkunde 14, 83-86

Soyka M. (1996): Alkoholhalluzinose – Pathophysiologie, Klinik und Therapie. Nervenarzt 67, 891-895

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

Szot P., Reigel C.E., White S.S., Veith R.C. (1996): Alterations in mRNA expression of systems that regulate neurotransmitter synaptic content in seizure-naïve genetically epilepsy-prone rat (GEPR): transporter proteins and rate-limiting synthesizing enzymes for norepinephrine, dopamine and serotonin. Brain Res Mol Brain Res 43(1-2), 233-245

Thomasson H.R., Edenberg H.J., Crabb D.W., Mai X.L., Jerome R.E., Li T.K., Wang S.P., Lin Y.T., Lu 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., Kuikka J., Bergström K.A., Hakola P., Karhu J., Ryynänen O.P., Föhr J. (1995): Altered striatal dopamine re-uptake site densities in habitually violent and non-violent alcoholics. Nat Med 1, 654-657

Ueno S., Nakamura M., Mikami M., Kondoh K., Ishiguro H., Arinami T., Komiyama T., Mitsushio H., Sano A., Tanabe H. (1999): Identification of a novel polmorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene and the significant association with alcoholism. Mol Psychiatry 4, 552-557

Vandenbergh D., Persico A.M., Hawkins A.L., Griffin C.A., Xiang L., Jabs E.W., Uhl G.L. (1992a): Human Dopamine Transporter Gene (DAT1) Maps to Chromosome 5p15.3 and Displays a VNTR. Genomics 14, 1104-1106

Vandenbergh D., Persico A.M., Uhl G.R. (1992b): A human dopamine transporter cDNA predicts reduced glycosylation, displays a novel repetitive element and provides racially-dimorphic TaqI RFLPs. Brain Res Mol Brian Res 15, 161-166

Vanyukov M.M., Moss H.B., Yu L.M., 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

Ventura J., Green M.F., Shaner A., Liberman R.P. (1993): Training and Quality Assurance with the BPRS. Int J Methods Psychiatry Res 3, 221-224

Ventura J., Liberman R.P., Green M.F., Shaner A., Mintz J. (1998): Training and Quality Assurance with the Structured Clinical Interview for DSM IV (SCID-I). Psychiatry Res 79, 163-173

Wan F.J., Berton F., Madamba S.G., Francesconi W., Siggins G.R. (1996): Low ethanol concentrations enhance GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in Hippocampal Pyramidal neurons only after block of $GABA_B$ receptors. Proc Natl Acad Sci 93, 5049-5054

Wernicke C., Smolka M., Gallinat J., Winterer G., Schmidt L.G., Rommelspacher H. (2002): Evidence for the importance of the human dopamine transporter gene for withdrawal symptomatology of alcoholics in a German population. Neurosci Lett 333, 45-48

Wetterling T., Veltrup C. (1997): Diagnostik und Therapie von Alkoholproblemen. Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Wetterling T., Driessen M., Kanitz W.D., Junghanns K. (2001): The severity of alcohol withdrawal is not age dependent. Alcohol Alcohol 36, 58-75

White J.H., Wise A., Main M.H., Green A., Fraser N.J., Disney G.H., Barne A.A., Emson P., Foord S., Marshall F.H. (1998): Heterodimerization is required for the formation of a functional $GABA_B$ receptor. Nature 396, 679-682

Wise R.A. (1988): The neurobiology of craving: implications for the understanding and treatment of addiction. J Abnorm Psychol 97, 118-132

Wu L.G., Saggau P. (1997): Presynaptic inhibition elecited neurotransmitter release. Trends Neurosci 20, 204-212

7. Anhang

7.1. Ergebnisse der Gelelektrophorese

Tabelle 14. Befunde der Gelelektrophorese der Kontrollgruppe:
ID = Identifikationsnummer; Status = Gruppenzugehörigkeit; N = Kontrollgruppe; E= aus der Studie ausgeschlossen; Geschl. = Geschlecht; m = männlich; w = weiblich; bp = Basenpaare; rs29230 = Polymorhismus im Exon 11 des GABBR1; rs1805057 = Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1; *= immer in homozygotem Zustand, nicht genotyp. = nicht genotypisiert.

