

Aus der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**Genetische Varianten synaptischer Proteine
als Risikomechanismus der Alkoholabhängigkeit
und Alkohol-bezogener Phänotypen**

Kumulative Habilitationsschrift

Zur Erlangung der *venia legendi* für das Fach
Psychiatrie und Psychotherapie
im Fachbereich Medizin
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Vorgelegt von Dr. med. Christoph Fehr

2007

Diese Schrift ist im Rahmen des kumulativen Habilitationsverfahrens als
Übersichtsartikel verfasst. Kopien der zugrundeliegenden publizierten Arbeiten sind
im Anhang beigefügt

Inhalt:	Seite
1. Zusammenfassung	3
2. Eigene Veröffentlichungen in der kumulativen Habilitation	4
3. Einleitung	5
4. Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der Ergebnisse der Habilitationsarbeit	8
4.1. Hochauflösende Kartierung eines „quantitativen trait locus (QTL)“ für Alkoholentzugsempfindlichkeit (<i>Alcw2</i>) - <i>Publikation A</i>	8
4.2. Validierung des Gens für das multiple PDZ Domänen Protein <i>Mpdz</i> als ein Kandidatengen für Alkoholentzug - <i>Publikation B</i>	16
4.3. Pleiotrope Effekte von <i>Mpdz</i> : - <i>Publikation C</i>	18
4.4. Evaluation der Gene <i>Gad1</i> und <i>Gad2</i> als weitere Kandidatengene für Alkoholentzugsempfindlichkeit und -präferenz auf Mauschromsom 2: - <i>Publikation D</i>	22
4.5. Bestätigung des <i>Syntaxin binding protein 1</i> Gens (<i>Stxbp1</i>) als Kandidatengen der Alkoholpräferenz: - <i>Publikation E</i>	26
4.6. Das Gen der alpha2 Untereinheit des GABAA-Rezeptors (<i>GABRA2</i>)als Kandidatengen verschiedener Subtypen der Alkoholabhängigkeit: - <i>Publikation F</i>	33
4.7. Manipulation der neuronalen Aktivität des Rewardsystems durch den selektiven GABA-Transporter 1 Inhibitor Tiagabin: - <i>Publikation G</i>	38
5. Ausblick der Ergebnisse	44
6. Literatur	48
7. Danksagung	57
8. Anhang: Sonderdrucke der Arbeiten A-G	

1. Zusammenfassung

Die Alkoholabhängigkeit gehört zu den häufigen chronischen Erkrankungen, welche mit einem vorzeitigen Verlust von Gesundheit und Lebensqualität einhergeht. Familien- und Zwillingsuntersuchungen sprechen dafür, dass mehr als 50% der Verhaltensvarianz durch genetische Faktoren zu erklären ist.

In der vorliegenden kumulativen Habilitationsarbeit wurden verhaltensgenetische, molekularbiologische, humangenetische und funktionell bildgebende Untersuchungstechniken kombiniert, um ein erweitertes Verständnis der Neurobiologie der Alkoholabhängigkeit zu erzielen.

In einer Serie **tierexperimenteller Arbeiten** konnte u.a. nachgewiesen werden, dass das Gen für das Multiple PDZ Domänen Protein *Mpdz* ein Kandidatengen des Alkoholentzugs, Barbituratentzugs und der neuronalen Exzitabilität darstellt (Arbeiten A-C). In zwei weiteren Untersuchungen wurden Kandidatengene der Alkoholpräferenz untersucht (Arbeiten D und E). Hier konnte mit dem *Syntaxin binding protein 1 (Stxbp1)* ein Kandidatengen der Alkoholpräferenz bestätigt werden (Arbeit E). **Humangenetische Untersuchungen** sprechen dafür, dass molekulare Varianten in der Alpha2 Untereinheit des GABAA Rezeptors zu einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit beim Menschen beitragen (Arbeit F). Mit einer ¹⁸F-Fluorodesoxyglucose Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass Alkohol *in vivo* das mesolimbische Rewardsystem stimuliert, diese Stimulation jedoch nicht durch Tiagabin, einem GABA-Transporterinhibitor, hemmbar ist (Arbeit G). Zusammengefasst sprechen die Untersuchungen dafür, dass molekulare Varianten synaptischer Proteine zu einer veränderten Alkoholempfindlichkeit und dem Risiko zur Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit beitragen.

2. Eigene Publikationen in der kumulativen Habilitation

- A. Fehr C, Shirley RL, Belknap JK, Crabbe JC, Buck KJ. Congenic mapping of alcohol and pentobarbital withdrawal liability Loci to a <1 centimorgan interval of murine chromosome 4: identification of mpdz as a candidate gene. *J Neurosci*. 2002; 22: 3730-3738. (IF 7.45)
- B. Shirley RL, Walter NA, Reilly MT, Fehr C, Buck KJ. Mpdz is a quantitative trait gene for drug withdrawal seizures. *Nat Neurosci*. 2004; 7: 699-700. (IF 14.80)
- C. Fehr C, Shirley RL, Metten P, Kosobud AE, Belknap JK, Crabbe JC, Buck KJ. Potential pleiotropic effects of Mpdz on vulnerability to seizures. *Genes Brain Behav*. 2004; 3: 8-19. (IF: 4.38)
- D. Fehr C, Rademacher BL, Buck KJ. Evaluation of the glutamate decarboxylase genes Gad1 and Gad2 as candidate genes for acute ethanol withdrawal severity in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27: 467-472. (IF 2.58)
- E. Fehr C, Shirley RL, Crabbe JC, Belknap JK, Buck KJ, Phillips TJ. The syntaxin binding protein 1 gene (Stxbp1) is a candidate for an ethanol preference drinking locus on mouse chromosome 2. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29: 708-720. (IF 2.93)
- F. Fehr C, Sander T, Tadic A, Lenzen KP, Anghelescu I, Klawe C, Dahmen N, Schmidt LG, Szegedi A. Confirmation of association of the GABRA2 gene with alcohol dependence by subtype-specific analysis. *Psychiatr Genet*. 2006; 16: 9-17. (IF 2.14)
- G. Fehr C, Hohmann N, Grunder G, Dielentheis TF, Buchholz HG, Checko N, Yakushev I, Landvogt C, Bartenstein P, Urban R, Schreckenberger M. Tiagabine does not attenuate alcohol-induced activation of the human reward system. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007; 191: 975-983. (IF 3.62).

3. Einleitung

Die Alkoholabhängigkeit gehört zu den häufigsten chronischen psychischen Erkrankungen, die mit einem starken Verlust der Lebensqualität einhergeht. Etwa 10% des errechenbaren Verlustes an Gesundheit und Lebensqualität („disability adjusted life years [DALY]“) lässt sich in industriellen Staaten auf einen übermäßigen Alkoholkonsum zurückführen, dieses stellt neben Tabakkonsum und Bluthochdruck den dritthäufigsten zuschreibbaren Risikofaktor dar (Ezzati et al. 2003). Deutschland gehört mit einem Alkoholverbrauch von etwa 11,5 l reinen Alkohols pro Einwohner zu den Ländern mit dem höchsten Alkoholkonsum auf der Erde. Etwa 50% dieser Menge wird von alkoholkranken Patientinnen und Patienten konsumiert. Das aktuelle diagnostische System nach ICD-10 unterscheidet in der Beurteilung des Schweregrads einer Alkoholkrankung die Diagnosen eines schädlichen Gebrauchs von der einer Alkoholabhängigkeit. Von einer Alkoholabhängigkeit wird dann ausgegangen, wenn innerhalb eines 1 Monatszeitraums dauerhaft oder innerhalb eines 12 -Monatszeitraums mehrfach drei der sechs folgenden diagnostischen Kriterien vorgelegen haben: 1. Zwanghafter Substanzkonsum, 2. Kontrollverlust, 3. Körperliches Entzugssyndrom, 4. Toleranzentwicklung, 5. Aufgabe wichtiger Aktivitäten infolge des Alkoholkonsums und 6. Fortgesetzter Konsum trotz bekannter nachteiliger Folgen.

Aktuelle epidemiologische Untersuchungen aus den USA zeigen eine 12-Monatsprävalenzrate der Alkoholabhängigkeit von ca. 3,8 % in der erwachsenen Bevölkerung (Grant et al., 2004; Hasin et al., 2007). Übertragen auf deutsche Verhältnisse entspricht dies einer Anzahl von ca. 2,9 Millionen konsumierender alkoholabhängigen Patienten, etwas konservativere deutsche Statistiken gehen von ca. 2 Millionen alkoholabhängigen Patienten aus. Das Ausmaß der Problematik lässt

sich auch daran erkennen, dass die Diagnosengruppe „Psychische und Verhaltensstörungen durch Alkohol“ im Jahr 2005 mit 220.000 Fällen die häufigste Behandlungsdiagnose unter den vollstationär behandelten männlichen Patienten darstellte (Statistisches Bundesamt, 2006).

Gemessen an der gesundheitsökonomischen Bedeutung der Alkoholabhängigkeit sind die Kenntnisse der Ursachen, Verlaufsformen und der therapeutischen Möglichkeiten der Alkoholabhängigkeit sehr unzureichend.

Verlaufsuntersuchungen zeigen, dass mehr als 80 % aller alkoholabhängigen Patienten innerhalb eines Jahres nach einer Entzugsbehandlung trotz einer initial guten Motivation wieder alkoholrückfällig werden (Körkel und Schindler, 2003; Mann, 2004). Zu den bisher etablierten Behandlungsmöglichkeiten gehören die stationäre Rehabilitationsbehandlung, durch welche die Rückfallquote auf ca. 55 % gesenkt werden kann (Zobel et al., 2005). Problematisch ist, dass aufgrund der Komplexität des Antrags- und Behandlungsverfahrens weniger als 3% der Patienten (ca. 40000) an einer solchen Therapie teilnehmen.

Der Entwicklung neuer Behandlungsverfahren für einen größeren Anteil der behandelten Patienten kommt daher eine entscheidende Bedeutung zu. Eine besondere Hoffnung besteht in der Implementierung medikamentöser Behandlungsverfahren, die auch im hausärztlichen Sektor breiter einsetzbar sind. Zu den bisher entwickelten medikamentösen Substanzen zählen der μ Opiatantagonist Naltrexon (Srisurapanont und Jarusuraisin, 2002) und der NMDA Rezeptorantagonist Acamprosat (Kranzler und Van Kirk, 2001). Obwohl insbesondere die Trinkmengen - reduzierenden Effekte von Naltrexon als durch zahlreiche Studien belegt gelten können (z.B. Anton et al., 2006), ist die Effektstärke der bisher eingesetzten Substanzen als unbefriedigend zu bezeichnen.

Für eine substantielle Weiterentwicklung der therapeutischen

Behandlungsmöglichkeiten alkoholabhängiger Patienten erscheint ein verbessertes neurobiologisches Verständnis der Erkrankung dringend erforderlich.

Besondere Hoffnungen liegen in der Identifikation genetischer Risikofaktoren der Alkoholabhängigkeit, um auf der Basis dieser Erkenntnisse neue Ziele für pharmakologische Ansätze zu finden. Nach metaanalytischer Auswertung der in verschiedenen Kontinenten durchgeführten Zwillingsstudien lassen sich ca. 55% (Konfidenzintervall: 40-65%) des individuellen Risikos, eine Alkoholabhängigkeit zu entwickeln, auf das Vorliegen genetischer Risikofaktoren zurückführen (Cloninger et al., 1981; Heath et al., 1997; Kendler, 2001; Prescott und Kendler, 1999; Sigvardsson et al., 1996). Die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit erhöht sich bei Männern um den Faktor 3-4, bei Frauen um den Faktor 5-7, wenn ein erstgradiger Verwandter alkoholabhängig ist (Prescott und Kendler, 1999; Reich et al., 1998). Die Zwillings- und Adoptionsstudien legen vergleichbar den Befunden bei anderen häufigen chronischen Erkrankungen mit einer familiären Veranlagung wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II und der Alzheimer Erkrankung ein komplexes Vererbungsmuster mit multiplen genetischen Risikofaktoren und möglichen Gen-Umweltinteraktionen nahe (Heath et al., 1997; Heath et al., 2002).

Problematisch bei der Identifikation der zugrundeliegenden Gene ist, dass die vermutete Effektstärke der einzelnen Gene nur moderat ist und dieses die Identifikation der zugrundeliegenden Gene erschwert. In der vorliegenden Arbeit werden daher verschiedene methodische Ansätze vorgestellt, welche auf die Identifikation von genetischen Risikofaktoren des Alkoholentzugs und der Alkoholabhängigkeit abzielen. Im ersten Teil der kumulativen Habilitationsschrift werden tierexperimentelle Arbeiten vorgestellt, in welchen die Effekte bestimmter Genloci auf verschiedene alkoholbezogene und verwandte Phänotypen unter

kontrollierten experimentellen Bedingungen untersucht wurden (**Publikationen A-E**). Dem Phänotyp des Alkoholentzugs, welcher in Bezug auf das Erscheinungsbild der Alkoholabhängigkeit als ein Schwergradindikator der Alkoholabhängigkeit aufgefasst werden kann, kommt hierbei eine besondere Rolle zu (Schuckit et al., 2003; Schuckit et al., 1998). Im zweiten Teil der Arbeit wird eine humangenetische Arbeit vorgestellt, in welcher ein wichtiges Kandidatengen der Alkoholabhängigkeit untersucht wurde, welches an einer großen Familienstudie identifiziert wurde (**Publikation F**). Im letzten Abschnitt wird eine Positronenemissionstomographische (PET) Untersuchung vorgestellt, in welcher eine pharmakologische Manipulation des Rewardsystems untersucht wurde (**Publikation G**).

4. Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der Ergebnisse der Habilitationsarbeit

4.1. Hochauflösende Kartierung eines „quantitativen trait locus (QTL)“ für Alkoholentzugsempfindlichkeit (*A/cw2*) - Publikation A

Tierexperimentelle Modelle sind seit einigen Jahrzehnten entwickelt worden, um die genetischen Einflussfaktoren alkoholbezogener Phänotypen unter kontrollierten Umweltbedingungen in einer ausreichend großen Studienpopulation beobachten zu können. Obwohl kein Modell exakt die Phänomenologie der Alkoholabhängigkeit darstellen kann, eignen sich insbesondere Mausmodelle dazu, genetische Risikofaktoren für Trinkmenge, Trinkpräferenz, Alkoholsensitivität und Entzugsschwere zu untersuchen (Crabbe et al., 1994a; Crabbe et al., 1999; Crabbe et al., 2006).

Die DBA/2J (D2) und C57BL/6J (B6) Mausinzuchtstämme gehören zu den am häufigsten untersuchten Tiermodellen zur Untersuchung Alkohol-bezogener

Phänotypen. Während B6 Mäuse z.B. bei wahlweiser Verfügbarkeit sehr große Mengen Alkohol freiwillig zu sich nehmen, vermeiden D2 Mäuse den Alkohol nahezu vollständig (Belknap et al., 1993). D2 Mäuse besitzen im Weiteren eine sehr hohe Sensitivität gegenüber v.a. aversiven Alkoholwirkungen, sie entwickeln im Vergleich zu B6 Mäusen deutlich ausgeprägte akute Alkoholentzugssymptome, welche im Mausmodell als sogenannte „Handling induced convulsions“ gemessen werden können (Crabbe et al., 1980). Dieses Modell wird unten im Weiteren noch Erwähnung finden.

Diese Alkohol-bezogenen Phänotypen nehmen in Kreuzungen von B6 und B2 Mäusen eine individuelle Ausprägungsform an, so dass Alkoholkonsum, Alkoholpräferenz und Alkoholentzugsschwere auch als quantitative Phänotypen („quantitative traits“) bezeichnet werden, welche von mehreren Gen(orten), den „quantitative trait loci“ (QTLs) beeinflusst werden. Zur Identifikation der Genloci wurden ausgehend von den B6 und D2 Inzuchtstämmen für jeden Phänotyp am Portland Alcohol Research Center (PARC) drei verschiedene Kreuzungspopulationen eingesetzt, a.) zum einen sogenannte eine Serie von ca. 26 rekombinanten Inzuchtstämmen (BXD), b.) zum anderen eine große ($n > 300$) F2 Population von B6 und D2 Stämmen und c.) eine Selektionslinie, in welcher ausgehend von einer F2-Population über vier Generationen Tiere auf die Entwicklung des extremen Phänotyps („High withdrawal vs. „Low withdrawal“; „High preference vs. low preference“) gezüchtet wurden. Alle drei Populationen wurden auf das gewünschte Verhalten phänotypisch untersucht und für ein Set von 400 genomweiter zwischen den B6 und den D2 Stämmen polymorphen Marker genotypisiert. Bei der Untersuchung des Phänotyps des akuten Alkoholentzugs konnten mit diesem Verfahren zwei signifikante und zwei mögliche Genorte der Alkoholentzugsschwere auf den Chromosomen 1, 2, 4 und 11 identifiziert werden (Abb1.)

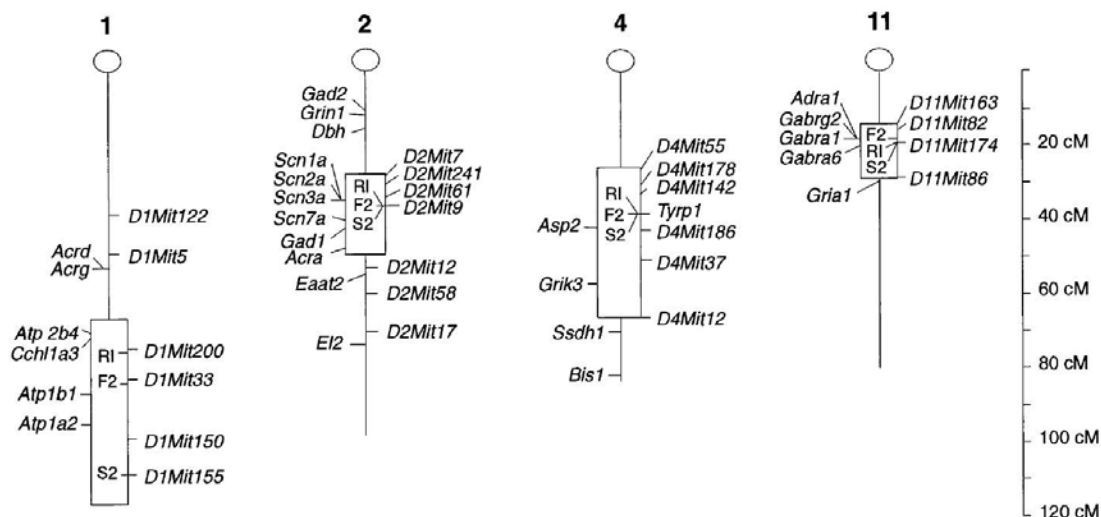


Abb. 1: Lage und Position der Alkoholentzugs-QTLs (aus Buck et al., 1997). Aufgetragen sind die geschätzten 1-LOD Konfidenzintervalle der vier QTLs und die möglichen Kandidatengene QTL auf den Mausemchromosomen 1, 2, 4 und 11 in ihren Markerabstand in cM vom Zentromer.

