

**AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK
DES AKADEMISCHEN LEHRKRANKENHAUSES
MARIENHOSPITAL EUSKIRCHEN
CHEFARZT: PROF. DR. MED. HANS SCHWERING**

**Kandidatengene der Opiatabhängigkeit:
Dopaminrezeptor D3 (DRD3)-Ser9Gly-Polymorphismus und
brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-Val66Met-Polymorphismus**

**INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES DOCTOR MEDICINAE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER WESTFÄLISCHEN WILHELMS UNIVERSITÄT
MÜNSTER**

**VORGELEGT VON
JESS, NICOLE
AUS TRIER, DEUTSCHLAND
2009**

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Preusser
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Schwering

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2009

Aus der chirurgischen Klinik des Akademischen Lehrkrankenhauses
Marienhospital Euskirchen (Chefarzt Prof. Dr. med. Hans Schwering)

Referent: Prof. Dr. med. P. Preusser

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Schwering

Zusammenfassung

Kandidatengene der Opiatabhängigkeit:

**Dopaminrezeptor D3 (DRD3)-Ser9Gly-Polymorphismus und
brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-Val66Met-Polymorphismus**

Jess, Nicole

Die Entwicklung einer Opiatabhängigkeitserkrankung hat eine multifaktorielle Genese. Genetischen Risikofaktoren wird hierbei eine besondere Rolle beigemessen.

Als mögliche Gene, die für eine Opiatabhängigkeit prädisponieren, gelten das Dopaminrezeptor D3-Gen und das brain-derived neurotrophic factor-Gen.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens und der Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens oder deren mögliche Wechselwirkung als genetischer Prädiktor für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Opiatabhängigkeit anzusehen sind.

Die vorliegende Arbeit stellt die bisher größte Assoziationsstudie und Kopplungsstudie dieser Polymorphismen zur Opiatabhängigkeit eines ethnisch homogenen, deutschen Studienkollektivs dar, die in einer Untergruppe auch den Charakterzug eines erhöhten Sensation-Seeking-Scores berücksichtigt.

Allelverteilung und Genotypverteilung wurden mittels molekularbiologischer Methoden (PCR, Restriktionsenzymverdau, Gelelektrophorese) ermittelt und unter Verwendung statistischer Standardverfahren (Chi-Quadrat-Tests, Fisher's Exact Test, Armitage's Trendtest, TDT) ausgewertet.

Die Auswertung zeigte keine erhöhte homozygote Allel- bzw. Genotypverteilung der beiden untersuchten funktionellen Polymorphismen bei opiatabhängigen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Ebenso wenig konnte eine Wechselwirkung der beiden Genpolymorphismen festgestellt werden. Somit konnten die Arbeitshypothesen nicht erhärtet werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeine Einführung in die Vererbungslehre der Krankheiten	1
1.2. Opiatabhängigkeit	3
1.3. Kandidatengene der Opiatabhängigkeit	4
1.3.1. Dopaminerges Neurotransmittersystem	5
1.3.2. Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens	7
1.3.3. Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens	8
1.4. Kopplungsanalysen und Assoziationsanalysen	10
1.5. Aktuelle Literaturlage	12
1.5.1. Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens	12
1.5.2. Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens	15
1.5.3. Interaktion des Dopaminrezeptor D3-Gens und des BDNF-Gens	20
1.6. Fragestellung	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Studiengruppe	23
2.2. Diagnostische Verfahren	23
2.2.1. Diagnostische Interviews	23
2.2.2. Sensation-Seeking und Sensation-Seeking-Score	25
2.3. Statistische Verfahren	26
2.4. Kopplungs- und Assoziationsstudien	28
2.5. Experimentelle Arbeit	28
2.5.1. Geräte	28
2.5.2. Enzyme und Längenstandards	29
2.5.3. Synthetische Oligonukleotide	29
2.5.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.5.5. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)	30
2.5.6. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	31

2.5.7. Kandidatengen-Polymorphismen	32
2.5.7.1. DNA-Amplifikation mittels PCR	32
2.5.7.2. DNA-Verdau	32
2.5.7.2.1. Ser/Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens	32
2.5.7.2.2. Val66Meth-Polymorphismus des BDNF-Gens	33
3. Ergebnisse	35
3.1. Daten	35
3.2. Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens	36
3.2.1. Analyse der Familienstichprobe	36
3.2.2. Analyse der kranken Kinder in Abhängigkeit des Sensation-Seeking -Scores	37
3.2.3. Vergleich der Genotypverteilungen aller opiatabhängigen Patienten und Kontrollpersonen	39
3.2.4. Vergleich der Genotypverteilungen verschiedener Untergruppen	41
3.2.4.1 Analyse der Untergruppe Sensation-Seeking-Score	41
3.2.4.2 Analyse der Untergruppe Männer	42
3.3. Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens	43
3.3.1. Analyse der Familienstichprobe	43
3.3.2. Analyse der kranken Kinder in Abhängigkeit des Sensation-Seeking -Scores	44
3.3.3. Vergleich der Genotypverteilungen aller opiatabhängigen Patienten und Kontrollpersonen	46
3.3.4. Vergleich der Genotypverteilungen verschiedener Untergruppen	48
3.3.4.1 Analyse der Untergruppe Sensation-Seeking-Score	48
3.3.4.2 Analyse der Untergruppe Männer	48
3.4. Interaktion des Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens und des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens sowie weiterer Kovariablen	50

4. Diskussion	51
4.1. Methodendiskussion	
4.2. Ergebnisdiskussion	53
4.2.1. Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens	53
4.2.2. Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens	56
4.2.3. Interaktion zwischen dem Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens und dem Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens	59
4.2.4. Populationsstratifikation	61
4.2.5. Einschlusskriterien des Patientenkollektivs und Subgruppierungen	62
4.2.6. Ökologische Faktoren	63
4.2.7. Komorbidität	64
4.2.8. Sensation-Seeking-Score	65
4.3. Zusammenfassung	66
5. Literaturverzeichnis	69
Danksagung	88
Curriculum Vitae	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin / Adenin
ATP	Adenylatcyclase
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaar (base pair)
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukeotidtriphosphate
DRD3	Dopaminrezeptor 3
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen
EDTA	ethylene diamine tetraacetid acid
et al.	et alii (und andere)
G	Guanin
Gly	Glycin
G-Protein	Guaninnukleotid Bindungsprotein
ICD-10	Internationale Klassifikation der Krankheiten
l	Liter
Met	Methionin
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmol	Millimolar
mol	Molar
m-RNA	Messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
P	Signifikanz, p-Wert

PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
q	langer Arm eines Chromosoms (queue)
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
SDS	Sodiumdodecylsulfate
Ser	Serin
SNP	Einzel (single)-Nukleotid-Polymorphismus
SSS	Sensation-Seeking-Score
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TDT	Transmission Disequilibrium Test
Val	Valin
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung in die Vererbungslehre der Krankheiten

Die Fortschritte der biomedizinischen Forschung ermöglichen immer genauere Einsichten in die molekularen Ursachen von Krankheiten. Bekannt ist die Tatsache, dass die Entstehung der meisten Krankheiten zumindest teilweise genetisch bedingt ist. Ziel dieser biomedizinischen Forschung ist, die Biologie der Erkrankung schrittweise aufzuschlüsseln und zu verstehen. Dies gelingt durch die Identifizierung eines zur Krankheit beitragenden genetischen Faktors, der somit als Ausgangspunkt eines pathophysiologischen Prozesses anzusehen ist.

Bei monogen erblichen Krankheiten ist dies mittlerweile zur Routine geworden. Dabei macht man sich zunutze, dass Krankheiten in Familien vererbt werden. In Kopplungsuntersuchungen wird dabei zunächst das krankheitsverursachende Gen durch Untersuchen genetischer Marker einer bestimmten chromosomalen Region zugeordnet, im Anschluss daran wird durch die Analyse individueller Rekombinationen die chromosomale Lage schrittweise eingegrenzt. Schließlich erfolgt durch Feststellung der krankheitsverursachenden Mutationen die Identifizierung des gesuchten Gens.

Ungleich komplizierter ist die Identifizierung der genetischen Faktoren bei polygen vererbten Krankheiten, den häufigsten Krankheiten, zu denen auch die Suchterkrankungen und insbesondere die Opiatabhängigkeit zählen. Die erbliche Disposition wird in der Regel durch mehrere Gene bestimmt, die zudem meist erst in Wechselwirkung miteinander und in Wechselwirkung mit Umweltfaktoren zur Manifestation der Krankheit führen.

Nachdem die Sequenzierung des menschlichen Genoms als wesentliche Grundvoraussetzung zur systematischen Identifizierung aller krankheitsrelevanten Gene weitgehend abgeschlossen ist, wird gegenwärtig mit großem Aufwand die Variabilität des 3,2 Milliarden Basenpaar großen Genoms untersucht.

Dabei ist jedoch zusätzlich zu berücksichtigen, dass genetische Faktoren, die zur Krankheitsentstehung beitragen, auch die Variabilität des Genoms zwischen den Menschen betreffen. Diese Variabilität des Genoms ist ganz entscheidend

durch kleinste Unterschiede der DNA-Sequenz geprägt, den so genannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. Single Nucleotide Polymorphism). Derartige Einzelnukleotidpolymorphismen gibt es im menschlichen Genom millionenfach, jedoch nur ein geringer Teil dieser SNPs ist für die Entstehung von Krankheiten relevant. Aufgrund der bekannten Haplotyp-Blockstruktur des menschlichen Genoms ergibt sich nicht die Notwendigkeit, alle SNPs auf eine Krankheitsbeteiligung zu untersuchen, dies wäre auch aus technischen und ökonomischen Gründen nahezu unmöglich. Ein SNP ist definiert durch einen Basenaustausch. Jedoch nur ein kleiner Teil der Polymorphismen tritt in den Exons auf, die schließlich in Proteine translatiert werden. Hier können sie zu einem Aminosäureaustausch führen, der eine Veränderung der Proteineigenschaften zur Folge haben kann. Der überwiegende Anteil der Polymorphismen befindet sich in den Introns und in solchen DNA-Regionen, die nicht in m-RNA transkribiert werden (Plomin et al., 1999).

Es muss aber auch an die Möglichkeit gedacht werden, dass das assoziierte Allel selbst nicht zur Krankheit beiträgt. Vielmehr kann es auch nur Indikatorfunktion besitzen, hervorgerufen durch eine räumliche Nähe zu einer direkt am Krankheitsgeschehen beteiligten Genvariante. Dieser Umstand darf zum Beispiel dann vermutet werden, wenn es sich beim assoziierten Polymorphismus um eine so genannte stille Mutation im sequenzkodierenden Bereich eines Gens handelt. Hierbei liegt zwar ein Nukleotidaustausch im Gen vor, es kommt aber aufgrund des degenerierten genetischen Codes nicht zu einem Aminosäureaustausch im zugehörigen Protein.

Ziel dieser molekulargenetischen Studie ist die Untersuchung zweier spezifischer Genvarianten, dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor (DRD3)-Gens und dem Val66Met-Polymorphismus des brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-Gens, auf ihre vermutliche Beteiligung am Erkrankungsrisiko und der Aufrechterhaltung einer Opiatabhängigkeit. Man spricht hierbei von Kandidatengenen. Dazu bedient man sich der oben beschriebenen genetischen Heterogenität (Variabilität), die in Form von SNPs charakterisiert ist.

1.2. Opiatabhängigkeit

Einer der ältesten Definitionen der Abhängigkeit beschreibt diese als einen Zustand, der von einer Droge herrühre, wobei der Entzug von dieser Droge psychische und/oder physische Störungen bewirke (Collier 1972). Laut der WHO-Definition ist die Drogenabhängigkeit ein Zustand, der zu erheblich von der Norm abweichenden psychischen Auffälligkeiten führen kann, gelegentlich auch physische Symptome aufweist und der von der Interaktion zwischen einem lebenden Organismus und einer Droge herrührt. Charakteristische Merkmale sind Verhaltensstörungen und Reaktionen anderer Art, wozu immer auch die zwangartige regelmäßige Einnahme der Substanz gehört, welche mit dem Ziele erfolgt, die psychische Wirkung hervorzurufen, manchmal auch um Beschwerden zu vermeiden.

Nach dem ICD (Internationale Klassifikation der Krankheiten) 10 Konzept der WHO (1991) müssen mindestens drei der folgenden Kriterien erfüllt sein, um eine Abhängigkeit zu diagnostizieren:

- übermächtiger Wunsch, die Substanz zu konsumieren
- verminderte Kontrollfähigkeit
- Substanzgebrauch, um die Entzugssymptome zu mildern
- körperliches Entzugssyndrom
- Toleranz (Dosissteigerung)
- eingeengtes Verhaltensmuster
- Vernachlässigung anderer Interessen
- anhaltender Substanzkonsum, trotz des Nachweises schädlicher körperlicher, psychischer und sozialer Folgen.

Die Substanzklasse der Opiate besitzt unter den Drogen das höchste Abhängigkeitspotential, es entsteht sowohl eine psychische als auch eine physische Abhängigkeit mit rascher Dosissteigerung. Wenngleich der soziale und kulturelle Einfluss zur Entwicklung einer Substanzabhängigkeit wie die der Alkohol-, Kokain- und Opiatabhängigkeit unumstritten ist (Rounsaville, 1991; Pickens, 1991; Cadoret, 1995), weisen Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien eindrücklich auf einen signifikanten genetischen Beitrag hin

(Merikangas et al., 1998; Tsuang et al., 1996; Cadoret et al., 1986). Aufgrund der hohen Mortalität und der medizinischen und sozialen Probleme der Opiatabhängigen, hat die Bedeutung der Opiatabhängigkeitserkrankung in den letzten Jahren in Deutschland erheblich zugenommen. Insbesondere bei Heroin handelt es sich unverändert um das „Drogenproblem Nummer Eins“ und die „meistgefürchtete aller verbotenen Substanzen“.

Trotz der gesamtgesellschaftlichen Bedeutung und des individuellen Leids der Betroffenen sind die medizinischen Forschungsbemühungen der Opiatabhängigkeitserkrankung derzeit noch nicht ausreichend. Dies führt zu unbefriedigenden Behandlungsmöglichkeiten, was zu hohen Abbruch- und Rückfallquoten (Gößling et al., 2001) führt und sich in einer 13-fach erhöhten Mortalität der Opiatabhängigen gegenüber der Durchschnittsbevölkerung äußert (Hulse et al., 1999). Es besteht daher ein großer Bedarf an der Erforschung der Krankheitsentstehung, -entwicklung und -manifestation, um effiziente und wirksame Behandlungsmethoden zu entwickeln und zu etablieren.

1.3. Kandidatengene der Opiatabhängigkeit

Das verfügbare Wissen über die Pathophysiologie der Opiatabhängigkeit weist dem mesokortiko-limbischen System einen zentralen Platz zu. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass Opiate, Alkohol und Psychostimulantien in der Lage sind, die Aktivität der mesolimbischen und mesokortischen dopaminergen Neuronen zu steigern, die in das Belohnungs- und Verstärkungssystem involviert sind (Di Chiara, 1988). Als krankheitsdisponierende Genvarianten, den sogenannten Kandidatengenen, kommen deshalb hauptsächlich Gene von Rezeptoren in Frage, die mit den entsprechenden Neuronen dieses Systems interagieren. Im mesokortiko-limbischen System dominieren vor allem dopaminerge Projektionsneurone, die unter anderem zum Nucleus accumbens septi und zum präfrontalen Kortex ziehen, allen voran der Dopaminrezeptor D3, der selektiv im Projektionsfeld der Neurone im mesolimbischen Kortex exprimiert wird (Sokoloff, 1990).

Die Studien von Caine et al. (1997) an Ratten sowie von Nader et al. (1996) und Spealman et al. (1996) an Affen zeigten, dass eine Stimulation des Dopaminrezeptor D3 durch Kokain das Belohnungssystem des Gehirns unterdrückt. Des Weiteren konnte bei Kokainabhängigen gezeigt werden, dass die D3 Dopaminrezeptor-Bindungsaffinität (Staley, 1996) und Gentranskription (Segal, 1997) im ventralen Striatum erhöht ist. Weitere Untersuchungen zeigten eine auftretende Verhaltenssensibilisierung nach wiederholter Gabe eines indirekten Dopaminagonists, ein Prozess, der ebenso nach der Gabe von Opiaten und Psychostimulantien beobachtet wurde, begleitet von einer selektiven Induktion der Dopaminrezeptor D3-Gen-Expression (Bordet, 1997). In diesem Sinne stehen Polymorphismen von Dopaminrezeptoren schon seit längerem im Fokus der Wissenschaft.

Opiatrezeptoren spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung von akuten Drogenwirkungen, und sie modulieren die Aktivität dopaminerger Neuronen des Nucleus accumbens als Teil des endogenen Belohnungssystems, das eng mit der Verstärkerwirkung von psychoaktiven Substanzen mit potenzieller Suchtpotenz verknüpft ist. Daher stellen Opiatrezeptorgene so genannte Kandidatengene für Suchterkrankungen dar, die mutmaßlich von pathophysiologischer Relevanz für die Entstehung und Aufrechterhaltung des Suchtverhaltens sind.

1.3.1. Dopaminerges Neurotransmittersystem

Der Neurotransmitter Dopamin ist im zentralen und im peripheren Nervensystem weit verbreitet. Im Zentralen Nervensystem sind drei dopaminerge Systeme bekannt:

1. Das nigrostriatale System: Es projiziert von der Substantia nigra zum Corpus striatum. Eine weitgehende Reduzierung der dopaminergen Transmission im nigrostriatalen System führt zu Morbus Parkinson.
2. Das tuberoinfundibuläre System: Es projiziert vom Nucleus arcuatus im Hypothalamus zu der Eminentia mediana am Tuber cinereum. Die hier stattfindende Dopaminausschüttung supprimiert die Prolaktinsekretion der Adenohypophyse.

3. Das mesokortiko-limbische System: Es reicht vom ventralen Tegmentum zum Nucleus accumbens mit weiteren Projektionen in andere Hirnareale, wie dem limbischen System und dem orbitofrontalen Cortex. Ihm wird eine große pathogenetische Bedeutung bei der Schizophrenie und den Abhängigkeitserkrankungen zugemessen (Greenstein et al., 2000).

Die physiologischen Effekte von Dopamin werden von mindestens fünf unterschiedlichen Rezeptor-Subtypen vermittelt. Zu den D1-artigen Dopaminrezeptoren gehören die Subtypen D1 und D5, zu den D2-artigen Rezeptoren die Subtypen D2, D3 und D4 (Edvinsson und Krause, 2002).

Die D1-, D2-, und D3-Subtypen treten hauptsächlich in Gebieten hoher Dopamininnervation auf, wie z.B. im Neostriatum und im ventralen Striatum. In Gebieten niedriger Dopamininnervation, z.B. im frontalen Kortex und im Hippokampus, sind hauptsächlich die D4-, D5-, aber auch D1-Subtypen zu finden (Schwartz 1997).

D1-artige Rezeptoren wirken exzitatorisch und sind fast ausschließlich an der postsynaptischen Membran lokalisiert. Nach der Bindung des Transmitters an einen Rezeptor wird eine so genannte Second-Messenger-Kaskade ausgelöst. Über ein G-Protein wird das Enzym Adenylatcyclase aktiviert, das ATP in cAMP umwandelt. cAMP-abhängige Proteinkinasen phosphorylieren die Ionenkanäle, was zur Aktivierungsänderung dieser Kanäle führt.

D2-artige Rezeptoren wirken inhibitorisch und treten sowohl an der prä- als auch an der postsynaptischen Membran auf. Die inhibierende Wirkung dieses Rezeptortyps besteht sowohl in der Hemmung der cAMP-Bildung, als auch in der Öffnung der Kaliumkanäle in der postsynaptischen Membran über Second-Messenger-Kaskaden. Der vermehrte Kaliumstrom in die Zelle führt zu einer Hyperpolarisation, welche die Wahrscheinlichkeit einer Erregungsweiterleitung durch ein Aktionspotential reduziert (Derrfuß et al., 2000).

Die Beendigung der Wirkung des Neurotransmitters erfolgt hauptsächlich durch Wiederaufnahme von Dopamin in die präsynaptische Zelle. Dies geschieht mittels Transportermolekülen, die Dopamin zum größten Teil wieder in Vesikel

einbauen und bei den nächsten Aktionspotentialen erneut in den synaptischen Spalt entlassen. Eine weitere Inaktivierung erfolgt in der präsynaptischen Zelle, vor allem bei hoher Dopaminkonzentration, durch das Enzym Monoaminoxidase unter Entstehung von Dihydrophenylelessigsäure. Auf der postsynaptischen Membran wird Dopamin durch das Enzym Catechol-O-Methyltransferase zu Methoxytyramin umgewandelt. Dihydrophenylelessigsäure und Methoxytyramin können zudem durch Catechol-O-Methyltransferase bzw. Monoaminoxidase in Homovanillinsäure umgewandelt werden (Elbert und Rockstroh, 1990), ein Metabolit der sich im Liquor und teilweise auch im Blut und Urin nachweisen lässt, so dass die Konzentration als Maß des synaptischen Abbaus und der an den Synapsen verfügbaren Transmittermengen betrachtet werden kann (Köhler, 2001).

