

Aus der Klinik und Hochschulambulanz für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Sektion Klinische Neurobiologie

DISSERTATION

Assoziation zwischen Polymorphismen des GABA_B- und des Dopamin-D₂-
Rezeptorgens und der Alkoholabhängigkeit

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Murat Ladehoff

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Rommelspacher
 2. Prof. Dr. med. H. Fink
 3. Prof. Dr. med. R. Morgenstern

Datum der Promotion: 23.03.2007

Eigene Veröffentlichungen, die im Zusammenhang zur Dissertation stehen:

Samochowicz, J., M. Ladehoff, J. Pelz, M. Smolka, L. G. Schmidt, H. Rommelspacher and U. Finckh (2000).

"Predominant influence of the 3'-region of dopamine D2 receptor gene (DRD2) on the clinical phenotype in German alcoholics."

Pharmacogenetics 10(5): 471-5.

Sander, T., M. Ladehoff, J. Samochowicz, U. Finckh, H. Rommelspacher and L. G. Schmidt (1999).

"Lack of an allelic association between polymorphisms of the dopamine D2 receptor gene and alcohol dependence in the German population."

Alcohol Clin Exp Res 23(4): 578-81.

Sander, T., J. Samochowicz, M. Ladehoff, M. Smolka, C. Peters, O. Riess, H. Rommelspacher and L. G. Schmidt (1999).

"Association analysis of Exonic variants of the gene encoding the GABAB receptor and alcohol dependence."

Psychiatr Genet 9(2): 69-73.

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	6
1.1	Abhängigkeitskrankheiten	6
1.2	Definition des Alkoholmißbrauchs und der Alkoholabhängigkeit.....	6
1.3	Historie und Epidemiologie der Alkoholabhängigkeit	6
1.4	Symptomatik der Alkoholkrankheit.....	8
1.5	Subtypisierung der Alkoholabhängigkeit	9
1.6	Pathogenese und genetische Disposition der Alkoholabhängigkeit.....	10
1.6.1	Familienuntersuchungen.....	10
1.6.2	Zwillingsstudien.....	11
1.6.3	Adoptionsuntersuchungen	13
1.7	Molekulargenetische Methoden zur Identifizierung krankheitsdisponierender Genvarianten	14
1.7.1	Krankheitsdisponierende Genvarianten	16
1.8	GABAerge Neurotransmission	17
1.9	Dopaminerges Neurotransmittersystem.....	18
1.10	Zielstellung.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Geräte.....	21
2.2	Chemikalien	22
2.3	Enzyme und Längenstandards	22
2.4	Puffer	23
2.5	Sonstiges	23
2.6	Synthetische Oligonukleotide.....	23
2.7	Studienteilnehmer	24
2.7.1	alkoholabhängige Studienteilnehmer	24
2.7.2	Kriterien für die Gruppe der Alkoholabhängigen	25
2.7.3	Kontrollkollektiv	26
2.8	DNA-Analyse	27
2.8.1	Isolierung und Aufbereitung menschlicher genomischer DNA.....	27
2.8.2	Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA und Überprüfung der Reinheit.....	28
2.8.3	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.8.4	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)	30
2.8.5	Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren	30
2.8.6	Horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese	31
2.8.7	Vertikale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	31
2.8.8	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	32
2.9	Kandidatengenpolymorphismen	33
2.9.1	DNA-Amplifikation.....	34
2.9.2	DNA-Verdau: DRD ₂ -Exon 8-A/G-Polymorphismus	34
2.9.3	DNA-Verdau: DRD ₂ -141C-Ins-/Del-Polymorphismus.....	35
2.9.4	DNA-Verdau: GABA _B -Exon 1a1-Ala20Val-Substitutionspolymorphismus.....	35
2.9.5	DNA-Verdau: GABA _B -Exon 7-Gly489Ser-Substitutionspolymorphismus.....	35
2.9.6	DNA-Verdau: GABA _B -Exon 11-T1974C-Nukleotidaustausch	35