Problematisch bei der Identifikation der zugrundeliegenden Gene ist, dass die signifikanten QTLs eine Größe von mehreren cM besitzen und daher mehr als 500 potentielle Kandidatengene beinhalten können. QTL Identifikationsstrategien stellen daher einen wichtigen Ansatz dar, um die Anzahl der möglichen Kandidatengene zu reduzieren.

Im Rahmen eines von der DFG unterstützten Forschungsvorhabens am Portland Alcohol Research Center wurde der die Alkoholentzugsschwere beeinflussende Genort auf Mausemchromosom 4 [auch „*Alcohol withdrawal 2*“ (*Alcw2*)] näher charakterisiert. Die hierzu notwendigen Arbeitsschritte sind in **Publikation A** (Fehr et al., 2002) der kumulativen Habilitationsschrift beschrieben.

Das besondere Interesse an *Alcw2* entstand v.a. durch die Tatsache, dass dieser Genort nicht nur die Schwere des Alkoholentzugs, sondern auch die Schwere des Pentobarbituratentzugs beeinflusst, so dass von diesem Gen Effekte auf mehrere Phänotypen (sogenannte „*Pleiotropie*“) angenommen werden konnte (Buck et al., 1999).

Die relativ aufwendige Strategie zur Feinkartierung von *Alcw2* auf eine chromosomale Region < 1 cM wurde durch die Entwicklung spezieller Tiermodelle, sogenannter „Congenic strains (CS)“ und „Interval specific congenic strains (ISCS)“ vorangetrieben (Darvasi, 1998). Durch spezielle Kreuzungsversuche wurden zunächst selektiv B6 Allele aus dem Bereich von *Alcw2* auf Mauschromosom 4 in ein Hintergrundgenom eines D2 Tieres eingeführt. Der so entwickelte D2.B6-*D4Mit142* „congenic strain (CS)“ erlaubte die Effekte von *Alcw2* ohne störende Interaktionen mit anderen QTLs zu untersuchen. Passend zur Hypothese zeigte der D2.B6-*D4Mit142* CS eine intermediäre akute Alkoholentzugsschwere (Abb. 2, aus Publikation A).

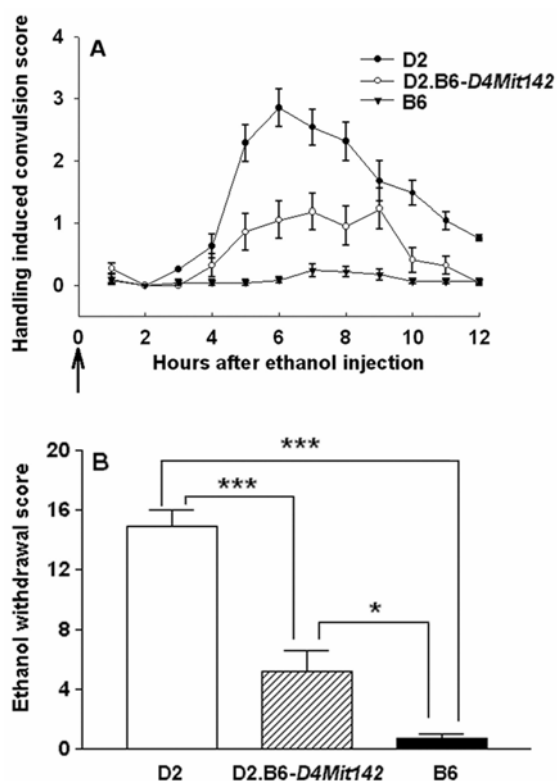


Abb. 2. Alkohol - Entzugsschwere [“Handling-induced convulsions (HIC)"] in den D2, D2.B6-D4Mit142 CS und B6 Stämmen. (A) Verlauf der Entzugsschwere 0-12 h nach i.p. Injektion von 4 g/kg Ethanol in den drei Modellen (Mittelwert \pm SEM; n = 22-40 Mäuse pro Stamm). (B) Mittelwert \pm SEM der kumulativen Entzugsschwere in den D2.B6-D4Mit142, D2 und B6 Stämmen (* p < 0.05; ***p < 0.001; Tukey's post hoc Test nach ANOVA)

Durch die Entwicklung sogenannter „Interval specific congenic lines (ISCLs) gelang es, eine höhere räumliche Auflösung von *A/w2* zu erzielen (Abb. 3 aus Publikation A)

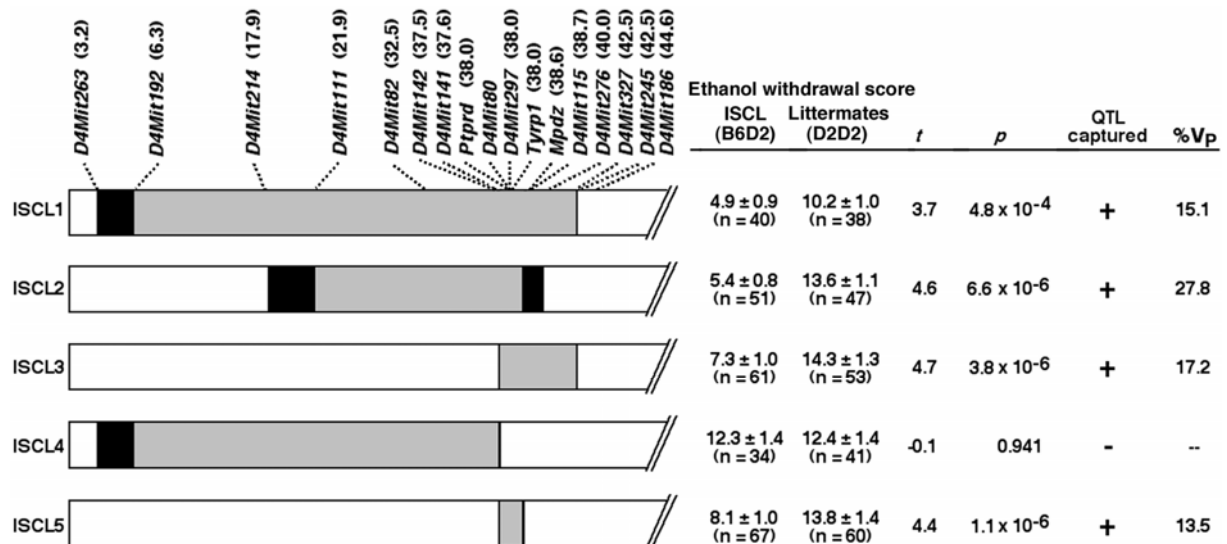


Abb. 3. Größe der B6 artigen Insertierung (linker Bildteil; D2-Region: weiss, B6-Region grau, Übergangsbereich: schwarz) sowie die korrespondierende Entzugsschwere (rechter Bildteil) in fünf verschiedenen ISCLs. Der entzugsprotektive Effekt der B6 Allele konnte in den B6D2 heterozygoten ISCL 1-3 und 5 Linien, nicht jedoch in ISCL4 nachgewiesen werden.

Homozygote D2.B6-*Mpdz* „Small Donor Segment“- Congenic Strains wiesen einen Alkohol- und Pentobarbiturat-entzugsprotektiven Effekt auf. Hierdurch konnte *A/w2* und *Pbw2*, der Locus für Pentobarbituratentzug, einem chromosomalen zwischen den Markern *Ptrd* und *Mpdz* zugeordnet werden. Diese Region entsprach nach Untersuchung der CELERA Datenbank einem ca. 1.8 MB großen Abschnitt auf Mauschromosom 4, welcher ca. 16 Kandidatengene enthält.

In einer weiteren Analyse wurden zwölf Kandidatengene aus dem mittleren Bereich des Chromosom 4 in den B6 und D2 Stämmen sequenziert (Tabelle 1 aus Publikation A)

Table 1. Evaluation of candidate genes for *Alcw2* on mouse chromosome 4

<u>Loc.</u> (cM) ^a	<u>Gene</u>	<u>Ref.</u>	<u>Proposed function</u>	<u>Length</u> (bp)	<u>ΔDBA/2J vs. C57BL/6J</u> SNP	<u>protein</u>
38.0	<i>Ptprd</i>		Protein tyrosine phosphatase receptor subtype delta A	3762	7	0
38.6	<i>Mpdz</i>		Multiple PDZ-domain protein	6168	18	10
38.0-42.6	<i>Sh3d2a</i>		SH3 domain protein 2A (endophyllin)	1059	1	0
syn. ^k	<i>Hpca</i>		Hippocalcin	579	0	0
syn.	<i>Ppt</i>		Palmitoyl-protein thioesterase	924	1	0
45.8	<i>Nfia</i>		Nuclear transcription factor I/A	1530	0	0
syn.	<i>Gabrd</i>		GABA _A receptor, δ subunit	1350	0	0
46.8	<i>Pde4b</i>		Phosphodiesterase 4B	2166	0	0

Lediglich das Gen für das Multiple PDZ Domänen Protein *Mpdz* zeigte Polymorphismen zwischen den B6 und den D2 Stämmen und befand sich im Bereich von *Alcw2*. Die Sequenzierung der gesamten *Mpdz* cDNA in den B6 und D2 Mäusen ergab 18 Polymorphismen, von welchen 10 einen Aminosäureaustausch im Bereich von MPDZ hervorrufen (Abb. 4 aus Publikation A).

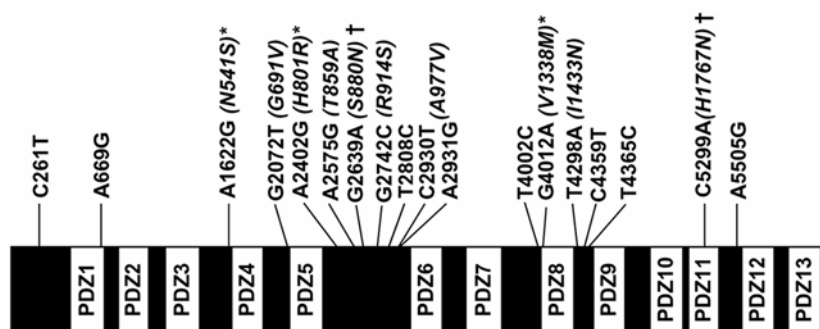


Abb. 4. SNPs in *Mpdz* in B6 und D2 Stämmen. Nonsynonyme SNPs sind in Klammern, potentielle Veränderungen der Konformation mit * angegeben. Potentielle Glykosylierungsstellen sind mit einem † versehen.

Mpdz enthielt zwei nichtsynonyme SNPs in zwei PDZ Domänen (V1338M in PDZ8; H1767N in PDZ11) und zwei SNPs, welche potentiell Glycosylierungen (S880N und H1767N) beeinflussen.

Mpdz besteht aus dreizehn PDZ-Domänen, welche nach drei prototypischen Proteinen, dem „Postsynaptic density protein“ (PSD-), dem „Drosophila discs-large septate junction protein“ (DLG), und dem epithelialen Tight-junction Protein „Zona occludens“ (ZO-1) benannt wurden. PDZ Domänen Proteine wie z.B. *Homer* oder *Mpdz* dienen als sogenannte Gerüst-Proteine („scaffolding proteins“), welche z.B. supramolekulare Komplexe aus präsynaptischen Proteinen, Ionen-Kanälen und postsynaptischen Proteinen in Zellen in bestimmten Positionen binden können und hierdurch die Signaltransduktion spezifischer und effizienter machen können (Sheng und Sala, 2001). Unsere Befunde unterstützten daher die Hypothese, dass *Mpdz* über Veränderungen dieser Prozesse die Alkoholentzugsschwere beeinflusst.

Zur Validierung von *Mpdz* als einem Kandidatengen der Alkoholabhängigkeit wurden die kodierenden Bereiche von *Mpdz* in 15 Standardinzuchtstämmen sequenziert. Die Haplotyp-Analyse der 15 Inzuchtmausstämme zeigte 6 *Mpdz* Haplotypen, die 3 verschiedene Protein Varianten (MpdzI bis MpdzIII) kodieren (Abb. 5 aus Publikation 1).

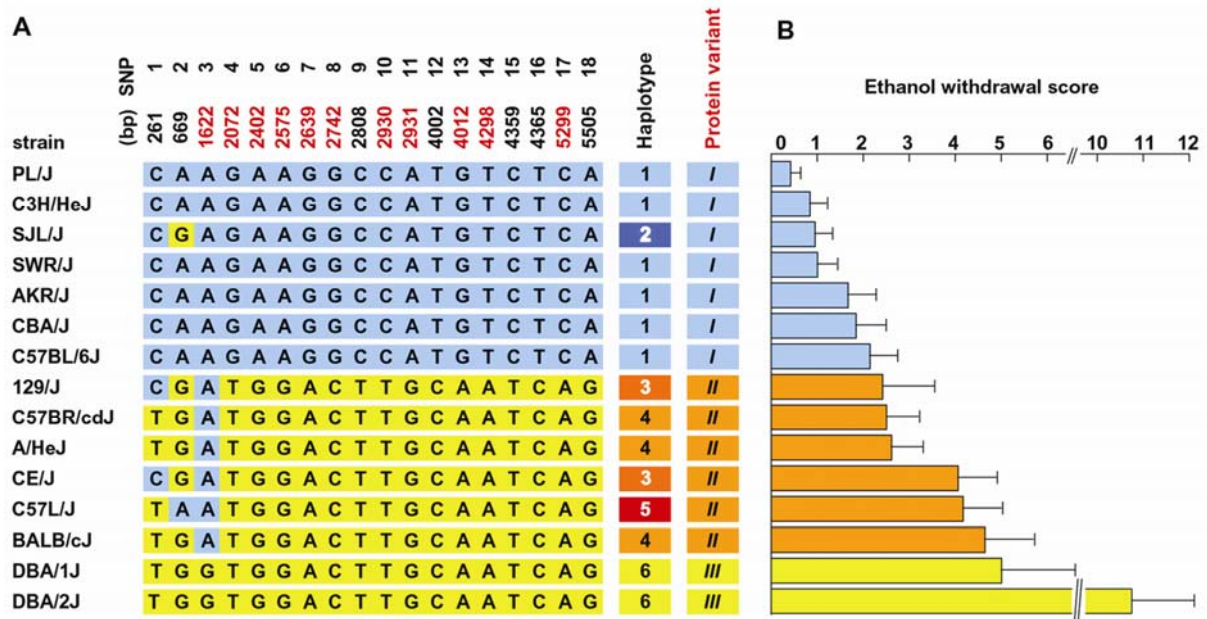


Abb. 5. Alkoholentzugsschwere in 15 Standardinzuchtstämmen. Auf der linken Seite sind die molekularen, haplotypischen und Proteinvarianten des *Mpdz* Genes, auf der rechten Seite die korrespondierende Alkoholentzugsschwere angegeben. Mausstämmen, welche ein B6 -artiges *Mpdz* Protein (Variante I) kodieren, zeigen statistisch signifikant geringeren Alkoholentzug und Pentobarbituratentzug als Tierstämmen, die ein A/HeJ artiges oder ein D2-artiges-Protein (Variante II und III) kodieren (Alkoholentzug: $F[2,12] = 17.6$, $p = .0003$; Pentobarbituratentzug: $F[2,11] = 10.26$, $p = .003$).

Diese Versuchsergebnisse, welche ausführlich in der **Publikation A** dargestellt und diskutiert sind, belegen, dass *Mpdz*, oder ein naheliegendes, gekoppeltes Gen die Alkoholentzugsschwere beeinflussen (Fehr et al., 2002). Diese Hypothese wird durch eine weitere Versuchsserie, welche in Publikation 2 zusammenfasst ist, gestützt (**Publikation B**, Shirley et al., 2004).

4.2. Validierung des Gens für das multiple PDZ Domänen Protein *Mpdz* als ein Kandidatengen für Alkoholentzug - *Publikation B*

Zunächst wurde eine weitere ISCL entwickelt und das QTL Interval auf einen Bereich von 1.8 Mb eingegrenzt (**Abb. 6** aus Publikation 2). Mit Hilfe dreier verschiedener Genomdatenbanken wurden innerhalb des 1.8 Mb Konfidenzintervalls drei definitive Gene (*Mpdz*, *NfiB*, *NM_026821*) und 13 weitere mögliche Kandidatengene identifiziert. Es konnte hierbei lediglich die Expression von fünf cDNAs (*NM_026821*, *Mpdz*, *XM_161175*, *XM_196325*, *NfiB*,) im Gehirn der Maus nachgewiesen werden (**Abb. 6** aus Publikation 2).

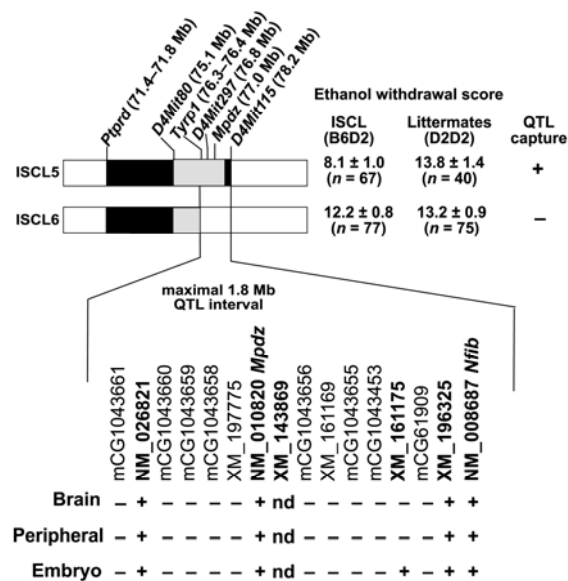


Abb. 6. Fine mapping von Alcw2. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Position des insertierten genomischen Bereichs sowie die Entzugsschwere im ISCL und den entsprechenden D2/D2 homozygoten Tieren. Der QTL konnte in ISCL5, nicht jedoch in ISCL6 gesichert werden. Im unteren Teil wurde die Expression der im QTL Interval gelegenen Gene im Gehirn, im peripheren Gewebe und im embryonalen Gewebe untersucht.

