

Aus der Klinik für Psychiatrie, Sozialpsychiatrie und Psychotherapie  
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Geschlechtsspezifische Unterschiede der epigenetischen Regulation  
bei Alkoholbezogener Störung am Beispiel des GABA<sub>B1</sub>-Rezeptors**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

Fiona Meyer-Bockenamp

aus Peine

Hannover 2024

**Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am: 22.10.2024**

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover**

**Präsident:** Professor Dr. med. Michael Manns

**Betreuer der Arbeit:** Professor Dr. med. Helge Frieling

**Referent/Referentin:**

1. Referent/in: DP D.r rer, nat. Thomas Ilig
2. Referent/in: Prof. D.r med. Detlef Dietrich

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22.10.2024

**Prüfungsausschussmitglieder**

**Vorsitz:** Prof. D.r med. Marc Ziegenbein

**1. Prüfer/in:** Prof. Dr. med. Corinna Trebst

**2. Prüfer/in:** Prof. Dr. med. Frank Schuppert

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1.1 Epidemiologie und Definition der Alkoholbezogenen Störung .....	11
1.2 Neurobiologische Grundlagen.....	14
1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	17
1.4 Diagnostik.....	18
1.5 Therapie der AUD .....	19
1.6 Ziel der Arbeit.....	20
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Studiendesign.....	22
2.2 Transkriptionsfaktoranalyse .....	24
2.3 Statistik.....	24
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
3.1 Spezifische Loci des GABBR1 Promoterfragments .....	30
3.2 Gemischtes Lineares Modell .....	32
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1 Methylierung und Transkriptionsfaktorvorhersage .....	35
4.2 GABBR1 und Ethanol .....	35
4.3 Gewebeübergreifende Effekte der GABBR1-Methylierung.....	36
4.4 CpG-4 als potentieller Biomarker? .....	37
4.5 GABBR1 Methylierung bei weiblichen Individuen.....	37
4.6 Abhängigkeit und hormonale Balancen .....	38
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>40</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>42</b>
<b>7 Danksagung.....</b>	<b>49</b>
<b>8 Curriculum Vitae.....</b>	<b>50</b>

---

<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung nach §2 Abs. 2 Nr 7 &amp; und 8 PromO .....</b>	<b>58</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Ein Sagittaler Querschnitt eines menschlichen Gehirns mit eingezeichneten Strukturen des Belohnungssystems: *Area Tegmentalis Ventralis* (VTA), *Nucl. Arcuatus* (NAR), *Nucl. Accumbens* (NAC), Hippocampus, Amygdala, Corpus Mamillare, Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Thalamus, Präfrontaler Cortex (PFC). Erstellt mit Biorender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))..... 16
- Abbildung 2:** Eine schematische Darstellung des heterodimeren GABA<sub>B</sub>-Rezeptors, bestehend aus Untereinheit 1 und 2, mit einem Liganden (GABA). Erstellt mit Biorender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))..... 17
- Abbildung 3:** Verteilung der Methylierung als Histogramm mit Häufigkeit in % auf der y-Achse und der mittleren Methylierung auf der x-Achse, Normalverteilung (schwarze Linie). Mittelwert (mean): 0,92, Standardabweichung (Std. Dev.): 0,022, N=373..... 25
- Abbildung 4a:** Punktdiagramm der Verteilung der durchschnittlichen Methylierung nach Alter und Gruppe in % auf der y-Achse abhängig vom Alter auf der x-Achse bei männlichen Individuen der AUD-Kohorte (rot) und Kontrollkohorte (blau). R<sup>2</sup> der Kontrollgruppe: 0,024, R<sup>2</sup> der AUD-Kohorte: 0,015..... 26
- Abbildung 4b:** Punktdiagramm der Verteilung der durchschnittlichen Methylierung in % auf der y-Achse abhängig vom Alter auf der x-Achse bei weiblichen Individuen der AUD-Kohorte (rot) und Kontrollkohorte (blau). R<sup>2</sup> der Kontrollgruppe: 0,046, R<sup>2</sup> der AUD-Kohorte: 0,057 ..... 26
- Abbildung 5a:** Als Boxplot aufgetragene durchschnittliche Methylierung nach Gewebe der männlichen Individuen der AUD-Kohorte (rot) und Kontrollkohorte (blau) in % auf der y-Achse der einzelnen Gewebe auf der x-Achse. Erfasst wurden: Blut, *Ncl. Arcuatus* (Nar), *Ncl. Accumbens* (Nacc), Amygdala, Corpus Mammillare (Mam), Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Hippocampus. .... 27

- Abbildung 5b:** Als Boxplot aufgetragene durchschnittliche Methylierung nach Gewebe der weiblichen Individuen der AUD-Kohorte (rot) und Kontrollkohorte (blau) in % auf der y-Achse der einzelnen Gewebe auf der x-Achse. Erfasst wurden: Blut, Ncl. Arcuatus (Nar), Ncl. Accumbens (Nacc), Amygdala, Corpus Mammillare (Mam), Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Hippocampus. .... 27
- Abbildung 6a:** Als Boxplot geclusterte durchschnittliche Methylierung nach Gruppe und Gewebe bei männlichen Individuen in % auf der y-Achse, getrennt nach der AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte auf der x-Achse, aufgetragen sind die untersuchten Gewebe Blut, Ncl. Arcuatus (Nar), Ncl. Accumbens (Nacc), Amygdala, Corpus Mammillare (Mam), Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Hippocampus. .... 29
- Abbildung 6b:** Als Boxplot geclusterte durchschnittliche Methylierung nach Gruppe und Gewebe bei weiblichen Individuen in % auf der y-Achse, getrennt nach der AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte auf der x-Achse, aufgetragen sind die untersuchten Gewebe Blut, Ncl. Arcuatus (Nar), Ncl. Accumbens (Nacc), Amygdala, Corpus Mammillare (Mam), Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Hippocampus ..... 29
- Abbildung 7A+B:** Die durchschnittliche Methylierung der männlichen (A) und weiblichen (B) Individuen in % über alle Gewebe auf der y-Achse an den CpG-Positionen -284 bis 44 des GABBR1-Promoters auf der x-Achse getrennt nach der AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte..... 30
- Abbildung 7C+D:** Die durchschnittliche Methylierung an CpG-Position -4 in % auf der y-Achse in den untersuchten Geweben Blut, Nucl. Arcuatus, Ncl. Accumbens, Amygdala, Corpus Mamillare, Anteriorer Temporaler Kortex, Hippocampus auf der x-Achse bei männlichen (C) und weiblichen Individuen (D) getrennt nach AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte..... 30

- Abbildung 8a-g:** Durchschnittliche Methylierung in % auf der y-Achse der CpG-Positionen -284 bis 44 auf der x-Achse, getrennt nach AUD- und Kontroll-Kohorte der untersuchten Gewebe: Blut(A), Nucl. Arcuatus(B), Ncl. Accumbens(C), Amygdala(D), Corp. Mamillare(E), Anteriorer Temporaler Kortex(F), Hippocampus(G) bei männlichen Individuen der AUD-Kohorte (schwarz) und Kontroll-Kohorte (weiß)..... 31
- Abbildung 8h-n:** Durchschnittliche Methylierung in % auf der y-Achse der CpG-Positionen -284 bis 44 auf der x-Achse, getrennt nach AUD- und Kontroll-Kohorte der untersuchten Gewebe: Blut (H), Nucl. Arcuatus(I), Ncl. Accumbens(J), Amygdala(K), Corp. Mamillare(L), Anteriorer Temporaler Kortex(M), Hippocampus(N) bei weiblichen Individuen der AUD-Kohorte (schwarz) und Kontroll-Kohorte (weiß). Signifikante Stellen: CpG-4 bei Amygdala, Corp. Mamillare bei männlichen Individuen. Signifikante Stellen nach Korrektur für multiples Testen ..... 31
- Abbildung 9a:** Geschätzte Randmittel der Methylierung in % auf der y-Achse im Vergleich bei Nichtrauchenden der Kontroll-Kohorte (NR/NA, weiße Punkte), Rauchenden der Kontrollkohorte (R/NA , schwarz-weiße Punkte) und Rauchenden der AUD-Kohorte (R/A, schwarze Punkte). ..... 33
- Abbildung 9b:** Geschätzte Randmittel der Methylierung im Geschlechtervergleich in % auf der y-Achse bei weiblichen (rechts) und männlichen (links) Individuen bei Nichtrauchenden der Kontroll-Kohorte (NR/NA, weiße Punkte), Rauchenden der Kontroll-Kohorte (R/NA, schwarz-weiße Punkte) und Rauchenden der AUD-Kohorte (R/A, schwarze Punkte). Jeweils +/- einer Standardabweichung ..... 33

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1a:</b>	Überblick über die demographischen Daten der Studienpopulation. Angegeben sind der Mittelwert des Alters und des Post-Mortem Intervalls (PMI) sowie die Standardabweichung. Aufgeteilt ist die Kohorte in gesunde Kontrollpersonen (Kontrolle) und Individuen mit AUD (Alkohol), sowie nach Geschlecht (Männer, Frauen). .....	23
<b>Tabelle 1b:</b>	Auflistung der Anzahl N der vorhandenen Gewebeproben der Kohorte. Aufgeteilt ist die Kohorte in gesunde Kontrollpersonen (Kontrolle) und Individuen mit AUD (Alkohol), sowie nach Geschlecht (Männer, Frauen). .....	23
<b>Tabelle 2:</b>	Normalverteilungstest des durchschnittlichen Methylierungslevels nach Kolmogorov-Smirnov mit Lilliefors-Korrektur: Statistische Signifikanz (Stat.), Freiheitsgrade (df), Signifikanz (Sig.), sowie Shapiro-Wilk Test: Statistische Signifikanz (Stat.), Freiheitsgrade (df), Signifikanz (Sig.) .....	24
<b>Tabelle 3:</b>	Test der Fixed-Effects-Berechnung. Betrachtet wurden die Faktoren: CpG-Position, Gewebe, AUD-Status in Kombination mit Raucherstatus (alc_smoke), Geschlecht, Alter, Gewebe unter Betrachtung des Geschlechts (Gewebe*Geschlecht), Geschlecht und AUD-Status in Kombination mit Raucherstatus (Geschlecht*alc_smoke) hinsichtlich des Faktors aus Freiheitsgraden und Signifikanz (F). Anzahl der Freiheitsgrade (Numerator df) und Signifikanz. a: Abhängige Variable: Methylierung.....	34

Die Zeit, die du für deine Rose gegeben hast, sie macht deine Rose so wichtig.

– Der kleine Prinz (Antoine de Saint-Exupéry) –



# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Definition der Alkoholbezogenen Störung

Alkohol wird seit Jahrtausenden hergestellt und konsumiert. Bereits 7000 v.Chr. wurden im neolithischen China fermentierte Getränke hergestellt (McGovern *et al.*, 2004). In religiösen oder sozio-kulturellen Kontexten spielt Alkohol seit jeher eine wichtige Rolle. Bereits im Alten Orient, in Ägypten, im antiken Griechenland und im Römischen Reich gehörte Alkoholkonsum zum gesellschaftlichen Leben <sup>2</sup>.

Seitdem hat sich der Konsum von alkoholhaltigen Getränken weltweit immer mehr verbreitet und zugleich auch der schädliche Gebrauch von Alkohol und die alkoholassoziierten Folgeerkrankungen zugenommen. Im Jahr 2016 wurden circa drei Millionen Todesfälle (5,3 % der Todesfälle weltweit) auf den schädlichen Gebrauch von Alkohol zurückgeführt. Die Mortalitätsrate, die aus Alkoholkonsum resultiert, ist damit höher als die anderer, weltweit verbreiteter Krankheiten wie etwa Tuberkulose, HIV/AIDS oder Typ 2 Diabetes <sup>3-5</sup>. Europa ist im weltweiten Vergleich die WHO-Region, in der die meisten Todesfälle (10,1 %) und die meisten „disease-adjusted life years“, kurz DALYs (10,8 %) in Bezug auf Alkoholkonsum auftreten. In Amerika liegen diese bei 5,5 % der Todesfälle und bei 6,7 % der DALYs. In Europa lag die Prävalenz von alkoholbezogenen Störungen im Jahr 2016 bei Männern bei 14,8 %, bei Frauen bei 3,5 %. Weltweit sind Männer häufiger von Alkoholmißbrauch und Alkoholabhängigkeit betroffen als Frauen <sup>6</sup>.

### Codierung und Klassifizierung in Deutschland

In Deutschland werden Erkrankungen nach der ICD, der International Classification of Diseases der WHO, codiert und definiert. Für den Gebrauch in Deutschland existiert die Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme in der 10. Revision, die German Modification (ICD-10-GM) zur Verschlüsselung von Diagnosen in der ambulanten und stationären Versorgung (Medizinprodukte, 2022; WHO, 2022). Der ICD-10-GM unterscheidet den schädlichen Gebrauch von Alkohol und die Alkoholabhängigkeit. Explizite Diagnosekriterien werden in der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) und der Deutschen Gesellschaft für Suchtforschung und Suchttherapie e.V. (DG-

SUCHT), verfügbar im Register der **Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)**, festgelegt.

Der schädliche Gebrauch beschreibt laut ICD-10 einen Alkoholkonsum, der zu einer Gesundheitsschädigung führt. Hierzu zählen sowohl körperliche Folgen (z. B. eine Leberschädigung) als auch psychische Störungen, beispielsweise eine durch den Konsum verursachte depressive Episode. In der S3-Leitlinie wird der schädliche Gebrauch von Alkohol (ICD-10 F10.1) definiert durch *„aufgrund von Alkoholkonsum entstandene, nachweisliche Folgeschäden psychischer oder physischer Natur, die mindestens einen Monat bestehen, oder in einem Zeitraum von zwölf Monaten wiederholt auftreten“*<sup>9</sup>. Das Abhängigkeitssyndrom (ICD-10 F10.2) wird durch starkes Suchtverlangen, Schwierigkeiten, den Konsum zu kontrollieren, sowie anhaltenden Substanzkonsum trotz schädlicher Folgen charakterisiert. Zudem wird dem Substanzkonsum Vorrang vor anderen Aktivitäten und Verpflichtungen gegeben. Es entwickeln sich eine Toleranz und körperliche Entzugserscheinungen<sup>10</sup>. In der S3-Leitlinie werden folgende Kriterien für die Diagnose einer Alkoholabhängigkeit zugrunde gelegt:

- Ein starker Wunsch oder eine Art Zwang, Alkohol zu konsumieren
- Eine verminderte Kontrollfähigkeit bezüglich des Beginns, der Beendigung und der Menge des Konsums
- Ein körperliches Entzugssyndrom bei Beendigung oder Reduktion des Konsums, nachgewiesen durch die substanzspezifischen Entzugssymptome oder durch die Aufnahme der gleichen oder einer nahe verwandten Substanz, um Entzugssymptome zu mildern oder zu vermeiden
- Nachweis einer Toleranz: Um die ursprünglich durch niedrige Dosen erreichten Wirkungen der Substanz hervorzurufen, sind zunehmend höhere Dosen erforderlich
- Eine fortschreitende Vernachlässigung anderer Vergnügungen oder Interessen zugunsten des Substanzkonsums
- Ein anhaltender Alkoholkonsum trotz Nachweises eindeutiger schädlicher Folgen körperlicher oder psychischer Art

Wenn drei oder mehr Kriterien mindestens einen Monat vorliegen oder wiederholt in einem Zeitraum von zwölf Monaten diagnostiziert werden können, kann von einer Alkoholabhängigkeit ausgegangen werden<sup>9</sup>.

## Codifizierung und Klassifizierung im amerikanischen Raum

Im amerikanischen Raum wird zur Klassifizierung psychischer Erkrankungen die 2013 erschienene 5. Auflage des *Diagnostic and Statistical Manual of Psychiatric Diseases* (DSM) der American Psychiatric Association verwendet. Dieses Klassifikationssystem wird auch in Deutschland oft zur Charakterisierung psychischer Erkrankungen herangezogen. Das DSM-5 definiert eine „alkoholbezogene Störung“ (engl. „alcohol use disorder“, AUD) in milder, moderater oder schwerer Ausprägung, die jedoch nicht zwischen Abhängigkeit oder schädlichem Gebrauch unterscheidet. Die Kriterien der AUD umfassen <sup>11,12</sup>:

- Wiederholter Substanzgebrauch, der zum Versagen im beruflichen oder privaten Bereich führt
- Fortgesetzter Substanzgebrauch trotz wiederholt auftretenden sozialen, zwischenmenschlichen, körperlichen oder psychischen Problemen
- Fortgesetzter Konsum trotz des Wissens über die oben genannten Probleme
- Toleranzentwicklung
- „Craving“ (dt. dauerhaftes, starkes, fast unabdingbares Suchtverlangen)
- Entzugssymptome bzw. deren Linderung durch Substanzkonsum
- Konsum in größeren Mengen oder länger als geplant
- Alkoholkonsum in riskanten oder gefährlichen Situationen
- Der Wunsch und/oder der erfolglose Versuch, den Konsum zu kontrollieren
- Hoher Zeitaufwand, den die Betroffenen für die Beschaffung und den Konsum bzw. dessen Folgen aufbringen
- Aufgabe oder Einschränkung wichtiger Aktivitäten aufgrund des Konsums

Toleranz beschreibt hier die Notwendigkeit der Dosissteigerung, um eine Intoxikation oder andere gewünschte Effekte zu erzielen, oder auch eine Abnahme des spürbaren Effektes des Konsums bei gleichbleibender Dosis. Im DSM wird Alkoholentzug definiert als das Auftreten typischer Entzugssymptome (Tachykardie, Tremor, innere Unruhe) oder als der Konsum von Alkohol oder verwandter Substanzen, z. B. Benzodiazepinen, um das Auftreten solcher Symptome zu umgehen oder zu lindern. Die Diagnose der Alkoholbezogenen Störung kann beim Auftreten von zwei oder mehr Kriterien gestellt werden (National Institute on Alcohol Abuse, 2021).

Diese Arbeit möchte sich primär dem Krankheitsbild der Alkoholbezogenen Störung widmen, da somit die Unterscheidung zwischen Alkoholabhängigkeit und schädlichem Alkoholgebrauch nicht erforderlich ist.

## 1.2 Neurobiologische Grundlagen

In der Neurobiologie der Alkoholbezogenen Störung müssen verschiedene Prozesse betrachtet werden: die direkten Folgen von Alkoholkonsum und Alkoholintoxikation auf neurobiologische Prozesse, die neurobiologischen Vorgänge im Rahmen der Abhängigkeitsentwicklung und -aufrechterhaltung sowie die Entstehung von Suchtverlangen/Craving.

Nach der Aufnahme von Alkohol (Ethanol) wird dieser hauptsächlich in der Leber metabolisiert. Die dort maßgeblich an der Verstoffwechselung beteiligten Enzyme sind die Alkoholdehydrogenase (ADH) und die Aldehyd Deyhydrogenase (ALDH2). Im Gehirn wird Alkohol von den Enzymen Cytochrom P450 und Katalase metabolisiert <sup>14</sup>. Im Rahmen der Metabolisierung entsteht unter anderem Acetaldehyd, das eine neurotoxische und zellschädigende Wirkung sowie eine verstärkende Wirkung auf die Effekte von Ethanol auf das Gehirn hat (McBride *et al.*, 2002).