ID	Status	Alter	Geschl.	DAT1 in bp		rs29230 in bp		rs1805057* in bp
1	N	55	m	450	450	279	101+178	258+183
2	N	41	w	450	450	279	279	258+183
3	N	55	w	410	450	279	279	258+183
4	N	29	m	450	450	101+178	101+178	258+183
5	N	39	m	450	450	279	101+178	258+183
6	N	35	w	450	450	279	279	258+183
7	N	34	m	450	450	279	279	258+183
8	N	29	m	450	450	279	279	258+183
9	N	38	m	450	530	279	279	258+183
10	N	34	w	410	450	279	101+178	258+183
11	N	40	m	450	450	279	279	258+183
12	N	28	m	450	450	279	279	258+183
13	N	31	w	410	450	279	279	258+183
14	N	30	m	450	450	279	279	258+183
15	N	26	w	450	450	279	101+178	258+183
16	N	51	w	410	450	279	279	258+183
17	N	46	w	450	450	279	101+178	258+183
18	N	35	w	410	450	279	279	258+183
19	N	30	w	410	450	279	279	258+183
20	N	38	m	450	450	279	279	258+183
21	N	30	m	450	450	279	279	258+183

Tabelle 14.

Fortsetzung Tabelle 14.

ID	Status	Alter	Geschl.	DAT1		rs29230		rs1805057*
22	N	31	m	450	450	279	279	258+183
23	N	32	w	450	450	279	279	258+183
24	N	25	m	450	450	279	279	258+183
25	N	29	m	450	450	279	279	258+183
26	N	30	m	410	450	279	279	258+183
27	N	30	w	450	450	279	101+178	258+183
28	N	37	m	410	450	279	279	258+183
29	N	35	m	410	490	279	279	258+183
30	N	39	m	450	450	279	279	258+183
31	N	38	w	410	450	279	101+178	258+183
32	N	40	m	450	450	279	279	258+183
33	N	26	m	410	450	279	101+178	258+183
34	N	28	m	410	450	279	279	258+183
35	N	26	m	450	490	279	279	258+183
36	N	38	w	450	450	279	101+178	258+183
37	N	40	w	450	450	279	279	nicht genotyp
38	N	27	m	450	450	279	279	258+183
39	N	28	m	450	450	279	279	258+183
40	N	25	w	410	450	279	279	258+183
41	N	24	w	450	450	279	101+178	258+183
42	N	27	w	450	450	279	279	258+183
43	N	24	w	450	450	279	279	258+183
44	N	32	m	410	450	279	279	258+183
45	N	26	w	450	450	279	279	258+183
46	N	36	m	450	450	279	279	258+183
47	N	30	m	450	450	279	279	258+183
48	N	25	w	450	450	279	279	258+183
49	N	59	m	410	450	279	279	258+183
50	E					279	279	258+183
51	E			450	450	279	279	258+183
52	N	37	w	410	410	279	279	258+183
53	N	57	m	450	450	279	279	258+183
54	N	46	m	450	450	279	279	258+183

Tabelle14.

Fortsetzung Tabelle 14.

ID	Status	Alter	Geschl.	DAT1		rs29230		rs1805057*
55	N	37	m	450	450	279	101+178	258+183
56	N	49	w	450	450	279	279	258+183
57	N	30	m	450	450	279	279	258+183
58	N	54	w	450	450	279	101+178	258+183
59	N	56	m	450	450	279	101+178	258+183
60	N	38	m	450	450	279	101+178	258+183
61	N	44	m	410	450	279	101+178	258+183
62	E	31	m	410	450	279	101+178	258+183
63	N	29	m	450	450	279	279	258+183
64	N	28	w	290	410	279	101+178	258+183
65	N	24	m	450	450	279	101+178	258+183
66	N	25	m	450	450	279	279	258+183
67	N	26	m	450	450	279	279	258+183
68	N	26	m	450	450	279	101+178	258+183
69	E			450	450	279	279	258+183
70	N	60	m	450	450	279	101+178	258+183
71	N	40	m	450	450	279	279	258+183
72	N	29	m	410	450	279	101+178	258+183
73	N	26	w	410	450	279	279	nicht genotyp
74	N	30	m	450	450	279	279	258+183
75	N	39	m	450	450	279	101+178	258+183
76	N	39	m	450	450			258+183
77	N	27	w	450	450	279	279	258+183
78	N	51	w	450	450	279	279	nicht genotyp.
79	N	49	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
80	N	52	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
81	N	57	w	450	450	279	279	258+183

Tabelle 14.

