

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Assoziationsanalyse von NMDAR-Genvarianten und deren
Einfluss auf striatale Belohnungsverarbeitung bei
alkoholabhängigem Verhalten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Malte Beckenbach

aus Berlin

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

I. Abstract	5
1.1 Zusammenfassung (deutsch)	5
1.2 Abstract (englisch)	6
II. Einleitung	8
2.1 Alkoholabhängiges Verhalten	8
2.1.1 Historische Herleitung.....	8
2.1.2 Epidemiologie.....	8
2.1.3 Terminologie alkoholabhängigen Verhaltens.....	9
2.1.4 Wirkungen von Ethanol auf das zentrale Nervensystem.....	11
2.1.5 Soziale Faktoren.....	11
2.1.6 Psychische Faktoren.....	12
2.1.7 Neurobiologische Faktoren.....	12
2.1.7.1 Dopaminhypothese.....	13
2.1.7.2 Serotoninhypothese.....	14
2.1.7.3 Glutamathypothese.....	14
2.1.8 Genetik alkoholabhängigen Verhaltens.....	15
2.1.8.1 Familienuntersuchungen, Zwillingsstudien und Adoptionsstudien.....	16
2.1.8.2 Kopplungsstudien.....	16
2.1.8.3 Das Konzept des Endophänotyps.....	17
2.1.8.4 Assoziationsstudien.....	18
2.1.9 Diagnostik und Therapie alkoholabhängigen Verhaltens.....	19
2.2 Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR)	20
2.2.1 Die genomische Struktur von NMDAR1.....	22
2.2.2 Die genomische Struktur von NMDAR2A.....	23
2.2.3 Die genomische Struktur von NMDAR2B.....	23
2.2.4 Der NMDA-Rezeptor als Kandidatengen bei Alkoholabhängigkeit...	24
III. Material und Methoden	25
3.1 Auswahl des Probandenkollektivs	25
3.2 Genetischer Teil	25
3.2.1 Auswahlkriterien der Gene und Polymorphismen.....	26

3.2.2	Ausgewählte SNPs des Gens NMDAR1.....	26
3.2.3	Ausgewählte SNPs des Gens NMDAR2A.....	27
3.2.4	Ausgewählte SNPs des Gens NMDAR2B.....	28
3.2.5	Primerkonstruktion.....	29
3.3	Experimenteller Teil.....	30
3.3.1	DNA-Extraktion.....	30
3.3.2	Polymerasekettenreaktion.....	31
3.3.3	Restriktionslängenpolymorphismus.....	33
3.3.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	34
3.3.5	Chemikalien.....	37
3.3.6	Geräte.....	37
3.3.7	Software.....	38
3.4	Bildgebungsteil.....	38
3.4.1	Einführung zum bildgebenden Verfahren.....	38
3.4.2	Auswahl des Bildgebungskollektivs.....	39
3.4.3	Monetary Incentive Delay Paradigma (MID).....	39
3.4.4	Alkohol Cue Paradigma.....	42
3.4.5	Geräteanordnung.....	43
3.4.6	Auswertung der (f)MRT-Daten.....	45
3.5	Statistische Auswertung.....	47
IV.	Ergebnisteil.....	48
4.1	Einfluss der Genotypen auf die Diagnose.....	48
4.2	Der Einfluss der Haplotypen auf die Diagnose.....	53
4.3	Assoziation bildgebender, klinischer und genetischer Daten im Subkollektiv.....	56
4.3.1	Deskriptive Statistik des Subkollektivs.....	56
4.3.2	Assoziation der MID-Daten mit der Diagnose.....	57
4.3.3	Assoziation der MID-Daten mit den Genotypen.....	60
4.3.4	Assoziation der MID-Daten mit den Haplotypen.....	62
4.3.5	Auswertung nach dem Alkohol-Cue-Paradigma.....	63
4.4	Deskriptive statistische Analyse des Gesamtkollektivs.....	66
4.5	Statistische Analyse der klinischen Variablen.....	66

V. Diskussion	67
5.1 NMDA-Genotypen und alkoholabhängiges Verhalten	67
5.2 Das ventrale Striatum (vST) und alkoholabhängiges Verhalten	69
5.3 Genotypen als Prädiktoren für neuronale Signalverarbeitung bei alkoholabhängigem Verhalten	71
5.4 Das Konzept des Endophänotyps („intermediärer Phänotyp“) bei alkoholabhängigem Verhalten	72
5.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit	74
5.6 Bedeutung der vorliegenden Arbeit für das Forschungsfeld	75
5.7 Klinische Relevanz dieser und vergleichbarer Daten	75
5.8 Ausblick	76
VI. Literaturverzeichnis	78
VII. Liste der Abkürzungen	88
VIII. Liste der Tabellen und Abbildungen	91
IX. Appendix	93
X. Eidesstattliche Erklärung	95
XI. Lebenslauf	96
XII. Danksagung	97

I. Zusammenfassung/ Abstract

1.1 Zusammenfassung (deutsch)

Einleitung: Alkoholabhängiges Verhalten stellt in Deutschland eine der häufigsten Ursachen für Krankheit und frühzeitigen Tod dar. Die Abhängigkeitsätiologie ist multifaktoriell. In anderen Studien konnte bereits die Assoziation von Alkoholabhängigkeit mit genetischen Varianten des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptorsystems nachgewiesen werden. Die Ätiologiemodelle beinhalten anatomischen Regionen, in denen Belohnungsreize prozessiert werden, u.a. das ventrale Striatum (vSt). Funktionelle Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen konnten belohnungsassoziierte Verhaltensunterschiede bei Alkoholabhängigen nachweisen. Ein dazu entwickeltes Verfahren ist das Monetary Incentive Delay Paradigma (MID), ein weiteres das Alkohol-Cue-Paradigma.

Methodik: Assoziationsanalyse von Alkoholabhängigkeit und Haplotypkombinationen von 16 Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) der drei NMDA-Rezeptorgene NMDAR1, NMDAR2A und NMDAR2B. 128 Probanden wurden genotypisiert und mit Hilfe der Software PHASE (1) wurden die häufigsten Haplotypsequenzen ermittelt. Ein Subkollektiv von 34 Probanden (17/17) wurde mit funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT; Erfassung des BOLD-Signals (Blood-Oxygen-Level-Dependent)) während der Durchführung des MID-Paradigmas untersucht. Acht alkoholabhängige Probanden wurden zudem mit dem Alkohol-Cue-Paradigma untersucht. Die Ergebnisse wurden mit der Software SPM (Statistical Parametric Mapping) ausgewertet und mit den genetischen Daten assoziiert.

Ergebnisse: Für alle untersuchten Gene des NMDA-Rezeptors konnten signifikante Verteilungsunterschiede der Polymorphismen nachgewiesen werden. Haplotypkombinationen zeigten signifikante Verteilungsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen für NMDAR1 ($p=0,028$) und NMDAR2A ($p=0,008$). BOLD-Werte im MID-Paradigma wichen in der anatomischen Zielregion (vSt) bei Alkoholpatienten während einer Gewinnerwartung von denen der Kontrollen in Richtung einer verringerten neuronalen Aktivierung bei der Antizipation von Gewinn ab ($p=0,02$). Für alle untersuchten Gene wurde ein Einfluss von Suszeptibilitätsloki auf die Aktivierung mit der MID-Task nachgewiesen. Eine geringere Aktivierung in

der Zielregion (vSt) während Gewinn-antizipation (MID) konnte mit Haplotypen von NMDAR1 ($p=0,018$) und NMDAR2B ($p=0,015$) assoziiert werden. Die Auswertung der Alcohol Cue Task ergab für die anatomische Zielregion in einem kleinen Sample (8 Patienten) einen bestätigten Trend ($p\leq 0,001$).

Diskussion: Die vorliegende Studie konnte die Verbindung von NMDAR-Sequenzvarianten mit neuronaler Dysfunktion im ventralen Striatum bei alkoholabhängigen Patienten herstellen. Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass bestimmte Genvarianten des NMDA-Rezeptors indirekt risikofördernd, andere wiederum protektiv für die Entwicklung einer Abhängigkeit sein könnten. Für die Spezifizierung der Hypothese und zur Konstruktion eines klinischen Phänotyps wäre eine größere Zahl an Probanden und eine Kontrollgruppe in der Alkohol-Cue-Task nötig, um den ermittelten Trend statistisch valide zu bestätigen.

1.2 Abstract (english version)

Introduction: There are multiple etiological causes for alcohol dependency. Numerous genetic variants have been identified to increase the risk of becoming alcohol dependent. The association of alcohol dependence (AD) and variants of the N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-receptor were previously pointed out. The etiological models focused hereby on anatomical regions within the reward system e.g. the ventral Striatum (vSt). Behavioral differences between alcoholics and controls could be elicited using functional magnetic resonance imaging (MRI)-Paradigms (Monetary Incentive Delay (MID)-task, alcohol-cue-paradigm).

Methods: Association analysis of AD and haplotype-estimates for 16 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the 3 NMDA-receptor genes NMDAR1, NMDAR2A and NMDAR2B. Participants ($n=128$) were genotyped and haplotype-estimation was performed using the software PHASE (1). A sub-collective (17/17) was assessed using the MID-task. Eight alcohol dependent patients were also assessed by using the alcohol-cue-paradigm. The data was then analysed using the software SPM (Statistical Parametric Mapping) and associated with the results of the genetic data set.

Results: Polymorphisms of all of the 3 genes were distributed significantly unequal amongst the 2 groups. Haplotype-combinations with higher frequencies were distributed unequally for NMDAR1 ($p=0,024$) and NMDAR2A ($p=0,039$).

BOLD-levels (Blood-Oxygen-Level-Dependent) during reward anticipation in the Vst using the MID-paradigm were significantly lower in alcoholics ($p=0,02$) and linked to haplotypes in alcoholics for NMDAR1 ($p=0,018$) and NMDAR2B ($p=0,015$). Results from the evaluation of the alcohol-cue paradigm in a small sample (8 alcohol dependent patients) corroborated the results of the MID-task.

Discussion: In our study we associated gene-sequence variants of the NMDA-receptor 1, 2A and 2B with neural dysfunction in the ventral striatum in alcoholics. All three gene variants were having an influence on BOLD-levels during reward anticipation. The structure of the group sample participating in this study was not suitable to postulate a clinical phenotype (endophenotype). The findings indicate that NMDAR-gene-variants are factors that may increase or decrease the risk for AD. For further specification about the association of gene-variants of NMDAR-subreceptors and a neural disfunction relevant for AD in a larger sample of participants and a control group for the alcohol-cue-paradigm would be needed.

II. Einleitung

2.1 Alkoholabhängiges Verhalten

2.1.1 Historische Herleitung

Aristoteles und Plutarch sind als frühe literarische Quellen für die Beschreibung von Trunkenheit und Rausch nachgewiesen (2). Der Krankheitsbegriff des Alkoholismus wird bei Trotter 1778 als „Trunkenheit“ beschrieben und später, 1819 von Bühl-Cramer, mit dem Begriff der Dipsomanie (heute: episodischer Missbrauch) bereits auf ein körperliches Leiden bezogen (3). Als eigenständiges Krankheitsbild wird der *alcoholismus chronicus* 1852 von Magnus Huus als solches definiert (4). Um die Jahrhundertwende war man (u.a. auch Kraepelin) der Meinung, Alkoholismus sei in erster Linie mit Willensschwäche assoziiert (5). Dies ist nicht selten auch heute noch der Fall, was unter anderem zur Bagatellisierung der Krankheit und Stigmatisierung der Betroffenen beiträgt. Jellinek hat mit seinen Arbeiten von 1940 bis 1960 den Begriff des Alkoholismus als Krankheit mit den heute noch gültigen Merkmalen des übersteigerten Denkens an Alkohol, der Palimpseste („Filmrisse“), des Kontrollverlusts, sowie des Verleugnens von Entzugssymptomen geprägt. Seit 1952 ist Alkoholabhängigkeit offiziell als Erkrankung von der WHO anerkannt, seit 1968 wurde dies auch in Deutschland durch das Bundessozialgericht bestätigt (4).

2.1.2 Epidemiologie

„9,5 Millionen Menschen in Deutschland konsumieren Alkohol in gesundheitlich riskanter Form. Durchschnittlich werden pro Kopf der Bevölkerung jährlich zehn Liter reinen Alkohols konsumiert. Etwa 1,3 Millionen Menschen gelten als alkoholabhängig. Nur etwa 10 Prozent unterziehen sich einer Therapie, oft erst viel zu spät, nach 10 bis 15 Jahren einer Abhängigkeit. Jedes Jahr sterben in Deutschland 74.000 Menschen an den direkten und indirekten Folgen ihres Alkoholmissbrauchs. Die volkswirtschaftlichen Kosten belaufen sich auf 26,7 Milliarden Euro, davon sind allein 7,4 Milliarden direkte Kosten für das Gesundheitssystem“ (6). Übermäßiger Alkoholkonsum hat nach Nikotinkonsum und Bluthochdruck das dritthöchste Risiko für Folgekrankheiten und vorzeitigen

Tod in Europa (7). Im Jahr 2009 wurden 26.400 Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene aufgrund akuter Alkoholvergiftung behandelt (8). Für Personen mit chronischem Alkoholmissbrauch verkürzt sich die Lebenserwartung um durchschnittlich 23 Jahre (9). Die Diagnoseklasse „F10 (ICD-10) Psychische und Verhaltensstörungen durch Alkohol“ ist bei Männern der zweithäufigste Behandlungsanlass in Krankenhäusern nach chronisch ischämischer Herzkrankheit (10). Abhängig vom Schweregrad einer alkoholbedingten Leberzirrhose sterben im Zeitraum von fünf Jahren nach Diagnosenstellung zwischen 40 und 80% der Betroffenen (11). Der Anteil von unbehandelten Patienten mit Alkoholabhängigkeit liegt in Deutschland nach Schätzungen bei 70% (12).

2.1.3 Terminologie alkoholabhängigen Verhaltens

Grundlegend zu unterscheiden sind die akute Intoxikation, das Entzugssyndrom und die Folgekrankheiten einer Abhängigkeit. Alkoholkonsum (riskanter, schädlicher), Alkoholmissbrauch, Alkoholabhängigkeit und Alkoholsucht/ Alkoholismus sind die verschiedenen Begriffe, die es einfürend abzugrenzen gilt:

Alkohol- Ethylalkohol oder einfach Ethanol (C_2H_6O); das Wort Alkohol kommt aus dem Arabischen (Al-Cool) und bedeutet „feines Pulver, Augenschminke“. Der Stoff hat spezifische chemische Eigenschaften, die ihn unterschiedlich einsetzbar machen. Abgesehen von der technischen Verwendung dient er als hochenergetisches Nahrungsmittel, Genussmittel und als psychoaktive Substanz, die im kulturellen Gebrauch vor allem okzidentaler Kulturen weit verbreitet ist.

Alkoholkonsum- In der klinischen Praxis werden verschiedene Risikostufen des Konsums abgegrenzt, wobei es Inhalt andauernder Diskussion ist, ob ein geringer Konsum nicht auch bereits schädlich ist. Die Risikostufen werden unterteilt in geringen, gefährlichen, sowie schädlichen Konsum (13). Mengenangaben der British Medical Association sind hierzu: täglicher Konsum von 30 g für Männer und 20 g für Frauen ist die Niedrig-Risiko-Gruppe. Gefährlicher Konsum beginnt bei Mengen von 30-60g bzw. 20-40g bei Frauen. Schädlicher Konsum beginnt bei täglichen Mengen von 60-120g bzw. 40-80g bei Frauen. Die Hochrisikogruppe liegt mit ihrem Konsum noch darüber (14).

Alkoholmissbrauch- Allgemein formuliert handelt es sich um Missbrauch, wenn bei der Bewertung eines Verhaltens die Schadens-Nutzen-Relation auf der Seite des Schadens liegt (4). Die Definitionen der International Classification of Diseases (ICD-10) der World Health Organization (WHO) und der Diagnostic and Statistical Manuals of Mental Disorders (DSM-IV) der American Psychiatric Association (APA) bezeichnen den Alkoholmissbrauch im engeren Sinne (5), wobei beide den Begriff „Abhängigkeit“ (siehe Tabelle 1) bezüglich des Konsums definieren, jedoch unterscheiden sie die Begriffe „schädlicher Gebrauch“ (ICD-10) versus „Missbrauch“ (DSM-IV).

Tab. 1: Gegenüberstellung der Diagnosekriterien nach ICD-10 und DSM-IV.

ICD-10 – Schädlicher Gebrauch von Alkohol	DSM-IV – Alkoholmissbrauch
Schädigung der psychischen oder physischen Gesundheit	Vernachlässigung von Pflichten
	Alkohol trotz körperlicher Risiken
	Alkohol trotz Probleme mit der Polizei
	Alkohol trotz psychosozialer Probleme

Alkoholabhängigkeit/ Alkoholismus/ Alkoholsucht (die Begriffe werden im Weiteren synonym verwendet)- „Ist eine primäre, chronische Krankheit, deren Entstehung und Manifestation durch genetische, psychosoziale und umfeldbedingte Faktoren beeinflusst werden. Sie schreitet häufig fort und kann tödlich enden“ (4). Körperliche Abhängigkeit ist gekennzeichnet durch zwei Phänomene: das Entzugssyndrom (definierter Symptomenkomplex, der nach dem Absetzen von Alkohol nachweisbar ist) und die Toleranzentwicklung. Da es abhängiges Verhalten auch ohne den Nachweis von körperlichen Symptomen gibt, unterscheidet man davon die psychische Abhängigkeit (15). ICD-10 und DSM-IV gleichen sich in den Kriterien für Abhängigkeit (Toleranz, Entzugssyndrom, Kontrollminderung, zwanghaftes Trinken, hoher Zeitaufwand, Vernachlässigung anderer Aktivitäten, Konsum trotz Wissen um negative Folgen), wobei nach ICD-10 6/8 gegenüber 7/8 nach DSM-IV über einen Zeitraum von 12 Monaten erfüllt sein müssen.

2.1.4 Wirkungen von Ethanol auf das Zentrale Nervensystem (ZNS)

Der Wirkstoff alkoholischer Getränke ist Ethanol (C_2H_6O). Die akut rauschhafte Ethanolwirkung entspricht etwa der eines Narkosemittels (Barbiturate, Benzodiazepine). Es lassen sich durch unterschiedliche Dosierungen verschiedene Stadien der Narkose auslösen. Kleine oder mäßige Dosen führen zur Belebung der motorischen und psychischen Funktionen. Bei 2-2.5‰ ist mit schwerer Intoxikation zu rechnen. Werte von 3-5‰ wurden bei tödlich verlaufenden Vergiftungen gefunden (16). Aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften durchdringt Ethanol leicht Lipidbarrieren und gelangt so schnell ins ZNS, wo es auf praktisch alle Transmittersysteme Einfluss hat. Durch Einlagerung in intergrale Membranschichten moduliert Ethanol jedoch vornehmlich die Wirkung von Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) und Glutamat. Die GABAerge Sedation und Anxiolyse (vermittelt über GABA-A-Rezeptoren) wird allosterisch verstärkt (17) und die glutamerge Exzitation nicht-kompetitiv gehemmt (18). Adaptive Prozesse bei Dauerkonsum führen zur Toleranz gegenüber den GABAerg sedierenden Wirkungen: GABA-Rezeptoren werden herunter reguliert. Der Glutamatrezeptor vom NMDA-Typ, der von Ethanol blockiert wird, erfährt bei chronischer Ethanoleinnahme eine reaktive Überexpression (19). Zudem führt eine stark erhöhte Ethanolplasmakonzentration zu vermehrter Glutamat- als auch Dopamin-freisetzung (20). Letzteres wird durch eine Interaktion von Ethanol mit Dopaminrezeptoren und -transportern verursacht (21). Auch Veränderungen des opioidergen Systems, sowie erhöhte Kortisolplasmaspiegel bei Entzug (22) haben bei chronischem Ethanolmissbrauch Einfluss auf Entstehung und Verlauf der resultierenden Abhängigkeit.

2.1.5 Soziale Faktoren

Innerhalb unserer Gesellschaft haben Alter, Geschlecht, sowie die gesellschaftliche Verortung einen Einfluss auf das Risiko, einen schädlichen Konsum bis hin zur Alkoholabhängigkeit zu entwickeln. Im Jugendalter ist durch besondere Trinkgewohnheiten wie dem Rauschtrinken (engl. „binge drinking“) eine erhöhte Gefahr für riskanten Konsum nachgewiesen (23). Laut einer Studie der Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen (DHS) ist auch im höheren Alter ein riskanter Alkoholkonsum besonders häufig (13). Wiederholt konnten Studien in

verschiedenen westlichen Ländern nachweisen, dass Männer häufiger von einer Abhängigkeit betroffen sind und eher zum riskanten Konsum neigen als Frauen (24, 25). Epidemiologischen Studien zufolge ist ein erhöhter Konsum zudem mit geringem Sozialstatus korreliert (26, 27).

2.1.6 Psychische Faktoren

Klinisch empirische Modelle stellen durch Assoziation von Verhaltensmustern mit der klinischen Diagnose einer Abhängigkeit modellhaft pathologierelevante Persönlichkeitsmerkmale heraus. Ein klinisch empirisches Modell ist das Modell der „Prämorbidem Persönlichkeit“ (28), welches auf frühe Studien zur Assoziation zwischen Alkoholismus und mangelnder Selbstkontrolle, gesteigerter Impulsivität und Aggressivität zurück greift (29) und an anderer Stelle als „sekundäre Alkoholabhängigkeit“ definiert wurde (30). Teile dieses Modells wurden durch experimentelle Befunde u.a. durch eine Studie von Beck et al. bestätigt. Demnach war impulsives Verhalten, gemessen mit der Barrat-Impulsivitäts-Skala-10 (Bis-10), bei alkoholabhängigen Patienten gegenüber gesunden Kontrollen verstärkt nachweisbar (31).

2.1.7 Neurobiologische Faktoren

Galten früher die Stufen einer „Suchtkarriere“ als selbstverschuldet, so werden in der anhaltenden Ausdifferenzierung des Bio-Psycho-Sozialen Ätiologieansatzes nach Engel (32) zunehmend neurobiologische Komponenten fokussiert. Zusammenfassend lassen sich sowohl protektive als auch risikofördernde Faktoren ausmachen, die abhängiges Verhalten bedingen. Bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Alkoholabhängigkeit spielen folgende Transmittersysteme eine wichtige Rolle: Serotonin, GABA, Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Opioide, Cannabinoide und Glutamat (33). In der aktuellen Debatte werden verschiedene Ansätze verfolgt. Dabei steht Dopamin auf der einen Seite, das starken Einfluss auf das Verlangen (Craving) und im Zusammenspiel mit Glutamat auf Verhaltenskopplung mit Inhalten, also Verhaltenskontrolle haben kann (34). Die Pathophysiologie der Alkoholabhängigkeit ist jedoch komplex, die Ätiologie multifaktoriell. Es existiert bislang kein einheitliches Erklärungsmodell. Sozio-kulturelle, biographische, als auch biologische Aspekte beeinflussen einander.

2.1.7.1 Dopaminhypothese

Im Zentrum der Aufmerksamkeit neurobiologischer Theorie der Abhängigkeit stand lange das mesolimbische, dopaminerge System und im Speziellen der Nucleus accumbens (Nac; im Folgenden synonym verwendet= ventrales Striatum (vSt); der gemeinsame Teil von Nucleus Caudatus und Putamen, der nicht von der Capsula interna durchbrochen wird) mit den ihn umgebenden Projektionen. Diese Projektionen werden vor allem aus dopaminergen und glutamergen Synapsen gebildet (siehe **Abb. 7**). Ursprünglich als Vermittler zwischen dem limbischen System und kortikalen, motorischen Systemen identifiziert, kommt dem Nac eine zentrale Rolle bei der motivationellen Komponente des Handelns zu. Diese schien in Teilen als das neuronale Korrelat für „Belohnung“ (oder der Erwartung einer Belohnung) bestimmbar zu sein. Aktivierung des Nac durch Projektionen aus dem ventralen tegmentalen Areal (VTA) werden im Speziellen bei primären Verstärkern, wie Essen und Sex beobachtet (35). Daraus ließ sich folgern: Evolutionär werden soziale Strategien, die sich als vorteilhaft erweisen (welche zu Essen bzw. Sex führen), durch Nac-Projektionen verstärkt. Dopaminausschüttung in diesem „Belohnungszentrum“ ist also über den Mechanismus einer Sensibilisierung (im Gegensatz zur Habituation) mit bestimmten Verhaltensweisen gekoppelt, die für unser Überleben essentiell sind. Im Tiermodell wurde in der Präferenz einer elektrischen Selbststimulation des Nac gegenüber den vorab beschriebenen Handlungen ein direktes Korrelat für Drogenkonsum gesehen (36). Somit wird motivationales Handeln von dem evolutionär ausgeprägten Belohnungsmechanismus abgekoppelt. Inwieweit der Nac bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von abhängigem Verhalten eine Rolle spielt, ist derzeit Teil unterschiedlicher Ätiologiehypothesen. Die „Belohnungshypothese“ ist zugunsten eines „belohnungsankündigenden“ bzw. „aufmerksamkeitslenkenden“ Signals vielfach in Frage gestellt bzw. modifiziert worden (37, 38). Computergestützte Modelle belohnungsassozierten Lernens konnten zeigen, dass Drogen gegenüber natürlichen Verstärkern im Vorteil waren, was die Bewertung des Ausmaßes einer zu erwartenden Belohnung bzw. Wichtigkeit oder Salienz betrifft (39). Das dopaminerge System ist also ein endogenes Verstärkersystem für implizite, suchtanaloge Gedächtnisinhalte und als solches Teil der zentralnervösen Endstrecke psychotroph wirkender Substanzen.

2.1.7.2 Serotoninhypothese

Serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) wirkt primär modulierend auf andere Transmitter. Stimmungslage, Aggressivität, Ess-, Schlaf- und Wachverhalten werden durch tonische Entladungen des serotonergen Systems beeinflusst. Auf der Ebene des Genotyps konnten bestimmte Varianten als Marker mit Einfluss auf die Ausbildung von alkoholabhängigem Verhalten identifiziert werden (40). Der prominenteste Polymorphismus im Bezug auf die Alkoholabhängigkeit ist der des SLC64A-Gens, genauer die Varianten der 5'-Promotorregion des 5-HT Transporters (5-HTT). Sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien konnte ein genetisch disponiertes Transportermehrangebot derjenigen Tiere nachgewiesen werden, die homozygot für das lange Allel sind (41) und in weiterführenden Studien konnten die Träger dieses Allels mit erhöhter „Trinkfestigkeit“ assoziiert werden (42), d.h. Menschen mit diesem Genotyp sind weniger sensitiv gegenüber Alkohol und haben möglicherweise ein erhöhtes Abhängigkeitsrisiko. Zudem konnten in Bildgebungsstudien die Träger des S-Allels mit erhöhter Aggressivität und „Ängstlichkeit“ in Verbindung gebracht werden, was man aus der vermehrten Stimulation in angstvermittelnden Zentren ableiten könnte: Die Träger des S-Allels weisen eine erhöhte Aktivität in der Amygdala als Reaktion auf angsterzeugende Stimuli auf (43, 44).

2.1.7.3 Glutamathypothese

Glutamerge Netzwerke umfassen etwa 40 % der Zellen des ZNS (45). Das glutamerge System wird durch das monoaminerge System moduliert. Dopamin erhöht die Anzahl der synaptischen und präsynaptischen Glutamatrezeptoren (34). Die Interdependenz von Glutamat und Dopamin gilt auch im Bezug auf suchtrelevanten Regionen: erregende Projektionen vom Präfrontalen Kortex (PKt) zum Nucleus accumbens (Nac), zum ventralen Tegmentum (VTA) und zum Hippokampus sind entweder glutamerg oder dopaminerg. Alle genannten Regionen sind immens verhaltensrelevant, da dort Einfluss auf Ebene der Kontrolle bzw. Hemmung genommen wird.

Abb.1: Glutamerge Verhaltenskontrolle.