1.3.2. Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens

Der Dopaminrezeptor D3 ist auf dem Chromosom 3q13.3 lokalisiert. Er gehört zur Überfamilie der Transmembranproteine und besitzt sieben transmembrane Abschnitte (Strader et al., 1989). Eine Bindung an den Dopaminrezeptor D3 führt zu einer Inhibierung der Adenylatcyclase und aktiviert K-Kanäle in der Zellmembran (Missale et al., 1998). Der Dopaminrezeptor D3 wird vorrangig im limbischen System des Gehirns exprimiert (Sokoloff, 1990), eine Region des zentralen Nervensystems, die für die Steuerung des Verhaltens und der Emotionen verantwortlich ist. Seine kodierende Sequenz beinhaltet fünf Exons sowie fünf Introns und erstreckt sich über mehr als 53.000 Basenpaare.

Das Dopaminrezeptor D3-Gen enthält einen Polymorphismus, resultierend aus einem Basenaustausch Adenin (A) gegen Guanin (G) in Position 25, aus dem ein Aminosäureaustausch Serin gegen Glycin im N-Terminus des Rezeptors resultiert (Lannfelt et al., 1992). Untersuchungen von Lundstrom und Turpin (1999), in denen dieser Polymorphismus des DRD3-Gens als rekombinante DNA in CHO-Zellen exprimiert wurde, zeigen, dass dieser Polymorphismus in der kodierenden Region des Gens funktionell bedeutend ist und eine signifikant höhere Dopamin-Bindungsaffinität für den homozygoten Ser9Gly-Polymorphismus aufweist.

Forschungsbefunde zum endogenen Opiatsystem haben maßgeblich zum Verständnis neurobiologischer Prozesse stoffgebundener Abhängigkeitserkrankungen beigetragen. Darüber hinaus haben sie die Entwicklung eines Modells ermöglicht, das erklären kann, welche Rolle der Verstärkung und Repetition von Verhalten zukommt und welche Funktion das "Belohnungsgefühl" (Reward) in Verbindung mit Verhalten hat. Ebenso versucht man zu erklären, auf welche Weise Stoffe, die in das stammesgeschichtlich alte dopaminerge-mesolimbische Belohnungs- und Verstärkungssystem eingreifen, abhängigkeiterzeugend wirken. Auf der Basis dieses Wissens können stoffgebundene Abhängigkeitserkrankungen generell als exzessiv künstliche Aktivierung eines fundamentalen neurobiologischen Funktionsmechanismus angesehen werden, der in seiner ursprünglichen Funktion der endogenen Regulation von Motivation, Stimmung und Verhalten dient. Endogene Opiode regulieren das Belohnungssystem bidirektional und können wegen ihrer tonischen Basalaktivität sowohl die neutrale Ausrichtung stabilisieren, als auch Verhaltensverstärkung und -vermeidung vermitteln (Kiefer, 2004).

In dieser Studie soll die Assoziation des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens mit der Opiatabhängigkeitserkrankung in einer deutschen Patientengruppe untersucht werden.

1.3.3. Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens

Das brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-Gen ist auf dem Chromosom 11p13 lokalisiert (Binder und Scharfman, 2004; Jones und Reichardt, 1990) und kodiert für das gleichnamige Protein (Jones et al., 1990; Maisonpierre et al., 1991).

BDNF gehört zur Familie der Nervenwachstumsfaktoren, Proteine die im peripheren und zentralen Nervensystem vorkommen. Während der Embryogenese und Organogenese besitzt das BDNF-Protein funktionelle Bedeutung in der Differenzierung von Neuronen und im Wachstum von Neuronen. Beim Erwachsenen hat es funktionelle Bedeutung in der Erhaltung der neuronalen Plastizität, Regulation der synaptischen Aktivität, Neurotransmittersynthese und Regeneration von Neuronen (Acheson et al.,

1995; Friedman and Green, 1999; Hellweg et al., 1998; Huang und Reichardt, 2001; Levine et al., 1996; Levi et al., 1980; Siegel und Chauhan, 2000). Neuronen, die nicht die erforderliche Menge an Neurotrophinen bilden können, sterben an dem sogenannten programmierten Zelltod, der Apoptose (Thoenen et al., 1987).

Obwohl die Mehrheit der Neuronen im menschlichen Gehirn bereits pränatal ausgebildet ist, sind Teile des ausgewachsenen Gehirns in der Lage, neue Neuronen aus Stammzellen zu entwickeln, man spricht dabei von der Neurogenese. Nervenwachstumsfaktoren spielen insbesondere bei der Stimulation und Kontrolle der Neurogenese eine entscheidende Rolle, allen voran BDNF (Zigova et al., 1998; Benraiss et al., 2001; Pencea, 2001). Dies wurde unter anderem in BDNF Knock-out-Studien bei Mäusen verifiziert, die eine letale Entwicklungsstörung des Gehirns und des sensorischen Nervensystems erlitten. Dieses Ergebnis suggeriert ebenfalls eine entscheidende Rolle des BDNF-Proteins in der normalen neuronalen Entwicklung (Ernfors et al., 1995).

Aktiv ist das Protein im Hippokampus, im Kortex und dem basalen Vorderhirn, Regionen die unter anderem für das Erlernen, die Erinnerung, intelligentes beziehungsweise höheres Denken sowie die Langzeitgedächtnisfunktion entscheidend sind (Yamada und Nabeshima, 2003; Bekinschtein et al., 2008).

Der Aktivierungsmechanismus des BDNF erfolgt über die Bindung an Zellmembran-Rezeptoren: Track B, ein Tyrosinkinase-Rezeptor, low affinity nerve growth factor-Rezeptor, auch unter p75 bekannt, sowie der Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ (Patapoutian und Reichardt, 2001).

Die Neurotrophinhypothese postuliert, dass eine repetitive neuronale Aktivität die Expression, Sekretion und Aktivität der Neurotrophine an der Synapse verändert und somit die synaptische Transmission und Konnektivität steuern kann (Schinder und Poo, 2000; Thoenen, 1995; Duman et al., 1997). Eine Veränderung der Neurotrophine oder ihrer Rezeptoren könnte somit unter anderem zu einer neuronalen Fehlentwicklung, Diskonnektivität, Problemen bei der Aussprossung der Neurone und Verminderung der neuronalen Plastizität führen.

Basierend auf diesen wissenschaftlichen Erkenntnissen gilt das BDNF-Gen als potentiell Kandidatengen für Abhängigkeitserkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit wird der Val66Met-Polymorphismus BDNF-Gens untersucht, der einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin in Position 66 und somit einen Austausch der Aminosäure Valin zu Methionin bewirkt (Egan et al., 2003; Bath und Lee, 2006). Es soll eine Assoziation des Val66Met-BDNF-Polymorphismus mit der Opiatabhängigkeit in einer deutschen Patientengruppe untersucht werden.

1.4. Kopplungsanalysen und Assoziationsanalysen

Als molekulargenetische Methoden zur Identifizierung krankheitsdisponierender Genvarianten stehen Kopplungsanalysen und Assoziationsanalysen zur Verfügung.

Kopplungsanalysen (Linkage-Analysen) sind besonders hilfreich bei der Identifikation von Hauptgeneffekten. Mit ihrer Hilfe konnten monogene Erkrankungen wie die Mukoviszidose oder die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne aufgeklärt werden. Hierbei dienen Sequenzvariationen der genomischen DNA, so genannte DNA-Marker, als Wegweiser auf den Chromosomen. Liegt ein DNA-Marker in der gleichen chromosomalen Region wie ein Gen, welches eine Verhaltensstörung beeinflusst, dann treten der Marker und die Verhaltensstörung nicht unabhängig voneinander auf, was als Kopplung bezeichnet wird. Kopplungsuntersuchungen analysieren die Abhängigkeit des Auftretens eines Merkmals von einem DNA-Marker (Plomin et al., 1999). Solche Untersuchungen werden unter verwandten Personen durchgeführt (Vink und Boomsma, 2002); es wird analysiert, ob der DNA-Marker und das Merkmal in einer Familie (Phänotyp) häufiger gemeinsam vererbt werden, als dies rein zufällig in der Population zu erwarten wäre (Böddeker und Ziegler, 2000; Plomin et al., 1999). Eine dem Phänotyp zugrunde liegende DNA-Sequenz und ein Marker werden mit umso geringerer Wahrscheinlichkeit durch eine Rekombination voneinander getrennt, je näher sie auf einem Chromosom zusammen liegen (Vink und Boomsma, 2002).

Die Assoziationsanalyse von Kandidatengenen besitzt vor allem bei komplexen Erkrankungen größere Aussagekraft, da in diesen Fällen Kombinationen mehrerer Gene mit geringen disponierenden Effekten zur Ätiologie beitragen. Bei klassischen Assoziationsstudien wird eine Patientenstichprobe mit einer Kontrollgruppe gesunder Personen verglichen. Hierbei wird untersucht, ob ein bestimmtes Allel eines polymorphen Gens in der erkrankten Population häufiger zu finden ist als bei gesunden Kontrollpersonen. Ein positiver Befund bedeutet in diesem Fall, dass das Allel mit der Erkrankung assoziiert ist (Böddeker und Ziegler, 2000). Der Grad der Assoziation von Allel und Krankheit wird in Form des relativen Risikos angegeben.

Durch systematisches Entschlüsseln des menschlichen Genoms mit konsekutivem Mutationsscreening in klonierten Genen stehen in den letzten Jahren immer mehr Varianten von Kandidatengenen bereit. Bei diesen Polymorphismen kann es sich einerseits um sequentielle Varianten in der kodierenden Region für ein Protein handeln, was gegebenenfalls zu strukturellen Unterschieden im Protein mit konsekutiv veränderter funktioneller Integrität führt. Andererseits kann es sich um Polymorphismen in regulatorischen DNA-Sequenzen handeln, die unter Umständen nur zu einer veränderten quantitativen Expression des Proteins führen. Es ist auch möglich, dass das assoziierte Allel selbst nicht zur Krankheit beiträgt und nur Indikatorfunktion aufgrund enger räumlicher Nähe zu einer direkt am Krankheitsgeschehen beteiligten Genvariante besitzt. Dieser Umstand darf dann vermutet werden, wenn es sich beim assoziierten Polymorphismus um eine so genannte stille Mutation im sequenzkodierenden Bereich eines Gens handelt. Hierbei liegt zwar ein Nucleotidaustausch im Gen vor, es kommt aber aufgrund des degenerierten genetischen Codes nicht zu einem Aminosäureaustausch im zugehörigen Protein.

Die Attraktivität von Assoziationsstudien ist auf die Detektion von Suszeptibilitätsgenen mit geringen Geneffekten zurückzuführen. Für eine bestehende Assoziation wird der Begriff Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium) benutzt. Dadurch wird einer der möglichen Gründe für die

Assoziation definiert, nämlich das überzufällig häufige gemeinsame Auftreten von genetischem Marker und Krankheitsgenort (Goldstein und Weale, 2001).

1.5. Aktuelle Literaturlage

1.5.1. Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens

Bereits über viele Jahre hinweg widmet sich schon die Grundlagenforschung weltweit dem Einfluss der Genvarianten des dopaminergen Systems, insbesondere den Dopaminrezeptor D3-Polymorphismen, auf multifaktoriell vererbte Erkrankungen, wie zum Beispiel der Schizophrenie, der Bipolaren Störung, der Alkoholabhängigkeit und der Substanzabhängigkeit. Bisher befassten sich dabei nur wenige Studien im Detail mit der Opiatabhängigkeit. Eine der ersten Assoziationsstudien führten Duaux et al. (1998) durch. Sie zeigten in einer Assoziationsstudie des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens, die 54 männliche, französische, opiatabhängige Personen (mittleres Alter 32,3 +/- 6,1) und 70 Kontrollen (mittleres Alter 42,2 +/- 7) einschließt, eine erhöhte Rate an homozygoten Allelträgern unter den Opiatabhängigen mit einem Sensation-Seeking-Score von ≥ 25 . Auf diese Subgruppierung sei ausdrücklich hingewiesen, da dies bereits eine Vorselektion des Patientenkollektives bedeutet (auf die enorme Wichtigkeit des Sensation-Seeking-Score bei der Abhängigkeitsentwicklung wird im folgenden noch näher eingegangen).

Li et al. (2002) untersuchten in der chinesischen Bevölkerung (Han Chinesen) eine heroinabhängige Patientengruppe von 121 Personen und eine 191 Personen große Kontrollgruppe auf eine mögliche Assoziation der Opiatabhängigkeit mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und fand keine signifikanten Unterschiede in der Allel-, Genotyp- oder Haplotypfrequenz zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe als Hinweis auf einen möglichen genetischen Risikofaktor.

Kotler et al. (1999) konnten in einer homogenen israelischen Patientengruppe (193 opiatabhängige und 134 gesunde Probanden) ebenfalls keine Assoziation der Opiatabhängigkeit mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens zeigen.

Die Assoziationsstudie von Freimer et al. (1996) untersuchte je 62 hellhäutige und dunkelhäutige, kokainabhängige Amerikaner und fand keine Assoziation mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens. Allerdings fiel ein erheblicher Unterschied in der Allelfrequenz zwischen den hell- und dunkelhäutigen Personen auf. So zeigte sich ein Übermaß an homozygoten Allelträgern des DRD3 Val I- Polymorphismus bei hellhäutigen Amerikanern mit Kokainabhängigkeit und einem SSS ≥ 24 , jedoch nicht bei dunkelhäutigen und /oder einem SSS ≤ 24 .

Comings et al. (1999) fanden bei 47 kaukasischen, kokainabhängigen Personen im Vergleich zu einer 305 Personen großen Kontrollgruppe eine erhöhte Anzahl an homozygoten Allelträgern, er bestätigte somit die Ergebnisse von Duaux et al., 1998.

Zusammenfassend sei gesagt, dass zum aktuellen Zeitpunkt bezüglich der Assoziation des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens mit einer Opiatabhängigkeit kontroverse Ergebnisse aus verschiedenen ethnischen Gruppen zusammengetragen wurden. Im Besonderen sei erwähnt, dass die vorliegenden Studien eine große Heterogenität aufweisen, zum einen hinsichtlich der Kollektivgröße, zum anderen der Untersuchung bestimmter Subgruppen, wie z. B. durch die Bestimmung eines Sensation-Seeking-Scores ≥ 25 , der bereits ein erhöhtes Risiko zur Abhängigkeitsentwicklung beinhaltet. Ein direkter Vergleich der Studienergebnisse ist somit nur eingeschränkt möglich.

Ebenfalls im Fokus der Wissenschaft stand die mögliche Komorbidität der Opiatabhängigkeitserkrankung mit anderen psychischen Erkrankungen. Dabei ist fraglich, welcher Einfluss die in der Literatur vielfach beschriebene enge Assoziation von Opiatabhängigkeit mit zahlreichen anderen Krankheitsbildern hat. Nach dem heutigen Kenntnisstand der klinischen Forschung wird die Opiatabhängigkeit nur selten nicht von einer Komorbidität begleitet. Bestes Beispiel hierfür ist die Schizophrenieerkrankung. Regier et al. (1990) zeigten in seiner Untersuchung mit 20291 amerikanischen Probanden, dass unter den schizophrenen Patienten die Drogenabhängigkeit viel höher ist als in der normalen Bevölkerung. Die Untersuchung von Krebs et al. (1998), die in einem

französischen Patientenkollektiv (89 Patienten, 52 Kontrollen) die Komorbidität von Schizophrenie und Substanzabhängigkeit in Bezug auf den Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens untersuchten, beobachtete ebenfalls eine signifikante Assoziation der beiden Erkrankungen bei einer Homozygotie des Allels 1.

Auch bei der alleinigen Betrachtung einer Assoziation der Schizophrenie mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens, wie zum Beispiel in einer Meta-Analyse von Williams et al. (1998) mit weltweit 30 Assoziationsstudien, konnte eine vermehrte Homozygotie des Allels 1 festgestellt werden.

Andererseits fehlt in der Familienstudie von Kremer et al. (2000) mit 129 palästinensischen Familientrios aus einer arabischen Population eine Assoziation des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens mit Schizophrenie. Zu demselben Ergebnis kamen auch Utsunomiya et al. (2008) in einer japanischen Assoziationsstudie und Meta-Analyse und Hawi et al. (1998) in einer irischen Patientengruppe (198 Patienten, 235 Kontrollen). Zusammenfassend, die Schizophrenieerkrankung betreffend, zeigen sich ebenfalls kontroverse Studienergebnisse.

Betrachtet man andere psychische Erkrankungen, findet man auch hier gegensätzliche Ergebnisse. So wird bei Segman et al. (1999) eine Assoziation der Homozygotie des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens mit tardiver Dyskinesie in Schizophrenie beschrieben.

Dagegen zeigten die Assoziationsstudien und Meta-Analyse von Elvidge et al. (2001) mit 229 Patienten und Kirov et al. (1999) mit 122 Familientrios negative Ergebnisse hinsichtlich einer Assoziation des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens britischer Patienten mit einer bipolaren Störung.

Konträre Ergebnisse liegen auch bei den Forschungsergebnissen der Alkoholabhängigkeit vor: Keine Assoziation besteht zwischen dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und Alkoholabhängigkeit bei Patienten ohne Konsumierung anderer Drogen, die in der Regel einen niedrigeren Sensation-Seeking-Score haben als Personen, die zusätzlich

andere Drogen konsumieren (Gorwood et al., 1995; Sander et al., 1995; Galizio et al., 1985).

Korrelierend hierzu sind die Studienergebnisse von Wiesbeck et al. (2006) anzuführen, der ebenfalls keine Assoziation der Alkoholabhängigkeitserkrankung mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens fand.

Trotz der vielen negativen Befunde hinsichtlich einer Assoziation sei an dieser Stelle noch einmal die funktionelle Wichtigkeit des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens im dopaminergen System betont, die nicht zuletzt in Experimenten mit CHO-Zellen demonstriert wurde. Eine signifikant höhere Dopamin-Bindungsaffinität wurde bei der Expression dieses Polymorphismus im Vergleich zum Wildtyp registriert (Lundstrom und Turpin, 1996).

Eine chronische Morphininjektion steigert die Expression des Dopaminrezeptor D3-Gene im dorsalen Striatum und in der Substantia nigra im ventralen Tegmentum (Spangler et al., 2003) und erhöht die Zahl der D3 Dopaminrezeptoren (Neisewander et al., 2004; Le Foll et al., 2003).

Weitere größere Studien, vor allem mit einem ethnisch homogenen Patientenkollektiv, sollten die kontroversen Untersuchungsergebnisse einer möglichen Assoziation der Opiatabhängigkeit mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens verifizieren.

1.5.2. Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens

Das Protein brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ein Protein der Familie der Nervenwachstumsfaktoren, wirkt als Neurotransmitter und spielt eine wichtige Rolle als Modulatorprotein (Egan et al., 2003). Moleküle der Familie der Nervenwachstumsfaktoren beeinflussen die Plastizität und Gesundheit im sich entwickelnden und erwachsenen Gehirn, inklusive des Belohnungs- und Abhängigkeitssystems (Nestler et al., 1997)

Daten vieler Tierversuche und genetischer Studien suggestieren eine entscheidende Rolle des BDNF im Mechanismus der Suchterkrankung. Unter anderem wurde in der Assoziationsstudie von Cheng et al. (2005) der Val66Met

Genpolymorphismus des BDNF in einer chinesischen Patientengruppe mit Amphetamin- und Heroinabhängigkeit untersucht (103 amphetaminabhängige Patienten, 200 heroinabhängige Patienten, 122 Kontrollpersonen). Die Studie wies eine unterschiedliche Genotypverteilung sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe auf, dabei zeigte die Patientengruppe eine niedrigere Met66-Allelfrequenz. Zudem wurde bei einem homozygoten Val-Genotyp ein späterer Krankheitsbeginn registriert. Die Ergebnisse deuten einen möglichen Zusammenhang dieses Polymorphismus mit einer Abhängigkeitserkrankung an, oder zumindest kann postuliert werden, dass dieser zu einem erhöhten Gefährdungspotential für eine Abhängigkeitserkrankung beisteuert.

Das im Mittelhirn lokalisierte dopaminerge System ist äußerst wichtig ist für die akute Antwort auf Opiate und die Initiierung einer Opiatabhängigkeit. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass der permanente neuronale Wechsel auf zellulärer und molekularer Ebene dem Abhängigkeitsprozess unterliegt. BDNF spielt eine Schlüsselrolle beim Überleben und der Differenzierung der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns. Es gibt Anzeichen aus Tierexperimenten (Knock-out Maus-Studien) und klinischen Studien, die eine erhöhte zentrale BDNF-Aktivität unter anderem für die Pathogenese einer Abhängigkeit verantwortlich machen.

Tsai (2007) belegte einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten BDNF-Sekretion als Antwort auf neuronale Stimulation und dem 66Val-Allel des BDNF-Gens des Val66Met Polymorphismus. Eine erhöhte Frequenz an homozygoten Allelträgern wurde bei Personen mit einer Abhängigkeit im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gefunden. Die Hypothese einer erhöhten zentralen BDNF-Aktivität bei einer Abhängigkeitserkrankung ermöglicht neue Einblicke in bessere therapeutische Strategien für eine Prävention und Behandlung.

