

Aus der Psychiatrischen und Psychotherapeutischen Klinik  
der  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Direktor: Prof. Dr. J. Kornhuber

---

# **Die Methylierung des Nerve Growth Factor Promotors im Alkoholentzug**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von  
Christian Karl Eberlein  
aus  
Nürnberg



**Gedruckt mit Erlaubnis der  
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg**

**Dekan:** Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jürgen Schüttler

**Referent:** Prof. Dr. med. Thomas Hillemacher

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Stefan Bleich

**Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2012**

***Meinen lieben Eltern und Anne  
in Dankbarkeit gewidmet.***

<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenfassung .....	1
1.1.1 Hintergrund und Ziele .....	1
1.1.2 Material und Methoden.....	2
1.1.3 Ergebnisse und Beobachtungen .....	2
1.1.4 Schlussfolgerungen.....	2
1.2 Summary .....	3
1.2.1 Background .....	3
1.2.2 Material and Methods.....	4
1.2.3 Results .....	4
1.2.4 Conclusions.....	4
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
2.1 Alkoholabhängigkeit.....	5
2.2 Geschichte der Genetik .....	7
2.3 Epigenetik.....	8
2.4 DNA-Methylierung .....	8
2.4.1 Ort und Funktion.....	8
2.4.2 Ablauf .....	10
2.5 Methylierung und Krankheitsentstehung .....	12
2.6 Nerve Growth Factor (NGF) .....	14
2.7 Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
3.1 FARS-Proben .....	17
3.1.1 Studiendesign und Patienten .....	17
3.1.2 ICD-10 Diagnosekriterien der Alkoholabhängigkeit.....	18
3.1.3 DNA-Extraktion aus EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) - Vollblut	19
3.2 PCR-Prinzipien .....	20
3.2.1 Analyse der promotorspezifischen Methylierung mittels Bisulfit- Methode .....	21
3.2.1.1 Material.....	21
3.2.1.2 Prinzip.....	22
3.2.1.3 Bisulfitkonversionsreaktion .....	24
3.2.1.4 Aufreinigung der konvertierten DNA.....	25
3.2.1.5 Bisulfit-DNA PCR.....	25
3.2.1.6 Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	27

3.2.1.7	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	27
3.2.1.8	Photometrische Messung der aufgereinigten PCR-Produkte ...	28
3.2.1.9	Sequenzierreaktion.....	28
3.2.1.10	Auswertung der Messergebnisse .....	29
3.3	Gelelektrophorese .....	29
3.3.1	Material.....	29
3.3.2	Durchführung.....	30
3.4	Statistische Methoden .....	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
4.1	Ergebnisse zur promotorspezifischen Methylierung.....	32
4.1.1	Unterschiede in der Methylierung zwischen Tag 1 und Tag 7 (nur FARS 2).....	32
4.1.2	Unterschiede in der Methylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe ...	32
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>33</b>
5.1	Vor- und Nachteile der Studie.....	33
5.2	Diskussion der Ergebnisse der promotorspezifischen Methylierung unter Berücksichtigung der Literatur .....	34
5.3	Bedeutung für die Praxis .....	35
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>47</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	47
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	48
7.3	QIAamp DNA Mini und Blood Mini Handbuch .....	48
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Bisherige Veröffentlichungen mit den Daten dieser Arbeit .....</b>	<b>53</b>

## **1 Zusammenfassung**

### 1.1 Zusammenfassung

#### 1.1.1 Hintergrund und Ziele

Bei Patienten mit Alkoholabhängigkeit sind Veränderungen der neuronalen Plastizität, des neuronalen Wachstums und der neuronalen Übertragung bekannt. Alkohol wirkt sich zudem negativ auf die Funktion des Immunsystems aus. Neurotropine gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die grundlegend in Zusammenhang mit den neuronalen Zellfunktionen und der neuronalen Zellregeneration nach Zellschädigung zu stehen scheinen. Als eines der bestuntersuchten Neurotropine spielt der Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor, NGF) bei der Reparatur cholinergischer Neurone im Frontalhirn eine Rolle und verfügt über immunmodulatorische Funktionen. In früheren Studien wurden bei alkoholabhängigen Patienten Veränderungen der peripheren NGF-Serumspiegel beobachtet. Bei einer weiteren Untersuchung (Franconian Alcoholism Research Study (FARS)) stellte sich heraus, dass die peripheren Blutspiegel des NGF signifikant mit der Alkoholeinwirkung assoziiert waren und zudem bei Alkoholentzug ein signifikanter Rückgang der Spiegel zu beobachten war. Bis heute sind die genauen Zusammenhänge der NGF Genexpression noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein wesentlicher, epigenetischer Regulationsmechanismus beruht auf der Methylierung von Cytosin-Guanin-Abschnitten, sog. CpG Inseln, in der Promotorregion des betreffenden Gens. In diesem Zusammenhang weiß man, dass eine erhöhte Methylierungsrate der CpG Inseln an der Promotorregion zu einer epigenetisch gesteuerten Herunterregulation der Expression des betreffenden Gens führen.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung des Einflusses von Alkohol auf die epigenetische Regulation des NGF-Gens bei Patienten mit Alkoholabhängigkeit.

### 1.1.2 Material und Methoden

Von insgesamt 60 alkoholabhängigen Patienten im Alter zwischen 28 und 62 Jahren (aus der Franconian Alcoholism Research Studies FARS 1 und 2) wurden Blutproben zu Beginn des Alkoholentzugs (FARS 1 und 2) und nach weiteren sieben Tagen (nur FARS 2) akquiriert. Dem gegenüber standen Blutproben 23 physisch und psychisch gesunder Kontrollpersonen. Nach Extraktion der DNA aus dem Vollblut erfolgte die Analyse der promotor-spezifischen Methylierung des NGF-Promotors mittels Bisulfit-Methode. Hierbei konvertieren nur unmethylierte Cytosin-Nukleotide zu Uracil, daran schloss sich eine Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung der zu untersuchenden DNA-Region an. Nach Sequenzierung des Amplifikats wurde der quantitative Methylierungsstatus mittels ESME-Software abgeschätzt.

### 1.1.3 Ergebnisse und Beobachtungen

Im Beobachtungszeitraum von sieben Tagen zeigte sich kein signifikanter Effekt des Alkoholentzugs auf die mittlere NGF-Methylierung. Es konnte jedoch eine Interaktion zwischen CpG-Position und Messzeitpunkt beobachtet werden, wobei der Unterschied an der Position 28 der untersuchten CpGs 25-43 in der Post-Hoc-Testung signifikant wurde ( $F=2,975$ ,  $df=38$ ,  $P<0,001$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich bei der Analyse der Daten der CpGs 7-43 ( $n$  Patienten  $>60$ ,  $n$  Kontrollen  $>23$ ) signifikante Unterschiede der DNA-Methylierung einzelner CpGs, allerdings kein Haupteffekt der Gruppe (Abhängige Variable: Methylierung. Patienten/Kontrollen:  $F=1,97$ ;  $df=1$ ;  $P=0,160$ ; Patienten/Kontrollen\*CpG-Position:  $F=9,47$ ;  $df=72$ ;  $P<0,001$ ). Die Parameterschätzung zeigte signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen an den Positionen 7, 11, 12, 15, 17, 18, 33, 34, 35, 39, 41.

### 1.1.4 Schlussfolgerungen

Die in früheren Studien beobachteten Steigerungen des NGF-Plasmaspiegels bei Alkoholabhängigen in Phasen des Konsums und der

anschließende Abfall im Entzug wurde als Teil der Neuroprotektion interpretiert. Es konnte nun eine Veränderung der Methylierung des NGF-Promotors gezeigt werden, die Teil des Regulationsmechanismus dieser Neuroprotektion zu sein scheint. Da aber nicht an allen Positionen des NGF-Promotors signifikante Unterschiede entdeckt werden konnten, liegt der Schluss nahe, dass die Methylierung nur ein Teil des Regulationsmechanismus darstellt. Die Interpretation der Ergebnisse bleibt schwierig, in zukünftigen Studien sollte vor allem ein längerer Beobachtungszeitraum gewählt werden, um weiteren Aufschluss über den Einfluss von Alkohol auf die epigenetische Regulation des NGF-Gens zu erhalten.

## 1.2 Summary

### 1.2.1 Background

Patients suffering from alcohol dependence are known to show alterations of neuronal plasticity, neuronal development and neuronal transmission. Furthermore, alcohol consumption leads to immunocompromising effects. Neurotrophins are members of a group of proteins closely linked to neuronal cellular function and neuronal cellular regeneration after damage. As one of the best investigated neurotrophins the nerve growth factor (NGF) plays a role in the restoration of cholinergic neuron in the frontal brain and has immunomodulatory character. Former studies were able to show alterations of NGF-levels in peripheral blood of alcohol dependent patients. The Franconian Alcohol Research Studies (FARS) was able to show a significant association of NGF-levels in peripheral blood and the exposure to alcohol while levels decreased after detoxification. Up to the current day exact relations of influences on the NGF-gene expression are not yet entirely understood. One fundamental epigenetic regulatory mechanism is based on the methylation of cytosine-guanine-sections in the promoter region of a gene called CpG-islands. In this context an increased rate of methylation of CpG-islands in the promoter of a gene leads to epigenetic controlled down-regulation of expression of this gene.



Aim of this study was the investigation of influences of alcohol on the epigenetic regulation of the NGF-gene in patients suffering from alcohol dependence.

### 1.2.2 Material and Methods

Blood samples from 60 alcohol dependent patients between age 28 and 62 were taken on day 1 (FARS 1 and 2) and on day 7 (FARS 2 only) of detoxification therapy compared to blood samples from 23 physically and mentally sane controls. After DNA-extraction analysis of the promotor specific methylation of the NGF-promotor was performed using the bisulfite method. Here non-methylated cytosine nucleotides convert to uracil followed by a polymerase chain reaction. After sequencing of the amplificate quantitative methylation was estimated using the ESME-Software.

### 1.2.3 Results

After the 7 day period of alcohol withdrawal there was no significant effect on the mean NGF-methylation detectable. An interaction between CpG-position and point of measurement could be revealed whereat position 28 of the analysed CpGs 25-43 showed significant difference in post-hoc testing ( $F=2,975$ ,  $df=38$ ,  $P<0,001$ ). In comparison to the controls ( $n$  patients  $>60$ ,  $n$  controls  $>23$ ) significant differences in DNA-methylation of single CpGs could be revealed, but no main effect for group (dependent variable: methylation. Patients/controls:  $F=1,97$ ;  $df=1$ ;  $P=0,160$ ; patients/controls\*CpG-position:  $F=9,47$ ;  $df=72$ ;  $P<0,001$ ). Parameter estimators showed significant differences between patients and controls on positions 7, 11, 12, 15, 17, 18, 33, 34, 35, 39, 41.

### 1.2.4 Conclusions

Increase of NGF plasma levels in alcohol dependent patients in periods of alcohol consumption followed by a decrease after detoxification observed in former studies was interpreted as part of the neuroprotective mechanism. The alteration in the methylation of the NGF-promotor could be part of

regulatory mechanism of neuroprotection. However, not all positions of the NGF-promotor showed significant differences, the conclusion might be drawn that methylation is just one part of this mechanism. Interpretation of the results is challenging since further investigations with longer periods of observation are realized to gain further knowledge of the influence of alcohol on the epigenetic regulation of the NGF-gene.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Alkoholabhängigkeit**

Alkoholabhängigkeit stellt bei Männern die häufigste psychische Störung dar. Der Pro-Kopf-Konsum reinen Alkohols in der BRD betrug im Jahre 2006 etwa 10,1 l. Schon dieser hohe Pro-Kopf-Konsum von Alkohol lässt auf eine starke Alkoholbelastung in der Bevölkerung schließen. Objektivierbare Daten hierfür haben Felduntersuchungen zur Häufigkeit von Alkoholmissbrauch und Abhängigkeit ergeben. Eine wichtige, diesbezüglich durchgeführte Untersuchung war die Oberbayerische Verlaufsuntersuchung (Fichter 1990), die bei Männern eine Lebenszeitprävalenzrate für eine behandlungsbedürftige Alkoholabhängigkeit von 7,1 % aufzeigte. Weitere 7,9 % wiesen einen leichten Grad von Alkoholismus auf. Für München fanden Wittchen et al. (1992) für Männer eine Lebenszeitprävalenz der Alkoholabhängigkeit von 13 %.