Fortsetzung Tabelle 14.

ID	Status	Alter	Geschl.	DAT1		rs29230		rs1805057*
82	E	30	m	450	450	279	101+178	258+183
83	E	35	m	410	450	279	279	nicht genotyp.
84	N	30	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
85	N	53	m	410	450	279	279	258+183
86	E	60	m	450	450	279	279	258+183
87	E	49	w	450	450	279	279	258+183
88	N	31	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
89	N	50	w	450	450	279	279	nicht genotyp.
90	N	49	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
91	N	38	m	410	450	279	279	nicht genotyp.
92	N	28	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
93	N	36	m	410	450	279	279	nicht genotyp.
94	N	38	m	410	450	279	279	258+183
95	N	39	m	450	450	279	279	258+183
96	N	54	w	450	450	279	279	nicht genotyp.
97	N	57	m	410	450	279	279	nicht genotyp.
98	N	62	m	410	450	279	279	nicht genotyp.
99	N	54	w	410	450	279	279	nicht genotyp.
100	N	41	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
101	N	34	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
102	N	26	m	410	450	279	279	nicht genotyp.
103	N	25	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
104	N	26	m	410	450	279	279	nicht genotyp.
105	N	28	w	450	450	279	279	nicht genotyp.
106	N	49	m	410	410	279	279	nicht genotyp.
107	N	41	w	410	450	279	279	nicht genotyp.
108	N	48	m	450	450	279	279	nicht genotyp.
109	N	59	m	410	450	279	279	nicht genotyp.
110	N	54	w	410	450	279	279	nicht genotyp.

Tabelle 14.

Tabelle 15. . Befunde der Gelelektrophorese der Alkoholiker

ID = Identifikationsnummer; Stat.= Status = Gruppenzugehörigkeit; A = Alkoholiker mit leichem Entzug; D = Alkoholiker mit Delirium; K = Alkoholiker mit Krampfanfall; DK = Alkoholiker mit Delirium und Krampfanfall; E = Ausgeschlossen aus der Studie; Geschl.= Geschlecht; m = männlich; w = weiblich; Alk/d = Menge des getrunkenen Alkohols am Tag in g; bp = Basenpaare; rs29230 = Polymorphismus im Exon 11 des GABBR1; rs1805057 = Polymorphismus im Exon 7 des GABBR1; nicht genotyp. = nicht genotypisiert; *= immer in homozygotem Zustand.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1 in bp		rs29230 in bp		rs1805057 in bp*
1	D	m	800	61	410	410	101+178	101+178	nicht genotyp.
2	K	m	900	45	450	450	101+178	101+178	258+183
3	DK	m	200	40	410	450	279	279	258+183
4	D	m	320	60	450	450	279	279	nicht genotyp.
5	D	m	160	51	410	450	279	279	258+183
6	DK	m	135	41	410	450	279	279	258+183
7	DK	m	1600	43	410	410	279	279	258+183
8	A	m	800	30	450	450	279	279	258+183
9	A	m	135	41	450	450	279	279	258+183
10	A	m	280	41	410	450	279	279	258+183
11	A	m	200	50	410	410	279	279	258+183
12	K	m	160	47	450	450	279	279	258+183
13	DK	w	350	55	410	450	279	279	258+183
14	A	m	160	45	450	450	279	101+178	258+183
15	D	m	440	44	450	450	279	101+178	258+183
16	D	m	400	59	450	450	279	279	258+183
17	D	m	1200	53	450	450	279	279	258+183
18	D	m	500	32	410	410	279	279	258+183
19	D	m	100	42	450	450	279	279	258+183
20	D	m	400	46	450	450	279	279	258+183
21	D	w	152	42	410	450	279	279	nicht genotyp.
22	K	m	450	39	410	450	279	279	258+183
23	K	m	160	46	410	450	279	279	nicht genotyp.