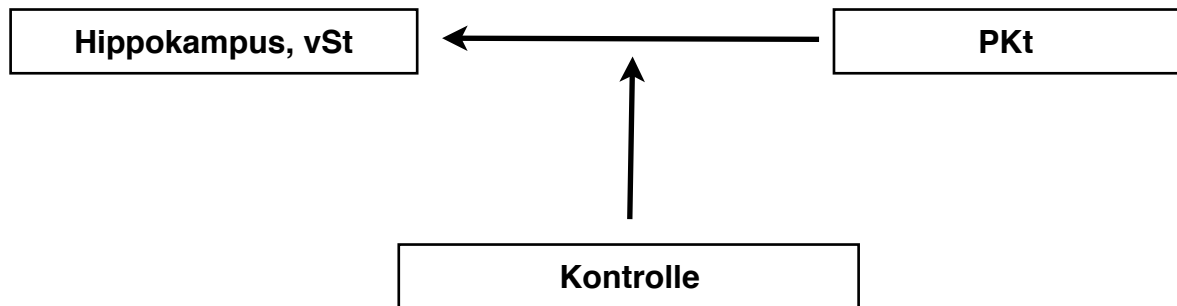


Abb.1: Schema der Projektionen vom präfrontalen Kortex (PKt) zum Hippokampus und ventralen Striatum (vSt), welche zu Verhaltenskontrolle führt. D.h. Hippokampus, VTA und vSt exekutieren im Zusammenspiel eine Handlung/ Emotion, während der Kortex, als höheres Zentrum, diese kontrolliert.

Der dargestellte Einfluss auf das Trinkverhalten konnte im Tierexperiment wie auch im klinischen Versuch nachgewiesen werden (46). Wie oben beschrieben, gerät das Trinkverhalten ab einer bestimmten Schwelle außer Kontrolle. Ein neurobiologisch interessantes Korrelat wird dabei in der Hochregulierung von NMDAR1 in der VTA und von NMDAR2 im Hippocampus angesehen (47).

2.1.8 Genetik alkoholabhängigen Verhaltens

Alkohol dient im Okzident seit Jahrhunderten zur Aufbereitung von Wasser. Durch Gärung entstehende organische Säuren. Diese Gärungsprodukte besitzen konservierende Eigenschaften, da sie potentielle Erreger zerstören. Somit bringt der Konsum von alkoholhaltigen Getränken von jeher einen Selektionsvorteil mit sich. Demgegenüber steht der Orient, wo Wasser traditionell durch erhitzen (samt Kräuterzusatz= Tee) konserviert wurde, weshalb im asiatischen Kulturkreis ein genetischer „Nachteil“ im Bezug auf die Alkoholmetabolisierung besteht: etwa 50 % der Ostasiaten weisen deshalb eine Isoform der Alkoholdehydrogenase auf, welche ihnen den übermäßigen Alkoholkonsum erschwert (48). Diese Tatsache deutet auf eine homogene Verteilung alkoholismusrelevanter Gene innerhalb eines Kulturkreises hin.

2.1.8.1 Familienuntersuchungen, Zwillingsstudien, Adoptionsstudien

Alkoholabhängiges Verhalten konnte in unterschiedlichen Familienstudien eine evidente Heritabilität (Prozent an direkten Verwandten, die ebenfalls erkrankt sind) zugeschrieben werden (49). Hier nach ist das Risiko, alkoholabhängig zu werden bei erstgradiger, alkoholabhängiger Verwandtschaft im Vergleich zu gesunden Kontrollen siebenmal höher (50). Andere Studien machten für männliche Probanden eine Heritabilität von rund 50 % gegenüber weiblichen mit 25 % aus, was in etwa proportional der geschlechtsspezifischen Prävalenz (2:1) ist (51). Zwillingsstudien konnten diese Befunde untermauern und in Abhängigkeit der Geschlechtszugehörigkeit eine signifikante Heritabilität nachweisen (52, 53). Frühe Adoptionsstudien zeigten ebenfalls ein deutlich höheres genetisches Risiko gegenüber sozialen Faktoren, da adoptierte Kinder von Alkoholabhängigen trotz anderer Eltern häufig abhängiges Verhalten zeigten (54, 55). Übergreifend werden 40-60% des Erkrankungsrisikos auf genetischen Einfluss zurückgeführt (56).

2.1.8.2 Kopplungsstudien

Durch Kopplungsanalysen wird die Vererbung von Genregionen mithilfe von Markern kontrolliert. Liegen die Regionen und die Marker auf dem Chromosom dicht beieinander, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass der Marker innerhalb einer Familie gehäuft auftritt. Die so identifizierten Regionen können als Kandidatengene angesehen werden. Dabei geht man davon aus, dass das Markerallel und das krankheitsrelevante Gen kosegregieren. Mehrere Genloki, welche für alkoholabhängiges Verhalten von Bedeutung sein könnten, konnten auf Chromosom 4 (57) identifiziert werden. Die dabei identifizierten Kandidatengene sind Varianten des GABA-Clusters und des Alkoholdehydrogenase-Clusters. Andere relevante Regionen liegen im Bereich des Chromosom 11 und auf Chromosom 2 für Dopaminrezeptoren, des Chromosom 7 für den Acetylcholinrezeptor und für ein mitochondriales Precursorprotein (58). Die Anzahl auf diese Weise identifizierter Genregionen ist jedoch immens hoch und gibt nur einen Anhalt für mögliche Assoziationen.

Tab. 2: Beispiele einiger durch Kopplungsanalysen identifizierter alkohol-assoziiertes Genloki (33, 57).

Genlocus	Genbezeichnung	Genprodukt
4p13-12	GABRA2&4, GABRB1 & GABRG1	GABA-Rezeptor
4q21-25	ADH1a, 1b, 1c, 4, 5, 6 & 7	Alkoholdehydrogenase
5q34-35	GABRA6	GABA-Rezeptor
6q24-25	OPRM1	Opioidrezeptor
7q31-35	CHRM2	Acetylcholin-Rezeptor
Chromosom 7	ACN9	Protein ACN9
10q22.3	KCNMA1	Kaliumkanal
11q23, 11p15.5	DRD2, 4	Dopaminrezeptor
12q24.2	ALDH2	Alkoholdehydrogenase
13q14-q21	HTR2A	Serotoninrezeptor
16p13, 12p12	NMDAR2A, 2B	Glutamatrezeptor
17q11.1-12	SLC6A4	Serotonintransporter

Tab. 2: Die Abkürzungen der Gene in der mittleren Spalte werden durch das Genprodukt in der rechten Spalte erklärt.

2.1.8.3 Das Konzept des Endophänotyps

Der Begriff des „Endophänotypes“ stammt von den griechischen Worten endo für „Innen“ und phainein für „Zeigen“ (59). Er wird oft synonym mit dem Begriff „klinischer Phänotyp“ oder „intermediärer Phänotyp“ verwendet. Endophänotypen stellen ein Konzept dar, welches psychiatrische Diagnosen mit ursächlichen Pathomechanismen in Verbindung bringt (60). Der Ansatz ist experimentell, da die Diagnosenstellung in der klinischen Psychiatrie bisher auf der Beschreibung von psychopathologischen Symptomen basiert. Elektrophysiologische Parameter (61), funktionelle und strukturelle MRT-Daten (62) haben sich als zuverlässige, quantifizierbare Variablen erwiesen die mit genetischen Varianten assoziiert werden können. Korrelierbare Parameter für Alkoholabhängigkeit sind z.B. bei EEG-Messungen in konsistent niedrigen Alpha-Wellen-Niveaus (7,5-12 Hz) anzusehen, die bei Nicht-Alkoholabhängigen mit positiver Familienanamnese nachweisbar waren (63). Ähnlich konsistent waren normvariante Beta-Wellen-Niveaus (13-28 Hz) bei alkoholabhängigen Männern (64). Ein anderer elektrophysiologischer Parameter mit konsistenter Heritabilität (0,3-0,8) ist die sogenannte P300-Welle: eine komplexe 2-Komponenten Welle, die ein

Aufmerksamkeitsparadigma abbildet (65). Generell lässt sich zwischen direkter und indirekter Beziehung von Endophänotypen mit dem Risiko alkoholabhängigen Verhaltens unterscheiden. Im Bezug auf Alkoholabhängigkeit ließen sich bereits einige spezifische, risikofördernde bzw. risikoreduzierende Gene mit einem Phänotyp assoziieren: Auf Ebene des Alkoholmetabolismus (ALDH2) ließ sich klinisch eine Flush-Symptomatik bei Alkoholkonsum provozieren, welche die Genträger vor übermäßigem Konsum schützen kann. Ähnlich protektiv ist eine zentralnervöse Wirkungssensitivität bestimmter Genträger des Serotonintransporters gegenüber Alkohol, die als phänotypisches Korrelat erhöhte Amygdalaaktivität im Provokationsversuch zeigten (20). Indirekte Beziehungen von Endophänotypen mit alkoholabhängigem Verhalten werden in genetisch beeinflussten Syndromen wie Schizophrenie und Bipolarer Störung gesehen, die durch erhöhte neurochemische Vulnerabilität gegenüber Stressoren zu erklären sein könnten (66).

Tab.3: Beispielstudien mit Endophänotypen.

Klinischer Parameter	Assoziiertes Gen	Studie
P300-Messung im EEG	CHRM2	P300 event-related potential amplitude as an endophenotype of alcoholism-evidence from the collaborative study on the genetics of alcoholism [64]
Amygdala BOLD-Signal im fMRT	5HTT	Serotonin transporter genotype (5-HTTLPR): effects of neutral and undefined conditions on amygdala activation [20]

2.1.8.4 Assoziationsstudien

Assoziationsstudien korrelieren genetische Polymorphismen mit dem Auftreten von komplexen Erkrankungen bei verwandten als auch bei nicht-verwandten Personen. Dabei versucht man in Fall-Kontroll-Studien genetische Varianten mit dem Risiko für eine bestimmte Krankheit zu assoziieren und die Auswirkung für deren Einfluss zu quantifizieren. Etwa 99% des Erbgutes sind bei allen Menschen identisch (67). Es können verschiedene Arten der genetischen Variation untersucht werden. Mögliche Marker für den Nachweis genetischer Variationen sind sog. Mikrosatelliten. Dabei handelt es sich um kodierende oder nicht-kodierende Regionen, die durch charakteristische Wiederholungen gekennzeichnet sind. Die

am häufigsten verwendeten Marker sind jedoch Einzel-polymorphismen (Single-Nucleotid-Polymorphism, SNPs), also charakteristische Punktmutationen einzelner Basen. Man spricht von einem SNP, wenn der Austausch innerhalb einer Population häufiger als 1% auftritt. Etwa 90% der Variabilität des genetischen Codes geht auf SNPs zurück. Mehr als 10 Millionen SNPs kommen im humanen Genom vor (68). Die Schwierigkeiten der Interpretation von Assoziationsstudien auf genetischer Ebene lassen sich wie folgt subsumieren: Viele Einflüsse auf Krankheit mit jeweils geringem Effekt, genetische Heterogenität, Gen-Gen-Interaktionen (Epistasie), Gen-Umwelt-Interaktionen und phänotypische Heterogenität (69).

Tab. 4: Alkoholrelevante SNPs aus der genomumfassenden Assoziationsanalyse „GWAS“ (70).

SNPs	Chromosomale Lokalisation	Gen	p-Werte	Odds Ratio
rs7590720	2q35	Unbekannt	9,72 E -9	0,76
rs1344694	2q35	Unbekannt	1,69 E -8	0,74
rs705648	2q35	PECR	1,78 E -6	1,29
rs13362120	5q15	CAST	1,85 E -5	1,23
rs1614972	4q23	ADH1C	1,41 E -4	0,80

2.1.9 Diagnostik und Therapie Alkoholabhängigen Verhaltens

In erster Linie beruht die Alkoholabhängigkeit auf einer klinischen Diagnose-sicherung nach den oben erwähnten Diagnosesystemen ICD-10 und DSM-IV. Diagnosen im Zusammenhang mit alkoholabhängigem Verhalten sind: akute Intoxikation, Schädlicher Gebrauch, Abhängigkeitssyndrom, psychotische Störung und anamnestisches Syndrom. Zur Sicherung der Diagnose mit möglichst hoher Reliabilität gibt es unterschiedliche standardisierte Testverfahren: Composite International Diagnostik Interview (CIDI), Internationale Diagnosenchecklisten (IDCL), u.a.. Der akute Rausch lässt sich (nach Soyka (71)) in vier Stadien einteilen: Leicht/ BAK<1,5‰ (Enthemmung, Motorische Störungen), Mittel/ BAK<2,5‰ (Verstärkte Einschränkung motorischer Funktion, evtl. Nystagmus, verminderte Selbstkritik), Schwer/ BAK>2,5‰ (Gleichgewichtsverlust, Dysarthrie, Ataxie, Schwindel, Orientierungsstörungen, illusionäre Verknennung, Angst oder

Erregung), Alkoholisches Koma/ BAK>4‰ (Letale Bedrohung durch Dämpfung des Atemantriebs). Die Stufen vom normalen über schädliches bis hin zum abhängigen Verhalten sind fließend. Das manifeste Bild einer Alkoholabhängigkeit ist durch die operationalisierten Diagnosesysteme klar definiert (siehe oben Definition der Alkoholabhängigkeit). Des Weiteren treten unspezifische Symptome wie depressive Verstimmung, Stimmungslabilität, Gedächtnislücken, Nervosität, Unruhe, Insomnie sowie Konzentrationsstörungen auf. Das klinische Bild einer Alkoholabhängigkeit (F10.2x) präsentiert sich jedoch als oligosymptomatisches Zusammenspiel von internistischen, neurologischen und psychiatrischen Störungen. Laut einiger Studien existiert eine hohe Lifetime-Prävalenz (=70-80%) bei Alkoholabhängigen für andere psychiatrische Krankheiten (72). Häufige Komorbiditäten einer Alkoholabhängigkeit sind eine narzistische und/oder antisoziale Persönlichkeitsstörung, affektive Störungen, sowie Angststörungen (5). Die Therapie richtet sich nach der genauen Diagnose (nach ICD-10 oder DSM-IV). Es gibt unterschiedliche Therapiekomponenten (pharmakologische, psychotherapeutische, u.a.), deren Einsatz individuell und in Absprache mit dem Patienten abzustimmen ist. In Deutschland üblich ist eine „qualifizierte Entzugsbehandlung“ (2) über mehrere Wochen, die neben der akuten Behandlung des Alkoholentzugssyndroms auf eine Wiederherstellung neuro-physiologischer, kognitiver und emotionaler Stabilität abzielt. Die Therapieansätze sind nicht einheitlich und von Klinik zu Klinik verschieden. Jedoch wird häufig eine Kombination aus Psychotherapie und gezielter pharmakologischer Intervention angestrebt, was die Rückfallquote positiv zu beeinflussen scheint (73). Dabei kommt unter anderem der Glutamatrezeptorantagonist Acamprosat zum Einsatz, der mit NMDA-Rezeptoren interagiert.

2.2 Der NMDA-Rezeptor

Glutamat ist der häufigste exzitatorische Transmitter im ZNS und ist von Bedeutung für die neuronale Entwicklung und Funktion, sowie für Lernprozesse und Gedächtnis (74). Glutamat entfaltet seine Wirkung postsynaptisch an 3 verschiedenen Rezeptortypen, deren Einteilung aufgrund von Agonisten getroffen wird: AMPA, Kainat und NMDA. Die erwähnten Rezeptoren haben alle gemeinsam, dass sie durch den endogenen Agonisten L-Glutamat stimuliert werden. Die

Glutamatkonzentration im ZNS beträgt rund 10mM, wobei der größte Anteil in präsynaptischen Vesikeln gespeichert ist (75). Funktionell lassen sich die Rezeptortypen weiter in metabotrope Rezeptoren und ionotrope Rezeptoren unterteilen. Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) sind membranständige Rezeptoren mit sieben putativ transmembranen Domänen. Ihre Funktionsweise ist durch die Kopplung an guanylnukleotidbindende Proteine (G-Proteine) und die nachfolgende Signalkaskade gekennzeichnet. Die Unterteilung in drei Gruppen wird anhand der Gemeinsamkeiten in der Struktur und in Analogie der Signaltransduktionskaskade getroffen. Gruppe 1 (mGluR1; 5) wirkt nach Bindung von Glutamat oder einem kompetitiven Agonisten über Aktivierung der Adenylylcyclase, welche wiederum die Phospholipase C aktiviert unter anschließenden Bildung von 1,4,5-Inositoltrisphosphat (InsP3) und Diacylglycerol (DAG). Die Gruppen 2 (mGluR2) und 3 (mGluR4) hemmen die Adenylylcyclase.

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Kationenkanäle, die nach Bindung durch Glutamat oder einen kompetitiven Agonisten die transmembrane Permeabilität für verschiedene Kationen erhöhen. Ionotrope Glutamatrezeptoren vermitteln in der Regel die rasche, postsynaptische Exzitation durch schnelle Öffnung, das Resultat ist eine erhöhte transmembrane Natrium- und Kaliumpermeabilität (76). Für die Struktur ionotroper Rezeptoren ist der im Folgenden besprochene NMDA-Rezeptor exemplarisch.

Der NMDA-Rezeptor (NMDAR) ist ein oligomerer Proteinkomplex aus 4 oder 5 Einheiten, welche als Ionenkanal um eine zentrale Pore organisiert sind. Die Kanalpore ist im inaktiven Zustand durch ein Magnesiumatom blockiert und im aktivierten Zustand durchlässig für Natrium-, Kalium-, und Calciumionen (77). Die invariante, homologe Untereinheit ist mit NMDAR1 bezeichnet. Sie ist in allen Formen von NMDAR vorhanden und für dessen Funktion unabdingbar. Als variable homologe Untereinheiten konnten bereits NMDAR2A-D sowie die Untereinheiten NMDAR3A und 3B kloniert werden. Die Zusammensetzung beeinflusst die Kinetik, die „Open-channel-conductance“ und die Spannungsabhängigkeit des Rezeptors (78). Welche Untereinheiten dominieren, hängt u.a. vom neuronalen Entwicklungsstadium und der anatomischen Lokalisation der Rezeptoren ab. So konnte im Tiermodell eine Verschiebung der Expression von NMDAR2D zu NMDAR2A mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden (79).

NMDAR2A und NMDAR2B sind vor allem im Hippokampus und Cortex von erwachsenen Säugetieren zu finden. NMDAR2C ist bevorzugt im Cerebellum und Rückenmark, NMDAR2D im Hirnstamm und Mesencephalon exprimiert (80). Ionenkanäle öffnen nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip. Der NMDA-Rezeptor nimmt jedoch gegenüber den anderen ionotropen Glutamatrezeptoren eine Sonderstellung ein: zur Aktivierung bedarf es nicht nur der Bindung von Glutamat, sondern auch stets der Anwesenheit von Glycin als Koagonist. Die Glutamatbindungsstelle befindet sich vermutlich auf der NMDAR2-Untereinheit, die Glycinbindungsstelle auf der NMDAR1-Untereinheit. Der Koagonismus wirkt sich wie eine endogene Regulation aus, da eine übermäßige Erregung und die daraus resultierende Exzitotoxizität unwahrscheinlicher werden (81). Des Weiteren dient der NMDA-Rezeptor als Koinzidenzdetektor, da zusätzlich zum Koagonismus eine Vordepolarisation in Form einer tetanischen Reizung oder gleichzeitige Depolarisation eines benachbarten Kanals (AMPA-Rezeptors) vorliegen muss um den Magnesiumblock zu entfernen und somit einen Ionenfluss passieren zu lassen.

2.2.1 Die Genomische Struktur von NMDAR1

Das NMDAR1-Gen konnte durch Fluoreszenz-Insitu-Hybridisierung (FISH) auf Chromosom 9 auf 9q34.3 lokalisiert werden (82). Das Gen umfasst 21 Exons über 31 kb (83). Die Organisation des Gens ist, analog zum Protein, in drei Segmente aufgeteilt:

1. Segment=Exons 1 bis 11 kodieren für die N-Terminale, extrazelluläre Domäne (84).
2. Segment=Exons 12 bis 19 kodieren für die Glutamat/NMDA-Bindungsstelle (85) und die 4 transmembranen Segmente.
- Segment=Exons 20 bis 21 kodieren für die C-Terminale Region de Proteins.

Die Promoterregion beinhaltet eine putative TATA-Box 629 bp oberhalb (upstream) des Startkodons und zwei Sp1-Bindungsstellen. Drei zusätzliche Bindungsstellen für Sp1-Transkriptionsfaktoren wurden im ersten Intron nachgewiesen. Eine Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor AP1 wurde 33 bp upstream des zweiten Exons lokalisiert (83). Außerdem konnten zwei hochkonservierte Erkennungssequenzen aus dem Drosophila-Homeobox-Gen even-skipped (eve)

detektiert werden (86, 87): 225 bp upstream des Startkodons und in reverser Ausrichtung im Exon 1. Diese Sequenzen haben eine wichtige Bedeutung für die Genregulation und deuten auf unterschiedliche Expressionsraten in verschiedenen Entwicklungsstufen hin (78). Das NMDAR1 Genprodukt von ist 938-Aminosäuren lang und zeigt sowohl eine hohe strukturelle Konservierung, d.h. dass sich im Verlauf der Evolution nur wenige Aminosäuren verändert haben. Die 8 Splicevarianten unterscheiden sich sowohl am C-Terminalen Ende, als auch sequentiell. Die Splicevarianten resultieren aus alternativem Splicing der Exons 4, 20 und 21 konnten zeigen, dass die in Ratten exprimierten Isoformen auch beim Menschen vorkommen. Sie konnten außerdem zeigen, dass zellspezifische Faktoren die Expression der verschiedenen Isoformen kontrollieren (83). Das resultierende Protein hat signifikante Struktureigenschaften zu AMPA/Kainat- Rezeptoren; alle besitzen 4 putativ transmembrane Segmente und eine extrazelluläre Domäne.

2.2.2 Die Genomische Struktur von NMDAR2A

Das für den humanen NMDAR2A kodierende Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 16 mit Genlokus 16p13.2 (88). Das Gen umfasst 14 Exons und 13 Introns. Laut Informationen des Internetportals Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression/>) konnten 2 Isoformen durch alternatives Splicing im 5'-Bereich des mRNA-Produkts mit Hilfe von Plasmidtranskripten isoliert werden.

2.2.3 Die Genomische Struktur von NMDAR2B

Das für NMDAR2B kodierende humane Gen ist auf Chromosom 12, Lokus 12p12 zu finden. Die Struktur dieses Gens hat große Ähnlichkeit mit dem verwandten Gen NMDAR2A. Hess et al. konnten die Sequenz des NMDAR2B-Gens aus isolierter cDNA von Rattus Norvegicus bestimmen und eine Übereinstimmung mit humaner DNA von 98 % nachweisen (89). Das Genprodukt umfasst 1484 Aminosäuren.

2.2.4 Der NMDA Rezeptor als Kandidatengen bei Alkoholabhängigkeit

Akute Ethanolexposition inhibiert die Funktion des NMDA-Rezeptors, welches bei chronischem Alkoholabusus zu einer vermehrten Expression führt (90). Diese auch als Homöostase bezeichnete Reaktion des Organismus bezieht sich auf die bereits erwähnte Toleranz gegenüber Alkohol. Die vermehrte Rezeptorzahl hat eine Dosissteigerung zur Folge und ist mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung alkoholabhängigen Verhaltens. Außerdem werden Entzugserscheinungen mit der veränderten Rezeptordichte in Verbindung gebracht. Selbst nach erfolgreicher Entwöhnung können Stressoren wieder zu „sekundärem/ erlernten Entzug“ führen (91). Es wird vermutet, dass sowohl Toleranzentwicklung als auch Entzugserscheinungen abhängiges Verhalten hervorrufen (92). Die Inhibition von NMDA-Rezeptoren im ZNS ist jedoch nicht global, sondern scheint sich auf verschiedene Teile des ZNS unterschiedlich auszuwirken. Vor allem Regionen des limbischen Systems und der Hippocampus sind betroffen, während z.B. im medialen Septum fast keine Inhibition nachzuweisen ist (93). In-Vitro-Versuche konnten außerdem ein unterschiedliches Ansprechen von NMDA-Rezeptoren auf Ethanol in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation (Zellsoma versus Präsynaptisch) nachweisen (94). Diese Unterschiede werden in Teilen mit der Komposition der Untereinheiten des Rezeptors begründet. Bisherige Befunde deuten darauf hin, dass die subzelluläre Organisation des NMDA-Rezeptors mit der Vulnerabilität gegenüber einer Chronifizierung eines alkoholabhängigen Verhaltens in Beziehung steht. Theorien über implizites Gedächtnis und die Rolle von Glutamat im „Verstärkersystem“ legen eine Bedeutung des NMDAR-Rezeptors für die Charakterisierung der Alkoholabhängigkeit nahe.

III. Material und Methoden

3.1 Auswahl des Probandenkollektivs

Nachdem die Studie von der Ethikkommission der Charité bewilligt wurde, wurden die Probanden an der Charite, Campus Mitte in der Klinik für Psychiatrie rekrutiert. Die Einschlusskriterien für Patienten waren eine nach ICD-10 und DSM-IV Kriterien diagnostizierte Alkoholabhängigkeit, keine andere neurologische oder psychiatrische DSM-IV-Achse-I-Störung und kein anderer Substanzmissbrauch als Nikotin, welches durch randomisierte Urintests, sowie klinisches Interview für DSM-IV-Achse-I-Störungen (SCID-I, (95)) getestet wurde. Der Alkoholkonsum und die Entzugssymptome wurden mit der Alcohol Drinking Scale (96) und der Obsessive Compulsive Drinking Scale (97) quantifiziert. Die gesunden Probanden durften keine neurologischen oder psychiatrischen Achse-I-oder Achse-II-Störungen vorweisen (SCID-I und SCID-II) und keine Verwandten ersten Grades mit psychiatrischen Störungen.

3.2 Genetischer Teil

Da für alkoholabhängiges Verhalten ein oligo- und polygener Vererbungsweg postuliert wird, wurde in der vorliegenden Studie für die Untersuchung der identifizierten Polymorphismen die Methode der Assoziationsstudie gewählt, womit auch kleinere Einflüsse von Suszeptibilitätsloki auf die Pathogenese einer Erkrankung ermittelt werden können (98). Da die Studie lediglich longitudinalen Charakter hatte und die DNA der Eltern der betroffenen nicht vorlag (und somit eine Analyse der beiden nicht an den Patienten vererbten elterlichen Allele nicht möglich war) wurde das klassische Modell der Fall-Kontroll-Studie mit nicht-verwandten Patienten und gesunden Kontrollpersonen gewählt. Das Kontrollkollektiv wurde bzgl. eines Hardy-Weinberg-Gleichgewicht getestet. Mit dieser Berechnung wurde sichergestellt, daß in der untersuchten Kontrollpopulation alle Allele eines Genortes die gleiche Chance zur Vererbung besitzen und es sich damit nicht um eine genetisch isolierte Subpopulation, sondern um ein repräsentatives Normalkollektiv handelt, welches daher in Assoziationsstudien verwendet werden kann.

3.2.1 Auswahlkriterien der SNPs

1. **Studienlage:** bereits in mindestens einer validen Studie als relevant im Sinne der Fragestellung nachgewiesen.
2. **Heterozygotenindex** (Verteilung in der Normalbevölkerung): Der bei NCBI angegebene Wert mußte größer 20 % sein.
3. Möglichst breite „**Abdeckung**“ **des Gens**, d.h. Auswahl von SNPs aus den Promoterregionen sowie über das gesamte Gen verteilt, möglichst aus kodierenden Regionen mit Einfluss auf Splice-Varianten.

Die verwendeten Quellen waren hierbei die Internet-Datenbanken NCBI/SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), sowie NCBI/OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

3.2.2 Ausgewählte SNPs des Gens NMDAR1

Abb.2: Chromosom 9 und selektierte Polymorphismen des NMDAR1-Gens.