Alkoholabhängige weisen eine Vielzahl von psychometrisch bzw. neuropsychologisch fassbaren Defiziten auf. Das organische Psychosyndrom bei Alkoholabhängigen ist einerseits durch relativ klar umschriebene neuropsychologische Defizite, zum anderen aber auch durch eine Vielzahl von Verhaltensauffälligkeiten oder einen Persönlichkeitswandel im Sinne einer organischen Wesensänderung gekennzeichnet, die testpsychologisch relativ schwierig zu objektivieren ist. Die wichtigsten Ausfälle finden sich vor allem in den Bereichen Aufmerksamkeit und Konzentration, verbales und räumliches Gedächtnis, verbales Lernen, Zeitwahrnehmung, Problemlösestrategien und Abstraktionsvermögen, räumliches Vorstellungsvermögen und Motorik (Übersicht in Soyka 1995). Relativ häufig sind auch visuelle Merkfähigkeitsstörungen. Die Funktionen sowohl der

rechten wie der linken Hirnhemisphäre können beeinträchtigt sein. Zu den relativ klar umschriebenen neurophysiologischen Defiziten gehören Dyspraxie oder Dysarthrie.

Entsprechende Defizite finden sich nicht nur bei Patienten mit langjähriger Alkoholabhängigkeit, sondern häufig schon bei sog. sozialen Trinkern. Interessanterweise konnten Emmerson et al. (1988) keinen Zusammenhang zwischen Trinkmenge und Ausmaß der kognitiven Defizite finden, ein Befund der z. B. von Bolter u. Hannon (1986) aber nicht sicher repliziert werden konnte. Für die Entwicklung von Hirnatrophien und neuropsychologischen Auffälligkeiten spielt sowohl die neurotoxische Wirkung von Alkohol eine große Rolle, aber auch Leberfunktionsstörungen (Tarter et al. 1986).

Neuropathologisch gesichert ist bei Alkoholismus seit langem das Auftreten von Hirnatrophien, wobei der Verlust von grauer Substanz gesichert, der von weißer Hirnsubstanz umstritten ist. Jensen und Pakkenberg (1993) fanden, dass Alkoholabhängige häufig einen Schwund der weißen Hirnsubstanz aufwiesen, während sie im Bereich des Neokortex keine entsprechenden Veränderungen aufwiesen. Vor allem im Bereich des Hippocampus, der für Gedächtnisfunktionen wichtig ist, zeigte sich eine Reduktion der Hirnsubstanz (Wilhelm und Bleich 2008). Bekanntermaßen ist der Untergang von Neuronen im Neokortex irreversibel, während die Autoren meinten, dass in ihrer Funktion eingeschränkte bzw. geschädigte Axone unter Abstinenzbedingungen wieder regenerieren könnten, so lange die Nervenzellkörper erhalten sind.

An neuropsychiatrischen Veränderungen sind vor allem die hirnorganischen Defizite in Zusammenhang mit dem Wernicke-Korsakow-Syndrom zu erwähnen. Anders als beim Morbus Alzheimer sind die kognitiven Störungen beim Wernicke-Korsakow-Syndrom in der Regel (bei Abstinenz) nicht progredient. Auf neurochemischer Ebene wurde insbesondere eine Dysfunktion des glutamatergen NMDA-Rezeptors, der für Lern- und Gedächtnisfunktion von großer Bedeutung zu sein scheint, hingewiesen (Tsai et al. 1995). Auch ein Adrenalindefizit wurde bei Korsakow-Syndromen diskutiert (McEntee und Mair 1980). Weiter wurde eine serotonerge Dysfunktion postuliert. Eine effektive Pharmakotherapie des Korsakow-

Syndroms ist bisher nicht bekannt. In experimentellen Untersuchungen wurden vor allem Serotoninwiederaufnahmehemmer sowie der  $\alpha$ -Rezeptor-Agonist Clonidin eingesetzt (Preuss u. Soyka 1997).

Bisher ist aber noch nicht ausreichend geklärt, in wieweit genetische oder epigenetische Veränderungen für die eben beschriebenen Veränderungen ursächlich oder zumindest beteiligt sein könnten.

## 2.2 Geschichte der Genetik

1865 hielt der Augustinermönch und katholische Priester Gregor Mendel seinen Vortrag „Versuche über Pflanzen-Hybriden“ und gilt seitdem als Begründer der genetischen Forschung. Nur drei Jahre später entdeckte Friedrich Miescher in einem Extrakt aus Leukozyten-Zellkernen die chemische Substanz der Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Hartl 2001). Danach blieb die Funktion dieser Struktur jahrzehntelang unbekannt, wenngleich schon 1883 von Roux und Weismann die These aufgestellt wurde, dass die Erbinformation in den Chromosomen zu finden sei. Sutton und Boveri griffen diesen Gedanken wieder auf und stellten 1904/05 die „Chromosomentheorie der Vererbung“ vor. Während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde jedoch sehr kontrovers diskutiert, welcher Bestandteil der Chromosomen- Proteine oder Desoxyribonukleinsäure-tatsächlich für die Codierung der Erbinformation verantwortlich sei. Zahlreiche Wissenschaftler vermuteten, die enorme genetische Variabilität könne nur von den komplexen Proteinen, nicht jedoch von der einfachen, nur aus vier Basen sowie Phosphorsäure und dem Monosaccharid Desoxyribose bestehenden DNA-Struktur verschlüsselt werden. Erst durch die 1928 von Griffith durchgeführten Versuche an pathogenen Pneumokokkenstämmen und die sich darauf beziehenden Experimente von Avery konnte 1944 die DNA zweifelsfrei als Träger unserer Erbinformation identifiziert werden. Das Strukturmodell der DNA ist schließlich seit 1953 durch Watson und Crick bekannt. Nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen erschöpft sich aber die genetische Komplexität nicht in der Abfolge der vier DNA-Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, sondern erfährt vielmehr durch epigenetische Modifikationen eine umfassende Ausweitung.

## 2.3 Epigenetik

Die Epigenetik stellt die Gesamtheit der „epi“ - d.h. auf oder über der DNA ablaufenden Prozesse dar, die Veränderungen in den Genfunktionen hervorrufen können, ohne dabei die Gensequenz zu verändern (Rodenhiser 2006). So kann durch kovalente Modifikation an der DNA und den umgebenden Proteinstrukturen Einfluss auf die Genexpression genommen werden (Fuks 2005; Cheung 2000). Neben der Acetylierung (Strahl und Allis 2000), Phosphorylierung (Cheung 2000) und Methylierung (Jenuwein und Allis 2001; Zhang und Reinberg 2001; Lachner und Jenuwein 2002) von Histonen, den „Packproteinen“ der DNA, zählt die Methylierung der DNA selbst zu diesen Regelmechanismen. Darüber hinaus sind auch RNA-Moleküle am Regulationsprozess beteiligt (Grewal und Moazed 2003). Hierdurch können Gene sowohl verstärkt als auch vermindert oder gar nicht transkribiert werden. Epigenetische Modifikationen tragen somit in einem wesentlichen Teil zur „Spezialisierung“ verschiedener Zellen eines Organismus bei, die – trotz gleichartiger Erbinformation – ihrer Aufgabe entsprechend unterschiedliche Proteine exprimieren können (Abdolmaleky et al. 2004). Die direkte DNA-Methylierung, ein hierbei sehr wichtiger Regulationsprozess, der die Transkriptionsrate meist supprimiert, soll im Folgenden näher erläutert werden (Hake et al. 2004).

## 2.4 DNA-Methylierung

### 2.4.1 Ort und Funktion

Die DNA-Methylierung erfolgt an Cytosin-Guanin-Dinukleotiden, die in variabler Frequenz im gesamten Genom zu finden sind. Als sog. CpG-Islands werden hierbei Stellen in der DNA bezeichnet, die eine Häufung derartiger Cytosin-Guanin-Sequenzen aufweist und sich innerhalb oder in unmittelbarer Nähe zu den regulatorischen Regionen von 50-60 % aller Gene befinden (Costello und Plass 2001). Nur etwa 30 % dieser CpG-Islands in den Promotorregionen aktiver Gene weisen eine Methylierung auf, während im gesamten Vertebratengenom 70-80 % aller Cytosin-Guanin-Sequenzen methyliert sind (Abdolmaleky et al. 2004; Ehrlich et al. 1982). Die CpG-Methylierungsrate unterscheidet sich gewebs- und zellspezifisch und trägt

entscheidend zur Differenzierung und Spezialisierung der Körperzellen bei (Kress et al. 2001). So werden bestimmte neuronale Peptide, Rezeptoren oder Hormone lediglich von Zellen des Nervensystems exprimiert (Bird 2002). In differenzierten Zellen kann die Methylierung je nach aktuellen Anforderungen auch kurzfristig verändert werden. Während Laktation und Gestation werden beispielsweise Methylierungsmuster in der Hypophyse und dementsprechend die Expression bestimmter Hormone wie Prolaktin und Somatotropin (Growth Hormone, GH) den physiologischen Anforderungen angepasst (Kumar und Biswas 1988).

Des Weiteren sind jedoch spezifische, in differenzierten Körperzellen generell stabile und erbliche Methylierungsmuster (Reik et al. 2001) auch imstande, eine dauerhafte Genabschaltung zu bewirken. Dieser Mechanismus findet sich beispielsweise bei der X-chromosomalen Inaktivierung zur Dosiskompensation in weiblichen Säuger-Zellen wieder (Panning und Jaenisch 1998). Im Rahmen der Embryonalentwicklung werden hierbei bestimmte Gene auf einem der beiden X-Chromosomen durch zufällige Auswahl mittels Methylierung abgeschaltet, um ein genetisches Gleichgewicht zu dem in männlichen Zellen nur einfach vorkommenden X-Chromosom zu schaffen. Genorte, die auf dem männlichen Y-Chromosom eine Entsprechung finden, bleiben allerdings aktiv. Dieser Vorgang führt dazu, dass sich in den Körperzellen weiblicher Individuen ein Mosaik aus inaktivierten X-Chromosomen befindet, die teils paternalen, teils maternalen Ursprungs sind.

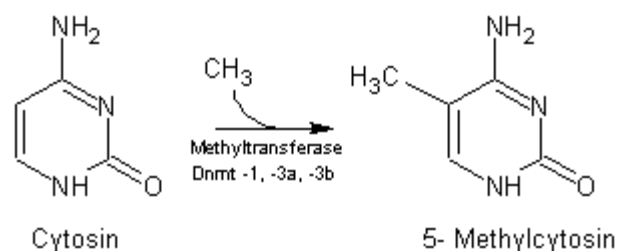
Auch beim „Genomischen Imprinting“ (Crouse 1960; Hartl 2001) spielt die Methylierung eine bedeutende Rolle. Hierbei handelt es sich um einen genregulatorischen Vorgang, der schon in den Keimzellen (Hartl 2001) die Abschaltung bestimmter maternaler oder paternaler Allele bedingt. Genorte homologer Chromosomenpaare werden also, abhängig von der parentalen Herkunft, gelegentlich nur „einzeln“ exprimiert (Watson und Goodman 2002).

Obwohl das Genom reifer Keimzellen eine extensive Methylierung aufweist, ist die Frühentwicklung der Zygote von einer genomweiten Demethylierungswelle gekennzeichnet (Plass und Soloway 2002). Die dem Imprinting unterworfenen Gene sind jedoch von diesem Ablauf

ausgenommen und zeigen so die geschlechtsspezifischen Methylierungsmuster an (Hartl 2001; Alberts 2008). Um den Zeitpunkt der Implantation herum erfährt das ganze Genom schließlich eine umfassende de-novo-Methylierung (Reik et al. 2001). Während der gesamten Embryogenese bleibt diese Prägung dann erhalten (Hartl 2001). Hierbei handelt es sich vorrangig um Gene, die am fetalen oder plazentaren Wachstum beteiligt sind (Alberts 2008). Durch entsprechendes Imprinting wird beispielsweise nur das paternale Allel des fetalen Wachstumsfaktors Igf2 (insulin-like growth factor 2) und nur das maternale Igf2-Rezeptor-Gen exprimiert (Russo 1996; Abdolmaleky et al. 2004; Li et al. 1993). Dieser Vorgang unterstützt die These, dass die unterschiedliche „Prägung“ durch den „Interessenkonflikt“ maternaler und paternaler Gene während der Embryonalentwicklung entstanden sei. So zielt maternales Imprinting oft auf die Bewahrung mütterlicher Ressourcen ab, wohingegen paternale Methylierungsmuster eher das fetale Wachstum fördern können (Russo 1996; Hartl 2001).