Genetische Polymorphismen von ADH und ALDH2 demonstrieren den Einfluss der Genetik auf die alkoholbezogene Störung. Ein Polymorphismus der ALDH2, ALDH2\*2, welches überproportional häufig in der chinesischen Population vertreten ist, weist eine deutlich geringere Aktivität auf, weshalb heterozygote oder homozygote Träger des Allels deutlich erhöhte Acetaldehyd-Konzentrationen nach Alkoholkonsum aufweisen, was sich in verstärkten negativen physiologischen Effekten nach dem Alkoholkonsum äußert. Die genetische Ausprägung dieser Enzyme hat folglich einen Einfluss auf die Vulnerabilität für die Entwicklung einer Alkoholbezogenen Störung und deren Folgeerkrankungen: Hetero- oder homozygote Träger des Allels weisen eine geringere Wahrscheinlichkeit auf, eine AUD oder eine alkoholische Leberzirrhose zu entwickeln <sup>14</sup>. Auch in einer europäischen Population konnten Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen, in diesem Fall dem ADH2\*2-Allel der Alkoholdehydrogenase, und der geringeren Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Alkoholabhängigkeit nachgewiesen werden (Borràs *et al.*, 2000).

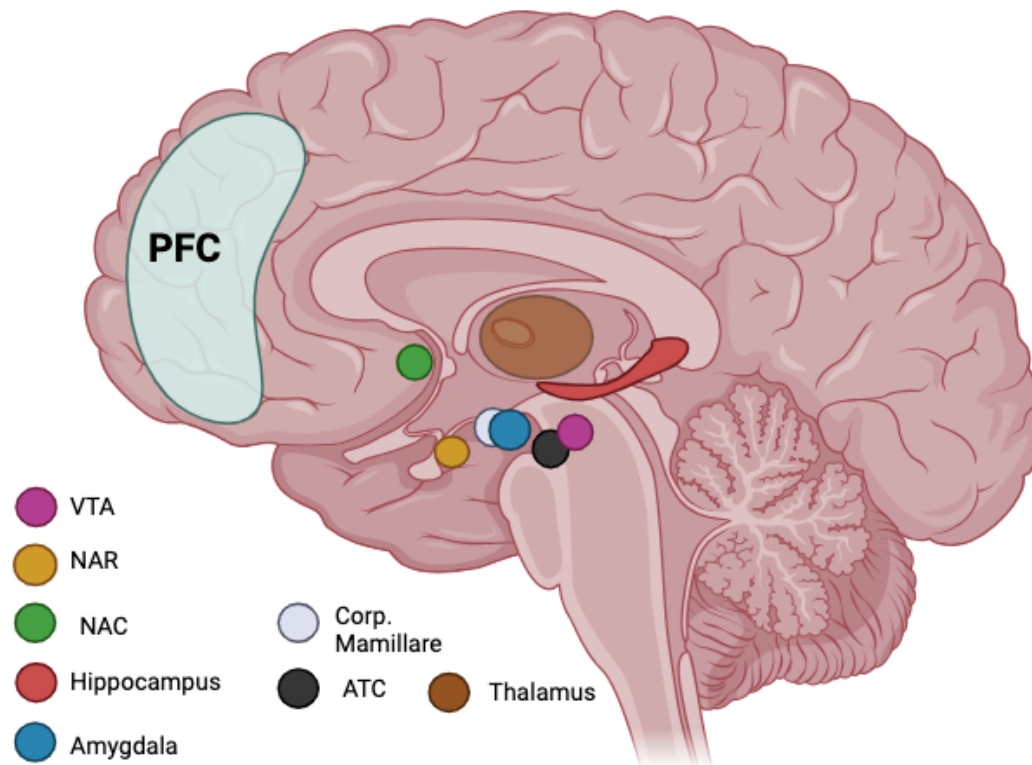
## Belohnungssystem und GABA<sub>A/B</sub>-Rezeptoren

Die Alkoholbezogene Störung verläuft analog zu anderen Suchterkrankungen in drei Phasen, die wiederholt durchlaufen werden. Hierzu zählt das Rauschtrinken bzw. die Intoxikation, die Entzugserscheinungen bzw. der negative Affekt und die Beschäftigung mit dem erneuten Konsum bzw. Suchtverlangen/Craving. Eine zentrale Rolle in diesen Prozessen spielt das Belohnungssystem des Gehirns.

Dieses Belohnungssystem besteht aus verschiedenen Gehirnregionen, die im Zusammenspiel zur Entstehung von Belohnungserleben, aber auch zu Abhängigkeiten führen. Es besteht aus der *Area tegmentalis ventralis* (VTA), die dem Mittelhirn angehört und sich aus verschiedenen Kerngebieten zusammensetzt. Die Neurone der VTA projizieren unter anderem in den *Nucleus Arcuatus* (NAR). Neurone der VTA aktivieren dort Gamma-Aminobuttersäure(GABA) erge Neurone<sup>17</sup>. Der NAR wird mit der Motivationsentstehung aufgrund externer Stimuli, die mit Aversion oder Belohnung assoziiert sind, in Verbindung gebracht. Zudem reguliert er verschiedene physiologische Funktionen wie etwa die Nahrungsaufnahme, den Stoffwechsel, die Hormonausschüttung und andere vegetative<sup>18,19</sup>.

Der *Nucleus Accumbens* (NAC) als weiterer Bestandteil spielt ebenfalls eine Rolle in der Verarbeitung von Motivation, Aversion und Belohnung (Berridge *et al.*, 2016). Weiterhin sei der Präfrontale Cortex (PFC) erwähnt, der die exekutive Kontrolle und zielorientiertes Verhalten moderiert. Der Hippocampus integriert emotionale, räumliche und kontextuelle Informationen und beeinflusst so zielgerichtetes Verhalten, im Kontext einer Abhängigkeit unter anderem so genanntes „cue induced drug-seeking-behavior“, also Suchtverhalten aufgrund externer (engl. cue induced) Stimuli. Er ist ein wichtiger Bestandteil von Lernprozessen und der Konsolidierung von Erinnerungen<sup>21</sup>. Die Amygdala als Teil des limbischen Systems moderiert belohnungserzeugendes Verhalten und ist in positive Verstärkungsmechanismen, Entscheidungsfindung, sowie emotionales Lernen und Angst<sup>22,23</sup>. Der Thalamus reguliert unter anderem aversionsgesteuertes Verhalten, der anteriore temporale Kortex (ATC) ist mit dem semantischen Gedächtnis und die *Corpora Mammillaria* mit dem episodischen Gedächtnis bzw. dem Erinnerungsgedächtnis assoziiert<sup>24–26</sup>.

In Zusammenarbeit erzeugen diese Gehirnregionen Lernprozesse, fördern belohnungserzeugendes Verhalten und sind somit auch für die Entstehung von Abhängigkeit und Craving verantwortlich.

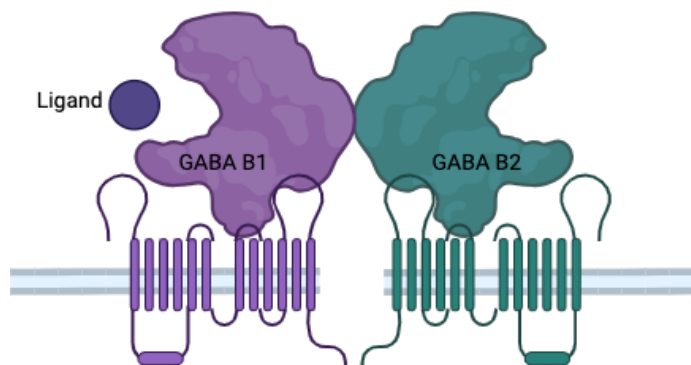


**Abbildung 1:** Ein Sagittaler Querschnitt eines menschlichen Gehirns mit eingezeichneten Strukturen des Belohnungssystems: *Area Tegmentalis Ventralis* (VTA), *Nucl. Arcuatus* (NAR), *Nucl. Accumbens* (NAC), Hippocampus, Amygdala, Corpus Mamillare, Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Thalamus, Präfrontaler Cortex (PFC). Erstellt mit Biorender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))

Die synaptische Signalübertragung des Belohnungssystems erfolgt hauptsächlich über GABAerge und dopaminerge Neurone. GABA fungiert als Neurotransmitter an GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren. In der Alkoholintoxikation ist das GABAerge System mit der anxiolytischen und sedierenden und antikonvulsiven Wirkung des Ethanolis assoziiert und erzeugt motorische Koordinationsstörungen (Kumar *et al.*, 2009).

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind pentamere, ligandengesteuerte Ionenkanäle, die als heteromere Kanäle aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt werden, während GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren heterodimere G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind, die aus zwei Untereinheiten bestehen<sup>28</sup>. Insbesondere der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor wird mit der Vermittlung der akuten physiologischen Wirkung der Ethanolintoxikation wie Sedierung, Anxiolyse und motorischen Koordinationsstörungen in Verbindung gebracht (Kumar *et al.*, 2009). Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor ist bisher weniger gut erforscht, wurde jedoch ebenfalls mit Funktionen des Belohnungssystems wie Lernen, Gedächtnis und auch der Entstehung von Craving und Substanzabhängigkeit in Verbindung gebracht<sup>29</sup>.

Die Aktivierung präsynaptischer GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren erzeugt eine Unterdrückung der GABA-Freisetzung durch einen Ca<sup>2+</sup> Einstrom an inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen, postsynaptische GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren erzeugen eine Hyperpolarisation durch die Aktivierung von K<sup>+</sup>-Kanälen und damit eine negative Beeinflussung der Nervenreizleitung. Sie modulieren thalamische Oszillationen und beeinflussen so das Bewusstsein, Lernen und Emotionen<sup>30,31</sup>. Ethanol ist ein positiver allosterischer Modulator an GABA-Rezeptoren und potenziert GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>B</sub> -induzierte postsynaptische Antworten<sup>32-34</sup>.



**Abbildung 2:** Eine schematische Darstellung des heterodimeren GABA<sub>B</sub>-Rezeptors, bestehend aus Untereinheit 1 und 2, mit einem Liganden (GABA). Erstellt mit Biorender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))

Das GABAerge System ist also nicht nur mit den Effekten der akuten Intoxikation, sondern auch mit der Entstehung von Craving und der Entwicklung von Alkoholabhängigkeit assoziiert<sup>35,36</sup>. Alkohol erhöht den inhibitorischen Effekt GABAerger Neurone, chronischer Alkoholkonsum führt zu einer geringeren Sensitivität der Neurone des VTA und einer erhöhten Baseline-Aktivität GABAerger Neurone, was auf einen möglichen Mechanismus hinter der Toleranzentwicklung bei chronischem Alkoholkonsum hindeuten könnte<sup>37,38</sup>.

### 1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Sowohl auf neurobiologischer, als auch auf soziokultureller Ebene gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede im Konsum- und Suchtverhalten von Alkohol. Männer weisen demnach häufiger alkoholbezogene Störungen auf als Frauen. 2007 zeigten Keyes, Grant und Hasin, dass dieser Effekt mittlerweile jedoch abzunehmen scheint<sup>39</sup>. Wenngleich die Differenz der geschlechtsspezifischen Inzidenz scheinbar geringer wird, was auf soziokulturelle Einflussfaktoren hindeutet, konnten in mehreren Studien auch geschlechtsspezifische neurobiologische Unterschiede der alkoholbezogenen Störung nachgewiesen werden: Frauen gelingt eine

lebenslange Abstinenz eher als Männern und sie zeigen eine weniger schwere Entzugssymptomatik sowie ein geringeres Risiko für Krampfanfälle im Alkoholentzug. Dies ist laut Studien vermutlich auf den Neurosteroid Allopregnanolon, einen endogenen GABA-Rezeptor-Liganden, zurückzuführen, dessen Metabolismus geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist<sup>40-42</sup>.

Das mesolimbische, dopaminerge System des Lern- und Belohnungssystems wird ebenfalls mit geschlechterspezifischen Unterschieden im Suchtverlangen und Konsumverhalten von Alkohol in Verbindung gebracht. Es spielt eine Rolle in der Konditionierung und bei assoziativem Lernen von Umwelt- und körperlichen Stimuli (engl. cues), die eine Belohnung durch Alkoholkonsum voraussagen. Das durch „binge-drinking“ (dt. Rauschtrinken) produzierte Sexualhormon Östradiol erhöht den stimulierenden Effekt von Alkohol auf dopaminerge Neurone des VTA. Von hier projizieren dopaminerge Neurone zum ventralen Striatum (*Nucleus Accumbens*), zum frontalen Cortex und zur Amygdala<sup>43,44</sup>. Östrogenbehandelte, ovariectomierte Mäuse zeigten einen erhöhten Dopaminstoffwechsel bzw. eine erhöhte Übertragung im dopaminergen System in der VTA sowie eine erhöhte Präferenz von Alkohol im Vergleich zu ovariectomierten Kontrollmäusen, weshalb davon ausgegangen wird, dass Östradiol die belohnenden Effekte von Alkohol verstärkt<sup>45</sup>.

## 1.4 Diagnostik

Zur Diagnostik und zum Screening der AUD wird laut der Leitlinie der **Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF)** der Fragebogen des „**Alcohol Use Disorders Identification Test**“ (AUDIT) bzw. dessen Kurzversion (AUDIT-c) empfohlen<sup>9</sup>.

Labormarker spielen im Vergleich zu Fragebögen in der Diagnostik der AUD bisher eine untergeordnete Rolle. Zustandsmarker (engl. state marker) können direkte Marker sein, die als Abbauprodukte/Nebenprodukte direkt nach dem Alkoholkonsum nachweisbar sind. Zur Verfügung stehen bisher unter anderem Ethanol, Ethylglukuronid (EtG), Ethylsulfat (EtS) und Phosphatidylethanol (Peth). Indirekte Marker zeigen beispielsweise durch Alkoholkonsum verursachte Organschäden an und weisen auf einen chronischen Konsum hin. Hierzu zählen die Gamma-Glutamyl Transferase (GGT), Carbohydrat-Defizientes Transferrin (CDT), Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), sowie das mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV). Zum Nachweis von akutem Alkoholkonsum können

direkte Marker wie EtG im Urin bzw. der Ethanolspiegel im Blut bestimmt werden, zum Nachweis von chronischem Alkoholkonsum können direkte Marker wie EtG in Haaren oder eine Kombination aus indirekten Zustandsmarkern (z. B. GGT, MCV, CDT) in Kombination mit dem AUDIT-Fragebogen bestimmt werden. Auch als Abstinenzmarker können direkte Marker wie EtG genutzt werden<sup>9</sup>. Marker, die im klinischen Gebrauch Auskunft über die Toleranzentwicklung oder die Ausprägung des Suchtverhaltens und über dessen zentralnervöse Ausprägung geben, existieren bisher nicht.

## 1.5 Therapie der AUD

In der Therapie der AUD wird eine sogenannte „Qualifizierte Entzugsbehandlung“ empfohlen. Hiervon abzugrenzen ist die „körperliche Entgiftung“, die sich auf die Behandlung der Komplikationen einer AUD, also einer Alkoholintoxikation bzw. eines Alkoholentzugssyndroms bezieht<sup>9</sup>.

Das Alkoholentzugssyndrom äußert sich mit psychischen und somatischen Symptomen wie verstärkter Gereiztheit, Angst und depressiven Symptomen, Blutdruckentgleisungen bis zur Hypertensiven Krise, vermehrtem Schwitzen (Hyperhidrosis) und Erhöhung der Herzfrequenz (Tachykardie), Übelkeit und Erbrechen. Weiterhin kann es zu schweren Krampfanfällen und einem Tremor kommen. Eine weitere schwere Komplikation stellt das Alkoholentzugsdelir dar. Die Letalität des Alkoholentzugsdelirs konnte durch das bessere Verständnis der Erkrankung, frühere Erkennung und bessere Behandlung von mehr als 30 % auf unter 5 % gesenkt werden. Es tritt häufig in Verbindung mit Entzugskrämpfen auf. Zusätzlich zu den zuvor genannten Symptomen treten auch Agitiertheit, Desorientiertheit, sowie akustische, optische und taktile Halluzinationen auf<sup>46,47</sup>.

Eine medikamentöse Therapie steht besonders im Rahmen der körperlichen Entgiftung zur Behandlung der körperlichen Entzugssymptome im Vordergrund. In der S3-Leitlinie werden Benzodiazepine oder Clomethiazol zur Reduktion der Schwere von Entzugssymptomen und zur Verhinderung des Auftretens eines Delirs, und somit zur Reduktion der Mortalität des akuten Alkoholentzugssyndroms empfohlen.<sup>9,48,49</sup>

Neben dem Aufbau eines stabilen ambulanten Netzes zur Rückfallverhütung steht auch hier eine medikamentöse Therapie zur Verfügung. In Deutschland sind hierfür Naltrexon, Nalmefen und Acamprosat zugelassen. Die Wirkung zielt im Gegensatz zur medikamentösen

Therapie des körperlichen Entzugs direkt auf die Behandlung der Abhängigkeitssymptomatik ab und nicht auf deren körperliche Folgeerscheinungen. Naltrexon ist ein selektiver Opioid-Antagonist, das endogene Opioide, die durch Alkoholkonsum freigesetzt werden, blockiert und zudem dopaminerge Aktivität reduziert. Es reduziert Rauschtrinken und Craving. Acamprosat ist ein synthetischer Arzneistoff, der mit Taurin und GABA verwandt ist. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht abschließend geklärt, es scheint jedoch nicht in das GABAerge System selbst einzugreifen, sondern moduliert das glutamaterge System, a.e. an N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptoren und soll so mutmaßlich die „Balance“ im GABAergen und glutamatergen System wiederherstellen, die durch die AUD gestört ist. Acamprosat ist Naltrexon in der Aufrechterhaltung von Abstinenz überlegen<sup>50,51</sup>. Nalmefen ist ein semisynthetischer Opiatrezeptorantagonist, der strukturell Naltrexon ähnelt. Es handelt sich um einen Antagonisten an allen drei Typen von Opiatrezeptoren (an  $\mu$ /My und  $\delta$ /Delta als Antagonist, an  $\kappa$ /Kappa als partieller Agonist), der hierüber vermutlich indirekt das Belohnungssystem über dopaminerge Neurone moduliert. Nalmefen hat eine längere Wirkdauer und eine bessere orale Bioverfügbarkeit als Naltrexon<sup>52,53</sup>. Weiterhin gibt es Untersuchungen zur Verwendung von Baclofen, einem GABA-Derivat, welches an GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren wirkt. Es ergaben sich Hinweise, dass die Einnahme von Baclofen die Rückfallwahrscheinlichkeit senken kann<sup>54</sup>. Aufgrund der bekannten wichtigen Rolle, die das GABAerge und dopaminerge System in der Entstehung und Aufrechterhaltung der AUD spielt, dienen diese Neurotransmittersysteme auch in der Therapie der AUD als Zielstruktur.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Im dopaminergen Signalweg des Belohnungssystems konnten durch Studien folglich bereits geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Neurobiologie der Alkoholbezogenen Störung nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede der neurobiologischen Prozesse der Alkoholbezogenen Störung. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung ist, ob aus den im Rahmen dieser Studie gewonnenen Erkenntnissen ein klinisch anwendbarer, peripherer Marker hervorgeht, der eine Aussage über Veränderungen der neurobiologischen Prozesse des zentralen Nervensystems durch chronischen Alkoholkonsum treffen kann.