Tabelle 15.

Fortsetzung Tabelle 15.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1		rs29230		rs1805057*
24	A	m	140	45	450	450	279	279	nicht genotyp.
25	K	w	60	45	410	410	279	279	258+183
26	K	m	104	39	450	450	279	279	258+183
27	D	m	400	56	410	450	279	279	258+183
28	D	m	200	35	450	450	279	279	258+183
29	A	m	140	57	410	450	279	279	258+183
30	A	m	300	45	410	450	279	279	258+183
31	A	w	400	47	450	450	279	279	258+183
32	A	m	200	40	450	450	279	279	258+183
33	A	w	380	32	450	450	279	101 +178	258+183
34	A	m	200	49	450	490	279	279	258+183
35	A	m	300	47	450	450	279	279	258+183
36	A	m	160	56	410	450	279	279	258+183
37	A	m	110	43	450	450	279	101+ 178	258+183
38	A	m	240	49	410	450	279	279	258+183
39	A	m	110	38	410	450	279	279	258+183
40	A	m	130	50	410	450	279	279	258+183
41	E	w	600	42	410	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
42	DK	m	120	48	410	450	279	279	nicht genotyp.
43	K	w	400	39	410	450	279	279	nicht genotyp.
44	D	m	280	43	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
45	DK	m	160	62	410	450	279	279	nicht genotyp.
46	A	m	180	52	410	450	279	279	258+183
47	A	m	360	32	450	450	279	279	258+183
48	K	m	150	48	410	450	279	279	258+183
49	A	m	200	35	450	450	279	279	258+183
50	A	w	150	27	450	450	279	101+ 178	258+183
51	A	m	200	54	450	450	279	279	258+183
52	E	m	.	37	450	450	279	279	nicht genotyp
53	A	m	280	43	450	450	279	279	258+183
54	D	m	200	38	450	450	279	27	nicht genotyp
55	A	w	120	58	410	450	279	279	258+183

Tabelle 15.

Fortsetzung Tabelle 15.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1		rs29230		rs1805057*
56	A	m	800	43	450	450	279	279	258+183
57	A	w	100	37	410	450	279	101+ 178	258+183
58	A	w	120	41	410	450	279	279	258+183
59	A	m	200	40	410	450	279	279	258+183
60	E	w	300	47	410	450	279	279	258+183
61	E						279	101+ 178	nicht genotyp.
62	A	m	300	42	410	410	279	279	nicht genotyp.
63	A	m	200	33	450	450	279	279	nicht genotyp.
64	D	m	170	41	450	490	279	101+ 178	nicht genotyp.
65	E						279	279	nicht genotyp.
66	A	m	400	36	410	450	279	279	nicht genotyp.
67	A	w	600	51	450	450	279	279	nicht genotyp.
68	A	m	600	36	450	450	279	279	nicht genotyp.
69	A	m	60	34	450	450	279	279	nicht genotyp.
70	A	w	160	50	410	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
71	A	m	120	36	450	450	279	279	nicht genotyp.
72	A	m	300	36	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
73	A	m	160	34	410	450	279	279	nicht genotyp.
74	E	w	400	50	410	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
75	A	m	200	31	450	450	279	279	nicht genotyp.
76	A	m	250	36	450	450	279	279	nicht genotyp.
77	D	m	210	34	410	450	279	279	nicht genotyp.
78	D	m	400	54	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
79	DK	m	500	38	410	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
80	DK	w	200	31	410	450	279	279	nicht genotyp.
81	E	m	400	57	.	.	279	279	nicht genotyp.
82	D	m	120	47	410	450	279	279	258+183
83	D	w	480	61	450	450	279	279	258+183
84	DK	m	120	61	450	450	279	279	258+183
85	D	m	600	43	450	450	279	279	258+183
86	D	w	160	28	450	450	279	279	258+183

Tabelle 15.