Von den fünf verschiedenen Genen innerhalb des Konfidenzintervalls konnten Sequenzunterschiede und eine differentielle Expression zwischen B6 und D2 Stamm, bzw. zwischen „congenic strain“ und D2 Stamm lediglich für *Mpdz* nachgewiesen werden (Tabelle 2 aus **Publikation B**).

Tab. 2. Expression und Sequenz der fünf verschiedenen Kandidatengene

GenBank accession	Gene name	GenBank confirmation	Confirmed coding region SNPs in B6 vs. D2 (amino acid changes)	B6/D2 expression ratio (quantitative RT-PCR mean \pm SEM)	Congenetic/background strain expression ratio (quantitative RT-PCR mean \pm SEM)	GenBank accession Human homolog
NM_026821		C	0	1.0 \pm 0.1	Nd	XM_210019
NM_010820	<i>Mpdz</i>	C	18 (10)	1.8 \pm 0.1**	1.6 \pm 0.1*	NM_003829
XM_161175		PE	0	nd	Nd	none found
XM_196325		C	0	1.0 \pm 0.1	Nd	none found
NM_008687	<i>Nfib</i>	C	0	1.0 \pm 0.1	Nd	NM_005596

Mpdz wurde im Gehirn von B6 Mäusen deutlich stärker exprimiert als im Gehirn von D2 Mäusen. Um die physiologische Bedeutung dieses Expressionsunterschiedes zu untersuchen, wurde die *Mpdz* Expression in drei weiteren Tierstämmen untersucht (Abb 7. aus Publikation B).

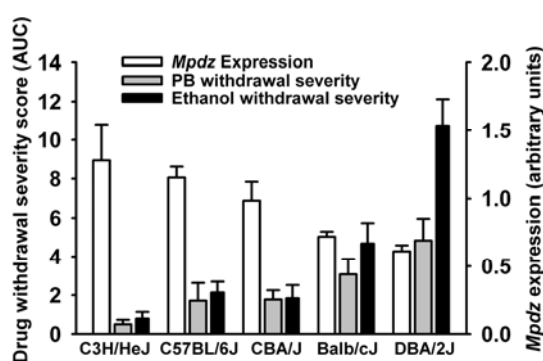


Abb. 7. *Mpdz* Expression (weiss, Units), PB Entzugsschwere (grau, AUC) und Alkoholentzugsschwere (schwarz, AUC) in 5 Standardinzuchtstämmen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. in 5 verschiedenen Standardinzuchtstämmen

Es fand sich eine inverse Korrelation zwischen *Mpdz* Expression und der Schwere des Alkohol- und des Pentobarbituratentzugs ($F_{1,3} = 9.7$ und $F_{1,3} = 28,2$, beide $p \leq 0.05$, Abb. 7 aus Publikation B).

Zusammengefasst sprechen die in Publikation A und B zusammengefassten Daten

dafür, dass Veränderungen der Funktion von *Mpdz* oder eines nahe gekoppelten Gens die Alkohol- und Pentobarbituratentzugsschwere beeinflussen. *Mpdz* stellt daher ein vielversprechendes Kandidatengen mit möglichen pleiotropen Eigenschaften dar.

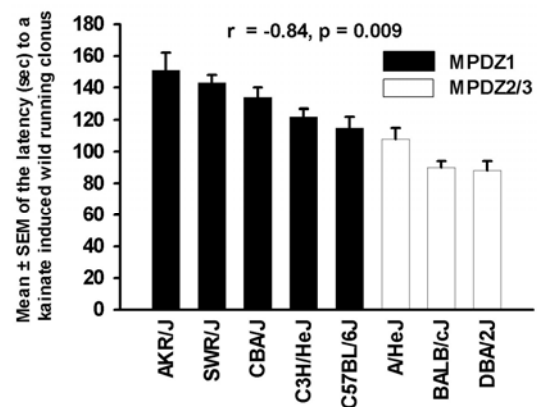
4.3. Pleiotrope Effekte von *Mpdz*: - *Publikation C*

Die Hypothese pleiotroper Effekte von *Mpdz* wurde durch Ergebnisse von drei weiteren Studien unterstützt, die signifikante QTLs für die Empfindlichkeit gegenüber audiogen induzierten Krampfanfällen (Neumann und Collins, 1991) und der Empfindlichkeit gegenüber den Chemikonvulsiva Pentylentetrazol (PTZ) und Kainat (KA) im Bereich von *Aicw2* und *Pbw2* auf Mauschromosom 4 nachgewiesen hatten (Ferraro et al., 1997; Ferraro et al., 1999). Ausgehend von diesen Befunden wurden in einer weiteren Untersuchung an einem Set von zehn verschiedenen Standardinzuchtmausstämmen Effekte des *Mpdz* Haplotyps auf den Schweregrad epileptischer Anfälle nach der Gabe neun verschiedener chemikonvulsiver Pharmaka aus fünf verschiedenen Substanzklassen untersucht: *a.* Bicucullin, Pentylentetrazol (PTZ), Picrotoxin, *Tert*-Butyl-Bicyclo-2,2,2-Phosphorothionat (TBPS), und Methyl-6,7-Dimethoxy-4-Ethyl- β -Carboline-3-Carboxylat (DMCM) aus der Klasse der GABA_A Rezeptor-aktivierten Kanalblocker;; *b.* Strychnin aus der Klasse der Glycin Kanalblocker;; *c.* 4-Aminopyridin (4-AP) aus der Klasse der Kaliumkanalblocker; *d.* 5-(2-Cyclohexyliden-Ethyl)-5-Ethyl Barbitursäure (CHEB) als konvulsiv wirksames Barbiturat; *e.* Kainat als glutamaterger Agonist (**Publikation C**, Fehr et al., 2004).

Drug	n	r	p
Picrotoxin (0.75 mg/ml)			
RB clonus	10	-0.33	.351
THE	10	-0.56	.089
DMCM (0.1 mg/dl)			
WRITHE	10	-0.69	.027
TBPS (0.01 mg/ml)			
Myoclonus	9	-0.34	.375
WRITHE	9	-0.38	.107
Bicuculline (0.06 mg/ml)			
Myoclonus	9	-0.58	.107
WRITHE	9	-0.70	.037
RB clonus	9	-0.36	.343
THE	9	-0.37	.334
Strychnine (0.05 mg/ml)			
RB clonus	9	-0.45	.219
THE	9	-0.38	.313
Pentylentetrazole (4 mg/ml)			
Myoclonus	10	-0.71	.023
WRITHE	10	-0.72	.018
4-Aminopyridine (2 mg/ml)			
RB clonus	9	-0.72	.028
THE	9	-0.07	.851
CHEB (0.25 mg/ml)			
Myoclonus	9	-0.53	.145
RB clonus	9	-0.56	.120
THE	9	-0.53	.143
Kainic acid (5 mg/ml)			
WR clonus	8	-0.84	.009
THE	8	-0.83	.011

Abb. 8. (links) Genetische Korrelation zwischen *Mpdz* Protein Status und der Latenz zur Entwicklung von epileptischen Anfällen in 8-10 verschiedenen Standardinzuchtstämmen (SIs). Pro SIs wurden jeweils 8-10 Tiere untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse der Pearson Korrelationen (n., r, p) zwischen den SI-Mittelwerten und dem MPDZ Protein Status.

Abb. 9 (unten). Mittlere Latenz (\pm S.E.M.) zur Entwicklung Kainat induzierter Krampfanfälle in 8 verschiedenen SIs.



Signifikante Effekte von MPDZ-Protein Varianten auf die Krampfanfallsempfindlichkeit (gemessen an der Latenz zur Entwicklung eines epileptischen Anfalls) konnten in insgesamt 7 von 18 untersuchten Krampfanfallsphänotypen nachgewiesen werden (Abb. 8 aus Publikation C). Die stärksten Korrelationen konnten für Kainat induzierte Krampfanfallsphänotypen nachgewiesen werden (Abb. 9 aus Publikation C). Daneben beeinflussten MPDZ Proteinvarianten v.a. die Sensitivität gegenüber PTZ, Bicucullin und DMCM, also solche chemikonvulsiven Pharmaka, welche die Funktionalität der GABA-ergen Systems beeinflussen. Im Gegensatz hierzu korrelierte der MPDZ Status nicht mit dem Schweregrad oder der Latenz zur Entwicklung Strychnin induzierter

epileptischer Anfälle, einem Pharmakon, welches ein Antagonist an Glycin Rezeptoren ist. Zusammenfassend sprachen die Versuchsergebnisse aus **Publikation C** dafür, dass v.a. GABA- oder glutamaterge Rezeptoren in ihrer Funktion durch Varianten im Mpdz Protein beeinflusst werden könnten.

Diese Befunde boten den Ausgangspunkt für eine umfangreiche Datenbankanalyse, in welcher systematisch Proteine aus dem Bereich der GABA-ergen oder glutamatergen Neurotransmission auf das Vorhandensein von C-terminalen PDZ Bindungsmotiven (X-S/T-X-Φ -Motiv) untersucht wurden. Tabelle 3 aus **Publikation C** zeigt, dass eine Vielzahl GABA-erger und glutamaterger Rezeptorproteine, wie z.B. AMPA1 Rezeptoren, Kainat-Rezeptor 2, metabotrope Glutamatrezeptoren, oder verschiedene Untereinheiten des GABAA und GABAB Rezeptors über PDZ Bindungsmotive verfügen.

MPDZ selber verfügt über 13 PDZ Domänen, so dass eine Vielzahl von Interaktionen u.a. mit glutamatergen und GABA-ergen Rezeptoren möglich erscheint. Nachgewiesen ist bisher eine Bindung von 5-HT_{2c} Rezeptoren (Becamel et al., 2001; Ullmer et al., 1998), GABAB Rezeptoren (Balasubramanian et al., 2007; Milligan und White, 2001), eine Interaktion mit weiteren Molekülen ist jedoch wahrscheinlich. Molekular- und verhaltenspharmakologische Daten lassen den GABAB Rezeptor als einen besonders interessanten Bindungspartner des Mpdz-Proteins erscheinen. Präsynaptische GABAB - Autorezeptoren sind auf GABA-ergen (Isaacson und Vitten, 2003), glutamatergen (Lei und McBain, 2003; Yamada et al., 1999) und dopaminergen Neuronen (Kalivas et al., 1990) nachgewiesen. Die Gabe des GABA_B Agonisten Baclofen veränderte u.a. die Schwere des Alkoholentzugs in einer humanen Pilotstudie (Addolorato et al., 2002; Addolorato et al., 2006) oder auch die Alkoholpräferenz im Tiermodell (Colombo et al., 2003; Walker und Koob, 2007). Eine Veränderung der Interaktion von MPDZ mit GABA_B Rezeptoren könnte daher

sowohl die Funktion GABA-erger als auch glutamaterger Neurone verändern und damit einen Einfluss auf die Alkoholentzugsschwere nehmen.

Tab. 3. PDZ Bindungsmotive in einer Reihe glutamaterger oder GABA-erger Proteine

Gene	Description of Protein Product	C-terminal amino acids				Interaction with PDZ-containing protein	Accession # ^a
		P ₃	P ₂	P ₁	P ₀ -COOH		
Class I motif		X - S/T - X - Φ^b					
<i>Gria1</i>	GluR1 – glutamate receptor, AMPA 1	A	T	G	L	SAP97 ^c	GI:6680087
<i>Grik2</i>	GluR6 – glutamate receptor, kainate 2	E	T	M	A	SAP90/PSD-95 ^d	GI:11386137
<i>Gabra4</i>	GABA _A receptor subunit alpha 4	E	S	L	M		GI:20831355
<i>Gabbr2/Gpr51</i>	GABA _B receptor subunit 2	V	S	G	L	MPDZ ^e	ENSMUSP00000044679 ^f
<i>Slc1a2/GLT1b</i>	Glutamate transporter 2 variant	E	T	C	I		GI:2668402
<i>Slc1a1</i>	Glutamate transporter 3	T	S	Q	F		GI:6678001
<i>Slc1a6</i>	Glutamate transporter 4	E	S	V	M		GI:6678003
<i>Slc1a3</i>	Glutamate transporter 1	E	T	K	M		GI:2423354
<i>Gabt1/Slc6A12</i>	Na ²⁺ and Cl ⁻ -dependent GABA transporter 2	E	T	H	L	Lin-7 ^g	GI:400627
<i>Gabt2/Slc6A13</i>	Na ²⁺ and Cl ⁻ -dependent GABA transporter 3	E	S	N	C		GI:400623
<i>Gabt3/Slc6A11</i>	Na ²⁺ and Cl ⁻ -dependent GABA transporter 4	E	T	H	F		GI:400625
<i>Grm1a/mGlu1a</i>	metabotropic glutamate receptor 1a	S	S	T	L		GI:14702189 GI:28546071 ^f
<i>Grm2/mGlu2</i>	metabotropic glutamate receptor 2	T	S	S	L		ENSMUSP00000023959
<i>Grm3/mGlu3</i>	metabotropic glutamate receptor 3	T	S	S	L		GI:6288800
<i>Grm5/mGlu5</i>	metabotropic glutamate receptor 5	S	S	S	L		GI:26346991 ^f
Class II motif		X - Φ - X - Φ					
<i>Gria2</i>	GluR2 – glutamate receptor, AMPA1	S	V	K	I	GRIP1, GRIP2, PICK1	GI:7305115
<i>Gria3</i>	GluR3 – glutamate receptor, AMPA3	S	V	K	I	GRIP1, GRIP2, PICK1	GI:8393313
<i>Grik3</i>	GluR7 – glutamate receptor kainite 3	P	V	F	P		GI:9623184 ^f
<i>Gabra2</i>	GABA _A receptor, subunit alpha 2	G	V	S	P		GI:6679901
<i>Gabrg1</i>	GABA _A receptor, subunit gamma 1	Y	L	Y	L		GI:22094103
<i>Gabrg2</i>	GABA _A receptor, subunit gamma 2	Y	L	Y	L		GI:21619326
<i>Gabrg3</i>	GABA _A receptor, subunit gamma 3	Y	L	Y	L		GI:6679917
<i>Gabrd</i>	GABA _A receptor, subunit delta	A	Y	T	M		GI:6679913
<i>Gabre</i>	GABA _A receptor, subunit epsilon	C	L	N	L		GI:8393396
<i>Gabrp</i>	GABA _A receptor, subunit pi	Y	M	Y	F		GI:22122485
<i>Gabt1/Slc6A1</i>	Na ²⁺ and Cl ⁻ -dependent GABA transporter 1	E	A	Y	I		GI:400622
<i>GABARAP</i>	GABA _A receptor associated protein	V	Y	G	L		GI:9789961
<i>Grm1b/mGlu1b</i>	metabotropic glutamate receptor 1b	A	V	Q	L		ENSMUSP00000037255 ^{fh}
<i>Grm7a/mGlu7a</i>	metabotropic glutamate receptor 7a	N	L	V	I	PICK-1 ⁱ	ENSMUSP00000042005 ^f

^a Amino acid sequence can be retrieved from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Ensembl (<http://www.ensembl.org/>).

^b X refers to any amino acid, Φ refers to a hydrophobic amino acid, usually V, L or I (Harris & Lim, 2001)

^c Leonard et al., 1998

^d Garcia et al., 1998

^e Milligan & White 2001, unpublished results

^f The amino acid sequence does not represent the entire coding region and only includes the amino acids at the C-terminus end of the protein.

^g Perego et al., 1999

^h Zhu et al., 1999

ⁱ Perroy et al., 2002, Boudin et al., 2000

4.4. Evaluation der Gene *Gad1* und *Gad2* als weitere Kandidatengene für Alkoholentzugsempfindlichkeit und -präferenz auf Mauschromosom 2: - Publikation D

Ergänzend zu den Arbeiten zur Identifikation des QTLs auf Mauschromosom 4 wurden in weiteren Arbeiten mehrere interessante Kandidatengene der Alkoholpräferenz und des Alkoholentzugs untersucht. Untersuchungen von Kandidatengenen haben eine hohe Relevanz, da aufgrund der hohen Kosten nicht jeder QTL mit Hilfe einer „Fine mapping“ Strategie untersucht werden kann. Im Fokus der Untersuchungen stand hierbei ein proximaler Bereich des Mauschromosoms 2, in dem sich ein mehrfach nachgewiesener QTL für Alkoholpräferenz (Belknap und Atkins, 2001; Phillips et al., 1998), sowie zwei potentielle QTLs für Alkoholentzug (Buck et al., 1997), ein potentieller QTL der konditionierten Geschmacksaversion gegenüber Alkohol [„Conditioned Taste Aversion (CTA)“] (Risinger und Cunningham, 1998) und ein QTL für Alkohol-induzierte Hypothermie (Crabbe et al., 1994b) befindet.

In einem ersten Untersuchungsschritt wurden innerhalb des Bereichs von Chromosom 2 die beiden Gene der Schrittmacherenzyme der Gamma-Aminobuttersäure (GABA) Synthese, *Glutamic-acid-decarboxylase* 1 und 2 (*Gad-1* und *Gad-2*) untersucht. Diese beiden Gene erschienen für eine initiale Kandidatengenuntersuchung besonders interessant, da die akute und chronische Gabe von Alkohol die Aktivität des GABA-ergen Systems verändert (Grobin et al., 1998; Krystal et al., 2006; Mihic, 1999). *Gad1* und *Gad2* enkodieren die 67kD und die 65kD Protein-Isoformen des GAD-Proteins. Obwohl beide Enzyme GAD1 und GAD2 in ihren katalytischen Domänen nur geringe Unterschiede aufweisen, unterscheiden sich die beiden Gene in ihrer regionalen Expression (Feldblum et al.,

1995), ihrer konstitutionellen Aktivität, der Interaktion mit dem Kofaktor Pyridoxalphosphat und der subzellulären Lokalisation (Soghomonian und Martin, 1998). Beide Isoformen des Enzyms setzen GABA in unterschiedlichen Kompartimenten frei; *Gad1* (GAD67) ist an der zytosolischen GABA Synthese, während *Gad2* (GAD65) an der synaptosomalen GABA Synthese beteiligt ist (Soghomonian und Martin, 1998).

