

Aus der
Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Arbeitsgruppe Molekulare Psychiatrie

**Validierung differentieller *HECW2*-DNA-Methylierung
bei Alkoholabhängigkeit und deren potentielle Funktion
als Biomarker für Diagnostik, Krankheitsschwere,
Therapieansprechen und Rückfall**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Link, Annalena

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. V. Nieratschker

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. J. Hübener-Schmid

Tag der Disputation: 16.05.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Alkoholabhängigkeit	1
1.1.1 Epidemiologie und Auswirkungen der Alkoholabhängigkeit	1
1.1.2 Definition und Diagnostik der Alkoholabhängigkeit	2
1.1.3 Therapie der Alkoholabhängigkeit	4
1.1.4 Rückfall bei Alkoholabhängigkeit	5
1.1.5 Ätiologie der Alkoholabhängigkeit	6
1.2 Epigenetik	8
1.2.1 DNA-Methylierung (DNAm)	9
1.3 Epigenetik bei Alkoholabhängigkeit	12
1.4 <i>HECW2</i>	16
1.5 Ziele und Fragestellung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Studiendesign	20
2.2 Patienten- und Kontrollprobandenkollektiv	20
2.3 Fragebogen	21
2.3.1 <i>Symptom-Checklist-90-Revised</i> (SCL-90-R) und <i>Global Severity Index</i> (GSI)	21
2.3.2 <i>Alcohol Use Disorders Identification Test</i> (AUDIT)	22
2.3.3 <i>Obsessive Compulsive Drinking Scale</i> (OCDS)	22
2.4 Probenmaterial	23
2.5 Materialien und Hersteller	23
2.6 Primer von <i>HECW2</i>	26
2.7 Methoden zur Analyse des <i>HECW2</i> -Methylierungslevels	27
2.7.1 DNA-Extraktion aus Vollblut	27
2.7.2 DNA-Extraktion aus Speichel	27
2.7.3 Messung der DNA-Konzentration	28

2.7.4	Bisulfit-Konvertierung	28
2.7.5	Amplifikation des Bisulfit-konvertierten Genabschnitts von <i>HECW2</i> mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.7.6	Gelelektrophorese	30
2.7.7	Pyrosequenzierung	31
2.8	Statistische Auswertung	33
2.8.1	Normalverteilungsanalyse	33
2.8.2	Identifikation und Ausschluss von Ausreißern	34
2.8.3	Statistische Tests	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Demografische Charakteristika der Studienkohorten	37
3.2	Vergleich der Fragebogen-Scores zwischen den (Sub-)Gruppen und über die Zeit	40
3.2.1	Psychische Belastung (GSI)	42
3.2.2	Alkoholkonsum (AUDIT)	49
3.2.3	Alkoholverlangen (OCDS)	56
3.3	Korrelationen zwischen den Fragebogen-Scores	63
3.4	<i>HECW2</i> -DNAm in Blut	65
3.4.1	Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm in Blut zwischen den (Sub-)Gruppen und über die Zeit	65
3.4.2	Alter als Störfaktor der <i>HECW2</i> -DNAm in Blut	73
3.4.3	Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm in Blut zwischen den (Sub-)Gruppen und über die Zeit in der SG36	77
3.4.4	Geschlecht und Rauchen als Störfaktoren der <i>HECW2</i> -DNAm in Blut	85
3.4.5	Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm in Blut mit den Fragebogen-Scores	87
3.5	<i>HECW2</i> -DNAm in Speichel	90
3.5.1	Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm in Speichel zwischen den (Sub-)Gruppen und über die Zeit	90
3.5.2	Alter als Störfaktor der <i>HECW2</i> -DNAm in Speichel	99
3.5.3	Geschlecht und Rauchen als Störfaktoren der <i>HECW2</i> -DNAm in Speichel	101

3.5.4	Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm in Speichel mit den Fragebogen-Scores _____	103
3.6	Vergleich und Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm in Blut und Speichel _____	106
4	Diskussion _____	109
4.1	Fragebogen _____	110
4.1.1	Fragebogen-Scores der Patienten und Kontrollprobanden _____	110
4.1.2	Fragebogen-Scores der rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten _____	112
4.2	<i>HECW2</i> -DNAm _____	114
4.2.1	Gewebespezifische Unterschiede _____	115
4.2.2	Alter als Störfaktor _____	120
4.2.3	Geschlecht und Rauchen als Störfaktoren _____	123
4.3	Potentielle Funktion der <i>HECW2</i> -DNAm als Biomarker bei Alkoholabhängigkeit _____	125
4.3.1	Diagnostik _____	125
4.3.2	Krankheitsschwere _____	126
4.3.3	Therapieansprechen _____	127
4.3.4	Rückfall _____	129
4.4	Bedeutung von <i>HECW2</i> und der <i>HECW2</i> -DNAm für die Pathophysiologie der Alkoholabhängigkeit _____	133
4.5	Limitationen der Studie und zukünftige Forschung _____	139
4.6	Schlussfolgerung _____	142
5	Zusammenfassung _____	144
6	Literaturverzeichnis _____	146
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	169
Anhang	_____	171

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACC	anteriöer cingulärer Cortex
<i>ADH1B</i>	Alkoholdehydrogenase-1B-Gen
AKT/mTOR	Proteinkinase B / <i>mechanistic target of rapamycin</i>
<i>ALDH2</i>	Aldehyd-Dehydrogenase-2-Gen
<i>ANP</i>	atriales-natriuretisches-Peptid-Gen
APC/C	<i>anaphase-promoting complex / cyclosome</i>
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
AUD	Alkoholkonsumstörung (<i>alcohol use disorder</i>)
AUDIT	<i>Alcohol Use Disorders Identification Test</i>
AVP	Vasopressin-Gen
BA	Brodmann-Areal
<i>BDNF</i>	<i>brain-derived-neurotrophic-factor-Gen</i>
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CD3	<i>cluster of differentiation 3</i>
Cdh1	Cadherin 1
CDT	kohlenhydratdefizientes Transferrin
CpG	Cytosin-(Phosphat-)Guanin
DALYs	verlorene gesunde Lebensjahre (<i>disability-adjusted life years</i>)
<i>DAT</i>	Dopamintransporter-Gen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dATP α S	Desoxyadenosin-alpha-thio-triphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde

DG-SUCHT	Deutsche Gesellschaft für Suchtforschung und Suchttherapie e.V.
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNAm	DNA-Methylierung
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM-5	Diagnostisches und Statistisches Manual psychischer Störungen, 5. Auflage (<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition</i>)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtG	Ethylglucuronid
EtS	Ethylsulfat
EWAS	epigenomweite Assoziationsstudie (<i>epigenome-wide association study</i>)
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
Fw	vorwärts (<i>forward</i>)
G	Guanin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GDAP1	<i>ganglioside-induced-differentiation-associated-protein-1</i> -Gen
GDNF/Ret	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> / <i>rearranged during transfection</i>
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GSI	<i>Global Severity Index</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudie (<i>genome-wide association study</i>)
GxE	Gen-Umwelt-Interaktion
<i>H</i>	Teststatistik des Kruskal-Wallis-Tests
HECT	<i>homologous to the E6-AP carboxyl terminus</i>
HECW2	<i>HECT,-C2-and-WW-domain-containing-E3-ubiquitin-ligase-2</i> -Gen
HERP	<i>homocysteine-induced-endoplasmic-reticulum-protein</i> -Gen
HP1	Heterochromatin-Protein 1

ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision (<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th revision</i>)
K	Kontrollprobanden
KKG	Kuratorium für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen
<i>LEP</i>	Leptin-Gen
<i>M</i>	Mittelwert
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen der Erythrozyten
<i>Mdn</i>	Median
MOAP1	<i>modulator of apoptosis 1</i>
MS	Methioninsynthase
<i>MTHFR</i>	Methylentetrahydrofolat-Reduktase-Gen
N	nicht-rückfällige Patienten
<i>N</i>	Größe der Gesamtstichprobe
<i>n</i>	Größe der Teilstichprobe
ncRNA	nichtcodierende Ribonukleinsäure (<i>non-coding ribonucleic acid</i>)
NEDD4	<i>neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4</i>
NEDL2	<i>NEDD4-like ubiquitin protein ligase 2</i> (Synonym für HECW2)
<i>NGF</i>	Nervenwachstumsfaktor-Gen
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
<i>NR2B</i>	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoruntereinheit-2B-Gen
OCDS	<i>Obsessive Compulsive Drinking Scale</i>
P	Patienten
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEth	Phosphatidylethanol
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase / Proteinkinase B
<i>POMC</i>	Proopiomelanocortin-Gen
PPI	Pyrophosphat
QE	Qualifizierte Entzugsbehandlung
R	rückfällige Patienten

r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
Ras/Erk	<i>rat sarcoma / extracellular signal-regulated kinase</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
r_s	Korrelationskoeffizient nach Spearman
Rv	rückwärts (<i>reverse</i>)
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SCL-90-R	<i>Symptom-Checklist-90-Revised</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
Seq	Sequenzierung
SG36	Subgruppe 36 Jahre alt oder älter
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TET	<i>ten-eleven translocation</i>
TRIM39	<i>tripartite motif-containing 39</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Teststatistik des Mann-Whitney-U-Tests
VTa	ventrales tegmentales Areal
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
x_{max}	Maximum
x_{min}	Minimum
Z	Standardteststatistik

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf der DNA-Methylierung.	10
Abbildung 2: Übersicht der Stichprobengrößen zu T1–T4 und <i>Loss to follow-up</i>	38
Abbildung 3: Vergleich der GSI-Scores von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.	43
Abbildung 4: Entwicklung der GSI-Scores von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit.....	45
Abbildung 5: Vergleich der GSI-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4.....	47
Abbildung 6: Entwicklung der GSI-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit... ..	49
Abbildung 7: Vergleich der AUDIT-Scores von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.	50
Abbildung 8: Entwicklung der AUDIT-Scores von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit.....	52
Abbildung 9: Vergleich der AUDIT-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4.....	54
Abbildung 10: Entwicklung der AUDIT-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit... ..	56
Abbildung 11: Vergleich der OCDS-Scores von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.	57
Abbildung 12: Entwicklung der OCDS-Scores von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit.....	59
Abbildung 13: Vergleich der OCDS-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4.....	61
Abbildung 14: Entwicklung der OCDS-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit... ..	63
Abbildung 15: Korrelationen zwischen den Fragebogen-Scores a) über beide Gruppen (Patienten und Kontrollprobanden) und alle Zeitpunkte hinweg und b) getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden über alle Zeitpunkte hinweg.....	64
Abbildung 16: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.	66
Abbildung 17: Entwicklung der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit.....	68

Abbildung 18: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4.	71
Abbildung 19: Entwicklung der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit.	73
Abbildung 20: Altersunterschied zwischen Patienten und Kontrollprobanden.	73
Abbildung 21: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T1 und dem Alter in Jahren.	75
Abbildung 22: Altersunterschied zwischen Patienten und Kontrollprobanden der SG36.	76
Abbildung 23: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T1 und dem Alter in Jahren in der SG36.	77
Abbildung 24: a) Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36 zu T1–T4. b) Entwicklung der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36 über die Zeit.	81
Abbildung 25: a) Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden der SG36 zu T1–T4. b) Entwicklung der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden der SG36 über die Zeit.	85
Abbildung 26: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von männlichen und weiblichen Probanden der SG36 zu T1–T4 getrennt nach a) Patienten und b) Kontrollprobanden.	86
Abbildung 27: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Nichtrauchern und Rauchern der SG36 zu T1–T4 getrennt nach a) Patienten und b) Kontrollprobanden.	87
Abbildung 28: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut und dem GSI-Score in der SG36.	88
Abbildung 29: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut und dem AUDIT-Score in der SG36.	89
Abbildung 30: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut und dem OCDS-Score in der SG36.	90
Abbildung 31: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.	92

Abbildung 32: Entwicklung der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit.....	94
Abbildung 33: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4.....	97
Abbildung 34: Entwicklung der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit.....	99
Abbildung 35: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel a) zu T1 bzw. b) zu T3 und dem Alter in Jahren.	101
Abbildung 36: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von männlichen und weiblichen Probanden zu T1–T4 getrennt nach a) Patienten und b) Kontrollprobanden.	102
Abbildung 37: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von Nichtrauchern und Rauchern zu T1–T4 getrennt nach a) Patienten und b) Kontrollprobanden.	103
Abbildung 38: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel und dem GSI-Score.	104
Abbildung 39: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel und dem AUDIT-Score.....	105
Abbildung 40: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel und dem OCDS-Score.	106
Abbildung 41: Vergleich der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in a) Blut und b) Speichel. .	107
Abbildung 42: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut und Speichel über beide Gruppen (Patienten und Kontrollprobanden) und alle Zeitpunkte hinweg.....	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Diagnosekriterien des Alkoholabhängigkeitssyndroms nach ICD-10 (F10.2).	3
Tabelle 2:	Die vier Zeitpunkte der Studienteilnahme.	20
Tabelle 3:	Übersicht über die verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Hersteller.	23
Tabelle 4:	Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Kits sowie deren Hersteller.	24
Tabelle 5:	Übersicht über die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.	26
Tabelle 6:	Übersicht über die verwendeten Primer.....	27
Tabelle 7:	Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Bisulfit-Konvertierung.....	28
Tabelle 8:	Programm für die Bisulfit-Konvertierung im Thermocycler.	29
Tabelle 9:	Zusammensetzung eines Ansatzes pro PCR-Tube.....	30
Tabelle 10:	Programm für die PCR im Thermocycler.	30
Tabelle 11:	Übersicht über die Bestandteile und Funktionen des Enzym- und Substratgemischs sowie der Nukleotide, die für die Pyrosequenzierung verwendet wurden.....	32
Tabelle 12:	Bericht über ausgeschlossene Ausreißer. Analysiert pro Variable, Gruppe (Patienten/Kontrollprobanden) und Zeitpunkt.	34
Tabelle 13:	Deskriptive Analyse der Charakteristika der Studienteilnehmer getrennt nach Gruppen.	37
Tabelle 14:	Deskriptive Analyse der Charakteristika der Studienteilnehmer getrennt nach Rückfallstatus.....	40
Tabelle 15:	Deskriptive Analyse der GSI-, AUDIT- und OCDS-Scores von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.	41
Tabelle 16:	Deskriptive Analyse der GSI-, AUDIT- und OCDS-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu T1–T4.	42
Tabelle 17:	Unterschiede der GSI-Scores von Patienten und Kontrollprobanden.....	43
Tabelle 18:	Unterschiede der GSI-Scores von Patienten über die Zeit.	44
Tabelle 19:	Unterschiede der GSI-Scores von Kontrollprobanden über die Zeit.	44