#### 2.4.2 Ablauf

Die Methylierung der 5'-CG-3'-Dinucleotide (Hartl 2001) erfolgt an der C5-Position des Cytosins (s. Abbildung 1) und wird durch eine spezifische Enzymfamilie, die DNA-Methyltransferasen (Dnmt1, 2, 3a, 3b), katalysiert. Die Methylgruppe stammt hierbei von S-Adenosyl-L-Methionin (Bestor und Verdine 1994). Auf die Basenpaarung im DNA-Doppelstrang hat die Konversion von Cytosin zu 5-Methylcytosin keinen Einfluss (Alberts 2008).



**Abbildung 1 Methylierung von Cytosin**

Die Funktionen der Methyltransferasen im Zellzyklus unterscheiden sich innerhalb der Enzymfamilie: während Dnmt3a und 3b für die de-novo-Methylierung von DNA-Abschnitten zuständig sind (Hsieh 1999), stellt die ubiquitär in Säugetiergewebe vorkommende DNA-Methyltransferase Dnmt1 (Yoder et al. 1997) überdies auch die Übertragung des Methylierungsmusters auf die Tochterzelle sicher (Bestor 2000). Bei der DNA-Replikation lagert sie sich vorzugsweise an hemimethylierte DNA an und synthetisiert am neu gebildeten Strang die hier noch fehlenden Methylgruppen an spezifischen CG-Sequenzen komplementär zum ursprünglichen Strang (Robertson et al. 1999).

Der Vorgang der de-novo-Methylierung erhält bei der Regulation von Imprinting, X-chromosomaler Inaktivierung (Bird 2002) sowie embryonaler Frühentwicklung (Razin und Cedar 1991) besondere Bedeutung und kann bei gestörter Regulation zur Karzinogenese beitragen (Jones 1986). Auch an der Methylierung endogener, im Genom befindlicher Retrovirus-DNA und Transposons ist dieser Prozess beteiligt (Yoder et al. 1997).

Im Unterschied zu den übrigen bekannten DNA-Methyltransferasen methyliert die bislang nur wenig erforschte Dnmt2 nicht DNA, sondern RNA-Sequenzen und ist primär im Cytoplasma lokalisiert (Goll et al. 2006).

Die im Zusammenhang mit der DNA-Methylierung beschriebene Gen-Inaktivierung (Bird 1992) wird auf eine Veränderung der Protein-DNA-Interaktion zurückgeführt (Razin und Cedar 1991), wobei zwei unterschiedliche Mechanismen ins Auge gefasst werden können:

Auf der einen Seite verhindern methylierte CpGs direkt die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen, während auf der anderen Seite bestimmte transkriptionshemmende Proteinkomplexe umso spezifischer an methylierten Regionen binden (Bird 2002). Von dieser, sich in einer methyl-CpG-bindenden Domäne (MBD: Methyl binding domain) ähnelnden, Proteinfamilie sind inzwischen folgende Proteine bekannt: MeCP1, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 (Hendrich und Bird 1998; Bird 2002). Die DNA-Glycosylase MBD4 ist ein Reparaturenzym, welches desaminierte 5-Methylcytosin-Basen von der DNA entfernt (Jin et al. 2005).



MeCP2, MBD1 und die Untereinheiten des MeCP1-Komplexes, MBD2 und 3, (Jin et al. 2005) sind an der methylierungsinduzierten Transkriptionshemmung beteiligt. So verhindern MeCP2 und MBD1 die Genexpression durch Bindung an methylierte Promotoren (Jones und Laird 1999; Nan et al. 1997), wobei MeCP2 auch durch die Inhibierung von Histon-Deacetylasen und konsekutive Chromatinkondensation wirkt (Nan et al. 1998).

## 2.5 Methylierung und Krankheitsentstehung

Störungen im Methylierungsmuster können vielfältige Krankheitsbilder hervorrufen. So spielt bei der Krebsentstehung sowohl die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen (Jones und Laird 1999) also auch die globale Hypomethylierung (Gama-Sosa et al. 1983) mit folgender chromosomaler Instabilität (Eden et al. 2003) oder Aktivierung von Onkogenen (Holliday und Pugh 1975) eine bedeutende Rolle. Beispielsweise wird in Zellen kolorektaler Karzinome typischerweise eine regionale CpG-Hypermethylierung gefunden, während genomweit eine Hypomethylierung vorliegt (Feinberg et al. 1988). Dieses Phänomen wird auf eine zunehmende Dysregulation der Dnmt1 zurückgeführt, die schließlich zur Entartung von Zellen und Krebsentstehung beiträgt (De Marzo et al. 1999).

Fehlerhafte Imprintingvorgänge auf Chromosom 15q11-q13 sind auch bei den genetischen Krankheitsbildern des Prader-Willi Syndroms (PWS) und des Angelman Syndroms (AS) involviert. Diese zeichnen sich durch mentale Retardierung variablen Ausmaßes, neuromuskuläre Defekte und weitere, unterschiedliche Merkmale aus (Hartl 2001). Die Gene des genannten Chromosomenabschnittes sind durch elternspezifische Prägung charakterisiert. Während beim PWS die paternale Kopie des entsprechenden - normalerweise nur vom väterlichen Chromosom exprimierten - Genabschnittes fehlt oder inaktiviert ist, ist dies beim AS entsprechend immer das mütterliche Allel. Neben fehlgesteuerten Imprintingvorgängen können auch uniparentale Disomien und Deletionen an der funktionellen Nullisomie der Patienten ursächlich beteiligt sein (Martin et al. 1998).

Doch auch im Zusammenhang mit psychischen Krankheitsbildern richtet die Forschung zunehmendes Augenmerk auf die Epigenetik. So stützen verschiedene Veröffentlichungen innerhalb der letzten Jahre die These, dass besonders die DNA-Methylierung bei der Pathogenese der Schizophrenie eine wichtige Rolle innehat (Krebs et al. 2009; Abdolmaleky et al. 2004; Abdolmaleky et al. 2005; Grayson et al. 2005). Besondere Bedeutung erhält hierbei das Glykoprotein Reelin, welches an neuronaler Migration, Differenzierung und Signalübertragung im ZNS beteiligt ist und vorzugsweise von GABAergen Interneuronen des Kortex sezerniert wird (Guidotti et al. 2000): Im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten bzw. Patienten mit bipolaren affektiven Störungen zeigt sich ein signifikanter Abfall von Glutamat-Decarboxylase  $GAD_{67}$ - und Reelin-mRNA um 30 bis 50% im Vergleich zu nicht psychisch Erkrankten, der auf eine Herunterregulation der entsprechenden Gene zurückzuführen ist. Eine Ursache dieser verminderten Genexpression findet sich in der Hypermethylierung des Reelin-Promotors in den post-mortem Gehirnen Schizophrener (Abdolmaleky et al. 2005), die mutmaßlich von einer Überexpression der DNA-Methyltransferase Dnmt1 in deren GABAergen Neuronen ermöglicht wird (Grayson et al. 2005; Veldic et al. 2005).

Auch epigenetische Dysregulation der membrangebundenen Catechol-O-Methyltransferase (MB-COMT), einem Enzym, das im Nervensystem an der Inaktivierung von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin beteiligt ist, konnte als Risikofaktor für die Entstehung von bipolaren affektiven Störungen und Schizophrenie ermittelt werden (Abdolmaleky et al. 2006).

Die zu den psychischen Erkrankungen zählenden Abhängigkeitserkrankungen sind in den letzten Jahren ebenfalls in den Fokus molekularbiologischer und epigenetischer Forschung gerückt. So konnte gezeigt werden, dass die Plasmaspiegel des Nerve Growth Factors (NGF) bei alkoholabhängigen Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe während der Intoxikation deutlich erhöht waren und während der Entzugsbehandlung wieder abfielen (Heberlein et al. 2008). Auch hier gibt es deutliche Hinweise auf eine epigenetische Kontrolle der NGF-Spiegel (Heberlein et al. 2010).

So kann also die Erforschung veränderter Methylierungsmuster und der daraus folgenden Genregulation und -expression helfen, den vielschichtigen Entstehungsprozess und Faktoren der Aufrechterhaltung der Alkoholabhängigkeit weiter aufzuklären und neue Therapieoptionen zu eröffnen.

## 2.6 Nerve Growth Factor (NGF)

Bei der Co-Kultivierung von Neuronen und deren Zielgewebezellen wurde bereits in den 1950er Jahren erkannt, dass die Größe einer neuronalen Population von der Größe des Innervationsgebietes abhängt (Black 1993). Man ging schon damals davon aus, dass Zellen des Innervationsgebietes einen Stoff produzieren, der das Wachstum und Überleben von Neuronen positiv beeinflusst. Im Jahre 1952 kam es erstmals zur Beschreibung einer biologischen Substanz, die aus Mäusesarkomzellen isoliert worden war und welche eine wachstumsstimulierende Wirkung auf Nervenzellen aufwies (Levi-Montalcini 1987). Nach Zugabe dieser Substanz zu sympathischen und sensorischen Ganglienzellen aus Hühnerembryonen konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* ein Neuritenwachstum beobachtet werden (Levi-Montalcini 1987). Das von ihren Entdeckern als Neurotrophin bezeichnete Polypeptid wurde später als beta-nerve growth factor (Nervenwachstumsfaktor, NGF) identifiziert. Immunohistochemische Untersuchungen zeigen, dass NGF in einer Vielzahl von Geweben vorkommt. In niedrigen Konzentrationen konnte NGF sowohl in der Plazenta, der Retina als auch in Haarfollikeln nachgewiesen werden (Chakrabarti et al. 1990; Delsite und Djakiew 1999; Yardley et al. 2000). Hohe Konzentrationen an NGF wurden beispielsweise in einigen Schlangengiften und den submaxillaren Drüsen männlicher Mäuse gefunden, welche als Ausgangsmaterial zur Isolierung benutzt wurden (Cohen 1960).

Das NGF-Gen findet sich angelegt auf dem menschlichen Chromosom 1 und existiert in zwei großen Splicevarianten (Edwards et al. 1986, 1988). Die biologisch aktive Form des NGF scheint in allen Geweben ähnlich zu sein und besteht aus einem 13-kDa-Polypeptiddimer, welches durch drei Disulfidbrücken verbunden ist. Die aus 120 Aminosäuren bestehende  $\beta$ -

Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von etwa 26,5 kDa besitzt die bekannten Funktionen des NGF (Greene et al. 1968; Angeletti und Bradshaw 1971). Anhand von Sequenzhomologie bzw. biologischer Aktivität konnten neben NGF fünf weitere Proteine identifiziert werden, welche eine wichtige Rolle während der neuronalen Entwicklung spielen. Hierzu zählen der Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), NT-4/5, NT-6 sowie NT-7 (Leibrock et al. 1989; Ernfors et al. 1990; Hohn et al. 1990; Maisonpierre et al. 1990; Rosenthal et al. 1990; Ip et al. 1992). Diese Neurotrophine weisen untereinander eine Sequenzidentität von über 50 % auf (Barde 1990; Bradshaw et al. 1993), wobei NGF das heute am besten erforschte Neurotrophin darstellt (Connor und Dragunow 1998). Das NGF-Protein bindet hochaffin an den spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptor TrkA (p140trkA) (Kaplan et al. 1991; Klein et al. 1991), mit geringerer Affinität aber auch an den p75-Rezeptor (p75NGFR) (Radeke 1987), an welchen auch alle anderen Neurotrophine binden können (Übersicht in Chao 1994). Anfangs wurde die biologische Funktion des NGF im Rahmen der klassischen Neurotrophinhypothese gesehen, welche auf den zuvor aufgezählten Beobachtungen beruht. Demnach werden bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems Neurotrophine in limitierter Menge von zu innervierenden Zielgeweben produziert und freigesetzt und Neurone werden so zu axonalem Wachstum angeregt. Ohne die Neurotrophinwirkung kommt es zur Apoptose der Neurone. Obwohl dieses Paradigma im peripheren Nervensystem (PNS) zweifellos eine entscheidende Rolle spielt, scheint es nicht die ausschließliche Funktion des NGF darzustellen. Bei Untersuchungen an transgenen Mäusen mit fehlendem BDNF, NGF, NT-3 oder NT-4/5 zeigte sich zwar ein selektiver Verlust autonomer und sensorischer Neurone (Crowley et al. 1994; Jones et al. 1994; Ernfors et al. 1994), im ZNS konnten jedoch keine größeren Zellverluste beobachtet werden. Hierauf beruht die Hypothese, dass die Neurotrophine im Gehirn andere Funktionen als die Förderung des Überlebens und der Differenzierung von Neuronen erfüllen. In der Tat reichen die durch NGF vermittelten Effekte weit über den Entwicklungszeitraum von Neuronen hinaus, was sich auch in dem Umstand widerspiegelt, dass sowohl NGF bis ins Alter gebildet als auch seine Rezeptoren exprimiert werden.