Um effektive medikamentöse Therapieansätze für eine Abhängigkeit von Psychostimulanzien zu finden, untersuchten Corominas et al. (2007) die intrazelluläre Signalkaskade des BDNF. Es zeigte sich, dass wiederholte Kokaingaben den BDNF-Spiegel steigern und die Aktivität der zellulären Kaskade im Belohnungssystem des Gehirns verringern. Das gilt besonders

nach einigen Tagen im Anschluss an einen Entzug. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass BDNF nachhaltig die synaptische Plastizität verändert. Die synaptische Plastizität unterliegt einer sensiblen Antwort auf Psychostimulanzien. Andererseits kann diese zelluläre Kaskade durch eine Inhibierung als ein protektiver Faktor für eine Abhängigkeit angesehen werden. Knock-out-Maus-Untersuchungen von Graham (2007) zeigten die Unerlässlichkeit von BDNF für die Aufrechterhaltung einer erhöhten Kokainabgabe. Dies deutet darauf hin, dass eine dynamische Induktion und die Abgabe von BDNF aus Neuronen des Nucleus accumbens während Kokaingenusses die Entwicklung und Persistenz eines Abhängigkeitsverhaltens fördern.

Angelucci et al. (2007) identifizierten einen erniedrigten Serumspiegel an BDNF bei schizophrenen, heroinabhängigen Patienten im Vergleich zu kokainabhängigen Patienten und gesunden Kontrollen. Diese Resultate deuten ebenfalls auf eine wichtige Rolle des BDNF in der Neurotoxizität sowie der Induktion einer Abhängigkeit hin. Die Daten der Studie suggestieren, dass ein niedriger Serumspiegel an Neutrophinen das Risiko erhöht, eine Psychose bei Drogenabhängigen zu entwickeln.

In einer Studie von Kim et al. (2005) wird der Plasmaspiegel bei chronisch Metamphetamin abhängigen Patienten untersucht. Sie zeigten einen signifikant höheren Plasmaspiegel an BDNF im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe, ein Resultat, das ebenfalls die wichtige Rolle des BDNF in der Neurotoxizität hervorhebt.

Die wichtige Rolle der Neurotrophine wie BDNF als Vermittler von Drogeneffekten auf die Stimmung, die Abhängigkeit und die Neuroprotektion, wurde in einer Studie von Castrèn (2004) untersucht.

Lu et al. (2004) untersuchten an Ratten den Kokainentzug und fanden einen engen Zusammenhang mit einem enormen Drogenverlangen und einem erhöhten Pegel an BDNF in der mesolimbischen-dopaminergen Region.

Lang et al. (2007) zeigten in einer Assoziationsstudie mit kaukasischen Rauchern einen höheren Anteil an homozygoten Met-Genotypen und Met-Allelträgern. Dies deutet darauf hin, dass diese Personen anfälliger sind, mit

dem Rauchen zu beginnen sowie das Rauchen beizubehalten. Entkräftet wurde die Wertigkeit dieser Studie durch ein kontroverses Ergebnis von Montag et al. (2008), die in einer BDNF-Val66Met-Polymorphismus-Assoziationsstudie bei kaukasischen Rauchern trotz einer doppelt so hohen Probandenanzahl keine signifikante Assoziation fanden.

Die funktionelle Bedeutung des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens, insbesondere in Bezug auf die Erinnerungsfunktion und die Gedächtnisfunktion, welche in der Entwicklung einer Suchterkrankung im allgemeinen und einer Opiatabhängigkeit im speziellen eine entscheidende Rolle spielt, wurden in vivo und vitro schon von Cargill et al. (1999) demonstriert. Egan et al. (2003) zeigten bei Untersuchungen des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens, dass das Methionin-Allel mit einer geringeren Gedächtnisleistung und abnormer hippocampaler Aktivierung einhergeht.

Einen beträchtlichen Einfluss auf die Gedächtnisleistung konnte dem BDNF-Gen auch in der Untersuchung von Rybakowski et al. (2003) zugewiesen werden. Sie zeigten, dass Patienten mit einer bipolaren Störung und einem homozygoten Val-Genotyp bei einem Gedächtnistest deutlich besser abschnitten als Patienten mit dem heterogenen Val/Met-Genotyp.

In der Gedächtnisstudie von Egan et al. (2003) war das Met-Allel mit einer schlechteren Gedächtnisleistung assoziiert. Hier konnten deutliche Unterschiede der BDNF-Sekretion in Abhängigkeit der Aktivität des Met-Allels festgestellt werden.

Die Schizophrenieforschung untersuchte die Polymorphismen des BDNF-Gens und ebenfalls zeigten sich bezüglich einer Assoziation kontroverse Ergebnisse in unterschiedlichen ethnischen Gruppen. In einer asiatischen Schizophrenie-Metaanalyse, die 2050 Patienten und 2765 Kontrollen einschloss, wurde, ebenso wie in einer kleinen japanischen Fall-Kontroll-Studie mit 211 Patienten und 205 Kontrollen (Naoe et al., 2007), keine signifikante Assoziation zwischen dem Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens und Schizophrenie gefunden. Es konnte auch keine Korrelation mit dem Zeitpunkt des Krankheitsbeginns hergestellt werden.

Hingegen wurde ebenfalls in einer japanischen Assoziationsstudie mit 159 Schizophreniepatienten von Numata et al. (2006) eine Assoziation zwischen dem Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens und dem Zeitpunkt des Krankheitsbeginns sowie der Symptomstärke nachgewiesen.

Keine Korrelation konnten hingegen bei Naoe et al. (2007) in einer Fall-Kontroll-Studie und einer Metaanalyse in einem japanischen Patientenkollektiv mit 211 Patienten und 205 Kontrollen nachgewiesen werden. Auch Tochigi et al. (2006) fanden keine Anzeichen für eine Assoziation einer Schizophrenieerkrankung bei der Untersuchung 401 japanischer Patienten und 569 Kontrollen.

Chao et al. (2008) berichteten in einer afrikanisch-amerikanischen Assoziationsstudie über einen signifikanten Zusammenhang des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens mit dem Zeitpunkt des Krankheitsbeginns einer Schizophrenie und der Symptomstärke.

Eine mögliche Assoziation zwischen dem Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens und Schizophrenie wurde in einer schwedischen Assoziationsstudie von Jönsson et al. (2006) vermutet (187 Patienten, 275 Kontrollen). Eine weitere schwedische Studie von Varnäs et al. (2008) bestätigte diese positiven Studienergebnisse (96 Patienten, 104 Kontrollen).

Ebenso zeigten Zhang H et al. (2006) in mehreren Assoziationsstudien des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens und der Alzheimererkrankung, der affektive Verhaltensstörungen, der posttraumatischen Stresstörung, der Schizophrenie und der Alkohol-/Drogenabhängigkeit (Patientenanzahl 295 / 108/ 96/ 84/ 327 sowie 250 gesunde Kontrollen) keine signifikante Korrelation.

Keinen Zusammenhang zeigt sich auch bei der Untersuchung des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens und der Alzheimererkrankung bei Saarela et al. (2006) in einer finnischen Gruppe mit 97 Alzheimerpatienten, 52 Parkinsonpatienten und 101 Kontrollen. He et al. (2007) beschrieben in einem chinesischen Kollektiv ebenfalls eine fehlende Assoziation zwischen der Alzheimererkrankung und dem Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens (513 Patienten. 575 Kontrollen).

Positive Korrelationen lieferten hingegen die Alzheimer-Assoziationsstudie von Hashimoto et al. (2008) in einem japanischen Patientenkollektiv (35 Patienten) und von Cozza (2008) in einer italienischen Patientengruppe.

1.5.3. Interaktion des Dopaminrezeptor D3-Gens und des BDNF-Gens

Tierstudien an Ratten zeigten, dass die Hochregulierung des Dopaminrezeptor D3-Gens im Striatum mittels BDNF gesteuert wird (Guillin et al., 2001). Zudem wurde gezeigt, dass sowohl Ethanol die Expression von BDNF im dorsalen Striatum erhöhen. Diese Vermittlung ist spezifisch für den Dopaminrezeptor D3, da es im Gegensatz dazu zu keiner Steigerung der Expression der Dopaminrezeptoren D1 und D2 kam (Jeanblanc et al., 2006). Eine Assoziation der Opiatabhängigkeit mit Genpolymorphismen des DRD3- oder BDNF-Gens könnte ebenfalls auf neuropathologischer Ebene über eine Störung der dopaminergen Neurotransmission erklärt werden. Di Chiara et al. (1992) postulierten, dass Substanzen mit Abhängigkeitspotential die dopaminerge Aktivität im mesolimbisch-mesokortikalen Belohnungssystem stimulieren und dadurch angenehme Gefühle erzeugen, so dass diese Substanzen wiederholt zugeführt werden (Di Chiara et al., 1992, Wise et al., 1989).

Eine Assoziation zwischen dem Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens und einer subjektiven sowie objektiven Amphetaminwirkung konnte bei gesunden Testpersonen gezeigt werden (Flanagin et al., 2006). Bei ihnen wurden subjektive und physische Antworten auf die Einnahme von Amphetamin, einem indirekten Dopaminagonist, untersucht. Dabei konnte eine Steigerung der Herzfrequenz trotz subjektiv geringer Erregung der Probanden mit einem homozygoten Val-Genotyp beobachtet werden (67 Personen mit Val/Val-Genotyp, je 32 Personen mit Met/Met-Genotyp bzw. Met/Val-Genotyp). Dieses Ergebnis lässt eine Beziehung zwischen dem BDNF-Genotyp und einer Amphetaminwirkung vermuten.

Jeanblanc et al. (2006) überprüfte die Hypothese, dass die Aktivierung der BDNF-Signalkaskade zu einer Hochregulierung der downstream-Gene führt (McGough, 2004), insbesondere die des Dopaminrezeptor D3-Gens.

Diese Überlegungen und Studienergebnisse führen zu der Hypothese, dass eine enge Kopplung zwischen den Polymorphismen des Dopaminrezeptor D3-Gens und des BDNF-Gens besteht und diese sich möglicherweise auf eine Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Opiatabhängigkeit auswirkt.

1.6. Fragestellung der Arbeit

Aufgrund der hohen Mortalität und der medizinischen und sozialen Probleme der Opiatabhängigen, hat die Bedeutung der Opiatabhängigkeitserkrankung in den letzten Jahren in Deutschland erheblich zugenommen. Trotz der gesamtgesellschaftlichen Bedeutung und des individuellen Leids der Betroffenen sind die medizinischen Forschungsbemühungen der Opiatabhängigkeitserkrankung derzeit noch nicht ausreichend. Es besteht daher ein großer Bedarf an der Erforschung der Krankheitsentstehung, -entwicklung und –manifestation, um effiziente und wirksame Behandlungsmethoden zu entwickeln und zu etablieren.

Die Opiatabhängigkeit stellt keine uniforme Krankheitsentität dar, vielmehr spielen in diesem Krankheitsbild verschiedene genetische, verhaltensbiologische und ökologische Komponenten eine entscheidende Rolle. Die Induktion eines Verhaltens, das zu einer Abhängigkeit führt, wird unter anderem mit Varianten von solchen Genen in Zusammenhang gebracht, welche die strukturelle und funktionelle Integrität der dopaminergen Neurotransmittersysteme kodieren.

Basierend auf den Ergebnissen pathowissenschaftlicher Untersuchungen und invitro-Untersuchungen wurden Genpolymorphismen des Dopaminrezeptor D3 (DRD3)-Gens und des brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-Gens als potentielle Kandidatengene einer Opiatabhängigkeit identifiziert und stehen schon seit langem im Mittelpunkt der Grundlagenforschung.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens und der Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens oder deren mögliche Wechselwirkung als genetischer Prädiktor für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Opiatabhängigkeit anzusehen sind.

Die bisher durchgeführten Studien führten hierbei zu kontroversen Ergebnissen, nicht zuletzt besierend auf zum Teil sehr kleinen oder ethnisch sehr heterogenen Studienkollektiven.

Die vorliegende Arbeit stellt die bisher größte Assoziationsstudie und Kopplungsstudie des Ser9Gly Polymorphismus des Dopamin D3-Gens und des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens zur Opiatabhängigkeit eines ethnisch homogenen, deutschen Studienkollektivs dar.

Die Allelverteilung und Genotypverteilung des Studienkollektivs wurde mittels etablierter molekularbiologischer Methoden (PCR, Restriktionsenzymverdau, Gelelektrophorese) ermittelt und unter Verwendung statistischer Standardverfahren (Chi-Quadrat-Tests, Fisher`s Exact Test, Armitage's Trendtest, TDT) ausgewertet.

Abschliessend erfolgte die Beurteilung der erhobenen Ergebnisse in Bezug auf die aktuell vor liegende Studienergebnisse.

2. Material und Methoden

2.1. Studiengruppe

Insgesamt wurden 765 deutsche Individuen für diese Studie rekrutiert. Unter den 765 Individuen gab es 158 Kernfamilien, d. h. 158 opiatabhängige Patienten und deren 316 Eltern, sowie 24 opiatabhängige Patienten ohne deren Eltern. Die Kontrollgruppe bestand aus 202 Personen. Die Datenakquisition fand zwischen 1993 und 2001 statt als Teil einer Studie über genetische und psychosoziale Risikofaktoren der Alkohol- und Opiatabhängigkeit. Die Patienten waren in stationärer Entzugsbehandlung einer Opiatabhängigkeit in Mainz (1993-1995) und Bonn (1996-2001). Alle Studienteilnehmer und Kontrollpersonen wurden von Psychiatern interviewt, dabei wurden als diagnostische Interviews der Semi-Structured Assessment on the Genetics in Alcoholism (SSAGA) und das Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-III) angewendet. Nicht verwandte Kontrollpersonen wurden zufällig aus dem Populationsregister von Bonn ermittelt und, genau wie die Patienten, per E-Mail oder Telefon kontaktiert. In einer kleinen Untergruppe wurde zusätzlich der Sensation-Seeking-Score ermittelt. Das Alter der Patienten betrug 30.2 ± 6.8 Jahre, das der Kontrollen 31.8 ± 7.0 Jahre.

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn genehmigt (Nr. 01EB9418).

2.2. Diagnostische Verfahren

2.2.1. Diagnostische Interviews

Als diagnostische Interviews wurden bei der Befragung der Studienteilnehmer und Kontrollpersonen der Semi-Structured Assessment on the Genetics in Alcoholism (SSAGA) und das Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-III) angewendet

Das Semi-Structured Assessment on the Genetics in Alcoholism (SSAGA) (Bucholz et al., 1995, Hesselbrock et al., 1999) ist ein halbstrukturiertes Interview, bei dem es während der Befragung möglich ist, die gestellten Fragen umzuformulieren und dem Patienten Erklärungen zu geben, so dass dieser eine korrekte Antwort geben kann. Dieser Fragebogen wurde für die COGA-Studie

(Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism) entworfen (Begleiter et al., 1995). Es ist ein polydiagnostisches Instrument, mit dem die Themenbereiche somatische Erkrankungen, Schweregrad, Verlauf, Folgeschäden und familiäre Belastung der Alkoholabhängigkeit, Marihuana- und Drogenmissbrauch bzw. Drogenabhängigkeit, Depressionen, manische und wahnhaftige Störungen, Agoraphobie, Panikstörungen, Soziophobie, Zwangsstörungen, antisoziale Persönlichkeitsstörungen, Anorexie und Bulimie untersucht werden können (Bucholz et al., 1995; Hesselbrock et al., 1999). Bei der Befragung wird jeder der genannten Themenbereiche strukturiert abgehandelt. Es werden Fragen über den Beginn, den Verlauf, die körperlichen, psychischen und sozialen Folgen und die eventuell bereits erfolgten Therapieversuche gestellt. Dabei werden sowohl dichotome als auch offene Fragen gestellt.

Das Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen, DSM) ist ein Klassifikationssystem der American Psychiatric Association (Amerikanische Psychiatrische Vereinigung) mit Erstauflage 1952 in den USA (Spitzer et al., 1992). Zwischenzeitlich gibt es auch Ausgaben in anderen Ländern, so wie zum Beispiel seit 1996 die deutsche Publikation. Aktuell liegt die Version IV vor. Der Inhalt des DSM wird von Experten festgelegt, um Diagnosen reproduzierbar zu gestalten. Die heute in Kliniken und Versicherungsgesellschaften gebräuchlich Klassifikation dient der Erleichterung der Diagnose und Heilung. Das DSM ist im Gegensatz zur ICD-10-Klassifikation (Internationale Klassifikation der Krankheiten) ein nationales Klassifikationssystem. Es enthält fünf Achsen, auf denen Störungen beschrieben werden. Dadurch soll dem Diagnostiker nahe gelegt werden, nicht nur die Ebene der klinischen Störungen zu betrachten, sondern auch weitere bedeutsame Aspekte zu berücksichtigen. Die DSM-Klassifikation berücksichtigt, im Gegensatz zur ICD-10-Klassifikation, geschlechtsspezifische Unterschiede.

2.2.2. Sensation-Seeking und Sensation-Seeking-Score

Nach Zuckerman (1994) ist Sensation Seeking ein Persönlichkeitsmerkmal, das definiert ist durch die Suche nach verschiedenartigen, neuen und intensiven Eindrücken und Erfahrungen sowie durch die Bereitschaft, um solcher Erfahrungen willen physische, soziale, legale und finanzielle Risiken in Kauf zu nehmen. Die Vorstellung, dass Personen sich in dieser Hinsicht interindividuell unterscheiden, entwickelte Zuckerman angesichts der Befunde zahlreicher Experimente in den 1960er und 1970er Jahren, bei denen unterschiedliche Reaktionen von Probanden in Situationen sensorischer Deprivation beobachtet wurden (Zuckerman und Marvin, 1988). Der theoretischen Konzeption von Sensation-Seeking als Persönlichkeitsmerkmal folgte die Entwicklung eines entsprechenden Erhebungsinstruments, der sogenannten Sensation-Seeking-Skala (SSS) Somit können verschiedene, durch Reizsuche gekennzeichnete Verhaltenstendenzen abgefragt werden. Dabei wird Sensation-Seeking auf vier Dimensionen erfasst: „Thrill-Seeking und Adventure-Seeking“ (Suche nach ungewöhnlichen Reizen durch physische Aktivitäten und Abenteuer), „Experience-Seeking“ (Suche nach sensorischer Erfahrung und kognitiver Stimulation), „Disinhibition“ (Suche nach Stimulation durch soziale Begegnungen) und „Boredom Susceptibility“ (Intoleranz gegenüber Langeweile). Man unterscheidet High-Sensation-Seeker von Low-Sensation-Seekern. Validierungsstudien zeigten eine Korrelation von Verhaltensweisen im Alltag. High-Sensation-Seeker neigen zu einem breiteren Spektrum riskanter und unkonventioneller Aktivitäten, suchen variierende sexuelle Erfahrungen, neigen zu Drogen-, Nikotin- sowie Alkoholkonsum und haben eher eine unkonventionelle politische und ethisch-moralische Lebenseinstellung. Psychopathologische Untersuchungen zeigen eine Assoziation eines hohen Sensation-Seeking-Score mit Störungen, die von ihrer Symptomatik her durch ein hochaktives, unkonventionelles und nach Veränderung suchendes Verhalten beschrieben werden. Sensation-Seeking scheint ein geschlechtsspezifisches Merkmal zu sein, denn in zahlreichen Untersuchungen fanden sich bei Männern höhere Werte als bei Frauen. Untersuchungen zeigen auch eine Assoziation zwischen Sensation-Seeking und dem Alter. Hohe

Sensation-Seeking Werte werden vor allem bei jüngeren Personen beobachtet. Keine gravierende Rolle spielen hingegen Bildung, sozioökonomischer Status und kulturelle Aspekte.

Erste Anhaltspunkte dafür, dass Sensation-Seeking ein zum Teil biologisch fundiertes Persönlichkeitsmerkmal ist, also zu einem gewissen Grad angeboren ist, ergaben sich aus Tierexperimenten. Dabei wurde das Explorationsverhalten unterschiedlichen Tierpopulationen in neuen Umgebungen über mehrere Nachfolgenerationen hinweg untersucht. Es zeigte sich, dass dieses relativ stabil blieb. Zwillingspaarstudien kamen zu einem ähnlichen Ergebnis und schätzen den Anteil der Vererbung auf etwa 50 bis 60 Prozent (Fulker D, Eysenck SBW und Zuckerman M, 1980). Dabei werden nicht die komplexen Verhaltensmuster vererbt, sondern biologische Prädispositionen, inwieweit solche Verhaltensmuster überhaupt erlernt werden können oder nicht. Die Annahme einer biologischen Fundierung des Persönlichkeitsmerkmals Sensation-Seeking ist nicht unumstritten (Asendorpf, 1996). Insbesondere der Nachweis der vermuteten neurophysiologischen und neurochemischen Korrelate gestaltet sich schwierig. Gesichert scheint jedenfalls die Annahme, dass es sich bei Sensation-Seeking um ein relativ stabiles Merkmal von Individuen handelt, auf dessen Grundlage unterschiedliche Verhaltenstendenzen differenziert werden können.

In der untersuchten Studiengruppe wurde in einer Untergruppe der opiatabhängigen Patienten und der Kontrollgruppe der dichotomisierte Sensation-Seeking-Score ermittelt. Dabei wird zwischen einem Wert von ≥ 25 (High-Sensation-Seeker) und ≤ 24 (Low-Sensation-Seeker) unterschieden.