Neben der Lokalisation der beiden *Gad* Gene im Bereich der verschiedenen QTLs von Mauschromosom 2 sprach auch der vorbeschriebene 30%-ige Gesamthirn-GAD-Aktivitätsunterschied zwischen dem B6 und dem D2 Mausstamm für die Auswahl von *Gad1* und *Gad2* als Kandidatengen der Alkoholpräferenz und des Alkoholentzugs (Buck et al., 1997). In den in **Publikation D** zusammengefassten Arbeiten wurden daher die *Gad1* und *Gad2* Gene auf cDNA Sequenzunterschiede und Proteinexpressionsunterschiede im Cortex, Hippocampus und Cerebellum von B6 und D2 Stämmen untersucht (Fehr et al., 2003).

Die *Gad1* Sequenz war in den B6 und den D2 Stämmen identisch, innerhalb von *Gad2* fand sich ein stiller Polymorphismus an Position 1017 mit einem C-Allel im Fall des B6 Stammes und einem T-Allel im Fall des D2 Stammes (Abb. nicht gezeigt). Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers und nicht-radioaktivem Western Blotting Techniken wurde die GAD65 and GAD67 Protein Expression im Hippokampus und Cortex von Ethanol-naiven und Ethanol behandelten B6 und D2 Mäusen untersucht (Abb. 10 aus **Publikation D**).

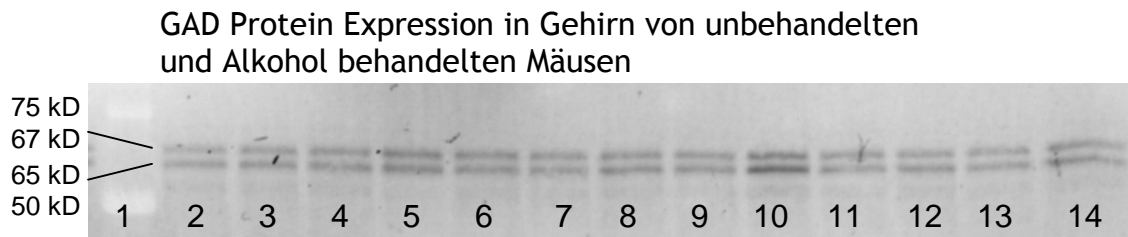


Abb. 10. Western Blot Analyse der GAD65 und GAD67 Protein Expression mit Hilfe eines polyklonalen Anti-GAD Antikörpers. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines typischen Western Blots verschiedener hippocampaler Proteinproben. Spur 1 enthielt einen kolorierten Proteinstandard, Spur 2-14 enthielt 10 µg der verschiedenen hippocampalen Proteinproben. The Behandlungsbedingungen waren: Spuren 2-4: Ethanol entzogene D2 Tiere; Spuren 5-8: Alkohol entzogene Tiere des B6 Stammes; Spuren 9-11: Alkohol naïve Tiere des D2 Stamms; Spuren 12-14: Alkohol naïve Tiere des B6 Stammes.

Die GAD67 Protein Expression war im Cortex zweimal so stark wie in den entsprechenden hippocampalen Regionen ($T = 5.2$, $df. = 8$, $P = .0004$). Die quantitative Analyse der Western-Blots ergab weder Hinweise auf stammspezifische Unterschiede in der GAD67 Expression, noch einen Effekt von Alkohol auf die Expression von GAD67 (Abb. 11 aus Publikation D).

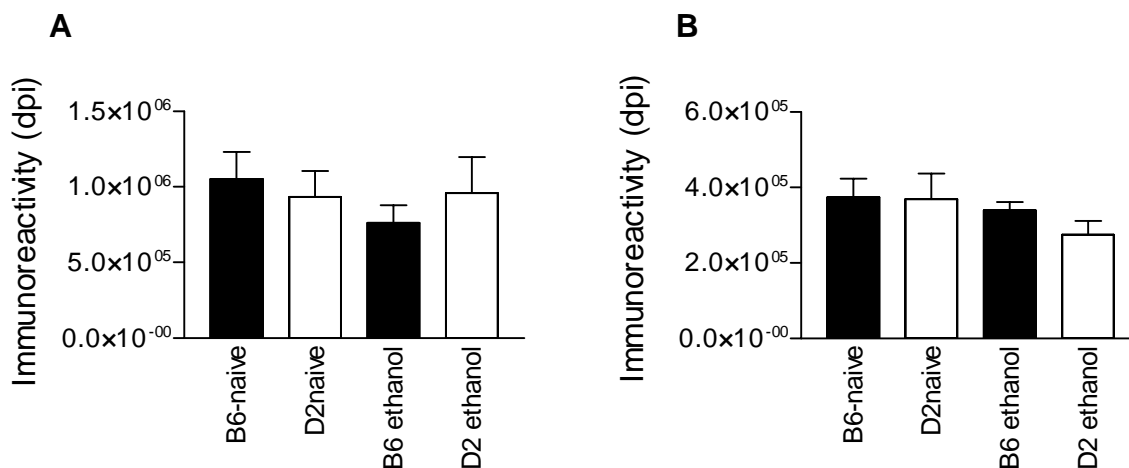


Abb. 11. GAD67 Expression in Alkohol-naiven und Alkohol-behandelten B6 und D2 Mäusen. Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm S.E.M. der GAD67 Expression (Dots per inch) in den Cortices (A) und Hippocampi (B) Alkohol-naiver und Alkohol-behandelter (4 g/kg i.p.) B6 und D2 Mäuse.

Die GAD65 Expression war im Cortex im Vergleich zum Hippokampus beider Tierstämme doppelt so hoch ($T= 4.7$, $df. = 4$, $P = .0009$). Genauso wie im Fall von GAD67, konnten wir weder einen Tierstamm-spezifischen Unterschied in der kortikalen oder hippokampalen Expression des GAD65 Proteins noch einen Tierstamm-spezifischen Alkoholeffekt auf die GAD65 Proteinexpression nachweisen (Abb. siehe Publikation D).

Zusammengefasst sprachen die in Publikation 4 zusammengefassten Untersuchungen nicht für die ursprüngliche Hypothese, dass von Sequenz- oder Expressionsvarianten in *Gad1* oder *Gad2* ein Effekt auf die Alkoholentzugsschwere oder Alkohol-Präferenz ausgeht. Insbesondere die Expressionsexperimente kontrastierten vorherige Daten, welche eine stärkere Baseline GAD Aktivität im Gehirn der B6 Mäuse im Vergleich zu D2 Mäusen nachgewiesen hatten (Buck et al., 1997).

4.5. Bestätigung des *Syntaxin Binding Protein 1* Gens (*Stxbp1*) als Kandidatengen der Alkoholpräferenz: - *Publikation E*

Ausgehend von diesem Negativbefund wurde der QTL auf Mauschromosom 2 in einer weiteren Studie auf das Vorhandensein weiterer interessanter Kandidatengene untersucht. Ein besonderer Fokus wurde auf synaptische Gene gelegt, da in anderen QTL Studien u.a. das Gen für das Synuclein alpha Protein (*Snca*) (Liang et al., 2003) und das Gen für das Syntaxin12 Protein (*Stx12*) (Treadwell et al., 2004) als Kandidatengene der Alkoholpräferenz identifiziert wurden. In **Publikation E** (Fehr et al., 2005) wurde daher das Gen für das Syntaxin Binding Protein 1 (*Stxbp1*, auch *N-sec1*) als ein mögliches Kandidatengen der Alkohol-abhängigen Phänotypen auf Mauschromosom 2 untersucht.

Stxbp1 ist ein Neuronen-spezifisches Mitglied der Sec-1/Munc18-artigen (SM) Protein Familie (Jahn und Sudhof, 1999), welches mit Syntaxin1A im Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor-Komplex interagiert (Sollner et al., 1993) und eine wichtige Rolle für die Fusion synaptischer Vesikel mit der Membran spielt (Jahn et al., 2003; Rizo und Sudhof, 2002).

Die Sequenzierung des *Stxbp1* Genes in den B6 und den D2 Mausstämmen zeigte einen non-synonymen Polymorphismus an Position 646 der *Stxbp1* cDNA, welche zu einem Aspartat (B6 Allel) oder einem Asparagin (D2 Allel) an Position 216 des Genes für das STXBP1 Protein führte. Untersuchung der Assoziation des *Stxbp1* Genotyps mit verschiedenen Alkohol abhängigen Phänotypen in den 27 rekombinanten BXD Mausinzuchtstämmen identifizierte mehrere provisorische Assoziationen mit Alkohol Präferenz, Schwere des Alkoholentzugs, der durch Alkohol konditionierten Geschmacksaversion und einer Alkohol induzierten Hypothermie (Tab. 4 aus **Publikation E**)

Tab. 4. Genetische Korrelation von *Stxbp1* mit verschiedenen Alkohol-abhängigen Phänotypen

Phenotype	Variable	Description of the phenotype	r	t	p	N	Reference
Ethanol induced loss of righting reflex	DURATION	Duration of loss of righting reflex after single injection of 4g/kg ethanol i.p.	-0.04	0.2	0.86	26	Browman et al. 2000
Ethanol induced locomotion	ETACTV	Ethanol induced locomotion after single 2 g / kg ethanol i.p.	0.36	1.7	0.10	23	Crabbe et al. 1983a
Chronic ethanol withdrawal	ETHICVAP	Area under the 25-hr curve for ethanol withdrawal following 72 hr exposure to EtOH vapor. Pyrazole injections were given daily to inhibit EtOH metabolism.	0.11	-0.6	0.58	27	Crabbe et al. 1998
Chronic ethanol withdrawal	DELAREA	Chronic EtOH withdrawal severity corrected for differences in handling-induced convulsions response to pyrazole	0.07	-0.4	0.73	27	Crabbe et al. 1998
Acute ethanol withdrawal	ETCOAUC	Handling induced convulsions after acute ethanol withdrawal (12 hs after 4 g /kg i.p.)	0.56	2.9	0.009	21	Buck et al. 1997
Acute ethanol withdrawal	ETPKWD	Peak withdrawal of acute ethanol withdrawal	0.69	4.1	0.0006	21	Buck et al. 1997
Acute ethanol withdrawal	RES_A_B	Withdrawal residuals of acute ethanol withdrawal	0.58	3.1	0.006	21	Buck et al. 1997
Ethanol induced ataxia	ETGRID2	Ataxia ratio (errors/activity counts) in the grid test after an acute 2 g/kg i.p. EtOH injection	0.14	-0.7	0.51	26	Phillips et al. 1996
Ethanol preference	PR3E	Preference ratio for 3% EtOH solution vs. Water in a two bottle choice paradigm	-0.42	-2.0	0.06	21	Phillips et al. 1994
Ethanol preference	PR10E	Preference ratio for 10% EtOH solution vs water in a two bottle choice paradigm	-0.25	-1.1	0.27	21	Phillips et al. 1994
Ethanol preference	PR10ES	Preference ratio for 10% EtOH solution in .2% saccharine versus water in a two bottle choice	-0.44	-2.1	0.05	21	Phillips et al. 1994
Ethanol consumption	AV10EG	g/kg consumption of 10% EtOH	-0.34	-1.6	0.14	21	Phillips et al. 1994
Ethanol consumption	AV10SG	g/kg consumption of 10% EtOH in 0.2% saccharin	-0.47	-2.3	0.03	21	Phillips et al. 1994
Ethanol consumption	AV3EG	g/kg consumption of 3% EtOH	-0.53	-2.7	0.01	21	Phillips et al. 1994
Ethanol consumption	AV3SG	g/kg consumption of 3% EtOH in 0.2% saccharin	-0.30	-1.4	0.19	21	Phillips et al. 1994
Saccharin preference	SACCEPRF	Preference ratio for the 0.2% saccharin solution	0.11	0.5	0.65	21	Phillips et al. 1994
Saccharin consumption	AVSACCON	Consumption of 0.2% saccharin solution (mg/kg)	-0.08	-0.4	0.73	21	Phillips et al. 1994
Ethanol induced sensitization	D11D35M	Sensitization to EtOH; day 11 minus day 3 CD group; 5 min test	0.15	0.7	0.49	23	Phillips et al. 1996
Ethanol induced sensitization	D3D25M	Sensitivity to EtOH; day 3 minus day 2; 5 min test	0.10	0.4	0.67	23	Phillips et al. 1996
Conditioned place preference	PDT60	Percent time spent on the ethanol paired floor during a 60 min test	-0.18	-0.8	0.43	22	Cunningham et al. 1995
Ethanol conditioned taste aversion	E2RES	Regression residuals of the saccharin consumption in the ethanol (2 g/kg i.p.) treated group	-0.29	-1.4	0.19	22	Risinger and Cunnigham 1998
Ethanol conditioned taste aversion	E4RES	Regression residuals of the saccharin consumption in the ethanol (4 g/kg i.p.) treated group	-0.52	-2.8	0.01	22	Risinger and Cunnigham 1998
Ethanol induced hypothermia	DTEMP	Hypothermia after acute ethanol injection (2 g/kg i.p.)	-0.43	-2.34	0.03	26	Crabbe et al. 1994

Diese mögliche Assoziation von Varianten in *Stxbp1* und Alkoholpräferenz und Alkoholentzugsschwere wurden in verschiedenen Schritten konfirmatorisch an verschiedenen Kreuzungen der B6 und der D2 Mausstämmen untersucht (Abb. 12).

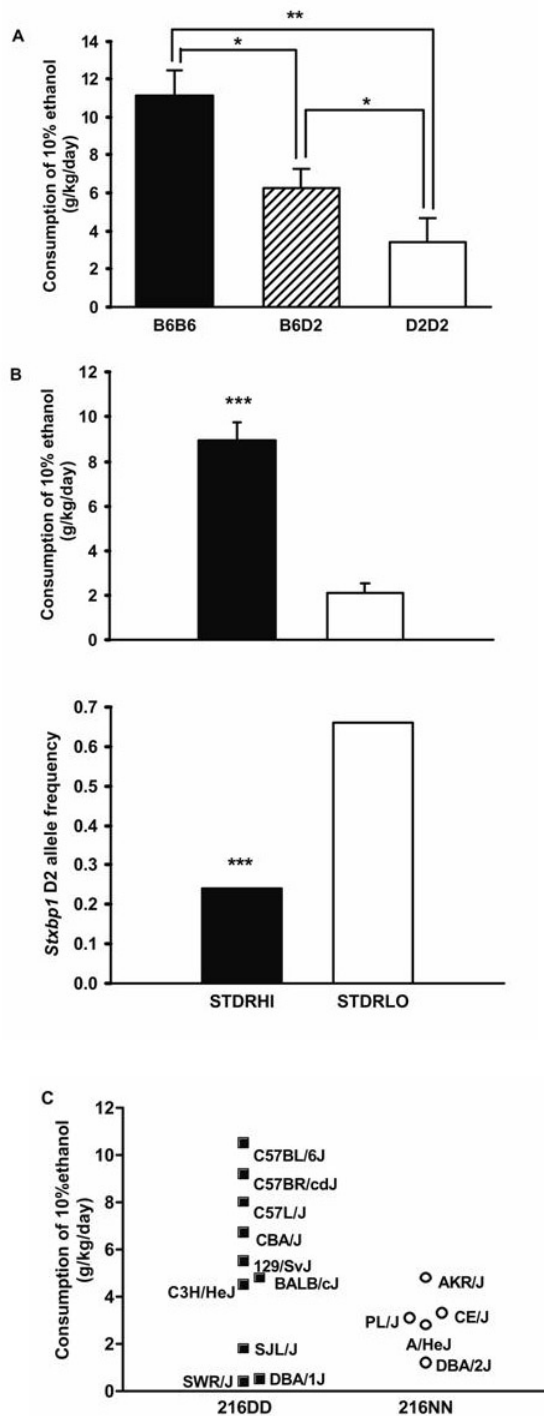


Abb. 12. Konfirmatische Analyse der Assoziation zwischen *Stxbp1* Genotyp und Alkoholpräferenz in drei Tiermodellen. **A.** *Stxbp1* Genotypeneffekt auf den Konsum einer 10% Alkohollösung in einer B6D2 F₂ Population [Mittelwert der Alkoholmenge (in g) ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's Post hoc test]. **B.** *Stxbp1* Allel Segregation in der Generation S₄ aus zwei Mauslinien, welche auf das Merkmal Alkoholpräferenz vs. Nonpräferenz gezüchtet wurden. Der obere Teil der Abb. 10B zeigt die konsumierte Alkoholmenge in den Alkoholpräferierenden (STDRHI, schwarz) und Alkohol vermeidenden Auszuchtlinien (STDRLO, weiß). Beide Stämme unterschieden sich signifikant in ihrem Alkoholkonsum ($t = 8.0$, $df = 117$, *** $p < 0.0001$). Der untere Teil der Abb. 10 B zeigt den *Stxbp1* D2 Allel-Anteil in der gleichen Gruppe der S₄ Tiere der Auszuchtlinien ($q_{\text{STDRLO}} = 0.24$, $q_{\text{STDRHI}} = 0.66$). STDRHI und STDRLO unterschieden sich signifikant in ihrem D2 Allel-Anteil (χ^2 -Quadrat= 44.3, $n = 238$, *** $p < 0.0001$). **C.** Alkoholkonsum in 15 Standardinzuchtstämmen der Maus, gruppiert nach dem *Stxbp1* Genotyp. Mausstämmen mit einem B6-artigen *Stxbp1* Genotyp (216DD) konsumierten tendenziell mehr Alkohol als Tierstämmen mit einem D2-artigen *Stxbp1* Genotyp (216NN) [Mittlerer Konsum (g/kg/day) ± SEM = 5.2 ± 1.1 und 3.0 ± 0.6 ; $p = 0.10$, Einseitiger Mann Whitney U-Test].

B6D2 F₂-Mäuse mit einem B6-artigen *Stxbp1* Genotyp konsumierten eine deutlich größere Menge Alkohol als solche Tiere, welche einen D2-artigen *Stxbp1* Genotyp aufwiesen (Abb. 12a). *Stxbp1* B6 und D2 Allele reicherten sich über vier

Generationen einer Züchtung präferentiell in Alkohol- bevorzugenden und Alkohol- vermeidenden Mauslinien an, so dass das Vorhandensein als Selektionsvorteil gewertet werden muss (Abb. 10b). Auch in einem unabhängigen Modell von 15 Standardinzuchtstämmen führte ein B6-artiger *Stxbp1* Genotyp zu höheren Alkoholmengen (Abb. 10c). Zusammenfassend erhärteten die Analysen in den drei ergänzenden Modellen die Hypothese, dass B6 Varianten in *Stxbp1* oder einem eng gekoppelten Gen zu einem erhöhten Alkoholkonsum und einer vermehrten Alkoholpräferenz beitragen.