Tabelle 20:	Unterschiede der GSI-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.....	46
Tabelle 21:	Unterschiede der GSI-Scores von rückfälligen Patienten über die Zeit.	48
Tabelle 22:	Unterschiede der GSI-Scores von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.	48
Tabelle 23:	Unterschiede der AUDIT-Scores von Patienten und Kontrollprobanden.....	50
Tabelle 24:	Unterschiede der AUDIT-Scores von Patienten über die Zeit. ..	51
Tabelle 25:	Unterschiede der AUDIT-Scores von Kontrollprobanden über die Zeit.	51
Tabelle 26:	Unterschiede der AUDIT-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.....	53
Tabelle 27:	Unterschiede der AUDIT-Scores von rückfälligen Patienten über die Zeit.	55
Tabelle 28:	Unterschiede der AUDIT-Scores von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.	55
Tabelle 29:	Unterschiede der OCDS-Scores von Patienten und Kontrollprobanden.....	57
Tabelle 30:	Unterschiede der OCDS-Scores von Patienten über die Zeit....	58
Tabelle 31:	Unterschiede der OCDS-Scores von Kontrollprobanden über die Zeit.	58
Tabelle 32:	Unterschiede der OCDS-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.....	60
Tabelle 33:	Unterschiede der OCDS-Scores von rückfälligen Patienten über die Zeit.	62
Tabelle 34:	Unterschiede der OCDS-Scores von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.	62
Tabelle 35:	Deskriptive Analyse der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.	65
Tabelle 36:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden.....	66
Tabelle 37:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten über die Zeit.	67

Tabelle 38:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Kontrollprobanden über die Zeit.....	67
Tabelle 39:	Deskriptive Analyse der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu T1–T4.	69
Tabelle 40:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.....	70
Tabelle 41:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen Patienten über die Zeit.....	72
Tabelle 42:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.....	72
Tabelle 43:	Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, gemeinsam für Patienten und Kontrollprobanden.....	74
Tabelle 44:	Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden.....	74
Tabelle 45:	Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, gemeinsam für Patienten und Kontrollprobanden der SG36.	76
Tabelle 46:	Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden der SG36.	76
Tabelle 47:	Deskriptive Analyse der Charakteristika der Studienteilnehmer der SG36 getrennt nach Gruppen.....	78
Tabelle 48:	Deskriptive Analyse der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36 zu T1–T4.....	78
Tabelle 49:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36.	79
Tabelle 50:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Patienten der SG36 über die Zeit.....	80
Tabelle 51:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von Kontrollprobanden der SG36 über die Zeit.	80
Tabelle 52:	Deskriptive Analyse der Charakteristika der Studienteilnehmer der SG36 getrennt nach Rückfallstatus.	82

Tabelle 53:	Deskriptive Analyse der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten der SG36 zu T1–T4.	82
Tabelle 54:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden der SG36 im paarweisen Vergleich.	83
Tabelle 55:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von rückfälligen Patienten der SG36 über die Zeit.	84
Tabelle 56:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut von nicht-rückfälligen Patienten der SG36 über die Zeit.	85
Tabelle 57:	Deskriptive Analyse der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.	91
Tabelle 58:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von Patienten und Kontrollprobanden.	92
Tabelle 59:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von Patienten über die Zeit.	93
Tabelle 60:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von Kontrollprobanden über die Zeit.	93
Tabelle 61:	Deskriptive Analyse der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu T1–T4.	95
Tabelle 62:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.	96
Tabelle 63:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von rückfälligen Patienten über die Zeit.	98
Tabelle 64:	Unterschiede der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.	98
Tabelle 65:	Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, gemeinsam für Patienten und Kontrollprobanden.	100
Tabelle 66:	Korrelation der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden.	100

1 Einleitung

1.1 Alkoholabhängigkeit

1.1.1 Epidemiologie und Auswirkungen der Alkoholabhängigkeit

Alkoholabhängigkeit stellt durch ihre weitreichenden gesundheitlichen und sozioökonomischen Folgen für Betroffene und deren Angehörige eine bedeutende Herausforderung dar und trägt wesentlich zur globalen Krankheitslast (*burden of disease*) bei (Griswold *et al.* 2018). Dennoch ist der Konsum von Alkohol in vielen Ländern – insbesondere in Deutschland – weit verbreitet und gesellschaftlich akzeptiert: Durchschnittlich konsumiert jeder deutsche Einwohner¹ jährlich etwa 10 bis 11 Liter reinen Alkohol (John und Hanke 2018). Die 12-Monats-Prävalenz für Alkoholabhängigkeit in Deutschland beträgt basierend auf Daten des Epidemiologischen Suchtsurveys von 2018 1.6 Millionen (im Alter zwischen 18 und 64 Jahren) – also 3.1 % der erwachsenen Bevölkerung (Atzendorf *et al.* 2019). Weltweit waren nach Daten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahr 2019 schätzungsweise 3.7 % (209 Millionen Menschen) der Bevölkerung im Alter ab 15 Jahren alkoholabhängig (WHO 2024). Durch den schädlichen Konsum von Alkohol starben im selben Jahr weltweit 2.6 Millionen Menschen – dies entspricht 4.7 % aller Todesfälle in diesem Zeitraum (WHO 2024). In Deutschland waren im Jahr 2016 62.000 Tode auf alkoholbezogene Todesursachen zurückzuführen (John *et al.* 2022). Das Gesundheitsrisiko ist dabei u. a. auf eine Vielzahl von Erkrankungen zurückzuführen, die durch eine Alkoholabhängigkeit verursacht oder begünstigt werden können. So sind in der 10. Revision der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10; deutsche Fassung: Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für

¹ In der vorliegenden Dissertation wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Die verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG) (2022); *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*; englische Fassung: World Health Organization (WHO) (2015)) über 40 Diagnosen aufgeführt, die in vollständigem kausalem Zusammenhang mit Alkoholkonsum stehen (Rehm *et al.* 2017). Darunter sind bspw. die psychotische Störung durch Alkohol (codiert mit F10.5) oder die Alkohol-Polyneuropathie (codiert mit G62.1) (Rehm *et al.* 2017). Missbräuchlicher Alkoholkonsum gilt zudem als wesentlicher Risikofaktor für viele chronische Erkrankungen wie Krebserkrankungen, Erkrankungen der Leber oder des Herz-Kreislauf-Systems sowie für Verletzungen (Rehm *et al.* 2017). Zugleich zählt er zu den wichtigsten vermeidbaren Gesundheitsrisiken (Lim *et al.* 2012). Eine Alkoholabhängigkeit geht außerdem häufig mit psychischen Komorbiditäten wie depressiven Störungen oder Angststörungen einher (Gallagher *et al.* 2018; Rehm *et al.* 2017). Wie eingangs erwähnt führt schädlicher Alkoholkonsum neben gesundheitlichen auch zu ökonomischen Folgen: Schätzungsweise 115.9 Millionen verlorene gesunde Lebensjahre (DALYs, *disability-adjusted life years*) waren im Jahr 2019 weltweit auf Alkoholkonsum zurückzuführen. Das entspricht 4.6 % aller verlorenen DALYs (WHO 2024). Die direkten und indirekten volkswirtschaftlichen Kosten des Alkoholkonsums in Deutschland betragen nach Effertz (2020) etwa 57 Milliarden Euro pro Jahr (Effertz 2020). Abschließend sollen auch psychosoziale Folgen wie die Gefährdung der Partnerschaft oder der Verlust des Arbeitsplatzes (Batra *et al.* 2016) Erwähnung finden.