Inhalt	5
2.10 Statistische Analysen.....	36
2.10.1 Allel-Häufigkeiten und Hardy-Weinberg-Gleichgewicht:.....	36
2.10.2 Kopplungs-Analysen	36
2.10.3 Haplotypen-Schätzung.....	37
3 ERGEBNISSE	38
3.1 DRD2-Polymorphismen	38
3.1.1 Allel- und Genotyp-Häufigkeiten des Exon 8-A/G-Polymorphismus.....	38
3.1.2 Allel- und Genotyp-Häufigkeiten des -141C Ins/Del-Polymorphismus	39
3.1.3 -141C Ins/Del-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	40
3.1.4 Allel- und Genotyp-Häufigkeiten des TaqI A1/A2-Polymorphismus	41
3.1.5 TaqI A1/A2-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	42
3.1.6 paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht: -141C x Exon8	43
3.1.7 paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht: -141C x TaqI A.....	44
3.1.8 paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht: Exon8 x TaqI A	45
3.1.9 Genotyp-Häufigkeiten	46
3.1.10 Haplotypen-Schätzung.....	47
3.2 GABA-B-Rezeptor-Polymorphismen.....	48
3.2.1 Allel- und Genotyp-Häufigkeiten des Ala20Val-Polymorphismus.....	48
3.2.2 Ala20Val-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus.....	49
3.2.3 Allel- und Genotyp-Häufigkeiten des: Gly489Ser-Polymorphismus	50
3.2.4 Gly489Ser-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	51
3.2.5 Allel- und Genotyp-Häufigkeiten des: T1974C-Polymorphismus	52
3.2.6 T1974C -Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	53
4 DISKUSSION	54
4.1 Methodik	54
4.2 Populationsstratifikation	55
4.3 -141C-Ins/Del-Polymorphismus , Promoter-Region	56
4.4 A/G-Polymorphismus im Exon 8	57
4.5 TaqI A1/A2-Polymorphismus	59
4.6 TaqI-A Meta-Analysen	60
4.7 Kopplungsuntersuchungen der DRD2-Polymorphismen.....	61
4.8 Haplotypen-Untersuchung	62
4.9 Dopaminerges mesokortikolimbisches Belohnungssystem	63
4.10 Pathomechanismus DRD2-Rezeptor und Alkoholabhängigkeit	63
4.11 Alkoholismus und assoziierte Krankheiten.....	65
4.12 GABA-Rezeptor-Polymorphismen	66
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	69
6 LITERATURVERZEICHNIS	71
7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
8 TABELLENVERZEICHNIS.....	84
9 LISTE DER ABKÜRZUNGEN	86

5 Zusammenfassung

Genotypische Varianten des DRD2-Rezeptors und des GABA-Rezeptors besitzen möglicherweise einen Einfluss auf das Vorkommen und die Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit. Verschiedene Studien haben den Zusammenhang zwischen dem A/G-Polymorphismus im Exon8 des DRD2-Rezeptors und der Alkohol-Abhängigkeit untersucht, erbrachten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Polymorphismen des DRD2-Rezeptors sowie drei Polymorphismen des GABA-B-R1-Rezeptors jeweils im Patienten- und Kontrollkollektiv genotypisiert und ihr Einfluss auf die Alkoholabhängigkeit untersucht.

Keiner der untersuchten Polymorphismen zeigte signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Der Exon8-Polymorphismus zeigte sowohl bezüglich der Genotyp-Häufigkeiten als auch bezüglich der Allel-Häufigkeiten signifikante Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv ($p < 0,05$). Dagegen konnten bei der Untersuchung des -141C und des TaqI-A-Polymorphismus weder beim gesamten Patientenkollektiv noch bei den untersuchten Subgruppen signifikante Assoziationen entdeckt werden. Der Genotyp [InsIns/GG/A2A2] zeigte eine signifikant erhöhte Häufigkeit in der Patientengruppe mit einer Odds Ratio von 4,59 ($p < 0,01$). Die Untersuchung der geschätzten Haplotypen zeigte für den Haplotypen [Ins/G/A2] ein signifikant höheres Vorkommen in der Patientengruppe, wobei die Odds Ratio jedoch nur bei 1,54 liegt ($p < 0,01$). Dagegen war der Haplotyp [Del/A/A2] in der Patientengruppe signifikant seltener vorhanden, bei einer Odds Ratio von 0,396 ($p < 0,05$). Die Polymorphismen -141C-Ins/Del und Exon8-A/G zeigten sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe ein Kopplungsungleichgewicht. Dagegen bestand für die Polymorphismen -141C und TaqI-A sowie die Polymorphismen Exon8 und TaqI-A ein Kopplungsungleichgewicht nur in der Patientengruppe, nicht aber in der Kontrollgruppe.