Relevant im Hinblick auf das Thema dieser Arbeit sind dabei die dem NGF zugesprochenen neuroprotektiven Funktionen. So schützt NGF Nervenzellen im Rahmen der Antwort auf Gewebsverletzungen erzeugten, endogenen Noxen und initiiert neuerliches Wachstum und neuronale Reparaturmechanismen. In vitro wurden die durch NGF vermittelten, neuroprotektiven Effekte über die letzten Jahre hinweg für verschiedene Typen von Neuronen ausführlich beschrieben und charakterisiert, darunter auch solche, die kein TrkA oder p75NTR exprimieren. NGF ist beteiligt am Schutz kortikaler, hippokoampaler, striataler, retinaler und weiterer Arten von Neuronen, die im Rahmen von Zellkulturversuchen glutamatvermittelter Excitotoxizität, Hypoglykämie oder oxidativem Stress ausgesetzt waren (Mattson et al. 1995). Diese neuroprotektive Rolle des NGF wurde in einer Vielzahl von Arbeiten in den letzten Jahren bestätigt auch auf die Toxizität von Ethanol ausgeweitet (Cunha et al. 1999, Heaton et al. 1993, Luo et al. 1997, Mattson und Mark 1996, Singer et al. 1999).

## 2.7 Zielsetzung der Arbeit

Bei alkoholabhängigen Patienten sind sowohl Veränderungen der neuronalen Plastizität, als auch des neuronalen Wachstums und der neuronalen Übertragung bekannt (Nutt 1999). Alkoholkonsum wirkt sich zudem negativ auf die Funktion des Immunsystems aus (Choudhry und Chaudry 2008).

Neurotrophine gehören zu einer Proteinfamilie, die prinzipiell in Zusammenhang mit den Zellfunktionen von Neuronen und deren Regeneration nach Zellschädigung zu stehen scheinen (Hellweg et al. 1998; Lang et al. 2004). Als eines der bestuntersuchten Neurotrophine spielt NGF unter anderem bei der Reparatur cholinergischer Neurone im Frontalhirn eine Rolle (Connor und Dragunow 1998; Cuello und Bruno 2007) und verfügt über immunmodulatorische Funktionen (Levi-Montalcini et al. 1996).

In früheren Studien wurden bei alkoholabhängigen Patienten Veränderungen der peripheren NGF-Serumspiegel beobachtet (Jockers-Scherübl et al. 2007; Yoon et al. 2006). In einer weiteren Untersuchung konnte im Rahmen der „Franconian Alcoholism Research Study“ (FARS) gezeigt werden, dass die

peripheren NGF-Serumspiegel signifikant mit der Alkoholeinwirkung assoziiert waren und die Spiegel im Alkoholentzug signifikant zurückgingen (Heberlein et al. 2008). Die Zusammenhänge der peripheren NGF-Konzentration und der NGF-Genexpression sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Studienergebnisse, die eine mögliche epigenetische Regulation des Nervenwachstumsfaktors zeigen, fehlen bisher. Ein wesentlicher epigenetischer Regulationsmechanismus beruht, wie oben beschrieben, auf der Methylierung von Cytosin-Guanin-Abschnitten, sog. CpG-Inseln, in der Promotorregion des betreffenden Gens. In diesem Zusammenhang weiß man, dass eine erhöhte Methylierungsdichte der CpG-Inseln an der Promotorregion zu einer verringerten Expression des betreffenden Gens führen (Marsit et al. 2009).

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung des Einflusses von Alkohol auf die epigenetische Regulation des NGF-Gens in vivo bei Patienten mit Alkoholabhängigkeit.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 FARS-Proben**

##### **3.1.1 Studiendesign und Patienten**

Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenserien stammen aus dem Probenkollektiv der „Franconian Alcoholism Research Study“ (FARS). Die Durchführung dieser Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg nach Prüfung des Ethikantrages genehmigt und für konform gehend mit der Deklaration von Helsinki aus dem Jahr 1996 erklärt. Alle Patienten, die an der Studie teilnahmen, willigten freiwillig und in schriftlicher Form in die Teilnahme ein. Mit den erhobenen Datenmaterialien wurde unter Wahrung des Datenschutzes und der ärztlichen Schweigepflicht umgegangen und ihre Auswertung erfolgte wissenschaftlich anonymisiert.

Insgesamt nahmen 60 Patienten im Alter zwischen 28 und 62 Jahren an der Studie teil, alle erfüllten die Diagnosekriterien für eine Alkoholabhängigkeit gemäß ICD-10. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung befanden sich diese

Patienten zur stationären Entzugstherapie in der Klinik mit Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und in der Klinik für Sucht und Psychotherapeutische Medizin im Klinikum am Europakanal in Erlangen.

Patienten jünger als 18 Jahre oder älter als 69 Jahre wurden von der Studie ausgeschlossen, ebenso Patienten deren Geschäfts- und Einwilligungsfähigkeit zur Einwilligung in eine Teilnahme an der Studie nicht gegeben war. Keiner der eingeschlossenen Patienten wies eine organische Komorbidität im Sinne einer Leberzirrhose, Nieren- oder Pankreasinsuffizienz oder eine psychiatrische Komorbidität auf. Weitere Ausschlusskriterien waren Medikamenten- oder Vitaminpräparateinnahmen.

Als Kontrollkollektiv wurden Blutproben 23 physisch und psychisch gesunder Menschen verwendet.

### 3.1.2 ICD-10 Diagnosekriterien der Alkoholabhängigkeit

Im deutschsprachigen Raum gebräuchlich ist die Verwendung der Diagnosekriterien der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems in der zehnten Ausgabe (ICD-10). Im Kapitel V (F), Kategorie 10 des ICD-10, sind folgende Kriterien einer Alkoholabhängigkeit aufgeführt, wobei die Erfüllung von mindestens drei Merkmalen für die Diagnose einer Alkoholabhängigkeit notwendig ist:

- Ein starker Wunsch oder eine Art Zwang, Alkohol zu konsumieren.
- Verminderte Kontrollfähigkeit bezüglich Beginn, Beendigung und Menge des Alkoholkonsums.
- Ein körperliches Entzugssyndrom bei Beendigung oder Reduktion des Konsums.
- Nachweis einer Toleranz. Um die ursprünglich durch niedrigere Dosen hervorgerufene Wirkung zu erreichen, sind zunehmend höhere Dosen erforderlich, die bei Konsumenten ohne Toleranzentwicklung zu schweren Beeinträchtigungen oder gar zum Tode führten.

- Fortschreitende Vernachlässigung anderer Vergnügen und Interessen, erhöhter Zeitaufwand, um Alkohol zu beschaffen, zu konsumieren oder sich von den Folgen zu erholen.
- Anhaltender Alkoholkonsum trotz Nachweis eindeutig schädlicher Folgen, wie z. B. einer Leberschädigung. Dabei sollte festgestellt werden, dass der Konsument sich tatsächlich über Art und Ausmaß der schädlichen Folgen im Klaren war oder dass zumindest davon auszugehen ist.

### 3.1.3 DNA-Extraktion aus EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) - Vollblut

Zunächst wurde die zu untersuchende DNA der Probanden, welchen im Rahmen der FARS zu einem bzw. zwei Zeitpunkten (FARS 1: Tag 1 oder FARS 2: Tag 1 und 7 nach begonnenem Alkoholentzug) Blut entnommen worden war, aus diesem extrahiert. Das zwischen 8:00 Uhr und 10:00 Uhr entnommene Blut wurde direkt nach Entnahme bei  $-80^{\circ}$  C tiefgekühlt. Die Extraktion der zu untersuchenden DNA wurde mit Hilfe der vollautomatischen Arbeitsplattform Qiacube des Herstellers QIAGEN durchgeführt. Im Anhang findet sich das dabei verwendete Protokoll des eingesetzten Reagenziensatzes QIAamp DNA Blood Mini Kit.

**Tabelle 1**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>QIAmp DNA Blood Mini kit (250)</b> Bestellnr. 51106	Qiagen GmbH, Hilden
<b>QIACube (250 V)</b> Bestellnr. 9001293	Qiagen GmbH, Hilden
<b>Rotor Adaptors (10x24)</b> Bestellnr. 990394	Qiagen GmbH, Hilden



In einem Arbeitsgang konnten jeweils 12 Patientenproben bearbeitet werden. Dazu wurden pro Probe jeweils 200 µl Blut eingesetzt. Die Arbeitsschritte der automatisierten Arbeitsstation QIAcube entsprechen denen des QIAamp DNA Blood Mini kit Protokolls und verliefen dabei in folgender Weise:

200 µl der Probe wurden mit 200 µl des Puffers AL versetzt und für 15 sek. vermischt und danach für 10 min. bei 56 Grad Celsius inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (90 %ig) und Vermischung auf dem Vortex wurde der gesamte Ansatz in eine QIAamp Filtersäule überführt und für eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW1 wurde der Zentrifugations-Schritt wiederholt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW2 wurde für 3 min. bei 20000 g zentrifugiert und anschließend die Filtersäule auf einen neuen 1,5 ml Eppendorf-Cup gesetzt und nach Zugabe von 200 µl Puffer AE und 1 min. Wartezeit bei 6000 g eluiert. Die so extrahierte DNA wurde bei minus 20 Grad Celsius gelagert.

### 3.2 PCR-Prinzipien

Durch die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR (Mullis et al., 1986), ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit spezifische DNA-Abschnitte nahezu exponentiell zu amplifizieren. Hierfür sind folgende grundlegende Schritte erforderlich:

Zunächst erfolgt ein Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges bei hohen Temperaturen, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen getrennt werden. Daraufhin werden – je nach Strangrichtung - Forward- und Reverse-Primer bei spezifischen Temperaturen komplementär an die DNA-Einzelstränge angelagert (Annealing). Diese dienen nun einer hitzestabilen DNA-Polymerase als Startpunkt für die Elongationsreaktion mittels aktivierter Nukleotide, d.h. der Ergänzung des DNA-Einzelstranges zu einem Doppelstrang. Mit der anschließenden Spaltung der neu synthetisierten Doppelstränge beginnt ein neuer PCR-Zyklus, der in vielen Wiederholungen der Vervielfältigung des innerhalb der Primer gelegenen DNA-Stückes dient.

### 3.2.1 Analyse der promotorspezifischen Methylierung mittels Bisulfit-Methode

#### 3.2.1.1 Material

Die folgenden Tabellen erläutern die für die Bisulfit-Methode verwendeten Oligonucleotide (Operon) und Materialien. Die Primer wurden so erstellt, dass sie ein spezifisches Fragment einer Länge von 857 Basenpaaren amplifizieren. Das Fragment von -552 bis +309 bp liegt vor dem ersten Exon des NGF-Gens (Gene Bank Accession Number NG\_007944) und enthält 62 CpG-Gruppierungen innerhalb der 5'-Upstream Promotorregion des Gens. Die folgenden Primer wurden verwendet:

**Tabelle 2**

Verwendung	Primer	Sequenz 5'-3'
Bis-Methode	NGF Fn	TTTGG AATTTAGGGTTTTAAGTTAAG
	NGF R	TCCCTAAACTACAAACCATCCTAAA
	NGFseneF	TTTTGTTAGAGGAGTTTGGGTATTTG

**Tabelle 3**

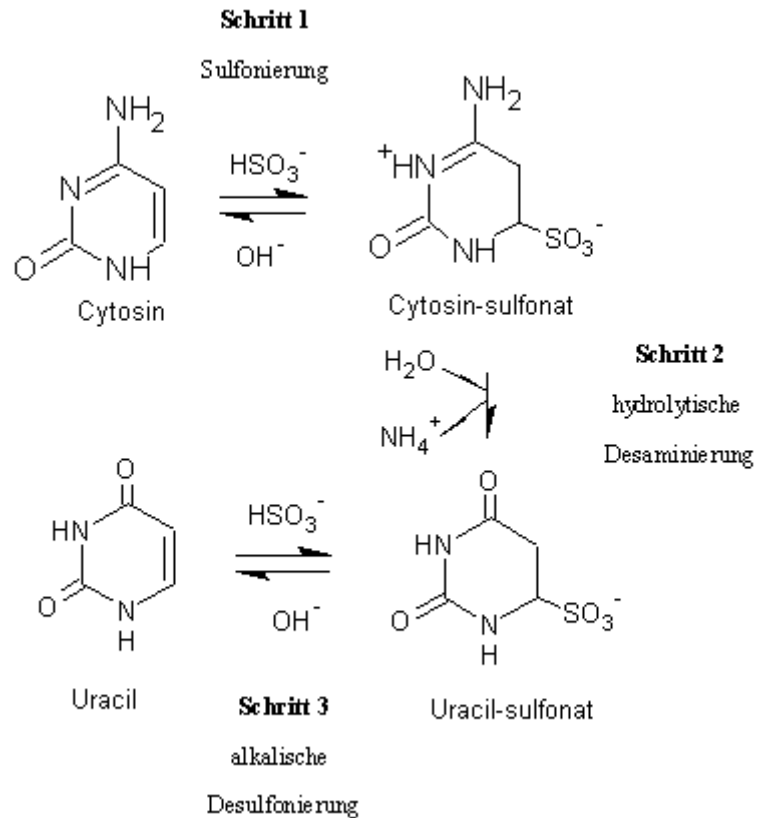
Produkt	Hersteller
<b>UVette</b> (Bestellnr. 0030 106.300)	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Microseal 'B' Adhesive Seals</b> MSB-1001	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>96 Well Polypropylen Microplatte für die PCR</b> (Art.-Nr.: 652201)	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>EpiTect Bisulfite Kit (48)</b>	Qiagen GmbH, Hilden

Bestellnr. 59104	
<b>QIAquick PCR Purification Kit (50)</b> Bestellnr. 28104	Qiagen GmbH, Hilden
<b>HotStar Taq Master Mix Kit (250 U)</b> Bestellnr. 203443	Qiagen GmbH, Hilden
<b>Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</b> incl. Big Dye Terminator v3.1 5× Sequencing Buffer (Bestellnr. 4337455)	Applied Biosystems, Foster City, CA
<b>iCycler Thermal Cycler</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

### 3.2.1.2 Prinzip

Um den promotorspezifischen Methylierungsstatus des NGF-Gens genau zu erforschen, wurde die Bisulfit-Methode herangezogen. Diese ermöglicht es, detaillierte Aussagen über die Methylierung der einzelnen CpG-Inseln innerhalb der untersuchten Promotorsequenz zu treffen.