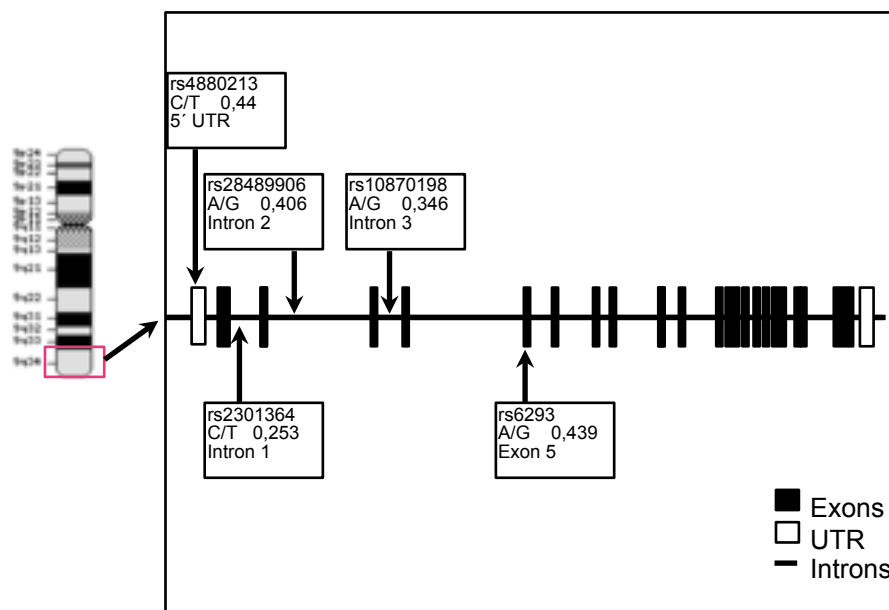


Abb.2: Schematisches Modell mit Introns und Exons. In den Kästen sind mögliche Allele, Heterozygotenindex und Position des Polymorphismus angegeben (modifiziert nach Schumann (33)).

Tab.5: Untersuchte SNPs für NMDAR1.

SNP	mRNA Position	Genposition	Heterozygot. Index	Allele
rs4880213	814004	5' near Region	0,44	C/T
rs2301364	817538	Intron 1	0,253	C/T
rs28489906	821402	Intron 2	0,406	A/G
rs10870198	825323	Intron 3	0,346	A/G
rs6293	834241	Exon 5	0,439	A/G

Tab.5: Position im Gen angegeben als mRNA-Positionen, Lokalisation innerhalb des Gens, Heterozygotenindices und Allele (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

3.2.3 Ausgewählte SNPs des Gens NMDAR2A

Abb.3: Chromosom 16 mit den selektierten Polymorphismen des NMDAR2A-Gens.

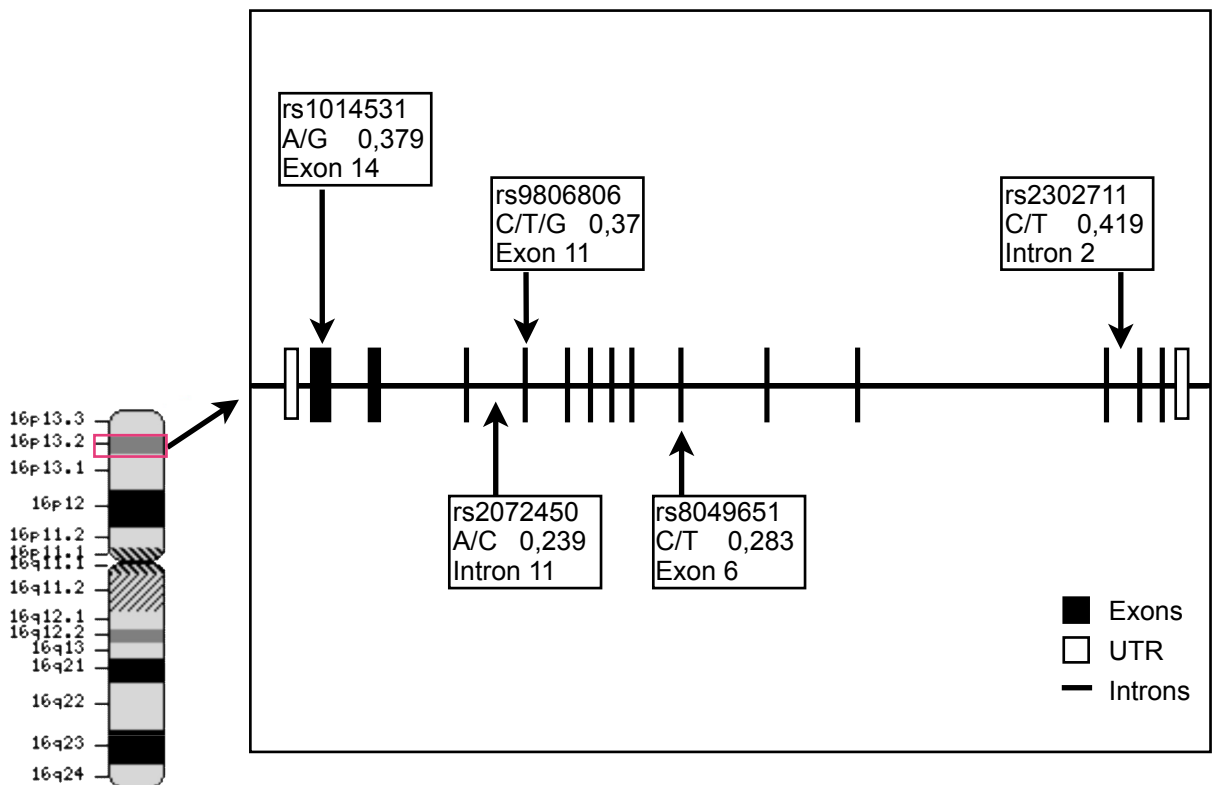


Abb.3: Schematisches Modell mit Introns und Exons (modifiziert nach Schumann (33)). Die Grossbuchstaben unter den SNPs bezeichnen die Allele, die Dezimalzahlen sind die Heterzygotenindices.

Tab.6: Untersuchte SNPs für NMDAR2A.

SNP	mRNA Position	Genposition	Heterozygot. Index	Allele
rs2302711	1588777	Intron 2	0,419	C/T
rs8049651	1256745	Exon 6	0,283	C/T
rs9806806	1229283	Exon 11	0,37	C/G/T
rs1014531	1168873	Exon 14 / 3'UTR	0,379	A/G
rs2072450	1228791	Introns 11	0,239	A/C

Tab.6: Position im Gen angegeben als mRNA-Positionen, Lokalisation innerhalb des Gens, Heterozygotenindices und Allele (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

3.2.4 Ausgewählte SNPs des Gens NMDAR2B

Abb.4: Chromosom 12 und selektierte Polymorphismen des NMDAR2B-Gens.

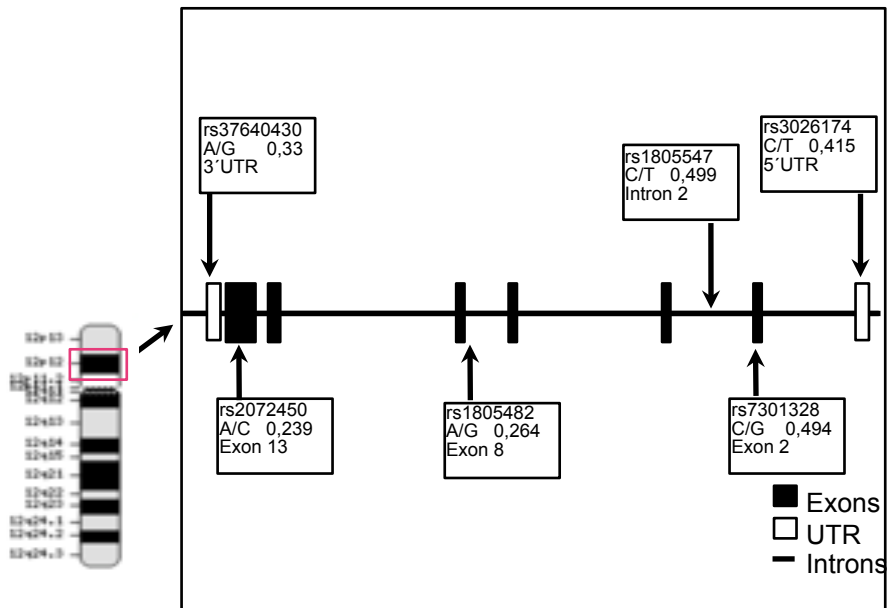


Abb.4: Schematisches Modell mit Introns und Exons (modifiziert nach Schumann (33)). Die Grossbuchstaben unter den SNPs bezeichnen die Allele, die Dezimalzahlen sind die Heterzygotenindices.

Tab.7: Untersuchte SNPs für NMDAR2B.

SNP	mRNA Position	Genposition	Heterozygot. Index	Allele
rs3026174	6472758	5'near region	0.415	C/T
rs7301328	6777751	Exon 2	0.494	C/G
rs1805547	6666696	Intron 2	0,499	C/T
rs1805482	6523748	Exon 8	0.264	A/G
rs1806201	6476482	Exon 13	0.41	A/G
rs3764030	6892306	3'near region	0.33	A/G

Tab.7: Position im Gen angegeben als mRNA-Positionen, Lokalisation innerhalb des Gens, Heterozygotenindices und Allele (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

3.2.5 Primerkonstruktion

Die cDNA-Sequenzen der Gene NMDAR1, 2A und 2B wurden bei der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) ermittelt. Die Primer flankieren die bei der PCR zu amplifizierende DNA-Region und stellen die von der DNA-Polymerase für die DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung benötigten freien 3'-OH-Gruppen zur Verfügung. Die Spezifität der Primer wird von deren Länge, Schmelztemperatur, CG-Gehalt und Gehalt an Nukleotidrepeats bestimmt. Die Primer wurden mit der Software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>) überprüft. Die Entwicklung erfolgte anhand folgender Richtlinien:

1. 18-22 bp lange Primer.
2. Differenz der Schmelztemperatur zwischen „forward“ und „reverse“ Primer maximal 4° C.
3. Keine inter- oder intramolekulare Komplementärstrukturen am 3'-Ende, um die Bildung von Primer-Dimern zu verhindern.
4. Fragmentgröße zwischen 100 bp und 400 bp.

Tab.8: Primer, Fragmentlänge und Annealingtemperatur des PCR-Produktes.

SNP	Primer	Primer (antiparallel)	PCR- Produkt	Temperatur
rs4880213	5`-gagatggccagctccgttcc-3`	5`-ggctctacatcctctgcagg-3`	243bp	65°C
rs2301364	5`-ccttggtggtcctcagag-3`	5`-gtcctgtttaaagctctgcag-3`	363bp	37°C
rs28489906	5`-cagacacagagaactgagg-3`	5`-ggacaagctgagctcagg-3`	267bp	55°C
rs10870198	5`-ggactgacacaggtggag-3`	5`-ctcctacctggagctcgc-3`	255bp	37°C
rs6293	5`-cagccgctgatgtaacatg-3`	5`- gatgcctaggcagcatcgc-3`	170bp	37°C
rs230277	5`-ctccaagaggcctcgacg-3`	5`-cactgc atcctcgacctc-3`	243bp	55°C
rs8049651	5`-gttactatcgat gatccatgc-3`	5`-gacaaccatctcagcatgc-3`	192bp	37°C
rs9806808	5`-gaggcatgccgagagtc-3`	5`-cagtgccctaatggaagcac-3`	194bp	37°C
rs1014531	5`-ctgttggtgctatgaagtgg-3`	5`-gtacaatgccatctgtctgc-3`	246bp	37°C
rs3764030	5`-gaccggtaccagctgttttc-3`	5`-ggctctgtgtggagaagc-3`	239bp	55°C
rs7301328	5`-gcatgttttagtctcagcac-3`	5`-cgcatctgtgatctcatgtc-3`	220bp	37°C
rs1805547	5`-gaacagcaggtgaaacacag-3`	5`-ctgacctacaggacaccac-3`	152bp	50°C
rs1805482	5`-gcagaagctgcctctacaac-3`	5`-ctgccatcagcgaggcacc-3`	375bp	37°C
rs1806201	5`-gccaggtcactgacctcagctc-3`	5`- cagaatgctgaagctgcggc-3`	451bp	55°C
rs3026174	5`-gcttgactgcaggatgcc-3`	5`-cctctgtcctctctcagtc-3`	362bp	37°C
rs2072450	5`-gctatggagtctgtgttacac-3`	5`-cactcagaaaacctctacc-3`	191bp	37°C

3.3 Experimenteller Teil

3.3.1 DNA-Extraktion

Von jedem Studienteilnehmer wurde 30 ml venöses Blut entnommen. Die Proben wurden pseudonymisiert um Anonymität zu gewährleisten und bei -20°C konserviert. Zur Extraktion der genomischen DNA wurde ein Kit der Firma Qiagen gemäß der gegebenen Anleitung verwendet: nach Auftauen des tiefgefrorenen EDTA-Blutes bei Raumtemperatur wurden 8 ml Blut in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen, in dem sich 15 ml Lyse-Puffer (FG1) befanden, gegeben. Die gesamte Mischung wurde 5 mal geschwenkt und anschließend mit der „Hettich-Zentrifuge“ für 8 min bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde der rote Überstand abgetrennt und verworfen und der Lyseschnitt mit 5 ml Lyse-Puffer und einer Zentrifugation (5 min bei 5000 Umdrehungen) wiederholt. Der Überstand wurde abgetrennt und verworfen. Dem schloss sich eine erneute Wiederholung des Lyseschnittes (3 ml Lyse-Puffer und Zentrifugation für 3 min bei 5000 Umdrehungen) an. Noch einmal wurde der Überstand abgetrennt und verworfen.

Nun erfolgte die Zugabe von 4 ml Puffer FG2, welcher 4 µl Qiagen-Protease enthielt. Durch Mischen wurde ein homogenes Pellet erzeugt. Dieses wurde in ein neues Röhrchen überführt und für 15 min bei 65°C inkubiert.

Danach wurden 4 ml Isopropanol hinzugefügt und gemischt, bis die DNA-Stränge sichtbar wurden. Anschließend wurde bei 4000 Umdrehungen für 3 min zentrifugiert. Es schloss sich ein vorsichtiges Abtrennen des Überstandes an, eine Zugabe von 4 ml Ethanol (70 %) und eine Zentrifugation für 3 min bei 4000 Umdrehungen. Ethanol wurde nun sorgfältig abgetrennt und es erfolgte eine Trocknung bei Raumtemperatur für 40-50 min. Abschließend wurde 1 ml Puffer (FG3) hinzugegeben und eine Inkubation für 60 min bei 65° C durchgeführt.

3.3.2 Polymerasekettenreaktion

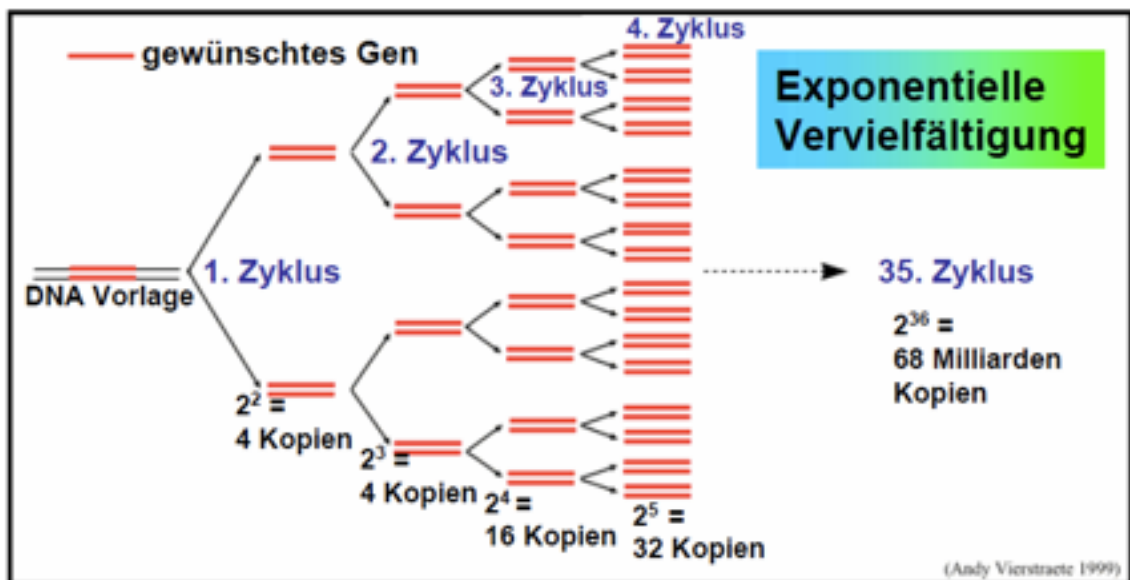
Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung der DNA. Sie ist eine in-vitro Technik, die eine zwischen zwei Oligonukleotid-Primern liegende genomische Sequenz spezifisch durch eine DNA-Polymerase amplifizieren lässt (99). Die DNA-Matrize wird unter Zugabe von Oligonukleotid-Primern, dNTPs, Puffer und DNA-Polymerase in einer Primerverlängerungsreaktion („primer extension“) von 35 Zyklen vervielfältigt. Es entstehen dabei Kopien in einer Größenordnung von 2^{35} . Dabei durchläuft der Zyklus folgende drei Schritte:

Denaturierung: Die Reaktionslösung mit der DNA den Primern (welche als Start-DNA dienen) und den Nukleotiden (welche an Primer angehängt werden) sowie der Taq-Polymerase (vom *Bacillus Therminus Aquaticus*w) wird auf 95° C erhitzt. Dadurch trennen sich die beiden komplementären Stränge, die DNA „denaturiert“.

Hybridisierung („Annealing“): Durch das Herabsetzen der Temperatur auf 55°C-65° C (abhängig von den verwendeten Primern) verbinden sich die Primer mit der DNA. An diesen Stellen beginnt die Polymerase damit, weitere komplementäre Nukleotide anzubauen und damit die Verbindung zwischen Primern und DNA zu verlängern.

Verlängerung: Die Temperatur wird nun wieder erhöht, diesmal auf 72° C. Das ist die ideale Arbeitstemperatur für die verwendeten Polymerasen, welche weitere Nukleotide an die entstehenden DNA-Stränge anbauen.

Abb.5: Schematische Übersicht der exponentiellen DNA-Vervielfältigung (Quelle: <http://www.wzw.tum.de/bmlt/Vorlesung/Allgemein/PCR.pdf>).



Um die optimalen Bedingungen für die verschiedenen Primer bestimmen zu können, wurde zunächst eine Gradienten-PCR durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Annealingtemperaturen (53° C, 53,3° C, 54,5° C, 56,3° C, 58,6° C, 61,1° C, 63,9° C, 66,5° C, 69,0° C, 71,1° C, 72,6° C, 73,4° C) und Magnesiumchloridkonzentrationen (30µl/ml, 40µl/ml, 50µl/ml, 60µl/ml) untersucht. nach Auswertung der entstanden PCR-Produkte wurden folgende Bedingungen für die PCR festgelegt:

Tab.9: Verwendete Zusammensetzung des Mastermix für die PCR.

NMDAR1	rs2301364 rs10870198 rs6293		rs4880213 rs28489906	
NMDAR2A	rs9806806 rs8049651	rs2302711 rs2072450	rs1014531	
NMDAR2B	rs1806201 rs3764030	rs7301328 rs1805547	rs1805482	rs3026174
Wasser	14,2µl	14,0µl	13,8µl	13,8µl
Puffer(10x Buffer)	2,0µl	2,0µl	2,0µl	2,0µl
dNTP`s (2mM)	1,0µl	1,0µl	1,0µl	1,0µl
MgCl₂ (50mM)	0,6µl	0,8µl	1,0µl	1,2µl
Primer F (10µM)	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,5µl
Primer R (10µM)	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,5µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0,2µl	0,2µl	0,2µl	0,2µl

Tab.9: Zielvolumen waren 19µl, denen 1µl DNA zugefügt wurde, so dass ein Gesamtvolumen von 20µl per Probe entsteht.

Es erfolgte die PCR im Thermocycler, mit folgenden Schritten:

1. Denaturierung bei 94° C für 5 Minuten
2. Denaturierung bei 94° C für 1 Minute
3. Hybridisierung für 1 Minute (Primerabhängig)
4. Verlängerung bei 72° C für 1 Minute
5. Finale Verlängerung bei 72° C für 7 Minuten

Die Schritte 2-4 wurden 35 Mal durchlaufen, dem schloss sich die Kühlung bei 4°C an.

3.3.3 Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP)

Anhand der Sequenz der DNA, die mit einem Restriktionsenzym geschnitten wird, kann die Länge und die Anzahl der aus der Vorlage entstehenden Fragmente vorhergesagt und damit auf das zugrunde liegende Allel rückgeschlossen werden. Die entsprechenden spezifischen Enzyme für jeweils ein Allel des SNPs wurden mit der Software NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) bestimmt. Das Vorliegen unterschiedlicher DNA-Fragmente nach RFLP durch Restriktionsenzyme wird als Restriktionslängenpolymorphismus bezeichnet.

3.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

PCR-Produkte und Restriktionsfragmente lassen sich hinsichtlich der Größe, Konzentration und Spezifität der Amplifikationsreaktion mit einer Gelelektrophorese überprüfen. In der Gelelektrophorese bewegt sich die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Gel unter angelegter Spannung in Richtung der Anode. Die zurückgelegte Strecke ist abhängig von der Molekülgröße. Die PCR-Produkte sowie die enzymatisch hergestellten Teilstücke wurden in einem 2%igen bzw. 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Agarosegele wurde Agarose-Pulver (SERVA 11404, SERVA electrophoresis GmbH, Heidelberg Deutschland) in 1xTBE-Puffer (10xTBE-Puffer) durch Aufkochen gelöst. Das flüssige Gel erstarrte in einem horizontalen Gel-Elektrophorese-Schlitten und wurde anschließend in eine mit 1xTBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Nun wurde eine Mischung des Laufpuffers und PCR-Produkts bei einem Verhältnis von 10µl zu 8-10µl in die Geltaschen appliziert. Zur Einschätzung der DNA-Länge erfolgte die parallele Zugabe eines 50 bp großen Markers (0,5µg/µl, MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth). Die angelegte Spannung lag bei der Auftrennung der PCR-Produkte bei etwa 120 bis 130 V (60-80min). Zur Auftrennung der RFLP-Teilstücke wurde die Spannung auf 100 – 120 V gesenkt und die Auftrennungsdauer auf 80 bis 100 min erhöht. Dann folgte die Anfärbung der Banden mit „SYBR-Gold nucleic acid gel stain“ (Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe Deutschland) in einem Färbebad für ca. eine Stunde. Zur Ergebnisdarstellung wurde ein UV-Licht-Kamerasystem „Gel Imager UST-20M-8E“ (INTAS, Göttingen Deutschland) verwendet.

Tab.10: Restriktionsenzyme für den RFLP in alphabetischer Reihenfolge.

Enzym	SNPs	Inkubationstemperaturen	Erkennungssequenz
AluI	rs2301364	37°C	AGCT
BsaI	rs1805547	50°C	GGTCTC
Bccl	rs7301328	37°C	CCATC
Bfal	rs8049651	37°C	CTAG
Bsll	rs2302711 rs3764030	55°C	CCNNNNNNNGG
BssSI	rs3026174	37°C	CACGAG
BtsI	rs1806201	55°C	GCAGTG
Hinp1I	rs1805482	37°C	GCGC
Hpy188I	rs9806806 rs10870198	37°C	TCNGA
Hpy188III	rs1014531	37°C	TCNNGA
MspI	rs6293	37°C	CCGG
SmlI	rs28489906	55°C	CTYRAG
TaqI	rs4880213	65°C	TCGA

Tab.10: Die Erkennungssequenz bezeichnet die Folge von Basen bei der ein Enzym schneidet. Aus dem „Single-Letter-Code“-Standard: N=eine beliebige Base (A,C,G oder T); R=A oder G; Y=C oder T (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/enzyme-finder>). Das Gesamtvolumen für eine Probe beträgt 20µl. Die Enzyme wurden alle beim Hersteller New England Biolabs (NEB) bezogen.

Abb.6: Auswertung des Abschnittes eines abgelaufenen RFLP.

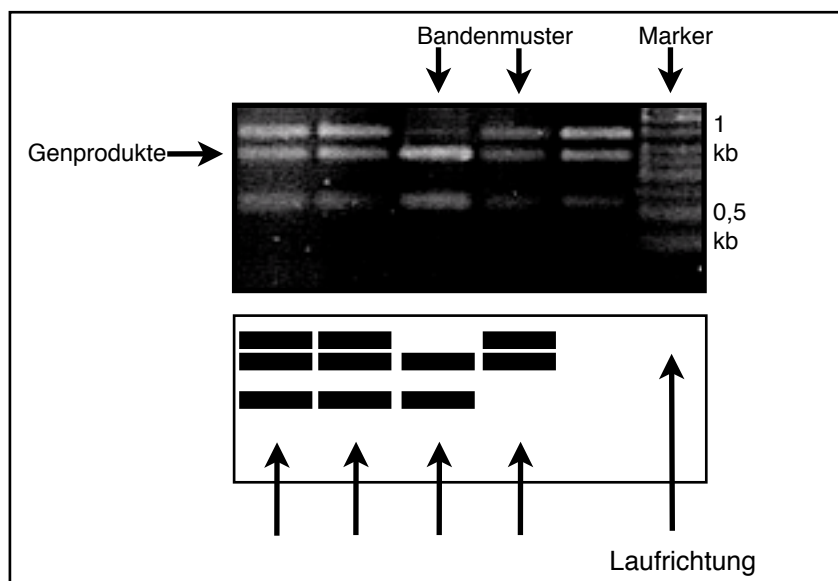


Abb.6: Kb=Kilobasenpaare. Das untere Schema zeigt beispielhaft mögliche Bandenmuster und die Aufteilung in verschiedene Genotypen.

Tab.11: Bandenmuster nach Restriktionslängenpolymorphismus (RFPL) .

SNP	homozygot I	heterozygot	homozygot II
rs2301364	145/13bp T/T	145/124/13/1bp C/T	124/11bp C/C
rs1805547	152bp G/G	152/121/31bp A/G	121/31bp A/A
rs7301328	140/80bp G/G	140/96/80/44bp G/C	96/44bp C/C
rs8049651	154bp C/C	154/133/21bp C/T	133/21bp T/T
rs2302711	231bp C/C	231/171/60bp C/T	171/60bp T/T
rs3764030	167 /38/34bp G/G	167/121/46/38/34bp A/G	121/46/38/34bp A/A
rs3026174	362bp G/G	362/224/138bp A/G	224/138bp A/A
rs1806201	451bp T/T	451/278/173bp C/T	278/173bp C/C
rs1805482	375bp T/T	375/265/110bp C/T	265/110bp C/C
rs9806806	116/78bp C/G	116/78/50bp C/G/T	116/50bp T/T
rs10870198	255bp A/A	255/170/85bp A/G	170/85bp G/G
rs1014531	186/60bp A/A	186/101/85/60bp A/G	101/85/60bp G/G
rs6293	140bp A/A	140/87/53bp A/G	87/53bp G/G
rs28489906	276bp G/G	276/192/75bp A/G	192/75bp A/A
rs4880213	243bp T/T	243/173/70bp C/T	173/70bp C/C
rs2072450	191bp C/C	191/131/60bp A/C	131/60bp A/A

Tab.11: Die Bandenmuster bezeichnen die Aufteilung im RFLP nach Auftrennung mit den jeweiligen Enzymen, die Buchstaben bezeichnen daraus resultierende Genotypen.

3.3.5 Chemikalien

Tab.12: Verwendete Chemikalien.

Funktion	Hersteller
Ethanol absolut	Carl Roth, GmbH, Karlsruhe, Deutschland
QIAamp DNA Blood Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
dNTP 10mM	Rapidozym GmbH
Primer	Tib Mobiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland
10xPCR-Puffer	Gene Craft, Lüdinghausen, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase 5U/ml	BioTherm, Gaithersburg, USA
Agarose SERVA 11404	SERVA electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
10xNEB-Puffer 4	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
10xTBE-Puffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Leiter 50bp 0,5µg/µl	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
MgCl ₂	Bio Therm, Gaithersburg, USA
SYBR-Gold nucleid acid gelstain	Invitrogen molecular probes, Karlsruhe, Deutschland
Loading Buffer	BioTherm, Gaithersburg, USA

3.3.6 Geräte

Tab.13: Verwendete Geräte.