Um die geschlechtsspezifische Regulation der neurobiologischen Prozesse des Belohnungssystems im Rahmen der AUD auch im GABAergen System zu untersuchen, wurde als

Zielstruktur dieser Studie das GABBR1-Gen ausgewählt. Dieses Gen kodiert für die Untereinheit 1 des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors. Diese Arbeit konzentriert sich für die Analyse auf sechs verschiedene Regionen des Belohnungssystems: den *Nucleus Arcuatus*, den *Nucleus Accumbens*, die *Corpora Mammillaria*, den Hippocampus, den Anterioren Temporalen Kortex und die Amygdala. Um auch ein peripher erreichbares Gewebe zu untersuchen, erfolgte zudem die Analyse der epigenetischen Regulation des Zielgens aus peripherem Blut. Durch die Untersuchung an menschlichem post-mortem Gewebe aus den verschiedenen Hirnregionen kann durch diese Arbeit eine Grundlage für weitere Arbeiten geschaffen werden, die die gewonnenen Erkenntnisse auf in-vivo Untersuchungen übertragbar machen. Auf diese Weise kann nicht nur untersucht werden, ob die epigenetische Regulation des GABA-Stoffwechsels im Belohnungssystem von Individuen mit AUD im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist, sondern auch, ob diese sich dann im peripheren Gewebe widerspiegeln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Für die Untersuchung wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover post-mortem Blutproben und Gehirnmateriale aus insgesamt sechs Gehirnregionen gesammelt (*Nucleus Arcuatus*, *Nucleus Accumbens*, *Corpora Mammillaria*, Hippocampus, Anteriorer Temporaler Kortex, Amygdala). Die Blutproben wurden mittels Vorhofpunktion des Herzens gewonnen, die Gehirnprouben wurden stereotaktisch entnommen. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Mittels eines Fragebogens wurden bei der Autopsie das zeitliche Intervall nach Versterben und Gewinnung der Proben (Post-Mortem Intervall, PMI), das Alter, bekannte medizinische Diagnosen inklusive einer Alkoholbezogenen Störung, der Raucherstatus, weitere klinische Hinweise oder Auffälligkeiten, die Todesursache sowie die medizinische Behandlung vor dem Versterben erfasst. Als diagnostisches Einschlusskriterium wurden die Diagnosekriterien der **Alcohol Use Disorder (AUD)** und des DSM-V verwendet.

Da in vorausgegangenen Studien nachgewiesen werden konnte, dass ein hohes PMI mit einer erhöhten Varianz der Ergebnisse epigenetischer Untersuchungen einhergeht, wurden Individuen mit einem PMI über 72h aus der Analyse ausgeschlossen (Rhein *et al.*, 2015). Ebenso wurden Individuen mit unklarem Alkoholkonsum nicht berücksichtigt. Aufgrund dieser Kriterien wurden fünf Individuen (vier in der Alkohol-Kohorte [AUD-Kohorte] und eines in der Kontroll-Kohorte) nicht berücksichtigt. Dementsprechend ergab sich eine AUD-Kohorte aus insgesamt 17 Individuen (13 männlich, 4 weiblich) sowie eine Kontroll-Kohorte aus 31 Individuen (21 männlich, 10 weiblich). Das mittlere Alter der AUD-Kohorte betrug 51,82 Jahre, das der Kontroll-Kohorte 54,4 Jahre. Die Daten sind den Tabellen 1a) und 1b) zu entnehmen.

**1a**

			Alter		PMI	
			Mittelwert	Standard- Abweichung +/-	Mittelwert	Standard- Abweichung +/-
Geschlecht	Männer	Kontrolle	51	20	46	14
		Alkohol	53	17	36	21
	Frauen	Kontrolle	66	19	47	15
		Alkohol	48	9	32	19

**1b**

			Gewebe						
			Blut N	Nar N	Nacc N	Amygdala N	Mam N	ATC N	Hippocampus N
Geschlecht	Männer	Kontrolle	20	20	19	20	21	20	21
		Alkohol	13	15	15	14	15	15	11
	Frauen	Kontrolle	12	8	10	10	12	11	11
		Alkohol	4	4	4	4	4	3	4

**Tabelle 1a:** Überblick über die demographischen Daten der Studienpopulation. Angegeben sind der Mittelwert des Alters und des Post-Mortem Intervalls (PMI) sowie die Standardabweichung. Aufgeteilt ist die Kohorte in gesunde Kontrollpersonen (Kontrolle) und Individuen mit AUD (Alkohol), sowie nach Geschlecht (Männer, Frauen).

**Tabelle 1b:** Auflistung der Anzahl N der vorhandenen Gewebeproben der Kohorte. Aufgeteilt ist die Kohorte in gesunde Kontrollpersonen (Kontrolle) und Individuen mit AUD (Alkohol), sowie nach Geschlecht (Männer, Frauen).

Zu Beginn der Studie wurde eine Chloroform-Extraktion der DNA durchgeführt. Nach Qualitätsmessungen des DNA-Gehaltes fiel jedoch eine nicht ausreichend hohe Qualität der DNA-Produkte auf. Es erfolgte daher zunächst eine Lyse des Gewebes, anschließend wurde das Lysat aufgereinigt. Hieraus ergab sich eine deutlich verbesserte Qualität. Anschließend wurde die DNA bisulfitiert und bei -20°C gelagert.

Um eine Untersuchung der epigenetischen Regulation des GABBR1-Gens durchführen zu können, wurde der proximale Promotor des GABBR1-Gens als Target ausgewählt. Das Primer-Design erfolgte mittels des NetPrimer Webservice (Premier Biosoft,

<http://www.premierbiosoft.com>; eingesehen am 26. Juli 2021). Die PCR-Vervielfältigung wurde mittels eines Touchdown-PCR Protokolls durchgeführt <sup>56</sup>.

Die vervielfältigten Abschnitte (Amplicons) wurden erneut aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem 3750xl 24 Capillary Sequencer (ABI Life Technologies, Grand Island, USA). Die Methylierungswerte wurden auf mindestens 95 % Integrität pro CpG Position und Gewebe validiert. Alle Sequenzen, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

## 2.2 Transkriptionsfaktoranalyse

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren wurde eine in-silico prediction database aus ChipSeq-Data ([www.factorbook.org](http://www.factorbook.org)) verwendet. Es konnten so drei mögliche Transkriptionsfaktoren, die in Verbindung mit alkoholbezogener Regulation von GABBR1 an CpG-4 gebracht werden können, identifiziert werden.

## 2.3 Statistik

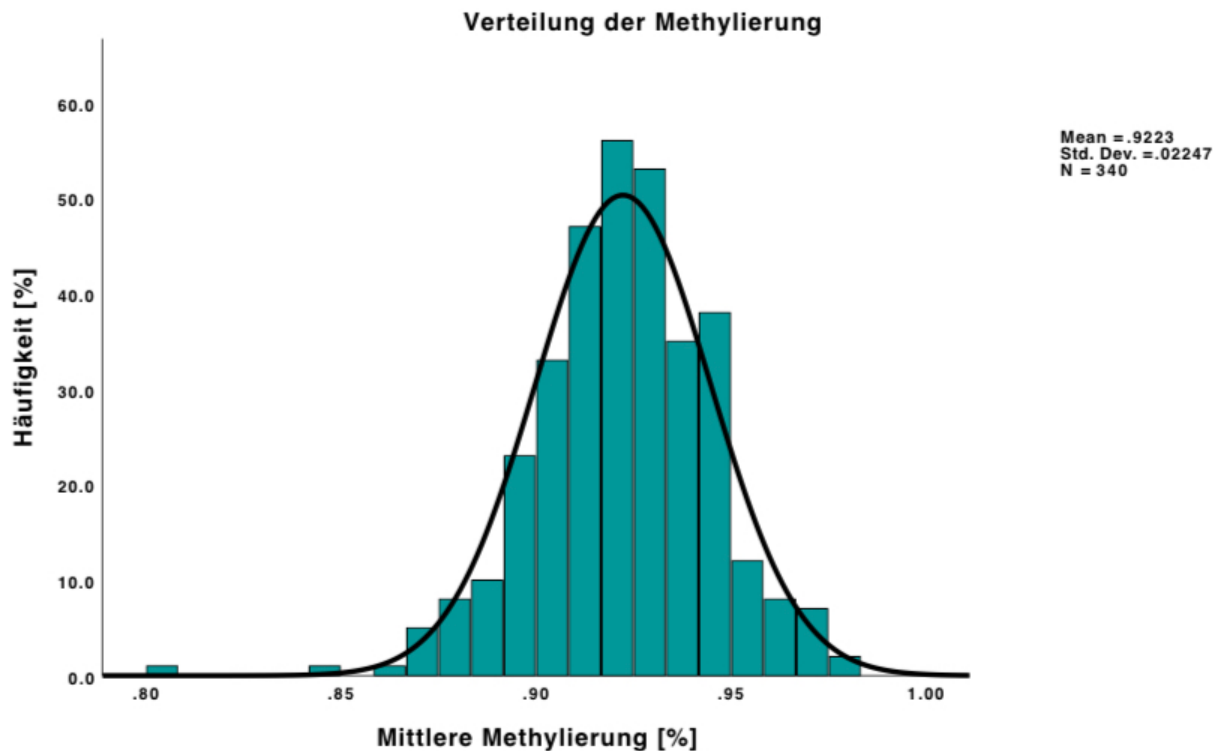
Die statistischen Rechnungen und die Datenillustration wurde mit dem **Statistical Package for the Social Sciences** Version 27 (SPSS, IBM, Armonk NY, USA) und GraphPad Prism für Mac Version 9 (GraphPad Software Inc, La Jolla CA, USA) durchgeführt. Die Methylierungsdaten sind nach Kolmogorov-Smirnov Normalverteilungstest mit Lilliefors Korrektur sowie nach visueller Inspektion der Verteilung in einem Histogramm normalverteilt.

	Normalverteilungstest					
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Sig.	Statistik	df	Sig.
Mittlere Methylierung [%]	0,039	340	.200*	0,979	340	<0,001

\*. Dies ist der untere Grenzwert der tatsächlichen Signifikanz

a. Lilliefors Significance Correction

**Tabelle 2:** Normalverteilungstest des durchschnittlichen Methylierungslevels nach Kolmogorov-Smirnov mit Lilliefors-Korrektur: Statistische Signifikanz (Stat.), Freiheitsgrade (df), Signifikanz (Sig.), sowie Shapiro-Wilk Test: Statistische Signifikanz (Stat.), Freiheitsgrade (df), Signifikanz (Sig.)



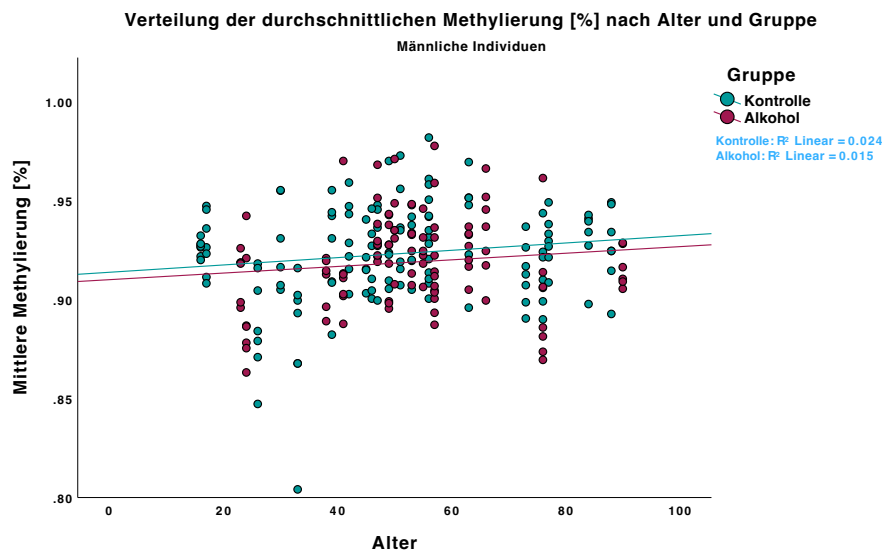
**Abbildung 3:** Verteilung der Methylierung als Histogramm mit Häufigkeit in % auf der y-Achse und der mittleren Methylierung auf der x-Achse, Normalverteilung (schwarze Linie). Mittelwert (mean): 0,92, Standardabweichung (Std. Dev.): 0,022, N=373

Unterschiede der durchschnittlichen Methylierung zwischen verschiedenen Geweben für die Geschlechter wurden mittels one-way ANOVA mit Tukey's Korrektur für multiples Testen erfasst. Unterschiede zwischen der AUD- und Kontrollgruppe für einzelne CpG-Positionen wurden mittels zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben erfasst. Es erfolgte eine Korrektur für multiple Vergleiche nach Benjamini, Krieger und Yekutieli mit einer false-discovery Rate (FDR) von 4 %. Auch bei Anwendung einer höheren FDR von bis zu 10 % ergaben sich keine zusätzlichen relevanten Ergebnisse bei einzelnen CpG-Positionen<sup>57</sup>. Die Equality of variance wurde mittels Levene's Test bestimmt. Mittels eines gemischten linearen Modells (MLM) wurden alle Faktoren betrachtet, die einen Einfluss auf die Methylierung nehmen. Insbesondere der Effekt von regelmäßigem Nikotinkonsum auf die Unterschiede in der Methylierung wurde hiermit betrachtet.

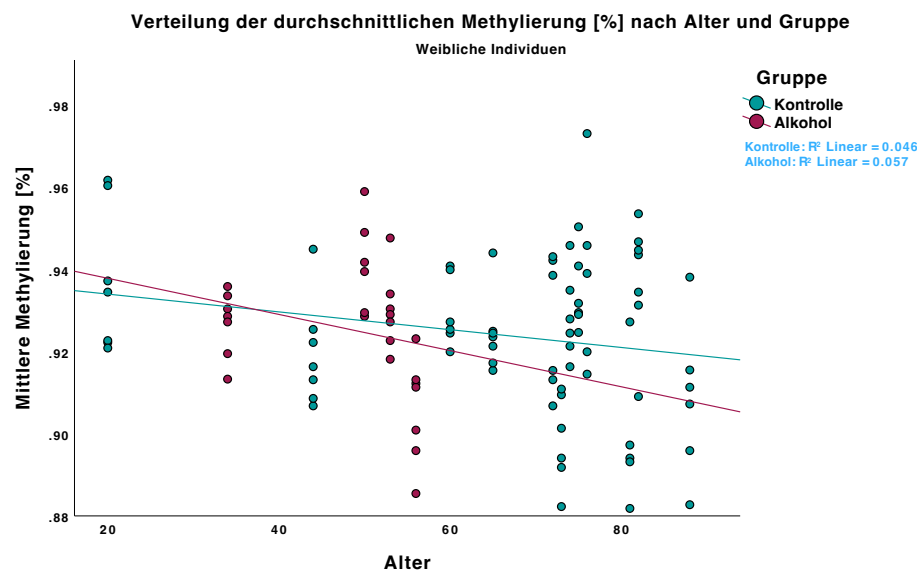
### 3 Ergebnisse

Im durchschnittlichen Methylierungslevel des Genfragmentes zeigte sich kein Unterschied zwischen AUD- und Kontrollkohorte bei beiden Geschlechtern. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das Methylierungslevel nicht mit dem Alter korreliert.

#### 4a



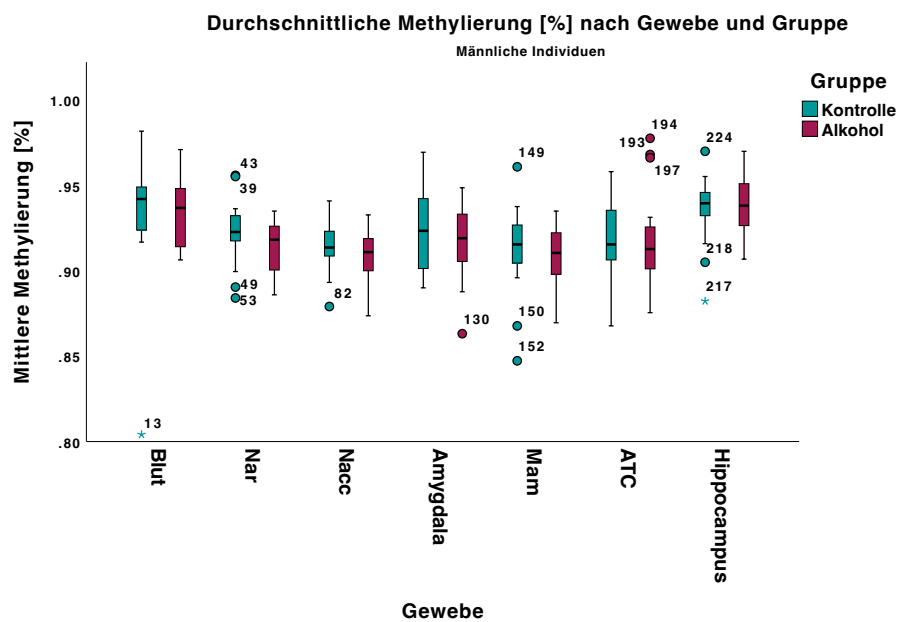
#### 4b



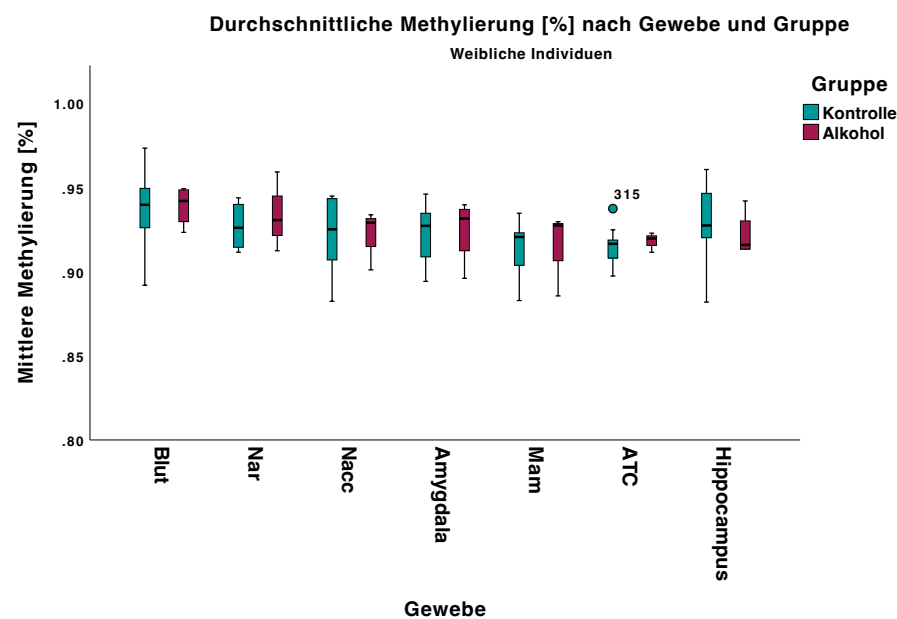
**Abbildung 4a:** Punktdiagramm der Verteilung der durchschnittlichen Methylierung nach Alter und Gruppe in % auf der y-Achse abhängig vom Alter auf der x-Achse bei männlichen Individuen der AUD-Kohorte (rot) und Kontrollkohorte (blau). R<sup>2</sup> der Kontrollgruppe: 0,024, R<sup>2</sup> der AUD-Kohorte: 0,015.