Die Bisulfit-Methode (Frommer et al. 1992; Clark et al. 1994; Herman et al. 1996) beruht auf der Tatsache, dass in Einzelstrang-DNA die Base Cytosin unter Bisulfiteinwirkung zu Uracil konvertiert (s. Abbildung 2), während methylierte Cytosin-Nukleotide (5'-Methylcytosin) gegen jene Reaktion resistent sind.



**Abbildung 2 Bisulfitmodifikation von Cytosin zu Uracil**

Nach dieser Bisulfitkonversion wird die Bisulfit-DNA mittels strangspezifischer PCR im zu untersuchenden Bereich amplifiziert und dabei Uracil wieder in Thymin übersetzt. Nur die methylierten Cytosin-Nukleotide werden weiterhin als Cytosin vervielfältigt. So kann nach der Aufreinigung der PCR-Produkte schließlich deren Sequenzierung erfolgen und der Methylierungsstatus präzise und sequenzspezifisch analysiert werden.

Die Bisulfitkonversion der nach dem unter 3.1.3 beschriebenen Verfahren isolierten DNA erfolgte mit dem EpiTect Bisulfite Kit von Qiagen nach beiliegendem Protokoll. Folgende grundlegende Schritte wurden hierbei durchlaufen:

Natriumbisulfit-vermittelte Konversion der unmethylierten Cytosinnukleotide zu Uracil im Thermo-Cycler, Bindung der konvertierten Einzelstrang-DNA an die Membran einer EpiTect spin column, Reinigung der gebundenen DNA sowie Elution der reinen, konvertierten DNA von der Säule.

### 3.2.1.3 Bisulfitkonversionsreaktion

Im Einzelnen wurde zunächst die Proben-DNA aufgetaut und die erforderliche Menge an Bisulfit-Mix-Aliquots durch die Zugabe von je 800  $\mu\text{l}$  RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgelöst. Der Bisulfit-Mix wurde so lange auf dem Vortex geschüttelt, bis er komplett gelöst war.

Anschließend wurden die Bisulfit-Reaktionsansätze in 200  $\mu\text{l}$ -Eppendorf-Cups vorbereitet: pro Gefäß wurden hierfür 20  $\mu\text{l}$  DNA, 85  $\mu\text{l}$  gelöster Bisulfit-Mix und 35  $\mu\text{l}$  DNA Protect Buffer pipettiert. Nach Hinzufügung des DNA Protect Buffers konnte ein Farbumschlag des Ansatzes von grün nach blau beobachtet werden, ein Indikator für korrekte Versuchsbedingungen (pH-Wert, Mischung). Einer gründlichen Mischung der Ansätze schloss sich die fünfständige Bisulfitkonversionsreaktion der DNA im Thermo Cycler (Bio-Rad) nach folgendem Protokoll an:

Zyklus	Anzahl	Vorgang	Temperatur	Zeit in Minuten
1	1 x	initiale Denaturierung	99,0°C	5
		Inkubation	60,0°C	25
		Denaturierung	99,0°C	5
		Inkubation	60,0°C	85
		Denaturierung	99,0°C	5
		Inkubation	60,0°C	175
		Halten der Temperatur	20,0°C	$\infty$

#### 3.2.1.4 Aufreinigung der konvertierten DNA

Nach Abschluss der Reaktion wurde die konvertierte DNA aufgereinigt. Dazu wurde jedes PCR-Reaktionsgefäß kurz zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415R) und anschließend der komplette Ansatz in ein 1,5 µl Eppendorf-Cup überführt. Daraufhin wurde 560 µl Buffer BL hinzugefügt und die Lösung durch kurzes Vortexen und Zentrifugieren gemischt. Der gesamte Ansatz wurde dann auf eine EpiTect spin column verbracht und diese bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl Buffer BW (Waschpuffer) auf die Säule pipettiert. Es erfolgten ein weiterer einminütiger Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit und das Verwerfen des Durchflusses. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl Buffer BD (Desulfonierungspuffer) beschickt, danach für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule mit 500 µl Buffer BW befüllt und eine weitere Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Daraufhin wurde die Säule in ein neues 2 ml Sammelröhrchen gesteckt und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um evtl. verbleibende Flüssigkeit zu entfernen. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cup gesteckt, 20 µl Buffer EB auf die Mitte der Membran pipettiert und die aufgereinigte DNA durch eine einminütige Zentrifugation bei 15000 g eluiert. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde die Säule zuletzt in ein neues 1,5ml Eppendorf-Cup überführt und nach dem Auftragen von weiteren 20 µl Buffer EB für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die Lagerung der 40 µl aufgereinigten, Bisulfit-konvertierten DNA pro Probe erfolgte bei minus 20°C.

#### 3.2.1.5 Bisulfit-DNA PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion mit der konvertierten DNA erfolgte im Thermal Cycler (Bio-Rad) und verlief in zwei Schritten. Für den ersten Schritt wurde pro Reaktionsansatz 25 µl HotStarTaq Master Mix von Qiagen (bestehend aus HotStarTaq DNA Polymerase, PCR Buffer mit 3 mM MgCl<sub>2</sub>

und 400  $\mu\text{M}$  je dNTP), 1  $\mu\text{l}$  Primer F (1:4 in  $\text{H}_2\text{O}$  vorverdünnt), 1  $\mu\text{l}$  Primer R (1:4 in  $\text{H}_2\text{O}$  vorverdünnt) und 19  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zu 4  $\mu\text{l}$  konvertierter Proben-DNA pipettiert.

Nach dem unten angeführten PCR-Protokoll verlief nun die erste Extensionsreaktion.

Im zweiten Schritt wurde pro Reaktionsansatz 25  $\mu\text{l}$  HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 1  $\mu\text{l}$  Primer F („Seminested“) (1:4 in  $\text{H}_2\text{O}$  vorverdünnt), 1  $\mu\text{l}$  Primer R (1:4 in  $\text{H}_2\text{O}$  vorverdünnt) und 21  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zu je 2  $\mu\text{l}$  Reaktionsprodukt aus dem ersten PCR-Durchgang pipettiert. Die anschließende Semi-nested-PCR verlief ebenfalls nach dem unten beschriebenen Protokoll.

Zyklus	Anzahl	Vorgang	Temperatur	Zeit in Minuten
1	1 x	initiale Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase	95,0°C	15
2	5 x	Denaturierung	95,0°C	0,5
		Annealing	53,0°C	1,5
		Extension	72,0°C	2,5
3	30 x	Denaturierung	95,0°C	0,5
		Annealing	53,0°C	1,5
		Extension	72,0°C	2
4	1 x	Finale Extension	72,0°C	4

		Halten der Temperatur	4,0°C	∞
--	--	-----------------------	-------	---

### 3.2.1.6 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Um die Länge (und somit die korrekte Amplifizierung) der gewünschten DNA-Abschnitte zu kontrollieren, wurde von jedem PCR-Produkt eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Vorbereitung und Durchführung erfolgten entsprechend dem unter 3.3 erläuterten Protokoll; pro Geltasche wurden hier jedoch 12 µl amplifizierte DNA pipettiert.

### 3.2.1.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen nach beiliegendem Protokoll.

Der Reinigungsvorgang umfasste dabei im Wesentlichen folgende Schritte:

Adsorption der DNA-Stücke an der Silica-Gel-Membran der Purifikationssäule mithilfe eines Bindepuffers, Reinigung der gebundenen DNA von überschüssigen PCR-Bestandteilen sowie Elution der DNA. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in Raumtemperatur bei 13000 rpm (17900 g).

Zunächst wurde zu den je verbleibenden 38 µl PCR-Proben 190 µl Buffer PBI gemischt und der Ansatz nach Kontrolle des Farbindikators auf eine Purifikationssäule (QIAquick spin column) verbracht. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 6000 rpm, um die DNA an die Säule zu binden.

Daraufhin wurde der Durchfluss verworfen und 750 µl Buffer PE (Wash Buffer) auf die Säule pipettiert. Es schloss sich eine weitere einminütige Zentrifugation an. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule für eine Minute zentrifugiert. Schließlich wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Cup eingesetzt und zur Elution der DNA 50 µl Buffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) auf die Membranmitte pipettiert. Es folgte darauf ein letzter, einminütiger Zentrifugationsschritt.



### 3.2.1.8 Photometrische Messung der aufgereinigten PCR-Produkte

Um die genauen DNA-Konzentrationen der PCR-Produkte für die nachfolgende Sequenzierreaktion zu erfassen, wurden sämtliche Proben photometrisch quantifiziert (BioPhotometer No. 6131 00290 von Eppendorf).

Die DNA-Konzentrationen lagen hierbei zwischen 17 ng/µl und 54 ng/µl.

### 3.2.1.9 Sequenzierreaktion

In einer weiteren Polymerase-Kettenreaktion wurden die PCR-Produkte für die anschließende Sequenzierung aufbereitet. Hierzu wurde 2 µl Big Dye Terminator v3.1 5× Sequencing Buffer (Applied Biosystems), 0,6 µl Primer R (5 µM), 0,5 µl Big Dye v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) und 1,9 µl H<sub>2</sub>O zu je 5 µl DNA-Probe pipettiert. Die Zielkonzentration des PCR-Produktes betrug 50 ng, so dass in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration der Probe zum Teil durch Zugabe von H<sub>2</sub>O das Zielvolumen 5 µl ergänzt wurde. Die anschließende Sequenzierreaktion verlief nach folgendem Protokoll im Thermal Cycler (Bio-Rad):

Zyklus	Anzahl	Vorgang	Temperatur	Zeit
1	1 x	Aktivierung	96,0°C	1 Minute
2	28 x	Denaturierung	96,0°C	10 Sekunden
		Annealing	60,0°C	5 Sekunden
		Extension	60,0°C	4 Minuten
3	1 x	Halten der Temperatur	4,0°C	∞

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend bei minus 20°C gelagert.

Die Sequenzierung erfolgte schließlich in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der Universität Erlangen im dortigen molekularbiologischen

Forschungslabor und wurde mittels eines ABI 3730 Sequencer (Applied Biosystems) durchgeführt.

### 3.2.1.10 Auswertung der Messergebnisse

Das quantitative Methylierungsstatus der DNA-Sequenzen wurde mittels der ESME-Software abgeschätzt (Lewin et al. 2004).

## 3.3 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurden nach sämtlichen PCR Gelelektrophoresen durchgeführt. Hierbei werden die synthetisierten DNA-Amplifikate auf einem Agarosegel längenspezifisch aufgetrennt und können mithilfe eines Basenstandards auf die korrekte Länge hin überprüft werden.

### 3.3.1 Material

Tabelle 4 und Tabelle 5 erläutern die für die Gelelektrophorese benötigten Materialien und Geräte.