Fortsetzung Tabelle 15.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1		rs29230		rs1805057*
87	E	m	.	32	410	450	279	279	nicht genotyp.
88	A	m	400	45	450	450	279	279	258+183
89	DK	m	350	41	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
90	D	w	290	51	410	450	279	279	258+183
91	DK	m	146	49	410	410	279	101+ 178	258+183
92	DK	m	240	49	410	450	279	279	258+183
93	D	m	120	52	410	450	279	101+ 178	258+183
94	D	m	230	62	450	450	101+ 178	101+ 178	258+183
95	A	m	160	40	410	450	279	279	nicht genotyp.
96	A	m	400	48	450	450	279	279	258+183
97	A	w	400	42	410	450	279	279	258+183
98	A	w	200	46	410	410	279	101 +178	258+183
99	A	w	280	30	450	450	279	279	258+183
100	A	m	400	30	410	450	279	101+ 178	258+183
101	K	m	400	36	410	450	279	279	258+183
102	E	m	560	39	.	.	279	279	nicht genotyp.
103	D	m	80	60	450	450	279	101+ 178	258+183
104	A	w	190	36	450	450	279	101 +178	nicht genotyp.
105	A	m	340	48	410	450	279	279	258+183
106	A	m	200	34	410	450	279	279	258+183
107	D	w	120	63	410	450	279	101 +178	258+183
108	DK	m	144	57	410	450	279	279	nicht genotyp.
109	DK	m	150	54	410	450	279	279	258+183
110	K	m	300	46	450	450	279	101+ 178	258+183
111	K	m	400	37	450	450	279	279	258+183
112	DK	m	900	43	450	450	279	279	258+183
113	D	m	120	43	410	450	279	279	258+183
114	DK	m	400	41	450	450	279	101 +178	258+183
115	D	m	140	42	450	450	279	279	nicht genotyp.

Tabelle 15.

Fortsetzung Tabelle 15.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1		rs29230		rs1805057*
116	D	m	200	31	410	410	279	101+178	258+183
117	DK	w	160	54	450	450	279	279	258+183
118	A	m	300	47	410	450	279	279	258+183
119	A	m	120	38	410	450	279	279	nicht genotyp.
120	A	w	120	38	450	450	279	279	nicht genotyp.
121	A	m	130	36	410	450	279	101+178	nicht genotyp.
122	A	m	120	50	450	450	279	279	nicht genotyp.
123	A	m	120	31	450	450	279	279	nicht genotyp.
124	A	w	800	39	450	450	279	279	nicht genotyp.
125	A	w	120	61	410	450	279	279	nicht genotyp.
126	A	w	240	50	410	450	279	101+178	nicht genotyp.
127	D	m	120	41	450	450	279	101+178	nicht genotyp.
128	DK	m	240	38	450	450	279	101+178	nicht genotyp.
129	D	m	400	51	410	450	279	279	nicht genotyp.
130	D	m	520	30	410	450	279	101+178	nicht genotyp.
131	DK	m	500	38	410	450	279	279	nicht genotyp.
132	DK	m	260	27	410	450	279	279	nicht genotyp.
133	DK	m	400	35	410	450	279	101+178	nicht genotyp.
134	D	m	200	45	410	450	279	279	nicht genotyp.
135	D	m	200	46	450	450	279	279	nicht genotyp.
136	D	m	300	42	450	450	279	279	nicht genotyp.
137	D	m	240	41	450	450	279	279	nicht genotyp.
138	D	m	380	53	450	450	279	279	nicht genotyp.
139	DK	m	320	42	450	450	279	279	nicht genotyp.
140	D	m	120	47	450	450	279	279	nicht genotyp.
141	D	m	240	46	410	450	279	279	nicht genotyp.
142	DK	m	280	42	450	450	279	279	nicht genotyp.
143	D	m	200	45	450	450	101+178	101+178	nicht genotyp.
144	DK	w	140	37	450	450	279	279	nicht genotyp.
145	D	m	160	58	450	450	279	279	nicht genotyp.
146	DK	m	240	59	450	450	279	279	nicht genotyp.

Tabelle 15.