**Abbildung 4b:** Punktdiagramm der Verteilung der durchschnittlichen Methylierung in % auf der y-Achse abhängig vom Alter auf der x-Achse bei weiblichen Individuen der AUD-Kohorte (rot) und Kontrollkohorte (blau). R<sup>2</sup> der Kontrollgruppe: 0,046, R<sup>2</sup> der AUD-Kohorte: 0,057

## 5a



## 5b

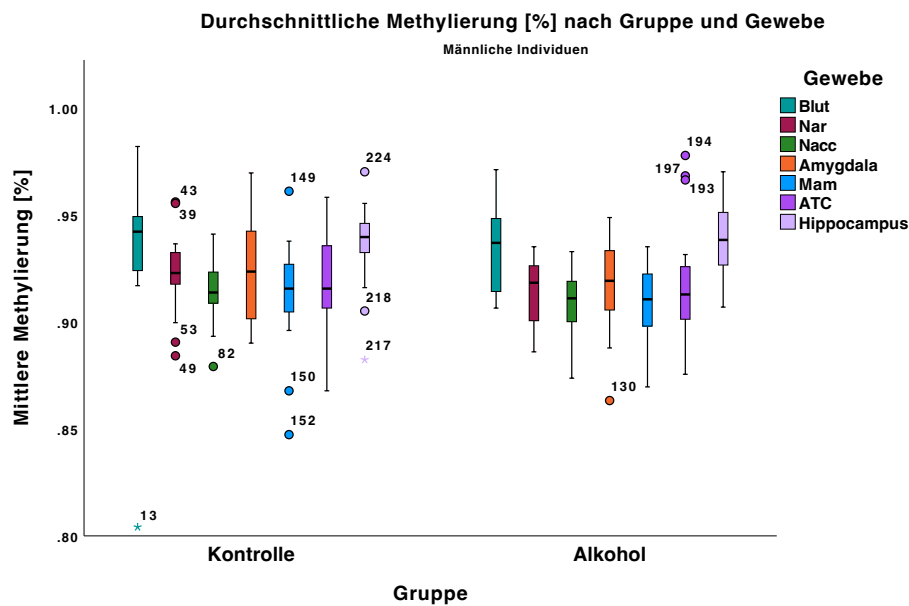


**Abbildung 5a:** Als Boxplot aufgetragene durchschnittliche Methylierung nach Gewebe der männlichen Individuen der AUD-Kohorte (rot) und Kontrollkohorte (blau) in % auf der y-Achse der einzelnen Gewebe auf der x-Achse. Erfasst wurden: Blut, Ncl. Arcuatus (Nar), Ncl. Accumbens (Nacc), Amygdala, Corpus Mammillare (Mam), Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Hippocampus.

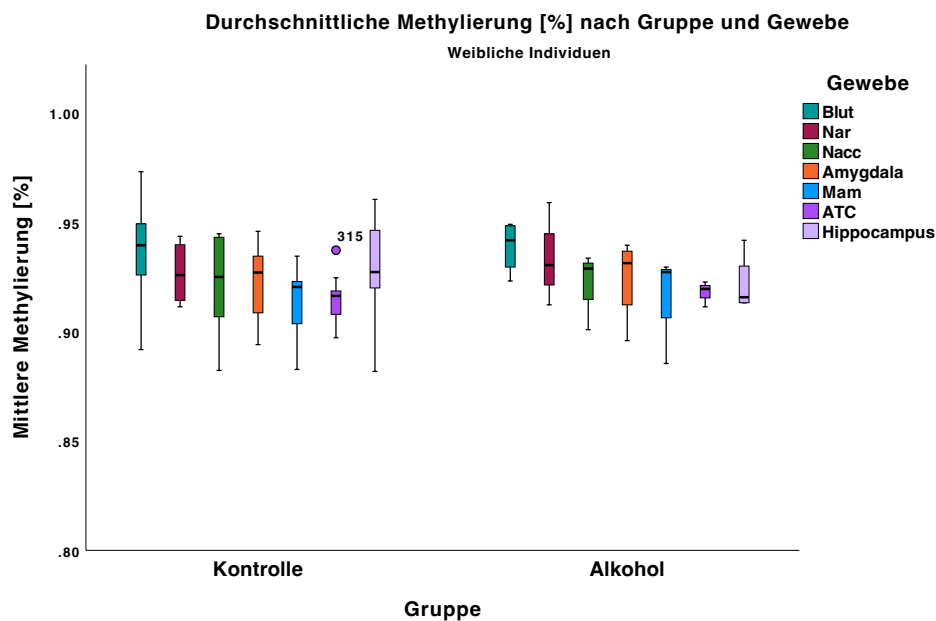
**Abbildung 5b:** Als Boxplot aufgetragene durchschnittliche Methylierung nach Gewebe der weiblichen Individuen der AUD-Kohorte (rot) und Kontrollkohorte (blau) in % auf der y-Achse der einzelnen Gewebe auf der x-Achse. Erfasst wurden: Blut, Ncl. Arcuatus (Nar), Ncl. Accumbens (Nacc), Amygdala, Corpus Mammillare (Mam), Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Hippocampus.

Bei Betrachtung der einzelnen Gewebe zeigten sich bei Männern der AUD-Kohorte signifikante Unterschiede des durchschnittlichen Methylierungslevels zwischen Blut und Nucleus Accumbens sowie zwischen Blut und Corpora Mammillaria. Im Hippocampus zeigte sich eine signifikante Hypermethylierung im Vergleich zum Nucleus Arcuatus, den Corpora Mammillaria und dem Nucleus Accumbens. In der Kontrollgruppe fanden sich lediglich signifikante Unterschiede des durchschnittlichen Methylierungslevels zwischen Hippocampus und Corpora Mammillaria. Bei allen weiblichen Individuen beider Kohorten wurden keine signifikanten Unterschiede in der durchschnittlichen Methylierung zwischen allen Geweben nachgewiesen.

6a



6b

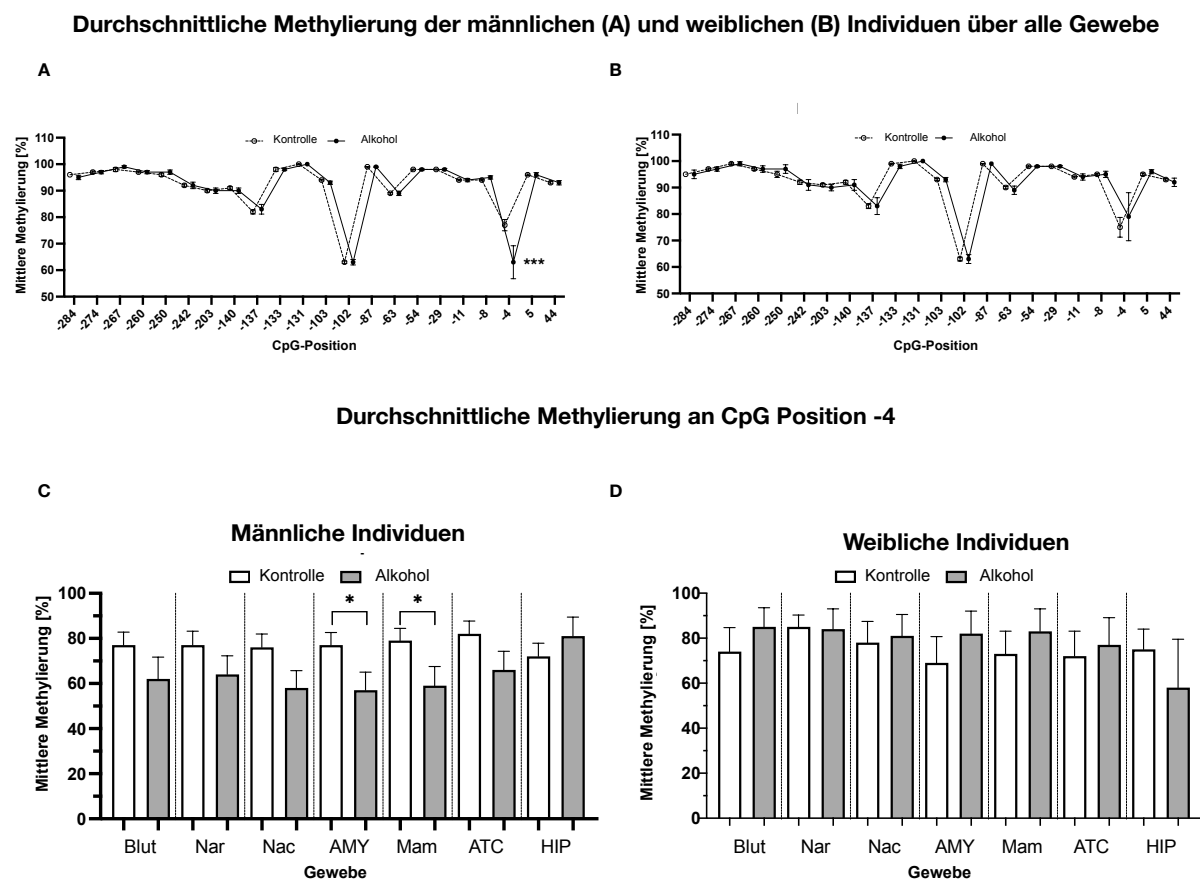


**Abbildung 6a:** Als Boxplot geclusterte durchschnittliche Methylierung nach Gruppe und Gewebe bei männlichen Individuen in % auf der y-Achse, getrennt nach der AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte auf der x-Achse, aufgetragen sind die untersuchten Gewebe Blut, Ncl. Arcuatus (Nar), Ncl. Accumbens (Nacc), Amygdala, Corpus Mammillare (Mam), Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Hippocampus.

**Abbildung 6b:** Als Boxplot geclusterte durchschnittliche Methylierung nach Gruppe und Gewebe bei weiblichen Individuen in % auf der y-Achse, getrennt nach der AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte auf der x-Achse, aufgetragen sind die untersuchten Gewebe Blut, Ncl. Arcuatus (Nar), Ncl. Accumbens (Nacc), Amygdala, Corpus Mammillare (Mam), Anteriorer Temporaler Kortex (ATC), Hippocampus

### 3.1 Spezifische Loci des GABBR1 Promoterfragments

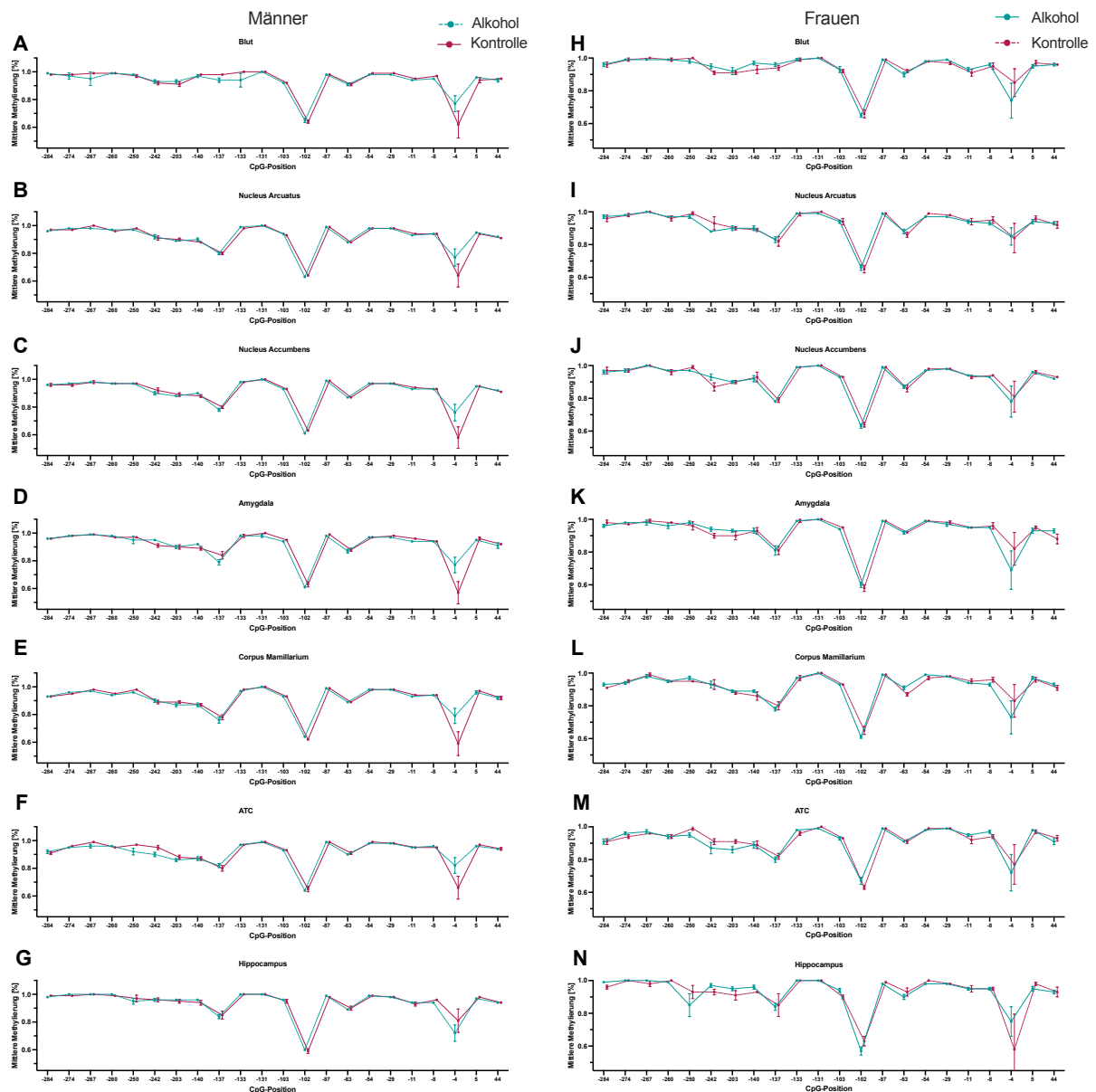
Bei Betrachtung des Methylierungslevels spezifischer CpG-Positionen des GABBR1-Promoters zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen der AUD- und der Kontroll-Kohorte. CpG-4 zeigte sich, alle Gewebe zusammengenommen, signifikant hypomethyliert bei männlichen Individuen der AUD-Kohorte ( $t(178.33) = 3.668, P < 0.001$ ). Bei weiblichen Individuen ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 7A+B:** Die durchschnittliche Methylierung der männlichen (A) und weiblichen (B) Individuen in % über alle Gewebe auf der y-Achse an den CpG-Positionen -284 bis 44 des GABBR1-Promoters auf der x-Achse getrennt nach der AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte.

**Abbildung 7C+D:** Die durchschnittliche Methylierung an CpG-Position -4 in % auf der y-Achse in den untersuchten Geweben Blut, Nucl. Arcuatus, Ncl. Accumbens, Amygdala, Corpus Mamillare, Anteriorer Temporaler Kortex, Hippocampus auf der x-Achse bei männlichen (C) und weiblichen Individuen (D) getrennt nach AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte

### Durchschnittliche Methylierung der CpG-Positionen -284 bis 44



**Abbildung 8a-g:** Durchschnittliche Methylierung in % auf der y-Achse der CpG-Positionen -284 bis 44 auf der x-Achse, getrennt nach AUD- und Kontroll-Kohorte der untersuchten Gewebe: Blut(A), Nucl. Arcuatus(B), Ncl. Accumbens(C), Amygdala(D), Corp. Mamillare(E), Anteriorer Temporaler Kortex(F), Hippocampus(G) bei männlichen Individuen der AUD-Kohorte (schwarz) und Kontroll-Kohorte (weiß).

**Abbildung 8h-n:** Durchschnittliche Methylierung in % auf der y-Achse der CpG-Positionen -284 bis 44 auf der x-Achse, getrennt nach AUD- und Kontroll-Kohorte der untersuchten Gewebe: Blut (H), Nucl. Arcuatus(I), Ncl. Accumbens(J), Amygdala(K), Corp. Mamillare(L), Anteriorer Temporaler Kortex(M), Hippocampus(N) bei weiblichen Individuen der AUD-Kohorte (schwarz) und Kontroll-Kohorte (weiß). Signifikante Stellen: CpG-4 bei Amygdala, Corp. Mamillare bei männlichen Individuen. Signifikante Stellen nach Korrektur für multiples Testen

Bei CpG -260 zeigten sich signifikant unterschiedliche Methylierungslevel bei Männern der AUD-Kohorte im Vergleich zur Kontroll-Kohorte im Blut ( $t(31) = 2.082, P = 0.046$ ), CpG-242 in der Amygdala ( $t(32) = 2.324, P = 0.027$ ) und ATC ( $t(32) = -2.192, P = 0.036$ ), CpG-4 in der Amygdala ( $t(32) = 2.158, P = 0.039$ ), und Corpora Mammillaria ( $t(33) = 2.103, P = 0.043$ ), CpG-250 in den Corpora Mammillaria ( $t(34) = -2.095, P = 0.044$ ), CpG-267 im ATC ( $t(24,558) = -2.235, P = 0.032$ ) und CpG-8 im Hippocampus ( $t(30) = -2.142, P = 0.040$ ). Bei weiblichen Individuen zeigten sich signifikante Unterschiede bei CpG-29 im Blut ( $t(14) = 2.163, P = 0.007$ ), und CpG-140 im Hippocampus ( $t(11,994) = 2.439, P = 0.031$ ).

CpG-4 blieb auch nach der Korrektur für multiples Testen signifikant. Alle anderen Loci in den individuellen Geweben, die zuvor eine Signifikanz zeigten, wiesen diese nach der Korrektur nicht mehr auf.

Die Methylierung von CpG-4 unterschied zwischen den untersuchten Geweben hinweg bei Frauen und Männern nicht signifikant (one way ANOVA, men:  $F(6) = 0.276, P = 0.948$ ; women:  $F(6) = 0.337, P = 0.916$ ).