Die vorliegende Studie erbrachte keinen Hinweis, dass einer der drei untersuchten GABA-B-R1-Rezeptor-Polymorphismen einen substantiellen Einfluss (Odds Ratio > 3) auf die Pathogenese der Alkoholabhängigkeit ausübt. Dies gilt sowohl für die Gesamtheit der untersuchten Alkoholiker als auch für die untersuchten Subgruppen. Allerdings fanden sich

beim Exon7- und Exon11-Polymorphismus signifikante Assoziationen zwischen den Allelhäufigkeiten und der Gruppe der Alkoholiker mit antisozialer Persönlichkeitsstörung.

Obwohl die vorliegende Studie bei den untersuchten Polymorphismen einige signifikante Assoziationen zur Alkohol-Abhängigkeit bzw. zu der untersuchten Subgruppe der Patienten mit dissozialer Persönlichkeitsstörung aufweist, können aufgrund der Vielzahl der untersuchten Zusammenhänge und der daraus resultierenden Gefahr falsch-positiver Ergebnisse keine eindeutigen Zusammenhänge abgeleitet werden. Da die Alkoholabhängigkeit neben den vermuteten genetischen Faktoren durch weitere individuelle, soziale und kulturelle Faktoren entscheidend beeinflusst wird, erfordert die Aufdeckung von Genotyp-Phänotyp-Assoziationen multivariate Analysen, die eine Vielzahl von möglichen Einfluss- und Störgrößen einschließen. Die hierfür erforderlichen hohen Fallzahlen können vermutlich nur im Rahmen von Multicenter-Studien zustande gebracht werden.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DRD2-Polymorphismen.....	19
Abbildung 2: Gel-Elektrophorese für A/G-Polymorphismus	34
Abbildung 3: Gel-Elektrophorese für -141C-Polymorphismus.....	35
Abbildung 4: Genotypen-Verteilung für die Polymorphismen -141C und Exon8	43
Abbildung 5: Genotypen-Verteilung für die Polymorphismen -141C und TaqI A.....	44
Abbildung 6: Genotypen-Verteilung für die Polymorphismen Exon8 und TaqI a.....	45

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konkordanzraten und Heritabilitäten von Alkoholismus bei männlichen Zwillingspaaren	12
Tabelle 2: Konkordanzraten und Heritabilitäten von Alkoholismus bei weiblichen Zwillingspaaren	12
Tabelle 3: synthetische Oligonukleotide	23
Tabelle 4: Kriterien für die Alkoholabhängigkeit der WHO	26
Tabelle 5: Kandidatengenpolymorphismen	33
Tabelle 6: Genotyp-Häufigkeiten des Exon8-A/G-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle).....	38
Tabelle 7: Allel-Häufigkeiten des Exon8-A/G-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle).....	38
Tabelle 8: Genotyp-Häufigkeiten des -141C-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle).....	39
Tabelle 9: Allel-Häufigkeiten des -141C-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle)	39
Tabelle 10: Genotyp-Häufigkeiten des -141C-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	40
Tabelle 11: Allel-Häufigkeiten des -141C-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	40
Tabelle 12 Genotyp-Häufigkeiten des -TaqI-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle)	41
Tabelle 13 Allel-Häufigkeiten des -TaqI-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle).....	41
Tabelle 14 Genotyp-Häufigkeiten des TaqI-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	42
Tabelle 15 Allel-Häufigkeiten des TaqI-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus.....	42
Tabelle 16 paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht -141C x Exon8	43
Tabelle 17 Irrtumswahrscheinlichkeit für paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht -141C x Exon8	43
Tabelle 18 paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht -141C x TaqI A.....	44
Tabelle 19 Irrtumswahrscheinlichkeit für paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht -141C x TaqI A.....	44
Tabelle 20 paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht Exon8 x TaqI A	45
Tabelle 21 Irrtumswahrscheinlichkeit für paarweises Kopplungs-Ungleichgewicht Exon8 x TaqI A	45
Tabelle 22: Genotyp-Häufigkeiten der untersuchten DRD2-Polymorphismen.....	46