Fortsetzung Tabelle 15.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1		rs29230		rs1805057*
147	D	m	700	38	410	450	279	101+178	nicht genotyp.
148	D	m	100	45	450	490	279	279	nicht genotyp.
149	D	m	240	47	450	450	279	101+178	nicht genotyp.
150	K	m	280	36	410	490	279	279	nicht genotyp.
151	K	m	400	51	410	450	279	101+178	nicht genotyp.
152	K	m	600	49	410	450	279	101+178	nicht genotyp.
153	K	m	120	44	410	450	279	279	258+183
154	A	m	200	46	450	450	279	101+178	258+183
155	DK	m	300	32	450	450	279	101+178	nicht genotyp.
156	A	m	300	38	450	450	279	279	258+183
157	A	m	200	37	410	450	279	279	258+183
158	A	m	240	38	450	450	279	279	258+183
159	A	m	180	48	450	450	279	279	nicht genotyp.
160	A	m	340	35	450	450	279	279	nicht genotyp.
161	A	m	120	58	450	450	279	279	nicht genotyp.
162	A	m	160	34	410	450	279	279	258+183
163	A	m	160	53	410	450	279	279	nicht genotyp.
164	A	w	360	28	410	450	279	279	nicht genotyp.
165	A	m	510	33	450	450	279	279	nicht genotyp.
166	A	w	160	42	450	450	279	279	nicht genotyp.
167	K	m	200	52	410	450	279	101+178	nicht genotyp.
168	A	w	270	33	410	450	279	279	nicht genotyp.
169	A	w	200	37	450	450	279	279	258+183
170	D	m	250	43	410	450	279	279	258+183
171	D	m	800	45	450	450	279	279	258+183
172	K	m	400	36	450	450	279	279	nicht genotyp.
173	DK	m	300	43	450	450	279	101+178	nicht genotyp.
174	A	m	240	31	410	450	279	279	258+183
175	A	w	80	46	450	450	279	101+178	258+183
176	D	m	280	52	450	450	279	279	nicht genotyp.

Tabelle 15.

Fortsetzung Tabelle 15.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1		rs29230		rs1805057*
177	E	m			450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
178	A	m	150	41	410	450	279	279	nicht genotyp.
179	A	m	180	41	410	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
180	E	m			410	450	279	279	nicht genotyp.
181	E	m			410	450	279	279	nicht genotyp.
182	K	m	273	50	450	450	279	279	nicht genotyp.
183	E	m			450	450	279	279	nicht genotyp.
184	K	m	200	62	410	450	279	279	nicht genotyp.
185	K	w	160	41	410	410	279	279	nicht genotyp.
186	D	m	200	43	450	450	279	279	nicht genotyp.
187	K	m	110	40	450	450	279	279	nicht genotyp.
188	A	m	216	45	410	450	279	279	nicht genotyp.
189	K	m	400	43	410	410	279	279	nicht genotyp.
190	K	m	250	50	410	410	279	279	nicht genotyp.
191	A	m	400	56	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
192	A	m	160	42	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
193	E	m	180	39	410	450	279	101+ 178	258+183
194	E	m	160	45	450	450	279	101+ 178	258+183
195	A	w	21	48	450	450	279	279	258+183
196	K	m	380	21	450	450	279	279	258+183
197	K	m	310	44	450	450	279	279	258+183
198	A	m	280	38	450	450	279	101+ 178	258+183
199	A	m	96	47	410	450	279	279	258+183
200	E	m			450	450	279	279	258+183
201	E	w			450	450	279	279	258+183
202	D	m	200	50	450	450	279	101+ 178	258+183
203	D	m	380	41	450	450	279	279	258+183
204	D	m	500	40	410	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
205	DK	m	350	37	450	450	279	101+ 178	258+183

Tabelle 15.