Funktion	Gerätetyp	Hersteller
Inkubator	Thermocenter Salvis Lab	Salvis Lab, Schweiz
Waage	OWA Labor	OWA Labor, ehem. DDR
Zentrifuge	Laboratorian Medical Centrifuge	Lab 4 you, Geesthacht
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Thermo 2720 Cycler	Applied Biosystems, USA
Kühlschrank	Economic (-20°C)	Bosch, München
Pipetten	(Ohne Angabe)	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	(Ohne Angabe)	Sarstedt, Nürnberg
Gelkammer	Maxi Large 480000	Harnischmacher, Ruhr
Spannungsquelle	Elite 300	Wealtec, Südafrika
PCR-Visualisierer	Gel Imager U5S-20M-8E	Intas, Gel Imager, Göttingen
Mikrowelle	Bosch	Bosch, München
Wippschüttler	Unitwist RT	G-Kisker, Steinfurth

3.3.7 Software

Zur statistischen Auswertung kamen die Statistiksoftware Predictive Analytics Software 20 als auch die Software SPM8 des Herstellers IBM zur Anwendung.

3.4 Bildgebungsteil

3.4.1 Einführung zum bildgebenden Verfahren

Die Bildgebungsdaten wurden freundlicherweise von der Forschungsgruppe „Bildgebung“ der Charité Campus Mitte (CCM) unter der Leitung von Dr. Anne Beck zur Verfügung gestellt und gemeinsam ausgewertet. Das Teilkollektiv der Probanden wurde mit funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT) untersucht. Die Forschungsgruppe benutzte dazu den Magnetom Vision, 1,5 Tesla von Siemens im Standort Charité Mitte (CCM). Die technischen Hintergründe dieses Verfahrens werden im Folgenden kurz spezifiziert:

Die fMRT ist ein nicht-invasives Verfahren zur Darstellung der Hirnaktivität. Dabei wird die neuronale Aktivität indirekt über Veränderungen der lokalen Durchblutung gemessen und durch digitale Signalverarbeitung visuell darstellbar. Die fMRT hat ein mäßiges zeitliches, aber ein hohes räumliches Auflösungsvermögen (100). Letzteres wird durch die variierbare Größe der Bildelemente (Volumenelemente=Voxel) ermöglicht. Physikalisch entspricht die Gewebsdifferenzierung unterschiedlicher Feldstärkeveränderung nach Einstrahlung eines magnetischen Hochfrequenzimpulses. Die Energieträger stellen dabei Wasserstoffionen (Protonen) dar, die im sich am Magnetfeld ausrichten. Im Fall des funktionellen MRT spielen vor allem die im Blut vorhandenen Ionen eine Rolle. Neuronen stellen Energie überwiegend durch oxydative Glykolyse bereit, welche über Vasodilatation und Sauerstoffangebot geregelt wird. Die Steigerung der folgenden hämodynamischen Parameter wird proportional zur neuronalen Aktivierung betrachtet: Blutfluß, Blutvolumen und Oxy-bzw. Desoxyhämoglobinkonzentration im Kapillarblut (101). Der Oxygenierungsgrad diente auch bei der von uns verwendeten „Blood Oxygenation Level Dependent“ (BOLD) Technik zur neuronalen Aktivitätsdetektion. Bei dieser Technik wird ein Kontrast von aktiven gegenüber inaktiven Hirnregionen darstellbar, da oxygeniertes und desoxygeniertes Blut verschiedene magnetische Eigenschaften haben (102). Jedoch kann mit der BOLD-Technik

keine Spontanaktivität gemessen werden, so dass man sich stimulativer Methoden bedienen muss. Das von uns dargebotene „ereigniskorrelierte Design“ (103) der Stimulation wird in den folgenden Abschnitten beschrieben („Monetary Incentive Delay Paradigma“ und „Alkohol Cue Paradigma“).

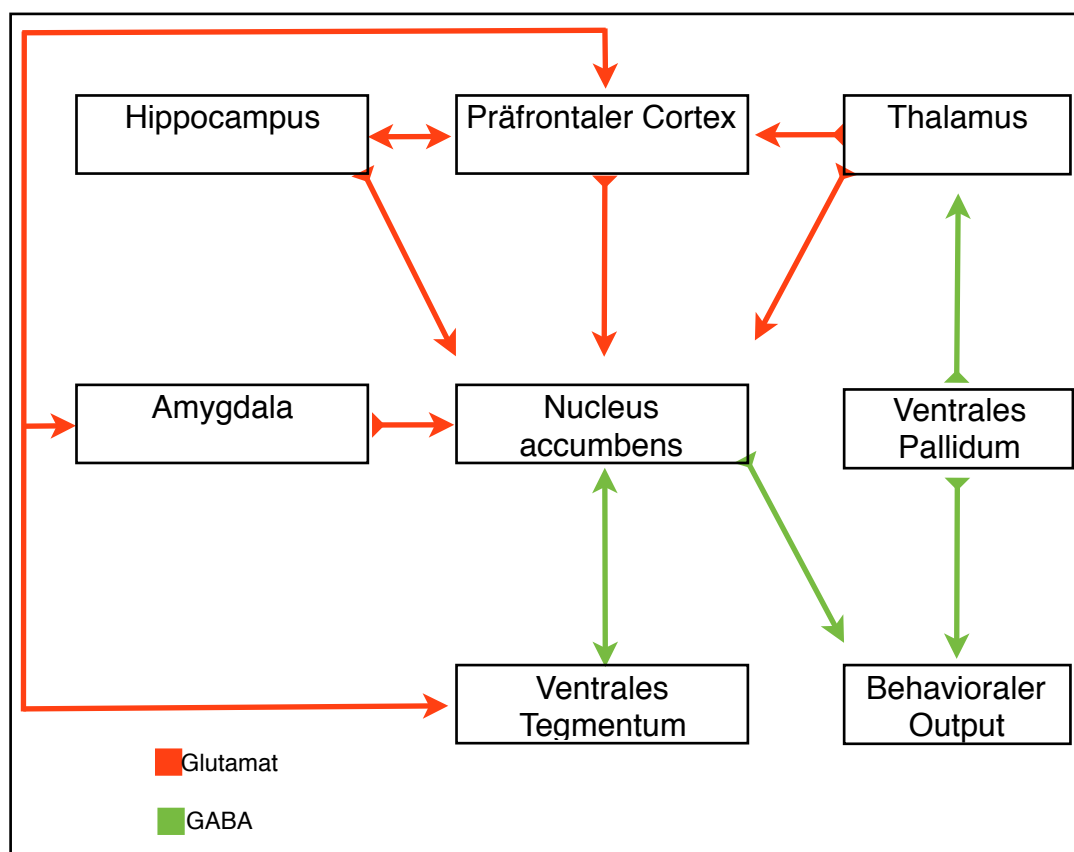
3.4.1 Auswahl des Bildgebungskollektivs

17 alkoholabhängige Patienten und 17 gesunde Kontrollprobanden aus dem Gesamtkollektiv wurden in den Bildgebungsarm der Studie eingeschlossen und mit standardisierten Verhaltensparadigmen untersucht. Des Weiteren wurde eine Untergruppe von 8 alkoholabhängigen Patienten mit einem alkoholassoziierten Paradigma untersucht (beide werden in Folgenden näher beschrieben).

3.4.2 Monetary Incentive Delay Paradigma (MID)

Die Untersuchung des sog. „Belohnungssystems“ erfolgt durch Messung der Aktivität der anatomische Region um den Nucleus accumbens und die ihn umgebenden Projektionen.

Abb.7: Nac und umgebende Projektionen (modifiziert nach Wolf, 2002).



Das dazu verwendete bildgebende Verhaltensparadigma wurde von Prof. Dr. Knutson von der Stanford University, einem Kooperationspartner der Forschungsgruppe an der Charité, entwickelt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei diesem Paradigma, dem Monetary Incentive Delay Task (MID), werden geometrische Figuren im Sinne abstrakter, für die Probanden und Patienten ungewohnter Reize gezeigt. Die unterschiedlichen Bildreize kündigen an, dass mit einer schnellen Reaktion (Tastendruck) entweder Geld gewonnen oder ein Geldverlust vermieden werden kann. Die Probanden erlernen die Bedeutung dieser Reize außerhalb des Scanners. In einer Studie mit gesunden Kontrollpersonen konnten Knutson und Mitarbeiter zeigen, dass bei den (neu gelernten) belohnungsanzeigenden Reizen, die einen möglichen Geldgewinn ankündigen, eine starke Aktivierung des Nucleus accumbens und einiger umgebenden Projektionen auftritt (104).

Während der Untersuchung liegen die Patienten auf dem Rücken im Scanner und sehen das von hinten auf eine Leinwand projizierte Bild über einen verstellbaren Spiegel, der an der Kopfspule befestigt ist. Die Leinwand befindet sich am Kopfende des Scanners. Das Experiment dauert 14 Minuten. Um die statistische Validität zu erhöhen, wurde das Experiment zweimal durchgeführt. Den Teilnehmern wurde vor der Untersuchung das Geld gezeigt und ihnen gesagt, dass sie die höhere Summe der beiden Durchläufe direkt im Anschluss ausgezahlt bekämen (was auch tatsächlich erfolgte). Die Gesamtdauer der Untersuchung beträgt ca. 30 Minuten. Dabei werden den Probanden für die Dauer von jeweils 250 Millisekunden zunächst unterschiedliche geometrische Figuren dargeboten, welche als Hinweisreize (Cues) fungieren und entweder einen bestimmten finanziellen Gewinn oder Verlust (0.10 €. 0.60 €. 3 €) oder aber auch keine finanziellen Folgen indizieren (neutrale Bedingung). Die jeweiligen Verlust- oder Gewinnbedingungen wurden pro Durchgang 9mal (27mal Gewinn in den drei gezeigten Gewinnstufen, 27mal Verlust in den drei gezeigten Verluststufen), die neutrale Bedingung wurde 18mal präsentiert.

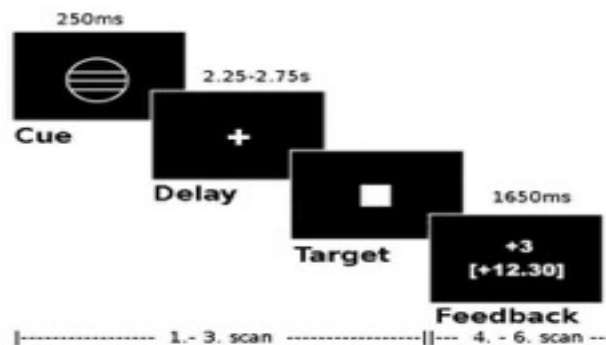
Abb.8: Darstellung der verwendeten Cues des fMRT-Experiments.



nach einem kurzen variablen Zeitintervall (delay) von 2250 – 2750 ms erscheint ein Zielreiz (target) für maximal 1000 ms, auf welchen so schnell wie möglich mit Tastendruck reagiert werden soll. Der Gewinn bzw. die Vermeidung des Verlustes von Geld wird nur dann erreicht, wenn die Reaktion während der Dauer der Targetpräsentation abgegeben wird.

Eine Feedbackmeldung erfolgt nach jeder Reaktion, welche sowohl den tatsächlich jeweils erzielten Gewinn oder Verlust anzeigt, als auch den gesamten bisher erzielten Betrag.

Abb.9: Aufbau eines Versuchs aus dem Monetary Incentive Delay Paradigma.



Die Schwierigkeit der Aufgabe (das zur Reaktion freigegebene Zeitfenster) wurde, auf Basis individueller Reaktionszeitergebnisse in einem Übungsdurchlauf, individuell angepasst, so dass die Probanden in 66 % der trials erfolgreich waren. Dadurch wird die Aufmerksamkeit und Motivation erhöht, da man nicht in jedem Fall gewinnt. Auf der anderen Seite wird durch diese Anpassung das Erleben von Frustration verhindert und ein bestimmter Gewinn gesichert.

3.4.3 Alkohol Cue Paradigma

Das Alkohol Cue Paradigma (ACP) testet die Reaktionen von Probanden im fMRT auf alkohol-assoziierte Bilder gegenüber nicht-alkohol-assoziierten Bildern. Die nicht-alkohol-assoziierten Bilder entstammen dem Bilderpool für standardisierte Abbildungen des internationalen Studienzentrums für Emotionen und Aufmerksamkeit (<http://csea.phhp.ufl.edu/Media.html> (105)). Die alkoholassoziierten Bilder wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. Jana Wrase an der Charité ausgewählt (106). Die Bilder sind also entweder nicht-alkoholassoziiert und besitzen dabei die Qualitäten angenehm, unangenehm und neutral oder sie stellen alkohol-assoziierte Inhalte (Bilder von alkoholischen Getränken) dar.

Abb.10: Schema zur Darstellung des Alkohol Cue Paradigmas.

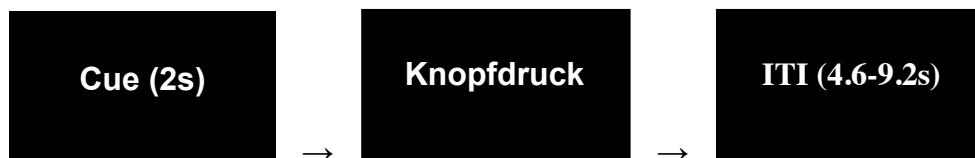


Abb.10: ITI=Intertrial Interval, zwischen den präsentierten Bildern (Cues) durch Darstellung eines Fixationskreuzes.

Jede Bilderkategorie beinhaltete 18 Motive. Jedes Bild wurde für 2s den Probanden präsentiert, wonach die Probanden einen Knopf drücken sollten. Die Probanden wurden nicht dazu aufgefordert die Bilder aktiv zu bewerten, da bereits einfache Bewertungsvorgänge die Amygdalaaktivierung beeinflussen (107). Das Interval zwischen den Bildern (Intertrial interval/ ITI) variierte in zufälligem Intervall zwischen 4,6-9,2s. Während dieser Zeit wurde den Probanden ein Fixationskreuz präsentiert.

Abb.11: Ausgewählte Beispielsbilder des Alkohol Cue Paradigmas.

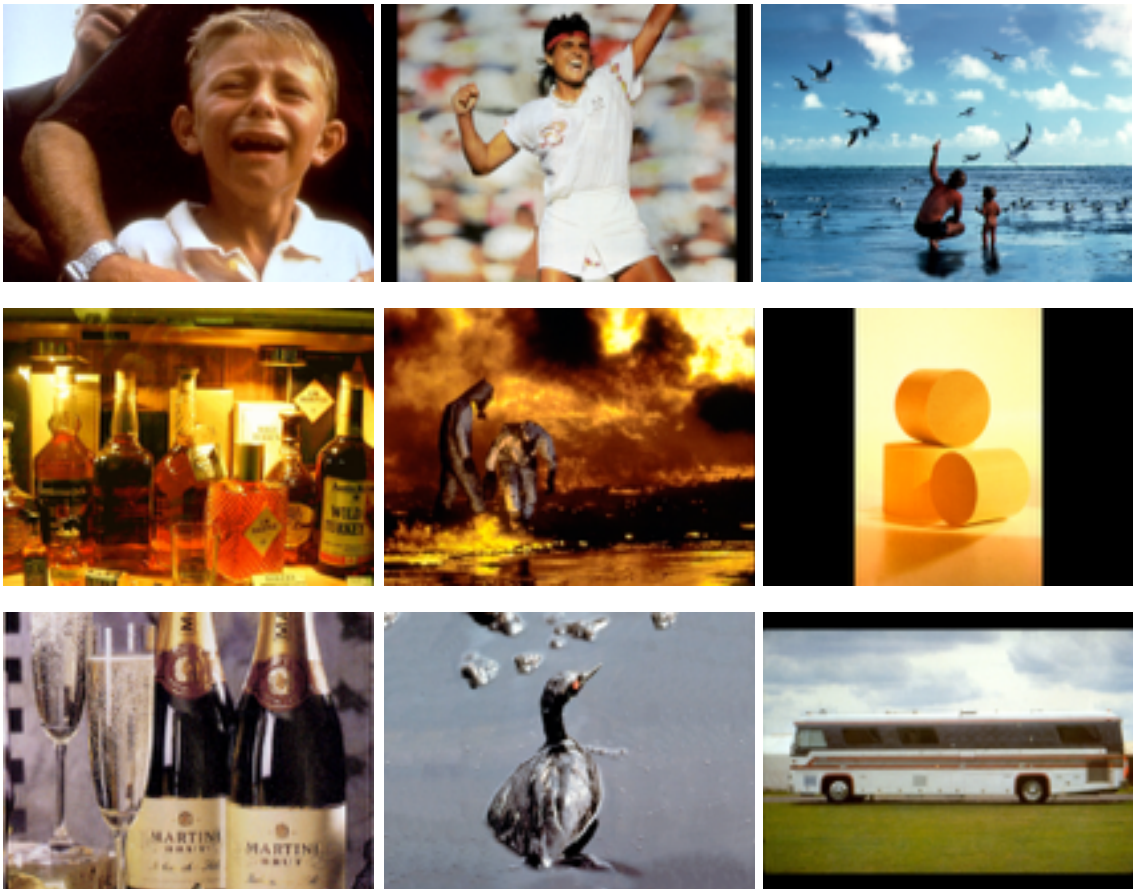


Abb. 11: Die Bilder repräsentieren positive, negative, neutrale und alkoholassoziierte Inhalte.

3.4.4 Geräteanordnung/ Datenerhebung

Die visuellen Stimuli wurden mit dem Programm Presentation (Neurobehavioural Systems. <http://nbs.neuro-bs.com>) gezeigt. Das Programm war installiert auf einem PC auf der Basis von Windows 98 (Microsoft. <http://www.microsoft.com>) und wurde der Versuchsperson über einen LCD-Videoprojektor (NEC Multisync 8000 G) mit VGA Auflösung (640 x 480 Bildpunkte) präsentiert, aus dem das optische System entfernt wurde. Stattdessen wurde eine sog. Bodal-Linse mit großer Brennweite zwischengeschaltet, um auch in der vom Untersuchungsraum vorgegebenen Entfernung von ca. 4 m zwischen Projektor und der Kopfspule noch ein Bild zu erhalten. Das Bild wurde auf eine Mattscheibe (Material Dalite, Daplex) projiziert und konnte über einen einstellbaren Spiegel von der Versuchsperson betrachtet werden, die mit dem Kopf in der MRT-Kopfspule lag und ca. einen Meter weit in die MRT-Röhre hineingefahren wurde. Die Reaktion auf die Aufgabe des Motivations-Paradigmas wurde mit einem MRT-tauglichen Handtaster mit

Mikroschalter ausgeführt, der mit einem abgeschirmten Kabel und einem Hochfrequenzfilter mit dem Stimulationsrechner im MRT-Bedienungsraum verbunden war. An diesem Rechner wurden auch die Reaktionszeiten des laufenden Paradigmas simultan ausgewertet, um dem Probanden im „Feedback“-Bild eine Rückmeldung über Erfolg oder Misserfolg der letzten Spielrunde zu geben. Für die Erhebung der MRT-Daten wurde ein 1,5 Tesla Magnetresonanztomograph (Magnetom Vision®, Siemens, Erlangen) mit einer Standard H-Kopfspule verwendet. Bewegungen wurden mit der seitlichen Kopffixierung in der Spule einem Vakuumkissen minimiert. Die MRT-Untersuchung gliederte sich in eine anatomische Messung (MPRAGE-Sequenz) und zwei funktionelle Messungen (EPI-Sequenz). Im ersten Teil der MRT-Sitzung wurde ein T1-gewichteter anatomischer Datensatz des gesamten Kopfes erzeugt (MPRAGE-Sequenz=magnetization prepared rapid gradient echo, TR=9.7ms; TE=4ms, Flipwinkel 12°, Matrix 256x256 Pixel, Voxelgröße 1x1x1 mm³), der aus 190 axialen Schichten bestand und ca. 8 min dauerte. Während dieser Untersuchung wurde ein Übungsdurchgang des Motivations-Paradigmas durchgeführt. Die funktionelle Datenaquisition erfolgte mittels einer Standard echo-planar-imaging-Sequenz (EPI) von Siemens, welche zur Messung des BOLD-Effektes optimiert wurde (Motivationsparadigma: GE-EPI-Sequenz, 18 Schichten, Reihenfolge der Aufnahmen aufsteigend [ascending], Schichtdicke 3 mm, Schichtabstand [gap] 0.3 mm, Repetitionszeit (TR)=1870 ms, Echozeit (TE)=40 ms, Flipwinkel=90°, Matrix=64x64 Pixel, Voxelgröße=4x4x3.3 mm³; Alkohol-Cue-Paradigma: GE-EPI-Sequenz, 24 Schichten, Reihenfolge der Aufnahmen aufsteigend [ascending], Schichtdicke 3 mm, Schichtabstand [gap] 0.3 mm, Repetitionszeit (TR)=2300 ms, Echozeit (TE)=40 ms, Flipwinkel=90°, Matrix=64x64 Pixel, Voxelgröße=4x4x3.3 mm³). Vor der EPI-Sequenz wurden T1-gewichtete Übersichtsbilder (scouts) in den drei Raumebenen (sagittal, koronar, transversal) aufgenommen, um in der sagittalen Ebene die Schichten parallel zur AC-PC-Linie auszurichten (Verbindungsline zwischen commissura anterior und commissura posterior, nach (108)). Dabei wurde die Schichtführung so gewählt, dass die subkortikal gelegenen Strukturen des dopaminergen Verstärkungssystems sicher erfasst wurden.

3.4.5 Auswertung der (f)MRT-Daten

Die Bilddaten wurden im Folgenden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware SPM8 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>) analysiert. Vor der statistischen Auswertung wurden die Daten homogenisiert und normalisiert. Es erfolgte zunächst eine zeitliche und räumliche Korrektur des erhobenen Datensatzes:

- Homogenisierung der Volumendaten durch Interpolieren, bzw. Anpassung an das mittlere Volumen um für zeitliche Verzögerung bei der Messung der einzelnen Schichten zu korrigieren (slice timing) und Bewegungsartefakte zu minimieren (zeitliche und räumliche Korrektur).
- Normalisierung der Schichtung und Anatomie durch Abgleich mit standardisiertem Modell (räumliche Korrektur), mit dem Resultat einer isometrischen Voxelgröße von 4 x 4 x 4 mm³.
- Die normalisierten Bilder wurden dann mit Hilfe eines Gauss'schen Kerns optimiert (geglättet), um das Signal-Rausch-Verhältnis in den betreffenden Regionen (z.B. des Nucleus accumbens) zu verbessern.

Die statistische Analyse der funktionellen Daten wurde im Rahmen des Allgemeinen Linearen Modells durchgeführt. Für das Motivationsparadigma wurden als Regressoren folgende Bedingungen definiert:

- 1) Gewinnantizipation
- 2) Verlustantizipation
- 3) Neutral

Für das Alkohol-Cue Paradigma wurden diese Bedingungen definiert:

- 1) Alkoholbilder
- 2) Positive Bilder
- 3) Negative Bilder
- 4) Neutrale Bilder
- 5) Alkoholbilder ankündigende Cues
- 6) Positive Bilder ankündigende Cues
- 7) Negative Bilder ankündigende Cues
- 8) Neutrale Bilder ankündigende Cues

Die Regressoren wurden mit einer kanonischen hämodynamischen Antwortfunktion modelliert, um die hämodynamische Verzögerung des BOLD-Signals zu berücksichtigen. Für jeden Probanden wurden voxelweise lineare Kontraste für Gewinnantizipation>Neutral sowie Verlustantizipation>neutral bzw. Alkohol Cue>Neutraler Cue (cue alk>cue neut); Alkohol Cue>Positiver Cue (cue alk>cue pos); Alkohol Bild>Neutrales Bild (pic alk>pic neut) sowie Alkohol Bild>Positives Bild (pic alk>pic pos). Auf Gruppenebene wurden Unterschiede zwischen Alkoholpatienten und gesunden Kontrollen untersucht. Mittels t-Tests wurden anschließend spezifische Aktivierungen für die einzelnen Bedingungen (>Neutral) überprüft. Berichtet werden Ergebnisse für mindestens 10 zusammenhängende Voxel mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.001$ unkorrigiert für das Gesamthirn. A priori wurde zusätzlich die Zielregion (regions of interest; ROI) des ventralen Striatums definiert, um die α -Fehlerkorrektur an kleine Volumina anpassen zu können. In einem kleineren Volumen ist die Anzahl der untersuchten Voxel und somit der durchgeführten t – Tests geringer (small volume correction, SVC). Das Signifikanzniveau der Aktivierungen für diese ROI wird auf $p < 0.05$ family wise error (FWE) korrigiert, festgelegt. Die FWE-Korrektur ist dabei eine Methode der statistischen Kontrolle des α – Fehlers beim multiplen Testen, wobei im Gegensatz zur konservativen Bonferroni-Korrektur die räumliche Korrelation der Voxel untereinander berücksichtigt wird.

Abb.12: Mögliche Darstellung der Auswertung eines Knutson-Paradigmas.

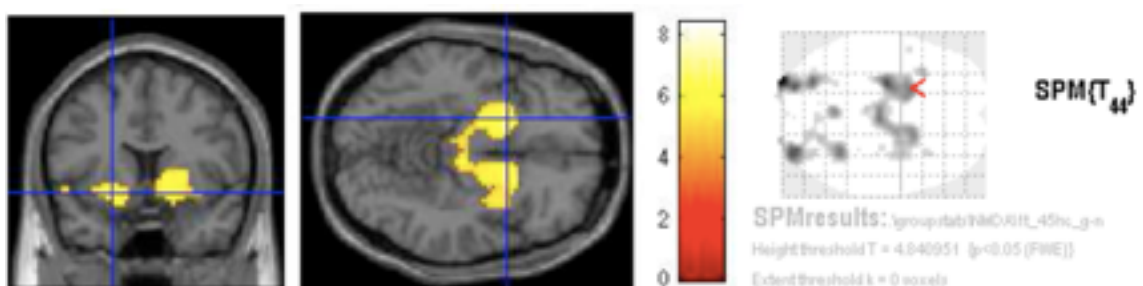


Abb.12: Gelb=Aktivierung im ventralen Striatum (vSt) beim oben beschriebenen Knutson-Paradigma.

3.5 Statistische Auswertung

Bei der Auswertung der klinischen und genetischen Daten kamen folgende Tests zur Anwendung:

1. Deskriptive Statistiken (Mittelwert=MW, Median, Minimum, Maximum)
2. Häufigkeitsvergleich mit nicht-parametrischem Chi-Quadrat-Test nach Pearson.
3. Mittelwertsvergleiche normalverteilter abhängiger Variablen durch den parametrischen t-Test (Student) für gepaarte Stichproben.
4. Einfaktorielle ANOVA nach Kruskal-Wallis
5. Multifaktorielle ANOVA

Das Signifikanzniveau wurde für alle Untersuchungen auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Berechnung der Haplotypen erfolgte mit der Software PHASE (1). Die Testung erfolgte mit der Software OEGE (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> (109)).

IV. Ergebnisse

4.1 Einfluss der Genotypen auf die Diagnose

Ziel dieses Teils der Studie war es die Assoziation zwischen Alkoholabhängigkeit (F 10.2 nach ICD-10) und unterschiedlichen Polymorphismen der ausgewählten NMDAR- Gene herzustellen.

Mit Hilfe des Vierfelder- χ^2 -Tests nach Pearsons mit zwei Freiheitsgraden wurde die Hypothese über einen Zusammenhang zwischen der genotypischen SNP-Ausprägung und der klinischen Diagnose F10.2 (nach ICD-10) überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. Die Auswertung der statistischen Analyse der Verteilung der Genotypen zwischen den beiden Gruppen wird in folgenden Tabellen nach Genen geordnet zusammengefasst:

Tab.14: Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR1.

SNP	Patienten (%)			Kontrollen (%)			χ^2	p-Wert
	HOM1	Het	HOM2	HOM1	Het	HOM2		
rs4880213 (C/T)	14,6	43,9	41,5	20,0	41,8	38,2	0,5	0,79
rs2301364 (C/T)	4,9	12,2	82,9	3,6	21,4	75,0	1,4	0,49
rs28489906 (A/G)	31,7	36,6	31,7	28,3	45,3	26,4	0,7	0,69
rs10870198 (A/G)	33,3	59,0	7,7	52,8	41,5	5,7	3,5	0,18
rs6293 (A/G)	54,8	28,6	16,7	48,2	39,3	12,5	1,3	0,53

Tab.14: Die Häufigkeitsverteilung zwischen den Gruppen ist in Prozent ausgedrückt, die Großbuchstaben beschreiben die Allele.