1.1.2 Definition und Diagnostik der Alkoholabhängigkeit

In der ICD-10 wird zwischen schädlichem Gebrauch von Alkohol (codiert mit F10.1) und Abhängigkeitssyndrom (codiert mit F10.2) unterschieden. Die diagnostischen Kriterien des Abhängigkeitssyndroms nach ICD-10 sind in Tabelle 1 dargestellt und umfassen diverse Verhaltens-, kognitive und körperliche Phänomene (Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) und Deutsche Gesellschaft für Suchtforschung und Suchttherapie e.V. (DG-SUCHT) 2020). Für die Diagnosestellung müssen dabei mind. drei der sechs aufgeführten Kriterien

während des letzten Jahres gleichzeitig erfüllt gewesen sein (DGPPN und DG-SUCHT 2020). Der schädliche Gebrauch von Alkohol wird hingegen bei Vorliegen einer durch Alkoholkonsum entstandenen nachweislichen Folgeschädigung der psychischen oder physischen Gesundheit gestellt. Dabei sollte das Konsummuster mind. einen Monat angedauert haben oder in den letzten zwölf Monaten wiederholt aufgetreten sein (DGPPN und DG-SUCHT 2020).

Tabelle 1: Diagnosekriterien des Alkoholabhängigkeitssyndroms nach ICD-10 (F10.2).

Kriterium	
1	Starkes Verlangen oder eine Art Zwang, Alkohol zu konsumieren (Craving)
2	Schwierigkeiten, die Einnahme zu kontrollieren (Beginn, Beendigung und Menge)
3	Körperliches Entzugssyndrom, wenn Alkoholkonsum reduziert oder abgesetzt wird
4	Toleranzentwicklung gegenüber den Wirkungen von Alkohol
5	Fortschreitende Vernachlässigung anderer Vergnügen oder Interessen zugunsten der Alkoholeinnahme
6	Fortdauernder Alkoholgebrauch trotz des Nachweises eindeutiger schädlicher Folgen

Anmerkung. Zur Diagnose eines Alkoholabhängigkeitssyndroms nach ICD-10 müssen mind. drei der sechs Kriterien während des letzten Jahres gleichzeitig erfüllt gewesen sein. Basierend auf S3-Leitlinie: Screening, Diagnose und Behandlung alkoholbezogener Störungen, Version 2020 (DGPPN und DG-SUCHT 2020).

Im Diagnostischen und Statistischen Manual Psychischer Störungen (DSM, *Diagnostical and Statistical Manual of Mental Disorders*) findet sich seit der fünften Auflage (DSM-5; deutsche Fassung: Falkai und Wittchen (2015); englische Fassung: American Psychiatric Association (2013)) keine Unterscheidung mehr zwischen Alkoholmissbrauch und Alkoholabhängigkeit. Hier wird im Gegensatz zur ICD-10 allgemein von einer Alkoholkonsumstörung (AUD, *alcohol use disorder*) gesprochen, wenn zwei von elf klinischen Merkmalen (z. B. Toleranzentwicklung oder starkes Verlangen) innerhalb von 12 Monaten erfüllt waren. Die Schwere der Symptomatik wird dabei dimensional betrachtet und in drei Schweregrade unterteilt (Batra *et al.* 2016).

Die Diagnosestellung erfolgt üblicherweise über die oben genannten Klassifikationsschemata von ICD-10 oder DSM-5. Laborchemische und klinische Veränderungen können auf eine möglicherweise bestehende alkoholbezogene Problematik hinweisen. Typische klinische Zeichen, die im Rahmen einer Alkoholabhängigkeit auftreten können, sind bspw. eine Polyneuropathie, Spider naevi oder der Foetor alcoholismus (Batra *et al.* 2016; Jain *et al.* 2021). Unter den indirekten laborchemischen Zustandsmarkern, die z. B. Organschäden anzeigen, sind v. a. die Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), das mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV) sowie das kohlenhydratdefiziente Transferrin (CDT) hervorzuheben, die bei Alkoholabhängigkeit jeweils erhöht sind (Batra *et al.* 2016; DGPPN und DG-SUCHT 2020; Hannuksela *et al.* 2007). Die höchste Spezifität und Sensitivität hat dabei nach Hannuksela *et al.* (2007) die kombinierte Bestimmung von GGT und CDT (sog. Anttila-Index (Thiesen und Hesse 2010)) (Hannuksela *et al.* 2007). Zu den direkten Zustandsmarkern, also Markern, die nach Alkoholkonsum positiv sind, gehören Ethanol, Ethylglucuronid (EtG), Ethylsulfat (EtS) und Phosphatidylethanol (PEth). Diese Marker sind jeweils unterschiedlich lange in unterschiedlichen Probenmaterialien (Atemluft, Blut, Urin, Haare) nachweisbar (Andresen-Streichert *et al.* 2018; Nanau und Neuman 2015; Woźniak *et al.* 2019). Als drittes hinweisgebendes Mittel können Selbstbefragungsinstrumente wie der AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*) (siehe Abschnitt 2.3.2) eingesetzt werden (Batra *et al.* 2016). Darüber hinaus besitzen epigenetische Signaturen ein großes Potential als Biomarker für Alkoholkonsum (Liu *et al.* 2018; Philibert *et al.* 2018) oder den Therapieerfolg (Brückmann *et al.* 2016).

1.1.3 Therapie der Alkoholabhängigkeit

Die S3-leitliniengerechte Therapie der Alkoholabhängigkeit entspricht in Deutschland der Qualifizierten Entzugsbehandlung (QE) (DGPPN und DG-SUCHT 2020; Kiefer *et al.* 2016). Bei der i. d. R. dreiwöchigen QE wird die überwiegend pharmakotherapeutische Behandlung des körperlichen Entzugssyndroms (entsprechend einer sog. körperlichen Entgiftung) um die psychiatrische/psychotherapeutische Behandlung der zugrundeliegenden Alkoholabhängigkeit erweitert (Diehl und Mann 2004; Kiefer *et al.* 2016).

Während bei der körperlichen Entgiftung v. a. die Behandlung von Entzugssymptomen (z. B. erhöhte Ängstlichkeit, Tremor, Schwitzen, Übelkeit) sowie die Vermeidung potentiell letaler Komplikationen (z. B. Delirium tremens oder epileptisches Ereignis) im Vordergrund steht, beinhaltet die QE u. a. zusätzlich eine Motivationsbehandlung und Psychoedukation in Form von Einzel- und/oder Gruppentherapien (Batra *et al.* 2016; DGPPN und DG-SUCHT 2020). Medikamentös kommen bei der Entzugsbehandlung als Mittel der ersten Wahl Benzodiazepine oder Clomethiazol zum Einsatz. Diese können situationsabhängig um andere Medikamente erweitert werden (DGPPN und DG-SUCHT 2020; Witkiewitz *et al.* 2019). Unterstützend sind für die Aufrechterhaltung der Abstinenz nach der Entzugsbehandlung in Deutschland derzeit (2024) Acamprosat und Naltrexon (ein Opioid-Antagonist) – sog. Anti-Craving-Medikamente – als wichtigste Vertreter zugelassen. Nalmefen kann zur Trinkmengenreduktion eingesetzt werden (DGPPN und DG-SUCHT 2020). Neben den erwähnten Medikamenten soll nahtlos an die Entzugsphase eine Postakutbehandlung wie eine medizinische Rehabilitation angeboten werden. Übergeordnetes Ziel stellt dabei die Abstinenz dar (Batra *et al.* 2016; DGPPN und DG-SUCHT 2020).