2.3. Statistische Verfahren

In dieser Arbeit ist der Fisher's Exact Test, der Armitage's Trendtest, der Chi-Quadrat-Test und der Test auf Hardy-Weinberg-Verteilung (TDT) mit den Computerprogrammen Statistical Analysis System (SAS) berechnet worden.

Der Fisher's Exact Test ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel, sogenannter Kreuztabellen absoluter Häufigkeiten bestimmter Merkmalsausprägungen, welcher auch bei einer geringen Anzahl von

Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Er geht auf den britischen Statistiker Ronald Aylmer Fisher (1890-1962) zurück. Im Anwendungsgebiet entspricht er dem Chi-Quadrat-Test.

Der Armitage's Trendtest erlaubt es zu überprüfen, ob eine Reihe von Proportionen (oder die entsprechenden Zählungen, gespeichert in Form einer $R \times 2$ Kontingenztabelle) als linear variierend in Funktion einer ordinalen oder kontinuierlichen Variable angesehen werden kann. Es ist dem Chi-Quadrat-Test verwandt, der es erlaubt zu überprüfen, ob eine Abhängigkeit zwischen den Zeilen und Spalten einer Kontingenztabelle besteht.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (TDT) besagt, dass die Häufigkeit der Homozygoten sowie der Heterozygoten über Generationen hinweg konstant bleibt, wenn die Population sehr groß ist, die Individuen sich uneingeschränkt paaren können, es zu keiner Selektion bestimmter Allele kommt, keine Genmigration stattfindet und keine Mutationen auftreten. Das Hardy-Weinberg Gleichgewicht entspricht der erwarteten Genotypverteilung, basierend auf der beobachteten Häufigkeit (p) für das Allel A und (q) für das Allel B.

Die Formel für die Berechnung lautet: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, mit

p^2 = erwartete Häufigkeit für den homozygoten Typ AA

q^2 = erwartete Häufigkeit für den homozygoten Typ BB

$2pq$ = erwartete Häufigkeit für den heterozygoten Genotyp AB

Hier wird also überprüft, ob die Allel-Häufigkeit auch mit der gefundenen Genotyp-Verteilung im Einklang steht. Würden die beobachteten Häufigkeiten im Kontrollkollektiv von den erwarteten Häufigkeiten abweichen, wäre dies ein Hinweis auf das Vorliegen eines Selektions-Bias.

Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests überprüft.

Zur Errechnung von Häufigkeits- und Prozentverteilungen wurden Verfahren der deskriptiven Statistik angewandt. Zusätzlich wurde eine lineare Regression durchgeführt, um die Beziehung zwischen den einzelnen Variablen sowie den untersuchten Genotypen zu explorieren.

2.4. Kopplungs- und Assoziationsstudien

Es gibt zwei Studienstrategien, um die menschlichen Gene zu identifizieren, die in Beziehung zu komplexen Erkrankungen stehen. Beide Methoden messen in differierender Weise eine Abweichung vom Mendelschen Gesetz, der unabhängigen Vererbung. Sie sind einander ergänzende Analysen zur Identifikation von Kandidatengenen.

Einerseits können Untersuchungen des ganzen Genoms durch Kopplungsanalysen durchgeführt werden, welche nicht auf bestimmten biologischen Hypothesen beruhen und im Rahmen von Familienstudien auf die Identifikation chromosomaler Regionen mit prädisponierenden Genen abzielen. Andererseits können ausgewählte Gene in Allelassoziationsstudien untersucht werden. Assoziationsstudien besitzen eine genügend hohe Sensitivität zum Auffinden auch geringer Gendefekte, sie sind jedoch auf die Auswahl plausibler Kandidatengene angewiesen.

2.5. Experimentelle Arbeit

2.5.1. Geräte

Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Elektroporator	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Gene Amp PCR System	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Fotoausrüstung	Cu5 Land Camera, Polaroid (Frankfurt)
Heizmagnetprüher	Monotherm, Merck KGaA (Darmstadt)
Minischüttler	MS1, IKA-Works. Inc.(Wilmington, USA)
Netzgerät (Blot)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
pH-Meter	pH320, SenTix 97T, WTW, Eich (Bonn)
Schüttler	Promax 1020, Heidolph, Fisher (Düsseldorf)
Sterilbank	Hera safe, Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus Instrument GmbH (Osterode)
UV-Lampe	Typ Chroma 4, Vetter GmbH (Wiesloch)
Vakuumpumpe	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Waage	Sartorius L 610, Göttingen
Wasserbad	2219 Multitemp II (Burgwedel)

Vortex Genie 2 Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
 Zentrifuge 400R, Heraeus Instruments GmbH (Osterode)

2.5.2. Enzyme und Längenstandards

100bp DNA Leiter Roche Molecular Biochemicals (München)
 DNS-Standard VI Roche Molecular Biochemicals (München)
 dNTP Set Applied Biosystems (New Jersey, USA)
 Msc I R0534S, New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
 Pml I R0532S, New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
 Taq DNA Polymerase Amersham Pharmacia Biotech (New Jersey, USA)

2.5.3. Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer für die Assoziationsuntersuchungen wurden von der Firma Thermo Hybaid in Ulm synthetisiert. Ihre Sequenzen sind im Folgenden aufgelistet.

Gen	Oligonukleotid-Sequenz	
DRD3	<i>Fwd</i>	5`-GCTCTATCTCCA ACTCTCACA -3`
	<i>Rew</i>	5`-AAGTCTACTCACCTCCAGGTA-3`
BDNF	<i>Fwd</i>	5`-GCCACTTTATCTCCTCCAGT-3`
	<i>Rew</i>	5`-AGCACTAGCTGCCTATTCCA-3`

2.5.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierung genomischer DNA auf der Basis von Kandidatengen-Markern erfolgte durch das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1987). Mit dieser Methode können definierte Nukleinsäuresequenzen in vitro in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Dazu werden einzelsträngige Oligonukleotide benötigt (Primer), die komplementär zu den 3'-Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Die DNA-Polymerase verlängert unter geeigneten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die an die Matrize angelagerten Primer am 3'-Ende entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-

Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Die gesamte Reaktion basiert auf drei zyklisch sich wiederholenden Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Im ersten Schritt, der Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei ca. 90 °C, wird die DNA in Einzelstränge aufgespalten. Beim Annealing, dem zweiten Schritt bei einer Primer spezifischen Temperatur zwischen 50 °C und 74 °C, hybridisieren die Oligonukleotidprimer mit den beiden DNA-Matrizensträngen und dienen damit im dritten Schritt, der Polymerisation bei 72 °C, der DNA-Polymerase als Startmoleküle zur Kopierung der beiden Matrizenstränge. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Startmolekülen eingerahmten Matrizenfragments und wird im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial. Im nächsten Reaktionszyklus dienen auch die Produkte des vorangegangenen Zyklus als Matrizen für die DNA-Polymerase. Die hierbei entstehenden DNA-Moleküle sind in ihrer Länge durch die eingesetzten Primer definiert. Ab dem folgenden Zyklus vermehrt sich die Zielsequenz exponentiell. Nach 20 Zyklen sollte die gewünschte DNA um den Faktor 220 vermehrt sein. Allerdings sei hier angemerkt, dass die Reaktionsausbeute im Schnitt bei ca. 85% liegt. Des Weiteren ist nach 20 bis 25 Zyklen durch sinkende Effizienz nur noch eine lineare Zunahme der Amplifikate zu erwarten. Ursache dafür ist die im Reaktionsverlauf relativ zum Amplifikat zunehmend geringer werdende Primerkonzentration mit der Folge der Renaturierung der DNA-Matrizen. Um einen vorzeitigen Start der PCR zu vermeiden, wurden alle Reaktionsansätze auf Eis pipettiert.

2.5.5. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)

Restriktions-Endonukleasen des Typs III spalten DNA an spezifischen, meist palindromischen Sequenzen. Wird durch Mutation eine Base in einer solchen Sequenz verändert, spaltet das betreffende Restriktionsenzym an dieser Stelle nicht mehr. Umgekehrt können durch Mutation neue Restriktionsstellen entstehen. Werden DNA-Abschnitte aus zwei genetisch nicht identischen Individuen mit Restriktions-Endonukleasen behandelt, ergeben sich häufig Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge, welche elektrophoretisch dargestellt werden können. Diese Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen

(RFLPs) sind somit Indikatoren sequentieller Aberrationen in den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme.

2.5.6. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Grundprinzip aller elektrophoretischen Trennmethoden ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld zu einer Elektrode umgekehrter Polarität. Elektrophoresen werden zumeist in einer elektrisch neutralen, halbfesten Gelmatrix aus Agarose oder Polyacrylamid (PAGE = Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese) durchgeführt. Nukleinsäuren besitzen aufgrund der Phosphatgruppen im Molekül eine negative Nettoladung. In vorgefertigte Taschen eines Gels eingebracht, wandern Nukleinsäuren nach Anlage einer elektrischen Spannung zur Anode. Diese Wanderung erfolgt umso schneller, je kleiner die Nukleinsäure-Moleküle sind. Die dabei zurückgelegte Strecke ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes der entsprechenden Nukleinsäure (Helling et al., 1974). Agarose- und Polyacrylamid-Gele wirken wie molekulare Siebe. Die Größe der Poren begrenzt dabei die Geschwindigkeit der Wanderung des Nukleinsäure-Moleküls im Gel, dabei bestimmt bei Agarosegelen die Agarosekonzentration die Porengröße. Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist die Standardmethode zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von Nukleinsäuren und erlaubt die Trennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 70 bis 60000 Basenpaaren. Die Agarosekonzentration im Gel betrug 3 %. Der Gell-Lauf erfolgte jeweils in einfach konzentriertem TBE-Puffer. Für die Herstellung eines einfach konzentrierten TBE-Puffers (pH 8,0) wurden 10,781 g (89 mmol) TRIS, 5,501 g (89 mmol) Borsäure und 0,744 g (2 mmol) EDTA-Na₂ mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Nukleinsäuren wurden mit Ethidiumbromid angefärbt (2 µl pro 100 ml Gel). Dieses planare Molekül interkaliert in die DNA und verstärkt damit sein Fluoreszenzverhalten unter UV-Anregung bei 320 nm, so dass die angefärbten Molekülbanden erkennbar werden.

2.5.7. Kandidatengen-Polymorphismen

Die Auswahl der Kandidatengen-Polymorphismen erfolgte unter Berücksichtigung der funktionellen Relevanz der Polymorphismen. Die untersuchten Kandidatengen-Polymorphismen mit dem entsprechenden Aminosäureaustausch und des daraus resultierenden Basenaustauschs, sowie deren Lokalisation sind der folgenden Auflistung zu entnehmen.

Gen	Lokalisation	Aminosäure-austausch	Basen-austausch	Restriktions-enzym
DRD3	3q13.3	A-G	Ser9Gly	Msc I
BDNF	11p13	A-G	Val66Met	Pml I

2.5.7.1. DNA-Amplifikation der Kandidatengen-Polymorphismen mittels PCR

100 ng genomische DNA wurden als Template für die PCR eingesetzt. Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Volumen von 20 µl und enthielten je 0,4 µmol der Primer, 50 mmol KCl, 1,5 mmol MgCl₂, 200 µmol dNTPs, 1 µl DMSO (unterbindet die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Template-DNA) und 1,5 Units Taq-Polymerase sowie ein Zehntel des Gesamtvolumens im Ansatz 10 x Polymerase-Puffer. Nach initialer Denaturierung bei 95 °C für 4 Minuten folgten 35 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Hybridisierung der Primer bei 56 °C und 30 s Synthese bei 72 °C. Im Anschluss folgte eine finale Elongation bei 72 °C für 10 Minuten.

2.5.7.2. DNA-Verdau

2.5.7.2.1. Ser/Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3 (DRD3) –Gens

10 µl des PCR-Produkts wurden in einem Endvolumen von 50 µl mit 4 Units MscI-Enzym 90 Minuten bei 37 °C im Wasserbad verdaut. Der Polymorphismus resultiert aus einem Einzelbasenaustausch von A zu G, 3q13.3. Durch diese Basensubstitution ergibt sich neben zwei konstanten Schnittstellen noch eine zusätzliche Schnittstelle beim G-Allel für die Restriktionsendonuklease Msc I. Nach dem Verdau des 462 bp langen PCR-Produkts mit Msc I entstehen beim

Allel 1 (Ser-9) ein 304 bp-Produkt, beim Allel 2 (Gly-9) ein 206 bp-Produkt, sowie bei beiden Allelen ein 111 bp-Produkt. Die PCR-Produkte wurden in 3 %-igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid gefärbt.

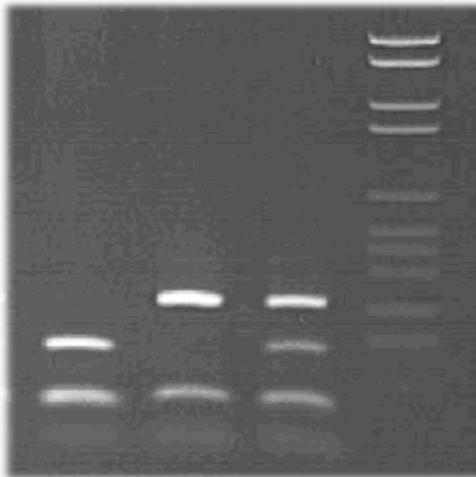


Abb.1: Restriktionsfragmentlängenmuster für Msc I zum Nachweis des Ser/Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens:

Von links nach rechts: Spur 1: Homozygoter Wildtyp (Ser/Ser) ohne Schnittstelle für Msc I mit Fragmenten von 206 bp- und 111 bp-Länge Länge. Spur 2: Homozygoter Mutationstyp (Gly/Gly) mit Schnittstellen für Msc I auf allen DNS-Strängen und Fragmenten von 304 bp- und 111 bp-Länge. Spur 3: Heterozygoter Genotyp (Ser/Gly) mit Fragmenten von 304 bp-, 206 bp- und 111 bp. Spur 4: DNS-Standard VI

2.5.7.2.2. Val66Meth-Polymorphismus des brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-Gens

10 µl des PCR-Produkts wurden in einem Endvolumen von 50 µl mit 4 Units PmlI-Enzym 90 Minuten bei 37 °C im Wasserbad verdaut. Die Länge des ursprünglichen PCR-Produkts betrug 300 bp. Nach Restriktionsverdau mit dem Enzym PmlI entstehen bei Vorliegen des G-Allels zwei Fragmente von 200 bp und 100 bp Länge. Das A-Allel wird von der Restriktionsendonuklease PmlI nicht geschnitten, das ursprüngliche PCR-Produkt in einer Länge von 300 bp liegt vor. Bei einem heterozygoten Genotyp entstehen 3 Fragmente in einer Größe von 300 bp, 200 bp und 100 bp. Die PCR-Produkte wurden mit einem 3%-igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid gefärbt.

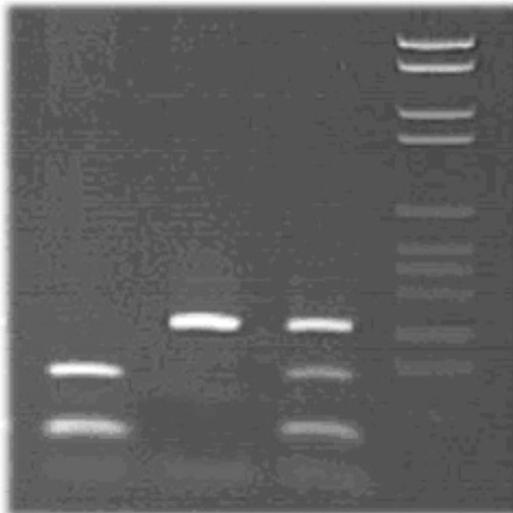


Abb.2: Restriktionsfragmentlängenmuster zum Nachweis der Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens:

Von links nach rechts: Spur 1: Homozygoter Genotyp G mit Schnittstelle für PmlI und Fragmenten von 200 bp- und 100 bp-Länge. Spur 2: Homozygoter Genotyp A ohne Schnittstelle für PmlI mit unverdaulichem 300 bp PCR-Produkt. Spur 3: Heterozygoter Genotyp A/G mit Fragmenten von 300 bp-, 200 bp- und 100 bp-Länge. Spur 4: DNS-Standard VI

3. Ergebnisse

3.1. Daten

Es wurden die Genotypen des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens sowie des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens von 158 Patienten und deren 316 Eltern (158 Kernfamilien) analysiert. Bei drei dieser Familien waren die Genotypen des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens unvollständig, bei einer Familie konnte kein Genotyp des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens ermittelt werden.

Die Verteilung dieser Familien gemäß der Anzahl der erkrankten (im Weiteren nur noch „kranke Kinder“ genannt) und gesunden Kinder ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Dabei lagen Genotypen von 103 Familien mit nur einem kranken Kind, von 4 Familien mit 2 kranken Kindern und einer Familie mit 3 kranken Kindern vor. Bei 42 Familien gab es je ein krankes und ein gesundes Kind, bei 5 Familien ein krankes und 2 gesunde Kinder, bei zwei Familien jeweils 2 kranke und ein gesundes Kind und bei einer Familie ein krankes und 3 gesunde Kinder.

Familienanzahl	Anzahl gesunde Kinder	Anzahl kranke Kinder
103	0	1
42	1	1
4	0	2
5	2	1
2	1	2
1	0	3
1	3	1

Tab. 1: Familiengrößen

Bei insgesamt 76 der Patienten der Kernfamilien wurde ein Sensation-Seeking-Score bestimmt, dabei wurde der Sensation-Seeking-Score bei 50% der Patienten (also in 38 Fällen) mit ≤ 24 und bei den übrigen 50% der Patienten mit ≥ 25 angegeben.

Bei weiteren 24 opiatabhängigen Patienten (im Weiteren nur noch „Patienten“ genannt) wurde der Genotyp des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens ermittelt, wobei nur bei einer Person dieser Gruppe zusätzlich auch der Genotyp des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens bestimmt werden konnte und auch nur bei einer Person eine Angabe zum Sensation-Seeking-Score vorlag.

Die Kontrollgruppe bestand aus 204 Personen. Bei 202 Kontrollpersonen konnte der Genotypen beider untersuchten Polymorphismen bestimmt werden, bei zwei Personen war die Genotypbestimmung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens nicht möglich. Bei 67 dieser Kontrollpersonen gab es eine Angabe zum Sensation-Seeking-Score, davon wiesen 55 Personen einen Sensation-Seeking-Score ≤ 24 und 12 Personen einen Sensation-Seeking-Score ≥ 25 auf.

3.2. Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens

3.2.1. Analyse der Familienstichprobe

Die Tabelle 2 beinhaltet die Ergebnisse der Analysen für den Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens der Kernfamilien. Sie enthält die Verteilung der Familien auf die verschiedenen möglichen Kombination von elterlichen Allelen und die dazugehörigen Genotypen der kranken Kinder

Allelkombination der Eltern	Genotyp de kranken Kinder		
	11	12	22
11 x 11	47	0	0
11 x 12	23	25	0
11 x 22	0	12	0
12 x 12	9	17	7
12 x 22	0	9	5
22 x 22	0	0	1

Tab. 2: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: Allelkombination der Eltern und die dazugehörigen Genotypen der kranken Kinder.

Zum Testen auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden nur die Kontrollen benutzt, die aus den nicht vererbten elterlichen Allelen gebildet werden (Tabelle 3).

Die Genotyp-Häufigkeiten des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens zeigen bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in der Patientengruppe keine signifikante Abweichung.

	Genotyp der Kontrollen			R	P
	11	12	22		
Anzahl	79	57	19	2,82	0,931

Tab. 3: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: Test auf HWE bei den Kontrollen mit Prüfgröße R und P-Wert des Chi-Quadrat-Tests.

Im Anschluss daran wurden die Anzahl der Transmissionen (TR) sowie der Nicht-Transmissionen (NTR) des Allels „1“ von heterozygoten Eltern ermittelt (Tabelle 4).

	TR	NTR	R	P
Anzahl	67	61	0,28	0,5959

Tab. 4: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: TDT bei den Kontrollen mit Prüfgröße R und P-Wert des Chi-Quadrat-Tests. Transmissionen (TR) und Nicht-Transmissionen (NTR) des Allels „1“.

3.2.2. Analyse der Unterteilung der kranken Kinder in Abhängigkeit des Sensation-Seeking Scores

Analog zur Familienstichprobe wurden bei den kranken Kindern die Ergebnisse für die drei Untergruppen analysiert, die durch einen unterschiedlichen Sensation-Seeking-Score definiert sind. Dabei betrachtet man zum einen die kranken Kinder mit einem Sensation-Seeking-Score ≥ 25 (Tabelle 5), sowie die kranken Kinder mit einem Sensation-Seeking-Score ≤ 24 (Tabelle 6) bzw. die kranken Kinder ohne Angaben eines Sensation-Seeking-Scores (Tabelle 7).

Allelkombination der Eltern	Genotyp der kranken Kinder		
	11	12	22
11 x 12	6	5	0
11 x 22	0	2	2
12 x 12	1	7	2
12 x 22	0	3	1
22 x 22	0	0	0

Tab. 5: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: Allelkombination der Eltern und Genotyp der kranken Kinder mit einem SSS \geq 25.