Tab.15: Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR2A.

SNP	Patienten (%)			Kontrollen (%)			χ^2	p-Wert
	HOM1	Het	HOM2	HOM1	Het	HOM2		
rs2302711 (C/T)	40,0	55,0	16,7	60,7	33,9	5,4	4,4	0,11
rs8049651 (C/T)	71,4	11,9	16,7	57,1	37,5	5,4	9,7	$\leq 0,01^*$
rs9806806 (C/G/T)	34,1	24,4	41,5	18,1	24,1	57,8	4,4	0,11
rs2072450 (A/C)	69,0	28,6	2,4	78,8	21,2	0	3,0	0,22
rs1014531 (A/G)	52,4	33,3	14,3	47,1	51,0	2,0	6,4	0,04*

Tab. 15: Häufigkeitsverteilung in Prozent die Grossbuchstaben beschreiben die Allele.

(*)=statistisch signifikant.

Tab.16: Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR2B.

SNP	Patienten (%)			Kontrollen (%)			χ^2	p-Wert
	HOM1	Het	HOM2	HOM1	Het	HOM2		
rs3026174 (A/G)	2,4	33,2	64,3	1,9	26,4	71,7	6,0	0,74
rs7301328 (C/G)	41,5	17,1	41,5	21,8	58,3	20,0	15,1	$\leq 0,01^*$
rs1805547 (A/G)	50,0	45,2	4,8	58,9	33,9	7,1	1,4	0,5
rs1805482 (C/T)	7,3	46,3	46,3	5,4	50,0	44,6	0,3	0,89
rs1806201 (C/T)	54,8	40,5	4,8	50,9	47,2	1,9	0,9	0,63
rs3764030 (A/G)	7,3	51,2	41,5	2,3	29,1	68,8	8,9	$\leq 0,01^*$

Tab. 16: Häufigkeitsverteilung in Prozent die Grossbuchstaben beschreiben die Allele.

(*)=statistisch signifikant.

Es konnte sowohl für NMDAR1 (rs1014531, rs8049651) als auch für NMDAR2B (rs7301328, rs3764030) bezüglich einer Assoziation zwischen dem Genotyp und der Diagnose ein p-Wert $\leq 0,05$ ermittelt werden.

Zur weiteren Einschätzung einer möglichen Assoziation der verschiedenen Genvarianten auf die Diagnose wurden sog. „SNP-Dominanz-Modelle“ auf die Daten angewandt.

Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass das Vorhandensein bzw. das Fehlen eines Allels von Bedeutung ist. Im ersten Modell (DM1) wurden alle Träger des Allels 1 Probanden gegenübergestellt, die dieses Allel nicht aufweisen. Im Folgenden dargestellt sind die Genotypen geordnet nach Genen:

Tab.17: Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR1 gewichtet nach dem Dominanzmodell 1.

SNP	Patienten (%)		Kontrollen (%)		χ^2	p-Wert
	HOM1 & Het	HOM2	HOM1 & Het	HOM2		
rs4880213 (C/T)	58,5	41,5	61,8	38,2	0,1	0,75
rs2301364 (C/T)	12,2	87,8	21,4	78,6	1,4	0,48
rs28489906 (A/G)	68,3	31,7	73,6	26,4	0,3	0,57
rs10870198 (A/G)	92,3	7,7	94,3	5,7	1,5	0,67
rs6293 (A/G)	83,3	16,7	87,5	12,5	0,3	0,56

Tab. 17: Häufigkeitsverteilung in Prozent die Grossbuchstaben beschreiben die Allele.

Tab.18: Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR2A gewichtet nach dem Dominanzmodell 1.

SNP	Patienten (%)		Kontrollen (%)		χ^2	p-Wert
	HOM1 & Het	HOM2	HOM1 & Het	HOM2		
rs2302711 (C/T)	95,0	5,0	94,6	5,4	0,1	0,94
rs8049651 (C/T)	83,3	16,7	94,6	5,4	3,4	0,07
rs9806806 (C/T)	58,5	41,5	42,2	57,8	3,0	0,09
rs2072450 (A/C)	97,6	2,4	100	0	2,0	0,15
rs1014531 (A/G)	85,7	14,3	98,0	2,0	5,0	0,02*

Tab. 18: Häufigkeitsverteilung in Prozent die Grossbuchstaben beschreiben die Allele.

(*)=statistisch signifikant.

Tab.19: Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR2B gewichtet nach dem Dominanzmodell 1.

SNP	Patienten (%)		Kontrolle (%)		χ^2	p-Wert
	HOM1 & Het	HOM2	HOM1 & Het	HOM2		
rs3026174 (A/G)	35,7	64,3	28,3	71,7	0,6	0,44
rs7301328 (C/G)	58,5	41,5	80,0	20,0	5,2	0,02*
rs1805547 (A/G)	95,2	4,8	92,9	7,1	0,2	0,63
rs1805482 (C/T)	53,7	46,3	55,4	44,6	0,3	0,87
rs1806201 (C/T)	95,2	4,8	98,1	1,9	0,6	0,43
rs3764030 (A/G)	58,5	41,5	31,4	68,8	8,5	$\leq 0,01^*$

Tab.19: Häufigkeitsverteilung in Prozent die Grossbuchstaben beschreiben die Allele. (*)=statistisch signifikant.

Durch die statistische Wichtung der Allele nach Dominanzmodell 1 konnten die Gene NMDAR1 (rs1014531) und NMDAR2B (rs7301328, rs3764030) mit einem p-Wert $\leq 0,05$ getestet werden.

Im zweiten Dominanzmodell (DM2) erfolgte die Zuteilung der heterozygoten Merkmalsträger zu den homozygoten Trägern des Allel 2:

Tab.20: Genotypisierung des Gens NMDAR1 nach dem Dominanzmodell 2.

SNP	Patienten (%)		Kontrollen (%)		χ^2	p-Wert
	HOM2 & Het	HOM1	HOM2 & Het	HOM1		
rs4880213 (C/T)	85,4	14,6	80,0	20,0	0,5	0,50
rs2301364 (C/T)	95,1	4,9	96,4	3,6	0,1	0,75
rs28489906 (A/G)	68,3	31,7	71,7	28,3	0,1	0,72
rs10870198 (A/G)	66,7	33,3	47,2	52,8	3,5	0,05*
rs6293 (A/G)	45,2	54,8	51,8	48,2	0,4	0,52

Tab.20: Häufigkeitsverteilung in Prozent die Grossbuchstaben beschreiben die Allele. (*)=statistisch signifikant.

Tab.21: Genotypisierung des Gens NMDAR2A nach dem Dominanzmodell 2.

SNP	Patienten (%)		Kontrollen (%)		χ^2	p-Wert
	HOM2 & Het	HOM1	HOM2 & Het	HOM1		
rs2302711 (C/T)	60,0	40,0	39,3	60,7	4,0	0,05*
rs8049651 (C/T)	28,6	71,4	42,9	57,1	2,1	0,15
rs9806806 (CG/T)	65,9	34,1	81,9	18,1	4,0	0,05*
rs2072450 (A/C)	31,0	69,0	21,2	78,8	1,5	0,23
rs1014531 (A/G)	47,6	52,4	52,9	47,1	0,3	0,61

Tab.21: Häufigkeitsverteilung in Prozent die Grossbuchstaben beschreiben die Allele.

(*)=statistisch signifikant.

Tab.22: Genotypisierung des Gens NMDAR2B nach dem Dominanzmodell 2.

SNP	Patienten (%)		Kontrollen (%)		χ^2	p-Wert
	HOM2 & Het	HOM1	HOM2 & Het	HOM1		
rs3026174 (A/G)	97,7	2,3	98,1	1,9	0,3	0,9
rs7301328 (C/G)	58,5	41,5	78,2	21,8	4,3	0,04*
rs1805547 (A/G)	50,0	50,0	41,1	58,9	0,8	0,38
rs1805482 (C/T)	92,7	7,3	94,6	5,4	0,2	0,69
rs1806201 (C/T)	45,2	54,8	49,1	50,9	0,1	0,71
rs3764030 (A/G)	92,7	7,3	97,7	2,3	1,8	0,18

Tab.22: Häufigkeitsverteilung in Prozent die Grossbuchstaben beschreiben die Allele.

(*)=statistisch signifikant.

Nach der Wichtung durch Dominanzmodell 2 konnten alle drei Gene NMDAR1 (rs10870198), NMDAR2A (rs2302711, rs9806806) und NMDAR2B (rs7301328) mit einem p-Wert $\leq 0,05$ getestet werden.

4.2 Der Einfluss der Haplotypen auf die Diagnose

Durch die Ermittlung von Haplotypen sollten der Zusammenhang von einzelnen SNP-Assoziationen und alkoholabhängigem Verhalten erhärtet werden.

Aus den Genotypen wurden mit der Software PHASE Haplotypen ermittelt (Vgl. Tab. 27, 29 und 31). Die häufigsten Haplotypen wurden so ausgewählt, dass mindestens 2/3 (>70 %) der Probanden in die Haplotypanalyse für das jeweilige Gen eingeschlossen sind.

Tab.23: Ausgewählte Haplotypen für Gen NMDAR1.

Haplotyp	%	rs4880213	rs2301364	rs28489906	rs10870198	rs6293
1	32,8	C	T	A	A	A
2	18,3	T	T	A	A	A
3	12,5	T	T	T	G	G
4	7,4	T	T	T	A	A
5	5,5	T	C	T	A	A
6	4,3	T	T	T	A	A

Tab.23: Rangordnung nach Häufigkeiten am Gesamtkollektiv in Prozent. Die Großbuchstaben bezeichnen die Allele. Insgesamt konnten 81 % der Probanden in die Haplotypanalyse für das Gen eingeschlossen werden, was den 6 häufigsten Haplotypen entspricht.

Abb.13: Häufigkeitsverteilung von Haplotypkombinationen für NMDAR1.

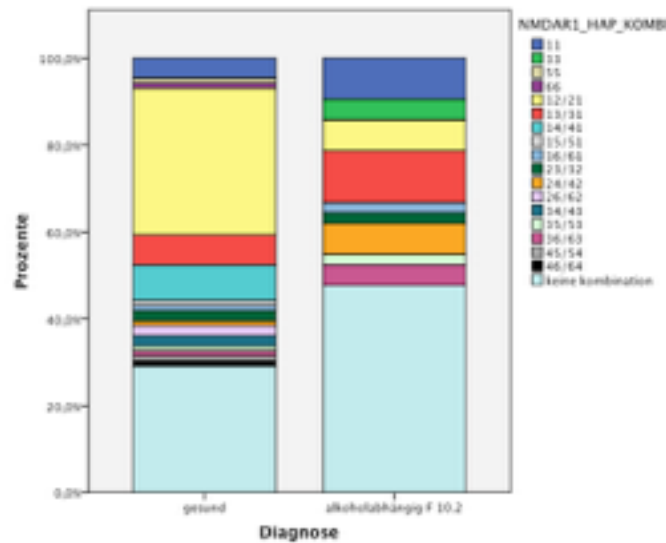


Abb.13: Das Label „Keine Kombination“ fasst die Individuen zusammen, bei denen nur einer der 6 häufigsten Haplotypen ermittelt werden konnte.

Die Verteilung der häufigsten Haplotypenkombinationen für NMDAR1 mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson (mit 16 Freiheitsgraden) ergab eine unterschiedliche Verteilung zwischen den Gruppen auf einem 5 % Signifikanzniveau ($p=0,028$) und einem χ^2 von 29,84. Der Verteilungsunterschied ist somit statistisch signifikant.

Tab.24: Ausgewählte Haplotypen für das Gen NMDAR2A.

Haplotyp	%	rs2302711	rs8049651	rs9806806	rs2072450	rs1014531
1	36,3	C	C	CG	A	A
2	11,3	C	T	TT	A	A
3	9,0	C	C	CG	A	A
4	8,2	C	C	CG	C	A
5	5,5	T	C	TT	A	A
6	5,1	C	C	TT	A	G

Tab.24: Ordnung nach Häufigkeiten am Gesamtkollektiv in Prozent. Die Großbuchstaben bezeichnen die Allele. Insgesamt konnten 75,5 % der Probanden in die Haplotypanalyse für das Gen eingeschlossen werden, was den 6 häufigsten Haplotypen entspricht.

Abb.14: Häufigkeitsverteilung von Haplotypkombinationen für NMDAR2A.

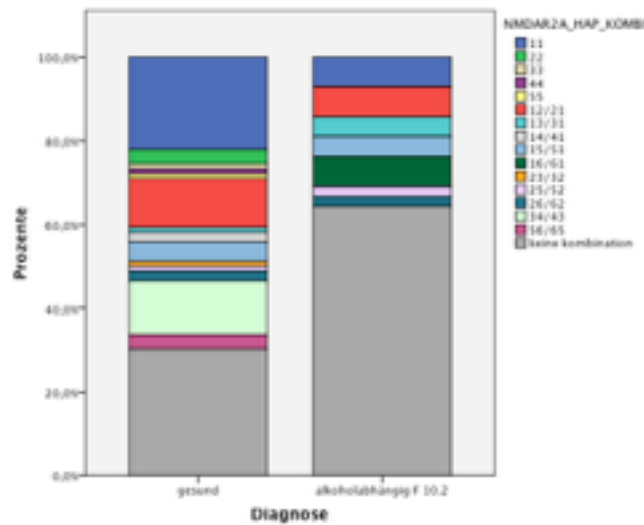


Abb.14: Das Label „Keine Kombination“ fasst die Individuen zusammen bei denen nur einer der 6 häufigsten Haplotypen ermittelt werden konnte.

Die Verteilung der häufigsten Haplotypenkombinationen für NMDAR2A mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergab eine unterschiedliche Verteilung zwischen den Gruppen auf einem 5% Signifikanzniveau ($p=0,008$) und einem χ^2 von 31,34. Der Unterscheid ist somit statistisch signifikant.

Tab.25: Ausgewählte Haplotypen für das Gen NMDAR2B.

Haplotyp	%	rs3026174	rs1806201	rs1805482	rs1805547	rs7301328	rs3764030
1	17,6	T	A	G	C	C	A
2	12,1	T	A	G	C	G	A
3	11,3	T	A	A	C	C	A
4	8,2	T	G	G	C	G	A
5	7,0	T	A	A	C	G	G
6	6,0	T	A	A	C	G	A
7	5,0	T	G	G	C	C	A
8	5,0	C	A	G	T	C	A

Tab.25: Rangordnung nach Häufigkeiten am Gesamtkollektiv in Prozent. Die Großbuchstaben bezeichnen die Allele. Insgesamt konnten 72,3 % der Probanden in die Haplotypanalyse für das Gen eingeschlossen werden, was den 8 häufigsten Haplotypen entspricht.

Abb.15: Häufigkeitsverteilung von Haplotypkombinationen für NMDAR2B.

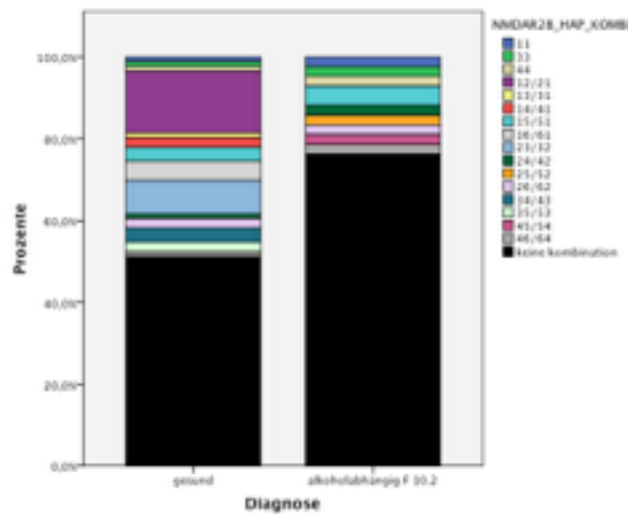


Abb.15: Das Label „Keine Kombination“ fasst die Individuen zusammen bei denen nur einer der 8 häufigsten Haplotypen ermittelt werden konnte.

Die Verteilung der häufigsten Haplotypenkombinationen für NMDAR2B mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson (mit 16 Freiheitsgraden) ergab eine unterschiedliche Verteilung zwischen den Gruppen auf einem 10 % Signifikanzniveau ($p=0,086$) und einem χ^2 von 24,16. Der Verteilungsunterschied deutet somit auf einen Trend hin. Die häufigsten Haplotypkombinationen (1 2 / 2 1 ; 2 3 / 3 2) waren jedoch nur bei Alkoholabhängigen nachweisbar.

4.3 Assoziation bildgebender, klinischer und genetischer Daten im Subkollektiv

4.3.1 Deskriptive Statistik des Subkollektivs

Die beiden Vergleichsgruppen wurden aus dem Gesamtkollektiv erstellt und wie folgt homogenisiert: Es ergab sich ein Subkollektiv von 34 ausschließlich männlichen Probanden (17 Gesunde und 17 Patienten). Folgende Kovariaten wurden mit potentielltem Einfluss auf die BOLD-Aktivierung berücksichtigt: Geschlecht, Rauchen, Depressivität (BDI) und Ängstlichkeit (STAI).

Tab.26: Übersicht der Altersstruktur des Bildgebungsarm der Studie.

Probanden	Alter				
	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	p-WERT
17 Patienten	25	61	44,5	8,0	0,335
17 Gesunde	27	59	41,1	7,3	
Gesamt	26	60	42,8	7,7	

4.3.2 Assoziation der Bildgebungsdaten des Knutson-Paradigmas mit der Diagnose

Abb.16: Darstellung der Signal-Maske für das Knutson-Paradigma.

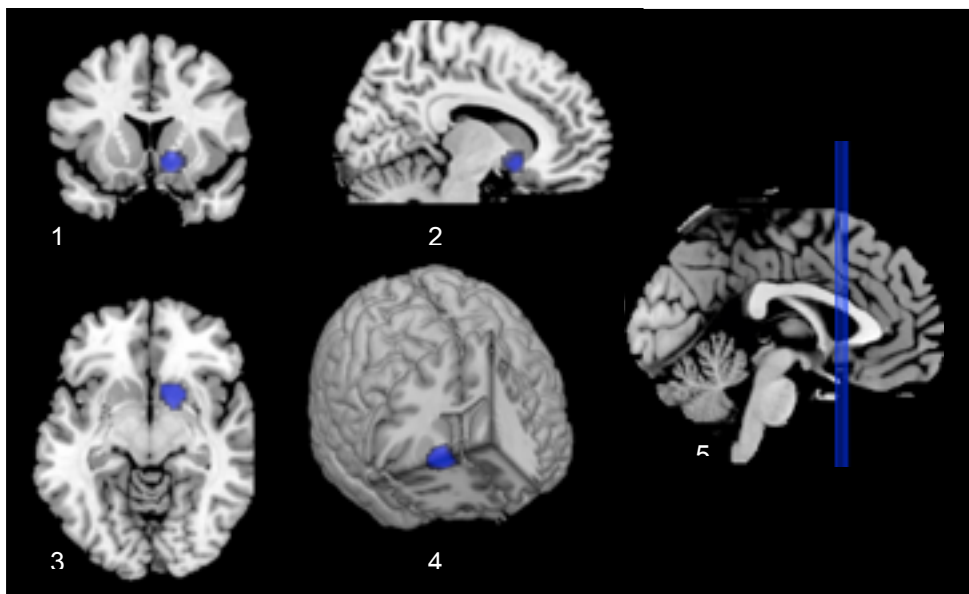


Abb.16: Die Maske grenzt das Zielgebiet ein und dient zur Korrektur von falsch positiven Ergebnissen des ventralen Striatums (vSt) für das MID-Paradigma in blau. 1=coronar; 2=sagital; 3=horizontal; 4=Mehrdimensional; 5=Schnittführung

Abb.17: Aktivierung in der anatomischen Zielregion (vSt) bei den Kontrollprobanden (Antizipation Gewinn>Neutral).

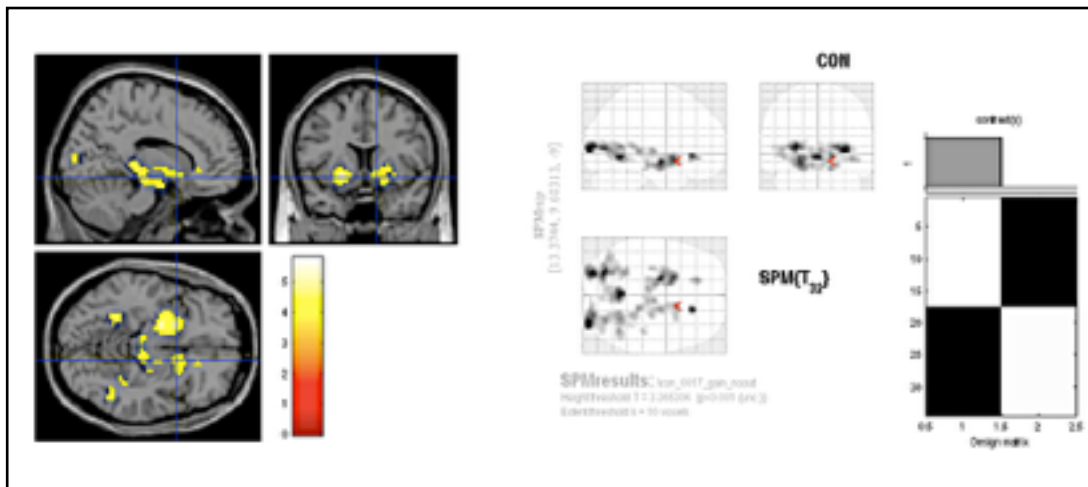


Abb.17: Gelb=Darstellung der Aktivierung in der anatomischen Zielregion (blaues Kreuz=vSt) bei den Kontrollprobanden während der Erwartung eines Gewinns im MID-Paradigma; K=Anzahl der Voxel, die zusammen hängen müssen, damit die Aktivierung als statistisch reliabel gilt.

Die Patientengruppe zeigte bei der Erwartung eines Gewinns auf dem Signifikanzniveau von $p < 0.001$ unkorrigiert in der betreffenden Region (ventrales Striatum) **keine** Aktivierung. Dies deutet daraufhin, dass die Prozessierung der Ankündigung eines belohnenden Reizes bei den Alkoholikern der Kontrollgruppe abweicht.

Abb.18: **Keine** Aktivierung in der Zielregion (vSt) bei den Patienten (Antizipation Gewinn>Neutral).

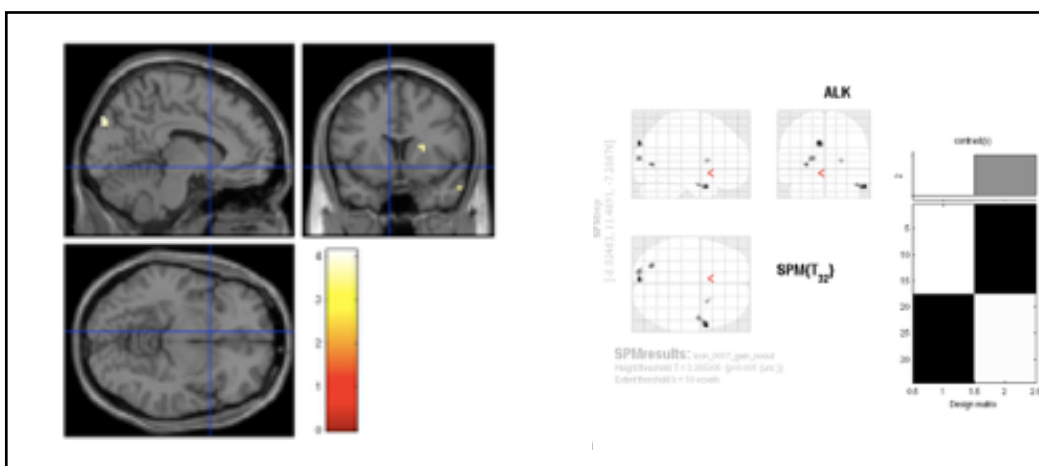


Abb.18: Gelb=Darstellung der Aktivierung in der anatomischen Zielregion (blaues Kreuz=vSt) bei den Patienten während der Erwartung eines Gewinns; K=Anzahl der Voxel, die zusammen hängen müssen, damit die Aktivierung als statistisch reliabel gilt.

Der Gruppenvergleich mit Bezug auf die Aktivierung in der Zielregion verdeutlicht den angedeuteten Unterschied mit Hilfe des gerichteten T-Tests (für 2 Stichproben; Kontrollen>Alkoholpatienten) bei einem Signifikanzniveau von 0,05 (FWE unkorrigiert) mit einem p-Wert von 0,02 und einem T-Wert ≥ 3 .

Abb.19: Aktivierung in der anatomischen Zielregion (vSt) im Gruppenvergleich Kontrollen>Patienten (Antizipation Gewinn>Neutral).

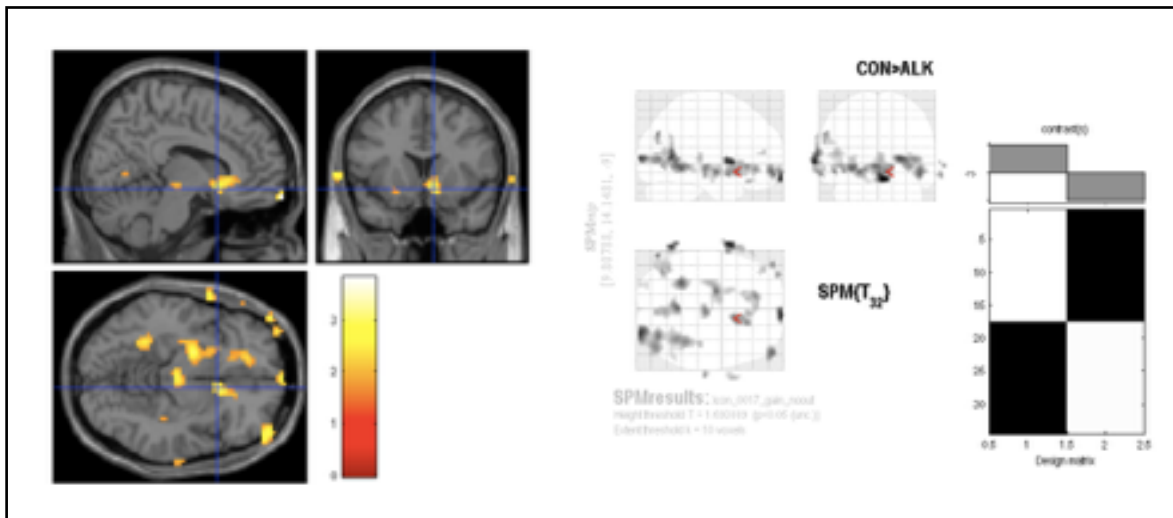


Abb. 19: Gelb=Darstellung der Aktivierung in der anatomischen Zielregion (blaues Kreuz=vSt) bei einem Gruppenvergleich während der Erwartung eines Gewinns im gerichteten T-Test für die Richtung Kontrollen>Patienten; K=Anzahl der Voxel, die zusammen hängen müssen, damit die Aktivierung als statistisch reliabel gilt.

Als Kontrolle diente die Umkehrung des T-Tests, der erwartungsgemäß **keine** Aktivierung zeigte (Antizipation Gewinn>Neutral).

Abb.20: Aktivierung in der anatomischen Zielregion (vSt) im Gruppenvergleich umgekehrter Richtung, d.h. Patienten>Kontrollen (Antizipation Gewinn>Neutral).