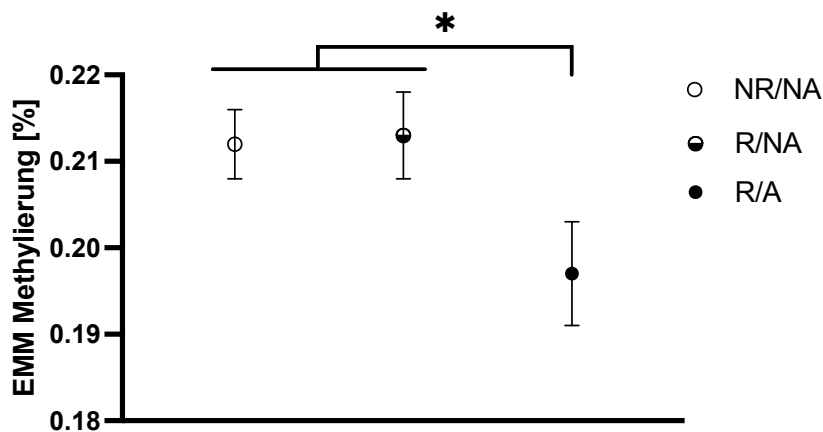
### 3.2 Gemischtes Lineares Modell

Um noch weitere Einflussfaktoren auf die Fragestellung dieser Studie zu identifizieren, erfolgte die Berechnung eines gemischten linearen Modells (MLM). Die Analyse via MLM ergab, dass sich der Effekt chronischen Nikotinkonsums auf weibliche und männliche Individuen der AUD- und Kontroll-Kohorte unterschiedlich auswirkt. Während bei Männern der hauptsächliche Effekt zwischen AUD-Kohorte und Kontroll-Kohorte lag, wurde bei Frauen der hauptsächliche Unterschied zwischen Raucherinnen und Nichtraucherinnen, ungeachtet des Alkoholkonsums, nachgewiesen.

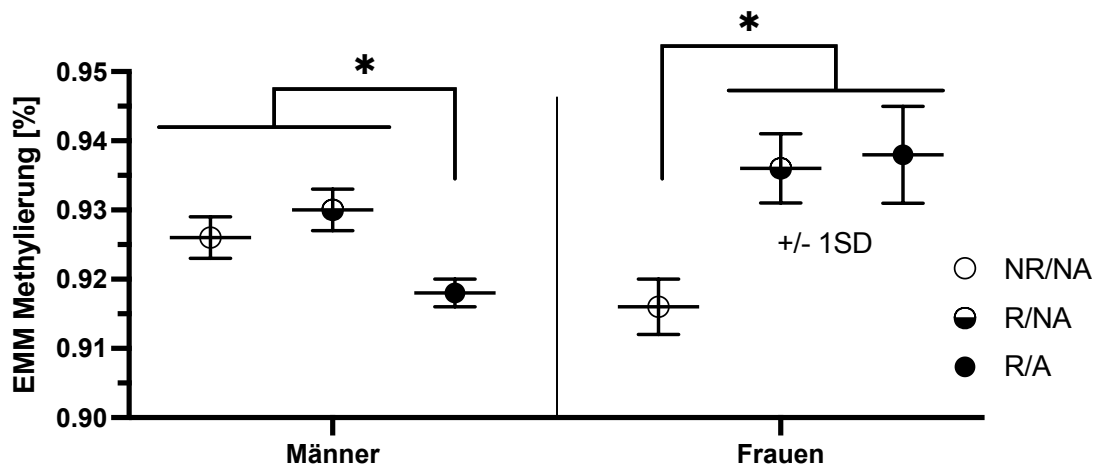
Frauen zeigten signifikante Unterschiede des Methylierungslevels der geschätzten Randmittel sowohl zwischen weiblichen Raucherinnen und Nichtraucherinnen ( $F(2,20)=5.792, P=0.0257$ ) als auch bei rauchenden weiblichen Individuen der AUD-Kohorte ( $F(2,20)=5.792, P=0.0429$ ).

## Rauchen und Alkohol im gemischten Modell

### A Geschätzte Randmittel der Methylierung



### B Geschätzte Randmittel der Methylierung im Geschlechtervergleich



**Abbildung 9a:** Geschätzte Randmittel der Methylierung in % auf der y-Achse im Vergleich bei Nichtrauchenden der Kontroll-Kohorte (NR/NA, weiße Punkte), Rauchenden der Kontrollkohorte (R/NA, schwarz-weiße Punkte) und Rauchenden der AUD-Kohorte (R/A, schwarze Punkte).

**Abbildung 9b:** Geschätzte Randmittel der Methylierung im Geschlechtervergleich in % auf der y-Achse bei weiblichen (rechts) und männlichen (links) Individuen bei Nichtrauchenden der Kontroll-Kohorte (NR/NA, weiße Punkte), Rauchenden der Kontroll-Kohorte (R/NA, schwarz-weiße Punkte) und Rauchenden der AUD-Kohorte (R/A, schwarze Punkte). Jeweils +/- einer Standardabweichung

Tests der Fixed-Effects-Berechnung				
Variable	Numerator df	Denominator df	F	Sig.
Schnittpunkt	1	3886	34212,709	0,000
CpG-Position	21	3886,000	243,374	0,000
Gewebe	6	3886	8,393	0,000
alc_smoke	2	3886,000	4,581	0,010
Geschlecht	1	3886,000	2,534	0,111
Alter	1	3886,000	1,156	0,282
Gewebe*Geschlecht	6	3886	0,600	0,730
Geschlecht* alc_smoke	2	3886,000	6,937	0,001

a. Abhängige Variable: Methylierung

**Tabelle 3:** Test der Fixed-Effects-Berechnung. Betrachtet wurden die Faktoren: CpG-Position, Gewebe, AUD-Status in Kombination mit Raucherstatus (alc\_smoke), Geschlecht, Alter, Gewebe unter Betrachtung des Geschlechts (Gewebe\*Geschlecht), Geschlecht und AUD-Status in Kombination mit Raucherstatus (Geschlecht\*alc\_smoke) hinsichtlich des Faktors aus Freiheitsgraden und Signifikanz (F). Anzahl der Freiheitsgrade (Numerator df) und Signifikanz. a: Abhängige Variable: Methylierung

## 4 Diskussion

Das GABAerge System ist ein wichtiger Bestandteil des Belohnungssystems und ein zentraler Bestandteil der Neurobiologie der Alkoholintoxikation und der Alkoholbezogenen Störung.

In dieser Studie konnten bei Individuen mit Alkoholbezogener Störung geschlechtsspezifische Unterschiede der epigenetischen Regulation des GABAergen Systems in verschiedenen Regionen des Belohnungssystems gezeigt werden, die sich auch im peripheren Blut widerspiegeln. Außer im Hippocampus wurde in einigen untersuchten Hirnregionen eine Hypomethylierung des CpG-4 des GABBR1-Gens nachgewiesen, was für die Untereinheit 1 des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors codiert. Ein möglicher Faktor, warum nicht alle untersuchten Gewebe einen statistisch signifikanten Unterschied in der Methylierung an dieser CpG-Position erreichten ist sicherlich auf die Größe der untersuchten Kohorten zurückzuführen.

### 4.1 Methylierung und Transkriptionsfaktorvorhersage

Die Untersuchung der Transkriptionsfaktoren des GABBR1-Promoters ergab keine spezifischen Hinweise auf die Regulation der Gensequenz. Dennoch ist generell eine Hypomethylierung zumeist mit einer Aktivierung der Transkription assoziiert <sup>58</sup>, woraus in diesem Fall eine erhöhte GABBR1-Transkription resultieren würde.

Die erwähnten prä- und postsynaptischen inhibitorischen Effekte wären somit bei Individuen mit AUD verstärkt. Es entsteht eine Abschwächung der synaptischen Übertragung und Gewöhnung im Belohnungssystem, was sich auch in aktuellen Abhängigkeitsmodellen widerspiegelt <sup>17,59</sup>. Epigenomische Veränderungen stehen nachgewiesenermaßen mit Gewöhnungseffekten der neuronalen Übertragung während chronischen Alkoholkonsums und dem Auftreten von Verhalten ähnlich einer Angststörung während des Alkoholentzugs in Verbindung <sup>60</sup>.

### 4.2 GABBR1 und Ethanol

In vorherigen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass die Ethanolaufnahme eine erhöhte Expression des GABA-Rezeptors B Untereinheit 1 (GABAB1) im Kortex, jedoch nicht im Hippocampus erzeugt, wohingegen die GABA-Rezeptor B Untereinheit 2 (GABAB2) sowohl im Kortex als auch im Hippocampus vermehrt exprimiert wurde. Die Gabe des GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Agonisten Baclofen hob diese Effekte teilweise wieder auf <sup>61</sup>. Dies ist ein Hinweis

darauf, dass sich die Regulation der GABAB1-Rezeptor Untereinheit, wie auch in dieser Studie, im Hippocampus von der des Kortex und anderer Hirnregionen unterscheidet.

Enoch et al. zeigten zwar gegenteilige Resultate, bei denen die GABBR1-Expression in post-mortemem Gewebe des Hippocampus bei Individuen mit AUD oder Kokainabhängigkeit und Alkohol-präferierenden Ratten herabreguliert schien, hier unterschied sich jedoch die angewandte Untersuchungsmethode, denn es wurden mRNA-Transkripte untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und Punkten der Transkriptionsregulation lassen sich diese Daten nicht direkt mit den hier besprochenen Ergebnissen ins Verhältnis setzen.

Ein weiterer intronischer Locus des GABBR1-Gens (CpG cg 09577455) zeigte ebenfalls eine herabgesetzte Methylierung im Zusammenhang mit erhöhter Alkoholaufnahme, wohingegen ein intronischer Locus des GABRD-Gens (CpG cs04781796), das für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor codiert, eine erhöhte Methylierung aufwies<sup>62</sup>. Hierbei ist in beiden Fällen unklar, welchen Effekt die Methylierung auf die tatsächliche Expression des Gens hat.

### **4.3 Gewebeübergreifende Effekte der GABBR1-Methylierung**

Für eine bessere Zugänglichkeit dieser Merkmale ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Gehirngewebes mit denen im peripheren Blut von Interesse. In vorherigen Arbeiten wurden bereits im peripheren Blut einer großen Kohorte epigenetische Veränderungen in Zusammenhang mit Alkoholkonsum nachgewiesen: Liu *et al.* zeigten epigenetische Veränderungen von GABBR1 und GABRD1, einem Gen, das für die Delta-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors kodiert, in Verbindung mit der Immunantwort bzw. der Funktion des Immunsystems. Transkripte dieser Gene wurden mit der Immunantwort und Lymphozytenaktivierung im Kontext von Alkoholkonsum assoziiert<sup>62</sup>. Auch Peng et al. zeigten Veränderungen der proinflammatorischen Mikroglia und Makrophagen (M1) und wachstumsinduzierenden Mikroglia/Makrophagen (M2), die nach binge-drinking eine erhöhte Expressierung zeigten, welche sich nach vier Tagen wieder normalisierte<sup>63</sup>.

Dies zeigt eine potenzielle Verbindung zwischen dem peripheren Immunsystem und dem zentralen Nervensystem im Kontext von Alkoholkonsum und unterstützt so die Hypothese peripher erfassbarer Strukturen, die Rückschlüsse über Prozesse im zentralen Nervensystem zulassen.

#### 4.4 CpG-4 als potentieller Biomarker?

Der in dieser Studie identifizierte Marker CpG-4 ist vor allem deshalb interessant, da er keine gewebespezifischen Unterschiede zwischen Gehirngewebe und Blut aufweist und konstante Veränderungen bei männlichen Individuen der AUD-Kohorte im Vergleich zu männlichen Individuen der Kontroll-Kohorte zeigt, während das durchschnittliche Methylierungslevel des gesamten Promoterfragments keine Unterschiede zwischen den Kohorten aufwies.

Daher könnte CpG-4 als Biomarker dienen: Hypomethylierung an CpG-4 und veränderte Expression des GABBR1-Gens im ZNS als potentieller Hinweis auf Gewöhnung des Belohnungssystems, Toleranzentwicklung und daraus resultierende Dosissteigerung bei chronischem, schwerem Alkoholgebrauch. Um diese These zu bestätigen, sind weitere gezielte Untersuchungen notwendig.

In vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass epigenetische Veränderungen durch schweren Alkoholkonsum noch nach Jahren der Abstinenz reversibel sein können<sup>62</sup>, so dass eine Verwendung von CpG-4 als Indikator für aktuellen, chronischen und schweren Alkoholkonsum oder auch für die Schwere der Abhängigkeit und Toleranzentwicklung denkbar ist. Hierfür sollte untersucht werden, ob es sich bei CpG-4 um einen veränderbaren State- oder permanenten Trait-Marker handelt. Da es sich bei dieser Arbeit um eine post-mortem Untersuchung handelt, wären daher insbesondere in-vivo Daten eine wichtige Ergänzung, um die gewonnenen Kenntnisse weiter zu untermauern.

#### 4.5 GABBR1 Methylierung bei weiblichen Individuen

In dieser Studie wurden keine signifikanten Veränderungen der Methylierung des GABBR1-Promoters durch Alkoholkonsum bei Frauen nachgewiesen.

Es zeigte sich jedoch im gemischten linearen Modell, dass sich die Signifikanz des Unterschiedes des Methylierungslevels unter Einbeziehung des Raucherstatus erhöht, wenn das Geschlecht ebenfalls als Faktor miteinbezogen wird. Bei weiblichen Individuen zeigte sich ein superadditiver Effekt des AUD-Status bei rauchenden Individuen.

Es ist bekannt, dass sich Alkoholabhängigkeit bei Frauen anders äußert als bei Männern. Wenngleich Frauen eine höhere Rate lebenslanger Abstinenz aufweisen und weniger schwere Entzugssymptome zeigen, so entwickeln sie häufiger alkoholbezogene Folgeerkrankungen wie alkoholassoziierte Lebererkrankungen, Diabetes oder kardiovaskuläre

Erkrankungen und sind zudem anfälliger für alkoholinduzierte neuronale Schäden<sup>64 40 6</sup>. Eine geschlechtsspezifische, ggf. hormonell bedingte Regulation ist hier denkbar und konnte bereits in Teilen nachgewiesen werden.

Auch bei der Untersuchung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (HPA) und der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Achse (HPG) wurden geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt. Beide sind wichtige Bestandteile der Stressantwort und regulieren sexuelle Funktionen. Es bestehen geschlechtsspezifische Unterschiede in diesem System, die auch mit dem zentralnervösen GABA<sub>A</sub>-Stoffwechsel in Verbindung stehen<sup>65</sup>.

#### 4.6 Abhängigkeit und hormonale Balancen

Neurosteroide und Sexualhormone sind geschlechtsspezifisch reguliert und könnten daher ein Erklärungsmodell für die diese geschlechtsspezifischen Unterschiede bieten. So konnte gezeigt werden, dass das Verabreichen des Sexualhormons Progesteron bei Frauen hinweisinduziertes Craving und Cortisolausschüttung während des Kokaintzuges milderte. Frauen, denen Progesteron verabreicht wurde, berichteten von weniger negativen Emotionen und reagierten weniger schwer auf Stressexposition während des Entzuges<sup>66</sup>.

Auch Allopregnanolon, ein Neurosteroid und Metabolit von Progesteron, reduzierte die Rückfälligkeit bei kokainabhängigen, weiblichen Ratten, was eine geschlechtsspezifische Regulation des Cravings abhängig von der Ausschüttung von Neurosteroiden und Sexualhormonen nahelegt. Allopregnanolon ist ein positiver allosterischer Modulator an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und beeinflusst so die GABAerge Übertragung. Wie eingangs erwähnt, wird Allopregnanolon auch mit den weniger stark ausgeprägten Entzugssymptomen bei Frauen in Verbindung gebracht.

Östrogen als weibliches Sexualhormon hat nachgewiesenermaßen eine neuroprotektive Wirkung und beeinflusst die Neuroplastizität positiv<sup>67</sup>. Es wurde eine lokale de-novo Synthese von Östrogen im Hippocampus durch das Enzym Aromatase nachgewiesen, wobei Frauen eine höhere Aktivität dieses Enzymes aufwiesen, was auf eine höhere lokale Konzentration von Estradiol bei Frauen hindeutet<sup>68</sup>. Nikotinkonsum als wichtiger Einflussfaktor auf neurobiologische Prozesse beeinflusst den cerebralen Blutfluss negativ. Der Östrogenrezeptor ER-β scheint eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der erwähnten positiven Effekte der Östrogene zu spielen. Chronischer Nikotinkonsum ist mit einer

verminderten ER- $\beta$  Aktivität assoziiert<sup>69</sup> und könnte also den protektiven Effekten des Östrogens entgegenwirken. Es ist bekannt, dass Rauchen die Methylierung global verändern kann, denn noch Jahre nach Beendigung des Nikotinkonsums können diese Veränderungen fortbestehen<sup>70</sup>.

Bei Männern wurden in dieser Studie Unterschiede zwischen AUD- und Kontroll-Kohorte nachgewiesen. Bei Frauen zeigte sich hingegen bei der Analyse mittels MLM der größte Effekt zwischen Raucherinnen und Nichtraucherinnen unabhängig vom Alkoholkonsum. Zusätzlich zeigte sich ein superadditiver Effekt bei weiblichen Individuen, die sowohl AUD als auch chronischen Nikotinkonsum aufwiesen. Dies könnte auf einen zusätzlichen Effekt des Nikotinkonsums auf die schädliche Wirkung des Alkoholkonsums hindeuten. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits in einer Studie über Nikotin- und Alkoholkonsum in Verbindung mit der Entwicklung einer Parkinson-Erkrankung nachgewiesen. Alkohol in Verbindung mit Nikotinkonsum zeigte einen superadditiven Effekt in männlichen Rauchern und weiblichen ehemaligen Raucherinnen<sup>71</sup>. Ein superadditiver Effekt der alkoholindizierten neuronalen Schäden durch chronischen Nikotinkonsum und hieraus resultierender, herabgesetzter Östrogenproduktion bei Frauen könnte eine Erklärung für die höhere Rate dieser Schäden bei Frauen im Vergleich zu Männern darstellen.

Wenngleich die in dieser Studie gezeigten statistisch signifikanten Unterschiede gering scheinen und somit eine biologische Relevanz nicht sicher belegt ist, unterstreichen diese Ergebnisse erneut die Wichtigkeit der geschlechtsspezifischen Betrachtung von Abhängigkeitserkrankungen. Zur Fragestellung eines superadditiven Effekts von chronischem Nikotinkonsum, vor allem bei weiblichen Individuen mit AUD, sollten weitere Untersuchungen erfolgen, insbesondere, da in unserer Kohorte keine nichtrauchenden Individuen beider Geschlechter in der AUD-Kohorte existierten, was für eine noch genauere Betrachtung der Effekte des Nikotinkonsums auf die epigenetische Regulation wünschenswert wäre.

## 5 Zusammenfassung

Alkoholbezogene Störungen stellen nach wie vor einen großen Teil des klinischen Alltags in verschiedenen medizinischen Bereichen dar und sind verantwortlich für negative soziale und medizinische Folgeerscheinungen.

Das GABAerge Neurotransmittersystem ist unter anderem für die Vermittlung der Wirkung von Alkohol während der akuten Intoxikation, aber auch die Entwicklung einer Abhängigkeit, Craving und Entzugerscheinungen verantwortlich. Alle diese Bereiche weisen geschlechtsspezifische Unterschiede auf.