**Tabelle 4**

Produkt	Hersteller
<b>100 bp DNA Ladder</b> 1 µg/10 µl (GC-015-004 )	Genecraft GmbH, Lüdinghausen
<b>Ethidiumbromidlösung 1%</b> 1 %ige Lösung in Wasser (10 mg/ml), Homidiumbromid, 3,8-Diamino-5-Ethyl-6- Phenylphenanthridinium-Bromid Art. 2218.1	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
<b>peqGOLD Universal-Agarose</b> 500g Bestellnr. 35-1020	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

**Tabelle 5**

Gerät	Hersteller
<b>Sub-Cell GT System</b> Bestellnr. 170-4482	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Gel-Doc 2000</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

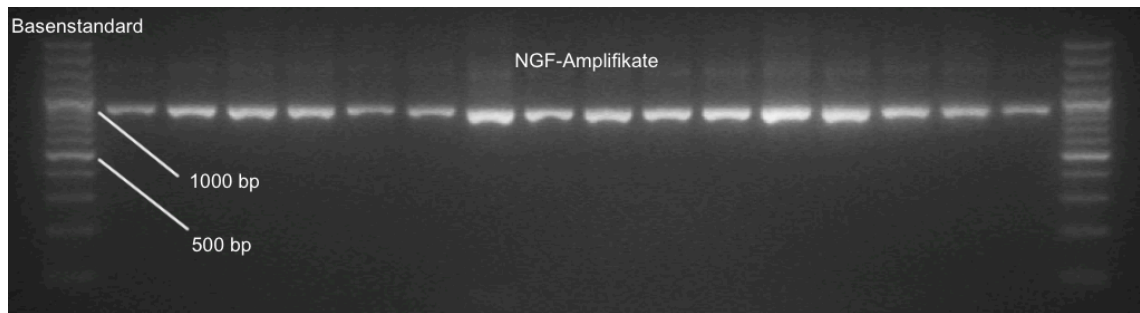
### 3.3.2 Durchführung

Zunächst erfolgte die Anfertigung eines 2%igen Agarosegels, indem Agarose-Pulver in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) vorsichtig aufgekocht und anschließend 1%ige Ehtidiumbromidlösung (2,5 µl Ethidiumbromid pro 200 ml TBE) beigemischt wurde. Das flüssige Gel wurde daraufhin in eine mit Taschenschablonen versehene Gelkammer gegossen. Nach kurzer Aushärtungszeit (ca. 20-30 Minuten) konnte die Taschenschablone entfernt und das Agarosegel in die Elektrophoresekammer überführt werden.

Je 20 µl der zu untersuchenden Proben wurden mit 2 µl blauem 6x-Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die randständigen Taschen wurden mit je 8 µl Basenstandard (100 bp DNA Ladder von Genecraft) befüllt. Die anschließende, etwa einstündige Gelelektrophorese erfolgte bei konstanten 120 Volt.

Daraufhin wurde das Gel mithilfe des GelDoc 2000 (Bio-Rad) unter Anwendung des Programms „Quantity One, Version 4.2.1“ von Bio-Rad fotografiert und die Fragmentlängen der Proben kontrolliert.

Abbildung 3 zeigt die Kontrolle der korrekten Basenpaarlänge am Beispiel von PCR-Amplifikaten zur Analyse des NGF-Promotors aus dem FARS-Kollektiv. Alle Ansätze liegen im gewünschten Längenbereich von 857 Basenpaaren.



**Abbildung 3 Gelelektrophorese**

### 3.4 Statistische Methoden

Für die statistische Analyse der Daten wurde zunächst eine deskriptive Statistik generiert, Gruppenvergleiche erfolgten mittels Ein-Wege-Varianzanalyse für Messwiederholungen. Die Unterschiede in der mittleren und individuellen Methylierung der CpG-Gruppierungen der einzelnen Probanden wurden mittels eines gemischten linearen Modells unter Verwendung der Restricted-Maximum-Likelihood-Methode errechnet. Die Methylierung war dabei abhängige Variable, die individuellen CpG-Gruppierungen und die Untersuchungstage bzw. die Gruppe (Kontrolle vs. Patienten) feste Faktoren. Die einzelnen CpG-Positionen wurden als Wiederholungsmessungen betrachtet, ebenso die Messzeitpunkte. Dabei wurde die Kovarianzmodellierung als skalierte Identität unter Verwendung des AIC als beste Lösung ermittelt. Die Subjektzuordnung wurde als zufälliger Faktor (Varianzkomponenten) in das Modell aufgenommen, um die Interindividuellen Schwankungen im Methylierungsniveau auszugleichen.

Das Alpha-Niveau durchlief eine Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau wurde bei  $\alpha=0.05$  festgelegt.

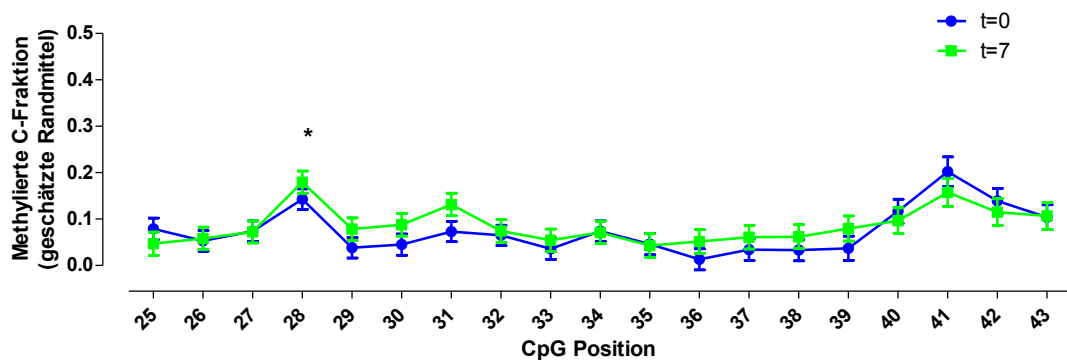
Alle Auswertungen erfolgen mit den Softwarepaketen PASW Statistics 18.0 (IBM Corporation 2010, Sommers, NY, USA) und Graph Pad Prism™ 5.0 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse zur promotorspezifischen Methylierung

#### 4.1.1 Unterschiede in der Methylierung zwischen Tag 1 und Tag 7 (nur FARS 2)

Aufgrund von fehlenden bzw. nicht ausreichenden Messwerten wurden für die Analyse nur die Daten der CpGs 25-43 eingeschlossen. Es zeigte sich im gemischten linearen Modell kein signifikanter Effekt des Alkoholentzugs auf die mittlere NGF-Methylierung. Allerdings konnte eine Interaktion zwischen CpG-Position und Messzeitpunkt beobachtet werden ( $F=2,975$ ,  $df=38$ ;  $P<0,001$ ). In der Post-Hoc-Testung wurde der Unterschied nur an der Position 28 signifikant (s. Abbildung 4).

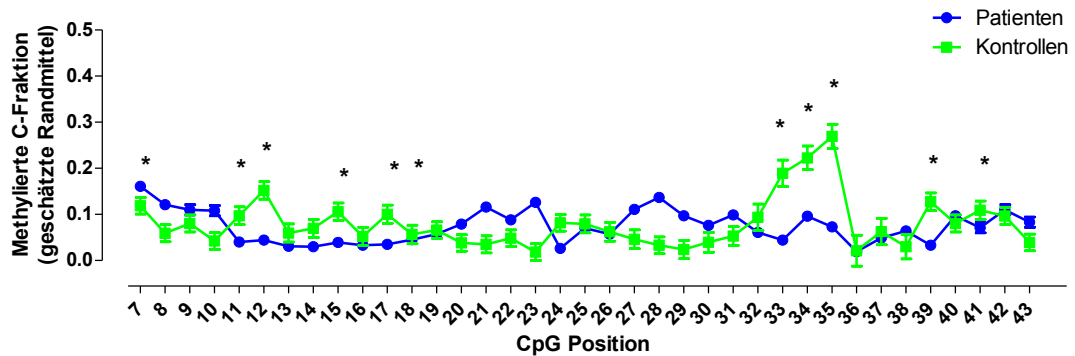


**Abbildung 4 Unterschiede der Methylierung zwischen Tag 1 und Tag 7**

#### 4.1.2 Unterschiede in der Methylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe

Aufgrund von fehlenden bzw. nicht ausreichenden Messwerten wurden für diese Analyse nur die Daten der CpGs 7-43 (n Patienten >60, n Kontrollen >23) eingeschlossen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede der DNA-Methylierung einzelner CpGs zwischen Patienten und Kontrollen, allerdings kein Haupteffekt der Gruppe (Abhängige Variable: Methylierung. Patienten/Kontrollen:  $F=1,97$ ;  $df=1$ ;  $P=0,160$ ; Patienten/Kontrollen\*CpG-Position:  $F=9,47$ ;  $df=72$ ;  $P<0,001$ ). Die Parameterschätzung zeigte

signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen an den Positionen 7, 11, 12, 15, 17, 18, 33, 34, 35, 39, 41 (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5 Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen (geschätzte Randmittel aus dem linearen gemischten Modell; \*: P<0.05)**

## 5 Diskussion

### 5.1 Vor- und Nachteile der Studie

Der Aufbau und der Ablauf der vorliegenden Studie beinhalten einige Vor- und Nachteile, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Einer der Nachteile der Untersuchung liegt in der nur eingeschränkten Zahl der Untersuchungszeitpunkte und bei zwei Untersuchungszeitpunkten in der relativ kurzen Zeit zwischen den beiden Probenentnahmen. Hierdurch konnten jedoch innerhalb der Alkoholentzugsbehandlung Proben unter ähnlichen Bedingungen erlangt werden.

Eine weitere Limitation liegt in der Begrenzung der Untersuchungsmethoden an sich, denn die DNA-Methylierung stellt nicht den einzigen, wenngleich aber einen der am effektivsten und effizientesten zu untersuchenden Regulationsmechanismus der Transkription dar. Ein weiterer Mechanismus, die Histonmodifikation, wurde in dieser Studie nicht untersucht (Jenuwein und Allis 2001).

Längere Zeit wurde diskutiert, dass die Untersuchung von Methylierungsmustern von Leukozyten unter Umständen nicht der gewebespezifischen Methylierung entspricht. Mittlerweile konnte jedoch in

einer post-mortem-Studie gezeigt werden, dass die Individuen-weite Methylierung weitestgehend auch der gewebespezifischen Methylierung der DNA in den Zielgeweben entspricht (Byun et al. 2009).

Dennoch können die eben genannten Limitationen dazu beitragen, zukünftige Studien bereits im Vorfeld zu verbessern, indem vor allem bei Fragestellungen der epigenetischen Veränderungen in Zusammenhang mit der Alkoholabhängigkeit längere Beobachtungszeiträume gewählt werden können.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse der promotorspezifischen Methylierung unter Berücksichtigung der Literatur

In früheren Untersuchungen konnten bei dem Probandenkollektiv deutliche Veränderungen der NGF-Serumlevel während des Alkoholentzuges nachgewiesen werden (Heberlein et al. 2008). Bei Alkoholabhängigen Probanden konnte eine Assoziation zwischen erhöhten NGF-Plasmaspiegeln und der akuten Alkoholintoxikation gezeigt werden. Während des Entzuges sanken die Konzentrationen deutlich. Diese gesteigerten NGF-Plasmaspiegel wurden als möglicher Mechanismus interpretiert, der den toxischen Ethanoleffekten entgegenwirken kann. Der neuroprotektive Effekt von NGF wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Heaton et al. 1993; Lukoyanov et al. 2003; Gericke et al. 2006). In einem weiteren Versuch wurde Probanden Blut abgenommen, bevor und nachdem eine definierte Menge Wein konsumiert wurde. Die Untersuchungszeitpunkte waren hier 30 Minuten vor und 60 Minuten nach dem Konsum. Es konnte keine signifikante Änderung der NGF-Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden (Aloe et al. 1996). Dies mag der Tatsache geschuldet sein, dass die Änderung der Plasmalevel mit einer größeren Latenz als dem gewählten Beobachtungszeitraum stattfindet.

Ähnlich kann es sich auch mit der Änderung der NGF-Plasmalevel und der Promotormethylierung des NGF-Gens verhalten. Obwohl in den ersten sieben Tagen der Entzugsbehandlung eine signifikante Veränderung der Plasmalevel beobachtet wurde, konnte eine signifikante Änderung der Methylierung über die Zeit nicht nachgewiesen werden. Für die kurzfristige Änderung der NGF-Plasmalevel scheint die Methylierung nicht der

Hauptregulationsmechanismus zu sein. Es bleibt zukünftigen Studien überlassen, die kurzfristig greifenden Mechanismen weiter zu untersuchen, wobei die Methylierung des NGF-Promotors aber Teil eines Feedback-Regulationsmechanismus zu sein scheint, dem die durch den Alkoholentzug ausgelöste Exzitotoxizität zugrunde liegen kann.