Eine Bedeutung der *Stxbp1* Varianten auf den Schweregrad des Alkoholentzugs konnte in konfirmatorischen Analysen nicht nachgewiesen werden (Abb. nicht gezeigt; aus **Publikation E**, Fehr et al., 2005).

In einem letzten Analyseschritt wurden die möglichen Effekte der Genvarianten in *Stxbp1* oder dem verbundenen QTL auf die genomweite Genexpression untersucht. Vorteilhaft war, dass für 24 der rekombinanten BXD Inzuchtstämme die mit Microarrays gemessenen cerebralen mRNA Expressionsmuster in einer frei verfügbaren Datenbank abgelegt waren (www.webqtl.org). Die nachfolgende Tabelle zeigt, wie Varianten in *Stxbp1* oder einem eng gekoppelten Gen einen Einfluss auf die Expression verschiedener Gengruppen nehmen können (Tab.5). Aufgetragen wurden die 100 signifikantesten ($p < 0.019$, $n = 24$) gefundenen Assoziationen.

Tab. 5. Genetische Korrelationen des *Stxbp1* G646A SNP mit der Gesamthirn mRNA Expression verschiedener Microarrays

Gene name	Symbol	Chr	Mb	r	p	Proposed Function / Pathway
<u>Signal transduction</u>						
Galanin	<i>Gal</i>	19	3.2	-0.60	0.0002	neuropeptide
G protein-coupled receptor 56	<i>Gpr56</i>	8	96.3	0.42	0.01	G-protein coupled receptor
Melanocortin 3 receptor	<i>Mc3r</i>	2	172.	-0.42	0.02	G-protein coupled receptor
Retinal G protein coupled receptor	<i>Rgr</i>	14	31.5	-0.41	0.02	G-protein coupled receptor, retinal
Protein kinase anchoring protein GKAP42	<i>Gkap42</i>	13	none	-0.43	0.01	G kinase anchoring protein
GTP binding protein 2	<i>Gtpbp2</i>	17	45.6	0.51	0.002	G-protein signalling
Dedicator of cyto-kinesis 2	<i>Dock2</i>	11	34.1	-0.45	0.009	G-protein signalling, Ras pathway
Kinesin-associated protein 3	<i>Kifap3</i>	1	167.	-0.41	0.02	G-protein signalling, Ras pathway
Odorant-binding protein 1b	<i>Obp1b</i>	X	68.0	-0.46	0.007	olfactory receptor
Vomeronal 2, receptor 10	<i>V2r10</i>	14	43.2	-0.45	0.01	olfactory receptor
Granulin	<i>Grn</i>	11	102.	0.52	0.002	growth factor
Transforming growth factor beta induced, 68 kD	<i>Tgfbi</i>	13	56.4	-0.46	0.008	growth factor
Casein kinase 1, epsilon	<i>Csnk1e</i>	15	80.8	0.42	0.02	modulator of TFG-beta signalling
Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	<i>Nr1h4</i>	10	91.8	-0.46	0.007	nuclear(hormone) receptor
MMS19-like (MET18 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	<i>Mms19l</i>	19	42.0	0.42	0.02	coactivator of steroid receptors
Chloride channel calcium activated 3	<i>Clca3</i>	3	148.	-0.48	0.005	chloride channel
Vanilloid receptor-like protein 1	<i>Vr1l</i>	11	62.2	0.49	0.004	heat activated ion-channel receptor
Solute carrier family 12, member 1	<i>Slc12a1</i>	2	125.	-0.55	0.0008	sodium/potassium/chloride
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP),	<i>Abcc6</i>	4	67.8	-0.48	0.005	modulator of potassium channels
Solute carrier family 22 (organic cation	<i>Slc22a2</i>	17	124.	-0.43	0.01	organic cation transporter
RIKEN cDNA 3100002B05 gene	<i>3100002B05R</i>	11	75.6	0.42	0.02	Golgi to vacuole transport
Frequenin homolog (<i>Drosophila</i>), neuronal calcium	<i>Freq</i>	2	31.6	0.45	0.009	synaptic vesicle release
Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	<i>Ap1s2</i>	9	88.1	-0.48	0.005	receptor internalization
<u>Transcription / Translation</u>						
Cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 1	<i>Cstf1</i>	2	172.	0.46	0.008	pre-mRNA processing and signal
Far upstream element (FUSE) binding protein 1	<i>Fubp1</i>	3	156.	-0.43	0.01	transcription factor
SRY-box containing gene 18	<i>Sox18</i>	2	181.	0.44	0.01	transcription factor, SOX- family
E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)	<i>Elf4</i>	X	39.7	-0.58	0.0004	transcription factor, ets domain
Zinc finger protein 125	<i>Zfp125</i>	3	20.1	-0.45	0.01	zinc finger domain transcription
Zinc finger protein 297	<i>Zfp297</i>	17	33.6	-0.49	0.004	zinc finger domain transcription
RIKEN cDNA 2810406K24 gene	<i>2810406K24R</i>	2	153.	0.46	0.007	zinc finger domain containing
GLI-Kruppel family member HKR3	<i>Hkr3</i>	4	150.	0.48	0.005	transcription regulation
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6	<i>Eif3s6ip</i>	15	80.4	-0.54	0.001	translation initiation
Eukaryotic translation initiation factor 4A1	<i>Eif4a1</i>	11	69.2	-0.49	0.004	translation initiation
<u>Cell cycle control</u>						
Caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	<i>Casp4</i>	9	45.4	-0.48	0.005	apoptosis
Dipeptidylpeptidase 7	<i>Dpp7</i>	2	25.6	0.49	0.004	apoptosis
Micromolar calcium activated neutral protease	<i>Capn1</i>	19	6.0	-0.41	0.02	apoptosis
Tumor necrosis factor receptor superfamily,	<i>Tnfrsf6</i>	19	34.3	-0.52	0.002	apoptosis
Baculoviral IAP repeat-containing protein 3	<i>Birc3</i>	9	7.8	-0.45	0.01	apoptosis inhibitor
Protease, serine 25	<i>Prss25</i>	6	84.2	-0.47	0.006	apoptosis inhibitor
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, sigma	<i>Ptprs</i>	17	56.3	0.41	0.02	neuronal outgrowth
Semaphorin 4A	<i>Sema4a</i>	11	90.9	-0.50	0.003	neuronal outgrowth
Semaphorin 4B	<i>Sema4b</i>	7	72.6	0.41	0.02	neuronal outgrowth
Anaphase promoting complex subunit 1	<i>Anapc1</i>	2	128.	0.45	0.009	proliferation
Fibroblast growth factor (acidic) intracellular	<i>Fibp</i>	19	5.3	0.41	0.02	proliferation
Folliculin	<i>Bhd</i>	11	59.4	0.42	0.02	proliferation
SET and MYND domain containing 5	<i>Smyd5</i>	6	86.8	0.44	0.01	proliferation
<u>Cellular defense</u>						
Acidic epididymal glycoprotein 2	<i>Aeg2</i>	3	98.0	0.42	0.02	inflammatory response
Complement component receptor related protein Y	<i>Crry</i>	1	199.	-0.49	0.004	inflammatory response
C-reactive protein	<i>Crp</i>	1	176.	-0.42	0.02	inflammatory response
Interferon gamma inducible protein, 47kDa	<i>Ifi47</i>	11	48.7	0.42	0.02	inflammatory response
Interleukin 17	<i>Il17</i>	2	155.	0.45	0.01	inflammatory response
CD86 antigen	<i>Cd86</i>	16	36.3	-0.43	0.01	inflammatory response inhibitor
Defensin related cryptdin 3	<i>Defcr3</i>	8	1.5	-0.42	0.02	pathogen defense reaction
Cytotoxic T lymphocyte associated protein 2, beta	<i>Ctla2b</i>	13	60.7	-0.48	0.005	protease inhibitor
Hyaluronan synthase 2	<i>Has2</i>	15	57.9	-0.46	0.008	wound healing

<u>Cellular homeostasis</u>						
Adenylate kinase 1	<i>Ak1</i>	2	32.9	0.45	0.009	ATP synthesis
ATPase type 13A	<i>Atp13a</i>	8	70.0	0.43	0.01	cation-transporting ATPase
RIKEN cDNA 2210417J23 gene	<i>Ms4a4d</i>	19	11.4	-0.44	0.01	cell surface protein
Isocitrate dehydrogenase (NAD+), gamma subunit	<i>Idh3g</i>	X	45.3	-0.46	0.007	citrate cycle
Coenzyme A synthase	<i>Coasy</i>	11	100.	0.42	0.002	coenzyme A synthesis
Diaphorase 1 (NADH)	<i>Dia1</i>	15	84.8	0.41	0.02	cytochrome b-5 reductase
NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase	<i>Por</i>	5	134.	0.42	0.02	cytochrome P450 oxidoreductase
Keratin complex 2, basic, gene 6a	<i>Krt2-6a</i>	15	104.	-0.44	0.01	cytoskeletal protein
Keratin complex-1, acidic, gene 12	<i>Krt1-12</i>	11	99.1	-0.44	0.01	cytoskeletal protein
Myocilin	<i>Myoc</i>	1	166.	-0.52	0.002	cytoskeletal protein
SM-11044 binding protein	<i>Smbp</i>	19	41.3	-0.51	0.002	cytoskeletal protein
Stromal cell derived factor receptor 2	<i>Sdfr2</i>	3	120.	-0.43	0.01	ferric reductase
Crystallin, gamma F	<i>Crygf</i>	1	66.5	-0.48	0.005	structural component of the eye lens
<u>DNA/RNA metabolism</u>						
Histone 2, H2aa1	<i>Hist2h2aa1</i>	3	98.9	-0.53	0.002	histon protein
Mitochondrial ribosomal protein L35	<i>Mrpl35</i>	6	72.8	-0.41	0.02	mitochondrial ribosomal protein
Small nuclear ribonucleoprotein B	<i>Snrpb</i>	12	50.4	-0.43	0.01	RNA component
Uridine phosphorylase (UdRPase, UPase)	<i>Upp</i>	11	9.0	-0.51	0.002	RNA metabolism
TATA box binding protein (Tbp)-associated factor,	<i>Taf1c</i>	8	121.	0.42	0.01	RNA polymerase
Alanyl-tRNA synthetase	<i>Aars</i>	8	112.	-0.46	0.008	tRNA synthetase
Ribosomal protein S29	<i>Rps29</i>	5	133.	-0.54	0.001	undescribed
<u>Protein modificaton</u>						
Matrix metalloproteinase 8	<i>Mmp8</i>	9	7.6	-0.44	0.01	degradation of extracellular proteins
Glucosidase 1	<i>Gcs1</i>	6	84.2	0.47	0.006	glucosidase
UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6	<i>Ugt1a6</i>	1	90.1	-0.48	0.005	glucuronidation pathway
Glyceronephosphate O-acyltransferase	<i>Gnpat</i>	11	75.6	-0.49	0.004	glycerolipid metabolism
Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	<i>Plod3</i>	5	135.	0.43	0.01	modulator of glycosylation reactions
Seven in absentia 2	<i>Siah2</i>	3	60.1	0.43	0.01	ubiquitin mediated proteolysis
Ret finger protein-like 4	<i>Rfp14</i>	7	4.8	-0.45	0.008	ubiquitin-protein ligase
<u>Other</u>						
Thromboxane synthase	<i>Tbxas1</i>	6	39.2	0.44	0.01	drug metabolism
A disintegrin and metalloprotease domain 3	<i>Adam3</i>	8	23.6	-0.43	0.01	gamete interaction
RIKEN cDNA 4932416N17 gene	<i>4932416N17</i>	16	10.2	-0.47	0.006	glucose binding
Solute carrier family 10, member 2	<i>Slc10a2</i>	8	5.1	-0.47	0.007	sodium-bile acid cotransporter
Arachidonate lipoxygenase, epidermal	<i>Alox12e</i>	11	69.9	-0.52	0.002	undescribed
cDNA sequence BC005662	<i>BC005662</i>	13	71.1	0.46	0.008	undescribed
DNA segment, Chr 10, Wayne State University 52,	<i>D10Wsu52e</i>	10	88.3	-0.42	0.02	undescribed
DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 436, expressed	<i>D14Ertd436e</i>	14	39.3	-0.44	0.01	undescribed
Expressed sequence AA511254	<i>AA511254</i>	9	38.0	-0.48	0.005	undescribed
Granule cell antiserum positive 8	<i>Gcap8</i>	5	130.	-0.46	0.007	undescribed
Hypothetical protein MGC39350	<i>MGC39350</i>	X	11.2	-0.44	0.01	undescribed
LTR endogenous murine leukemia virus modified	<i>LTR</i>	7	23.0	0.41	0.02	undescribed
None	<i>AF071079</i>	5	103.	0.41	0.02	undescribed
RIKEN cDNA 1110013L07 gene	<i>1110013L07R</i>	3	91.4	0.45	0.009	undescribed
RIKEN cDNA 2510039O18 gene	<i>2510039O18</i>	4	146.	0.44	0.01	undescribed
RIKEN cDNA 2610001J05 gene	<i>2610001J05R</i>	6	13.7	-0.44	0.01	undescribed
Similar to LFB1/HNF1 promoter	<i>Mm.24900</i>	5	61.9	-0.45	0.009	undescribed
Two-cell-stage, variable group, member 1	<i>Tcstv1</i>	13	2.3	-0.42	0.02	undescribed

Von den 100 signifikantesten Genen haben 23 eine mögliche Funktion innerhalb verschiedener Signaltransduktionsmechanismen; 10 davon bei Transkriptions- oder Translationsvorgängen, 13 Proteine für die Funktion des Zell-Zyklus, 9 innerhalb der zellulären Abwehr, 13 für die zelluläre Homeostase, 7 Proteine beeinflussen den DNA/RNA Metabolismus und 7 spielen eine wichtige Rolle für Protein Modifikation. Die Funktion 14 weiterer Transkripte bleibt unklar.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der Korrelationsanalysen dafür, dass von *Stxbp1* oder einem gekoppelten Gen auf dem Genort auf Mauschromosom 2 die Expression verschiedener Signaltransduktions-Moleküle, Transkriptions-Faktoren und einer Reihe von Genen, welche für die zelluläre Funktion bedeutsam sind, beeinflusst werden. Zu den interessantesten Einzelbefunden der Genexpressionsanalyse gehörte die negative Assoziation zwischen dem *Stxbp1* D2 Genotyp und der Expression von Galanin, einem Neuropeptid, welches die Alkoholaufnahme steigern kann (Rada et al., 2004; Thiele et al., 2003). Passend zu diesem Befund fand sich eine negative Korrelation des *Stxbp1* D2 Genotyps mit der Expression der Galanin Rezeptor 1 mRNA (*Galr1*) ($r = -.41$, $p = 0.019$). Zu den weiteren, in ihrer Expression durch *Stxbp1* beeinflussten Neuropeptidgenen gehörte u.a. auch der Melanocortin Rezeptor III (*Mc3r*). Diese Befunde sprechen dafür, dass über die Effekte des QTL auf Mauschromosom 2 auch Neuropeptide einen Einfluss auf den Alkoholkonsum nehmen könnten (Navarro et al., 2003; Ploj et al., 2002). Es bleibt unklar, welche Interaktionen zwischen der Funktion von *Stxbp1* und der Funktion von Galanin oder Melacortin bestehen könnten. Interessanterweise wird das *Stxbp1* Protein z.B. auf cholinergen Neuronen zusammen mit Galanin koexprimiert (Mufson et al., 1998). Zu der zweiten Gruppe Gene, welche in ihrer Expression von Varianten in *Stxbp1* beeinflusst war, gehörten u.a. eine Reihe synaptosomaler Gene, wie z.B. *Slc12a1*, einem Natrium/Kalium/Chlorid Transporter, *Vr11*, ein Gen, welches ein Vanilloid Rezeptor -like Protein 1 kodiert und potentiell an der Alkohol abhängigen zentralen Temperatur Regulation beteiligt ist, sowie der neuronale Calcium Sensor Frequenin (*Freq*). Interessanterweise ist dieser lediglich 1 Mb proximal von *Stxbp1* lokalisiert und an der Freisetzung synaptischer Vesikel beteiligt (Pan et al., 2002). Expressionsunterschiede in Frequenin und anderen beteiligten synaptosomalen

Genen könnten daher einen Teil des beobachteten Alkoholpräferenz-QTL Effekts im proximalen Bereich von Chromosom 2 erklären. Diese Befunde unterstützen auch die Befunde humaner Studien, welche einen Effekt des chronischen Alkoholkonsums auf die Expression synaptosomaler Genen nachgewiesen haben (Lewohl et al., 2000)

4.6. Das Gen der alpha2 Untereinheit des GABAA-Rezeptors (*GABRA2*) als

Kandidatengen verschiedener Subtypen der Alkoholabhängigkeit: - *Publikation F*

Korrespondierend zu den tierexperimentellen Arbeiten wurde in weiteren Arbeiten versucht, Kandidatengene für die Alkoholabhängigkeit am menschlichen Modell zu identifizieren (Fehr et al., 2000a; Fehr et al., 2001; Fehr et al., 2000b). Im Rahmen der kumulativen Habilitation wird exemplarisch eine Arbeit vorgestellt, die sich mit einem der bisher meisten replizierten Kandidatengene der Alkoholabhängigkeit, dem Gen für die alpha 2 Untereinheit des GABAA-Rezeptors *GABRA2* beschäftigt (**Publikation F**).