Ziel dieser Arbeit war, die neurobiologischen Prozesse dahinter eingehender zu beleuchten. Es wurde zudem untersucht, ob ein peripher erreichbarer Marker identifiziert werden kann, der Rückschlüsse über alkoholassoziierte Veränderungen dieser Prozesse im zentralen Nervensystem geben könnte. Hierfür führten wir epigenetische Analysen des proximalen GABBR1-Promoters, ein Gen, das für die Untereinheit 1 des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors kodiert, durch. In einem post-mortem Kollektiv bestehend aus einer AUD-Kohorte aus 17 Individuen (13 männlich, 4 weiblich) und einer Kontroll-Kohorte aus 31 Individuen (21 männlich, 10 weiblich) wurde stereotaktisch Gewebe aus je sechs verschiedene Gehirnregionen und peripheres Blut gewonnen. Nach Bisulfit-Sequenzierung erfolgte eine Analyse der Methylierungsdaten des proximalen Promoters.

Es wurden signifikante und nahezu signifikante Veränderungen des CpG-4 des GABBR1-Gens bei männlichen Individuen der AUD-Kohorte im Vergleich zu männlichen Individuen der Kontroll-Kohorte in Gehirngewebe und Blut nachgewiesen. Passend zu bisherigen Forschungsergebnissen deutet dies auf eine Veränderung der Genregulation des GABBR1-Gens durch chronischen Alkoholkonsum hin.

In dieser Arbeit wurde nach bisherigem Stand erstmals eine geschlechtsspezifische Abhängigkeit der Regulation gezeigt. Dies kann ein Hinweis auf eine Toleranzentwicklung der Signalübertragung des Belohnungssystems durch chronischen Alkoholkonsum sein. Da CpG-4 sowohl in zentralnervösem Gewebe als auch im Blut gleichermaßen Veränderungen aufwies, könnte dieser Marker aus peripherem Gewebe Anhalt über Veränderungen im zentralen Nervensystem geben.

CpG-4 ist ein peripher beurteilbarer, geschlechtsspezifischer Marker für den Nachweis alkoholbezogener Veränderungen der Signalübertragung in Bereichen des Belohnungssystems, der in weiteren Untersuchungen beleuchtet werden sollte.

Weiterhin ergab eine MLM-Analyse der Daten Hinweise darauf, dass bei Frauen die Covariable Nikotinkonsum einen superadditiven Effekt auf die Wirkung des chronischen Alkoholkonsums auf die Methylierung des Genabschnittes zu haben scheint. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen damit die Notwendigkeit, sowohl die klinische Präsentation als auch die Diagnostik und Therapie der Alkoholbezogenen Störung unter einem geschlechtsspezifischen Gesichtspunkt zu betrachten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.S., et al. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17593–17598. [10.1073/pnas.0407921102](https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102).
2. Hirschfelder, G., and Trummer, M. (2016). *Bier: eine Geschichte von der Steinzeit bis heute* 1. Auflage. (Theiss, Konrad).
3. UNAIDS (2022). Global HIV statistics. 1–16. [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf).
4. WHO (2022). Global tuberculosis report 2021: supplementary material.
5. Loke, A. (World H.O. (2023). Diabetes. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
6. WHO (2018). Global status report on alcohol and health 2018 V. Poznyak and D. Rekve, eds. [10.1037/cou0000248](https://doi.org/10.1037/cou0000248).
7. WHO (2022). International Classification of Diseases. <https://www.who.int/standards/classifications/classification-of-diseases>.
8. Medizinprodukte, B. für A. und (2022). ICD-10-GM. <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2022/>.
9. AWMF-online (2020). S3-Leitlinie: Screening, Diagnose und Behandlung alkoholbezogener Störungen [10.1055/a-1404-4722](https://doi.org/10.1055/a-1404-4722).
10. WHO, and BfArM ICD-10 F10-F19. <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2022/block-f10-f19.htm>.
11. Batra, A., Müller, C.A., Mann, K., and Heinz, A. (2016). Abhängigkeit und schädlicher Gebrauch von Alkohol: Diagnostik und Behandlungsoptionen. *Dtsch. Arztebl. Int.* *113*, 301–310. [10.3238/arztebl.2016.0301](https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0301).
12. Thompson, W., Lande, G.R., and Kalapatapu, R.K. (2020). What are the DSM-5 criteria for Alcohol Use Disorder? <https://www.medscape.com/answers/285913-41535/what-are-the-dsm-5-criteria-for-alcohol-use-disorder#?form=fpf>.

13. Abuse, N.I. on A. (2021). Changes Disorder Terminology Alcohol Use Disorder: A Comparison Between DSM-IV and DSM-5. <https://www.niaaa.nih.gov/publications/brochures-and-fact-sheets/alcohol-use-disorder-comparison-between-dsm>.
14. Zakhari, S. (2006). Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res. Heal.* *29*, 245–254.
15. McBride, W.J., Li, T.K., Deitrich, R.A., Zimatkin, S., Smith, B.R., and Rodd-Henricks, Z.A. (2002). Involvement of acetaldehyde in alcohol addiction. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *26*, 114–119. [10.1111/j.1530-0277.2002.tb02439.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2002.tb02439.x).
16. Borràs, E., Coutelle, C., Rosell, A., Fernández-Muixi, F., Broch, M., Crosas, B., Hjelmqvist, L., Lorenzo, A., Gutiérrez, C., Santos, M., et al. (2000). Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in Europeans: The ADH2\*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH\*3. *Hepatology* *31*, 984–989. [10.1053/he.2000.5978](https://doi.org/10.1053/he.2000.5978).
17. Cooper, S., Robison, A.J., and Mazei-Robison, M.S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics* *14*, 687–697. [10.1007/s13311-017-0525-z](https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z).
18. Bouret, S.G., Draper, S.J., and Simerly, R.B. (2004). Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice. *J. Neurosci.* *24*, 2797–2805. [10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004).
19. Sapru, H.N. (2013). Role of the hypothalamic arcuate nucleus in cardiovascular regulation. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* *175*, 38–50. [10.1016/j.autneu.2012.10.016](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2012.10.016).
20. Berridge, K.C., Kringelbach, M.L., Arbor, A., and Hospital, W. (2016). Pleasure Systems of the Brain. *Neuron* *86*, 646–664. [10.1016/j.neuron.2015.02.018](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018).Pleasure.
21. Knierim, J.J. (2015). The hippocampus. *Curr. Biol.* *25*, R1116–R1121. [10.1016/j.cub.2015.10.049](https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049).
22. Paton, J.J., Belova, M.A., Morrison, S.E., and Salzman, C.D. (2008). <PatonSalzman Nature2006.pdf>. *Nature* *439*, 865–870.
23. LaLumiere, R.T. (2014). Optogenetic dissection of amygdala functioning. *Front. Behav. Neurosci.* *8*, 1–7. [10.3389/fnbeh.2014.00107](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00107).

24. Bonner, M.F., and Price, A.R. (2013). Where is the anterior temporal lobe and what does it do? *J. Neurosci.* *33*, 4213–4215. 10.1523/JNEUROSCI.0041-13.2013.
25. Peterson, D.C., Reddy, V., and Mayes, D.A. (2020). Neuroanatomy, Mammillary Bodies. *StatPearls*, 10.
26. Kirouac, G.J. (2021). The Paraventricular Nucleus of the Thalamus as an Integrating and Relay Node in the Brain Anxiety Network. *Front. Behav. Neurosci.* *15*, 1–14. 10.3389/fnbeh.2021.627633.
27. Kumar, S., Porcu, P., Werner, D.F., Matthews, D.B., Diaz-, J.L., Helfand, R.S., and Morrow, A.L. (2009). Ethanol : a Decade of Progress. *Psychopharmacology (Berl)*. *205*, 529–564. 10.1007/s00213-009-1562-z.The.
28. Sigel, E., and Steinmann, M.E. (2012). Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *J. Biol. Chem.* *287*, 40224–40231. 10.1074/jbc.R112.386664.
29. Heaney, C.F., and Kinney, J.W. (2016). Role of GABAB receptors in learning and memory and neurological disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *63*, 1–28. 10.1016/j.neubiorev.2016.01.007.
30. Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., and Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors. *Physiol. Rev.* *84*, 835–867. 10.1152/physrev.00036.2003.
31. Sanchez-Vives, M. V., Barbero-Castillo, A., Perez-Zabalza, M., and Reig, R. (2021). GABAB receptors: modulation of thalamocortical dynamics and synaptic plasticity. *Neuroscience* *456*, 131–142. 10.1016/j.neuroscience.2020.03.011.
32. Olsen, R.W. (2018). GABAA Receptor: Positive and Negative Allosteric Modulators HHS Public Access. *Neuropharmacology* *136*, 10–22. 10.1016/j.neuropharm.2018.01.036.GABA.
33. Celentano, J.J., Gibbs, T.T., and Farb, D.H. (1988). Ethanol potentiates GABA- and glycine-induced chloride currents in chick spinal cord neurons. *Brain Res.* *455*, 377–380. 10.1016/0006-8993(88)90098-4.
34. Federici, M., Nisticò, R., Giustizieri, M., Bernardi, G., and Mercuri, N.B. (2009). Ethanol enhances GABAB-mediated inhibitory postsynaptic transmission on rat midbrain dopaminergic neurons by facilitating GIRK currents. *Eur. J. Neurosci.* *29*, 1369–1377. 10.1111/j.1460-9568.2009.06700.x.

35. Koob, G.F. (2004). A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochem. Pharmacol.* *68*, 1515–1525. 10.1016/j.bcp.2004.07.031.
36. Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., and Spanagel, R. (2008). Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol.* *154*, 299–315. 10.1038/bjp.2008.30.
37. Charlton, M.E., Sweetnam, P.M., Fitzgerald, L.W., Terwilliger, R.Z., Nestler, E.J., and Duman, R.S. (1997). Chronic ethanol administration regulates the expression of GABA(A) receptor  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 5 subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. *J. Neurochem.* *68*, 121–127. 10.1046/j.1471-4159.1997.68010121.x.
38. Arora, D.S., Nimitvilai, S., Teppen, T.L., McElvain, M.A., Sakharkar, A.J., You, C., Pandey, S.C., and Brodie, M.S. (2013). Hyposensitivity to gamma-aminobutyric acid in the ventral tegmental area during alcohol withdrawal: Reversal by histone deacetylase inhibitors. *Neuropsychopharmacology* *38*, 1674–1684. 10.1038/npp.2013.65.
39. Keyes, K.M., Grant, B.F., and Hasin, D.S. (2008). Evidence for a closing gender gap in alcohol use, abuse, and dependence in the United States population. *Drug Alcohol Depend.* *93*, 21–29. 10.1016/j.drugalcdep.2007.08.017.
40. Erol, A., and Karpyak, V.M. (2015). Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. *Drug Alcohol Depend.* *156*, 1–13. 10.1016/j.drugalcdep.2015.08.023.
41. Gatta, E., Guidotti, A., Saudagar, V., Grayson, D.R., Aspesi, D., Pandey, S.C., and Pinna, G. (2021). Epigenetic Regulation of GABAergic Neurotransmission and Neurosteroid Biosynthesis in Alcohol Use Disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *24*, 130–141. 10.1093/ijnp/pyaa073.
42. Martin-Garcia, E., and Pallares, M. (2005). Effects of intrahippocampal nicotine and neurosteroid administration on withdrawal in voluntary and chronic alcohol-drinking rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *29*, 1654–1663. 10.1097/01.alc.0000179206.01621.4b.
43. Flores-Bonilla, A., and Richardson, H.N. (2019). Sex differences in the neurobiology of alcohol use disorder. *Alcohol Res. Curr. Rev.* *40*, 1–19. 10.35946/arcr.v40.2.04.

44. Vandegrift, B.J., You, C., Satta, R., Brodie, M.S., and Lasek, A.W. (2017). Estradiol increases the sensitivity of ventral tegmental area dopamine neurons to dopamine and ethanol. *PLoS One* *12*, 1–18. 10.1371/journal.pone.0187698.
45. Hildebrand, E.R., and Lasek, A.W. (2018). Estradiol enhances ethanol reward in female mice through activation of ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Horm. Behav.*, 159–164. 10.1016.
46. Schuckit, M.A. (2014). Recognition and Management of Withdrawal Delirium (Delirium Tremens). *N. Engl. J. Med.* *371*, 2109–2113. 10.1056/nejmra1407298.
47. Khan, A., Levy, P., DeHorn, S., Miller, W., and Compton, S. (2008). Predictors of mortality in patients with delirium tremens. *Acad. Emerg. Med.* *15*, 788–790. 10.1111/j.1553-2712.2008.00187.x.
48. Williams, D., and McBride, A.J. (1998). The drug treatment of alcohol withdrawal symptoms: A systematic review. *Alcohol Alcohol.* *33*, 103–115. 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008365.
49. DeBellis, R., Smith, B.S., Choi, S., and Malloy, M. (2005). Management of delirium tremens. *J. Intensive Care Med.* *20*, 164–173. 10.1177/0885066605275353.
50. Zornoza, T., Cano, M.J., Polache, A., and Granero, L. (2003). Pharmacology of Acamprosate: An Overview. *CNS Drug Rev.* *9*, 359–374. 10.1111/j.1527-3458.2003.tb00260.x.
51. Maisel, N.C., Blodgett, J.C., Wilbourne, P.L., Humphreys, K., and Finney, J.W. (2013). Meta-analysis of naltrexone and acamprosate for treating alcohol use disorders: When are these medications most helpful? *Addiction* *108*, 275–293. 10.1111/j.1360-0443.2012.04054.x.Meta-analysis.
52. Livertox (2020). LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury (Internet). Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012 2020th ed. (Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases).
53. KBV (Kassenärztliche Bundesvereinigung (2015). Wirkstoff AKTUELL. KBV 4. <https://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/WA/Archiv/Nalmefen.pdf>.
54. Agabio, R., Saulle, R., Rösner, S., and Minozzi, S. (2023). Baclofen for alcohol use disorder. *Cochrane Database Syst. Rev.* *2023*. 10.1002/14651858.CD012557.pub3.

55. Rhein, M., Hagemeier, L., Klintschar, M., Muschler, M., Bleich, S., and Frieling, H. (2015). DNA methylation results depend on DNA integrity-role of post mortem interval. *Front. Genet.* *6*, 1–7. 10.3389/fgene.2015.00182.
56. Korbie, D.J., and Mattick, J.S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* *3*, 1452–1456. 10.1038/nprot.2008.133.
57. Benjamini, Y., Krieger, A.M., and Yekutieli, D. (2006). Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika* *93*, 491–507. 10.1093/biomet/93.3.491.
58. Ahn, H.R., Baek, G.O., Yoon, M.G., Son, J.A., Yoon, J.H., Cheong, J.Y., Cho, H.J., Kang, H.C., Eun, J.W., and Kim, S.S. (2022). Hypomethylation-mediated upregulation of the WASF2 promoter region correlates with poor clinical outcomes in hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *41*, 1–18. 10.1186/s13046-022-02365-7.
59. Hamilton, P.J., and Nestler, E.J. (2019). Epigenetics and addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* *59*, 128–136. 10.1016/j.conb.2019.05.005.
60. Pandey, S.C., Kyzar, E.J., and Zhang, H. (2017). Epigenetic Basis of the Dark Side of Alcohol Addiction. *Neuropharmacology* *122*, 74–84.
61. Li, S.P., Moon, S.P., Guang, Z.J., Jong, H.K., Hye, L.L., Yu, L.L., Jin, H.K., Jong, Y.B., Tae, J.P., Phil, O.K., et al. (2005). Ethanol modulates GABAB receptor expression in cortex and hippocampus of the adult rat brain. *Brain Res.* *1061*, 27–35. 10.1016/j.brainres.2005.08.052.
62. Liu, C., Marioni, R.E., Hedman, A.K., Pfeiffer, L., Tsai, P.C., Reynolds, L.M., Just, A.C., Duan, Q., Boer, C.G., Tanaka, T., et al. (2018). A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. *Mol. Psychiatry* *23*, 422–433. 10.1038/mp.2016.192.
63. Peng, H., Geil Nickell, C.R., Chen, K.Y., McClain, J.A., and Nixon, K. (2017). Increased expression of M1 and M2 phenotypic markers in isolated microglia after four-day binge alcohol exposure in male rats. *Alcohol* *62*, 29–40. 10.1016/j.alcohol.2017.02.175.
64. Alfonso-Loeches, S., Pascual, M., and Guerri, C. (2013). Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology* *311*, 27–34. 10.1016/j.tox.2013.03.001.

65. Finn, D.A. (2019). The endocrine system and alcohol drinking in females. *Alcohol Res. Curr. Rev.* *40*, 1–20. 10.35946/arcv.v40.2.02.
66. Fox, H.C., Sofuoglu, M., Morgan, P.T., Tuit, K.L., and Sinha, R. (2013). The effects of exogenous progesterone on drug craving and stress arousal in cocaine dependence: Impact of gender and cue type. *Psychoneuroendocrinology* *38*, 1532–1544. 10.1016/j.psyneuen.2012.12.022.
67. Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M., et al. (2004). Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J. Neurosci.* *24*, 5913–5921. 10.1523/JNEUROSCI.5186-03.2004.
68. Liu, M., Oyarzabal, E.A., Yang, R., Murphy, S.J., and Hurn, P.D. (2008). A novel method for assessing sex-specific and genotype-specific response to injury in astrocyte culture. *J. Neurosci. Methods* *171*, 214–217.
69. Raval, A.P. (2011). Nicotine addiction causes unique detrimental effects on women’s brains. *J. Addict. Dis.* *30*, 149–158. 10.1080/10550887.2011.554782.
70. Joehanes, R., Just, A.C., Marioni, R.E., and Al., E. (2016). Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circ Cardiovasc Genet.* *9*, 436–447.
71. Kim, R., Yoo, D., Jung, Y.J., Han, K., and Lee, J.Y. (2020). Sex differences in smoking, alcohol consumption, and risk of Parkinson’s disease: A nationwide cohort study. *Park. Relat. Disord.* *71*, 60–65. 10.1016/j.parkreldis.2019.12.006.

## 7 Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Helge Frieling, für die Unterstützung und Begleitung durch Studium, Forschung, Promotion und Arbeit. Sein Vertrauen und seine Expertise ermöglichten es mir, die hier vorliegende Arbeit im Labor für Molekulare Neurowissenschaften anzufertigen. Für jede wissenschaftliche und klinische Frage hatte Herr Prof. Frieling immer ein offenes Ohr und eine Lösung. Einen großen Anteil meines bisherigen Erfahrungsschatzes verdanke ich ihm.

Ein weiterer Dank gilt meinem Chef, Herrn Prof. Dr. med. Stefan Bleich, dem Klinikdirektor der Klinik für Psychiatrie, Sozialpsychiatrie und Psychotherapie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. Mathias Rhein. Er hat mir von Grund auf die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens im Labor nahegebracht, mich motiviert und an das Projekt geglaubt. Auch bei Rückschlägen hat Mathias mir stets geholfen, das Ziel nie aus den Augen zu verlieren und bei Erfolgen konnten wir gemeinsam feiern. Ich denke nach wie vor gern an die Zeit im Labor und an die unersetzlichen Erfahrungen, die ich dort machen durfte.

Auch dem gesamten Team des Labors für Molekulare Neurowissenschaften möchte ich für die Hilfe und Unterstützung während meiner dortigen Zeit meinen Dank aussprechen. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Hannah Maier, für spannende Erlebnisse während der Forschung und für das Korrekturlesen.