Fortsetzung Tabelle 15.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1		rs29230		rs1805057*
206	D	w	26	52	450	450	279	279	258+183
207	D	m	560	47	410	450	279	279	258+183
208	K	m	280	40	410	410	279	279	258+183
209	D	m	50	59	450	450	279	279	nicht genotyp.
210	A	w	80	41	410	410	279	279	nicht genotyp.
211	A	m	140	41	410	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
212	A	m	220	31	410	450	279	279	nicht genotyp.
213	A	m	142	36	450	450	279	279	nicht genotyp.
214	A	m	250	31	410	450	279	279	258+183
215	A	m	260	47	410	450	279	279	nicht genotyp.
216	A	w	300	32	410	450	279	279	258+183
217	A	w	80	55	410	450	279	101 +178	258+183
218	E		140				279	279	nicht genotyp.
219	K	m	80	54	450	450	279	279	nicht genotyp.
220	K	m	400	33	410	450	279	279	nicht genotyp.
221	K	m	220	35	410	450	279	279	nicht genotyp.
222	A	m	300	44	410	450	279	279	nicht genotyp.
223	A	m	200	55	410	450	279	279	nicht genotyp.
224	A	m	220	31	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
225	A	w	80	47	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
226	A	m	200	45	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
227	K	m	160	56	450	450			nicht genotyp.
228	K	m	600	44	450	450	279	279	nicht genotyp.
229	DK	m	320	47	410	410	279	101+ 178	258+183
230	K	m	130	46	410	450	279	279	nicht genotyp.
231	K	w	180	40	410	450	279	279	nicht genotyp.
232	K	m	120	63	450	450	279	101+ 178	258+183
233	K	m	600	42	450	450	279	279	258+183
234	K	m	300	43	450	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
235	K	m	.	64	410	450	279	279	nicht genotyp.

Tabelle 15.

Fortsetzung Tabelle 15.

ID	Stat.	Geschl.	Alk/d	Alter	DAT 1		rs29230		rs1805057*
236	E	w	160	50	410	410	279	101+ 178	nicht genotyp.
237	DK	w	600	42	410	450	279	279	nicht genotyp.
238	DK	w	100	69	410	450	279	279	nicht genotyp.
239	K	m	288	45	410	450	279	101+ 178	nicht genotyp.
240	K	m	160	54	410	450	279	279	nicht genotyp.

Tabelle 15.

7.2. Verteilung der Allele

7.2.1. DAT1-Allele

Allel	N	A6	A7	A9	A10	A11	A12	Σ
Anzahl der Wiederholungen		6	7	9	10	11	12	
Basenpaarlänge		290 bp	330 bp	410 bp	450 bp	490 bp	530 bp	
Kontrollen $f_{Bev}(A)$ Nach Sano		0,000	0,009	0,042	0,930	0,019	0,000	1,000
$f_{KA}(A)$	54	0,000	0,000	0,213	0,768	0,019	0,000	1,000
$f_{Alk}(A)$	211	0,000	0,000	0,279	0,712	0,009	0,000	1,000
$f_{leicht}(A)$	97	0,000	0,000	0,263	0,732	0,005	0,000	1,000
$f_{Kontrollen}(A)$	102	0,005	0,000	0,171	0,809	0,010	0,005	1,000

Tabelle 16. Frequenz der Allele des DAT1 nach Sano (1993) und aus der vorliegenden Studie

$f_{Bev}(A)$ = Häufigkeit der einzelnen Allele in der japanischen Bevölkerung, erhoben von Sano. Das Wildtyp-Allel A10 kommt mit 93% am häufigsten in der gesunden Bevölkerung vor.

Frequenz der Allele bei den Probanden der vorliegenden Studie:

N = Anzahl der Probanden, $f_{KA}(A)$ = Patienten mit Krampfanfall, $f_{Alk}(A)$ = Alkoholiker, $f_{leicht}(A)$ = Patienten mit leichtem Entzug, $f_{Kontrollen}(A)$ = Kontrollgruppe.

7.2.2. Allele des Polymorphismus des GABBR1 im Bereich von Exon 11 (rs29230)

	N	Allel2 homozygot C/C	Allel2/Allel1 C/T	Allel1 homozygot T/T	Σ
f_{Alk}(A)	352	0,023	0,239	0,652	1,000
$f_{Kontrollen}$(A)	227	0,031	0,317	0,652	1,000

Tabelle 17. Allelfrequenzen des Polymorphismus des GABBR1 im Bereich von Exon 11 (rs29230) nach Sander 1999. N = Anzahl der Probanden, f_{Alk}(A) = Alkoholiker, $f_{Kontrollen}$(A) = Kontrollgruppe.