GABRA2 wurde ausgehend von den Befunden von zwei großen Genom-weiten-Linkage Untersuchungen ausgewählt, in welchen eine Kopplung des Phänotyps der Alkoholabhängigkeit zu einem Genort auf dem menschlichen Chromosom 4 nachgewiesen worden war (Long et al., 1998; Reich et al., 1998). In diesem chromosomalen Bereich befand sich eine Reihe interessanter Kandidatengene, wie u.a. das Alkohol abbauende Enzym *ALDH2*, sowie ein Cluster aus GABAA Rezeptor Genen, u.a. *GABRB1*, *GABRA2*, *GABRA4*, *GABRB2*. Aufgrund weiterer positiver Ergebnisse von Assoziationsuntersuchungen im Bereich des *GABRB1*-Lokus (Parsian und Zhang, 1999; Song et al., 2003) wurde von der “Collaborative Study Group on the Genetics of Alcoholism (COGA)” ein hochauflösendes Mapping des *GABRB1*

Lokus angestrebt (Edenberg et al., 2004). Einunddreißig SNPs innerhalb von *GABRA2*, dem Gen für die Alpha-2 Untereinheit des GABA_A Rezeptors, aber nur ein SNP innerhalb der anderen Gene des *GABRB1* Lokus zeigte eine signifikante Assoziation mit der Diagnose der Alkoholabhängigkeit (Edenberg et al., 2004). Ein Haplotyp, welcher einen Bereich von Intron 3 zum 3' Ende des *GABRA2* Genes umfasste, zeigte eine hoch signifikante Assoziation mit der Diagnose einer Alkoholabhängigkeit ($p = 0.000000022$) (Edenberg et al., 2004). Interessanterweise enthielt der Hochrisiko-Haplotyp keine non-synonymen SNPs, so dass angenommen werden muss, dass von dem Hochrisiko Haplotyp keine Effekte auf die Proteinsequenz, sondern auf die *GABRA2* mRNA Expression ausgehen. Der initial positive Befund konnte in zwei unabhängigen Untersuchungen mit alkoholabhängigen Patienten europäischer Abstammung bestätigt werden (Covault et al., 2004; Lappalainen et al., 2005).

In den in **Publikation F** zusammengefassten Arbeiten wurde versucht, die mögliche Assoziation genetischer Varianten innerhalb von *GABRA2* auf die Ausprägung unterschiedlicher Subtypen einer Alkoholabhängigkeit an einer deutschen Bevölkerungsstichprobe zu untersuchen.

Unsere Hypothese hierbei war, dass mögliche Effekte eines Kandidatengenes v.a. in der Untergruppe von Patienten mit einem frühen Krankheitsbeginn ("early onset"), bei positiver Familienanamnese („positive family history“) und bei Auftreten von Komplikationen nachweisbar sein sollte (Babor et al., 1992; Cloninger et al., 1981; Johnson et al., 1996).

Insgesamt wurden 6 SNPs innerhalb des *GABRA2* Genes an 256 alkoholabhängigen Patienten und 88 Kontrollprobanden genotypisiert (Fehr et al., 2006). Fünf der sechs SNPs befanden sich innerhalb der Region, welche in den

vergangenen Untersuchungen mit der Diagnose einer Alkoholabhängigkeit assoziiert gewesen war.

Ein Vergleich der Genotypen zeigte eine signifikante Assoziation von Genotypen innerhalb von *GABRA2* mit der Diagnose einer Alkoholabhängigkeit für die untersuchten Marker B, D, und E (χ^2 : 5,8 - 7,4, $p = 0,02 - 0,05$, Tab. 6 aus **Publikation F**) und einen Trend für eine signifikante Assoziation für die Marker A und C (χ^2 : 5,6 - 5,7, $p = 0,06$, Tab.6). Zusätzliche allelische Vergleiche unterstützten die Hypothese einer Assoziation von Markern innerhalb von *GABRA2* mit der Diagnose einer Alkoholabhängigkeit. Die weniger häufigen Allele der fünf Marker A-E (rs567926, rs279871, rs279858, rs279845, rs279836), welche sich zwischen Intron 3 und dem 3'Ende von *GABRA2* befanden, zeigten eine Assoziation mit der Diagnose der Alkoholabhängigkeit (Tab. 6, χ^2 : 5.27 - 6.12, p -Werte= 0.0098 - 0.02). Die Häufigkeit der selteneren Allele der SNPs A-E überstieg innerhalb der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten die Häufigkeit der selteneren Allele der SNPs A-E in der Gruppe der Kontrollprobanden um 10 - 12 % (Tab. 6). Die Untersuchung des Kopplungsgleichgewichts [„Linkage disequilibrium (LD)“] zeigte eine große Übereinstimmung zwischen den Allelen der Marker A-E innerhalb von *GABRA2* (D' : 0,83 bis 1,0) und legte das Vorhandensein eines 97,3 kD großen Haplotypblocks innerhalb *GABRA2* zwischen den SNPs A und E nahe. Eine Haplotypanalyse der SNPs A-E ergab zwei häufige Haplotypen, T-T-A-A-A und C-C-G-T-T, welche zusammen 91,7% aller vorhandenen chromosomalen Kombinationen darstellten. Es bestand eine hochsignifikante Differenz in der Haplotypverteilung zwischen den alkoholabhängigen Patienten und den gesunden Kontrollen (Tab. 7 aus Publikation 6). Der seltenere C-C-G-T-T Haplotyp trat lediglich bei 29 % der Kontrollprobanden, jedoch bei 45% der alkoholabhängigen Patienten auf ($\chi^2 = 11,2$, $df = 1$, $p = 0.0008$, Tab.7).

Tab. 6. Genotypische und allelische Assoziationen von Polymorphismen in *GABRA2* mit der Diagnose einer Alkoholabhängigkeit

SNP	<u>Alcohol Dependent</u>					<u>Controls</u>					Genotypic		Allelic	
	Genotype count (frequency)			Allele count (frequency)		Genotype count (frequency)			Allele count (frequency)		x ²	p	x ²	p
	11	12	22	1	2	11	12	22	1	2				
A	77 (0.30)	128 (0.51)	47 (0.19)	282 (0.56)	222 (0.44)	37 (0.41)	41 (0.47)	9 (0.10)	115 (0.66)	59 (0.34)	5.63	0.06	5.48	0.02
B	78 (0.31)	125 (0.49)	50 (0.20)	281 (0.56)	225 (0.44)	39 (0.45)	36 (0.41)	12 (0.14)	114 (0.66)	60 (0.34)	5.83	0.05	5.30	0.02
C	50 (0.20)	124 (0.49)	78 (0.31)	224 (0.44)	280 (0.56)	12 (0.14)	36 (0.41)	39 (0.45)	60 (0.34)	114 (0.66)	5.74	0.06	5.27	0.02
D	57 (0.23)	127 (0.50)	69 (0.27)	241 (0.48)	265 (0.52)	13 (0.14)	37(0.43)	37 (0.43)	63 (0.36)	111 (0.64)	7.43	0.02	6.67	0.01
E	50 (0.20)	128 (0.51)	74 (0.29)	228 (0.45)	276 (0.55)	11 (0.12)	38 (0.44)	38 (0.44)	60 (0.34)	114 (0.66)	6.54	0.04	6.12	0.01
F	123 (0.49)	94 (0.38)	33 (0.13)	340 (0.68)	160 (0.32)	43 (0.49)	33 (0.38)	12 (0.13)	119 (0.68)	57 (0.32)	0.01	0.99	0.01	0.92

Tab. 7. Haplotypische Assoziationen von Polymorphismen in *GABRA2* mit der Diagnose einer Alkoholabhängigkeit

	<u>AD Patients</u>			<u>Controls</u>			x2 df	<i>p</i>
	T-T-A-T-A	T-T-A-A-A	C-C-G-T-T	T-T-A-T-A	T-T-A-A-A	C-C-G-T-T		
AD patients vs. Controls	12 (0.03)	243 (0.52)	205 (0.45)	4 (0.03)	98 (0.68)	42 (0.29)	11.2 1	0.0008
<i>Gender specific</i>								
Male AD patients vs. male controls	10 (0.03)	186 (0.52)	158 (0.45)	4 (0.04)	74 (0.68)	30 (0.28)	10.1 2	0.006
Female AD patients vs. female controls	0 (0.00)	57 (0.56)	45 (0.44)	0 (0.00)	24 (0.67)	12 (0.33)	1.3 2	0.25
<i>Subtype specific comparisons</i>								
AD patients with ASPD vs. controls	3 (0.06)	24 (0.50)	21 (0.44)	4 (0.03)	98 (0.68)	42 (0.29)	<u>5.2 2</u>	<u>0.07</u>
AD patients with DT vs. controls	3 (0.03)	48 (0.51)	43 (0.46)	4 (0.03)	98 (0.68)	42 (0.29)	7.0 2	0.03
AD patients with WS vs. controls	0 (0.00)	53 (0.52)	49 (0.48)	0 (0.00)	96 (0.71)	40 (0.29)	8.6 1	0.003
Family positive AD patients vs. controls	6 (0.04)	86 (0.48)	86 (0.48)	4 (0.03)	98 (0.68)	42 (0.29)	13.0 2	0.002
Family negative AD patients vs. controls	0 (0.00)	154 (0.57)	116 (0.43)	0 (0.00)	96 (0.71)	40 (0.29)	7.2 2	0.007
Early onset AD patients vs. controls	5 (0.06)	36 (0.46)	37 (0.48)	4 (0.03)	98 (0.68)	42 (0.29)	10.3 2	0.006
Late onset AD patients vs. controls	0 (0.00)	83 (0.57)	63 (0.43)	0 (0.00)	96 (0.71)	40 (0.29)	5.8 1	0.02

Die Effektstärke der beobachteten Haplotypdifferenz entsprach einer Odds Ratio (OR) von 1,97 (95% Konfidenz Intervall: 1,30 - 2,96), d.h. das Vorhandensein des C-C-G-T-T Risikohaplotyps steigerte die Wahrscheinlichkeit, alkoholabhängig zu werden um etwa 100%.

Die Subgruppenanalyse zeigte signifikante Assoziationen für nahezu alle untersuchten Subgruppen, bis auf die kleine Gruppe der weiblichen Patientinnen und die Gruppe der alkoholabhängigen Patienten mit einer antisozialen Persönlichkeitsstörung. Die Berechnung Odds Ratios (ORs) bestätigte die größere Effektstärke des *GABRA2* Risikohaplotypes in den Gruppen der alkoholabhängigen Patienten mit zu mindestens einem aufgetretenen Alkoholentzugskrampfanfall (OR: 2,22), einer positiven Familiengeschichte (OR: 2.60) oder einem frühen Beginn der Abhängigkeitserkrankung (OR: 2,19, siehe auch Tab. 7).

Zusammenfassend bestätigten die positiven Befunde in den Untergruppen von Patienten mit angenommener hoher genetischer Belastung *GABRA2* als ein wichtiges Kandidatengen der Alkoholabhängigkeit.

4.7. Manipulation der neuronalen Aktivität des Rewardsystems durch den selektiven GABA-Transporter 1 Inhibitor Tiagabin: - *Publikation G*

Unsere oben dargestellten tierexperimentellen Befunde unterstützten die Hypothese, dass Varianten u.a. in synaptischen Genen wie *Mpdz* und *Stxbp1* die Alkoholentzugsschwere und die Alkoholpräferenz beeinflussen. Sie wurden ergänzt um humangenetische Assoziationsuntersuchungen, in welchen *GABRA2* als ein Risikogen der Alkoholabhängigkeit identifiziert wurde (Covault et al., 2004; Edenberg et al., 2004; Fehr et al., 2006; Lappalainen et al., 2005). Erste

Pilotuntersuchungen sprachen darüber hinaus dafür, dass die beobachteten Risikohaplotypen von *GABRA2* die Alkoholsensitivität verändern (Pierucci-Lagha et al., 2005).

In der in **Publikation G** vorgestellten Studie wurde deshalb die Alkoholvermittelte Aktivierung des zerebralen Belohnungssystems („reward-system“) und eine GABA-erge Interventionsstrategie zur Veränderung der neuronalen Alkoholwirkung mittels [¹⁸F]-Fluoro-desoxyglucose (FDG) Positronenemissionstomographie (PET) untersucht.

Für die Wahrnehmung positiver und aversiver Alkohol- und Drogenwirkungen spielt die Aktivierung des Belohnungssystems („Reward System“) eine entscheidende Rolle. Zu den Hauptteilen des Rewardsystems gehören mesolimbische und mesokortikale dopaminerge Neurone, welche von der ventralen tegmental Region (VTA) in die Amygdala, den Nucleus accumbens, in das ventrale Pallidum und den präfrontalen Cortex projizieren (Berke und Hyman, 2000). Die akute Verabreichung von Alkohol und anderen Drogen führt zu einem Dopamin-Release in das ventrale Striatum, welches im Tiermodell durch die Gabe der Trinkmengen reduzierenden Substanz Naltrexon gehemmt werden kann (Gonzales und Weiss, 1998). Der Nachweis einer Hemmung der Alkohol induzierten Aktivierung des striatalen Rewardsystems erscheint konzeptionell eine sinnvolle Idee, um das Potential weiterer rückfallprophylaktischer Medikamente *in vivo* untersuchen zu können.

Die Aktivität des Rewardsystems kann am Menschen mit Hilfe der Positronen Emissions Tomographie (PET) untersucht werden. Die akute intravenöse Gabe von 40 g Ethanol führte in einer [¹⁸F]-Fluoro-Desoxyglucose (FDG) Pilotstudie zu einer Zunahme des neuronalen Metabolismus im Striatum und frontalen Cortex (Schreckenberger et al., 2004). Aus diesem Grund wurde dieses i.v. Alkohol

Challenge [¹⁸F]-FDG Paradigma dazu verwandt, die Möglichkeiten einer pharmakologischen Hemmung der Alkohol Aktivierung des Reward Systems zu untersuchen.

In der in **Publikation G** dargestellten Studie wurde der selektive GABA-Transporter 1 -Inhibitor Tiagabin zur Hemmung der Alkohol bedingten Aktivierung des Rewardsystems eingesetzt (Fehr et al., 2007). Für die Auswahl von Tiagabin sprachen neben den oben dargestellten tier- und humangenetischen Überlegungen zwei wesentliche Gründe: Zum einen spielt die präsynaptische Aktivierung GABA-erger Interneurone und GABA-erger Neurone im Globus pallidus für die inhibitorische Wirksamkeit von Naltrexon eine wichtige Rolle (Mavridis und Besson, 1999; Stanford und Cooper, 1999). Eine Aktivierung dieser GABA Neurone führt zu einer Hemmung der dopaminergen Neurone im Striatum (Mavridis und Besson, 1999; Stanford und Cooper, 1999). Zweitens führte die systemische Gabe des GABA Transaminase Inhibitors Vigabatrin sowohl in Mikrodialyse als auch PET Studien zu einer Hemmung einer Kokain-induzierten Dopamin Freisetzung im Nucleus accumbens (Schiffer et al., 2000; Schiffer et al., 2003).

Für die hier vorgestellte Untersuchung wurde aufgrund der wesentlich besseren Verträglichkeit der selektive GABA-Transporter 1 (GAT1) Inhibitor Tiagabin eingesetzt. In einer einfach blinden Untersuchung mit zwei verschiedenen Behandlungs- und Bildgebungsbedingungen wurden die neuronalen Effekte einer Tiagabin Behandlung, eines Alkohol Challenge und Alkoholwirkung nach Tiagabin-Behandlung untersucht. Zwanzig Probanden wurden in zwei verschiedene Behandlungsbedingungen randomisiert. In der ersten Behandlungsgruppe erhielten die Probanden zwei PET Scans mit 150 ± 20 MBq [¹⁸F] Fluorodeoxyglucose (18-FDG) nach einer Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9%), einmal zu Beginn der Studie und einmal nach einer Woche Tiagabin Behandlung (7.5 mg einmal

täglich für zwei Tage, 15 mg einmal täglich während der folgenden fünf Tage). Die zweite Behandlungsgruppe erhielt eine Serie von drei PET Scans mit 150 ± 20 MBq ^{18}F -FDG unter drei verschiedenen Untersuchungsbedingungen: 1. nach einer Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9%) ohne Vorbehandlung, 2. nach einer intravenösen Injektion von 40 g Alkohol ohne Vorbehandlung, 3. Nach einer Injektion von 40 g Alkohol nach einer Woche Tiagabin Behandlung (7.5 mg einmal täglich für zwei Tage, 15 mg einmal täglich während der folgenden fünf Tage). Die PET Untersuchungen wurden in einem ECAT Exact PET Scanner (Siemens/CTI, Knoxville) an der Klinik für Nuklearmedizin durchgeführt. Die PET-Daten wurden mit Hilfe der Software *Statistical Parametric Mapping* (Versionen 99 und 2), Wellcome Department of Cognitive Neurology, London ausgewertet. Details zur Auswertung der PET Daten finden sich in **Publikation G**. Die einwöchige Tiagabin-Behandlung führte zu einer signifikanten Verminderung des cerebralen Metabolismus im rechten Temporallappen und linken Teil des Cerebellums (Abb. 13a). Entsprechend der Vorbefunde führte die Ethanolinfusion im Vergleich zur Kochsalzinfusion zu einer signifikanten Zunahme des regionalen Glucose Metabolismus im bilateralen Striatum, in Teilen des mittleren frontalen Cortex und Teilen des linken anterioren cingulären Cortex (Abb. 13b). Eine Minderung des regionalen Glucoseverbrauchs konnte im bilateralen Cerebellum, im linken temporalen Cortex und Teilen des primären visuellen Cortex (bilateralen Gyrus lingualis/cuneus) beobachtet werden (Abb 13b). Konträr zu unserer Hypothese konnte die Tiagabin Vorbehandlung die Alkohol bedingte Aktivierung des Rewardsystems (bilaterales Striatum, frontaler und cingulärer Cortex) nicht hemmen (Abb. 13 c.) Die Alkoholinfusion führte unter Tiagabin Behandlung im Vergleich zur Alkoholinfusion ohne Vorbehandlung zu einem signifikanten Anstieg des regionalen cerebralen Glucose Metabolismus in einem kleinem Areal des linken cingulären Cortex und zu signifikant stärkeren

Hemmung in verschiedenen Teilen des bilateralen Cerebellums, des linken occipitalen Cortex, Teilen des rechten temporalen Cortex und des linken posterioren cingulären Cortex (Abb. 13d).