Ich danke Dr. med. Frank Matschiner, der immer ein Vorbild für mich ist, für alle wertvollen Ratschläge und die Unterstützung auf meinem Weg.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, Bettina und Ulrich Meyer-Bockenkamp, die mir das Verwirklichen meiner Träume ermöglicht haben und immer für mich da sind.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen besten Freundinnen, Daniela Nissle, Laura Amagliani, Dr. med. Joana Moog, Svenja Thomas, Isabel Schenk und Dr. med. Francesca Borlak für die gemeinsamen Erlebnisse, und für alle, die noch kommen.

Zuletzt danke ich Bastian Pritsch, für die Unterstützung, und für alles Schöne bisher und in Zukunft.

## 9 Anhang

*Alcohol and Alcoholism*, 2023, 58(3), 308–314  
<https://doi.org/10.1093/alcal/agad022>  
Advance access publication date 11 April 2023  
Article



## Cytosine methylation in GABA B1 receptor identifies alcohol-related changes for men in blood and brain tissues

Fiona Meyer-Bockenamp<sup>1,\*</sup>, Phileas J. Proskynitopoulos<sup>1</sup>, Alexander Glahn<sup>1</sup>, Marc Muschler<sup>1</sup>, Lars Hagemeyer<sup>2</sup>, Vanessa Preuss<sup>2</sup>, Michael Klintschar<sup>2</sup>, Johannes Achenbach<sup>3</sup>, Helge Frieling<sup>1</sup>, Mathias Rhein<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychiatry, Social Psychiatry and Psychotherapy, Hannover Medical School, Carl-Neuberg Str. 1, 30625 Hannover, Germany

<sup>2</sup>Institute of Legal Medicine, Hannover Medical School, Carl-Neuberg Str. 1, 30625 Hannover, Germany

<sup>3</sup>Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Pain Clinic, KRH Hannover Nordstadt, Haltenhoffstraße 41, 30167 Hannover, Germany

\*Corresponding author: Department of Psychiatry, Social Psychiatry and Psychotherapy, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Straße 1, Hannover 30625, Germany. E-mail: meyer-bockenamp.fiona@mh-hannover.de; Tel. +49176 811 588 94

### Abstract

**Aims:** Alcohol use alters the reward signaling processes contributing to the development of addiction. We studied the effects of alcohol use disorder (AUD) on brain regions and blood of deceased women and men to examine sex-dependent differences in epigenetic changes associated with AUD. We investigated the effects of alcohol use on the gene promoter methylation of GABBR1 coding for GABA<sub>B</sub> receptor subunit 1 in blood and brain. **Methods:** We chose six brain regions associated with addiction and the reward pathway (nucleus arcuatus, nucleus accumbens, the mammillary bodies, amygdala, hippocampus and anterior temporal cortex) and performed epigenetic profiling of the proximal promoter of the GABBR1 gene of post-mortem brain and blood samples of 17 individuals with AUD pathology (4 female, 13 male) and 31 healthy controls (10 female, 21 male). **Results:** Our results show sex-specific effects of AUD on GABBR1 promoter methylation. Especially, CpG -4 showed significant tissue-independent changes and significantly decreased methylation levels for the AUD group in the amygdala and the mammillary bodies of men. We saw prominent and consistent change in CpG-4 across all investigated tissues. For women, no significant loci were observed. **Conclusion:** We found sex-dependent differences in GABBR1 promoter methylation in relation to AUD. CpG-4 hypomethylation in male individuals with AUD is consistent for most brain regions. Blood shows similar results without reaching significance, potentially serving as a peripheral marker for addiction-associated neuronal adaptations. Further research is needed to discover more contributing factors in the pathological alterations of alcohol addiction to offer sex-specific biomarkers and treatment.

**Keywords:** addiction; alcohol dependence; biomarker; brain; epigenetic; GABA receptor B

### Introduction

Alcohol use disorder (AUD) is the seventh leading risk factor for deaths and disability-adjusted life-years globally. In Germany, the prevalence of alcohol dependence as defined by the international classification of diseases (ICD-10) is higher in men (5.0%) than in women (2.0% (WHO, 2018)), indicating important sex-related differences in AUD. Although women are more likely to be lifetime abstainers and develop fewer alcohol withdrawal symptoms, they develop more medical complications, such as alcohol-attributable cardiovascular diseases or diabetes. They also have a greater risk of developing severe alcoholic liver problems than men (Erol and Karpyak, 2015). Studies on neurosteroid levels and sex-related differences in neurometabolism strongly suggest sex-dependent differences in addiction neurobiology. Additionally, sex-related differences in body water, alcohol resorption and first-pass rates add to the different presentation of alcohol intoxication and AUD in women and men (Lancaster, 1994).

Early life stress is often associated with the development of AUD. Parental alcoholism and adverse childhood experiences have been linked to the development of AUD in their children as well (Anda et al., 2002). A polymorphism in the GABA<sub>A</sub> receptor has been associated with the development of AUD and lesser sensitivity to the effects of alcohol in the offspring of patients suffering from AUD (Schuckit et al., 1999; Iwata et al., 1999), highlighting the multifactorial genesis of AUD consisting of genetic predisposition and additional environmental factors such as traumatic life events or early life stress.

GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the human brain (Petroff, 2002). In brain regions associated with learning and addiction, GABAergic activity has been connected to neuronal plasticity, learning and memory (Nishiyama et al., 2010). GABA acts as a neurotransmitter on GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. GABA<sub>A</sub> receptors are pentameric ligand-gated ion channels typically found as heteromeric channels assembled from various subunits. GABA<sub>B</sub> receptors are heterodimer G-protein-coupled receptors consisting of two subunits (Sigel and Steinmann, 2012). Especially, the GABA<sub>A</sub>

Received: December 14, 2022. Revised: March 11, 2023. Accepted: March 15, 2023

© The Author(s) 2023. Medical Council on Alcohol and Oxford University Press. All rights reserved.

receptor isoform has been associated with the acute and chronic effects of ethanol, such as anxiolytic, sedative-hypnotic and anticonvulsant effects, as well as mediating motor incoordination (Kumar *et al.*, 2009).

Alcohol acts directly on GABA receptors, which enhances their inhibitory effect (Charlton *et al.*, 1997). Repeated alcohol administration has been shown to lessen the sensitivity of neurons in the ventral tegmental area (VTA) to GABA. Furthermore, genetic and epigenetic changes in neurometabolism due to chronic alcohol exposure have been discovered, ultimately leading to an altered GABA metabolism, such as a higher baseline activity of GABA neurons (Arora *et al.*, 2013). The GABA<sub>B</sub> receptor remains lesser examined. It plays a role in learning, memory and neuronal plasticity and has been associated with addiction (Heaney and Kinney, 2016). A single nucleotide polymorphism (SNP) in the Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 1 (GABBR 1) gene, rs29220, has been associated with AUD in three independent populations (Enoch, 2013).

Due to the observed alterations in addiction neurobiology and metabolism, research on biomarkers for alcohol consumption, AUD and recovery has been conducted. An increased expression of proinflammatory microglia/macrophages (M1) and growth-promoting microglia/macrophages (M2) after binge drinking has been observed, which normalised after 4 days (Peng *et al.*, 2017), indicating reversible neurobiological changes induced by excessive alcohol consumption. Changes in neurosteroid levels due to alcohol consumption highlighted a sexual dimorphism. The hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis are important stress response pathways and mediate sexual function. Sex-dependent changes in various HPA- and HPG-associated hormone levels due to alcohol consumption have been shown. These changes also influence the central nervous gamma-aminobutyric acid A (GABA<sub>A</sub>) metabolism (Finn, 2019).

Furthermore, a connection between GABA metabolism and immune functions, such as lymphocyte activation, has been discovered in a large epigenomic study in the context of alcohol. Intronic CpGs of both GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor genes (GABRD and GABBR1) have been associated with transcripts involved in immune response (Liu *et al.*, 2018).

Ethanol has an enhancing effect on synaptic responses of GABA<sub>B</sub>-receptors (Federici *et al.*, 2009), GABA<sub>B</sub>-receptor associated changes have been linked to changes occurring during active chronic alcohol use (Liu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2005). Genetic and epigenetic changes of GABA<sub>A</sub>-receptor have already been linked to the development of AUD, but GABA<sub>B</sub>-receptor-associated changes have not (yet).

To further elucidate the role of GABA<sub>B</sub>-receptor metabolism and possible sex-related differences in the context of AUD, we chose to examine epigenetic changes in GABBR1 promoter methylation in individuals with AUD. To determine the accessibility and relevance of GABBR1 methylation changes as possible state or trait markers in further clinical studies, we compared findings in post-mortem central nervous tissue with peripheral tissue. This also is the first time that the functional relevance of the proximal promoter region of the GABBR1 gene is investigated in the context of AUD.

We collected tissue samples of the nucleus arcuatus, nucleus accumbens, mamillary bodies, amygdala, hippocampus and the anterior temporal cortex/anterior temporal lobe (ATC/ATL) due to their involvement in learning, reward and

conditioning. To compare findings in central nervous system tissue with accessible peripheral tissue, blood samples were collected by cardiac puncture.

We performed a post-mortem epigenetic profiling of the proximal promoter of GABBR1 in different brain regions and blood samples of 17 individuals with AUD and 31 controls. Following previous work concerning the regulation of GABBR1 in addiction, we hypothesised that parts of the GABBR1 promoter might show significant, possibly sex-dependent, differences between individuals with alcohol use disorder when compared with healthy controls while being similar across blood and brain tissues.

## Materials and methods

We collected post-mortem human brain and blood samples in cooperation with the department of legal medicine at Hannover Medical School, Germany. Samples of six different brain regions (nucleus arcuatus, nucleus accumbens, mamillary bodies, amygdala, hippocampus and the anterior temporal cortex/anterior temporal lobe (ATC/ATL)) were extracted using stereotactic measurements. Blood samples were collected as well by cardiac puncture, all samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The function of the arcuate nucleus is based on its diversity of neurons, but its central role is involved in homeostasis, mediating many physiological functions such as feeding, metabolism, fertility and cardiovascular regulation (Bouret *et al.*, 2004) (Sapru, 2013). The nucleus accumbens plays a significant role in the cognitive processing of motivation, aversion, reward (i.e. incentive salience, pleasure and positive reinforcement) and reinforcement learning, therefore being essential in the pathophysiology of addiction and emotions (Berridge *et al.*, 2016; Salgado and Kaplitt, 2015). The amygdala is part of the limbic system and plays a role in memory, reward, positive conditioning, decision making and emotional responses such as fear, anxiety, or aggression (Paton *et al.*, 2008; LaLumiere, 2014). The hippocampus is essential in consolidating short- to long-term memory and is also associated with decision-making (Knierim, 2015; Ito and Lee, 2016). The ATC/ATL is associated with semantic memory, the mamillary bodies with recollective memory (Bonner and Price, 2013; Peterson *et al.*, 2020).

We used an autopsy questionnaire assessing the post-mortem interval (PMI), age, diagnosis, smoker status, other clinical diagnoses, the cause of death, marital status, medication and medical treatment shortly before death, where available.

The AUD cohort showed the following demographics: 13 male, 4 female, 51.82 mean age. The control group showed the following demographics: 21 male, 10 female, 55.84 years mean age. Age was not normally distributed within the cohort (data not shown). The mean age in the control group was 49.15 years, and in the disease group, it was 54.5 years (see Table 1).

As a high PMI is linked to an increased variance in methylation (Rhein *et al.*, 2015), we selected tissue from specimens below the threshold of 72 h and excluded higher PMI for the analysis. One additional exclusion criterion was unclear alcohol dependence pathology, which was assessed post-mortem by the typical liver and brain alterations associated with chronic alcohol use during the autopsy (liver cirrhosis, pancreas necrosis, cerebellar atrophy). In addition, the police

**Table 1.** Study demographics

Sex	Group	Age (y)		PMI (h)		tissue (N)						
		Mean	SD	Mean	SD	blood	Nar	NACC	AMY	Mam	ATC	HIP
men	Control	49	20	45	14	20	20	19	20	21	20	21
	Alcohol	55	17	38	22	13	15	15	14	15	15	11
women	Control	68	19	46	15	12	8	10	10	12	11	11
	Alcohol	48	10	33	22	4	4	4	4	4	3	4

Tissue availability, age and post-mortem interval (PMI) are displayed per gender and cohort (Control or Alcohol) team.

**Table 2.** Primer sequences

hGABBR1-F2	AATATAAAATTTAGTTAGTTATGGTGGTG	29 bp
hGABBR1-R1	ATCTACCTCATTAACAATCCCTATC	25 bp

Primers were used for one touchdown PCR and generated a product of 213 readable bases that include the proximal promoter and a part of Exon 1.

report was scanned for accumulated alcohol bottles at the site of death. Five specimens had to be excluded from the analysis based on these criteria (four in the alcohol cohort and one in the control cohort), resulting in the case numbers mentioned above.

#### DNA purification and modification

To purify DNA from the collected brain tissues, we used tissue lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) in combination with Teflon pistils and pipetting of the resulting crude lysate several times with 200  $\mu$ l tips to further homogenise the tissue. Lysates were further purified by the NucleoMag DNA purification kit (Macherey&Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer protocol, using an NxP liquid handling platform (Beckman Coulter, Brea, USA).

Bisulfite modification was performed using the Epitect 96 kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer protocol followed by DNA storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  until measurement.

We designed primers to characterise the immediate proximal promoter of GABBR1 (see Table 2) using the NetPrimer web service (Premier Biosoft, <http://www.premierbiosoft.com>, accessed on 26 July 2021).

After applying the primers in a touchdown PCR (Korbic and Mattick, 2008), we purified the resulting amplicons on the NxP liquid handling platform (Beckman Coulter, Brea, USA) and performed a sequencing PCR using the BigDye 3.1 chemistry (ABI Life Technologies, Grand Island, USA) and following the manufacturer recommendations for the sequencing PCR. Sequencing was performed on a 3750xl 24 capillary sequencer (ABI Life Technologies, Grand Island, USA).

The resulting sequences were processed using the Epigenetic Sequence Methylation Software package (Lewin et al., 2004). The resulting methylation values for each Cytosine Guanine dinucleotide (CpG) were validated for at least 95% integrity per CpG position and tissue. All sequences not meeting these criteria were excluded.

#### In silico transcription factor prediction

Using an in-silico prediction database consisting of ChipSeq data for binding affinities of transcription factors ([www.factobook.org](http://www.factobook.org)), we identified three likely binding factors involved with alcohol-dependent GABBR1 regulation at C-4. As most

transcription factors have a binding motif of 4–10 bases, we used the CG dinucleotide of interest and included 4 bases on every side.

#### Statistical analysis

Statistical calculations and data illustration were performed using the Statistical Package for the Social Sciences Version 27 (SPSS, IBM, Armonk, NY) as well as GraphPad Prism for Mac Version 9 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA). The methylation data are normally distributed according to the Kolmogorov–Smirnov test of normality with Lilliefors correction and a visual inspection of the distribution in a histogram (see Fig. S1).

Mean methylation differences between tissues for each sex within different groups were assessed using a one-way ANOVA with Tukey's correction for multiple testing. Differences between alcohol and control groups for single CpG positions were assessed using a two-sided t-test for independent samples. Adjustment for multiple comparisons was made using the two-stage step-up method by Benjamini, Krieger and Yekutieli with a false discovery rate (FDR) of 4% (Benjamini et al., 2006). A higher FDR of up to 10% did not result in more findings as the difference of other significantly different CpG positions was not substantial enough (biologically irrelevant, technical error). Equality of variance was determined using Levene's test. Results in figures are given as mean and standard error of the means (SEM) unless stated otherwise.

#### Results

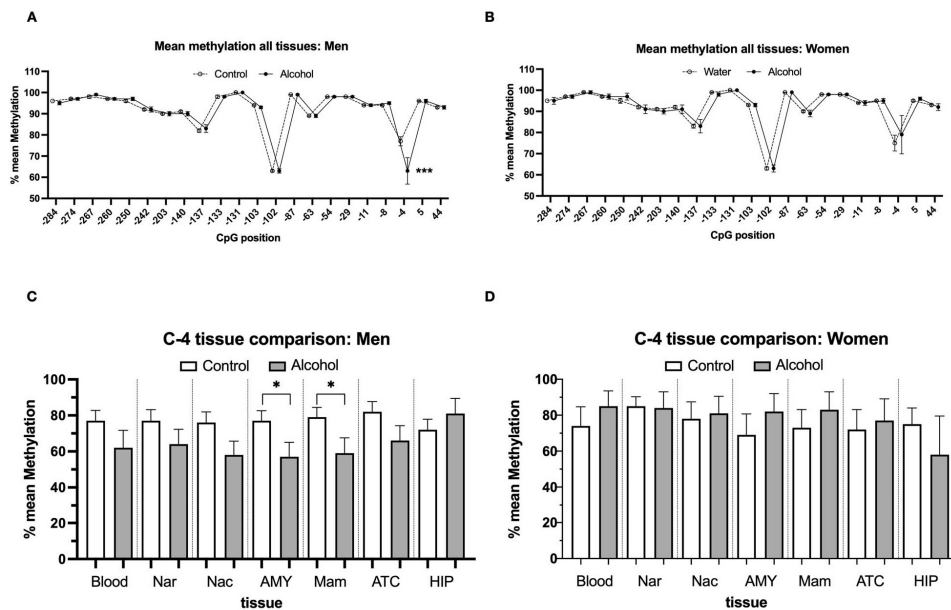
##### GABBR1 mean methylation in men and women

We observed no overall difference in mean methylation between alcohol and control specimens for both sexes (data not shown).

Between tissues, men with AUD showed significant changes in the mean methylation of blood and nucleus accumbens ( $F(6) = 4.129$ ,  $P_{\text{corr}} = 0.030$ ), as well as blood and mamillary bodies ( $F(6) = 4.129$ ,  $P_{\text{corr}} = 0.044$ ). The hippocampal mean methylation showed significant hypermethylation compared to nucleus arcuatus ( $F(6) = 4.129$ ,  $P_{\text{corr}} = 0.050$ ), mamillary bodies ( $F(6) = 4.129$ ,  $P_{\text{corr}} = 0.009$ ) and nucleus accumbens ( $F(6) = 4.129$ ,  $P_{\text{corr}} = 0.006$ ). Male Controls only showed significant alterations between hippocampus and mamillary bodies ( $F(6) = 3.148$ ,  $P_{\text{corr}} = 0.032$ ). In women, no significant changes between group means were observed.

##### Specific methylation for loci of the GABBR1 promoter fragment

Concerning methylation at specific loci, we found sex-dependent differences between alcohol users and controls



**Figure 1.** CpG-4 methylation in men and women. Single CpG methylation plots for men (A) and women (B) without tissue separation. (\*\*\* $P < 0.001$ ). Tissue-specific display of C-4 for men (A) and women (B) across the assessed brain tissues and blood. Nacc: nucleus accumbens; Nar: nucleus arcuatus; Mam: mammillary bodies; SEM:  $\pm 1$  standard error of the mean.

on several CpGs. All numbers for the individual positions are in relation to the genomic transcription start site of the human GABBR1 gene located on Chromosome 6 (Ensembl # GRCh38:6:29555629).