Eine flächendeckende Therapieversorgung ist derzeit jedoch nicht gewährleistet: Mekonen *et al.* (2021) stellten fest, dass lediglich 16.5 % der Menschen, die an einer Alkoholabhängigkeit leiden, eine Behandlung erhalten (Mekonen *et al.* 2021). Nach Daten der WHO schwankt der Anteil der Alkoholabhängigen, die in Kontakt mit Therapieangeboten stehen, stark zwischen Hoch- (über 40 %) und Niedrigeinkommensländern (nahezu 0 %) (WHO 2018). Die therapeutische Unterversorgung ist zum Teil auch darauf zurückzuführen, dass viele Betroffene vor der Inanspruchnahme einer Behandlung zurückschrecken (DGPPN und DG-SUCHT 2020). In Deutschland ist außerdem nach Kiefer *et al.* (2016) die Umsetzung einer 21-tägigen QE mit den in der Psychiatrie-Personalverordnung vorgesehenen Personalressourcen nicht möglich (Kiefer *et al.* 2016).

1.1.4 Rückfall bei Alkoholabhängigkeit

Trotz etablierter therapeutischer Möglichkeiten sind die Rückfallraten auch nach initial erfolgreicher Therapie hoch: Innerhalb eines Jahres erleiden etwa 50 bis

70 % der Patienten einen Rückfall (Durazzo und Meyerhoff 2017; Hunt *et al.* 1971; Nguyen *et al.* 2020; Schellekens *et al.* 2015). Auch nach mehreren Jahren erreichen nach Fleury *et al.* (2016) lediglich 50 % der Patienten eine Remission (Fleury *et al.* 2016). Diese Zahlen verdeutlichen den Verbesserungsbedarf der vorhandenen Therapien. Die Wahrscheinlichkeit für einen Rückfall wird dabei von verschiedenen Faktoren beeinflusst: Während bspw. psychiatrische Komorbiditäten (z. B. Angststörung), Craving, Konsum anderer Substanzen und gesundheitliche Faktoren einen Rückfall begünstigen, wirken ein unterstützendes soziales Netzwerk sowie Selbstvertrauen protektiv (Schellekens *et al.* 2015; Sliedrecht *et al.* 2019). Psychologische und psychobiologische Modelle, die u. a. Neurotransmittersysteme, Entscheidungsfindung und Lernmechanismen beleuchten, versuchen die Hintergründe des Rückfallphänomens zu erklären (Connors *et al.* 1996; Garbusow *et al.* 2014; Sebold *et al.* 2017). Einige Autoren versuchten darüber hinaus Vorhersagemodelle und potentielle Biomarker eines erhöhten Rückfallrisikos zu identifizieren (Hendershot *et al.* 2011; Kinreich *et al.* 2021; Miller *et al.* 1996). Letztere umfassen bspw. hirnmorphologische Parameter wie das Volumen des rechten kaudalen und rostralen anterioren cingulären Cortex (ACC) oder das Gesamtvolumen des rechts-frontalen Cortex (Durazzo und Meyerhoff 2017), aber auch genetische Polymorphismen wie den Val66Met-Polymorphismus des *BDNF*(*brain-derived neurotrophic factor*)-Gens (Wojnar *et al.* 2009).

1.1.5 Ätiologie der Alkoholabhängigkeit

Die Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit ist komplex und basiert sowohl auf genetischen und neurobiologischen als auch auf psychologischen und umweltbedingten Veränderungen bzw. Vorgängen. Die Erbllichkeit einer AUD wird in einer Metaanalyse von zwölf Zwillings- und fünf Adoptionsstudien von Verhulst *et al.* (2015) auf etwa 50 % geschätzt (Verhulst *et al.* 2015). Varianten einer Vielzahl von Genen sind dabei mit dem Risiko für eine alkoholbezogene Störung assoziiert (Edenberg und Foroud 2013; Tawa *et al.* 2016). Hierzu zählen insbesondere Gene, die für Enzyme des Alkoholmetabolismus codieren, wie das Alkoholdehydrogenase-1B-Gen (*ADH1B*) und das Aldehyd-Dehydrogenase-2-Gen (*ALDH2*) (Edenberg und McClintick 2018) – aber z. B. auch Gene, die in

Neurotransmittersystemen eine Rolle spielen (Edenberg *et al.* 2004; Ray und Hutchison 2004; Wang *et al.* 2004). Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, *single nucleotide polymorphism*) sowohl in *ADH1B* als auch in *ALDH2* erweisen sich dabei als protektive Faktoren einer AUD (Bierut *et al.* 2012; Hurley und Edenberg 2012; Li *et al.* 2012; Wall *et al.* 2003). Aus psychologischem Blickwinkel tragen insbesondere operante und klassische Konditionierungsprozesse zum Alkoholverlangen bei: Die „Belohnung“ durch die als angenehm empfundenen psychotropen Wirkungen des Alkohols wie Stimmungsaufhellung und Enthemmung (positive Verstärkung) sowie durch die Unterdrückung negativer Emotionen oder das Beenden von Entzugssymptomen durch erneuten Alkoholkonsum (negative Verstärkung) motiviert gemeinsam mit der Kopplung an Umgebungsstimuli zum Konsum (Batra *et al.* 2016; Koob 2003; Koob und Volkow 2016). Den psychotropen Wirkungen, aber auch den ablaufenden Lernprozessen und letztlich der Abhängigkeitsentwicklung liegen strukturelle und funktionelle neuroadaptive Prozesse des Gehirns zugrunde (Koob und Volkow 2016; Seo und Sinha 2015): Chronischer Alkoholkonsum führt zu Veränderungen in Hirnarealen wie dem Mittelhirn, dem limbischen System inklusive Amygdala und dem präfrontalen Cortex – Areale, die mit motiviertem Verhalten sowie Stress- und Emotionskontrolle in Zusammenhang stehen (Witkiewitz *et al.* 2019). An der positiven Verstärkung im Zusammenhang mit Alkoholkonsum sind v. a. die Neurotransmitter Dopamin, Serotonin, Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Opioidpeptide und Endocannabinoide beteiligt (Koob und Volkow 2016). Bei der negativen Verstärkung spielen Erhöhungen des Corticotropin-Releasing-Faktors und des glutamatergen Systems sowie die Herabregulation der GABA-Übertragung eine Rolle (Koob und Volkow 2016). Viele dieser Neurotransmittersysteme und das Belohnungssystem werden durch langfristige Alkoholexposition adaptiv verändert, sodass eine Abhängigkeit resultiert (Koob und Volkow 2016; Robison und Nestler 2011; Seo und Sinha 2015). Ein Entzug von Alkohol geht mit einer entsprechenden Dysfunktion des Nervensystems einher (Koob 2003; Koob und Volkow 2016). Für eine detaillierte Darstellung der komplexen zugrundeliegenden neurobiologischen Mechanismen sei auf Übersichtsarbeiten zu diesem Thema wie bspw. von Egervari *et al.* (2021),

Koob und Volkow (2016) oder Seo und Sinha (2015) verwiesen (Egervari *et al.* 2021; Koob und Volkow 2016; Seo und Sinha 2015).