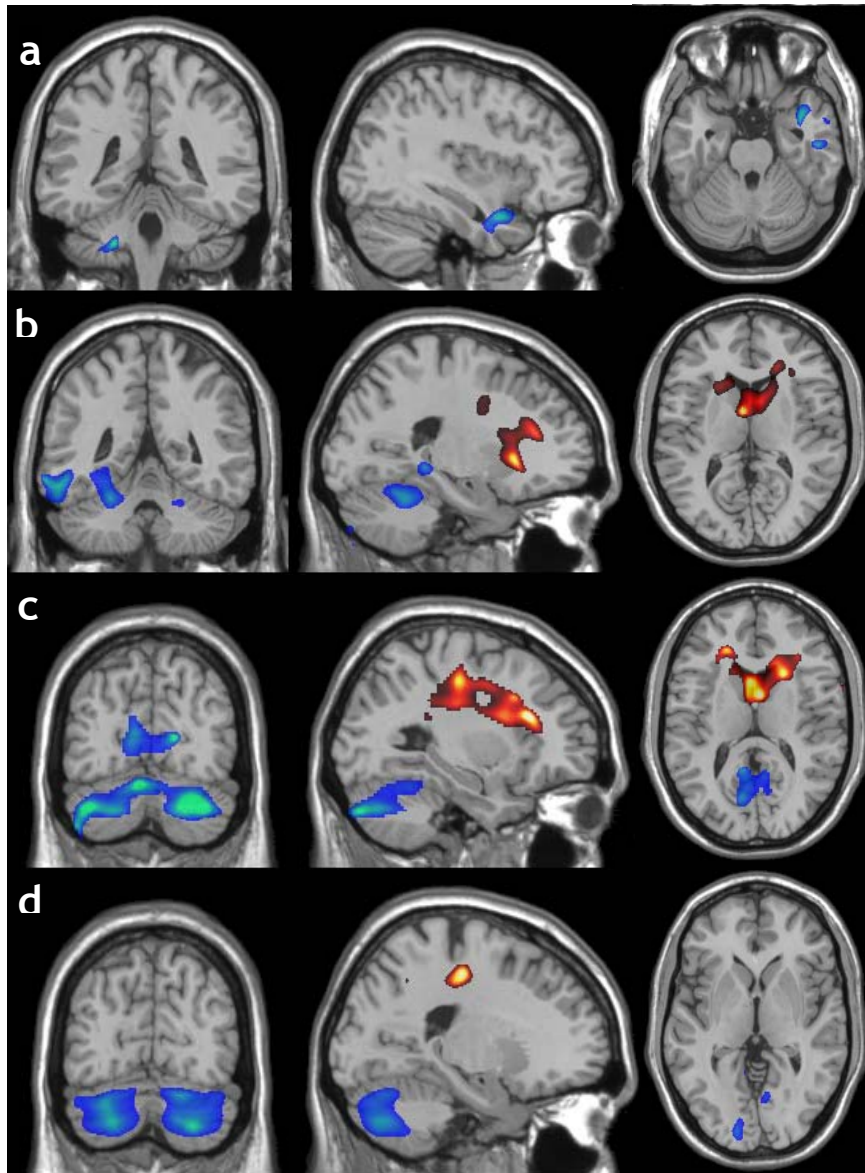


Abb. 13. Wirkung der Alkohol oder Placebo Infusionen auf den cerebralen Metabolismus mit und ohne Tiagabin Vorbehandlung. Die Teile a-d zeigen die signifikant aktivierten (in rot) oder deaktivierten (in blau) Hirnareale der folgenden Vergleiche: a, Tiagabin Behandlung versus Baseline; b, Alkohol Infusion vs. Placebo Infusion ohne Vorbehandlung; c, Alkohol Infusion nach Tiagabin-Behandlung vs. Placebo Infusion; d, Alkohol Infusion nach Tiagabin-Behandlung vs. Alkohol Infusion ohne Vorbehandlung.

Zusammengefasst konnte die subchronische Tiagabin-Gabe (15 mg einmal täglich) nicht den Alkohol induzierten Hypermetabolismus innerhalb des mesolimbischen Reward Systems hemmen.

Für das negative Ergebnis dieser Untersuchung könnten drei wesentliche Ursachen angeführt werden, welche in der Publikation ausführlich diskutiert sind. Erstens könnte die verwandte Tiagabine Dosis in unserer Studie zu gering oder das Dosisintervall zu kurz für eine suffiziente GABA-erge Suppression des Ethanol induzierten Hypermetabolismus im mesolimbischen Dopamin- System gewesen sein. Zweitens könnte Tiagabin aufgrund seiner pharmakodynamischen Eigenschaften als selektiver GAT-1 Inhibitor (Meldrum und Chapman, 1999) weniger gut wie der GABA-Transaminase Inhibitor Vigabatrin für eine breite Augmentation GABA-erger Prozesse im Rewardsystem geeignet sein. Ein inhibitorischer Effekt GABA-erger Substanzen auf die Alkohol bedingte Aktivierung im Rewardsystem ist bisher lediglich für die Substanz Vigabatrin, nicht jedoch für Tiagabin nachgewiesen worden (Dewey et al., 1999; Dewey et al., 1998; Gerasimov et al., 1999; Schiffer et al., 2003). Drittens könnte es sein, dass eine Inhibition pathologisch aktivierter glutamaterger Prozesse im präfrontalen Cortex für die Alkohol- und Drogenkonsum reduzierende Wirkung von Tiagabin bei abhängigen Patienten verantwortlich ist, welche bei den von uns untersuchten Kontrollprobanden nicht nachweisbar war (Kalivas und Volkow, 2005).

5. Ausblick der Ergebnisse

Die in der kumulativen Habilitationsarbeit zusammengefassten Arbeiten versuchen mit unterschiedlichen methodischen Vorgehensweisen genetische und neurobiologische Ursachen der Alkoholwirkung und der Alkoholabhängigkeit zu identifizieren.

Mit Hilfe einer Kombination verhaltensgenetischer und molekularbiologischer Experimente konnte mit *Mpdz* ein Kandidatengen identifiziert werden, welches in verschiedenen unabhängigen Tiermodellen die Schwere des Alkoholentzugs wesentlich beeinflusst. Die bisher bekannten funktionellen Untersuchungen sprechen dafür, dass *Mpdz* mit GABA_B-Rezeptoren und 5-HT_{2C} Rezeptoren interagiert (Balasubramanian et al., 2007; Becamel et al., 2001), eine Veränderung der Funktion dieser Rezeptoren könnte den Schweregrad der Entzugssymptomatik nachhaltig beeinflussen. Diese Untersuchungen stellen eine wichtige methodische Weiterentwicklung im Bereich der Verhaltensgenetik von Abhängigkeitserkrankungen dar, um die Alkohol Wirkung beeinflussende QTLs besser zu charakterisieren und die zugrunde liegenden Gene identifizieren zu können.

Als Alternative zu dem hier vorgestellten „High-resolution Mapping“ Ansatz sind verschiedene andere methodische Möglichkeiten diskutiert worden, um eine Identifikation der verschiedenen QTLs zu erreichen (Phillips et al., 2002). Die Kombination der Entwicklung von Congenic Strains mit Microarray-Genexpressionsuntersuchungen, wie sie z.B. für die Charakterisierung von Alkoholpräferenz QTLs eingesetzt worden sind (Carr et al., 2007), stellen eine solche Möglichkeit dar. Mit Hilfe dieser Strategie konnten mehrere neue

Kandidatengene eines Alkohol Präferenz QTL auf Chromosom 9 identifiziert werden, welche u.a. zu der Gruppe der Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Proteinen und zu unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren und -regulatoren gehören (Mulligan et al., 2006). Die Untersuchung genetisch veränderter Knock-out oder Knock-in Mäuse stellt eine zweite Möglichkeit dar, die Wirkung potentieller QTL Kandidatengene verifizieren zu können (Spanagel und Heilig, 2005). Es sind bereits systematisch verschiedene Knock-out-Tierstämme in einer Serie von Alkoholparadigmen in der Vergangenheit untersucht worden. Diese Versuche haben unser Verständnis der Neurobiologie von Alkoholpräferenz und der Alkoholabhängigkeit deutlich erweitert und können für die Interpretation von QTL Untersuchungen herangezogen werden (zur Übersicht z.B. Crabbe et al., 2006; Lovinger und Crabbe, 2005). Drittens besteht die Option, Kandidatengene über einen translationalen Vergleich der Ergebnisse genomweiter Assoziationsuntersuchungen an Tiermodellen und verschiedenen Abhängigkeitsdiagnosen zu verifizieren (Uhl et al., 2007). Eine Identifikation weiterer Kandidatengene Alkohol bezogener QTLs, vergleichbar zu *Mpdz* erscheint unter kombinierter Anwendung dieser Methoden möglich.

Ausgehend von dem Positivbefund in der COGA Studie konnte in einer humangenetischen Assoziationsuntersuchung das Gen für die alpha 2 Untereinheit des GABAA Rezeptors (*GABRA2*) als ein Kandidatengen der Alkoholabhängigkeit bestätigt werden. Dieses ist insofern interessant, da bei abhängigem Alkoholkonsum eine Vielzahl von Änderungen der Funktion GABA-erger Rezeptoren beobachtet werden kann (Krystal et al., 2006). Pilotstudien sprechen dafür, dass Träger des *GABRA2* Risikohaplotyps eine verminderte Sensitivität gegenüber verschiedenen Alkoholwirkungen besitzen (Pierucci-Lagha et al., 2005). Dieses Gen besitzt eine besondere Bedeutung für die Alkoholforschung, da u.a. am Vorliegen des

Risikohaplotyps komplexe Gen-Umweltinteraktionen beschrieben werden konnten. Träger des Haplotyps wiesen u.a. nicht nur ein höheres Risiko zur Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit, sondern auch eine geringere Rate an stabilen Partnerschaften sowie eine höhere Scheidungsrate auf (Dick et al., 2006a). Neue Befunde sprechen zudem für pleiotrope Effekte von *GABRA2*; u.a. können Risikovarianten in *GABRA2* auch das Risiko kindlicher Verhaltensstörungen und einer Drogenabhängigkeit steigern (Agrawal et al., 2006; Dick et al., 2006b). In Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen in Deutschland wollen wir die Bedeutung der oben beschriebenen synaptischen Gene für Alkohol-bezogene Phänotypen weiter untersuchen. Diese Studien befinden sich derzeit in dem Stadium der Auswertung.

Bildgebende Untersuchungen stellen eine interessante Möglichkeit dar, den Einfluss interessanter Kandidatengene wie *GABRA2* auf die neuronalen Alkoholwirkung *in vivo* zu untersuchen. Zudem können neuronale Effekte potentiell rückfallprophylaktischer Psychopharmaka untersucht werden. Mit dem Alkohol-Challenge 18-FDG Paradigma (Fehr et al., 2007; Schreckenberger et al., 2004) steht uns hierfür eine Möglichkeit zur Verfügung. In diesem Paradigma soll der Effekt des μ -Opiatrezeptorantagonisten Naltrexon als der bisher am besten untersuchten rückfallprophylaktischen Substanz untersucht werden. Unsere Hypothese hierbei ist, dass die subchronische Naltrexon Gabe die Alkohol bedingte Aktivierung des mesolimbischen Rewardsystems blockieren kann. Zusammen mit den bisher durchgeführten Alkohol-Challenge 18-FDG Untersuchungen werden diese Untersuchungen auch erlauben, den Effekt etablierter Risikogene der Alkoholabhängigkeit wie *GABRA2* auf die neuronale Alkoholwirkung zu untersuchen.

Die Kombination der verschiedenen Untersuchungstechniken hat zu einem erheblich erweiterten Verständnis der Bedeutung genetischer Risikofaktoren der Alkoholabhängigkeit beigetragen und unser konzeptionelles Verständnis der Erkrankung deutlich erweitert. Es besteht die berechtigte Hoffnung, dass die Erkenntnisse auch in mittelbarer Zukunft zu verbesserten Behandlungsmöglichkeiten der Alkoholabhängigkeit beitragen werden (Abb.14).

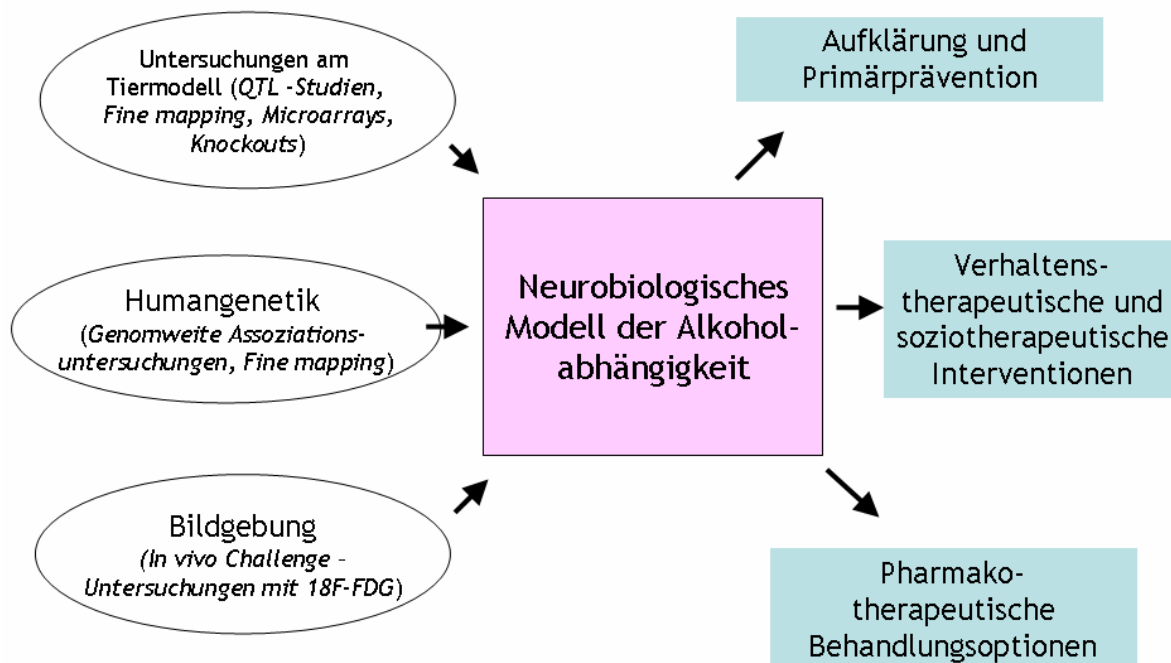


Abb. 14. Alkoholabhängigkeitsforschung: Methoden und Ziele. Tierexperimentelle, humangenetische und bildgebende Untersuchungen generieren eine Vielzahl von Erkenntnissen, die gemeinsam das neurobiologische Modell der Alkoholabhängigkeit erweitern. Das verbesserte neurobiologische Modell wird dazu beitragen, bessere Primärpräventionen, psychotherapeutische, soziotherapeutische und pharmakotherapeutische Behandlungsmöglichkeiten der Alkoholabhängigkeit zu entwickeln.

6. Literatur

- Addolorato G, Caputo F, Capristo E, Janiri L, Bernardi M, Agabio R, Colombo G, Gessa GL, Gasbarrini G (2002) Rapid suppression of alcohol withdrawal syndrome by baclofen. *Am J Med* 112(3):226-9.
- Addolorato G, Leggio L, Abenavoli L, Agabio R, Caputo F, Capristo E, Colombo G, Gessa GL, Gasbarrini G (2006) Baclofen in the treatment of alcohol withdrawal syndrome: a comparative study vs diazepam. *Am J Med* 119(3):276 e13-8.
- Agrawal A, Edenberg HJ, Foroud T, Bierut LJ, Dunne G, Hinrichs AL, Nurnberger JI, Crowe R, Kuperman S, Schuckit MA, Begleiter H, Porjesz B, Dick DM (2006) Association of GABRA2 with drug dependence in the collaborative study of the genetics of alcoholism sample. *Behav Genet* 36(5):640-50.
- Anton RF, O'Malley SS, Ciraulo DA, Cisler RA, Couper D, Donovan DM, Gastfriend DR, Hosking JD, Johnson BA, LoCastro JS, Longabaugh R, Mason BJ, Mattson ME, Miller WR, Pettinati HM, Randall CL, Swift R, Weiss RD, Williams LD, Zweben A (2006) Combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence: the COMBINE study: a randomized controlled trial. *Jama* 295(17):2003-17.
- Babor TF, Hofmann M, DelBoca FK, Hesselbrock V, Meyer RE, Dolinsky ZS, Rounsaville B (1992) Types of alcoholics, I. Evidence for an empirically derived typology based on indicators of vulnerability and severity. *Arch Gen Psychiatry* 49(8):599-608.
- Balasubramanian S, Fam SR, Hall RA (2007) GABAB receptor association with the PDZ scaffold Mupp1 alters receptor stability and function. *J Biol Chem* 282(6):4162-71.
- Becamel C, Figge A, Poliak S, Dumuis A, Peles E, Bockaert J, Lubbert H, Ullmer C (2001) Interaction of Serotonin 5-Hydroxytryptamine Type 2C Receptors with PDZ10 of the Multi-PDZ Domain Protein MUPP1. *J Biol Chem* 276(16):12974-12982.
- Belknap JK, Atkins AL (2001) The replicability of QTLs for murine alcohol preference drinking behavior across eight independent studies. *Mamm Genome* 12(12):893-9.
- Belknap JK, Crabbe JC, Young ER (1993) Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112(4):503-10.
- Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25(3):515-32.
- Buck K, Metten P, Belknap J, Crabbe J (1999) Quantitative trait loci affecting risk for pentobarbital withdrawal map near alcohol withdrawal loci on mouse chromosomes 1, 4, and 11. *Mamm Genome* 10(5):431-7.