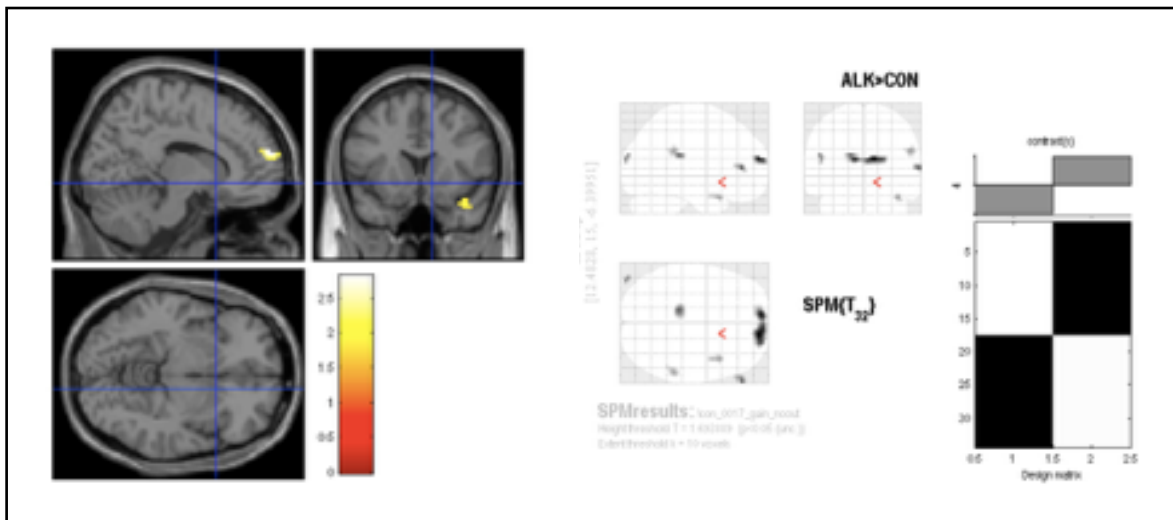


Abb.20: Gelb=Darstellung der Aktivierung in der anatomischen Zielregion (blaues Kreuz=vSt) bei einem Gruppenvergleich während der Erwartung eines Gewinns im gerichteten T-Test in umgekehrter Richtung, d.h. Patienten>Kontrollen.

4.3.3 Assoziation der Bildgebungsdaten des Knutson-Paradigmas mit den Genotypen

Zur Assoziation der Ergebnisse aus der MID-Task mit den genetischen Daten wurden die Aktivierungen im ventralen Striatum als Gruppenvergleich des gewichteten T-Tests während einer Gewinnerwartung mit Hilfe der Software SPM extrahiert und in skalierbare Werte umgewandelt. Die dafür verwendeten Kategorien Maske (gemittelte Aktivierung aller Voxel innerhalb der benutzten Maske), Peak (Peakwert innerhalb der Zielregion) und Cluster (gemittelte Aktivierung aller in einem Cluster zusammenhängender Voxel in der Zielregion) stellen dabei Aktivierungsparameter dar, die durch räumliche und zeitliche Datenintegration aus den fMRT-Kontrasten (in Voxel pro Zeiteinheit) einen nominalen Wert entstehen lassen.

Abb. 21: Visualisierung der skalierten Aktivierungen während der MID-Task (vSt).

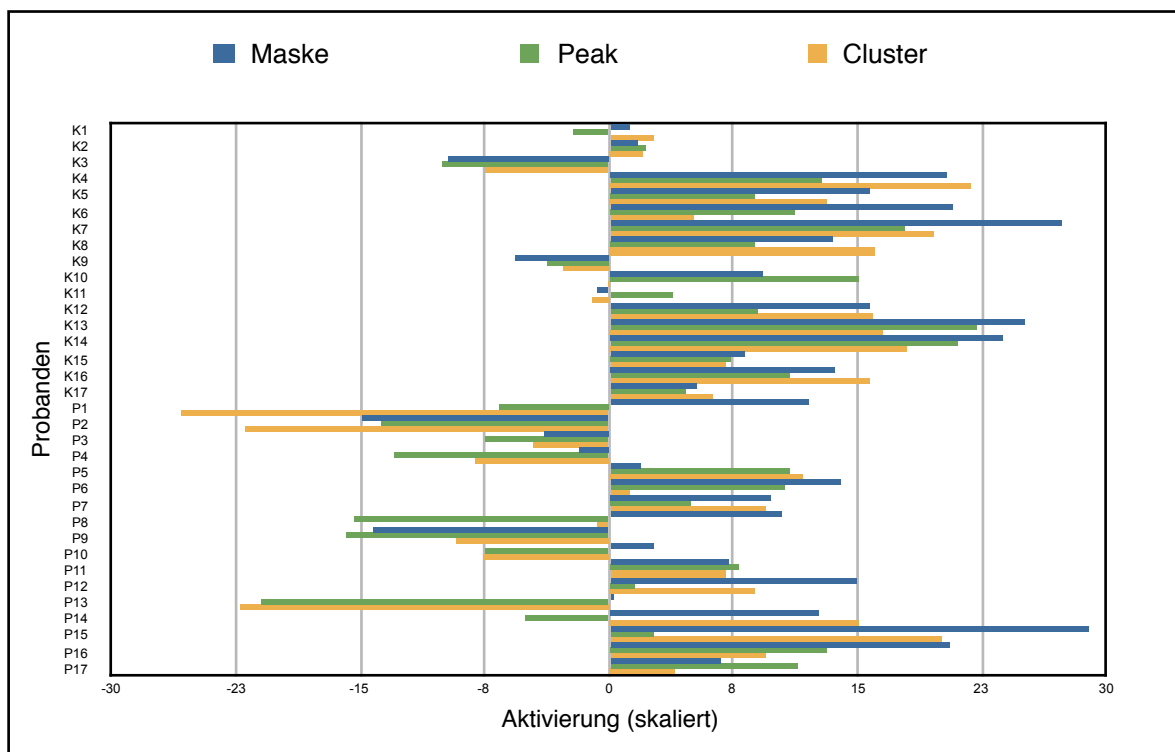


Abb.21: X-Achse=die 3 farbkodierten Parameter Maske, Peak und Cluster. Y-Achse=K1-17 Kontrollen (K1-17) und Patienten (P1-17). Positive Werte bedeuten eine Aktivierung im vSt während einer Gewinnerwartung (Antizipation Gewinn>Neutral). Negative Werte bedeuten, dass in der Zielregion (vSt) verstärkt auf die neutrale Bedingung reagiert wurde.

Tab.27: Deskriptive statistische Auswertung der skalierten Aktivitätsparameter der MID-Task mit der Antizipation Gewinn>Neutral.

Aktivierung (skaliert)	Patienten			Kontrollen		
	Maximum	Minimum	Mittelwert	Maximum	Minimum	Mittelwert
Maske	28,94	-14,91	6,28	27,34	-9,68	10,90
Peak	13,08	-20,89	-2,47	22,13	-9,98	8,20
Cluster	20,08	-25,71	-0,76	21,87	-7,51	8,74

Die Auswertung der Verteilung der skalierten Aktivitätsparameter der MID-Task im Gruppenvergleich mit Hilfe des Man-Whitney-U-Tests ergab signifikante p-Werte für die Parameter Peak ($p=0,009$) und Cluster ($p=0,041$), nicht jedoch für den Parameter Maske ($p=0,259$).

Folgende SNPs waren im Kruskal-Wallis-Test für den Einfluss auf die Aktivierung signifikant ($p \leq 0,05$): rs28489906, rs9806806*, rs3026174**. Weitere SNPs waren im Kruskal-Wallis-Test für den Einfluss auf die Aktivierung hoch-signifikant ($p \leq 0,001$): rs4880213*, rs1805547** (siehe Tabelle im Appendix).

Somit konnte für alle drei Gene NMDAR1, NMDAR2A* und NMDAR2B** ein Einfluss auf die Aktivierung im Knutson-Paradigma nachgewiesen werden.

4.3.4 Assoziation der Daten des Knutson-Paradigmas mit den Haplotypen

Die Interaktionseffekte zwischen den zwei Faktoren Diagnose und Haplotyp in Abhängigkeit von den Aktivierungswerten im fMRT wurden mit Hilfe einer 2-faktoriellen ANOVA (mit 13 Freiheitsgraden) ermittelt und zeigten für NMDAR1 folgende signifikante Zwischensubjekteffekte: für Peak ($p=0,018$; $F=2,82$) konnte ein R^2 von 0,42 ermittelt werden. Das bedeutet, dass die Kombination aus den ausgewählten NMDAR1-Haplotypkombinationen mit der Diagnose 42% der Varianz der Peakaktivierung erklärt.

Die Parameterschätzer für die Peakaktivierung zeigten des Weiteren einen signifikanten Zusammenhang zwischen der NMDAR1-Haplotypkombination 1 3 / 3 1 und der Diagnose „Alkoholabhängig“ ($p=0,009$; $T=-2,88$) mit einem β -Koeffizienten von -16,37. Dies bedeutet, dass diejenigen Patienten, die Träger der NMDAR1-Haplotyp-kombination 1 3 / 3 1 sind, im Durchschnitt eine (um -16,37) niedrigere Aktivierung bei einer Gewinnerwartung in der MID-Task zeigen. In der ANOVA (mit 9 Freiheitsgraden) zeigte sich außerdem ein signifikanter Einfluss von den Kombinationseffekten NMDAR2B und Diagnose: $p=0,015$; $F=3,0$; $R^2=0,35$. Die Parameterschätzer ergaben für die Haplotypkombination 1 1 / 1 1 & Alkoholabhängigkeit: $p=0,015$; $T=-1,61$; $\beta=-24,41$. Für Haplotypkombination 4 4 / 4 4 & Alkoholabhängigkeit: $p=0,07$; $T=-2,95$; $\beta=-27,58$ und für Haplotypkombination 4 5 / 5 4 & Alkohol-abhängigkeit: $p=0,047$; $T=2,10$; $\beta=19,60$.

4.3.5 Auswertung der (f)-MRT-Daten nach dem Alkohol-Cue-Paradigma

Abb.22: Darstellung der zur Signal-Maske für das Alkohol-Cue-Paradigma

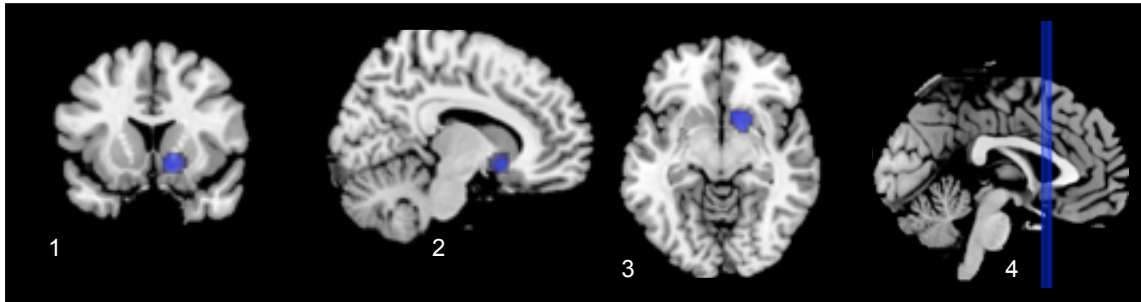


Abb.22: Blau=Markierung der zur BOLD-Signal-Extraktion sowie zur Korrektur von falsch positiven Ergebnissen verwendeten Maske in der Zielregion (vSt). 1=coronar; 2=sagital; 3=horizontal; 4=Schnittführung.

Acht Patienten wurden für folgende Bedingungen getestet:

- (1) Alkohol Cue*>Neutraler Cue* (cue alk>cue neut)
- (2) Alkohol Cue*>Positiver Cue* (cue alk>cue pos)
- (3) Alkohol Bild>Neutrales Bild (pic alk>pic neut)
- (4) Alkohol Bild>Positives Bild (pic alk>pic pos)

(* Cue=die Ankündigung eines Bildes/Reizes)

Ziel dieses Teils der Studie war, einen Trend zu ermitteln, der die im Knutson-Paradigma ermittelten Ergebnisse mit alkoholassoziierten Inhalten kombiniert.

Zu (1) Für die 1. Bedingung im Alkohol-Cue-Paradigma konnte eine **statistische Signifikanz** auf einem 5%- Niveau ermittelt werden:

Abb.23: Aktivierung für die 1. Bedingung (cue alk>cue neut).

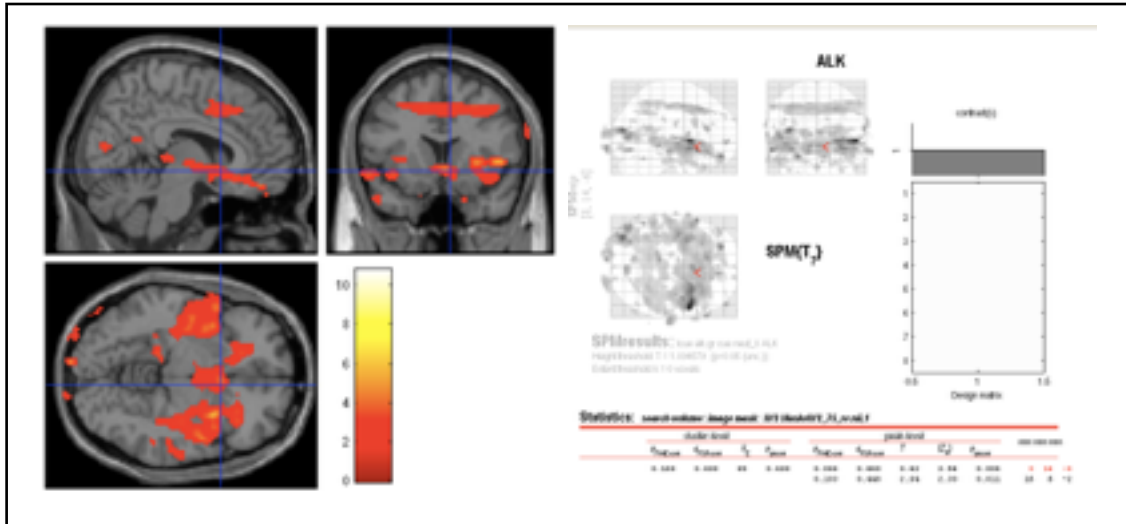


Abb.23: Rot=Markierung der Aktivierung im fMRT für die 1. Bedingung innerhalb der Gruppe der Alkoholpatienten. Die Testwerte waren $p=0,066$ FWE korrigiert für das ventrale Striatum; $T=3,42$.

Zu (2) Für die 2. Bedingung im Alkohol-Cue-Paradigma konnte **keine** statistische Signifikanz auf einem 5 %-Niveau ermittelt werden:

Abb.24: Aktivierung für die 2. Bedingung (cue alk>cue pos).

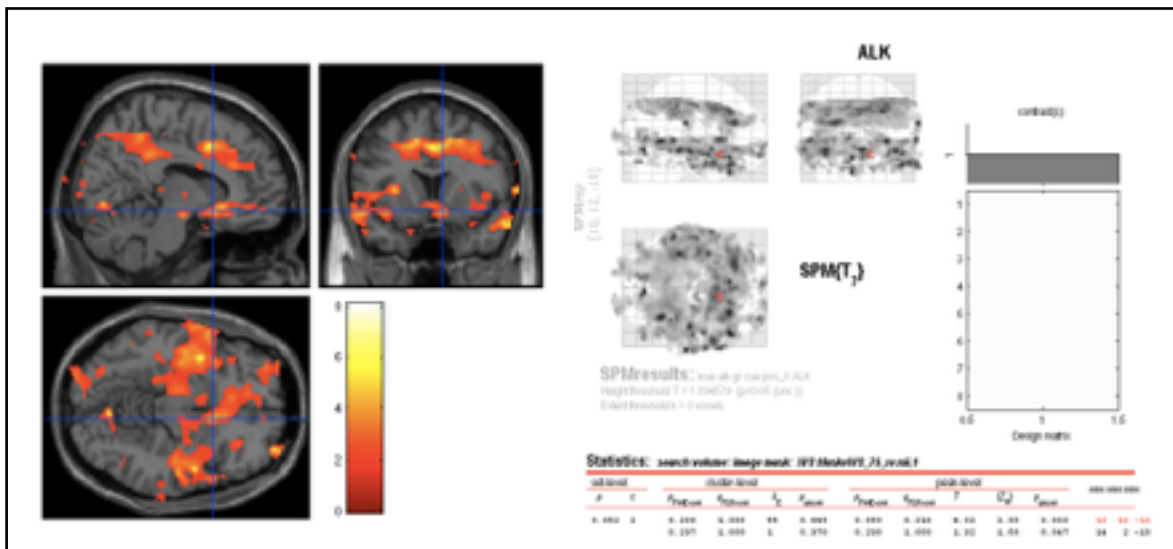


Abb.24: Rot=Markierung der Aktivierung im fMRT für die 2. Bedingung innerhalb der Gruppe der Alkoholpatienten. Die Testwerte waren $p=0,05$ FWE korrigiert für das ventrale Striatum; $T=4,02$.

Zu (3) Für die 3. Bedingung (pic alk>pic neut) konnte **keine** statistische Signifikanz auf einem 5 %-Niveau ermittelt werden:

Abb.25: Aktivierung im Alkohol-Cue-Paradigma für die 3. Bedingung (pic alk>pic neut).

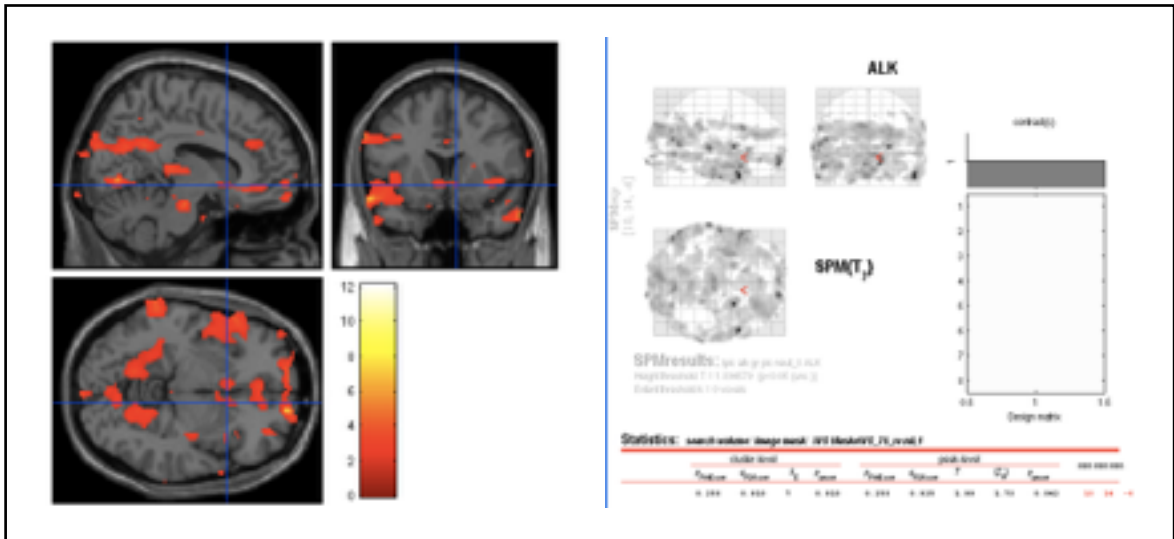


Abb.25: Rot=Darstellung der Aktivierung für die 3. Bedingung innerhalb der Gruppe der Alkoholpatienten.

Zu (4) Für die 4. Bedingung konnte ebenfalls **keine** statistische Signifikanz auf einem 5 %-Niveau ermittelt werden:

Abb.26: Aktivierung im Alkohol-Cue-Paradigma für die 4. Bedingung (pic alk>pic pos).

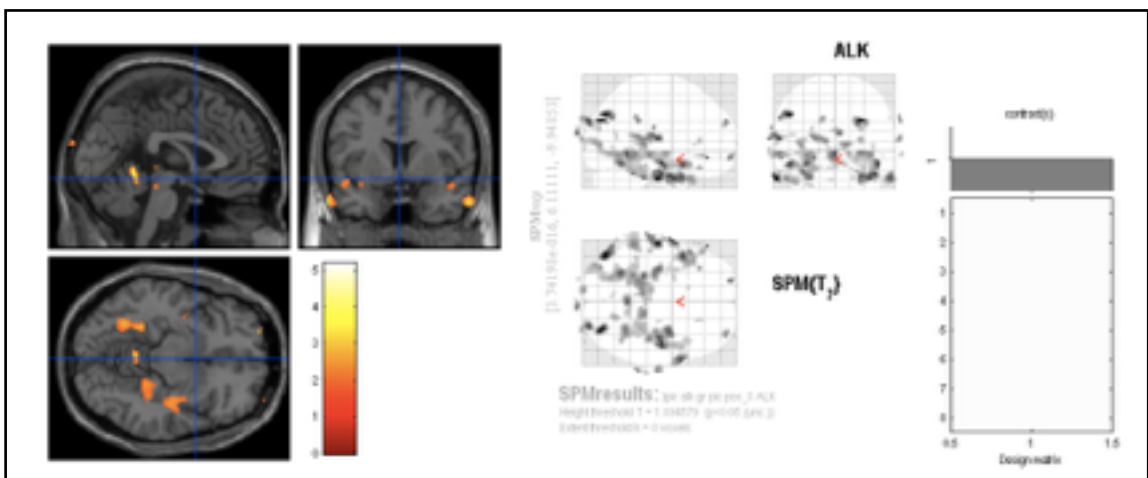


Abb.26: Rot/Orange=Darstellung der Aktivierung im fMRT für die 4. Bedingung innerhalb der Gruppe der Alkoholpatienten.

4.4 Deskriptive statistische Analyse des Gesamtkollektivs

Tab.28: Übersicht aller Probanden mit Diagnose und Geschlecht.

Diagnose	Frauen	Männer	Gesamt	p-Wert
Kontrollprobanden	18	68	86	0,001
Patienten	0	42	42	
Gesamt	18	110	128	

Tab.29: Übersicht der Altersstruktur aller Probanden.

Probanden	Alter				p-Wert
	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	
Kontrollen	22	61	38,8	10,1	0,004
Patienten	25	61	43,9	8,1	
Gesamt	22	61	40,3	9,8	

4.5 Statistische Analyse der klinischen Variablen

Tab.30: Verteilung der klinischen Variablen.

Klinische Variable	Mittelwerte			p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Gesamt	
BDI	3,72 ± 0,64	10,70 ± 1,45	6,31 ± 0,79	<0,01
OCDS	3,10 ± 0,56	20,87 ± 1,19	9,69 ± 1,24	<0,01
STAI I	33,21 ± 1,32	39,48 ± 2,21	35,53 ± 1,22	<0,05
STAI II	32,77 ± 1,23	44,74 ± 2,16	37,21 ± 1,33	<0,01
BIS-10 (Motor Score)	22,00 ± 0,56	24,52 ± 1,33	22,94 ± 0,62	0,05
BIS-10 (Cognitive Score)	22,97 ± 0,61	26,96 ± 1,11	24,45 ± 0,61	<0,01
BIS-10 (Non Planning Score)	23,92 ± 0,82	27,52 ± 0,87	25,26 ± 0,64	<0,05
BIS-10 (Gesamt)	68,90 ± 1,65	79,00 ± 2,73	72,65 ± 1,57	<0,01

Tab.30: Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Wert wurden mit dem Mann-Whitney-U Test ermittelt. BDI=Beck's Depression Inventory; OCDS=Obsessive Compulsive Drinking Scale; STAI=State-Trait Anxiety Inventory; BIS-10=Barrat Impulsiveness Scale. Alle getesteten Variablen waren signifikant ungleich zwischen den Gruppen verteilt.

V. Diskussion

5.1 NMDA-Genotypen und alkoholabhängiges Verhalten

Die Bedeutung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten für alkoholabhängiges Verhalten konnte in mehreren genetischen Studien bestätigt werden (33, 90, 110). In unterschiedlichen Studien konnten Sequenzvarianten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kandidatengene NMDAR1, 2A und 2B als relevante Marker identifiziert werden (33, 111). Weitere Studien konnten zudem die Bedeutung der Untereinheit 2C als Kandidatengen ausweisen (110, 112). Im folgenden Abschnitt diskutiere ich die aktuelle Studienlage zu den Untereinheiten NMDAR1, 2A und 2B und ordne die eigenen Ergebnisse ein.

In einer Assoziationsstudie von Reimers et al. (110) konnte ein Polymorphismus der Untereinheit NMDAR1 (rs2301363) hochsignifikant ($p < 0.001$) in einem Patientenkollektiv von 1283 Probanden getestet werden. Diese Befunde bestätigen Ergebnisse aus einer Studie von Wernicke aus dem Jahr 2003 (111) mit einem Kollektiv von 802 Probanden, die einen „stummen“ SNP in Exon 7 (G2108A) identifizierten. Auch in unserem wesentlich kleineren Probandenkollektiv konnte einer von 5 SNPs signifikant getestet werden. Dieser SNP (rs10870198) befindet sich in einem nicht kodierenden Abschnitt (Intron 3).

Einer Studie von Domart et al. zufolge konnte eine „G-T“-Wiederholung im 5'-Ende der regulatorischen Untereinheit von NMDAR2A als krankheitsrelevant identifiziert werden (113). Dies ist insofern interessant, da in diesem Genabschnitt unterschiedliche Mechanismen das Auslesen des Gens beeinflussen. Reimers et al. konnten zudem einen weiteren relevanten SNP (rs1650420) im Intron 3 identifizieren (110). Beide SNPs waren in unserer Studie nicht enthalten. Schumann et al. stellten bereits in einer groß angelegten Assoziationsstudie die Bedeutung eines Polymorphismus (rs2072450) im Intron 11 heraus, den auch wir in unsere Studie einschlossen (33). Dieser SNP konnte in dem von uns untersuchten Probandenkollektiv nicht statistisch signifikant getestet werden. Die abweichenden Ergebnisse könnten u.a. durch die Struktur unseres Probandenkollektivs in unserer Studie erklärt werden (siehe *Limitationen*). Die Assoziation mit der Diagnose konnte in unserer Studie bei 4 von 6 getesteten SNPs und bei den 6 häufigsten Haplotypkombinationen

nachgewiesen werden. Die Bedeutung der Untereinheit NMDAR2A für das Forschungsfeld in mehreren Studien, wenn auch nicht einheitlich, bestätigt.

Für den Einfluss von Genvarianten der Untereinheit 2B des NMDA-Rezeptors sind die Befunde nicht einheitlich. Wernicke et al. konnten den Zusammenhang bestätigen (111). Eine aktuelle Meta-Analyse von Forero et al., die sowohl die Daten der genannten Studie als auch die von zwei weiteren mit Hilfe eigener Modelle stratifizierte (u.a. nach Ethnizität), konnte den Zusammenhang nicht bestätigen (114). In unserer Studie ließen sich 2 von 6 untersuchten SNPs dieser Untereinheit als relevant identifizieren, jedoch nicht der zuvor in 2 anderen Studien bestätigte SNP rs1806202 (111, 115). Die zwei von uns positiv getesteten SNPs befinden sich in der 3'-UTR-Region (rs37640430) und in einem kodierenden Abschnitt von Exon 2 (rs7301328) am anderen Ende des Gens. Obwohl die Relevanz von NMDAR2B für das Forschungsfeld nicht einheitlich beurteilt wird, stützen unsere Ergebnisse die Bedeutung von NMDAR2B als Kandidatengen.

Die von uns untersuchten SNPs decken große Abschnitte der 3 untersuchten Gene ab und unterstreichen die studienübergreifende Bedeutung der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors für Alkoholabhängigkeit. Die somit nachgewiesenen Sequenzvarianten können als Risikoindikatoren für alkoholabhängiges Verhalten betrachtet werden. Am wahrscheinlichsten ist ein Einfluss im Bereich des Gens, das in räumlicher Nähe mit der identifizierten Sequenzvariante steht. Die Haplotypanalyse bestätigt die Vermutung, dass sich in den untersuchten genetischen Regionen krankheitsrelevante Genabschnitte befinden, die gemeinsam mit den untersuchten Suszeptibilitätsloki vererbt werden. Bisher existieren keine Hinweise auf einzelne Polymorphismen der NMDAR-Untereinheiten, die gegenüber anderen ein erhöhtes Morbiditätsrisiko erzeugen. Es ist anzunehmen, dass bestimmte Kombinationen von Suszeptibilitätsloki der NMDAR-Gene das statistisch validierbare Risiko für einen Krankheitsbeginn und den Verlauf beeinflussen. Die Erkenntnisse aus der aktuellen Studienlage unterstützen die Vermutung, dass ein Schwellenwert für genetische Einflussfaktoren überschritten sein muss, bevor der Effekt statistisch nachweisbar wird.