Separating the groups by sex and looking at all tissues together, CpG-4 was significantly hypomethylated in men with AUD ( $t(178.33) = 3.668$ ,  $P < 0.001$ ), but not in women (see Fig. 1A, B). We saw significantly altered methylation levels in AUD men vs. control group on CpG-260 in blood ( $t(31) = 2.082$ ,  $P = 0.046$ ), CpG-242 in the amygdala ( $t(32) = 2.324$ ,  $P = 0.027$ ) and ATC ( $t(32) = -2.192$ ,  $P = 0.036$ ), CpG-4 in the amygdala ( $t(32) = 2.158$ ,  $P = 0.039$ ), and mammillary bodies ( $t(33) = 2.103$ ,  $P = 0.043$ ), CpG-250 in the mammillary bodies ( $t(34) = -2.095$ ,  $P = 0.044$ ), CpG-267 in the ATC ( $t(24,558) = -2.235$ ,  $P = 0.032$ ) and CpG-8 in the hippocampus ( $t(30) = -2.142$ ,  $P = 0.040$ ). Women showed significant alterations in CpG-29 in blood ( $t(14) = 2.163$ ,  $P = 0.007$ ), and CpG-140 in the hippocampus ( $t(11,994) = 2.439$ ,  $P = 0.031$ ) (see Fig. S2).

While the CpG-4 remained significant after correction for multiple measurements, all other significant differences from CpG sites in individual organs did not survive correction.

CpG-4 methylation did not differ across tissues for men and women (one way ANOVA, men:  $F(6) = 0.276$ ,  $P = 0.948$ ; women:  $F(6) = 0.337$ ,  $P = 0.916$ ; see Fig. 1C, D).

Transcription factor prediction results for CpG-4 showed potentially relevant transcription factors to consider. One of the most prominent factors, YY2, is mostly unknown and characterised as displaying both positive and negative regulatory effects depending on several cofactors (Klar and Bode, 2005) (see Supplementary Table S1).

## Discussion

### Mean methylation of CpG -4 is significantly altered in male individuals with AUD

GABA and its receptors are deeply integrated into the reward system and involved with the regulation of drug abuse. The activation of presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors results in a repression of GABA release on both inhibitory and excitatory synapses through Ca<sup>2+</sup> influx (Bettler *et al.*, 2004). Post-synaptic GABA<sub>B</sub> receptors induce hyperpolarisation through the activation of K<sup>+</sup> channels. They modulate thalamic rhythm as well as cortical oscillations, influencing consciousness, learning and emotions (Sanchez-Vives *et al.*, 2021).

The drug in question, Ethanol, is a positive allosteric modulator of GABA receptors (Olsen, 2018), potentiating GABA<sub>A</sub> (Celentano *et al.*, 1988) as well as GABA<sub>B</sub>-induced post-synaptic responses (Federici *et al.*, 2009).

In our collective, we found sex-dependent differences between individuals with AUD and controls in the methylation pattern of the proximal GABBR1 promoter in blood and several brain regions.

CpG-4 shows hypomethylation for AUD men in most tissues, except for the hippocampus. Restricted cohort sizes most likely prevented values from reaching statistical significance in every instance (for comparison, see Fig. S2).

In agreement with this finding, Li *et al.* showed that ethanol administration increased expression of GABAB1 receptor subunit in the brain cortex but not the hippocampus, whereas GABAB2 receptor subunit levels were increased in both cortex and hippocampus. The effects were partially reversed

by GABA receptor agonist baclofen (Li et al., 2005). This supports our findings that methylation in hippocampal tissue differed from the other brain regions in this study. In contrast to our findings, Enoch et al. showed a robust downregulation of GABBR1 in post-mortem hippocampal tissue of individuals with AUD or cocaine addiction as well as alcohol-preferring rats (Enoch et al., 2012), which might be due to the different detection techniques, as this study observed quantified mRNA transcripts using RNA-Seq rather than changes in methylation.

While transcription factor analysis did not yield a conclusive direction of regulation, hypomethylation usually leads to an activation of transcription, resulting in more GABBR1 transcripts and proteins (Ahn et al., 2022). Consequently, the inhibitory pre- and post-synaptic effects mentioned earlier appear to be increased in AUD specimens, leading to attenuation of signaling and habituation of the reward circuitry according to current models of addiction (Cooper et al., 2017; Hamilton and Nestler, 2019).

Supporting our findings of hypomethylation of the GABBR1 gene in relation to heavy alcohol use, Liu et al. also observed decreased methylation levels in association with increased alcohol intake in CpG cg 09577455, an intronic locus of GABBR1 while CpG cs04781796, an intronic locus of the *GABRD* gene (coding for GABA<sub>A</sub> receptor), showed increased methylation (Liu et al., 2018). Pandey et al. reported an association of epigenomic changes with habituation of neuronal signaling during chronic alcohol exposure and development of anxiety-like behavior during withdrawal (Pandey et al., 2017).

In agreement with this, Finn et al. found alcohol-related methylation changes associated with methylation in whole blood in a large epigenomic cohort. Additionally, the association of changes in GABBR1 and GABRD methylation with immune response and immune function points toward a potential cross-talk between the nervous and immune systems that, according to our study, might differ between males and females. This is in line with sexual dimorphism of changes in HPA and HGA hormonal levels as well as neurosteroid levels due to alcohol consumption (Finn, 2019).

Although mean methylation of the whole promoter fragment was not significantly different between blood and all brain regions, CpG -4 alone showed consistency across all tissues for group comparison. There is no tissue-specific difference between brain tissue and blood, making CpG -4 a potentially interesting target as an accessible biomarker: CpG -4 promoter hypomethylation could indicate an altered expression of GABA<sub>B1</sub> subunit in the central nervous system, serving as a potential indicator of reward cycle repression and development of tolerance and dose increase due to chronic heavy alcohol use. Of course, these hypotheses must be thoroughly reproduced and confirmed in upcoming clinical studies.

DNA methylation changes due to heavy alcohol use might revert after several years of abstinence (Liu et al., 2018), making biomarkers such as CpG-4 possible indicators of current heavy alcohol use, severity of addiction and development of tolerance.

Our targeted approaches now indicate potentially altered GABBR1 regulation through methylation in the brain, and potentially also blood, in the context of alcohol consumption, thereby complementing the previous findings and extending

the importance from blood to brain regions involved with addiction.

### GABBR1 methylation in females

Females showed no significant alterations in the methylation of the GABBR1 promoter. Unlike our findings in male patients with AUD, we found no CpG that showed consistent change over multiple tissues. Alcohol abuse in women differs in psychological and physiological parameters, potentially leading to greater variance that makes investigating group differences difficult.

As administering progesterone significantly decreased cue-induced craving and cortisol responses during cocaine withdrawal, women that received the progesterone treatment also reported lower ratings of negative emotions and increased relaxed mood after stress exposure (Fox et al., 2013). Allopregnanolone, a neurosteroid metabolite of progesterone, decreased cocaine-primed reinstatement in female rats, indicating a sex-dependent difference in craving and its possible treatment options (Anker et al., 2009). Allopregnanolone acts as a positive allosteric modulator on GABA<sub>A</sub> receptors, thus influencing the GABAergic signaling (Belelli et al., 2009). These experimental findings further indicate a sex-dependent difference in regulating and modulating GABAergic signaling in addiction neurobiology.

### Limitations of the study

As it is difficult to find suitable specimens, our cohort is restricted in sample size. A post-mortem analysis enables us to study epigenetic or genetic changes in human brain matter, especially in different brain regions. To observe differences between brain regions and to see how they might correlate with changes in more accessible tissues like blood, more post-mortem studies will be needed. While we carefully included only specimens with clear indications of AUD (pathological changes in pancreas, liver and brain, assisted by additional information on alcohol use in the police report), we have no data on alcohol consumption in terms of duration and severity of the AUD. As it is difficult to deduce a diagnosis of alcohol dependence through the available information, the diagnosis of AUD better characterises the cohort that showed harmful alcohol use.

Of note, due to the higher prevalence of alcohol dependence in men, our cohort reflected this bias, as the female alcohol group was considerably smaller than the male. The results obtained, however, are not suggesting that a higher number of specimens, possibly reducing the variance, would have resulted in a comparable result in women as CpG-4 in men (see Fig. Fig. 1B). Setting the *Q* value of the FDR correction up to 20% reveals more significant positions in men and women, but the biological importance for all other positions remains a below 3% change, which makes biological relevance questionable.

It is also unknown to which extent death alters the epigenetic profile, which means our findings might differ from in vivo conditions. While this factor cannot be ultimately neglected, we tested for the influence of different death causes and did not observe a difference (data not shown).

The relevance of the transcription factors considered is unclear as there is no confirmatory analysis due to the increased variance in protein levels caused by cellular degradation in all tissues. More studies about the specific

Meyer-Bockenamp *et al.*

313

effects of transcription factors on gene expression in relation to GABBR1 are needed to further elucidate the regulatory effects of epigenetic changes.

While the different PMI does not alter epigenetic effects on the level of methylation below 72 h (Rhein *et al.*, 2015), the effect on proteins and mRNA is expected to be much more detrimental, thereby preventing us from comparing protein expression and transcription of GABBR1 in blood and brain tissue of this collective.

### Conclusion

We observed prominent and consistent sex-specific changes in the methylation of CpG -4 of the proximal GABBR1 promoter. In males with AUD, methylation was significantly altered in the amygdala and mamillary bodies, while restricted cohort sizes may have prevented other tissue from reaching significance. CpG -4 methylation is consistent between blood and brain in men, indicating potential tissue-overarching hypomethylation in male individuals with AUD.

Questions to further elucidate are the development of CpG -4 methylation during abstinence, in vivo- studies of CpG -4 methylation in blood samples to examine the possibility of CpG -4 as a blood marker in men, and studies on the effect of GABA in different pathologies of AUD such as psychosocial factors or correlations with other molecular variables.

Our results show a sex-dependent altered methylation pattern that can serve as a basis for future research to better understand the neurobiology of addiction and possibly develop sex-specific markers. As medicine evolves, the concept of a holistic approach that considers physical and socio-cultural factors gains popularity. Our findings support that there is no one-size-fits-all approach to alcohol use disorder and that sex-related factors play a role in disease neurobiology and possibly in the treatment of alcoholism.

### Author contributions

H.F., M.K. and M.R. planned and carried out the study, V.P. and L.H. collected the samples. F.M.B. and M.R. generated the methylation data; F.M.B., P.J.P. and M.R. analyzed the data; M.R., F.M.B., J.A., P.J.P. wrote the manuscript; A.G., M.R., F.M.B., M.M., H.F., P.J.P., J.A., M.K., L.H., V.P. critically revised and contributed to the manuscript.

### Supplementary material

Supplementary material is available at *Alcohol and Alcoholism* online.

### Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Funding

This study was completely funded from department funds.

### Data availability

The data that support the findings of this study will be available from the Hannover Medical School repository when the manuscript is accepted.

### References

- Ahn HR, Baek GO, Yoon MG *et al.* Hypomethylation-mediated upregulation of the WASF2 promoter region correlates with poor clinical outcomes in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2022;41:1–18. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02365-7>.
- Anda RF, Whitfield CL, Felitti VJ *et al.* Adverse childhood experiences, alcoholic parents, and later risk of alcoholism and depression. *Psychiatr Serv* 2002;53:1001–9. <https://doi.org/10.1176/appi.ps.53.8.1001>.
- Anker JJ, Holtz NA, Zlebnik N *et al.* Effects of allopregnanolone on the reinstatement of cocaine-seeking behavior in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;203:63–72. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1371-9>.
- Arora DS, Nimitvilai S, Teppen TL *et al.* Hyposensitivity to gamma-aminobutyric acid in the ventral tegmental area during alcohol withdrawal: reversal by histone deacetylase inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 2013;38:1674–84. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.65>.
- Bellelli D, Harrison NL, Maguire J *et al.* Extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci* 2009;29:12757–63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3340-09.2009>.
- Benjamini Y, Krieger AM, Yekutieli D. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika* 2006;93:491–507. <https://doi.org/10.1093/biomet/93.3.491>.
- Berridge KC, Kringelbach ML, Arbor A *et al.* Pleasure systems of the brain. *Neuron* 2016;86:646–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018>.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J *et al.* Molecular structure and physiological functions of GABA<sub>B</sub> receptors. *Physiol Rev* 2004;84:835–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2003>.
- Bonner MF, Price AR. Where is the anterior temporal lobe and what does it do? *J Neurosci* 2013;33:4213–5. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0041-13.2013>.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci* 2004;24:2797–805. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004>.
- Celentano JJ, Gibbs TT, Farb DH. Ethanol potentiates GABA- and glycine-induced chloride currents in chick spinal cord neurons. *Brain Res* 1988;455:377–80. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90098-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90098-4).
- Charlton ME, Sweetnam PM, Fitzgerald LW *et al.* Chronic ethanol administration regulates the expression of GABA(A) receptor  $\alpha 1$  and  $\alpha 5$  subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. *J Neurochem* 1997;68:121–7. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68010121.x>.
- Cooper S, Robison AJ, Mazei-Robison MS. Reward circuitry in addiction. *Neurotherapeutics* 2017;14:687–97. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>.
- Enoch MA. Genetic influences on the development of alcoholism. *Curr Psychiatry Rep* 2013;15:412. <https://doi.org/10.1007/s11920-013-0412-1>.
- Enoch MA, Zhou Z, Kimura M *et al.* GABAergic gene expression in postmortem hippocampus from alcoholics and cocaine addicts; corresponding findings in alcohol-naïve P and NP rats. *PLoS One* 2012;7:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029369>.
- Erol A, Karpyak VM. Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: contemporary knowledge and future research considerations. *Drug Alcohol Depend* 2015;156:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.08.023>.

- Federici M, Nisticò R, Giustizieri M *et al.* Ethanol enhances GABAB-mediated inhibitory postsynaptic transmission on rat midbrain dopaminergic neurons by facilitating GIRK currents. *Eur J Neurosci* 2009;29:1369–77. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06700.x>.
- Finn DA. The endocrine system and alcohol drinking in females. *Alcohol Res Curr Rev* 2019;40:1–20.
- Fox HC, Sofuoglu M, Morgan PT *et al.* The effects of exogenous progesterone on drug craving and stress arousal in cocaine dependence: impact of gender and cue type. *Psychoneuroendocrinology* 2013;38:1532–44. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.12.022>.
- Hamilton PJ, Nestler EJ. Epigenetics and addiction. *Curr Opin Neurobiol* 2019;59:128–36. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.05.005>.
- Heaney CF, Kinney JW. Role of GABAB receptors in learning and memory and neurological disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2016;63:1–28. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.01.007>.
- Ito R, Lee ACH. The role of the hippocampus in approach-avoidance conflict decision-making: evidence from rodent and human studies. *Behav Brain Res* 2016;313:345–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.039>.
- Iwata N, Cowley DS, Radel M *et al.* Relationship between a GABA $\alpha$ 6 Pro385Ser substitution and benzodiazepine sensitivity. *Am J Psychiatry* 1999;156:1447–9. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.9.1447>.
- Klar M, Bode J. Enhanceosome formation over the Beta interferon promoter underlies a remote-control mechanism mediated by YY1 and YY2. *Mol Cell Biol* 2005;25:10159–70. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.10159-10170.2005>.
- Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol* 2015;25:R1116–21. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>.
- Korbic DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008;3:1452–6. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>.
- Kumar S, Porcu P, Werner DF *et al.* Ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;205:529–64. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1562-z>.
- LaLumiere RT. Optogenetic dissection of amygdala functioning. *Front Behav Neurosci* 2014;8:1–7.
- Lancaster FE. Gender differences in the brain: implications for the study of human alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:740–6. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1994.tb00940.x>.
- Lewin J, Schmitt AO, Adorján P *et al.* Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics* 2004;20:3005–12. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth346>.
- Li SP, Moon SP, Guang ZJ *et al.* Ethanol modulates GABAB receptor expression in cortex and hippocampus of the adult rat brain. *Brain Res* 2005;1061:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.08.052>.
- Liu C, Marioni RE, Hedman AK *et al.* A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. *Mol Psychiatry* 2018;23:422–33. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.192>.
- Nishiyama M, Togashi K, Aihara T *et al.* GABAergic activities control spike timing- and frequency-dependent long-term depression at hippocampal excitatory synapses. *Front Synaptic Neurosci* 2010;2:1–15. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00022>.
- Olsen RW. GABAA receptor: positive and negative allosteric modulators HHS public access. *Neuropharmacology* 2018;136:10–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.036>.
- Pandey SC, Kyzar EJ, Zhang H. Epigenetic basis of the dark side of alcohol addiction. *Neuropharmacology* 2017;122:74–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.02.002>.
- Paton JJ, Belova MA, Morrison SE *et al.* The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature* 2008;439:865–70. <https://doi.org/10.1038/nature04490>.
- Peng H, Geil Nickell CR, Chen KY *et al.* Increased expression of M1 and M2 phenotypic markers in isolated microglia after four-day binge alcohol exposure in male rats. *Alcohol* 2017;62:29–40. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.02.175>.
- Peterson DC, Reddy V, Mayes DA. *Neuroanatomy, Mammillary Bodies*. StatPearls, 2020, 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537192/>.
- Petroff OAC. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* 2002;8:562–73. <https://doi.org/10.1177/1073858402238515>.
- Rhein M, Hagemeyer L, Klintschar M *et al.* DNA methylation results depend on DNA integrity-role of post mortem interval. *Front Genet* 2015;6:1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00182>.
- Salgado S, Kaplitt MG. The nucleus accumbens: a comprehensive review. *Stereotact Funct Neurosurg* 2015;93:75–93. <https://doi.org/10.1159/000368279>.
- Sanchez-Vives MV, Barbero-Castillo A, Perez-Zabalza M *et al.* GABAB receptors: modulation of thalamocortical dynamics and synaptic plasticity. *Neuroscience* 2021;456:131–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.011>.
- Sapru HN. Role of the hypothalamic arcuate nucleus in cardiovascular regulation. *Auton Neurosci Basic Clin* 2013;175:38–50. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2012.10.016>.
- Schuckit MA, Mazzanti C, Smith T *et al.* Selective genotyping for the role of 5-HT $_2A$ , 5-HT $_2C$ , and GABA $\alpha$ 6 receptors and the serotonin transporter in the level of response to alcohol: a pilot study. *Biol Psychiatry* 1999;45:647–51. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00248-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00248-0).
- Sigel E, Steinmann ME. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *J Biol Chem* 2012;287:40224–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664>.
- World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol and health 2018, Geneva. In: *World Health Organization: Global Status Report on Alcohol*, Vol. 65, 2018, 65. ISBN 978-92-4-156563-9.

## 10 Erklärung nach §2 Abs. 2 Nr 7 und 8 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**“Geschlechtsspezifische Unterschiede der epigenetischen Regulation bei Alkoholbezogener Störung am Beispiel des GABA<sub>B1</sub>-Rezeptors“**

in der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Sozialpsychiatrie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Helge Frieling und mit Unterstützung von Dr. Mathias Rhein ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation werden im folgenden Publikationsorgan veröffentlicht:

**„Alcohol and Alcoholism“.**