- Buck KJ, Metten P, Belknap JK, Crabbe JC (1997) Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. *J Neurosci* 17(10):3946-55.
- Carr LG, Kimpel MW, Liang T, McClintick JN, McCall K, Morse M, Edenberg HJ (2007) Identification of candidate genes for alcohol preference by expression profiling of congenic rat strains. *Alcohol Clin Exp Res* 31(7):1089-98.
- Cloninger CR, Bohman M, Sigvardsson S (1981) Inheritance of alcohol abuse. Cross-fostering analysis of adopted men. *Arch Gen Psychiatry* 38(8):861-8.
- Colombo G, Serra S, Brunetti G, Vacca G, Carai MA, Gessa GL (2003) Suppression by baclofen of alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Drug Alcohol Depend* 70(1):105-8.
- Covault J, Gelernter J, Hesselbrock V, Nellissery M, Kranzler HR (2004) Allelic and haplotypic association of GABRA2 with alcohol dependence. *Am J Med Genet* 129B(1):104-9.
- Crabbe JC, Belknap JK, Buck KJ (1994a) Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science* 264(5166):1715-23.
- Crabbe JC, Belknap JK, Mitchell SR, Crawshaw LI (1994b) Quantitative trait loci mapping of genes that influence the sensitivity and tolerance to ethanol-induced hypothermia in BXD recombinant inbred mice. *J Pharmacol Exp Ther* 269(1):184-92.
- Crabbe JC, Janowsky JS, Young ER, Rigter H (1980) Handling induced convulsions in twenty inbred strains of mice. *Subst Alcohol Actions Misuse* 1(2):159-63.
- Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK (1999) Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci* 22(4):173-9.
- Crabbe JC, Phillips TJ, Harris RA, Arends MA, Koob GF (2006) Alcohol-related genes: contributions from studies with genetically engineered mice. *Addict Biol* 11(3-4):195-269.
- Darvasi A (1998) Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat Genet* 18(1):19-24.
- Dewey SL, Brodie JD, Gerasimov M, Horan B, Gardner EL, Ashby CR, Jr. (1999) A pharmacologic strategy for the treatment of nicotine addiction. *Synapse* 31(1):76-86.
- Dewey SL, Morgan AE, Ashby CR, Jr., Horan B, Kushner SA, Logan J, Volkow ND, Fowler JS, Gardner EL, Brodie JD (1998) A novel strategy for the treatment of cocaine addiction. *Synapse* 30(2):119-29.
- Dick DM, Agrawal A, Schuckit MA, Bierut L, Hinrichs A, Fox L, Mullaney J, Cloninger CR, Hesselbrock V, Nurnberger JI, Jr., Almasy L, Foroud T, Porjesz B,

- Edenberg H, Begleiter H (2006a) Marital status, alcohol dependence, and GABRA2: evidence for gene-environment correlation and interaction. *J Stud Alcohol* 67(2):185-94.
- Dick DM, Bierut L, Hinrichs A, Fox L, Bucholz KK, Kramer J, Kuperman S, Hesselbrock V, Schuckit M, Almasy L, Tischfield J, Porjesz B, Begleiter H, Nurnberger J, Jr., Xuei X, Edenberg HJ, Foroud T (2006b) The role of GABRA2 in risk for conduct disorder and alcohol and drug dependence across developmental stages. *Behav Genet* 36(4):577-90.
- Edenberg HJ, Dick DM, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer LO, Crowe RR, Goate A, Hesselbrock V, Jones K, Kwon J, Li TK, Nurnberger JI, Jr., O'Connor SJ, Reich T, Rice J, Schuckit MA, Porjesz B, Foroud T, Begleiter H (2004) Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. *Am J Hum Genet* 74(4):705-14.
- Fehr C, Grintschuk N, Szegedi A, Angheliescu I, Klawe C, Singer P, Hiemke C, Dahmen N (2000a) The HTR1B 861G>C receptor polymorphism among patients suffering from alcoholism, major depression, anxiety disorders and narcolepsy. *Psychiatry Res* 97(1):1-10.
- Fehr C, Hohmann N, Grunder G, Dielentheis TF, Buchholz HG, Chechko N, Yakushev I, Landvogt C, Bartenstein P, Urban R, Schreckenberger M (2007) Tiagabine does not attenuate alcohol-induced activation of the human reward system. *Psychopharmacology (Berl)* 191(4):975-83.
- Fehr C, Rademacher BL, Buck KJ (2003) Evaluation of the glutamate decarboxylase genes Gad1 and Gad2 as candidate genes for acute ethanol withdrawal severity in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(3):467-72.
- Fehr C, Sander T, Tadic A, Lenzen KP, Angheliescu I, Klawe C, Dahmen N, Schmidt LG, Szegedi A (2006) Confirmation of association of the GABRA2 gene with alcohol dependence by subtype-specific analysis. *Psychiatr Genet* 16(1):9-17.
- Fehr C, Schleicher A, Szegedi A, Angheliescu I, Klawe C, Hiemke C, Dahmen N (2001) Serotonergic polymorphisms in patients suffering from alcoholism, anxiety disorders and narcolepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25(5):965-82.
- Fehr C, Shirley RL, Belknap JK, Crabbe JC, Buck KJ (2002) Congenic mapping of alcohol and pentobarbital withdrawal liability Loci to a <1 centimorgan interval of murine chromosome 4: identification of mpdz as a candidate gene. *J Neurosci* 22(9):3730-8.
- Fehr C, Shirley RL, Crabbe JC, Belknap JK, Buck KJ, Phillips TJ (2005) The syntaxin binding protein 1 gene (Stxbp1) is a candidate for an ethanol preference drinking locus on mouse chromosome 2. *Alcohol Clin Exp Res* 29(5):708-20.

- Fehr C, Shirley RL, Metten P, Kosobud AE, Belknap JK, Crabbe JC, Buck KJ (2004) Potential pleiotropic effects of Mpdz on vulnerability to seizures. *Genes Brain Behav* 3(1):8-19.
- Fehr C, Szegedi A, Anghelescu I, Klawe C, Hiemke C, Dahmen N (2000b) Sex differences in allelic frequencies of the 5-HT_{2C} Cys23Ser polymorphism in psychiatric patients and healthy volunteers: findings from an association study. *Psychiatr Genet* 10(2):59-65.
- Feldblum S, Dumoulin A, Anoaï M, Sandillon F, Privat A (1995) Comparative distribution of GAD65 and GAD67 mRNAs and proteins in the rat spinal cord supports a differential regulation of these two glutamate decarboxylases in vivo. *J Neurosci Res* 42(6):742-57.
- Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, Schork NJ, St. Jean P, Ballas C, Choi H, Berrettini WH (1997) Mapping murine loci for seizure response to kainic acid. *Mamm Genome* 8(3):200-8.
- Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, Ballas C, Schill J, Buono RJ, Berrettini WH (1999) Mapping loci for pentylentetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19(16):6733-9.
- Gerasimov MR, Ashby CR, Jr., Gardner EL, Mills MJ, Brodie JD, Dewey SL (1999) Gamma-vinyl GABA inhibits methamphetamine, heroin, or ethanol-induced increases in nucleus accumbens dopamine. *Synapse* 34(1):11-9.
- Gonzales RA, Weiss F (1998) Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 18(24):10663-71.
- Grant BF, Dawson DA, Stinson FS, Chou SP, Dufour MC, Pickering RP (2004) The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991-1992 and 2001-2002. *Drug Alcohol Depend* 74(3):223-34.
- Grobin AC, Matthews DB, Devaud LL, Morrow AL (1998) The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 139(1-2):2-19.
- Hasin DS, Stinson FS, Ogburn E, Grant BF (2007) Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry* 64(7):830-42.
- Heath AC, Bucholz KK, Madden PA, Dinwiddie SH, Slutske WS, Bierut LJ, Statham DJ, Dunne MP, Whitfield JB, Martin NG (1997) Genetic and environmental contributions to alcohol dependence risk in a national twin sample: consistency of findings in women and men. *Psychol Med* 27(6):1381-96.
- Heath AC, Todorov AA, Nelson EC, Madden PA, Bucholz KK, Martin NG (2002) Gene-environment interaction effects on behavioral variation and risk of complex

- disorders: the example of alcoholism and other psychiatric disorders. *Twin Res* 5(1):30-7.
- Isaacson JS, Vitten H (2003) GABA(B) receptors inhibit dendrodendritic transmission in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 23(6):2032-9.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112(4):519-33.
- Jahn R, Sudhof TC (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68:863-911.
- Johnson EO, van den Bree MB, Pickens RW (1996) Subtypes of alcohol-dependent men: a typology based on relative genetic and environmental loading. *Alcohol Clin Exp Res* 20(8):1472-80.
- Kalivas PW, Duffy P, Eberhardt H (1990) Modulation of A10 dopamine neurons by gamma-aminobutyric acid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 253(2):858-66.
- Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162(8):1403-13.
- Kendler KS (2001) Twin studies of psychiatric illness: an update. *Arch Gen Psychiatry* 58(11):1005-14.
- Körkel J, Schindler C (2003) Rückfall und Rückfallprävention bei Alkoholabhängigkeit: Eine Übersicht, in *Rückfallprävention mit Alkoholabhängigen*, (Körkel J ed, pp 1-57. Springer Heidelberg.
- Kranzler HR, Van Kirk J (2001) Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 25(9):1335-41.
- Krystal JH, Staley J, Mason G, Petrakis IL, Kaufman J, Harris RA, Gelernter J, Lappalainen J (2006) Gamma-aminobutyric acid type A receptors and alcoholism: intoxication, dependence, vulnerability, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 63(9):957-68.
- Lappalainen J, Krupitsky E, Remizov M, Pchelina S, Taraskina A, Zvartau E, Somberg LK, Covault J, Kranzler HR, Krystal JH, Gelernter J (2005) Association between alcoholism and gamma-amino butyric acid alpha2 receptor subtype in a Russian population. *Alcohol Clin Exp Res* 29(4):493-8.
- Lei S, McBain CJ (2003) GABA B receptor modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission onto rat CA3 hippocampal interneurons. *J Physiol* 546(Pt 2):439-53.
- Lewohl JM, Wang L, Miles MF, Zhang L, Dodd PR, Harris RA (2000) Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 24(12):1873-82.
- Liang T, Spence J, Liu L, Strother WN, Chang HW, Ellison JA, Lumeng L, Li TK, Foroud T, Carr LG (2003) alpha-Synuclein maps to a quantitative trait locus

- for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8):4690-5.
- Long JC, Knowler WC, Hanson RL, Robin RW, Urbanek M, Moore E, Bennett PH, Goldman D (1998) Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an American Indian population. *Am J Med Genet* 81(3):216-21.
- Lovinger DM, Crabbe JC (2005) Laboratory models of alcoholism: treatment target identification and insight into mechanisms. *Nat Neurosci* 8(11):1471-80.
- Mann K (2004) Pharmacotherapy of alcohol dependence: a review of the clinical data. *CNS Drugs* 18(8):485-504.
- Mavridis M, Besson MJ (1999) Dopamine-opiate interaction in the regulation of neostriatal and pallidal neuronal activity as assessed by opioid precursor peptides and glutamate decarboxylase messenger RNA expression. *Neuroscience* 92(3):945-66.
- Meldrum BS, Chapman AG (1999) Basic mechanisms of gabitril (tiagabine) and future potential developments. *Epilepsia* 40 Suppl 9(9):S2-6.
- Mihic SJ (1999) Acute effects of ethanol on GABAA and glycine receptor function. *Neurochem Int* 35(2):115-23.
- Milligan G, White JH (2001) Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22(10):513-8.
- Mufson EJ, Kahl U, Bowser R, Mash DC, Kordower JH, Deecher DC (1998) Galanin expression within the basal forebrain in Alzheimer's disease. Comments on therapeutic potential. *Ann N Y Acad Sci* 863:291-304.
- Mulligan MK, Ponomarev I, Hitzemann RJ, Belknap JK, Tabakoff B, Harris RA, Crabbe JC, Blednov YA, Grahame NJ, Phillips TJ, Finn DA, Hoffman PL, Iyer VR, Koob GF, Bergeson SE (2006) Toward understanding the genetics of alcohol drinking through transcriptome meta-analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16):6368-73.
- Navarro M, Cubero I, Knapp DJ, Thiele TE (2003) MTII-induced reduction of voluntary ethanol drinking is blocked by pretreatment with AgRP-(83-132). *Neuropeptides* 37(6):338-44.
- Neumann PE, Collins RL (1991) Genetic dissection of susceptibility to audiogenic seizures in inbred mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12):5408-12.
- Pan CY, Jeromin A, Lundstrom K, Yoo SH, Roder J, Fox AP (2002) Alterations in exocytosis induced by neuronal Ca²⁺ sensor-1 in bovine chromaffin cells. *J Neurosci* 22(7):2427-33.

- Parsian A, Zhang ZH (1999) Human chromosomes 11p15 and 4p12 and alcohol dependence: possible association with the GABRB1 gene. *Am J Med Genet* 88(5):533-8.
- Phillips TJ, Belknap JK, Buck KJ, Cunningham CL (1998) Genes on mouse chromosomes 2 and 9 determine variation in ethanol consumption. *Mamm Genome* 9(12):936-41.
- Phillips TJ, Belknap JK, Hitzemann RJ, Buck KJ, Cunningham CL, Crabbe JC (2002) Harnessing the mouse to unravel the genetics of human disease. *Genes Brain Behav* 1(1):14-26.
- Pierucci-Lagha A, Covault J, Feinn R, Nellissery M, Hernandez-Avila C, Oncken C, Morrow AL, Kranzler HR (2005) GABRA2 Alleles Moderate the Subjective Effects of Alcohol, Which are Attenuated by Finasteride. *Neuropsychopharmacology*.
- Ploj K, Roman E, Kask A, Hyytia P, Schioth HB, Wikberg JE, Nylander I (2002) Effects of melanocortin receptor ligands on ethanol intake and opioid peptide levels in alcohol-preferring AA rats. *Brain Res Bull* 59(2):97-104.
- Prescott CA, Kendler KS (1999) Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins. *Am J Psychiatry* 156(1):34-40.
- Rada P, Avena NM, Leibowitz SF, Hoebel BG (2004) Ethanol intake is increased by injection of galanin in the paraventricular nucleus and reduced by a galanin antagonist. *Alcohol* 33(2):91-7.
- Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Van Eerdewegh P, Foroud T, Hesselbrock V, Schuckit MA, Bucholz K, Porjesz B, Li TK, Conneally PM, Nurnberger JI, Jr., Tischfield JA, Crowe RR, Cloninger CR, Wu W, Shears S, Carr K, Crose C, Willig C, Begleiter H (1998) Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *Am J Med Genet* 81(3):207-15.
- Risinger FO, Cunningham CL (1998) Ethanol-induced conditioned taste aversion in BXD recombinant inbred mice. *Alcohol Clin Exp Res* 22(6):1234-44.
- Rizo J, Sudhof TC (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3(8):641-53.
- Schiffer WK, Gerasimov MR, Bermel RA, Brodie JD, Dewey SL (2000) Stereoselective inhibition of dopaminergic activity by gamma vinyl-GABA following a nicotine or cocaine challenge: a PET/microdialysis study. *Life Sci* 66(13):PL169-73.
- Schiffer WK, Marsteller D, Dewey SL (2003) Sub-chronic low dose gamma-vinyl GABA (vigabatrin) inhibits cocaine-induced increases in nucleus accumbens dopamine. *Psychopharmacology (Berl)* 168(3):339-43.
- Schreckenberger M, Amberg R, Scheurich A, Lochmann M, Tichy W, Klega A, Siessmeier T, Gründer G, Buchholz HG, Landvogt C, Stauss J, Mann K,

- Bartenstein P, Urban R (2004) Acute alcohol effects on neuronal and attentional processing: striatal reward system and inhibitory sensory interactions under acute ethanol challenge. *Neuropsychopharmacology* 29(8):1527-37.
- Schuckit MA, Danko GP, Smith TL, Hesselbrock V, Kramer J, Bucholz K (2003) A 5-year prospective evaluation of DSM-IV alcohol dependence with and without a physiological component. *Alcohol Clin Exp Res* 27(5):818-25.
- Schuckit MA, Smith TL, Daepfen JB, Eng M, Li TK, Hesselbrock VM, Nurnberger JI, Jr., Bucholz KK (1998) Clinical relevance of the distinction between alcohol dependence with and without a physiological component. *Am J Psychiatry* 155(6):733-40.
- Sheng M, Sala C (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24:1-29.
- Shirley RL, Walter NA, Reilly MT, Fehr C, Buck KJ (2004) Mpdz is a quantitative trait gene for drug withdrawal seizures. *Nat Neurosci* 7(7):699-700.
- Sigvardsson S, Bohman M, Cloninger CR (1996) Replication of the Stockholm Adoption Study of alcoholism. Confirmatory cross-fostering analysis. *Arch Gen Psychiatry* 53(8):681-7.
- Soghomonian JJ, Martin DL (1998) Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 19(12):500-5.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362(6418):318-24.
- Song J, Koller DL, Foroud T, Carr K, Zhao J, Rice J, Nurnberger JI, Jr., Begleiter H, Porjesz B, Smith TL, Schuckit MA, Edenberg HJ (2003) Association of GABA(A) receptors and alcohol dependence and the effects of genetic imprinting. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 117(1):39-45.
- Spanagel R, Heilig M (2005) Addiction and its brain science. *Addiction* 100(12):1813-22.
- Srisurapanont M, Jarusuraisin N (2002) Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD001867.
- Stanford IM, Cooper AJ (1999) Presynaptic mu and delta opioid receptor modulation of GABAA IPSCs in the rat globus pallidus in vitro. *J Neurosci* 19(12):4796-803.
- Statistisches_Bundesamt (2006) Entlassdiagnosen bei stationär behandelten Patienten in Deutschland.
- Thiele TE, Navarro M, Sparta DR, Fee JR, Knapp DJ, Cubero I (2003) Alcoholism and obesity: overlapping neuropeptide pathways? *Neuropeptides* 37(6):321-37.

- Treadwell JA, Pagniello KB, Singh SM (2004) Genetic segregation of brain gene expression identifies retinaldehyde binding protein 1 and syntaxin 12 as potential contributors to ethanol preference in mice. *Behav Genet* 34(4):425-39.
- Uhl GR, Drgon T, Johnson C, Fatusin OO, Liu QR, Contoreggi C, Li CY, Buck K, Crabbe J (2007) "Higher order" addiction molecular genetics: Convergent data from genome-wide association in humans and mice. *Biochem Pharmacol* 25:25.
- Ullmer C, Schmuck K, Figge A, Lubbert H (1998) Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett* 424(1-2):63-8.
- Walker BM, Koob GF (2007) The gamma-aminobutyric acid-B receptor agonist baclofen attenuates responding for ethanol in ethanol-dependent rats. *Alcohol Clin Exp Res* 31(1):11-8.
- Yamada J, Saitow F, Satake S, Kiyohara T, Konishi S (1999) GABA(B) receptor-mediated presynaptic inhibition of glutamatergic and GABAergic transmission in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology* 38(11):1743-53.
- Zobel M, Missel P, Bachmeier R, Funke W, Garbe D, Herder F, Kluger H, Medenwaldt J, Verstege R, Weissinger V, Wülst G (2005) Effektivität der stationären Suchtrehabilitation: -FVS Katamnese des Entlassjahrganges 2003 von Fachkliniken für Alkohol- und Medikamentenabhängige Sucht *Aktuell* (13(2)):5-15.