5.2 Das ventrale Striatum (vST) und alkoholabhängiges Verhalten

Glutamat ist einer der pharmakologischen Angriffspunkte von Alkohol (Inhibition von NMDA-Rezeptoren). Dieser funktionale Zusammenhang stellt die ursächliche Bedeutung der glutamergen Hirnareale für alkoholabhängiges Verhalten *a priori* heraus. Die Transmitterfunktion von Glutamat in abhängigkeitsrelevanten Hirnarealen verstärkt diesen Zusammenhang. Das ventrale Striatum (vSt) steht seit langem im Zentrum von Theorien zur Entwicklung von abhängigem Verhalten (116). Abhängigkeitsrelevante Verhaltensmuster und glutamerge Aktivität in der anatomischen Zielregion (vSt) im funktionellen MRT konnten in zahlreichen Studien bestätigt werden (117). In einer Studie von Andrews et al. wurden 30 Probanden untersucht, die einen alkoholabhängigen Vater und mindestens einen weiteren alkoholabhängigen Verwandten ersten oder zweiten Grades hatten. Diese wurden mit 19 Probanden ohne alkoholabhängige Verwandte verglichen (118). Die Probanden wurden im fMRT mit Hilfe der MID-Task getestet. Die anatomische Zielregion war das ventrale Striatum sowie benachbarte Hirnareale. Die Autoren konnten einen signifikanten Unterschied des Prozessierens belohnungsassoziierter Reize zwischen den Testgruppen in der Zielregion (und umgebenden Regionen) nachweisen. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte in Anlehnung an die grundlegende Theorie des „reward-deficiency-syndromes (RDS)“ (119). Dieses Modell geht von der These aus, dass eine dysfunktionale Entwicklung im „Belohnungssystem“ (vST) ursächlich für die Entwicklung von abhängigem Verhalten ist. Die Autoren untersuchten in Bezugnahme auf Wrase et al. (105), ob die genannten Veränderungen im Belohnungssystem bei alkoholabhängigem Verhalten als Ursache oder als Wirkung des Substanzmissbrauchs betrachtet werden sollten. Diese Veränderungen sind u.a. mit erhöhter Impulsivität assoziiert, wie u.a. in einer Studie von Beck et al. nachgewiesen (31). Andrews et al. kommen zu dem Schluss, dass die Veränderungen im Belohnungsverhalten eher als Ursache denn als Folge des Alkoholkonsums zu betrachten sind. Zu abweichenden Ergebnissen kommt eine Studie von Müller et al. (120). Diese untersuchte 206 gesunde Probanden im Alter von 13-15 Jahren, die mindestens einen Verwandten ersten oder zweiten Grades mit alkoholabhängigem Verhalten aufwiesen und verglich diese mit 206 Kontrollprobanden ohne alkohol-

abhängige Verwandte. Die Probanden wurden im fMRT mit einer leicht modifizierten Variante der MID-Task untersucht. Einer der Hauptunterschiede zur ursprünglichen MID-Task war, dass ein möglicher Gewinn nicht durch Geld erzielt werden konnte, sondern durch Schokolade (Auflagen der Ethikkommission). Die so erhobenen Daten konnten keinen signifikanten Unterschied des neuronalen Prozessierens belohnungsassoziierter Reize in der Zielregion (vST) der Testgruppen nachweisen. Diese Ergebnisse ließen sich in einer Untergruppe der Probanden mit mindestens einem alkoholabhängigem Elternteil reproduzieren. Die Autoren interpretierten die Ergebnisse dahingehend, dass die Entwicklung des mesolimbischen Belohnungssystems bei jüngeren Angehörigen Alkoholabhängiger noch nicht abgeschlossen sei und der zu erwartende Einfluss auf das Verhalten sich erst nach Abschluss dieser Entwicklung manifestiere. Diese Erkenntnis nimmt Bezug auf eine Studie, die den Einfluss verschiedener Einflussfaktoren auf alkoholabhängiges Verhalten in Abhängigkeit von der Entwicklung sieht [13]. Laut dieser Studie kommen die genetischen Einflüsse erst im Erwachsenenalter zum Tragen. Die zwei zuvor genannten Studien gehen auf die Annahme zurück, dass eine Störung in der Belohnungsverarbeitung im Sinne eines möglichen „reward-deficiency-syndroms“ [10] vorliegt. Anzumerken ist, dass die zwei genannten Studien keine Assoziationsstudien sind, sondern Familienstudien. Dass sich bei jüngeren Verwandten Alkoholabhängiger wiederholt abweichende Ergebnisse finden ließen, trägt zum Verständnis über die klinische Manifestation eines möglichen RDS- Endophänotyps bei. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass erst nach Abschluss der Adoleszenz die typische klinische Ausprägung i.S. einer dysfunktionalen Belohnungsverarbeitung auftritt.

Alkohol nimmt auch über die Neuroplastizität Einfluss auf abhängiges Verhalten: die Homöostase im Glutamatsystem im vSt beeinflusst den Krankheitsverlauf über die Deregulierung des Glutamatsstoffwechsels. Chronischer Alkoholkonsum führt zu reflektorisch erhöhter Glutamatausschüttung in den Projektionen vom präfrontalen Kortex zum ventralen Striatum (117). Dieser Mechanismus verschlechtert die Prognose im Bezug auf Rückfälligkeit (121). Ein Aspekt des Verhaltens, das nach einem Entzug zur Rückfälligkeit führt, ist

die (unbewusste) Erwartung des belohnenden Effektes, die eine Substanz-einnahme erzeugt. Die These, eine gestörte Exekution von Belohnungserwartung sei mit abhängigkeitsrelevantem Verhalten assoziiert, wurde in verschiedenen Studien untersucht. Bei alkoholabhängigen Patienten konnte wiederholt eine Dysfunktion des vSt bei der Belohnungsverarbeitung mit impulsivem Verhalten (Beck et al. 2009) und erhöhtem Verlangen/ „craving“ (Wrase et al. 2007) nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse decken sich mit denen der genannten Studien (31, 105). Die Bildgebungsdaten aus der Zielregion (vSt) ließen das zu erwartende Verteilungsmuster zwischen den Gruppen erkennen. Es konnte ein unterschiedliches Prozessieren belohnungsassoziierter Reize bei alkoholabhängigen Patienten in der anatomischen Zielregion (vSt) nachgewiesen werden. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass ihr Belohnungssystem gegenüber nicht-alkohol-assozierten Reizen unempfindlicher ist und damit abhängiges Verhalten begünstigt.

5.3 Genotypen als Prädiktoren für neuronale Signalverarbeitung bei alkoholabhängigem Verhalten

Welche klinischen Beobachtungen ursächlich und welche als Folge von abhängigem Verhalten angesehen werden, ist Gegenstand aktueller neurogenetischer Forschung (122). Der Nachweis eines bestimmten Genotyps, welcher mit der klinischen Variable in Verbindung steht, könnte Hinweise auf Pathomechanismen geben. Eine aktuelle Studie von Karoly et al. kam bei dem Vergleich von Cannabis, Tabak und Alkohol bei einem jugendlichen Probandenkollektiv mit der MID-Task zu dem Ergebnis, dass sich die Belohnungsprozessierung von Alkoholtrinkern im vSt nicht unterscheidet, auch nicht im Vergleich zu abstinenten Kontrollen (123). Jedoch waren die eingeschlossenen Probanden nicht alkoholabhängig (nach ICD-10). Der Nachweis einer bilateralen Dysfunktion im vSt ließ sich lediglich für abhängige Tabakraucher nachweisen. Dies verdeutlicht die Bedeutung dysfunktionaler Belohnungsprozessierung im vSt für abhängiges Verhalten über alkoholassoziierte Abhängigkeit hinaus. Gleichzeitig werfen diese Ergebnisse Fragen über die Substanzspezifität der Belohnungsverarbeitung für abhängiges Verhalten auf. Der Nachweis von dysfunktionaler Belohnungsprozessierung in der MID-Task

im Zusammenhang mit NMDAR- Sequenzvarianten stellt einen spezifischen Bezug zu alkoholabhängigem Verhalten her. Dieser Zusammenhang konnte durch die Ergebnisse unserer Studie erstmals bestätigt werden. Zudem scheint die vSt-Dysfunktion ein prämorbidem Attribut von abhängigem Verhalten zu sein. Davon ist auszugehen, da sich die Suszeptibilitätsloki auch unabhängig von der MID-Task nachweisen ließen und im Verlauf für alle drei Gene ein Einfluss auf die Aktivierung in der MID-Task nachgewiesen werden konnte. Dies lässt Raum für die Interpretation, dass bestimmte Genvarianten als Marker dienen könnten, um Voraussagen über dysfunktionales Belohnungsverhalten bei Alkoholabhängigkeit zu machen. Jedoch ist nicht notwendigerweise davon auszugehen, dass die Sequenzvarianten ursächlich für die neuronale Dysfunktion anzusehen sind. Vielmehr weisen die phänotypischen Marker auf grundlegende Unterschiede in der neuronalen Struktur und molekularen Funktion hin, die mit abhängigem Verhalten in Verbindung stehen.

5.4 Das Konzept des intermediären Phänotyps bei alkoholabhängigem Verhalten

In den letzten Jahren ist das Konzept des intermediären Phänotyps immer weiter in den Hintergrund getreten. Dennoch wandten sich einige ausgewählte Studien im Zusammenhang mit alkoholabhängigem Verhalten einer der unseren vergleichbaren Methodik zu. Im Folgenden werde ich zwei dieser Studien kurz vorstellen und diskutieren, um die eigenen Ergebnisse diesbezüglich in den Stand der aktuellen Forschung einzuordnen und den aktuellen Stellenwert von „intermediären Phänotypen“ vorzunehmen:

Die Autoren Blaine et al. untersuchten die neuronale Reaktion in unterschiedlichen Hirnarealen auf alkoholassoziierte Reize im Vergleich zu neutralen Reizen (124). Als genetischer Prädiktor diente der Tachykinin-Rezeptor 1 (TACR1). Die Studie von Blaine et al. versuchte diese Ergebnisse durch ein alkoholspezifisches Paradigma zu spezifizieren: 326 amerikanische Probanden wurden rekrutiert (31 % weiblich) und durch ein sog. „Taste“-fMRT-Paradigma untersucht. Drei SNPs konnten als Prädiktoren für BOLD-Aktivierung in belohnungsassoziierten Hirnregionen (besonders präfrontaler Kortex, Striatum und Insula) bei Alkoholreizen identifiziert werden. Die Lokalisation der

signifikanten SNPs (in 3'-or 5'-Regionen des Gens) deutete auf einen potentiell funktionalen Zusammenhang zwischen Symptomstärke (nach SAGE) und bestimmten Genmutationen hin.

Eine andere Studie von Wilcox et al. bezieht sich auf das gleiche Patientenkollektiv mit oben erwähntem „Taste“-Paradigma (s.o. Blaine et al. 2013). Der wesentliche Unterschied besteht in der Assoziation mit dem untersuchten SNCA-Gen (125). Im Studienverlauf wurde das Ziel formuliert einen „intermediäreren Phänotyp“ zu ermitteln, in dem die BOLD-Werte des fMRT-Paradigmas mit den Ausprägungen des SNCA-Gens assoziiert wurden. Die Genotypisierung in der hier genannten Studie fokussierte vor allem auf zwei bereits identifizierte SNPs (rs2583985, rs356168), die beide mit erhöhten BOLD-Werten ($p < 0.005$) in der anatomischen Region Nucleus accumbens (= vSt) assoziiert werden konnten.

Die Ergebnisse der genannten 2 Studien decken sich mit denen der von uns vorgelegten Studie und weisen auf genübergreifende Abweichungen in der neuronalen Signalprozessierung hin, die sich mit Genvarianten assoziieren lassen. Die Auswahl der fokussierten SNPs erfolgte ebenfalls auf der Grundlage bereits nachgewiesener Assoziationen. Beide oben erwähnten Studien sind also im wesentlichen, genau wie die von uns vorgelegte Studie, Replikationsstudien. In allen Studien konnten die zentralen Hypothesen über konstruierte „intermediäre Phänotypen“ bestätigt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine studienübergreifende Bedeutung des Konzepts „intermediäre Phänotypen“ für alkoholabhängiges Verhalten hin.

Obwohl alle der genannten Studien die Konstruktion eines „intermediären Phänotyps“ zum Ziel hatten, wurde dies nur durch Wilcox et al. so formuliert. Dies zeigt, dass sich das Konzept vom „intermediären Phänotypen“ als einheitlicher Begriff noch nicht durchgesetzt hat. Zudem scheint eine Vielzahl von Genen für alkoholabhängiges Verhalten mit neuronaler Dysfunktion sowohl in der Zielregion (vST) als auch in anderen Regionen relevant zu sein. Die Erkenntnisse über quantifizierbare Ausprägungen von intermediären Phänotypen helfen in der Summe, das heterogene Krankheitsbild „Alkoholismus“ zu charakterisieren und eröffnen somit neue Strategien für die Ursachenforschung.

5.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Das Gesamt Kollektiv war, wie oben beschrieben, bzgl. Alters- und Geschlechtsstruktur ähnlich wie vergleichbare Studien. Jedoch waren beide Parameter nach Testung in den zwei Gruppen signifikant verschieden ($p < 0,05$). Diese Asymmetrien nahmen wir für die genetische Analyse des Kollektivs jedoch in Kauf, um die Gesamtzahl möglichst hoch zu halten. Zudem stellen beide Parameter (Alter und Geschlecht) auch in der Gesamtbevölkerung Prädiktoren für ein Abhängigkeitsrisiko dar. Den Einfluss dieser Asymmetrien minimierten wir durch eine Kovarianzanalyse. Das Subkollektiv (Bildgebung) wurde zugunsten einer statistisch reliableren Gruppenstruktur bzgl. Alter und Geschlecht homogenisiert. Für die Auswertung der alkoholspezifischeren Cue-Tasks konnten wir nur ein kleineres Probandenkollektiv testen, was ausschließlich aus Patienten bestand.

Assoziationsstudien können durch Stratifikationseffekte zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Diesen wurde durch Auswahl einer ethnisch homogenen Probandenpopulation versucht entgegen zu wirken. Obwohl bei der Auswahl der SNPs darauf geachtet wurde, dass die Marker über das Gen verteilt sind, bilden diese nur einen Bruchteil der genetischen Variabilität des Gens ab. Die vorliegende Arbeit kann daher keine absolute Aussage über eine mögliche Gen-Diagnose-Assoziation treffen, da nur die Genotypen der betrachteten SNPs auf eine signifikante Verteilung innerhalb des Probandenkollektivs untersucht wurden. Um eine umfassende Assoziation zu untersuchen, wäre eine Analyse aller SNPs der ausgewählten Gene nötig. Der genetische Schwerpunkt dieser Arbeit lag allerdings auf der Assoziationsanalyse von SNPs und deren Haplotypen und nicht auf dem Screening des gesamten Gens. Die Auswertung der Haplotypkombinationen ergab für NMDAR1 und NMDAR2B einen signifikanten Zusammenhang, nicht aber für NMDAR2A. Die Anzahl der eingeschlossenen Probanden reduzierte sich bei dem Erstellen der Haplotypen nochmals, was die Aussagekraft der Haplotyp-Ergebnisse gegenüber den Genotypenergebnissen mindert. Die meisten der oben erwähnten Studienergebnisse waren zum Zeitpunkt der Genotypisierung (2009) unserer Studie noch nicht veröffentlicht. Dies hätte den replikativen Charakter unserer

Ergebnisse verstärkt und damit der Suche eines allgemeinen, konsistenten Phänotyps gedient.

Insgesamt wäre für die Spezifizierung einer Assoziation der Sequenzvarianten mit einer neuronalen Dysfunktion bei alkoholabhängigen Patienten eine größere Zahl an Probanden und eine Kontrollgruppe in der Alkohol-Cue-Task wünschenswert, um die ermittelten Ergebnisse zu bestätigen.

5.6 Bedeutung der vorliegenden Studie für das Forschungsfeld

Es ist uns in der vorliegenden Studie gelungen, die Einzelergebnisse anderer Studien zu reproduzieren und darüber hinaus, diese erstmals miteinander zu kombinieren. Der genetische Ansatz dieser Studie (funktionell verwandte Gene des NMDA-Typs bei Alkoholabhängigkeit) ist relevant für weiterführende Assoziationsanalysen zum NMDA-Rezeptor bei alkoholabhängigem Verhalten. Die Sequenzvarianten der Rezeptor-Untereinheiten NMDAR1, NMDAR2A und NMDAR2B sind Kandidatengene, deren Bedeutung für alkoholabhängiges Verhalten in der vorliegenden Studie unterstrichen werden konnte. Für alle drei Gene (NMDAR1, NMDAR2A und NMDAR2B) konnten mehrere Suszeptibilitätsloki mit Einfluss auf die Aktivierung während der MID-Task nachgewiesen werden. Der Versuch, einen intermediären Phänotyp (Endophänotyp) zu konstruieren, war teilweise erfolgreich. Weiterführende Studien sollten versuchen, diesen intermediären Phänotyp in größeren Probandenkollektiven zu bestätigen.

5.7 Klinische Relevanz dieser und vergleichbarer Daten

Diese Studie trägt einen kleinen Teil dazu bei, den polygenetischen Einfluss auf alkoholabhängiges Verhalten zu quantifizieren und die „Hot-Spots“ einzugrenzen. Dennoch stellt sich die Frage nach der diagnostischen Relevanz der Studienergebnisse für den klinischen Alltag. Im psychiatrischen Klinikalltag ist aufgrund fehlender personeller und finanzieller Ressourcen eine Genotypisierung oder ein fMRT bei Alkoholabhängigkeit nicht leitliniengerecht. Es besteht jedoch Hoffnung, dass durch die Identifizierung der genetischen Risikofaktoren Alkoholabhängigkeit als Krankheitsentität besser verstanden wird. Bisher steht dem die hohe Komplexität der Krankheitsätiologie „Alkohol-

abhängigkeit“ (nach ICD-10) entgegen. Hier sind besonders die paraklinischen Parameter (soziales Umfeld und Aspekte der Persönlichkeit) zu erwähnen, die bisher eine Standardisierung des Krankheitsbegriffs zusätzlich erschweren. Je besser sich die Einflussfaktoren, insbesondere auch die genetischen Varianten klassifizieren liessen, desto einheitlicher wäre die Krankheitsätiologie. Die Hoffnung auf präzise quantifizierbare, diagnostische Parameter zielt somit auf eine standardisierte Differenzierung in der Diagnostik. So wäre es denkbar, aus der Summe der gewonnenen neurobiologischen Forschungserkenntnisse „endophänotypische“ Subtypen zu konstruieren. Eine Ausdifferenzierung des Begriffes „Alkoholabhängigkeit“ mit Hilfe von standardisierten Parametern wäre für die klinische Diagnostik ein Zugewinn.

Diese Erkenntnisse könnten auch in der Therapie einen Einfluss haben. So könnten die differenzierbaren „Subtypen“ auf ihre Empfänglichkeit gegenüber bestimmten Therapiestrategien untersucht werden. Dabei steht die Hoffnung auf eine Reduzierung von unbekanntem Kovariaten, die einen Einfluss auf einen Therapieerfolg haben im Vordergrund. Zudem rücken die Erkenntnisse über Bedeutung bestimmter Hirnareale für den Therapieverlauf immer mehr in den Fokus. So könnten die in Studien untersuchten Hirnareale nicht nur Angriffspunkte von Diagnostik sein, sondern auch Ziel von Therapieregimes: Heinze und Kollegen haben schwere Fälle von Alkoholabhängigkeit mit Tiefe Hirnstimulation (THS) im ventralen Striatum behandelt [24]. Die Ergebnisse bei den 3 Patienten zeigten erste erfolgsversprechende Ergebnisse.

5.8 Ausblick

Weiterführende Studien sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit genauer spezifizieren. Besonders die Bedeutung der Sequenzvarianten, die durch das Konstruieren von Haplotypen identifiziert worden sind, könnten durch aufwendigere Sequenzierungsmethoden erweitert werden. Durch die rapide technologische Entwicklung wird dieser Prozess beschleunigt. Hier sind vor allem genumfangreiche Assoziationsstudien zu nennen, die den systematischsten Ansatz zur Entschlüsselung komplexer Erkrankungen darstellen.

Die von uns identifizierten Genloki könnten mit Loki anderer krankheitsrelevanter Gene kombiniert werden, um die Einflüsse der einzelnen Gene zu

summieren. Ähnliches gilt für die untersuchten anatomischen Regionen: erst die Identifikation aller relevanten Hirnareale liefert eine umfassende ätiologische Theorie alkoholabhängigen Verhaltens. Durch die Einbeziehung sämtlicher genetischer wie auch klinischer Einflussfaktoren ließe sich ein differenziertes Muster erstellen, welches für die Entwicklung von diagnostischen Instrumenten und therapeutischen Optionen in der Zukunft hochrelevant sein könnte.

VI. Literaturverzeichnis

1. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001;68(4):978-89.
2. Schmidt LG. [Alcohol drinking at the threshold of abuse. When is it really critical?]. *MMW Fortschr Med.* 2001;143(23):20-2.
3. Vallee BL. Alcohol in the western world. *Sci Am.* 1998;278(6):80-5.
4. Soyka MK, H. Alkoholismus - Mißbrauch und Abhängigkeit (6. Auflage). Stuttgart: Thieme; 2011.
5. Schmidt L, Room R. Cross-cultural applicability in international classifications and research on alcohol dependence. *J Stud Alcohol.* 1999;60(4):448-62.
6. Bundesgesundheitsministerium. Drogen- und Suchtbericht 2013. Berlin, Germany: Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung; 2013; 220]. Available from: <http://drogenbeauftragte.de/presse/pressemitteilungen/2013-02/drogen-und-suchtbericht-2013.html>.
7. Anderson PB, B. Alcohol in Europe. London: Institute of Alcohol Studies.; 2006; Available from: http://ec.europa.eu/health/archive/ph_determinants/life_style/alcohol/documents/alcohol_europe_en.pdf.
8. Bundesgesundheitsministerium. Drogen- und Suchtbericht 2011. Berlin, Germany: Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung; 2011; 148]. Available from: http://drogenbeauftragte.de/fileadmin/dateien-dba/Service/Publikationen/Drogen_und_Suchtbericht_2011_110517_Drogenbeauftragte.pdf.
9. Bundesgesundheitsministerium. Drogen- und Suchtbericht 2008. Berlin, Germany: Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung; 2008; 128]. Available from: http://drogenbeauftragte.de/fileadmin/dateien-dba/Service/Publikationen/Drogen_und_Suchtbericht_2008_Drogenbeauftragte.pdf.
10. Bundesamt S. Gesundheitstabelle 2005. 2005; Available from: (<http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab11.php>).
11. DHS. Datenfakten Alkohol. 2013; Available from: <http://www.dhs.de/datenfakten/alkohol.html>.
12. Rumpf HJ, Bischof G, Freyer-Adam J, Coder B. [Assessment of problematic alcohol use]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2009;134(47):2392-3.
13. Buhringer G. A need for comparability in review design: comment on three reviews of studies for alcohol use disorder treatment. *Addiction.* 2002;97(3):295-6.
14. Anderson P. Global use of alcohol, drugs and tobacco. *Drug and alcohol review.* 2006;25(6):489-502.
15. Hasin D. Classification of alcohol use disorders. *Alcohol Res Health.* 2003;27(1):5-17.
16. Caetano R, Kaplan MS, Huguet N, McFarland BH, Conner K, Giesbrecht N, Nolte KB. Acute alcohol intoxication and suicide among United States ethnic/racial groups: findings from the national violent death reporting system. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013;37(5):839-46.

17. June HL, Zuccarelli D, Torres L, Craig KS, DeLong J, Allen A, Braun MR, Cason CR, Murphy JM. High-affinity benzodiazepine antagonists reduce responding maintained by ethanol presentation in ethanol-preferring rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284(3):1006-14.
18. Allgaier C, Scheibler P, Muller D, Feuerstein TJ, Illes P. NMDA receptor characterization and subunit expression in rat cultured mesencephalic neurones. *Br J Pharmacol.* 1999;126(1):121-30.
19. Tsai G, Gastfriend DR, Coyle JT. The glutamatergic basis of human alcoholism. *Am J Psychiatry.* 1995;152(3):332-40.
20. Heinz A, Smolka MN, Braus DF, Wrase J, Beck A, Flor H, Mann K, Schumann G, Buchel C, Hariri AR, Weinberger DR. Serotonin transporter genotype (5-HTTLPR): effects of neutral and undefined conditions on amygdala activation. *Biol Psychiatry.* 2007;61(8):1011-4.
21. Storvik M, Tiihonen J, Haukijarvi T, Tupala E. Amygdala serotonin transporters in alcoholics measured by whole hemisphere autoradiography. *Synapse.* 2007;61(8):629-36.
22. Virkkunen M, Rissanen A, Naukkarinen H, Franssila-Kallunki A, Linnoila M, Tiihonen J. Energy substrate metabolism among habitually violent alcoholic offenders having antisocial personality disorder. *Psychiatry Res.* 2007;150(3):287-95.
23. Wilmott RW. Relationship between adolescent binge drinking and childhood alcohol use. *The Journal of pediatrics.* 2013;163(2):309-11.
24. Goodman AC. Economic analyses of multiple addictions for men and women. *The journal of mental health policy and economics.* 2009;12(3):139-55.
25. Moller-Leimkuhler AM, Schwarz R, Burtscheidt W, Gaebel W. Alcohol dependence and gender-role orientation. *Eur Psychiatry.* 2002;17(1):1-8.
26. Moller-Leimkuhler AM. [Socioeconomic status and gender. Manifestations of social inequality in psychiatric diseases]. *Nervenarzt.* 1999;70(11):970-80.
27. Kohler J, Grunbeck P, Soyka M. [Applicability, duration, and sociomedical course of rehabilitation of alcohol dependency. Current results and perspectives from the insurers' point of view]. *Nervenarzt.* 2007;78(5):536, 8-41, 43-6.
28. Feuerlein W. [Alcoholism as an illness]. *Herz.* 1996;21(4):213-6.
29. Jones DJ. [Alcohol and violence: reflection on care and responsibility]. *Revue medicale suisse.* 2011;7(302):1455-7.
30. Lindenmeyer J. [Training of safer drinking instead of addiction prevention in adolescents--pro]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2009;134(47):2408.
31. Beck A, Schlagenhauf F, Wustenberg T, Hein J, Kienast T, Kahnt T, Schmack K, Hagele C, Knutson B, Heinz A, Wrase J. Ventral striatal activation during reward anticipation correlates with impulsivity in alcoholics. *Biol Psychiatry.* 2009;66(8):734-42.
32. Engel GL. The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science.* 1977;196(4286):129-36.

33. Schumann G, Johann M, Frank J, Preuss U, Dahmen N, Laucht M, Rietschel M, Rujescu D, Lourdasamy A, Clarke TK, Krause K, Dyer A, Depner M, Wellek S, Treutlein J, Szegedi A, Giegling I, Cichon S, Blomeyer D, Heinz A, Heath S, Lathrop M, Wodarz N, Soyka M, Spanagel R, Mann K. Systematic analysis of glutamatergic neurotransmission genes in alcohol dependence and adolescent risky drinking behavior. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(7):826-38.
34. Wolf ME. Effects of psychomotor stimulants on glutamate receptor expression. *Methods in molecular medicine*. 2003;79:13-31.
35. Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology*. 2004;47 Suppl 1:61-79.
36. Kandel ER, Schwartz J.H., Jessell T.M. *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill; 2000.
37. Day JJ, Roitman MF, Wightman RM, Carelli RM. Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*. 2007;10(8):1020-8.
38. Schultz W, Dayan P, Montague PR. A neural substrate of prediction and reward. *Science*. 1997;275(5306):1593-9.
39. Montague PR, Hyman SE, Cohen JD. Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature*. 2004;431(7010):760-7.
40. Feinn R, Nellisery M, Kranzler HR. Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;133B(1):79-84.
41. Hinckers AS, Laucht M, Schmidt MH, Mann KF, Schumann G, Schuckit MA, Heinz A. Low level of response to alcohol as associated with serotonin transporter genotype and high alcohol intake in adolescents. *Biol Psychiatry*. 2006;60(3):282-7.
42. Heinz A, Higley JD, Gorey JG, Saunders RC, Jones DW, Hommer D, Zajicek K, Suomi SJ, Lesch KP, Weinberger DR, Linnoila M. In vivo association between alcohol intoxication, aggression, and serotonin transporter availability in nonhuman primates. *Am J Psychiatry*. 1998;155(8):1023-8.
43. Hariri AR, Holmes A. Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. *Trends Cogn Sci*. 2006;10(4):182-91.
44. Heinz A, Mann K, Weinberger DR, Goldman D. Serotonergic dysfunction, negative mood states, and response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(4):487-95.
45. Soyka M, Preuss U. [Glutamatergic mechanisms in alcohol dependence--genetic, molecular-biological and neuropharmacological findings]. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2003;71 Suppl 1:S45-50.
46. Chandler LJ, Norwood D, Sutton G. Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23(2):363-70.