Allelkombination der Eltern	Genotyp der kranken Kinder		
	11	12	22
11 x 12	0	5	3
11 x 22	0	3	0
12 x 12	3	5	4
12 x 22	0	3	0
22 x 22	0	0	0

Tab. 6: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: Allelkombination der Eltern und Genotyp der kranken Kinder mit einem SSS \leq 24.

Allelkombination der Eltern	Genotyp der kranken Kinder		
	11	12	22
11 x 12	12	17	0
11 x 22	0	7	0
12 x 12	5	5	1
12 x 22	0	3	4
22 x 22	1	0	0

Tab. 7: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: Allelkombination der Eltern und Genotyp der kranken Kinder ohne Angabe zum SSS.

In Tabelle 8 werden die Ergebnisse des Tests auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei den Untergruppen der Indexperson in Bezug auf den Sensation-Seeking-Score dargestellt.

Die Genotyp-Häufigkeiten des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens zeigen bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in keiner der drei Untergruppen (Personen mit einem Sensation-Seeking-Score ≥ 25 , Personen mit einem Sensation-Seeking-Score ≤ 24 , Personen ohne Angaben eines Sensation-Seeking-Scores) eine signifikante Abweichung.

SSS	Genotyp			R	P
	11	12	22		
≥ 25	18	16	4	0,02	0,8744
≤ 24	19	13	6	1,93	0,1653
unbekannt	42	28	9	1,58	0,2091

Tab. 8: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: Test auf HWE bei den Untergruppen der kranken Kinder in Bezug auf den SSS mit Prüfgröße R und P-Wert.

Tabelle 9 zeigt die Auflistung der ermittelten Anzahl der Transmissionen (TR) und der Nicht-Transmissionen (NTR) des Allels „1“ von heterozygoten Eltern in der Untergruppe der kranken Kinder in Bezug auf den Sensation-Seeking-Score an.

SSS	TR	NTR	R	P
≥ 25	18	17	0,03	0,8658
≤ 24	19	16	0,26	0,6121
unbekannt	30	28	1,58	0,2091

Tab. 9: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: TDT bei den Untergruppen der kranken Kinder in Bezug auf den SSS mit Prüfgröße R und P-Wert. Transmission (TR) und Nicht-Transmission (NTR) des Allels „1“.

3.2.3. Vergleich der Genotypverteilungen aller opiatabhängigen Patienten und Kontrollpersonen

Im Folgenden werden die opiatabhängigen Patienten ohne vorliegende Elterndaten als „Patienten“ bezeichnet, hingegen werden die opiatabhängigen

Patienten aus den Kernfamilien „kranke Kinder“ genannt und die Eltern als „Pseudokontrollen“ bezeichnet.

Die Genotyp-Häufigkeiten des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens zeigen bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts weder bei den Patienten, noch bei den kranken Kindern, den Kontrollpersonen und den Pseudokontrollen eine signifikante Abweichung.

	Genotyp			Summe
	1/1	1/2	2/2	
Patienten	16 66,67%	8 33,33%	0 0%	24
Kontrollen	97 48,02%	85 42,08%	20 9,9%	202
Kranke Kinder	79 50,32%	65 41,4%	13 8,28%	157
Pseudokontrollen	79 50,97%	57 36,77%	19 12,26%	155
Summe	271	215	52	538

Tab. 10: Genotypverteilung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens in den verschiedenen Untergruppen

		Chi ² - Test	Fisher´s Exact Test	Armitage´s Trend Test
Patienten vs. Kontrollen	R	4,2667		3,2273
	P	0,1184	0,1391	0,0724
Kranke Kinder vs. Pseudokontrollen	R	1,6368		1,1381
	P	0,4411	0,4514	0,2861
Patienten vs. Kranke Kinder	R	3,3833		2,6683
	P	0,1842	0,2378	0,1024
Kontrollen vs. Pseudokontrollen	R	1,2212		0,3373
	P	0,5430	0,5337	0,5614
Pseudo-/Kontrollen vs. Patienten/kranke Kinder	R	1,9914		1,9894
	P	0,3695	0,3888	0,1584

Tab. 11: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: Ergebnisse diverser Gruppenvergleiche mittels des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher´s Exact Tests und des Armitage´s Trend Test mit Prüfgröße R und P-Wert.

Die Tabellen 10 und 11 beinhalten die Ergebnisse diverser Gruppenvergleiche mittels des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Test für Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens.

3.2.4. Vergleich der Genotypverteilungen verschiedener Untergruppen

3.2.4.1 Analyse der Untergruppe Sensation-Seeking-Score

Tabelle 12 beinhaltet die Genotypverteilung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens bei Kontrollen und kranken Kindern mit einem Sensation-Seeking-Score ≥ 25 .

In Tabelle 13 werden die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Tests für den Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens dargestellt, wenn nur Personen mit einem SSS ≥ 25 in die Analyse einbezogen werden.

	Genotyp			Summe
	1/1	1/2	2/2	
Kontrollen	7 58,33%	4 33,33%	1 8,33%	12
Kranke Kinder	18 47,74%	17 44,74%	3 7,89%	38
Summe	25	21	4	50

Tab. 12: Genotypverteilung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens bei Kontrollen und kranken Kindern mit einem SSS ≥ 25 .

		Chi ² - Test	Fisher's Exact Test	Armitage's Trend Test
Kranke Kinder vs. Kontrollen	R	0,5039		0,0047
	P	0,7773	0,7863	0,9454

Tab. 13: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Test, Fisher's Exact Test und des Armitage's Trend Test mit Prüfgröße R und P-Wert bei Kontrollen und kranken Kindern mit einem SSS ≥ 25 .

3.2.4.2 Analyse der Untergruppe Männer

Tabelle 14 zeigt die Genotypverteilung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens bei männlichen Kontrollen, männlichen kranken Kindern und männlichen Pseudokontrollen. Die dazugehörigen Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Test werden in Tabelle 15 dargestellt.

	Genotyp			Summe
	1/1	1/2	2/2	
Patienten	10 71,43%	4 28,57%	0 0%	14
Kontrollen	66 44,3%	68 45,64%	15 10,07%	149
Kranke Kinder	61 52,59%	46 39,66%	9 7,76%	116
Pseudokontrollen	62 53,45%	42 36,21%	12 10,34%	116
Summe	199	160	36	395

Tab. 14: Genotypverteilung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens bei der Betrachtung der männlichen Personen.

		Chi ² Test	Fisher's Exact Test	Armitage Trend Test
Patienten vs. Kontrollen	R	4,2739	0,1643	2,2091
	P	0,1180		0,1372
Kranke Kinder vs. Pseudokontrollen	R	0,6185	0,7559	0,3840
	P	0,7340		0,5355
Patienten vs. Kranke Kinder	R	2,2973	0,4804	1,5596
	P	0,3171		0,2117
Kontrollen vs. Pseudokontrollen	R	2,5336	0,2805	0,0255
	P	0,2817		0,8730
Pseudo-/Kontrollen vs. Patienten/Kranke Kinder	R	1,9106	0,4098	1,4013
	P	0,3847		0,2365

Tabelle 15: Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens bei der Betrachtung der männlichen Personen: Ergebnisse diverser Gruppenvergleiche mittels des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Tests mit Prüfgröße R und P-Wert.

3.3. Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens

3.3.1. Analyse der Familienstichprobe

Die Tabelle 16 beinhaltet die Ergebnisse der Analysen für den Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens. Sie enthält die Verteilung der Familien auf die verschiedenen möglichen Kombination von elterlichen Allelen und die dazugehörigen Genotypen der kranken Kinder.

Allelkombination der Eltern	Genotyp der kranken Kinder		
	11	12	22
11 x 12	31	24	0
11 x 22	0	7	0
12 x 12	7	15	5
12 x 22	0	1	3
22 x 22	0	0	2

Tab. 16: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Allelkombination der Eltern und Genotypen der kranken Kinder.

Zum Testen auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden nur die Kontrollen benutzt, die aus den nicht vererbten elterlichen Allelen gebildet werden (Tabelle 17).

	Genotyp der Kontrollen			R	P
	11	12	22		
Anzahl	91	56	10	0,12	0,727

Tab. 17: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Test auf HWE bei den Kontrollen mit Prüfgröße T und P-Wert des Chi-Quadrat-Tests. Transmissionen (TR), Nicht-Transmissionen (NTR).

Die Genotyp-Häufigkeiten des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens zeigen bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in der Patientengruppe keine signifikante Abweichung.

Tabelle 18 enthält die ermittelte Anzahl der Transmissionen (TR) sowie der Nicht-Transmissionen (NTR) des Allels "1" von heterozygoten Eltern.

	TR	NTR	R	P
Anzahl	61	52	0,72	0,3972

Tab. 18: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: TDT bei den Kontrollen mit Prüfgröße R und P-Wert des Chi-Quadrat-Tests. Transmission (TR) und Nicht-Transmission (NTR) des Allel „1“.

3.3.2. Unterteilung der kranken Kinder nach dem Sensation-Seeking-Score

Analog zur Familienstichprobe wurden die Ergebnisse für die durch den Sensation-Seeking-Score bei den kranken Kindern definierten drei Untergruppen analysiert. Dabei betrachtet man kranke Kinder mit einem Sensation-Seeking-Score ≥ 25 (Tabelle 19), kranke Kinder mit einem Sensation-Seeking-Score ≤ 24 (Tabelle 20) und kranke Kinder ohne Angaben eines Sensation-Seeking-Scores (Tabelle 21).

Die Genotyp-Häufigkeiten des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens zeigen bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts weder in der Untergruppe der kranken Kinder mit einem Sensation-Seeking-Score ≥ 25 , noch bei einem Sensation-Seeking-Score ≤ 24 oder ohne Angaben eines Sensation-Seeking-Scores eine signifikante Abweichung.

Allelkombination der Eltern	Genotyp der kranken Kinder		
	11	12	22
11 x 12	4	7	0
11 x 22	0	2	0
12 x 12	4	4	1
12 x 22	0	1	1
22 x 22	0	0	0

Tab. 19: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Allelkombination der Eltern und Genotypen der kranken Kinder mit SSS ≥ 25 .

Allelkombination der Eltern	Genotyp der kranken Kinder		
	11	12	22
11 x 12	8	4	0
11 x 22	0	2	0
12 x 12	0	5	1
12 x 22	0	0	1
22 x 22	0	0	0

Tab. 20: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Allelkombination der Eltern und Genotypen der kranken Kinder mit SSS \leq 24.

Allelkombination der Eltern	Genotyp der kranken Kinder		
	11	12	22
11 x 12	19	13	0
11 x 22	0	3	0
12 x 12	3	6	3
12 x 22	0	0	1
22 x 22	0	0	2

Tab. 21: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Allelkombination der Eltern und Genotypen der kranken Kinder ohne Angabe zum SSS.

Die Genotyp-Häufigkeiten des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens zeigen bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in keiner der drei Untergruppen (Personen mit einem Sensation-Seeking-Score \geq 25, Personen mit einem Sensation-Seeking-Score \leq 24, Personen ohne Angaben eines Sensation-Seeking-Scores) eine signifikante Abweichung.

In Tabelle 22 werden die Ergebnisse des Tests auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei den Untergruppen der kranken Kinder in Bezug auf den Sensation-Seeking-Score dargestellt.

Im Anschluss daran wurden die Anzahl der Transmissionen (TR) sowie der Nicht-Transmissionen (NTR) des Allels "1" von heterozygoten Eltern ermittelt (Tabelle 23).

SSS	Genotyp			R	P
	11	12	22		
≥ 25	21	11	5	2,67	0,1022
≤ 24	22	16	0	2,70	0,1002
unbekannt	48	29	5	0,05	0,8251

Tab. 22: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Test auf HWE bei den Untergruppen der Indexperson in Bezug auf den SSS mit Prüfgröße R und P-Wert.

SSS	TR	NTR	R	P
≥ 25	17	14	0,29	0,59
≤ 24	13	12	0,04	0,8415
SSS unbekannt	31	26	0,44	0,5078

Tab. 23: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: TDT bei den Untergruppen der Indexperson in Bezug auf den SSS mit Prüfgröße R und P-Wert. Transmission (TR) und Nicht-Transmission (NTR) des Allels „1“.

3.3.3. Vergleich der Genotypverteilungen aller opiatabhängigen Patienten und Kontrollpersonen

Die Genotyp-Häufigkeiten des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens zeigen bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts weder bei den Patienten, noch bei den kranken Kindern aus den Kernfamilien, den Kontrollpersonen und den Pseudokontrollen eine signifikante Abweichung.

Die Tabelle 24 beinhaltet die Genotypverteilung und Tabelle 25 die Ergebnisse diverser Gruppenvergleiche mittels des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Tests für den Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens.

	Genotyp			Summe
	1/1	1/2	2/2	
Patienten	1 100%	0 0%	0 0%	1
Kontrollen	127 62,25%	64 31,31%	13 6,37%	204
Kranke Kinder	100 63,69%	47 29,94%	10 6,37%	157
Pseudokontrollen	91 57,96%	56 35,67%	10 6,37%	157
Summe	319	167	33	519

Tab. 24: Genotypverteilung des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens in verschiedenen Untergruppen.

		Chi ² Test	Fisher´s Exact Test	Armitage´s Trend Test
Patienten vs. Kontrollen	R	0,6045	1,0000	0,1471
	P	0,7391		0,7013
Kranke Kinder vs. Pseudokontrollen	R	1,2105	0,5465	0,0370
	P	0,5459		0,8475
Patienten vs. Kranke Kinder	R	0,5680	1,0000	0,1426
	P	0,7528		0,7057
Kontrollen vs. Pseudokontrollen	R	0,7634	0,7092	0,0231
	P	0,6827		0,8792
Pseudo-/Kontrollen vs. Patienten/KK	R	0,6409	0,7548	0,0247
	P	0,7258		0,8752

Tab. 25: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Ergebnisse diverser Gruppenvergleiche mittels des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher´s Exact Tests und des Armitage´s Trend Tests mit Prüfgröße T und P-Wert.

3.3.4. Vergleich der Genotypverteilungen verschiedener Untergruppen

3.3.4.1 Analyse der Untergruppe Sensation-Seeking-Score

Tabelle 26 beinhaltet die Genotypverteilung bei Kontrollen und kranken Kindern mit einem SSS ≥ 25 . Die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Tests für den Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens, wenn nur Personen mit einem SSS ≥ 25 in die Analyse einbezogen werden, werden in Tabelle 27 dargestellt.

	Genotyp			Summe
	1/1	1/2	2/2	
Kontrollen	8 66,67%	4 33,33%	0 0%	12
Kranke Kinder	21 56,76%	14 37,84%	2 5,41%	37
Summe	29	18	2	49

Tabelle 26: Genotypverteilung des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens bei Kontrollen und kranken Kindern mit einem SSS ≥ 25 .

		Chi ² Test	Fisher's Exact Test	Armitage Trend Test
Kranke Kinder vs. Kontrollen	R	0,8491		0,7990
	P	0,6541	0,8551	0,3714

Tab. 27: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Ergebnisse diverser Gruppenvergleiche mittels des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Tests mit Prüfgröße R und P-Wert bei Kontrollen und kranken Kindern mit einem SSS ≥ 25 .

3.3.4.2 Analyse der Untergruppe Männer

Tabelle 28 beinhaltet die Genotypverteilung des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens bei männlichen kranken Kindern, männlichen Kontrollen und männlichen Pseudokontrollen. Die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Tests für den Val66Met-

Polymorphismus des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens, wenn nur Männer in die Analyse einbezogen werden, werden in Tabelle 29 dargestellt.

	Genotyp			Summe
	1/1	1/2	2/2	
Patienten	1 100%	0	0	1
Kontrollen	90 56,6%	48 31,79%	13 8,61%	151
Kranke Kinder	70 60,34%	37 31,9%	9 7,76%	116
Pseudokontrollen	68 58,62%	41 35,34%	7 6,03%	116
Summe	229	126	29	384

Tabelle 28: Genotypverteilung des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens bei Männern.

		Chi ² Test	Fisher's Exact Test	Armitage Trend Test
Patienten vs. Kontrollen	R	0,6748	1	0,1749
	P	0,7136		0,6758
Kranke Kinder vs. Pseudokontrollen	R	0,4841	0,7766	0,1866
	P	0,7850		0,6657
Patienten vs. Kranke Kinder	R	0,6535	1	0,1647
	P	0,7213		0,6848
Kontrollen vs. Pseudokontrollen	R	0,8403	0,6610	0,4994
	P	0,6570		0,4798
Pseudo-/Kontrollen vs. Patienten/KK	R	0,1078	0,9384	0,0003
	P	0,9475		0,9871

Tabelle 29: Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens: Ergebnisse diverser Gruppenvergleiche mittels des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher's Exact Tests und des Armitage's Trend Test mit Prüfgröße R und P-Wert bei Männern.

3.4. Gemeinsame Betrachtung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens sowie weiterer Kovariablen

Bei dieser Analyse wurden die kranken Kinder aus den Kernfamilien und die 204 nicht verwandten Kontrollen betrachtet. Im Folgenden wurden unabhängige Variablen für eine logistische Regression definiert:

Zur Kodierung des DRD3-Genotyps wurden entsprechend dem Vorschlag von Cordell und Clayton (2002) zwei Variablen D1 und D2 verwendet, somit ergibt sich $D1=-1$, $D2=-0.5$ für Personen mit DRD3-Genotyp 11, $D1=0$, $D2=0.5$ für Personen mit DRD3-Genotyp 12 und $D1=1$, $D2=-0.5$ für Personen mit DRD3-Genotyp 22. Analog wurden zur Kodierung des BDNF-Genotyps zwei Variablen B1 und B2 verwendet.

Als weitere, unabhängige Variablen wurden das Geschlecht sowie der dichotomisierte Sensation-Seeking-Score (≥ 25 beziehungsweise ≤ 24) berücksichtigt.

Um mögliche Wechselwirkungen zu erfassen, wurden die Produkte $D1 \times B1$, $D1 \times B2$, $D2 \times B1$, $D2 \times B2$, Sex \times SSS sowie alle weiteren paarweisen Produkte gebildet, bei denen der erste Faktor eine der Variablen D1, D2, B1, B2 und der zweite Faktor eine der Variablen Sex, SSS ist, insgesamt also 13 Variablen, die zu Wechselwirkungen korrespondieren.

Dabei zeigte sich der Sensation-Seeking-Score als einzige Variable, die bei einer schrittweisen logistischen Regression in das Modell aufgenommen wurde.

4. Diskussion

4.1. Methodendiskussion

Wie im Material- und Methodenteil beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der Kandidatengene DRD3 und BDNF in der Ätiologie der Opiatabhängigkeit mit verschiedenen statistischen Methoden untersucht.

Mittels direkter Assoziationsanalysen ist die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Einzelnukleotid Polymorphismen (SNP) und dem Auftreten von Krankheitsbildern möglich. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms deutet darauf hin, dass ca. 600000 SNPs in kodierenden Bereichen existieren. In den aktuellen Datenbanken sind ca. 2,6 Millionen SNPs erfasst. In einer Assoziationsanalyse wird, in der einfachsten Form, ein einzelner SNP direkt mit einem Krankheitsbild assoziiert. Für eine solche Assoziation eines SNPs mit einer Krankheit gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Einerseits könnte das SNP selbst die pathogene Sequenz präsentieren, während es andererseits möglich ist, dass das krankheitsverursachende Allel selbst kein SNP darstellt, sondern lediglich eng mit ihm assoziiert ist. Assoziationsstudien bieten die Möglichkeit, Gene geringen bis mittelgradigen Einflusses bei Populationen realistischer Größe zu identifizieren. Auf diese Weise wurde zum Beispiel bei der Alzheimer-Demenz und der Aufmerksamkeits-Defizit-Störung eine Gen-Assoziationen gefunden. Bei der Erkrankung der Opiatabhängigkeit war es, hauptsächlich wegen der Heterogenität der Störung, der Unkenntnis der zugrunde liegenden Pathophysiologie und des Fehlens klarer Kopplungsanalysen, bislang nicht ohne weiteres möglich, geeignete Kandidatengene zu identifizieren. Dennoch sind Assoziationsstudien in komplexen Erkrankungen, wie es die Opiat-abhängigkeit ist, die effizienteste Strategie, um den mutmaßlichen Beitrag der Kandidatengene zu erforschen (Nöthen et al., 1993; Risch et al., 1996).

Auch Assoziationsstudien als Fall-Kontroll-Untersuchungen haben Nachteile, da sich zum einen falsch-positive und zum anderen falsch-negative Befunde ergeben können. Allein durch die Untersuchung eines hinreichend großen Patientenkollektivs lassen sich falsch-negative Befunde reduzieren. Um falsch-

positive Befunde auszuschließen, wären Haplotypen-Untersuchungen an Familien aussagekräftiger.

Als Haplotyp wird eine Variante einer Nukleotidsequenz im Genom eines Lebewesens bezeichnet. Der Haplotyp ist durch die Allele verschiedener Gene, die ein Individuum auf einem Chromosom trägt, gekennzeichnet.