Auch die politische Akzeptanz von Alkoholkonsum sowie die ständige Verfügbarkeit von Alkohol vereinfachen die Entstehung eines schädlichen Konsummusters (Anderson *et al.* 2009; Campbell *et al.* 2009; Popova *et al.* 2009). Zusätzlich kann das Risiko für die spätere Ausbildung eines Abhängigkeitssyndroms bereits im Kindesalter durch frühkindliche Stresserfahrungen (*early life stress*) erhöht werden (Enoch 2011).

Bei der Entstehung von Krankheiten, inklusive der Alkoholabhängigkeit, spielt neben genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen auch deren Interaktion, also die Wechselwirkung der genetischen Varianten mit den persönlichen Umgebungsbedingungen (auch unter GxE (Gen-Umwelt-Interaktion) zusammengefasst) eine wichtige Rolle (Hunter 2005; Young-Wolff *et al.* 2011). Ein Mechanismus, über den Umweltfaktoren wirken können, ist die sog. Epigenetik (Meaney 2010). Diese soll im Folgenden zunächst allgemein (siehe Abschnitt 1.2) und anschließend im Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit (siehe Abschnitt 1.3) genauer erläutert werden.

1.2 Epigenetik

Die Expression unserer Gene wird von genetischen und epigenetischen Veränderungen an der Desoxyribonukleinsäure (DNA, *desoxyribonucleic acid*) beeinflusst. Epigenetik ist dabei ein Überbegriff für eine Reihe reversibler Modifikationen der DNA, die deren Sequenz (im Gegensatz zu genetischen Veränderungen) nicht verändern. Sie erklärt, warum Zellen mit gleichem Genotyp einen unterschiedlichen Phänotyp, inklusive differentieller Funktion, ausbilden können (Bonasio *et al.* 2010) und umfasst u. a. DNA-Methylierung (DNAm), Histonmodifikationen und nichtcodierende Ribonukleinsäuren (ncRNA) (Romani *et al.* 2015). Diese epigenetischen Veränderungen sind eng miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig (Cedar und Bergman 2009; Romani *et al.* 2015).

DNAm stellt einen wichtigen und einen der am besten untersuchten molekularen Mechanismen in der epigenetischen Vermittlung von GxE dar (Campagna *et al.*

2021; Jaenisch und Bird 2003) und wird in Abschnitt 1.2.1 genauer beleuchtet. Histonmodifikationen (z. B. Histonmethylierung, -acetylierung oder -phosphorylierung (Strahl und Allis 2000)) wirken sich auf den Kondensierungsgrad des Chromatins aus und beeinflussen damit, ob die DNA in einem lockeren, transkriptionsaktiven oder einem dichteren, transkriptionsinaktiven Zustand vorliegt (Kouzarides 2007). Bei ncRNAs handelt es sich um eine Reihe spezieller Ribonukleinsäuren (RNAs), die nicht in Proteine translatiert werden, sondern vielseitige Funktionen im Rahmen der transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation der Genexpression erfüllen (Kaikkonen *et al.* 2011).

Diese epigenetischen Modifikationen ermöglichen durch ihre Plastizität die adaptive Programmierung des Genoms an eine sich ändernde Umgebung und werden von internen und externen Stimuli beeinflusst. Dazu zählen bspw. Geschlecht (Lam *et al.* 2012; Xia *et al.* 2021), Ethnie (Coit *et al.* 2015; Lam *et al.* 2012), Stress (Hunter 2012; Lam *et al.* 2012), Alter (Heyn *et al.* 2012; Refn *et al.* 2023; Saul und Kosinsky 2021; Seale *et al.* 2022), Ernährung (Guo *et al.* 2020; Ling und Rönn 2019), Alkoholkonsum (Zakhari 2013), Rauchen (Breitling *et al.* 2011; McCartney *et al.* 2018; Zeilinger *et al.* 2013), Umweltgifte (Bollati und Baccarelli 2010; Hou *et al.* 2011; Romani *et al.* 2015), Einflüsse in der Fetalperiode (Heijmans *et al.* 2008; Ladd-Acosta *et al.* 2016) oder frühkindliche widrige Lebensumstände (Anacker *et al.* 2014; Roth *et al.* 2009) und – zumindest bei Ratten und Mäusen – Einflüsse auf vorige Generationen: Epigenetische Muster können nicht nur bei der Mitose innerhalb eines Individuums erhalten bleiben (Zaidi *et al.* 2010), sondern sind über die Meiose auch an die nächste Generation, also zwischen Individuen vererbbar (Transgenerationseffekt) (Anway *et al.* 2005; Fitz-James und Cavalli 2022; Morgan *et al.* 1999).

1.2.1 DNA-Methylierung (DNAm)

Unter DNAm versteht man die durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysierte, kovalente Bindung einer Methylgruppe an das Kohlenstoffatom in Position 5 eines Cytosins, wodurch 5-Methylcytosin entsteht (Doerfler 1983) (siehe Abbildung 1). Die Methylgruppe stammt dabei von S-Adenosylmethionin (SAM), das durch die Abspaltung zu S-Adenosylhomocystein (SAH) wird (Chiang

et al. 1996) (siehe Abbildung 1). Man unterscheidet zwei Arten von DNMTs: Die DNMT1 ist überwiegend für die sog. Erhaltungsmethylierung zuständig, sorgt also dafür, dass DNAm-Muster über die Zellteilung hinweg erhalten bleiben (Bestor *et al.* 1988; Goll und Bestor 2005). Die DNMT3A und die DNMT3B hingegen katalysieren v. a. *de-novo*-DNAm, also neue Methylierungen an bis dahin nicht modifizierter DNA (Okano *et al.* 1999; Okano *et al.* 1998).

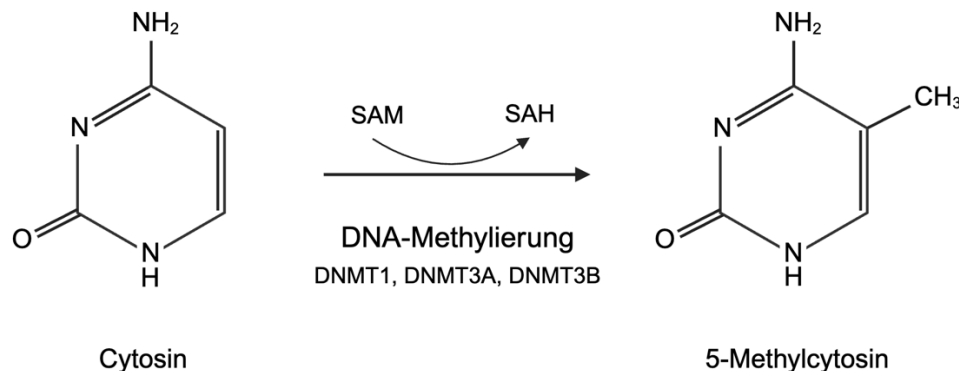


Abbildung 1: Ablauf der DNA-Methylierung. DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysieren die kovalente Bindung einer Methylgruppe (CH₃) an die C5-Position eines Cytosins, wobei 5-Methylcytosin entsteht. S-Adenosylmethionin (SAM) dient als Methylgruppendonor und wird durch die Abspaltung der Methylgruppe zu S-Adenosylhomocystein (SAH). DNMT1 erhält bestehende DNA-Methylierungsmuster über die Zellteilung hinweg, DNMT3A und DNMT3B sind *de-novo*-DNMTs und methylieren bis dahin unveränderte DNA. Erstellt mit BioRender.com, in Anlehnung an Meda *et al.* (2011).