47. Ortiz J, Fitzgerald LW, Charlton M, Lane S, Trevisan L, Guitart X, Shoemaker W, Duman RS, Nestler EJ. Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse*. 1995;21(4):289-98.
48. Schmidt LG, Rommelspacher H. [Biological markers of alcoholism]. *Nervenarzt*. 1990;61(3):140-7.
49. Agrawal A, Lynskey MT, Todorov AA, Schrage AJ, Littlefield AK, Grant JD, Zhu Q, Nelson EC, Madden PA, Bucholz KK, Sher KJ, Heath AC. A candidate gene association study of alcohol consumption in young women. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(3):550-8.
50. Yuan H, Marazita ML, Hill SY. Segregation analysis of alcoholism in high density families: a replication. *Am J Med Genet*. 1996;67(1):71-6.
51. Agrawal A, Lynskey MT. Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. *Addiction*. 2008;103(7):1069-81.
52. Pickens RW, Svikis DS, McGue M, Lykken DT, Heston LL, Clayton PJ. Heterogeneity in the inheritance of alcoholism. A study of male and female twins. *Arch Gen Psychiatry*. 1991;48(1):19-28.
53. McGue M, Pickens RW, Svikis DS. Sex and age effects on the inheritance of alcohol problems: a twin study. *J Abnorm Psychol*. 1992;101(1):3-17.
54. Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, Guze SB, Winokur G. Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. *Arch Gen Psychiatry*. 1973;28(2):238-43.
55. Cadoret RJ, Troughton E, O'Gorman TW, Heywood E. An adoption study of genetic and environmental factors in drug abuse. *Arch Gen Psychiatry*. 1986;43(12):1131-6.
56. Dick DM, Agrawal A, Wang JC, Hinrichs A, Bertelsen S, Bucholz KK, Schuckit M, Kramer J, Nurnberger J, Jr., Tischfield J, Edenberg HJ, Goate A, Bierut LJ. Alcohol dependence with comorbid drug dependence: genetic and phenotypic associations suggest a more severe form of the disorder with stronger genetic contribution to risk. *Addiction*. 2007;102(7):1131-9.
57. Mayfield RD, Harris RA, Schuckit MA. Genetic factors influencing alcohol dependence. *Br J Pharmacol*. 2008;154(2):275-87.
58. Franke P, Wang T, Mothen MM, Knapp M, Neith H, Lichtermann D, Capellen KM, Sander T, Propping P, Maier W. Susceptibility for alcoholism: DRD4 exon III polymorphism: a case-control and a family-based association approach. *Addict Biol*. 2000;5(3):289-95.
59. Puls I, Gallinat J. The concept of endophenotypes in psychiatric diseases meeting the expectations? *Pharmacopsychiatry*. 2008;41 Suppl 1:S37-43.
60. Zobel A, Maier W. [Endophenotype--a new concept for biological characterization of psychiatric disorders]. *Nervenarzt*. 2004;75(3):205-14.
61. Gallinat J, Bajbouj M, Sander T, Schlattmann P, Xu K, Ferro EF, Goldman D, Winterer G. Association of the G1947A COMT (Val(108/158)Met) gene polymorphism with prefrontal P300 during information processing. *Biol Psychiatry*. 2003;54(1):40-8.

62. Hariri AR, Weinberger DR. Functional neuroimaging of genetic variation in serotonergic neurotransmission. *Genes Brain Behav.* 2003;2(6):341-9.
63. Ehlers CL, Spence JP, Wall TL, Gilder DA, Carr LG. Association of ALDH1 promoter polymorphisms with alcohol-related phenotypes in southwest California Indians. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(10):1481-6.
64. Rangaswamy M, Porjesz B, Chorlian DB, Wang K, Jones KA, Bauer LO, Rohrbaugh J, O'Connor SJ, Kuperman S, Reich T, Begleiter H. Beta power in the EEG of alcoholics. *Biol Psychiatry.* 2002;52(8):831-42.
65. Hesselbrock V, Begleiter H, Porjesz B, O'Connor S, Bauer L. P300 event-related potential amplitude as an endophenotype of alcoholism--evidence from the collaborative study on the genetics of alcoholism. *Journal of biomedical science.* 2001;8(1):77-82.
66. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science.* 2003;301(5631):386-9.
67. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yoosheph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M,

- Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
68. Mir A, Kaufman L, Noor A, Motazacker MM, Jamil T, Azam M, Kahrizi K, Rafiq MA, Weksberg R, Nasr T, Naeem F, Tzschach A, Kuss AW, Ishak GE, Doherty D, Ropers HH, Barkovich AJ, Najmabadi H, Ayub M, Vincent JB. Identification of mutations in TRAPPC9, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2009;85(6):909-15.
69. Preuss UW, Johann M, Fehr C, Koller G, Wodarz N, Hesselbrock V, Wong WM, Soyka M. Personality disorders in alcohol-dependent individuals: relationship with alcohol dependence severity. *European addiction research*. 2009;15(4):188-95.
70. Treutlein J, Rietschel M. Genome-wide association studies of alcohol dependence and substance use disorders. *Curr Psychiatry Rep*. 2011;13(2):147-55.
71. Soyka M. [Pharmacotherapy of alcohol dependence]. *MMW Fortschr Med*. 2008;150 Suppl 2:22-4.
72. Feuerlein W. [Alcoholism: definition, diagnosis, illness concept, follow-up, results and costs of treatment]. *Versicherungsmedizin / herausgegeben von Verband der Lebensversicherungs-Unternehmen eV und Verband der Privaten Krankenversicherung eV*. 1991;43(1):21-7.
73. Bartels C, Kunert HJ, Stawicki S, Kroner-Herwig B, Ehrenreich H, Krampe H. Recovery of hippocampus-related functions in chronic alcoholics during monitored long-term abstinence. *Alcohol Alcohol*. 2007;42(2):92-102.
74. Gallinat J, Gotz T, Kalus P, Bajbouj M, Sander T, Winterer G. Genetic variations of the NR3A subunit of the NMDA receptor modulate prefrontal cerebral activity in humans. *J Cogn Neurosci*. 2007;19(1):59-68.
75. Fonnum F, Fykse EM, Roseth S. Uptake of glutamate into synaptic vesicles. *Prog Brain Res*. 1998;116:87-101.
76. Stark H, Grassmann S, Reichert U. [Structure, function and potential therapeutic possibilities of NMDA receptors. 1. Architecture and modulation of receptors]. *Pharm Unserer Zeit*. 2000;29(3):159-66.
77. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 1999;51(1):7-61.
78. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 1994;12(3):529-40.

79. Thomas CG, Miller AJ, Westbrook GL. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 2006;95(3): 1727-34.
80. Stark H, Reichert U, Grassmann S. [Structure, function and potential therapeutic possibilities of NMDA receptors. 2. Therapy concepts and new receptor ligands]. *Pharm Unserer Zeit.* 2000;29(4):228-36.
81. Danysz W, Parsons CG. GlycineB recognition site of NMDA receptors and its antagonists. *Amino Acids.* 1998;14(1-3):205-6.
82. Karp SJ, Masu M, Eki T, Ozawa K, Nakanishi S. Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem.* 1993;268(5):3728-33.
83. Zimmer M, Fink TM, Franke Y, Lichter P, Spiess J. Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene.* 1995;159(2):219-23.
84. Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* 1991;354(6348):31-7.
85. Nakanishi N, Axel R, Shneider NA. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(18):8552-6.
86. Levine M, Hoey T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell.* 1988;55(4):537-40.
87. Hoey T, Levine M. Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature.* 1988;332(6167):858-61.
88. Kalsi G, Whiting P, Bourdelles BL, Callen D, Barnard EA, Gurling H. Localization of the human NMDAR2D receptor subunit gene (GRIN2D) to 19q13.1-qter, the NMDAR2A subunit gene to 16p13.2 (GRIN2A), and the NMDAR2C subunit gene (GRIN2C) to 17q24-q25 using somatic cell hybrid and radiation hybrid mapping panels. *Genomics.* 1998;47(3):423-5.
89. Hess G, Jacobs KM, Donoghue JP. N-methyl-D-aspartate receptor mediated component of field potentials evoked in horizontal pathways of rat motor cortex. *Neuroscience.* 1994;61(2):225-35.
90. Kumari M, Ticku MK. Regulation of NMDA receptors by ethanol. *Prog Drug Res.* 2000;54:152-89.
91. Heinz A, Beck A, Wrase J, Mohr J, Obermayer K, Gallinat J, Puls I. Neurotransmitter systems in alcohol dependence. *Pharmacopsychiatry.* 2009;42 Suppl 1:S95-S101.
92. Wrase J, Grusser SM, Heinz A. [Cue-induced alcohol craving. Neurobiological correlates and clinical relevance]. *Nervenarzt.* 2006;77(9):1051-2, 5-8, 60-3.
93. Simson PE, Criswell HE, Breese GR. Inhibition of NMDA-evoked electrophysiological activity by ethanol in selected brain regions: evidence for ethanol-sensitive and ethanol-insensitive NMDA-evoked responses. *Brain Res.* 1993;607(1-2): 9-16.

94. Poelchen W, Kittner H, Sieler D, Regenthal R, Preiss R, Illes P. In vitro tolerance to inhibition by ethanol of N-methyl-D-aspartate-induced depolarization in locus coeruleus neurons of behaviorally ethanol-tolerant rats. *Neurochem Int.* 2001;39(1): 51-8.
95. Ventura J, Liberman RP, Green MF, Shaner A, Mintz J. Training and quality assurance with the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I/P). *Psychiatry Res.* 1998;79(2):163-73.
96. Skinner HA, Holt S, Schuller R, Roy J, Israel Y. Identification of alcohol abuse using laboratory tests and a history of trauma. *Annals of internal medicine.* 1984;101(6): 847-51.
97. Anton RF. Obsessive-compulsive aspects of craving: development of the Obsessive Compulsive Drinking Scale. *Addiction.* 2000;95 Suppl 2:S211-7.
98. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 1996;273(5281):1516-7.
99. Saiki I, Murata J, Matsuno K, Ogawa R, Nishi N, Tokura S, Azuma I. Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly(RGD), and its analogues. *Japanese journal of cancer research : Gann.* 1990;81(6-7):660-7.
100. Stippich C, Heiland S, Tronnier V, Mohr A, Sartor K. [Functional magnetic resonance imaging: Physiological background, technical aspects and prerequisites for clinical use]. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin.* 2002;174(1):43-9.
101. Lenz C, Frietsch T, Futterer C, van Ackern K, Kuschinsky W, Waschke KF. Influence of blood viscosity on blood flow in the forebrain but not hindbrain after carotid occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(6):947-55.
102. Ogawa S, Lee TM. Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields: in vivo and in vitro measurements and image simulation. *Magn Reson Med.* 1990;16(1): 9-18.
103. Dale AM, Buckner RL. Selective averaging of rapidly presented individual trials using fMRI. *Hum Brain Mapp.* 1997;5(5):329-40.
104. Knutson B, Adams CM, Fong GW, Hommer D. Anticipation of increasing monetary reward selectively recruits nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2001;21(16):RC159.
105. Wrase J, Schlagenhauf F, Kienast T, Wustenberg T, Bermpohl F, Kahnt T, Beck A, Strohle A, Juckel G, Knutson B, Heinz A. Dysfunction of reward processing correlates with alcohol craving in detoxified alcoholics. *Neuroimage.* 2007;35(2):787-94.
106. Wrase J, Grusser SM, Klein S, Diener C, Hermann D, Flor H, Mann K, Braus DF, Heinz A. Development of alcohol-associated cues and cue-induced brain activation in alcoholics. *Eur Psychiatry.* 2002;17(5):287-91.

107. Phan KL, Taylor SF, Welsh RC, Decker LR, Noll DC, Nichols TE, Britton JC, Liberzon I. Activation of the medial prefrontal cortex and extended amygdala by individual ratings of emotional arousal: a fMRI study. *Biol Psychiatry*. 2003;53(3):211-5.
108. Talairach J, Tournoux P, Musolino A, Missir O. Stereotaxic exploration in frontal epilepsy. *Advances in neurology*. 1992;57:651-88.
109. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *American journal of epidemiology*. 2009;169(4):505-14.
110. Reimers MA, Riley BP, Kalsi G, Kertes DA, Kendler KS. Pathway based analysis of genotypes in relation to alcohol dependence. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(4):342-8.
111. Wernicke C, Samochowiec J, Schmidt LG, Winterer G, Smolka M, Kucharska-Mazur J, Horodnicki J, Gallinat J, Rommelspacher H. Polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate receptor 1 and 2B subunits are associated with alcoholism-related traits. *Biol Psychiatry*. 2003;54(9):922-8.
112. Bach P, Kirsch M, Hoffmann S, Jorde A, Mann K, Frank J, Charlet K, Beck A, Heinz A, Walter H, Rietschel M, Kiefer F, Vollstadt-Klein S. The effects of single nucleotide polymorphisms in glutamatergic neurotransmission genes on neural response to alcohol cues and craving. *Addict Biol*. 2015;20(6):1022-32.
113. Domart MC, Benyamina A, Lemoine A, Bourgain C, Blecha L, Debuire B, Reynaud M, Saffroy R. Association between a polymorphism in the promoter of a glutamate receptor subunit gene (GRIN2A) and alcoholism. *Addict Biol*. 2012;17(4):783-5.
114. Forero DA, Lopez-Leon S, Shin HD, Park BL, Kim DJ. Meta-analysis of six genes (BDNF, DRD1, DRD3, DRD4, GRIN2B and MAOA) involved in neuroplasticity and the risk for alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend*. 2015;149:259-63.
115. Kim JH, Park M, Yang SY, Jeong BS, Yoo HJ, Kim JW, Chung JH, Kim SA. Association study of polymorphisms in N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunits (GRIN2B) gene with Korean alcoholism. *Neurosci Res*. 2006;56(2):220-3.
116. Abuja GA, Bubeck KA, Quinteros DD, Garcia-Lopez JM. Surgical treatment of distal tarsal joint luxations in three horses. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2013;26(4):304-10.
117. Quintero GC. Role of nucleus accumbens glutamatergic plasticity in drug addiction. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2013;9:1499-512.
118. Andrews MM, Meda SA, Thomas AD, Potenza MN, Krystal JH, Worhunsky P, Stevens MC, O'Malley S, Book GA, Reynolds B, Pearson GD. Individuals family history positive for alcoholism show functional magnetic resonance imaging differences in reward sensitivity that are related to impulsivity factors. *Biol Psychiatry*. 2011;69(7):675-83.

119. Bjork JM, Smith AR, Chen G, Hommer DW. Mesolimbic recruitment by nondrug rewards in detoxified alcoholics: effort anticipation, reward anticipation, and reward delivery. *Hum Brain Mapp.* 2012;33(9):2174-88.
120. Muller KU, Gan G, Banaschewski T, Barker GJ, Bokde AL, Buchel C, Conrod P, Fauth-Buhler M, Flor H, Gallinat J, Garavan H, Gowland P, Heinz A, Ittermann B, Lawrence C, Loth E, Mann K, Martinot JL, Nees F, Paus T, Pausova Z, Rietschel M, Strohle A, Struve M, Schumann G, Smolka MN, Consortium I. No differences in ventral striatum responsivity between adolescents with a positive family history of alcoholism and controls. *Addict Biol.* 2015;20(3):534-45.
121. Kalivas PW, Volkow ND. New medications for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity. *Mol Psychiatry.* 2011;16(10):974-86.
122. Cservenka A. Neurobiological phenotypes associated with a family history of alcoholism. *Drug Alcohol Depend.* 2016;158:8-21.
123. Karoly HC, Bryan AD, Weiland BJ, Mayer A, Dodd A, Feldstein Ewing SW. Does incentive-elicited nucleus accumbens activation differ by substance of abuse? An examination with adolescents. *Dev Cogn Neurosci.* 2015;16:5-15.
124. Blaine S, Claus E, Harlaar N, Hutchison K. TACR1 genotypes predict fMRI response to alcohol cues and level of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013;37 Suppl 1:E125-30.
125. Wilcox CE, Claus ED, Blaine SK, Morgan M, Hutchison KE. Genetic variation in the alpha synuclein gene (SNCA) is associated with BOLD response to alcohol cues. *J Stud Alcohol Drugs.* 2013;74(2):233-44.

VII. Liste der Abkürzungen (in alphabetischer Reihenfolge)

A

A=Adenin

AD=Alcohol dependence

ADH=Alkohol-Dehydrogenase

AMPA=Aminomethylphosphonsäure

B

BAK=Blut Alkohol Konzentration

BOLD=Blood oxigenation level dependend

bp=Baasenpaare

Bzw.=beziehungsweise

C

C=Cytosin

°C=Grad Celsius

CAST=Calpastatin

CHRM=Acetylcholin-Rezeptor

CIDI=Composite International Diagnostik Interview

D

DHS=Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen

DNA=Desoxyribonukleinsäure

DRD=Dopaminrezeptor

DSM-IV=Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disordersn (Version 4)

dNTPs=Desoxyribonukleosidtriphosphate

E

EEG=Elektroenzephalogramm

e.g.=exempli gratia

F

fMRT=funktioneller Magnet Resonanz Tomograph

G

g=Gramm

G=Guanin

GABA=Gamma-Amino-Buttersäure

H

HTT, SLC=Serotonintransporter

Hz=Hertz

HTR=Serotoninrezeptor

H₂O=Wasser

I

ICD-10=International classification of disease (Version 10)

J

J=Joule

K

kb=Kilo Basen

KCNMA1=Kaliumkanal-M-Alpha

M

MgCl₂=Magnesiumchlorid

MID=Monetary Incentive Delay Task

min=Minuten

ml=Milliliter

mM=Millimol

mm³=Kubikmillimeter

MRT=Magnet Resonanz Tomograph

ms=Millisekunden

µl=Mikroliter

N

Nac=Nucleus accumbens

NMDA=N-Methyl-D-Aspartat

NMDAR=N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

O

OPRM=Opioidrezeptor

P

PCR=Polymerase Chain Reaction

PECR=Peroxisomal-Trans-2-Enoyl-CoA-Reductase

PKt=Präfrontaler Kortex

p=Kurzer Arm eines Chromosom

Q

q= Langer Arm eines Chromosoms

R

RFLP=Restriktionslängenpolymorphismus

S

s= Sekunde

SNP=Single Nucleotid Polymorphismus

T

T=Thyrosin

U

U=Unit

UV=Ultraviolett

V

V=Volt

VTA=Ventrales Tegmentum

vSt=Ventrales Striatum (synonym verwendet mit Nucleus accumbens)

W

WHO=World Health Organization

X

χ^2 =Chiquadrat

Z

ZNS=Zentrales Nervensystem

z.T.=zum Teil

VIII. Liste der Tabellen und Abbildungen

- Tab.1:** Gegenüberstellung der Diagnosekriterien nach ICD-10 und DSM-IV (S.10).
- Tab.2:** Beispiele durch Kopplungsanalysen identifizierter Genloki (S.17).
- Tab.3:** Beispielstudien mit Endophänotypen (S.18).
- Tab.4:** Alkoholrelevante SNPs aus der Assoziationsanalyse „GWAS“ (S.19).
- Tab.5:** Untersuchte SNPs für NMDAR1 (S.26).
- Tab.6:** Untersuchte SNPs für NMDAR2A (S.27).
- Tab.7:** Untersuchte SNPs für NMDAR2B (S.28).
- Tab.8:** Primer, Fragmentlänge und Annealingtemperatur des PCR-Produktes (S.29).
- Tab.9:** Verwendete Zusammensetzung des Mastermix für die PCR (S.32).
- Tab.10:** Restriktionsenzyme für den RFLP in alphabetischer Reihenfolge (S.34).
- Tab.11:** Bandenmuster nach Restriktionslängenpolymorphismus (S.35).
- Tab.12:** Verwendete Chemikalien (S.36).
- Tab.13:** Verwendete Geräte (S.36).
- Tab.14:** Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR1 (S.47).
- Tab.15:** Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR2A (S.48).
- Tab.16:** Genotypisierung der ausgewählten SNPs des Gens NMDAR2B (S.48).
- Tab.17:** Genotypisierung von NMDAR1 gewichtet nach Dominanzmodell 1 (S.49).
- Tab.18:** Genotypisierung von NMDAR2A gewichtet nach Dominanzmodell 1 (S.49).
- Tab.19:** Genotypisierung von NMDAR2B gewichtet nach Dominanzmodell 1 (S.50).
- Tab.20:** Genotypisierung des Gens NMDAR1 nach Dominanzmodell 2 (S.50).
- Tab.21:** Genotypisierung des Gens NMDAR2A nach Dominanzmodell 2 (S.51).
- Tab.22:** Genotypisierung des Gens NMDAR2B nach Dominanzmodell 2 (S.51).
- Tab.23:** Ausgewählte Haplotypen für Gen NMDAR1 (S.52).
- Tab.24:** Ausgewählte Haplotypen für das Gen NMDAR2A (S.53).
- Tab.25:** Ausgewählte Haplotypen für das Gen NMDAR2B (S.54).
- Tab.26:** Übersicht der Altersstruktur des Bildgebungsarm der Studie (S.56).
- Tab.27:** Deskriptive statistische Auswertung der skalierten Aktivitätsparameter der MID-Task mit der Antizipation Gewinn>Neutral (S.60).
- Tab.28:** Übersicht aller Probanden mit Diagnose und Geschlecht (S.65).
- Tab.29:** Übersicht der Altersstruktur aller Probanden (S.65).
- Tab.30:** Verteilung der klinischen Variablen (S.65-66).

- Abb.1:** Glutamerger Verhaltenskontrolle (S.15).
- Abb.2:** Chromosom 9 und selektierte Polymorphismen des NMDAR1-Gens (S.26).
- Abb.3:** Chromosom 16 und selektierten Polymorphismen des NMDAR2A-Gens (S.27).
- Abb.4:** Chromosom 12 und selektierte Polymorphismen des NMDAR2B-Gens (S.28).
- Abb.5:** Schematische Übersicht der exponentiellen DNA-Vervielfältigung (S.31)
- Abb.6:** Auswertung des Abschnittes eines abgelaufenen RFLP (S.34).
- Abb.7:** Nac und umgebende Projektionen (S.39).
- Abb.8:** Darstellung der verwendeten Cues des fMRT-Experiments (S.40).
- Abb.9:** Aufbau eines Trials aus dem Monetary Incentive Delay Paradigma (S.41).
- Abb.10:** Schema zur Darstellung des Alkohol Cue Paradigmas (S.41).
- Abb.11:** Ausgewählte Beispielsbilder des Alkohol Cue Paradigmas (S.42).
- Abb.12:** Mögliche Darstellung der Auswertung eines Knutson-Paradigmas (S.46).
- Abb.13:** Häufigkeitsverteilung von Haplotypkombinationen für NMDAR1 (S.53).
- Abb.14:** Häufigkeitsverteilung von Haplotypkombinationen für NMDAR2A (S.54).
- Abb.15:** Häufigkeitsverteilung von Haplotypkombinationen für NMDAR2B (S.55).
- Abb.16:** Darstellung der Signal-Maske für das Knutson-Paradigma (S.56).
- Abb.17:** Aktivierung in der anatomischen Zielregion bei den Kontrollprobanden(S.57).
- Abb.18:** **Keine** Aktivierung in der Zielregion bei den Patienten (S.57).
- Abb.19:** Aktivierung in der anatomischen Zielregion im Gruppenvergleich (S.58).
- Abb.20:** Aktivierung in der anatomischen Zielregion (vSt) im Gruppenvergleich in umgekehrter Richtung, d.h. Patienten>Kontrollen (S.59).
- Abb.21:** Visualisierung der skalierten Aktivierungen während der MID-Task (S.60).
- Abb.22:** Darstellung der zur Signal-Maske für das Alkohol-Cue-Paradigma (S.62).
- Abb.23:** Aktivierung im Alkohol-Cue-Paradigma für die 1. Bedingung (S.63).
- Abb.24:** Aktivierung im Alkohol-Cue-Paradigma für die 2. Bedingung (S.63).
- Abb.25:** Aktivierung im Alkohol-Cue-Paradigma für die 3. Bedingung (S.64).
- Abb.26:** Aktivierung im Alkohol-Cue-Paradigma für die 4. Bedingung (S.64).

IX. Appendix

SNP	p-Wert (Kruskal Wallis Test)		
	Maske	Peak	Cluster
rs4880213	0,003**	0,012*	0,002**
Rs2301364	0,758	0,630	0,450
rs28489906	0,082	0,493	0,029*
rs10870198	0,755	0,481	0,992
rs6293	0,899	0,249	0,374
rs1014531	0,290	0,499	0,544
rs2072450	0,477	0,439	0,863
rs9806806	0,296	0,050*	0,149
rs8049651	0,131	0,625	0,239
rs2302711	0,289	0,260	0,391
rs3026174	0,808	0,047*	0,871
rs1806201	0,371	0,265	0,372
rs1805482	0,796	0,838	0,303
rs1805547	0,374	0,019*	0,361
rs7301328	0,354	0,408	0,643
rs3764030	0,727	0,760	0,708
rs4880213dom1	0,014*	0,090	0,028*
rs2301364dom1	0,758	0,630	0,450
rs28489906dom1	0,632	0,514	0,056
rs10870198dom1	0,484	1,000	0,983
rs6293dom1	0,785	0,122	0,172
rs2302711dom1	0,115	0,115	0,172
rs8049651dom1	0,061	0,336	0,181
rs9806806dom1	0,278	0,828	0,942
rs2072450dom1	0,248	0,208	0,600
rs1014531dom1	b.n.m.	b.n.m	b.n.m
rs3026174dom1	0,808	0,047*	0,871
rs1806201dom1	0,169	0,114	0,169

SNP	p-Wert (Kruskal Wallis Test)		
	Maske	Peak	Cluster
rs1805482dom1	0,972	0,605	0,581
rs1805547dom1	0,785	0,693	0,448
rs7301328dom1	0,473	0,429	0,387
rs3764030dom1	0,426	0,492	0,638
rs4880212dom2	0,083	0,050*	0,029*
rs2301364dom2	0,600	0,345	0,248
rs28489906dom2	0,062	0,489	0,304
rs10870198dom2	0,940	0,243	0,910
rs6293dom2	0,806	1,000	0,834
rs2302711dom2	0,799	0,489	0,743
rs8049651dom2	0,889	0,753	0,726
rs9806806dom2	0,746	0,032*	0,115
rs2072450dom2	1,000	0,867	0,769
rs1014531dom2	0,290	0,499	0,544
rs3026174dom2	b.n.m.	b.n.m.	b.n.m.
rs1806201dom2	0,931	0,521	0,615
rs1805482dom2	0,510	0,884	0,124
rs1805547dom2	0,221	0,006**	0,361
rs7301328dom2	0,149	0,182	0,449
rs3764030dom2	0,880	0,940	0,597

b.n.m.=Berechnung nicht möglich, da es in dem überprüften Probandenkollektiv nur eine Variante (einen Genotyp) der untersuchten Variable gab. (*)=Signifikant auf einem 5%-Niveau; (**)=Hoch-Signifikant auf einem 0,1%-Niveau

X. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Malte Beckenbach, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Assoziationsanalyse von NMDAR-Genvarianten und deren Einfluss auf striatale Belohnungsverarbeitung bei alkoholabhängigem Verhalten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE-www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

(entfällt)

XI. Lebenslauf

Mein Lebenslauf ist in der elektronischen Version der Dissertation aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

XII. Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Imke Puls, sowie der Leiterin der Gruppe „Emotional Neuroscience“ Dr. Dipl.-Psych. Anne Beck, dem ehem. Genetiklaborleiter Dr. Werner Kitzrow, meiner Frau Dr. Philine Senf-Beckenbach ihrem Bruder Dr. Cornelius Senf und meinen Eltern Prof. Dr. Niels Beckenbach und Dipl.-Psych. Gisela Beckenbach ohne all ihre Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht hätte fertig gestellt werden können.