Die Unterschiede zwischen den Probanden und den Kontrollen sind zwar zwischen den Gruppen nicht signifikant, es unterscheiden sich jedoch einzelne CpG-Positionen. Die Interpretation dieses Befundes erscheint beim derzeitigen Kenntnisstand schwierig, im Prinzip steht dieser Befund jedoch nicht im Gegensatz zu den Ergebnissen der verschiedenen Serumlevelkonzentrationen von NGF bei Alkoholkranken verglichen mit den Konzentrationen der Kontrollgruppe (Heberlein et al, 2008).

### 5.3 Bedeutung für die Praxis

Auf die Praxis bezogen kann das Wissen um die Änderung der Methylierung des NGF-Promotors nach weiterer Erforschung und vor allem verlängertem Beobachtungszeitraum dazu beitragen, Teile der Mechanismen der alkoholbedingten Zellschädigung im zentralen Nervensystem zu verstehen.

Das Verständnis um die molekularbiologischen Grundlagen der Alkoholabhängigkeit ist unerlässlich um weitere Ansätze für Behandlungsmethoden zu entwickeln. Aufgrund der hier vorliegenden, teils uneindeutigen Ergebnisse lässt sich allerdings noch keine konkrete Folgerung für die Praxis ableiten. Diese Arbeit ist vielmehr als Puzzlestück zum Verständnis der Alkoholabhängigkeit zu sehen.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Abdolmaleky H. M., Smith C. L., Faraone S. V., Shafa R., Stone W., Glatt S. J. und Tsuang M. T. (2004) Methyloomics in psychiatry: Modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 127, 51-59
2. Abdolmaleky H. M., Cheng K. H., Russo A., Smith C. L., Faraone S. V., Wilcox M., Shafa R., Glatt S. J., Nguyen G., Ponte J. F., Thiagalingam S. und Tsuang M. T. (2005) Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 134, 60-66
3. Abdolmaleky H. M., Cheng K. H., Faraone S. V., Wilcox M., Glatt S. J., Gao F., Smith C. L., Shafa R., Aiali B., Carnevale J., Pan H., Papageorgis P., Ponte J. F., Sivaraman V., Tsuang M. T. und Thiagalingam S. (2006) Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet*, 15, 3132-3145
4. Alberts B. (2008) *Molecular biology of the cell*, 5th, Garland Science, New York
5. Aloe L., Tuveri M.A., Guerra G., Pinna L., Tirassa P., Micera A., Alleva E. (1996) Changes in human plasma nerve growth factor level after chronic alcohol consumption and withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res.*, 20, 462-465
6. Angeletti R. H., Bradshaw RA. und Wade R.D. (1971) Subunit structure and amino acid composition of mouse submaxillary gland nerve growth factor. *Biochemistry*, 10, 463-469
7. Barde Y. A. (1990) The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res*, 2, 237-248
8. Bestor T. H. und Verdine G. L. (1994) DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 380-389
9. Bestor T. H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 9, 2395-2402
10. Bird A. (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell*, 70, 5-8

11. Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16, 6-21
12. Black I. B. (1993) Viktor Hamburger Award review. Environmental regulation of brain trophic interactions. *Int J Dev Neurosci*, 11, 403-410
13. Bönsch D., Lenz B., Reulbach U., Kornhuber J. und Bleich S. (2004) Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm*, 111, 1611-1616
14. Bolter J.F., Hannon R. (1986) Lateralized Cerebral Dysfunction in Early and Late Stage Alcoholics. *J Stud Alcohol* 47, 213-218
15. Bradshaw R. A., Blundell T. L., Lapatto R., McDonald N. Q. und Murray-Rust J. (1993) Nerve growth factor revisited. *Trends Biochem Sci*, 18, 48-52
16. Byun H.-M., Siegmund K.D., Pan F., Weisenberger D.J., Kanel G., Laird P.W. und Yang A.S. (2009) Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual-specific DNA methylation patterns. *Human molecular genetics*, 18, 4808-4817
17. Chakrabarti S., Sima A. A., Lee J., Brachet P. und Dicou E. (1990) Nerve growth factor (NGF), proNGF and NGF receptor-like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res.*, 523, 11-15
18. Chao M. V. (1994) The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol*, 25, 1373-1385
19. Cheung P., Tanner K. G., Cheung W. L., Sassone-Corsi P., Denu J. M. und Allis C. D. (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, 5, 905-915
20. Choudhry M. A. und Chaudry I. H. (2008) Alcohol, burn injury, and the intestine. *J Emerg Trauma Shock*, 1, 81-87
21. Clark S. J., Harrison J., Paul C. L. und Frommer M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*, 22, 2990-2997
22. Cohen S. (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 46, 302-311

23. Connor B. und Dragunow M. (1998) The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 27, 1-39
24. Costello J. F. und Plass C. (2001) Methylation matters. *J Med Genet*, 38, 285-303
25. Crouse H. V. (1960) The Controlling Element in Sex Chromosome Behavior in *Sciara*. *Genetics*, 45, 1429-1443
26. Crowley C., Spencer S. D., Nishimura M. C., Chen K. S., Pitts-Meek S., Armanini M. P., Ling L. H. et al. (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*, 76, 1001-1011
27. Cuello A. C. und Bruno M. A. (2007) The failure in NGF maturation and its increased degradation as the probable cause for the vulnerability of cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 32, 1041-1045
28. Cunha G. M., Moraes R. A., Moraes G. A., França M. C., Moraes M. O. und Viana G. S. (1999) Nerve growth factor, ganglioside and vitamin E reverse glutamate cytotoxicity in hippocampal cells. *Eur J Pharmacol*, 367, 107-112.
29. Delsite R. und Djakiew D. (1999) Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate*, 41, 39-48
30. De Marzo A. M., Marchi V. L., Yang E. S., Veeraswamy R., Lin X. und Nelson W. G. (1999) Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*, 59, 3855-3860
31. Eden A., Gaudet F., Waghmare A. und Jaenisch R. (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 300, 455
32. Edwards R.H., Selby M.J. und Rutter W.J. (1986) Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature*, 319, 784-7

33. Edwards R.H., Selby M.J., Mobley W.C., Weinrich S.L., Hruby D.E. und Rutter W.J. (1988) Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector. *Molecular and cellular biology*, 8, 2456-64
34. Ehrlich M., Gama-Sosa M. A., Huang L. H., Midgett R. M., Kuo K. C., McCune R. A. und Gehrke C. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, 10, 2709-2721
35. Emmerson R.Y., Durstman D.A., Heil J., Shearer D.E. (1988) Neuropsychological performance of young nondrinkers, social drinkers and long, and short term alcoholics. *Alcoholism* 12, 625–629
36. Ernfors P., Ibáñez C. F., Ebendal T., Olson L. und Persson H. (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5454-5458
37. Ernfors P., Lee K. F., Kucera J. und Jaenisch R. (1994) Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*, 77, 503-512
38. Feinberg A. P., Gehrke C. W., Kuo K. C. und Ehrlich M. (1988) Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res*, 48, 1159-1161
39. Fichter MM (1990) Verlauf psychischer Erkrankungen in der Bevölkerung. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
40. Frommer M., McDonald L. E., Millar D. S., Collis C. M., Watt F., Grigg G. W., Molloy P. L. und Paul C. L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1827-1831
41. Fuks F. (2005) DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 490-495
42. Gama-Sosa M. A., Slagel V. A., Trewyn R. W., Oxenhandler R., Kuo K. C., Gehrke C. W. und Ehrlich M. (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*, 11, 6883-6894
43. Gericke C.A., Schulte-Herbrüggen O., Arendt T. und Hellweg R. (2006) Chronic alcohol intoxication in rats leads to a strong but transient

- increase in NGF levels in distinct brain regions. *J Neural Transm.*, 113(7), 813-820
44. Goll M. G., Kirpekar F., Maggert K. A., Yoder J. A., Hsieh C. L., Zhang X., Golic K. G., Jacobsen S. E. und Bestor T. H. (2006) Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311, 395-398
  45. Grayson D. R., Jia X., Chen Y., Sharma R. P., Mitchell C. P., Guidotti A. und Costa E. (2005) Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9341-9346
  46. Greene L. A., Shooter E.M. und Varon, S. (1968) Enzymatic activities of mouse nerve growth factor and its subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 60, 1383-1388
  47. Grewal S. I. und Moazed D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, 301, 798-802
  48. Guidotti A., Auta J., Davis J. M., Di-Giorgi-Gerevini V., Dwivedi Y., Grayson D. R., Impagnatiello F., Pandey G., Pesold C., Sharma R., Uzunov D. und Costa E. (2000) Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry*, 57, 1061-1069
  49. Hake S. B., Xiao A. und Allis C. D. (2004) Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer*, 90, 761-769
  50. Hartl D. L. und Jones E. W. (2001) *Genetics: analysis of genes and genomes*, 5th ed., Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Mass
  51. Heaton M. B., Paiva M., Swanson D. J. und Walker D. W. (1993) Modulation of ethanol neurotoxicity by nerve growth factor. *Brain Res*, 620, 78-85
  52. Heberlein A., Bleich S., Bayerlein K., Frieling H., Gröschl M., Kornhuber J. und Hillemacher T. (2008) NGF plasma levels increase due to alcohol intoxication and decrease during withdrawal. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 999-1003
  53. Heberlein A., Muschler M., Frieling H., Behr M., Eberlein C., Wilhelm J., Gröschl M., Kornhuber J., Bleich S. und Hillemacher T. (2011)

Epigenetic down regulation of nerve growth factor during alcohol withdrawal. *Addiction biology*, Mar 11, 2010-2012.

54. Hellweg R., von Richthofen S., Anders D., Baethge C., Röpke S., Hartung H. D. und Gericke C. A. (1998) The time course of nerve growth factor content in different neuropsychiatric diseases – a unifying hypothesis. *J Neural Transm (Vienna, Austria: 1996)*, 105, 871-903
55. Hendrich B. und Bird A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, 18, 6538-6547
56. Herman J. G., Graff J. R., Myohanen S., Nelkin B. D. und Baylin S. B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9821-9826
57. Hohn A., Leibrock J., Bailey K., Barde Y.A. (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*, 344, 339-341
58. Holliday R. und Pugh J. E. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226-232
59. Hsieh C. L. (1999) In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*, 19, 8211-8218
60. Idanpaan-Heikkila J., Alhava E., Olkinuora M. und Palva I. P. (1977) Agranulocytosis during treatment with chlozapine. *Eur J Clin Pharmacol*, 11, 193-198
61. Ip N. Y., Ibáñez C. F., Nye S. H., McClain J., Jones P. F., Gies D. R., Belluscio L., et al. (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3060-3064
62. Jensen G.B., Pakkenberg B. (1993) Do alcoholics drinks their neurons away? *Lancet* 342, 1201–1204
63. Jenuwein T. und Allis C. D. (2001) Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-1080
64. Jin S. G., Jiang C. L., Rauch T., Li H. und Pfeifer G. P. (2005) MBD3L2 interacts with MBD3 and components of the NuRD complex and can

- oppose MBD2-MeCP1-mediated methylation silencing. *J Biol Chem*, 280, 12700-12709
65. Jockers-Scherübl M. C., Bauer A., Kuhn S., Reischies F., Danker-Hopfe H., Schmidt L. G., Rentzsch J., et al. (2007) Nerve growth factor in serum is a marker of the stage of alcohol disease. *Neurosci Lett*, 419, 78-82
66. Jones P. A. und Taylor S. M. (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20, 85-93
67. Jones P. A. (1986) DNA methylation and cancer. *Cancer Res*, 46, 461-466
68. Jones P. A. und Laird P. W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 21, 163-167
69. Jones K. R., Fariñas I., Backus C. und Reichardt L. F. (1994) Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 76, 989-999
70. Kaplan D. R., Hempstead B. L., Martin-Zanca D., Chao M. V. und Parada L. F. (1991) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 252, 554-558
71. Klein R., Jing S. Q., Nanduri V., O'Rourke E. und Barbacid M. (1991) The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65, 189-197
72. Krebs M. O., Bellon A., Mainguy G., Jay T. M. und Frieling H. (2009) One-carbon metabolism and schizophrenia: current challenges and future directions. *J Mol Med*, 15, 562-570
73. Kress C., Thomassin H. und Grange T. (2001) Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett*, 494, 135-140
74. Kumar V. und Biswas D. K. (1988) Dynamic state of site-specific DNA methylation concurrent to altered prolactin and growth hormone gene expression in the pituitary gland of pregnant and lactating rats. *J Biol Chem*, 263, 12645-12652
75. Lachner M. und Jenuwein T. (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 286-298