Neben der direkten Assoziationsanalyse zwischen SNP und Phänotyp einer Krankheit können die Kopplungsungleichgewichte benachbarter Allele betrachtet werden. Ein Kopplungsungleichgewicht besteht zwischen zwei Sequenzvarianten, wenn diese überdurchschnittlich häufig auf demselben Chromosom auftreten. Blöcke, in denen ein Kopplungsungleichgewicht besteht, treten im Wechsel mit Blöcken auf, in denen kein oder nur ein geringes Kopplungsungleichgewicht besteht (Timmermann et al., 2004).

Die Interpretation von Kopplungsanalysen muss nach Gejman et al. (1994) kritisch betrachtet werden, da sie von dem zu Grunde gelegten genetischen Modell, den gewählten Parametern für die Analyse sowie der statistischen Stärke um ein Kopplungsungleichgewicht zu beobachten, abhängt.

Neben der direkten Assoziationsanalyse und der Betrachtung von Kopplungsungleichgewichten besteht die Möglichkeit der Haplotypenbetrachtung. Von den theoretisch möglichen Allelkombinationen treten in vivo jedoch nur eine geringe Anzahl auf (Clark et al., 1998; Hoehe et al., 2003). Simulationen zeigen (Calafell et al., 2001), dass die ancestralen Haplotypen („Ur-Haplotypen“) sowohl bei geringen Häufigkeiten als auch noch nach vielen Tausenden Generationen aufgedeckt werden konnten, während Kopplungsungleichgewichte bei gleichen Untersuchungsbedingungen verschwanden oder sich sogar umkehrten.

In der vorliegenden Arbeit werden diese etablierten Methoden der genetischen Epidemiologie angewendet.

4.2. Ergebnisdiskussion

Diese Arbeit sollte

1. die Vermutung überprüfen, dass eine homozygote Allelfrequenz des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens mit einem erhöhten Risiko einer Opiatabhängigkeit assoziiert ist.
2. die Hypothese untermauern, dass der Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens mit einem erhöhten Risiko einer Opiatabhängigkeit assoziiert ist.
3. die Fragestellung beantworten, ob der Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens mit dem Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens interagiert, oder ob sie unabhängige phänotypische Assoziationen zeigen.

4.2.1. Dopaminrezeptor D3 (DRD3)-Ser9Gly-Polymorphismus

Der Transmission/Disequilibrium Test (TDT) der D3-Dopaminrezeptor Allelverteilung offenbarte eine zufällige Transmission der Allele von 128 heterozygoten Eltern an 95 Patienten. Dabei erfolgte eine Transmission des Allels A in 67 Fällen, in 61 erfolgte keine Transmission (TDT = 0,28; P = 0,60). Auch in einer Untergruppe von 35 heterozygoten Eltern und 25 Patienten mit einem SSS \geq 25 konnte keine signifikante Assoziation der Allel-Transmission nachgewiesen werden (18 Transmissionen; TDT = 0,03; P = 0,87). Die Genotypverteilung zwischen den 158 Patienten und den unabhängigen 202 Kontrollen differierte nicht signifikant. Zu demselben Ergebnis kamen zuvor ebenso Duaux et al. (1998), Kotler et al. (1999) und Li et al. (2002), die Patientenkollektive aus unterschiedlichen ethnischen Gruppen untersuchten. Weitere Studien mit einem deutschen Patientenkollektiv wurden bisher nicht veröffentlicht.

So konnten Duaux et al. (1998) in einer französischen Patientengruppe mit einem SSS \geq 25 eine positive Korrelation der Opiatabhängigkeit mit einer Homozygotie für den Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens (Allel A) zeigen, bei fehlender Assoziation der Allel-Transmission in der Patienten- und Kontrollgruppe.

In dieser Arbeit konnte in einer Untergruppe von 38 Patienten mit einem SSS ≥ 25 hingegen weder eine erhöhte homozygote Allelverteilung im Vergleich zu der gesamten Kontrollgruppe nachgewiesen werden, noch zu der Untergruppe der Kontrollen, bestehend aus 12 Personen (18% von 67, bei denen ein SSS vorlag) mit einem SSS ≥ 25 (Chi-Quadrat=0,01; P=0,94 and Chi-Quadrat= 0.44; P= 0,51).

Kotler et al. (1999) konnten in einem großen Studienkollektiv einer homogenen israelischen Patientengruppe keine homozygote Allel-Transmission und somit auch keine Assoziation der Opiatabhängigkeit mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens nachweisen. Auch bei der selektiven Betrachtung des ermittelten SSS in einer kleinen Untergruppe konnte kein relevanter Zusammenhang registriert werden.

Neben der hier vorliegenden deutschen Assoziationsstudie und der israelischen Assoziationsstudie von Kotler et al. (1999) konnten ferner Li et al. (2002) in einer chinesischen Assoziationsstudie keine signifikanten Unterschiede in der Allelfrequenz, Genotypfrequenz oder Haplotypfrequenz des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens als Hinweis auf eine mögliche Assoziation des Gens mit der Opiatabhängigkeit nachweisen.

An einem kleinen amerikanischen Patientenkollektiv mit Weißen und Dunkelhäutigen wurde in einer Studie von Freimer et al. (1996) gezeigt, dass weder bei weißen amerikanischen Patienten, noch bei dunkelhäutigen amerikanischen Patienten eine Assoziation mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und einer Opiatabhängigkeit besteht. Jedoch zeigte sich ein Übermaß an homozygoten Allelträgern dieses Polymorphismus bei weißen Amerikanern mit Kokainabhängigkeit und einem SSS ≥ 25 , im Vergleich zu den dunkelhäutigen amerikanischen Patienten mit einem SSS ≥ 25 , sowie weissen und dunkelhäutiger Patienten mit einem SSS ≤ 24 .

Ergänzend sei gesagt, dass Comings et al. (1999) die Ergebnisse von Duaux et al. (1998) bestätigten, indem sie in einem kaukasischen, kokainabhängigen Patientenkollektiv eine erhöhte Anzahl an homozygoten Allelträgern fanden. Kokain ist jedoch kein Opiat, sondern gehört zu der Gruppe der Alkaloide und beeinflusst die Dopaminwiederaufnahme und -abgabe.

Auch die Studien über den Zusammenhang des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und anderen psychischen Erkrankungen sind in ihren Ergebnissen nicht übereinstimmend.

So konnte zum Beispiel in einer Meta-Analyse von Williams et al. (1998) mit weltweit 30 Assoziationsstudien über Schizophrenie und den Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens eine vermehrte Homozygotie des Allels 1 festgestellt werden. Andererseits fehlt in der palästinensischen Familienstudie von Kremer et al. (2000) eine Assoziation des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens mit Schizophrenie. Zu demselben negativen Ergebnis kam auch Hawi et al. (1998) in einer irischen Assoziationsstudie und Utsunomiya et al. (2008) in einer japanischen Assoziationsstudie und Meta-Analyse.

Segman et al. (1999) beschreiben eine Assoziation der Homozygotie des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens mit tardiven Dyskinesien in einem an Schizophrenie erkrankten Patientenkollektiv.

Dagegen zeigten britische Assoziationsstudien und Meta-Analysen von Elvidge et al. (2001) und Kirov et al. (1999) keinen Zusammenhang zwischen dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und einer bipolaren Störung.

Konträre Ergebnisse liegen auch bei den Forschungsergebnissen der Alkoholabhängigkeit vor: Es lässt sich keine Assoziation nachweisen zwischen dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und Alkoholabhängigkeit bei Patienten ohne Konsumierung anderer Drogen, die in der Regel einen niedrigeren SSS haben als Personen, die zusätzlich andere Drogen konsumieren (Gorwood et al., 1995; Sander et al., 1995; Galizio et al., 1985). Korrelierend hierzu sind die Studienergebnisse von Wiesbeck et al. (2006) zu erwähnen, die ebenfalls keine Assoziation der Alkoholabhängigkeitserkrankung mit dem Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens fanden.

4.2.2. Brain derived neurotrophic factor (BDNF)-Val66Met-Polymorphismus

Seitdem in vielen Studien der letzten Jahre zunehmend die Hypothese untermauert wurde, dass die intrazerebrale DRD3-Genexpression entscheidend von den Wachstumsfaktoren, insbesondere dem BDNF, abhängt, wurde in dieser Studie als zweiter Polymorphismus der Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens analysiert.

Betrachtet man die Ergebnisse der Genpolymorphismus-Analyse des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens dieser Arbeit, fällt auf, dass sich die Allel-Transmission von 113 heterozygoten Eltern an 86 Patienten nicht von einer zufälligen Verteilung unterscheidet (TDT = 0,72; P = 0,40). Ebenso konnte in einer Untergruppe von 31 heterozygoten Eltern und 22 Patienten mit einem SSS \geq 25 keine erhöhte homozygote Allel-Transmission nachgewiesen werden (TDT = 0,29; P = 0,59). Die Genotypverteilung zwischen den Patienten und den unabhängigen Kontrollen differierte ebenfalls nicht signifikant.

Eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer Suchterkrankung und im speziellen einer Opiatabhängigkeit spielt die Erinnerungs- und Gedächtnisfunktion. Hier demonstrierten Cargill et al. (1999) eine wichtige funktionelle Bedeutung des Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens in vivo und vitro.

Egan et al. (2003) zeigten bei Untersuchungen des Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens, dass das Methionin-Allel mit einer geringeren Gedächtnisleistung und abnormer hippokampaler Aktivierung einhergeht.

Daten vieler Tierversuche und genetischer Studien suggestieren eine entscheidende Rolle des BDNF im Mechanismus der Suchterkrankung. So zum Beispiel die Assoziationsstudie von Cheng et al. (2005), die den Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens in einer chinesischen Patientengruppe mit Amphetamin- und Heroinabhängigen untersuchten. Sie fanden eine signifikant unterschiedliche Genotypverteilung in der Patienten- und Kontrollgruppe, wobei die Patientengruppe eine niedrigere Met-Allelfrequenz zeigte. Die Ergebnisse deuten auf einen möglichen Zusammenhang dieses Polymorphismus mit einer Abhängigkeitserkrankung hin, oder zumindest kann vermutet werden, dass

dieser zu einem erhöhten Gefährdungspotential für eine Abhängigkeitserkrankung beisteuert.

Es gibt Anzeichen aus Tierexperimenten (Knock-out Mäuse) und klinischen Studien, die eine erhöhte zentrale BDNF-Aktivität unter anderem für die Pathogenese einer Abhängigkeit verantwortlich machen. Tsai (2007) belegte eine Assoziation zwischen einer erhöhten BDNF-Sekretion als Antwort auf neuronale Stimulation und dem 66Val-Allel des Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens. Eine erhöhte Anzahl an homozygoten Allelträgern wurde bei Personen mit einer Abhängigkeit gefunden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Die Hypothese einer erhöhten zentralen BDNF-Aktivität bei einer Abhängigkeit ermöglicht neue Einblicke in bessere therapeutische Strategien für die Prävention und Behandlung.

Corominas et al. (2007) untersuchten die intrazelluläre Signalkaskade des BDNF, um effektive medikamentöse Therapieansätze für eine Abhängigkeit von Psychostimulanzien zu finden. Es zeigte sich, dass wiederholte Kokaingaben den BDNF-Spiegel steigern und die Aktivität der zellulären Kaskade im Belohnungssystem des Gehirns verringern. Das gilt besonders nach einigen Tagen im Anschluss an einen Entzug. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass BDNF nachhaltig die synaptische Plastizität verändert. Andererseits jedoch kann eine Inhibierung dieser zellulären Kaskade als protektiver Faktor für eine Abhängigkeit angesehen werden.

Knock-out-Maus-Untersuchungen von Graham (2007) zeigten die Unerlässlichkeit von BDNF für die Aufrechterhaltung einer erhöhten Kokainabgabe. Dies deutet darauf hin, dass eine dynamische Induktion und Abgabe von BDNF aus Neuronen des Nucleus accumbens während Kokaingenusses die Entwicklung und Persistenz eines Abhängigkeitsverhaltens fördert.

Resultate aus den Untersuchungen von Angelucci et al. (2007), die einen erniedrigten Serumspiegel an BDNF bei heroinabhängigen Patienten im Vergleich zu kokainabhängigen Patienten und gesunden Kontrollen registrierten, deuten auf eine wichtige Rolle des BDNF in der Neurotoxizität und in der Induktion einer Abhängigkeit hin. Außerdem legen diese

Studienergebnisse nahe, dass ein niedriger BDNF-Serumspiegel das Risiko für die Entwicklung einer Psychose bei Drogenabhängigen erhöht. Die wichtige Rolle des BDNF in der Neurotoxizität wird auch bei der Betrachtung der Studienergebnisse von Kim et al. (2005) deutlich. Sie untersuchten den BDNF-Plasmaspiegel und fanden bei chronisch Metamphetamin-abhängigen Patienten, im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe, einen signifikant höheren Plasmaspiegel.

Die wichtige Funktion der Neurotrophine wie BDNF als Vermittler von Drogeneffekten auf die Stimmung, die Abhängigkeit und die Neuroprotektion, wurde in einer Studie von Castrèn (2004) gezeigt.

Lu et al. (2004) untersuchten an Ratten den Kokainentzug und fanden eine positive Assoziation mit einem erhöhten Pegel an BDNF in der mesolimbischen dopaminergen Region.

Kontroverse Studienergebnisse zeigten Assoziationsstudien an kaukasischen Rauchern. Lang et al. (2007) zeigten einen höheren Anteil an Met/Met Genotypen sowie Met-Allelträgern, was darauf hindeutet, dass diese Personen anfälliger sind, mit dem Rauchen zu beginnen sowie das Rauchen beizubehalten. Hingegen fanden Montag et al. (2008) keine signifikante Assoziation an einer doppelt so hohen Probandenanzahl in einem deutschen Kollektiv

Betrachtet man die bisherigen Forschungsergebnisse anderer multifaktoriell vererbter Erkrankungen, wie zum Beispiel der Schizophrenie, so sind auch hier viele kontroverse Studienergebnisse bei der Untersuchung des Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens in unterschiedlichen ethnischen Gruppen dokumentiert.

In einer asiatischen Meta-Analyse und in einer japanischen Fall-Kontroll-Studie von Naoe et al., (2007) wurden keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens und der Schizophrenie gefunden. Es konnte auch kein Zusammenhang mit dem Zeitpunkt des Krankheitsbeginns hergestellt werden. Auch Tochigi et al. (2006) fanden keine Anzeichen für einen Zusammenhang des Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens und einer Schizophrenieerkrankung in einem japanischen Patientenkollektiv. Hingegen

wurde in einer weiteren japanischen Assoziationsstudie von Numata et al. (2006) und in einer afrikanisch-amerikanischen Assoziationsstudie von Chao et al. (2008) wiederum über einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens und dem Zeitpunkt des Krankheitsbeginns sowie der Symptomstärke berichtet. Zwei unabhängige schwedischen Assoziationsstudien von Jönsson et al. (2006) und Varnäs et al. (2008) bestätigten diese positive Korrelation.

Ebenso zeigten Zhang H et al. (2006) in mehreren Assoziationsstudien des Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens und der Alzheimererkrankung, der affektiven Verhaltensstörungen, der posttraumatischen Stresstörung, der Schizophrenie und der Alkohol-/Drogenabhängigkeit keine signifikanten Korrelationen.

Ein fehlender Zusammenhang besteht auch für die Untersuchung einer Assoziation des Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens und der Alzheimererkrankung bei Saarela et al. (2006) in einem finnischen Kollektiv mit Alzheimer- und Parkinsonpatienten. He et al. (2007) beschrieben in einem chinesischen Kollektiv eine fehlende Assoziation zwischen der Alzheimererkrankung und dem Val66Met Polymorphismus des BDNF-Gens.

Eine positive Korrelation lieferten hingegen die japanische Alzheimer-Assoziationsstudie von Hashimoto et al. (2008) und die italienischen Assoziationsstudie von Cozza (2008).

4.2.3. Interaktion zwischen dem Dopaminrezeptor D3 (DRD3)-Ser9Gly-Polymorphismus und dem Brain derived neurotrophic factor (BDNF)-Val66Met-Polymorphismus

Weil keine Allel-Assoziation oder Genotyp-Assoziation der beiden untersuchten SNP beobachtet wurde, wurde mittels logistischer Regression die verbleibende Möglichkeit untersucht, dass ihre gegenseitige Wechselwirkung oder andere Interaktionen zum Risiko einer Opiatabhängigkeit beitragen. DRD3- und BDNF-Genotypen wurden in dichotome Variablen transformiert, dabei wurden als unabhängige Varianten das Geschlecht und der dichotomisierte SSS (mit Werten ≥ 25 oder ≤ 24) berücksichtigt. Nach der Bildung paarweiser Produkte

erfolgte eine schrittweise logistische Regression. Bei allen statistisch ermittelten Kombinationen konnte keine signifikante gegenseitige Wechselwirkung oder andere Interaktionen festgestellt werden, die zum Risiko einer Opiatabhängigkeit beitragen.

Es bestätigte sich die Hypothese, dass Personen mit einem Sensation-Seeking-Score ≥ 25 eher zu einer Opiatabhängigkeit neigen als Personen mit einem Sensation-Seeking-Score ≤ 24 .

Eine Assoziation der Opiatabhängigkeit mit Dopaminrezeptor D3- oder BDNF-Polymorphismen könnte auf neuropathologischer Ebene über eine Störung der dopaminergen Neurotransmission erklärt werden. Di Chiara et al. (1992) postulierten, dass Substanzen mit Abhängigkeitspotential die dopaminerge Aktivität im mesolimbisch-mesokortikalen Reward-System stimulieren und dadurch angenehme Gefühle erzeugen, so dass diese Substanzen wiederholt zugeführt werden (Di Chiara et al., 1992; Wise und Rompre, 1989). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Aktivierung des mesokortiko- limbischen Systems auch durch externe Stimuli erfolgen kann (Horvitz et al., 1997). Demnach würde das Dopamin nicht als Mediator für ein Gefühl der Freude beziehungsweise Belohnung dienen, sondern als eine Lernhilfe. Somit ließen sich Befunde erklären, nach denen fortgesetzter Drogenkonsum (zum Beispiel von Kokain oder Nikotin) immer weniger mit der Erzeugung von Wohlbefinden einhergeht (Wickelgren, 1997). Diese Theorie würde auch die starke Ablenkbarkeit von Patienten mit Schizophrenie oder hyperkinetischen Syndromen erklären, bei denen man eine Überaktivität des mesokortiko- limbischen Systems annimmt.

In den letzten Jahren hat sich eine differenziertere Betrachtungsweise der Rolle des Dopamins im Belohnungs-System durchgesetzt, bei der die Rolle des Dopamins zwar auch mit dem Gefühl der Belohnung, mehr aber mit dem Gefühl der Begierde beziehungsweise der motivierten Aufmerksamkeit assoziiert wird (Franken et al., 2005).

Guillin et al. (2001) demonstrierten in Rattenversuchen die BDNF-abhängige Regulation der DRD3-Gene im Striatum. Jeanblanc et al. (2006) zeigten, dass die BDNF-Expression, und somit auch die DRD3-Expression, durch Ethanol

erhöht wird, hingegen aber die Dopamin D1- und D2-Expression davon nicht gesteigert werden kann. McGough (2004) erörtert, dass die Aktivierung der BDNF-Signalkaskade zu einer Hochregulierung der Downstream-Gene führt, zu denen auch das den Ethanolkonsum erhöhende, Dopaminrezeptor D3-Gen gehört.

Flanagin et al. (2006) beschäftigten sich mit einer Assoziation zwischen BDNF-Val66Met-Genotyp und einer subjektiven sowie objektiven Amphetaminwirkung. Amphetamine sind indirekte Dopamin-Agonisten. Sie konnten bei gesunden Testpersonen, trotz subjektiv geringer Erregung, eine Steigerung der Herzfrequenz bei Personen mit einem homozygoten Val/Val-Genotyp im Vergleich zu einem homozygoten Met/Met-Genotypen beziehungsweise einem heterozygoten Met/Val-Genotyp zeigen.

Die Studienergebnisse der genannten Literatur führen zu der Hypothese, dass eine enge Kopplung zwischen den Genvarianten im DRD3 und BDNF besteht und diese sich auf eine Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Opiatabhängigkeit auswirkt.

Diese vorliegende Arbeit kann die Hypothese einer Kopplung des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens und des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopamin D3-Gens jedoch nicht bestärken.

4.2.4. Populationsstratifikation

Die Häufigkeiten der Polymorphismen zwischen den unterschiedlichen ethnischen Populationen variiert erheblich, dabei spricht man von einer so genannten Populationsstratifikation. So ist es durchaus möglich, dass unterschiedliche Ergebnisse bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Polymorphismen und dem Krankheitsbild der Opiatabhängigkeit durch einen Populationsstratifikations-Bias zustande kommen können (Goldman et al., 1993; Barr et al., 1993; Gelernter et al., 1998; Kidd et al., 1998; Blomqvist et al., 2000). Innerhalb einer ethnisch homogenen Gruppe ist jedoch die Frequenz einer Variation heterogen (De Mille et al., 2002). Bei der vorliegenden Studie wurden sowohl bei den opiatabhängigen Personen als auch beim Kontrollkollektiv nur deutsche Personen einbezogen, somit lag eine ethnisch

und kulturell homogene Gruppe vor, so dass ein Populationsstratifikations-Bias minimiert werden kann.