DNAm ist wie andere epigenetische Modifikationen reversibel – die DNA kann also auch wieder demethyliert werden (Ramchandani *et al.* 1999). Die Initiierung von aktiven und passiven Demethylierungsprozessen erfolgt hierbei durch Methylcytosin-Dioxygenasen der TET(*ten-eleven translocation*)-Familie (He *et al.* 2011; Ito *et al.* 2011; Pastor *et al.* 2013; Tahiliani *et al.* 2009). 5-Methylcytosin unterliegt darüber hinaus auch der spontanen Desaminierung zu Thymin (Holliday und Grigg 1993).

DNAm erfolgt bei Eukaryoten v. a. an Cytosinen, denen ein Guanin folgt – sog. CpG(Cytosin-(Phosphat-)Guanin)-Dinukleotiden (Gruenbaum *et al.* 1981; Sinsheimer 1955). Ein kleiner Teil der CpG-Dinukleotide findet sich geballt in sog. CpG-Inseln (CG-Gehalt mind. 55 % (Takai und Jones 2002)) (Bird *et al.* 1985; Tykocinski und Max 1984), die oft in der Promotorregion eines Gens vorkommen, aber auch intra- oder intergenisch zu finden sind (Larsen *et al.* 1992; Medvedeva *et al.* 2010). CpG-Dinukleotide innerhalb von CpG-Inseln sind bei Säugetieren im

Allgemeinen eher nicht methyliert (Bird *et al.* 1985; Bird 1986; Gardiner-Garden und Frommer 1987; Weber *et al.* 2007), CpG-Dinukleotide außerhalb von CpG-Inseln hingegen methyliert (Messerschmidt *et al.* 2014; Miranda und Jones 2007). Eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotoren führt u. a. über die Blockierung von Transkriptionsfaktoren (Xu *et al.* 2010) und/oder die Rekrutierung bestimmter Methyl-CpG-Bindeproteine (Chen *et al.* 2011) sowie eine Änderung der Chromatinstruktur (Jones *et al.* 1998) zu einer Inhibition der Transkription und damit der Expression des entsprechenden Gens (Miranda und Jones 2007). Dennoch sind auch die Promotoren inaktiver Gene meistens nicht methyliert (Weber *et al.* 2007). Repression durch DNAm spielt v. a. bei Genen eine Rolle, bei denen die Repression langfristig stabilisiert werden soll (Jones 2012), wie z. B. bei Genen des inaktivierten X-Chromosoms, Genen, die der genomischen Prägung unterliegen oder bei keimbahnspezifischen Genen (Greenberg und Bourc'h 2019; Jones 2012). Die Rolle intra- und intergenischer CpG-Inseln ist noch nicht vollständig verstanden (Jones 2012; Messerschmidt *et al.* 2014). Intragenische Methylierung ist im Gegensatz zu Promotormethylierung meist mit erhöhter Genexpression assoziiert (Ball *et al.* 2009; Rauch *et al.* 2009; Yang *et al.* 2014); nach Aran *et al.* (2010) v. a. in proliferativen Zelllinien und Geweben (Aran *et al.* 2010). Diese Beobachtung könnte bspw. auf die Aufrechterhaltung der Transkriptionsleistung über die Bewahrung vor aberranter Transkriptionsinitiation außerhalb von Promotoren (Dahlet *et al.* 2020; Neri *et al.* 2017) oder die Stilllegung repetitiver DNA-Sequenzen (Lorincz *et al.* 2004; Pappalardo und Barra 2021) zurückzuführen sein. Auch bei der Regulation alternativer Promotoren (Cheong *et al.* 2006; Maunakea *et al.* 2010) und bei alternativem Spleißen (Shayevitch *et al.* 2018; Shukla *et al.* 2011; Yearim *et al.* 2015) spielt intragenische Methylierung eine Rolle. DNAm in intergenischen Bereichen hingegen wird von Pfeiffer *et al.* (2016) z. B. als microRNA-regulierender Mechanismus in Betracht gezogen (Pfeiffer *et al.* 2016).

Fehlerhaft veränderte DNAm-Muster wurden in der Vergangenheit u. a. bei Krebserkrankungen (Jones und Baylin 2002; Nishiyama und Nakanishi 2021) und neuropsychiatrischen Störungen, insbesondere bei Depressionen (Zhu *et al.* 2023), Alzheimer-Demenz (Poon *et al.* 2020; Sanchez-Mut und Gräff 2015),

Schizophrenie (Magwai *et al.* 2021), Autismus-Spektrum-Störung (Stoccoro *et al.* 2023) und Substanzgebrauchsstörungen (Andersen *et al.* 2015; Mahna *et al.* 2018) gefunden. Doch auch durch den natürlichen Alterungsprozess verändern sich die DNAm-Muster: Es zeigen sich v. a. eine globale Hypomethylierung und lokale Hypermethylierungsereignisse (Jung und Pfeifer 2015).

Nach Shirvani-Farsani *et al.* (2021) werden epigenetische Signaturen, darunter der DNAm-Status, zunehmend als entscheidende Biomarker erachtet (Shirvani-Farsani *et al.* 2021). Bisher kommen sie v. a. im onkologischen Setting zum Einsatz (Ibrahim *et al.* 2023; Mikeska und Craig 2014), zukünftig aber möglicherweise auch im Zusammenhang mit Alzheimer-Demenz (Fransquet und Ryan 2018; Villa und Stoccoro 2022), anderen neuropsychiatrischen Störungen (Shirvani-Farsani *et al.* 2021), Diabetes mellitus Typ 2 (Hwang *et al.* 2018), dem kardio-vaskulären Risiko (Kim *et al.* 2010), dem Altern (Horvath und Raj 2018; McCartney *et al.* 2021) oder der Geschwindigkeit des Alterns (Belsky *et al.* 2022). Dabei können Biomarker diagnostisch, prognostisch und prädiktiv relevant sein.

Schließlich ist DNAm auch als potentiell Ziel neuer Therapien von Interesse. Azacitidin und Decitabin, zwei bereits zugelassene DNMT-Inhibitoren, werden bei verschiedenen malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems eingesetzt (Estey 2013; Gore *et al.* 2006; Issa *et al.* 2005). Weitere Präparate und Anwendungsbereiche sind Gegenstand zahlreicher experimenteller und klinischer Studien (Nervi *et al.* 2015; Nunes *et al.* 2020).