	N	Allel2/Allel1 C/T	Allel1 homozygot T/T	Σ
f_{KA}(A)	69	0,138	0,862	1,000
f_{Alk}(A)	220	0,141	0,859	1,000
f_{leicht}(A)	97	0,119	0,881	1,000
$f_{Kontrollen}$(A)	101	0,109	0,891	1,000

Tabelle 18. Allelfrequenzen des Polymorphismus des GABBR1 im Bereich von Exon 11 (rs29230) der vorliegenden Studie. N = Anzahl der Probanden, f_{KA}(A) = Patienten mit Krampfanfall, f_{Alk}(A) = Alkoholiker, f_{leicht}(A) = Patienten mit leichtem Entzug, $f_{Kontrollen}$(A) = Kontrollgruppe.

7.3. Material

7.3.1. Geräte

Autoclav	Typ CV – EL 10 L	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

Gelkamera	GelCam	Polaroid, St. Albans, UK
Kühlschrank		Linde, Köln
Mikrowelle	Compact Y50	Moulinex, Solingen
PCR-Gerät	Personal Cycler 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-Transluminator	Macro Vue UV 20	Hoefer, San Francisco, USA
Vortex-Gerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries Bohemia, USA
Wärmeschrank	T6060	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Universal 16R	Hettich, Tuttlingen

7.3.2. Zubehör und Gefäße

Blutentnahmemonovetten EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfcup 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Kunststoffglasreagenzröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
PCR-Reaktionsgefäße	Biometra, Göttingen
Polaroidfilm Typ 667	Polariod, St. Albans, UK
Quarzglasküvette	Merck Eurolap, Bruchsal
Wachsfolie	American National Can, Chicago, USA
Falcon-Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg

7.3.3. Chemikalien

1 kb DNA-Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
100 bp DNA-Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose NA	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Aqua ad injektabilia	Delta Phamra, 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, Damrstadt
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
HCL	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
MgCl	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
NaCl	Sigma, Deisenhofen
NE-Buffer 2	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
NE-Buffer 3	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

7.3.4. Enzyme

Taq-Polymerase	Gibco BRL, Karlsruhe
Eag I	New England Biolabs, Frankfurt am Main
XmnI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Pronase	Roche, Mannheim

7.3.5. Primer

Die Primer stammen von der Firma MWG Biotech in Ebersberg. Die Primersequenzen stammen aus den Angaben der Literatur und sind bereits in Tabelle 3, Kapitel 2.2.3. aufgeführt.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Köhnke für die Überlassung des Themas und die beispielhafte Beratung. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Gaertner und Frau PD Gaertner für ihre Unterstützung.

Zu besonderem Dank bin ich auch Herrn Prof. Buchkremer als Klinikleiter verpflichtet.

Herrn Dr. Vonthein vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung danke ich für die statistische Beratung, sowie Herrn Dr. Kolb für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der Stichproben und Herrn Dr. Bauer vom Insitut für Humangenetik für die Beratung.

Mein Dank gilt auch allen Patienten und Kontrollpersonen, die für diese Studie zu gewinnen waren, und den Mitarbeitern der Stationen A3 und B6, die trotz des engmaschig organisierten Stationsalltages immer mit Rat und Tat zur Stelle waren.

Ein Dankeschön geht auch an Claudia Diermeier und Thomas Maurer für die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit und an meine Eltern für ihre konstante Unterstützung.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:	Sandra Maurer, geb. Schick geboren am 25. November 1978 in Stuttgart Familienstand: verheiratet mit Thomas Maurer Kraftfahrzeugtechnikermeister, Karosseriebauer
Eltern:	Dr. med. Günther Gustav Schick, Arzt Erika Helga Schick, geb. Singer, Krankenschwester
Geschwister:	Thomas, geboren am 25.12.1981, Finanzassistent
Schulbildung	1985-1989 Berkenschule Holzgerlingen 1989-1998 Schönbuch-Gymnasium Holzgerlingen Abitur 1998 in Holzgerlingen
Berufsausbildung	seit Oktober 1998 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen Im September 2000 Physikum Im August 2001 Erstes Staatsexamen Im September 2003 Zweites Staatsexamen Am 16. November 2004 Drittes Staatsexamen