76. Lang U. E., Mühlbacher M., Hesselink M. B., Zajaczkowski W., Danysz W., Danker-Hopfe H. und Hellweg, R. (2004) No nerve growth factor response to treatment with memantine in adult rats. *J Neural Transm* 111, 181-190
77. Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H., Barde YA. (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 341, 149-152
78. Levi-Montalcini R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237, 1154-1162
79. Levi-Montalcini R., Skaper S. D., Dal Toso R., Petrelli L. und Leon A. (1996) Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinine. *Trends Neurosci*, 19, 514-520
80. Lewin J., Schmitt A. O., Adorjan P., Hildmann T. und Piepenbrock C. (2004) Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics*, 20, 3005-3012
81. Li E., Beard C. und Jaenisch R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362-365
82. Lukoyanov N. V., Pereira P. A., Paula-Barbosa M. M. und Cadete-Leite, A. (2003) Nerve growth factor improves spatial learning and restores hippocampal cholinergic fibers in rats withdrawn from chronic treatment with ethanol. *Exp. Brain Res.*, 148(1), 88-94.
83. Luo J., West J. R. und Pantazis N. J. (1997) Nerve growth factor and basic fibroblast growth factor protect rat cerebellar granule cells in culture against ethanol-induced cell death. *Alcohol Clin Exp Res*, 21, 1108-1120
84. Maisonpierre P. C., Belluscio L., Squinto S., Ip N. Y., Furth M. E., Lindsay R. M. und Yancopoulos G. D. (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, 247, 1446-1451
85. Marsit C. J., Christensen B. C., Houseman E. A., Karagas M. R., Wrensch M. R., Yeh R.-F., Nelson H. H., et al. (2009) Epigenetic profiling reveals etiologically distinct patterns of DNA methylation in



- head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 30, 416-422
86. Martin A., State M., Koenig K., Schultz R., Dykens E. M., Cassidy S. B. und Leckman J. F. (1998) Prader-Willi syndrome. *Am J Psychiatry*, 155, 1265-1273
  87. Mattson M. P., Lovell M. A., Furukawa K. und Markesbery W. R. (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem*, 65, 1740-1751
  88. Mattson, M. P. und Mark R. J. (1996) Excitotoxicity and excitoprotection in vitro. *Adv Neurol*, 71, 1-35
  89. McEntee W.J., Mair R.G. (1980) Memory enhancement in Korsakoff's psychosis by clonidine: further evidence for a noradrenergic deficit. *Ann Neurol*, 7, 466-470
  90. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273
  91. Nan X., Campoy F. J. und Bird A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, 88, 471-481
  92. Nan X., Ng H. H., Johnson C. A., Laherty C. D., Turner B. M., Eisenman R. N. und Bird A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393, 386-389
  93. Nutt D. (1999) Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. *Br J Psychiatry*, 175, 114-119
  94. Panning B. und Jaenisch R. (1998) RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell*, 93, 305-308
  95. Plass C. und Soloway P. D. (2002) DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet*, 10, 6-16
  96. Preuss U.W., Soyka M. (1997) Das Wernicke-Korsakow-Syndrom. *Klinik, Pathophysiologie und therapeutische Ansätze. Fortschr Neurol Psychiatr* 65, 413-420

97. Radeke M. J., Misko T. P., Hsu C., Herzenberg L. A. und Shooter E. M. (1987) Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*, 325, 593-597
98. Razin A. und Cedar H. (1991) DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev*, 55, 451-458
99. Reik W., Dean W. und Walter J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-1093
100. Robertson K. D., Uzvolgyi E., Liang G., Talmadge C., Sumegi J., Gonzales F. A. und Jones P. A. (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, 27, 2291-2298
101. Rodenhiser D. und Mann M. (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Cmaj*, 174, 341-348
102. Rosenthal A., Goeddel D. V., Nguyen T., Lewis M., Shih A., Laramie G. R., Nikolics K., et al. (1990) Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron*, 4, 767-773
103. Russo V. E. A., Riggs A. D. und Martienssen R. A. (1996) Epigenetic mechanisms of gene regulation, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
104. Shimabukuro M., Jinno Y., Fuke C. und Okazaki Y. (2006) Haloperidol treatment induces tissue- and sex-specific changes in DNA methylation: a control study using rats. *Behav Brain Funct*, 2, 37
105. Singer H. S., Hansen B., Martinie D. und Karp C. L. (1999) Mitogenesis in glioblastoma multiforme cell lines: a role for NGF and its TrkA receptors. *J Neurooncol*, 45, 1-8
106. Soyka M. (1995) Die Alkoholkrankheit – Diagnostik und Therapie. Chapman & Hall, Weinheim London
107. Srivastava L. K., Morency M. A. und Mishra R. K. (1992) Ontogeny of dopamine D2 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Pharmacol*, 225, 143-150

108. Strahl B. D. und Allis C. D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-45
109. Tarter R.E., Hegedus A.M., Van Thiel D.H., Gavalier J.S., Schade R.R. (1986) Hepatic dysfunction and neuropsychological test performance in alcoholics with cirrhosis. *J Stud Alcohol* 47, 74–77
110. Tsai G., Gastfriend D.R., Coyle J.T. (1995) The glutamateric basis of human alcoholism. *AM J Psychiatry* 152, 332–340
111. Veldic M., Guidotti A., Maloku E., Davis J. M. und Costa E. (2005) In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2152-2157
112. Watson R. E. und Goodman J. I. (2002) Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology. *Toxicol Sci*, 67, 11-16
113. Wilhelm J., Frieling H., Hillemacher T., Degner D., Kornhuber J., Bleich S. (2008) Hippocampal volume loss in patients with alcoholism is influenced by the consumed type of alcoholic beverage. *AlcAlc*, 43, 296–299
114. Wittchen H.U., Essau C.A., v Zerssen D., Krieg J.C., Zaudig M. (1992) Lifetime and six-month prevalence of mental disorders in the Munich follow-up study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 241, 247–258
115. Yardley G., Relf B., Lakshmanan J., Reinshagen M., Moore G. P. (2000) Expression of nerve growth factor mRNA and its translation products in the anagen hair follicle. *Exp Dermatol*, 9, 283-289
116. Yoder J. A., Soman N. S., Verdine G. L. und Bestor T. H. (1997) DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol*, 270, 385-395
117. Yoder J. A., Walsh C. P. und Bestor T. H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13, 335-340
118. Yoon S.-J., Roh S., Lee H., Lee J.-Y., Lee B.-H., Kim Y.-K. und Kim D.-J. (2006) Possible role of nerve growth factor in the pathogenesis of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, 30, 1060-1065

119. Zhang Y. und Reinberg D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, 15, 2343-2360

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Angelman Syndrom
Bis	Bisulfit
BDNF	Brain Derived Neurotropic Factor
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnmt	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Forward
FARS	Franconian Alcohol Research Study
G	Guanin
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD-67	Glutamic acid decarboxylase isoform 67
GH	Growth Hormone
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems in der zehnten Ausgabe
Igf 2	Insulin-like growth factor 2
MB-COMT	membrangebundene Catechol-O-methyltransferase
MBD	Methyl-CpG-Binding-Domain
MeCP2	Methyl-CpG-bindendes Protein 2
m-RNA	messenger Ribonukleinsäure
NGF	Nerve Growth Factor

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT	Neurotropin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
PWS	Prader Willi Syndrom
R	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	RNA spaltendes Enzym
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sene	seminested
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
Trk	Tyrosinkinaserzeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Methylierung von Cytosin .....	10
Abbildung 2 Bisulfitmodifikation von Cytosin zu Uracil .....	23
Abbildung 3 Gelelektrophorese .....	31
Abbildung 4 Unterschiede der Methylierung zwischen Tag 1 und Tag 7.....	32
Abbildung 5 Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen .....	33

## 7.3 QIAamp DNA Mini und Blood Mini Handbuch

Auszug mit dem Protokoll zur DNA-Extraktion aus Blut des nur in englischer Sprache erschienenen Handbuchs:

Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, and body fluids using a microcentrifuge.

#### Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 18).
- 200 µl of whole blood yields 3–12 µg of DNA. Preparation of buffy coat (see page 19) is recommended if a higher yield is required.

#### Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature.
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 17.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

#### Procedure

1. Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube.
2. Add 200 µl sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 µl whole blood, plasma, serum, buffy coat, or body fluids, or up to 5 x 10<sup>6</sup> lymphocytes in 200 µl PBS. If the sample volume is less than 200 µl, add the appropriate volume of PBS. QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample before addition of Buffer AL. Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into

microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

3. Add 200  $\mu$ l Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s. In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution. If the sample volume is larger than 200  $\mu$ l, increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer AL proportionally; for example, a 400  $\mu$ l sample will require 40  $\mu$ l QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400  $\mu$ l Buffer AL. If sample volumes larger than 400  $\mu$ l are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 ml or up to 10 ml of sample, respectively. Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

4. Incubate at 56°C for 10 min. DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

5. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

6. Add 200  $\mu$ l ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid. If the sample volume is greater than 200  $\mu$ l, increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400  $\mu$ l sample will require 400  $\mu$ l of ethanol.

7. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate. Close each spin column in order to avoid aerosol formation during centrifugation. Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) in order to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp Mini spin column is empty. Note: When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, centrifugation at full speed is recommended to avoid clogging.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500  $\mu$ l Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate. It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the original sample volume is larger than 200  $\mu$ l.

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500  $\mu$ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.

10. Recommended: Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min. This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200  $\mu$ l Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Incubating the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield. A second elution step with a further 200  $\mu$ l Buffer AE will increase yields by up to 15%. Volumes of more than 200  $\mu$ l should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation. Elution with volumes of less than 200  $\mu$ l increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield. For samples containing less than 1  $\mu$ g of DNA, elution in 50  $\mu$ l Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2 x 100  $\mu$ l instead of 1 x 200  $\mu$ l does not increase elution efficiency. For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at –20°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200  $\mu$ l sample of whole human blood (approximately 5 x 10<sup>6</sup> leukocytes/ml) typically yields 6  $\mu$ g of DNA in 200  $\mu$ l water (30 ng/ $\mu$ l) with an A260/A280 ratio of 1.7–1.9.



## 8 Danksagung

Mein Dank gilt dem Institutsleiter der Psychiatrischen und Psychotherapeutischen Klinik der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen, Herrn Prof. Dr. Johannes Kornhuber, und besonders Herrn Prof. Dr. Thomas Hillemacher, Herrn Prof. Dr. Stefan Bleich und Herrn Prof. Dr. Helge Frieling für die vertrauensvolle Überlassung dieser Doktorarbeit und für die engagierte Betreuung und Unterstützung. Zu jeder Zeit erfuhr ich professionellen Rat und Hilfe für alle meine Fragen und Probleme.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Annemarie Heberlein für die Unterstützung der laborchemischen Arbeiten und für die kompetente Beantwortung aller Fragen bezüglich der Methodik und Auswertung.

Herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Marc Muschler für die wertvolle Unterstützung und Hilfe insbesondere beim Laborteil dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Sermin Toto und Frau Dr. Viktoria Leitmeier für ihre freundschaftliche Hilfe und Motivation bedanken.

Ich bedanke mich auch bei meinem langjährigen Freund Herrn Dipl.-Biol. Philipp Kollmar für den fachlichen Austausch und die freundschaftliche Unterstützung während aller Phasen dieser Arbeit.

Einen großen Teil des geistigen Fundaments für wissenschaftliches Arbeiten und kritisches Denken verdanke ich Herrn Dr. Jürgen Sandweg.

Mein besonderer Dank gilt meiner Verlobten Anne Puschmann, die mir während der Entstehung dieser Arbeit mit ihrer Liebe und selbstlosen Unterstützung zur Seite stand, mir damit Kraft gegeben und mich motiviert hat.

Meinem Bruder Stephan Eberlein danke ich für sein offenes Ohr und seine wertvollen Ratschläge in jeder Phase der Entstehung dieser Arbeit.

Abschließend danke ich meinen lieben Eltern Hildegard und Karl Eberlein für ihre Liebe, ihre Erziehung, ihre Unterstützung, ihren Rat und dafür, dass sie immer für mich da sind. Ohne sie wäre dieses Studium und damit auch diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## **9 Bisherige Veröffentlichungen mit den Daten dieser Arbeit**

Heberlein A., Muschler M., Frieling H., Behr M., Eberlein C., Wilhelm J., Gröschl M., Kornhuber J., Bleich S. und Hillemacher T. (2011) Epigenetic down regulation of nerve growth factor during alcohol withdrawal. *Addiction biology*, Mar 11, 2010-2012.