Tabelle 23: Haplotypen-Schätzung für DRD2-Polymorphismen (Patienten vs. Kontrolle)	47
Tabelle 24: Genotyp-Häufigkeiten des Ala20Val-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle)	48
Tabelle 25: Allel-Häufigkeiten des Ala20Val-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle)	48
Tabelle 26: Genotyp-Häufigkeiten des Ala20Val-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	49
Tabelle 27: Allel-Häufigkeiten des Ala20Val-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	49
Tabelle 28: Genotyp-Häufigkeiten des Gly489Ser-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle)	50
Tabelle 29: Allel-Häufigkeiten des Ala20Val-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle)	50
Tabelle 30: Genotyp-Häufigkeiten des Gly489Ser-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	51
Tabelle 31: Allel-Häufigkeiten des Gly489Ser-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	51
Tabelle 32: Genotyp-Häufigkeiten des T1974C-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle)	52
Tabelle 33: Allel-Häufigkeiten des T1974C-Polymorphismus (Patienten vs. Kontrolle)	52
Tabelle 34: Genotyp-Häufigkeiten des T1974C-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	53
Tabelle 35: Allel-Häufigkeiten des T1974C-Polymorphismus und Subgruppen des Alkoholismus	53

9 Liste der Abkürzungen

A	Adenosin
Ala	Alanin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Kation
Cl ⁻	Chlorid-Anion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et. al.	et alii (und andere)
G	Guanosin
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GH	menschliches Wachstumshormon
Gly	Glycin
ICD	International Classification of Diseases
insb.	insbesondere
K ⁺	Kalium-Kation
kcal	Kilokalorie
kJ	Kilojoule
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MAO	Monoaminoxidase
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi (für Analysezwecke)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Phen	Phenylalanin
resp.	respektive: oder
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat

sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
sog.	sogenannt
T	Thymidin
UTR	untranslated region (nicht-translatierte Region)
u. a.	unter anderem
Val	Valin

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Murat Ladehoff, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Assoziation zwischen Polymorphismen des GABA_B- und des Dopamin-D₂-Rezeptorgens und der Alkoholabhängigkeit“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Allen, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle Dank sagen.

Als erstes gebührt der Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans Rommelspacher für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Versuchsumgebung. Seine Geduld, sein Enthusiasmus und seine stete Ansprechbarkeit zu allen Fragen des Promotionsprozesses haben ganz erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinem ärztlichen Kollegen und Freund Herrn Dr. med. Dipl. Ing. Ingo Steffen für die unermüdliche Hilfe bei der Bearbeitung der statistischen Fragestellungen. Seine persönliche und fachliche Hilfe hat tiefen Eingang in diese Arbeit gefunden.

Herrn Dr. med. Georg Nowak, meinem Mentor, Freund und leitenden Oberarzt an der Neurochirurgischen Klinik am Campus Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, danke ich zutiefst für den immer geduldigen Beistand in beruflich und privat schwierigen Zeiten. Sein positives Einwirken hat entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke meiner Freundin Bianca Zoch für ihr stetes Verständnis und die fortwährende Unterstützung meiner Arbeit. Während dieser entscheidenden Lebensphase konnte ich ihrer liebevollen Begleitung und Stärkung immer sicher sein.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich für die unermüdliche Unterstützung danken. Sie haben ganz entscheidend meinen bisherigen Weg begleitet und mir vieles ermöglicht, das ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt den Probanden, durch deren Bereitschaft an dieser Arbeit mitzuwirken, diese Promotionsarbeit erst möglich wurde.