Ein weiterer Grund für die möglicherweise falsch positive Korrelation zwischen der homozygoten Allelverteilung und einer Opiatabhängigkeit kann zum Beispiel auch sein, dass die betrachtete Genvariante nicht selbst die kausal bedingte relevante Mutation ist, sondern dass eine populationsspezifische Mutation zur Förderung einer möglichen Opiatabhängigkeit in enger Verknüpfung mit der Genvariante steht. Solche populationsspezifischen Mutationen können durchaus auch in regulatorischen Genregionen (Promotorregion) lokalisiert sein. Letztlich kann es auch möglich sein, dass die untersuchten SNPs nur im Zusammenspiel mit anderen, jetzt noch nicht identifizierten, populationsspezifischen oder ökologischen Faktoren wirken. Eine weitere Überlegung ist, dass die untersuchten Genvarianten als Empfindlichkeitsgen oder Modifizierungsgen agieren. Dies bedeutet, dass das Gen nicht notwendigerweise für die Expression der Krankheit verantwortlich ist, aber es das Erkrankungsrisiko erhöht oder den Krankheitsverlauf ändert.

4.2.5. Einschlusskriterien des Patientenkollektivs und Subgruppierungen

Ein Problem bei der Studienplanung betrifft die Einschlusskriterien zur Aufnahme der süchtigen Patienten in das Patientenkollektiv. Dabei ist es beim Vergleich und der Beurteilung der Ergebnisse von unterschiedlichen Assoziationsstudien ganz entscheidend, dass identische oder äquivalente Einschlusskriterien vorliegen und dass man möglichst einheitliche klinische Diagnoseverfahren anwendet.

Einschränkend in dieser Studie könnte die Selektion der Opiatabhängigen wirken, welche alle an einer stationären Entwöhnungstherapie teilnahmen und somit selektiv als motiviert und abstinentwillig betrachtet werden können. Somit wurde hier nur eine Subgruppe von Opiatabhängigen angesprochen, die Studienergebnisse sind somit streng genommen nicht repräsentativ für die Gesamtheit der Opiatabhängigen. Es können Vermutungen aufgestellt werden, ob diese Untersuchung in einer unbehandelten Feldstudie zu einem ähnlichen Ergebnis führen würde.

Eine weiteres Selektionskriterium für die Auswahl der Patienten gilt es zu berücksichtigen: Bei der Auswahl der Patienten sollte es sich idealer Weise um Patienten handeln, die ausschließlich Opiate konsumieren und keine weiteren suchterzeugenden Substanzen (Polytoximanie). Dieses Phänomen wird jedoch insbesondere bei den Opiatabhängigkeitserkrankungen häufig beobachtet. Dabei bedarf es der Ehrlichkeit der Patienten, eine Polytoximanie den Studienleitern zu melden, wenn es sich um Drogen handelt, die nicht in den routinemäßigen Drogen-Screeninguntersuchungen nachzuweisen sind.

Auf Grund der unterschiedlichen Varianz von genetischen Polymorphismen und Umweltfaktoren, welche einen individuellen Einfluss auf die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Suchtentwicklung haben, stellt sich die Frage, ob jede Person eine individuell beeinflussbare Prädisposition zeigt. Dies würde zu der Schlussfolgerung führen, dass man Probanden in potentielle Subtypen einteilen könnte. Geht man beispielsweise von einem „genetischen Subtypen“ im Gegensatz zum „Persönlichkeits-Subtypen“ aus, so hieße dies, dass bestimmte Polymorphismen oder eine Kombination aus bestimmten Polymorphismen als Marker für die Entstehung einer Suchtentwicklung dienen. Dabei ist zu beachten, dass der Polymorphismus auf Grund der polygenen Vererbung nicht als diagnostischer Marker per se zu verwenden ist, jedoch eine mögliche Disposition vorhersagt. So konnte zum Beispiel in anderen Bereichen eine positive Assoziation zwischen Polymorphismen und der Alzheimer-Erkrankung, der Entstehung von Psychosen, der Suizidalität und Kokain-induzierter Psychosen gezeigt werden (Gelernter et al., 1999).

4.2.6. Ökologische Faktoren

Beeinflusst durch ökologische Faktoren, Familie, Bildung und genetische Risikofaktoren spielen die Interaktion aus Vulnerabilität, Modalitäten des Opiatkonsums, die Motivation als auch positive Verstärkerfunktionen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer Opiatabhängigkeit aber auch anderer Abhängigkeitserkrankungen. Trotz der kontroversen Befunde scheint ein genetischer Beitrag zur Entstehung der Opiatabhängigkeit zumindest teilweise plausibel zu sein. Hettaema et al. (1999) und White et al. (2003)

postulierten die Annahme einer Interaktion von Genetik und Umwelt. Darüber hinaus ziehen sie Umwelteinflüsse, ein geringes Bildungsniveau, einen hohen Level an Neurotizismus und Extrovertiertheit sowie eine breite Vielfalt an psychiatrischen Erkrankungen ursächlich in Betracht. Nicht zuletzt deshalb sollte bei der Patientenauswahl möglichst sichergestellt sein, dass die Patienten an keiner weiteren psychiatrischen Erkrankung leiden.

4.2.7. Komorbidität

Bei der Untersuchung der genetischen Ursachen der Opiatabhängigkeit müssen Komorbiditäten als wichtige Störgrößen berücksichtigt werden (van den Bree et al., 1998). Die Vielzahl der Komorbiditäten der Opiatabhängigkeit erfordert entweder die Bildung von Subgruppen, bei denen der Phänotyp präzise definiert wird, oder multivariante Analysen, bei denen die Komorbiditäten der Opiatabhängigkeit als mögliche Einflussfaktoren eingeschlossen werden. Bei der Durchführung von multivariante Analysen sind in Abhängigkeit von der Anzahl der untersuchten Einflussfaktoren allerdings höhere Fallzahlen erforderlich, die vermutlich nur im Rahmen von Multicenter-Studien erzielt werden können.

Die Komorbidität der Opiatabhängigkeitserkrankung mit anderen psychischen Erkrankungen stand bereits in den letzten Jahrzehnten im Fokus der Wissenschaft. Dabei ist fraglich, welchen Einfluss die in der Literatur vielfach beschriebene enge Assoziation der Opiatabhängigkeit mit zahlreichen anderen Krankheitsbildern hat. Nach dem heutigen Kenntnisstand der klinischen Forschung wird die Opiatabhängigkeit nur selten nicht von einer Komorbidität begleitet. Bestes Beispiel hierfür ist die Schizophrenieerkrankung. Regier et al. (1990) zeigten in ihrer Untersuchung, dass unter den schizophrenen Patienten die Drogenabhängigkeit viel höher ist als in der normalen Bevölkerung. Die Untersuchung von Krebs et al. (1998) wies eine signifikante Assoziation der beiden Erkrankungen bei homozygoten Allel 1 Trägern des Dopaminrezeptor D3-Gens auf.

4.2.8. Sensation-Seeking-Score

Bei der gemeinsamen Betrachtung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens sowie weiterer Kovariablen wurden als unabhängige Variablen für eine logistische Regression das Geschlecht und der dichotomisierte Sensation-Seeking-Score definiert. Dabei zeigte sich der Sensation-Seeking-Score als einzige Variable, die bei einer schrittweisen logistischen Regression in das Modell aufgenommen wurde. Das bedeutet, dass die opiatabhängigen Patienten, unabhängig von der genotypischen Verteilung der untersuchten Polymorphismen, im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen hohen Sensation-Seeking-Score besitzen. Somit kann ein hoher Sensation-Seeking-Score (SSS ≥ 25) als Schwachstelle für einen Drogenmissbrauch in der normalen Bevölkerung angesehen werden. Dieser Zusammenhang ist bereits aus den Untersuchungen von Kilpatrick (1976), Fulker, Eysenck und Zuckerman (1980) sowie Everett und Palmgreen (1995) bekannt.

Es kann in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Zusammenhang eines erhöhten Sensation-Seeking-Scores mit einer homogenen Allelverteilung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens oder des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens festgestellt werden.

Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zu den Studienergebnissen von Duaux et al. (1998), die eine vermehrte homozygote Allelverteilung des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens bei opiatabhängigen Patienten mit einem SSS ≥ 25 zeigten. Unter der Kenntnis, dass suchterzeugende Psychostimulantien wie Opiate, Kokain und Amphetamine alle das mesolimbische-dopaminerge System stimulieren, wurde von Duaux et al. (1998) postuliert, dass das dopaminerge Belohnungs- und Kontrollsystem als primäres Substrat für Sensation-Seeking anzusehen ist.

Dieser Zusammenhang wurde bereits in früheren Studien untersucht. Dabei konnte korrelierend zu den Beobachtungen bei Menschen in Versuchen mit Ratten beobachtet werden, dass diese nach Stimulation mit Psychostimulantien eine gesteigerte Entdeckungslust in neuer Umgebung zeigten (Piazza, 1989). Interessanterweise konnte auch bei der Untersuchung von Dopaminrezeptor D3

Knock-out Mäusen (Accili, 1996) und selektiven Dopaminrezeptor D3-Antagonisten eine besondere Bedeutung des Dopaminrezeptor D3 in Bezug auf die Entdeckungslust gezeigt werden (Sautel, 1995; Waters, 1993). Anscheinend neigen Drogenabhängige zu einem höheren Sensation-Seeking-Score, insbesondere bei einer Abhängigkeit mit dem indirekten Dopamin-Agonist Amphetamin (Carol, 1977; Spotts, 1986). In einer anderen Studie führte die Gabe von Levodopa, einem direkten Dopamin-Agonist, bei Parkinsonpatienten, die sich ihrer Umgebung gegenüber teilnahmslos verhielten, zu einem drastischen „Erwachen“, inklusive einer erhöhten Aufmerksamkeit für ihre Umgebung sowie anderer Zeichen eines erhöhten Sensation-Seeking-Scores (Sachs, 1983).

Es gibt bisher keine Studien, die sich mit dem Zusammenhang des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens und eines erhöhten Sensation-Seeking-Scores beschäftigen.

4.3. Zusammenfassung

Seit fast zwei Jahrzehnten wird eine Beteiligung des mesolimbischen dopaminergen Systems sowie eine individuelle genetische Variabilität in diesem System bei der Entwicklung einer Opiatabhängigkeit diskutiert. Neuere Studien zeigen, dass eine weitaus umfassendere und komplexere Entstehungsgrundlage anzunehmen ist. Die Entwicklung einer Opiatabhängigkeitserkrankung hat eine multifaktorielle Genese. Der Beitrag des dopaminergen Systems ist eingebettet in einer komplexen Interaktion von Genetik, Umwelt und Persönlichkeit. Genetischen Risikofaktoren werden hierbei eine besondere Rolle beigemessen.

Die allzu große Zahl von Sequenzvarianten erschwert die Auswahl der entscheidenden Sequenzen, die möglicherweise an der Ätiologie der Opiatabhängigkeitsentwicklung und Aufrechterhaltung der Opiatabhängigkeit beteiligt sind. Die erbliche Disposition wird in der Regel durch mehrere Gene bestimmt, die häufig sowohl in Wechselwirkung miteinander als auch in Wechselwirkung mit Umwelt- und Persönlichkeitsfaktoren erst zur Manifestation führen. Ein „Opiatabhängigkeits-Gen“ per se wird daher nicht zu finden sein.

Dennoch könnten weitere Untersuchungen zeigen, dass eine Kombination aus bestimmten Polymorphismen eine Suchtentwicklung fördert und somit eine erhöhte Disposition zur Opiatabhängigkeit darstellen kann.

Als mögliche Gene, die für eine Opiatabhängigkeit prädisponieren, gelten das Dopaminrezeptor D3-Gen, das selektiv im Zentrum des Belohnungssystems des menschlichen Gehirns exprimiert wird, und das BDNF-Gen, dessen Einfluss auf die DRD3-Expression bekannt ist.

Eine Reihe von genetischen Assoziationsstudien in unterschiedlichen ethnischen Populationen wurden in den letzten Jahren durchgeführt unter der Annahme, dass der Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens das Risiko für die Entstehung von substanzgebundenen Abhängigkeitserkrankungen beeinflussen könnte. Die Ergebnisse dieser Studien erbrachten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, ganz abgesehen davon, dass der Vergleich der Studien auf Grund sehr unterschiedlicher ethnischer Abstammung der Studienkollektive und sehr variabler Patientenkollektivgrößen äußerst schwierig ist. Außerdem lag nur bei einer sehr geringen Patientenanzahl ein Sensation-Seeking-Score vor, ein Charakterzug, dem ein erhöhtes Abhängigkeitspotential zugesprochen wird.

Die vorliegende Arbeit stellt die bisher größte Assoziationsstudie und Kopplungsstudie des Ser9Gly-Polymorphismus des Dopaminrezeptor D3-Gens und des (DRD3)-und des Val66Met-Polymorphismus des Brain derived neurotrophic factor (BDNF)-Gens zur Opiatabhängigkeit eines ethnisch homogenen deutschen Studienkollektivs dar, die in einer Untergruppe auch den Charakterzug eines erhöhten Sensation-Seeking-Scores (SSS) berücksichtigt.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine erhöhte homozygote Allelverteilung beziehungsweise Genverteilung des Ser9Gly-Polymorphismus des DRD3-Gens und des Val66Met-Polymorphismus des BDNF-Gens oder deren mögliche Wechselwirkung als genetischer Prädiktor für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Opiatabhängigkeit angesehen werden können.

Allel- und Genotypverteilung wurden mittels molekularbiologischer Methoden (PCR, Restriktionsenzymverdau, Gelelektrophorese) ermittelt und unter Verwendung statistischer Standardverfahren (Chi-Quadrat-Test, Fisher's Exact Test, Armitage's Trendtest, TDT) ausgewertet.

Die Auswertung zeigte keine erhöhte homozygote Allelverteilung beziehungsweise Genotypverteilung der beiden untersuchten funktionellen Polymorphismen bei Opiatabhängigen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Es konnte auch keine Interaktion zwischen dem Dopaminrezeptor D3 (DRD3)-Ser9Gly-Polymorphismus und dem Brain derived neurotrophic factor (BDNF)-Val66Met-Polymorphismus nachgewiesen werden. Somit konnten die Arbeitshypothesen, in guter Übereinstimmung zu vielen früheren Publikationen kleiner ausländischer Arbeitsgruppen, nicht erhärtet werden.

5. Literaturverzeichnis

Accili D, Fishburn CS, Drago J, Steiner H, Lachowicz JE, Park B-H (1996) A targeted mutation of the D3 receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1945–1949

Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1995) A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374 (6521): 450–3

Angelucci F, Ricci V, Pomponi M, Conte G, Mathé AA, Attilio Tonali P, Bria P (2007) Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Psychopharmacol* 21(8): 820-5

Asendorpf JB (1996) *Psychologie der Persönlichkeit. Grundlagen.* Springer, Berlin

Barr CL und Kidd KK (1993) Population frequencies of the A1 allele at the dopamine D2 receptor locus. *Biol Psychiatry* 34(4): 204-209

Bath KG, Lee FS (2006) Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. *Cogn Affect Behav Neurosci* 6 (1): 79–85

Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7): 2711-2716

Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory

neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J. Neurosci* 21 (17): 6718–6731

Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22 (3): 123–31

Blomqvist O, Gelernter J, Kranzler HR (2000) Family-based study of DRD2 alleles in alcohol and drug dependence. *Am J Med Genet* 96(5): 659-964

Böddeker I, Ziegler A (2000) Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 125: 810-815

Bordet R, Ridray S, Carboni S, Diaz J, Sokoloff P, Schwartz J-C (1997) Induction of dopamine D3 receptor as a mechanism of behavioural sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3363–3367

Bucholz KK, Hesselbrock VM, Shayka JJ, Nurnberger JI Jr, Schuckit MA, Schmidt I, Reich T (1995) Reliability of individual diagnostic criterion items for psychoactive substance dependence and the impact on diagnosis. *J Stud Alcohol* 56(5):500-5

Cadoret RJ, Yates WR, Troughton E, Woodworth G, Stewart MA (1995) Adoption studies demonstrating two genetic pathways to drug abuse. *Arch Gen Psychiatry* 52: 42–52

Cadoret RJ, Troughton E, O’Gorman TW, Heywood E (1986) An adoption study of genetic and environmental factors in drug abuse. *Arch Gen Psychiatry* 43: 1131–1138

Caine SB, Koob GF, Parsons LH, Everitt BJ, Schwartz J-C, Sokoloff P (1997) D3 receptor functional test in vitro predicts potencies of dopamine agonists to reduce cocaine self-administration. *Neuroreport* 8: 2373–2377

Calafell F, Grigorenko EL, Chiknian AA, Kidd KK (2001). Haplotype evolution and linkage disequilibrium: A simulation study. *Hum Hered* 51(1-2): 85-96

Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ; LanderES (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes *Nat Genet* 22: 231-238

Carol EN, Zuckerman M (1977) Psychopathology and sensation seeking in 'downers', 'speeder' and 'trippers': a study on the relationships between personality and drug choice. *Int J Addictions* 12: 591–601

Castrén E (2004) Neurotrophins as mediators of drug effects on mood, addiction, and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 29(3): 289-302

Chao HM, Kao HT, Porton B (2008) BDNF Val66Met variant and age of onset in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147 B(4):505-506.

Cheng CY, Hong CJ, Yu YW, Chen TJ, Wu HC, Tsai SJ (2005) Brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) genetic polymorphism is associated with substance abuse in males. *Brain Res Mol Brain Res* 140 (1-2):86-90

Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Buchanan A, Stengard J, Salomaa V, Vartiainen E, Perola M, Boerwinkle E, Sing CF (1998) Haplotype structure and population genetic inferences from nucleotide-sequence variation in human lipoprotein lipase. *Am J Hum Genet* 63(2): 595-612

Comings DE, Gonzalez N, Wu S, Saucier G, Johnson P, Verde R, MacMurray JP(1999) Homozygosity at the dopamine DRD3 receptor gene in cocaine dependence. *Mol Psychiatry* 4(5):484-487

Cordell H und Clayton D (2002) Stepwise Procedure for Polymorphisms within a Gene. *Am J Hum Genet* 70:124-141

Corominas M, Roncero C, Ribases M, Castells X, Casas M (2007) Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology* 55(1):2-13

Cozza A, Melissari E, Iacopetti P, Mariotti V, Tedde A, Nacmias B, Conte A, Sorbi S, Pellegrini S (2008) SNPs in neurotrophin system genes and Alzheimer's disease in an Italian population. *J Alzheimers Dis* 15(1):61-70.

De Mille MMC, Kidd JR, Ruggeri V, Palmatier MA, Goldman D, Odunsi A, Okonofua F, Grigorenko E (2002) Population variation in linkage disequilibrium across the COMT gene considering promoter region and coding region variation. *HumGenet* 111: 521-537

Derrfuß, J, Krämer S, Kugele O, Kugler R (2000) Transmittersysteme und ihre Bedeutung für unser Verhalten. In: M. Pritzel, Dopamin und seine Bedeutung für unser Verhalten. Kovac, Hamburg

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

Di Chiara, Morelli GM., Acquas E, Carboni E (1992) Functions of dopamine in the extrapyramidal and limbic systems. Clues for the mechanism of drug actions. *Arzneimittelforschung* 42(2A): 231-237

Duaux E, Gorwood P, Griffon N, Bourdel MC, Sautel F, Sokoloff P, Schwartz JC, Ades J, Lôo H, Poirier MF (1998) Homozygosity at the dopamine D3 receptor gene is associated with opiate dependence. *Mol Psychiatry* 3(4):333-336

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54: 597–606

Edvinsson, L. & Krause, D. N. (2002) *Cerebral blood flow and metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia:

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112 (2): 257–69

Everett MW und Palmgreen P (1995) Influences of sensation seeking, message sensation value, and program context on effectiveness of anticocaine public service announcements. *Health Communication* 7, 225-248.

Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) *Molecular and Cellular Basis of Addiction*. *Science* 278 (5335): 58-63

Ernfors P, Kucera J, Lee KF, Loring J, Jaenisch R (October 1995) Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int J Dev Biol* 39 (5): 799–807

Franken IH, Booij J, van den Brink W (2005) The role of dopamine in human addiction: from reward to motivated attention. *Eur J Pharmacol* 526(1-3):199-206

Freimer M, Kranzler H, Satel S, Lacobelle J, Skipsey K, Charney D (1996) No association between D3 dopamine receptor (DRD3) alleles and cocaine dependence. *Addiction Biol* 1: 281–287

Flanagin BA, Cook EH Jr, de Wit H (2006). An association study of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and amphetamine response. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141 B(6):576-83

Friedman WJ, Greene LA (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res*, 253: 131-42

Fulker D, Eysenck SBW, Zuckerman M (1980) The genetics of sensation seeking. *Journal of Personality Research* 14, 261-281

Galizio M, Gerstenharber L, Friedensen F (1985) Correlates of sensation seeking in alcoholics. *Int J Addictions* 20: 1479–1493

Gejman PV, Ram A, Gelernter J, Friedman E, Cao Q, Pickar D, Blum K, Noble EP, Kranzler HR, O'Malley S (1994) No structural mutation in the dopamine D2 receptor gene in alcoholism or schizophrenia. Analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Jama* 271(3): 204-208

Gelernter J, O'Malley S, Risch N, Kranzler HR, Krystal J, Merikangas K, Kennedy JL, Kidd KK (1991) No Association between an Allele at the D2 Dopamine Receptor Gene (DRD2) and Alcoholism *Jama* 266:1801-1807

Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF, Ichinose H, Nagatsu T (1998) DRD2 allele frequencies and linkage disequilibria, including the -141CIns/Del promoter polymorphism, in European-American, African-American, and Japanese subjects. *Genomics* 51(1): 21-26

Gelernter J, Kranzler H, Lacobella J (1998) Population Studies of Polymorphisms at Loci of Neuropsychiatric Interest (Tryptophan Hydroxylase (TPH), Dopamine Transporter Protein (SCL6A3), D3 Dopamine Receptor (DRD3), Apolipoprotein E (APOE), μ Opioid Receptor (OPRM1), and Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)). *Genomics* 52: 289-297

Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (2001) BDNF controls dopamine D₃ receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 411(6833):86-89

Gössling HW, Gunkel S, Schneider U, Melles W (2001) Frequency and causes of premature termination (drop-out) during in-patient opiate detoxification. *Fortschr Neurol Psychiatr* 69(10):474-481

Goldman D, Brown GL, Albaugh B, Robin R, Goodson S, Trunzo M, Akhtar L, Lucas-Derse S, Long J, Linnoila M (1993) DRD2 dopamine receptor genotype, linkage disequilibrium, and alcoholism in American Indians and other populations. *Alcohol Clin Exp Res* 17(2):199-204

Goldstein DB; Weale ME (2001) Population genomics: Linkage disequilibrium holds the key. *Current Biology* 11: 576-579

Gorwood P, Martres M-P, Ades J, Sokoloff P, Noble EP, Geijer T (1995) Lack of association between alcohol-dependence and D3 dopamine receptor gene in three independent samples. *Am J Med Genet* 60: 529–531

Graham DL, Edwards S, Bachtell RK, DiLeone RJ, Rios M, Self DW (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* 10(8):1029-37

Hashimoto R, Hirata Y, Asada T, Yamashita F, Nemoto K, Mori T, Moriguchi Y, Kunugi H, Arima K, Ohnishi T (2008) Effect of the BDNF and the ApoE polymorphisms on disease progression in preclinical Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* published online Sep 11

Hawi Z, McCabe U, Straub RE, O'Neill A, Kendler KS, Walsh D and Gill M (1998) Examination of new and reported data of the DRD3/Mscl polymorphism: no support for the proposed association with schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 3, 150–155

He XM, Zhang ZX, Zhang JW, Zhou YT, Tang MN, Wu CB, Hong Z (2007) Lack of association between the BDNF gene Val66Met polymorphism and Alzheimer disease in a Chinese Han population. *Neuropsychobiology* 2007; 55(3-4):151-155

Hellweg R, Hock C, Hartung HD (1989) An improved rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for nerve growth factor. *Technique, J Meth Cell Mol Biol* 1: 43-49

Helling RB, Goodman HM, Boyer HW (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*14(5):1235-1244

Hesselbrock M, Easton C, Bucholz KK, Schuckit M, Hesselbrock V (1999) A validity study of the SSAGA-a comparison with the SCAN. *Addiction* 94(9):1361-70

Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Hermann D, Klein S, Grusser SM, Flor H, Braus DF, Buchholz HG, Grunder G, Schreckenberger M, Smolka MN, Rosch F, Mann K, Bartenstein P (2004) Correlation between dopamine D(2) receptors

in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. *Am J Psychiatry* 161(10): 1783-1789

Hettema JM, Corey LA, Kendler KS (1999) A multivariate genetic analysis of the use of tobacco, alcohol, and caffeine in a population based sample of male and female twins. *Drug Alcohol Depend* 57: 69-78

Hoehe MR, Timmermann B, Lehrach H (2003) Human inter-individual DNA sequence variation in candidate genes, drug targets, the importance of haplotypes and pharmacogenomics. *Curr Pharm Biotechnol* 4(6): 351-378

Horvitz JC, Stewart T, Jacobs BL (1997) Burst activity of ventral tegmental dopamine neurons is elicited by sensory stimuli in the awake cat. *Brain Res* 759(2):251-258

Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677–736

Hulse GK, English DR, Milne E, Holman CD (1999) The quantification of mortality resulting from the regular use of illicit opiates. *Addiction* 94(2):221-229

Jones KR, Reichardt LF (1990) Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (20): 8060–8064

Jönsson EG, Edman-Ahlbom B, Sillén A, Gunnar A, Kulle B, Frigessi A, Vares M, Ekholm B, Wode-Helgodt B, Schumacher J, Cichon S, Agartz I, Sedvall GC, Hall H, Terenius L (2006) Brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) variants and schizophrenia: an association study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(5):924-933

Kiefer F (2004) Functions of endogenous opioids in the mesolimbic brain-reward system *SFP* 6(2):180-184

Kilpatrick DG, Sutker PB, Smith AD (1976) Deviant drug and alcohol use: the role of anxiety, sensation seeking and other personality variables. In: Zuckerman M, Spielberger CD. *Emotions and Anxiety: New Concepts, Methods and Applications*. Erlbaum: Hillsdale, NJ, pp 247–278

Kidd KK, Morar B, Castiglione CM, Zhao H, Pakstis AJ, Speed WC, Bonne-Tamir B, Lu RB, Goldman D, Lee C, Nam YS, Grandy DK, Jenkins T, Kidd JR (1998) A global survey of haplotype frequencies and linkage disequilibrium at the DRD2 locus. *Hum Genet* 103(2): 211-227

Kim DJ, Roh S, Kim Y, Yoon SJ, Lee HK, Han CS, Kim YK (2005) High concentrations of plasma brain-derived neurotrophic factor in methamphetamine users. *Neurosci Lett* 388(2):112-115.

Kirov G, Jones I, McCandless F, Craddock N, Owen MJ (1999) Family-based association studies of bipolar order with candidate genes involved in dopamine neurotransmission: DBH, DAT1, COMT, DRD2, DRD3, DRD5. *Molecular Psychiatry* 4, 558-565

Kotler M, Cohen H, Kremer I, Mel H, Horowitz R, Ohel N, Gritsenko I, Nemanov L, Katz M, Ebstein RP (1999). No association between the serotonin transporter promoter region (5-HTTLPR) and the dopamine D3 receptor (D3DR) polymorphisms and heroin addiction. *Molecular Psychiatry* 4, 313–316

Köhler T. 2001. *Biopsychologie - Ein Lehrbuch*. Kohlhammer, Stuttgart

Krebs M-O, Sautel F, Bourdel M-C, Sokoloff P, Schwartz J-C, Olie J-P et al. (1998) Dopamine D3 receptor gene variants and substance abuse in schizophrenia. *Mol Psychiatry*; 3: 337–341

Kremer I, Rietschel M, Dobrusin M, Mujaheed M, Murad I, Blanaru M, Bannoura I, Müller DJ, Schulze TG, Reshef A, Gathas S, Schwab S, Wildenauer D, Bachner-Melman R, Belmaker RH, Maier W, Ebstein RP (2000) No association between the dopamine D3 receptor Bal I polymorphism and schizophrenia in a family-based study of a Palestinian Arab population. *Am J Med Genet* 96(6):778-780

Lang UE, Sander T, Lohoff FW, Hellweg R, Bajbouj M, Winterer G, Gallinat J (2007) Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. *Psychopharmacology (Berl)*190(4):433-439

Lannfelt L, Sokoloff P, Martres MP, Pilon C, Giros B, Jonnson E (1992) Amino acid substitution in the dopamine d3 receptor gene as a useful polymorphism for investigation psychiatric disorders. *Psychiatr Genet* 2:249-256

Le Foll B, Diaz J, Sokoloff P (2005) A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implications for drug-conditioning: *NeuroReport* 16:175-178

Levi A, Shechter Y, Neufeld EJ, Schlessinger J (1980) Mobility, clustering and transport of nerve growth factor in embryonal sensory cells and in a sympathetic neuronal cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(6): 3469-3473

Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR (1996) Selective role for trkB neurotrophin receptors in rapid modulation of hippocampal synaptic transmission, *Brain Res Mol Brain Res* 38: 300-303

Lewin GR, Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins, *Annu Rev Neuroscience* 19: 289-317

Lu L, Grimm JW, Hope BT, Shaham Y (2004) Incubation of cocaine craving after withdrawal: a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:214-226

Lundstrom K, Turpin MP (1996) Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: Expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun* 225:1068-1072

Montag C, Basten U, Stelzel C, Fiebach CJ, Reuter M (2008) The BDNF Val66Met polymorphism and smoking. *Neurosci Lett* 442(1):30-33

McGough NN, He DY, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, Kharazia V, Janak PH, Ron D (2004) RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci* 24:10542–10552

Merikangas KR, Stolar M, Stevens DE, Goulet J, Preisig MA, Fenton B et al. (1998) Familial transmission of substance use disorders. *Arch Gen Psychiatry* 55: 973–979

Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R, et al (1991) Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations: *Genomics* 10 (3): 558–568

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78 (1): 189–225

Pickens RW, Svikis DS (1991) Genetic influences in human substance abuse. *Arch Gen Psychiatry*; 10: 202–213

Naoe Y, Shinkai T, Hori H, Fukunaka Y, Utsunomiya K, Sakata S, Matsumoto C, Shimizu K, Hwang R, Ohmori O, Nakamura J (2007) No association between the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism and schizophrenia in Asian populations: Evidence from a case-control study and meta-analysis. *Neurosci Lett* 415(2):108-112

Nader MA, Mach RH (1996) Self-administration of dopamine D3 agonist 7-OH-DPAT in rhesus monkeys is modified by prior cocaine exposure. *Neuropsychopharmacology* 125: 12–22

Neisewander JL, Fuchs RA, Tran-Nguyen LT, Weber SM, Coffey GP, Joyce JN (2004) Increases in dopamine D3 receptor binding in rats receiving a cocaine challenge at various time points after cocaine self-administration: implications for cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* 29:1479-1487

Nöthen MM, Propping P, Fimmers R (1993) Association versus linkage studies in psychosis genetics. *J Med Genet* 30: 634–637

Numata S, Ueno S, Iga J, Yamauchi K, Hongwei S, Ohta K, Kinouchi S, Shibuya-Tayoshi S, Tayoshi S, Aono M, Kameoka N, Sumitani S, Tomotake M, Kaneda Y, Taniguchi T, Ishimoto Y, Ohmori T (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism in schizophrenia is associated with age at onset and symptoms. *Neurosci Lett* 401(1-2):1-5

Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* (3): 272–280

Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new

neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21 (17): 6706–6717

Piazza PV, Deminie`re JM, Le Moal M, Simon H (1989) Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 145: 1511–1513

Plomin R, De Fries JC, Mc Cleary GE (1999) *Gene, Umwelt und Verhalten*. Hans Huber, Bern

Regier DA, Farmer ME, Rae DS (1990) Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse - results from the epidemiologic catchment area (ECA) study. *Jama* 264: 2511–2518

Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516–1517

Rounsaville BJ, Kosten TR, Weissman MMPB, Pauls D, Anton SF, Merikangas K (1991) Psychiatric disorders in the relatives of probands with opiate addiction. *Arch Gen Psychiatry* 488: 33–42

Rybakowski JK, Borkowska A, Czerski PM, Skibinska M, Hauser J (2003) Polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and performance on a cognitive prefrontal test in bipolar patients. *Bipolar Disord* 5: 468-472

Saarela MS, Lehtimaki T, Rinne JO, Huhtala H, Rontu R, Hervonen A, Roytta M, Ahonen JP, Mattila KM (2006) No association between the brain-derived neurotrophic factor 196 G>A or 270 C>T polymorphisms and Alzheimer's or Parkinson's disease. *Folia Neuropathol* 44(1):12-16

Sachs O. (1983) *Awakenings*. EP Dutton: New York

Sander T, Harns H, Podschus J, Finckh U, Nickel B, Rolfs A et al. (1995) Dopamine D1, D2, and D3 receptor genes in alcohol dependence *Psychiatric Genet* 5: 171–176

Sautel F, Griffon N, Sokoloff P, Schwartz J-C, Launay C, Simon P et al. (1995) Nafadotride, a potent preferential dopamine D3 receptor antagonist, activates locomotion in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 1239–1246

Schinder AF, Poo M (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23: 639-645

Schwarting RKW (1997) Zur Neurochemie des Verhaltens: Dopamin und Motivation. *Psychologische Rundschau* 48: 211-223

Segal DM, Moraes CT, Mash DC (1997) Up-regulation of D3 dopamine receptor mRNA in the nucleus accumbens of human cocaine fatalities. *Mol Brain Res* 45: 335–339

Siegel GJ, Chauhan NB (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Rev* 33: 199-227

Sokoloff P, Giros B, Martres M-P, Bouthenet M-L, Schwartz J-C (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347: 146–151

Spangler R, Goddard NL, Avena NM, Hoebel BG, Leibowitz SF (2003) Elevated D3 dopamine receptor mRNA in dopaminergic and dopaminoceptive regions of the rat brain in response to morphine. *Brain Res Mol Brain Res* 111:74–83

Spealman RD (1996) Dopamine D3 receptor agonists partially reproduce the discriminative stimulus effects of cocaine in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 1128–1137

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506–516

Spitzer RL, Williams JB, Gibbon M, First MB. (1992) The structured clinical interview for DSM-III-R(SCID): history, rationale and description. *Arch Gen Psychiatry* 49: 624–629

Spotts JW, Shontz FC (1986) Drugs and personality: dependence of findings on methods. *Am J Drugs Alc Abuse* 12: 355–382

Staley JK, Mash DC (1996) Adaptive increase in D3 dopamine receptors in the brain reward circuits of human cocaine fatalities. *J Neurosci* 16: 6100–6106

Strader CD, Sigal IS, Dixon RA (1989) Mapping the functional domains of the beta-adrenergic receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1(2):81-86

Thoenen H, Barde YA, Davies AM, Johnson JE (1987) Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp* 126: 82–95

Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593-598

Timmermann, B., S. Sauer, A. Dahl and R. Reinhardt (2004) Genetische Variabilität des Menschen: Hochdurchsatz-Technologien und Datenanalyse. *Laborwelt* 5: 31-32.

Tochigi M, Otowa T, Suga M, Rogers M, Minato T, Yamasue H, Kasai K, Kato N, Sasaki T (2006) No evidence for an association between the BDNF Val66Met polymorphism and schizophrenia or personality traits. *Schizophrenia Research* 87 (1-3): 45-47

Tsai SJ, Hong CJ, Liao DL, Lai IC (2004) Association study of a functional catechol-O-methyltransferase genetic polymorphism with age of onset, cognitive function, symptomatology and prognosis in chronic schizophrenia. *Neuropsychobiology* 49: 196-200

Tsai SJ, Hong CJ, Yu YW, Chen TJ (2004) Association study of a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism and personality trait and intelligence in healthy young females. *Neuropsychobiology* 49: 13-16

Tsai SJ (2007) Increased central brain-derived neurotrophic factor activity could be a risk factor for substance abuse: Implications for treatment. *Medical Hypotheses* 68(2):410-414

Tsuang M, Lyons MJ, Eisen SA, Goldberg J, True W, Lin M et al. (1996) Genetic influences on DSM-III-R drug abuse and dependence: a study of 3372 twin pairs. *American Journal of Medical Genetics* 67: 473-477

Utsunomiya K, Shinkai T, De Luca V, Hwang R, Sakata S, Fukunaka Y, Chen HI, Ohmori O, Nakamura J (2008) Genetic association between the dopamine D3 gene polymorphism (Ser9Gly) and schizophrenia in Japanese populations: Evidence from a case-control study and meta-analysis. *Neuroscience Letters* 444(2):161-165

van den Bree MB, Svikis DS, Pickens RW (1998) Genetic influences on antisocial personality and drug use disorders. *Drug Alcohol Dependence* 49(3): 177-187

Varnäs K, Lawyer G, Jönsson EG, Kulle B, Nesvåg R, Hall H, Terenius L, Agartz I (2008) Brain-derived neurotrophic factor polymorphisms and frontal cortex morphology in schizophrenia. *Psychiatr Genet* 18(4):177-83

Vink JM, Boomsma DI (2002) Gene finding strategies. *Biological Psychology* 61: 53-71

Waters N, Svensson K, Haadsma-Svensson SR, Smith MW, Carlsson A (1993) The dopamine D3 receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J Neural Transm (Gen Sect)* 94: 11–19

White VM, Hopper FJL, Wearing AJ, Hill DJ (2003) The role of genes in tobacco smoking during adolescence and young adulthood: a multivariate behaviour genetic investigation. *Addiction* 98:1087-1100

Wickelgren I (1997) Getting the brain's attention. *Science* 278 (5335):35-37

Wickelgren I (1997) Marijuana: harder than thought? *Science* 276 (5321):1967-1968

Williams J, Spurlock G, Holmans P, Mant R, Murphy K, Jones L et al. (1998) A meta-analysis and transmission disequilibrium study of association between the DRD3 gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 3:141-149

Wiesbeck GA, Dürsteler-MacFarland KM, Wurst FM, Walter M, Petitjean S, Müller S, Wodarz N, Böning J (2006) No association of dopamine receptor sensitivity in vivo with genetic predisposition for alcoholism and DRD2/DRD3 gene polymorphisms in alcohol dependence. *Addict Biol* 11(1):72-75

Wise RA, Rompre PP (1989) Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol* 40:191-225.

Yamada K, Nabeshima T (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J. Pharmacol. Sci* 91 (4): 267–270

Zhang H, Ozbay F, Lappalainen J, Kranzler HR, van Dyck CH, Charney DS, Price LH, Southwick S, Yang BZ, Rasmussen A, Gelernter J (2006) Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants and Alzheimer's disease, affective disorders, posttraumatic stress disorder, schizophrenia, and substance dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B(4):387-393.

Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol. Cell. Neurosci* (4): 234–245

Zuckerman M, Link K (1968) Construct, validity of the sensation seeking scale. *J Consult Clin Psychol* 32: 420–426

Zuckerman M (1994) Behavioral expressions of biosocial bases of sensation seeking. Cambridge University Press, Cambridge

Zuckerman M (1988) Behavior and biology: Research on sensation seeking and reactions to the media. In: Donohew, Lewis/Howard E. Sypher/E. Tory Higgins (Hrsg.): Communication, social cognition, and affect. Hillsdale, NJ, S. 173-194

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Hans Schwering, apl. Prof. für Chirurgie an der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster und Chefarzt der Chirurgischen Klinik des Akademischen Lehrkrankenhauses Marienhospital Euskirchen, danke ich für die freundliche Anregung zu der vorliegenden Untersuchung und seine stete Gesprächsbereitschaft bei der Bewältigung aller Probleme.

Herrn Dr. med. Dirk Lichtermann, ehemals Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie im Zentrum der Nervenheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, bin ich für die liebenswerte Überlassung der Einrichtung seines wissenschaftlichen Labors zu großem Dank verpflichtet.

Herr Dr. Michael Knapp, Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für das große Engagement bei der Lösung aller mathematisch-statistischer Probleme.

Meinen Eltern, meinem Lebensgefährten und meinen Freunden danke ich von Herzen für die moralische und tatkräftige Unterstützung auf dem Weg zur Promotion.

Curriculum Vitae

Dipl. Biol. Nicole Jess

Barkingstr. 3, 53359 Rheinbach

Persönliches

Geburt: 03.03.1974 in Trier

Familienstand: ledig

Eltern: Helmut Matthias Jess und Mathilde
Katharina Jess, geb. Kollmann

Schulbildung

1980 – 1984

Grundschule Klüsserath

1984 – 1993

Auguste-Viktoria Gymnasium Trier ,
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Studium der Biologie

10/1993

Aufnahme des Biologiestudiums an der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität
Bonn

07/1995

Diplom-Biologie Vorprüfung

07/1998

Diplom-Biologie Hauptprüfung

08/1998 – 05/1999

Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. T.
Franz am Anatomischen Institut der Friedrich-
Wilhelms Universität Bonn

05/1999

Abschluss des Studiums Diplom-Biologie

Studium der Medizin

05/1995

Aufnahme des Medizinstudiums an der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität
Bonn

04/1997

Ärztliche Vorprüfung

08/2000

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2000 – 05/2003

Auslandsstipendium in Spanien im Rahmen
der Sokrates/Erasmus-Stiftung

09/2002

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2002 - 11/2003

Praktisches Jahr im St. Nikolaus-Stiftshospital
Andernach

11/2003

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

01/2004 – 03/2005

AIP und Assistenzärztin der Inneren Medizin
im Rahmen der Weiterbildung „Diagnostische
Radiologie“
in der Ahrtalklinik, Fachkrankenhaus für
Angiologie und Kardiologie, Sinzig

04/2005 – 03/2007

Assistenzärztin im Rahmen der Weiterbildung
„Diagnostische Radiologie“ im Radiologischen
Institut Praxis Dr. von Essen, Koblenz

04/2007 – 05/2008

Assistenzärztin im Rahmen der Weiterbildung
„Diagnostische Radiologie“ im St. Elisabeth
Krankenhaus, Neuwied

seit 6/2008

Assistenzärztin im Rahmen der Weiterbildung
„Diagnostische Radiologie“ im Marienhospital,
Euskirchen

Rheinbach, den 12.12.2008