1.3 Epigenetik bei Alkoholabhängigkeit

Alkoholkonsum beeinflusst über molekulare Mechanismen die Aktivität neuronaler Schaltkreise, was zu langanhaltenden zellulären Anpassungen im Gehirn und schließlich der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Alkoholabhängigkeit führen kann (Egervari *et al.* 2021). In den letzten Jahren rückte daher die Epigenetik zunehmend in den Fokus von Studien zu den Pathomechanismen der Alkoholabhängigkeit. Es verdichten sich die Hinweise, dass die durch epigenetische Modifikationen regulierte Genexpression eine bedeutende Rolle bei der Entstehung, der Aufrechterhaltung und auch dem Rückfallrisiko von Suchterkrankungen und insbesondere AUDs spielt (Berkel und

Pandey 2017; Robison und Nestler 2011). Neben Veränderungen der DNAm, auf die im Nachfolgenden näher eingegangen wird, finden sich auch für ncRNA oder Histonmodifikationen differentielle Muster im Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit. Für einen Überblick sei bspw. auf die Übersichtsarbeiten von Mayfield (2017) oder Wang *et al.* (2023) (zu ncRNA) (Mayfield 2017; Wang *et al.* 2023) bzw. Berkel und Pandey (2017) oder Bohnsack und Pandey (2021) (zu Histonmodifikationen) (Berkel und Pandey 2017; Bohnsack und Pandey 2021) verwiesen.

Alkoholkonsum hat in der Leber über verschiedene Wege direkte Auswirkungen auf die DNAm: Acetaldehyd – ein Zwischenprodukt beim Abbau von Ethanol – inhibiert die Methioninsynthase (MS) (Kenyon *et al.* 1998), die die Regeneration von Methionin aus Homocystein katalysiert (Banerjee und Matthews 1990). Methionin wiederum ist essentieller Bestandteil von SAM, dem Methylgruppendonor der DNAm (vgl. Abschnitt 1.2.1). Die MS ist außerdem abhängig von Folat, das bei chronischem Alkoholkonsum häufig vermindert ist (Medici und Halsted 2013). In Untersuchungen an Mäusen und Ratten konnte gezeigt werden, dass die intrahepatischen SAM-Level durch chronischen Alkoholkonsum sinken und die SAH-Level steigen (Song *et al.* 2007; Song *et al.* 2004; Stickel *et al.* 2000). Durch die erhöhte SAH-Konzentration wird die DNMT inhibiert (Zakhari 2013). Gleichzeitig akkumuliert Homocystein und es kommt zu der bei alkoholabhängigen Patienten häufig zu beobachtbaren Homocysteinämie (Blasco *et al.* 2005; Bleich *et al.* 2005). Insgesamt führen diese Effekte zu einer globalen Hypomethylierung (Brückmann *et al.* 2017; Ponomarev *et al.* 2012; Zakhari 2013). Diese Assoziation von erhöhtem Homocysteinlevel und DNA-Hypomethylierung konnte in einigen Studien nachgewiesen werden (Bönsch *et al.* 2007; Castro *et al.* 2003; Ingrosso *et al.* 2003; Yi *et al.* 2000). Andere Studien hingegen berichteten einen entgegengesetzten Zusammenhang (Bönsch *et al.* 2006; Bönsch *et al.* 2004).

Untersuchungen der DNAm auf Kandidatengen-Ebene brachten einige Gene zum Vorschein, die bei Alkoholabhängigkeit eine differentielle Methylierung zeigten. Darunter waren u. a. das Vasopressin-Gen (*AVP*) (Hillemacher *et al.* 2009), das Gen des *homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein*

(*HERP*) (Bleich *et al.* 2006) und das Proopiomelanocortin-Gen (*POMC*) (Muschler *et al.* 2010).

In einer ersten epigenomweiten Assoziationsstudie (EWAS) zu Alkoholabhängigkeit fanden Zhang *et al.* (2013) bei alkoholabhängigen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden sowohl global als auch bei den meisten der signifikant unterschiedlich methylierten CpG-Dinukleotide eine Hypomethylierung (Zhang *et al.* 2013). Brückmann *et al.* (2017) fanden bei einer in unserer Arbeitsgruppe mittels *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays* durchgeführten EWAS unter Verwendung von CD3(*cluster of differentiation 3*)⁺-T-Zellen alkoholabhängiger Patienten vor der Therapie sowie gesunder Kontrollprobanden insgesamt 59 unterschiedlich methylierte CpG-Dinukleotide (Brückmann *et al.* 2017). Der signifikanteste Treffer nach Benjamini-Hochberg-Bereinigung war mit einer DNAm-Differenz von 6.6 Prozentpunkten ein im Genkörper von *HECW2* (*HECT, C2-and-WW-domain-containing-E3-ubiquitin-ligase-2*-Gen) lokalisiertes CpG-Dinukleotid (cg18752527) (Brückmann *et al.* 2017). Die signifikante Hypomethylierung des CpG-Dinukleotids im *HECW2*-Gen bei Patienten konnte in einer unabhängigen Kohorte sowohl in T-Zellen als auch in Vollblut mittels Pyrosequenzierung validiert werden, sodass sie nach Brückmann *et al.* (2017) möglicherweise zur Aufdeckung von Mechanismen der Alkoholabhängigkeit beitragen könnte (Brückmann *et al.* 2017). Das DNAm-Level von cg18752527 in *HECW2* war dabei in hohem Maße mit T-Zellen sowie NK-Zellen (natürlichen Killerzellen) assoziiert, sodass Brückmann *et al.* (2017) vermuteten, dass die in Vollblut gemessene DNAm zum Teil von T-Zellen verursacht wurde (Brückmann *et al.* 2017). Sie stellten außerdem ein signifikant niedrigeres globales DNAm-Level bei Patienten vor der Behandlung im Vergleich zu Kontrollen fest, das sich nach der Behandlung wieder dem Kontrollniveau anpasste (Brückmann *et al.* 2017). Diese Umkehr konnte auch für 7 der 59 CpG-Dinukleotide nachgewiesen werden; nicht für das in *HECW2* gelegene CpG-Dinukleotid (Brückmann *et al.* 2017). Weitere explorative Studien enthüllten z. B. veränderte Methylierungsmuster innerhalb von Gennetzwerken, die mit inflammatorischen (Hagerty *et al.* 2016; Lohoff *et al.* 2021) oder immunologischen (Hagerty *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018) Funktionen

sowie Stress (Gatta *et al.* 2021; Lohoff *et al.* 2021) assoziiert sind. Zillich *et al.* (2022) identifizierten bei Analysen in postmortalen Gehirnproben von AUD-Patienten differentiell methylierte Positionen und Regionen im Nucleus caudatus, dem ventralen Striatum und dem ACC (Zillich *et al.* 2022) – Hirnregionen, die mit pathologischen Prozessen im Rahmen der Alkoholabhängigkeit in Zusammenhang stehen (Bauer *et al.* 2013; Magrabi *et al.* 2022; Martinez *et al.* 2005).

Erste Studien über Veränderungen der DNAm während eines Alkoholentzugs konzentrierten sich auf Kandidatengene und fanden eine verminderte Promotormethylierung im Falle des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoruntereinheit-2B-Gens (*NR2B*) (Biermann *et al.* 2009) (nicht signifikant), eine erhöhte Promotormethylierung des Nervenwachstumsfaktor-Gens (*NGF*) (Heberlein *et al.* 2013), keinen Effekt beim Dopamintransporter-Gen (*DAT*) (Nieratschker *et al.* 2014), einen Anstieg der Promotormethylierung von *AVP* und eine verminderte Promotormethylierung im Gen des atrialen natriuretischen Peptids (*ANP*) im Vergleich zu Kontrollprobanden (Glahn *et al.* 2014), eine Assoziation der Promotormethylierung des Leptin-Gens (*LEP*) mit Craving während des Entzugs (Hillemacher *et al.* 2015) sowie eine Reduktion der Promotormethylierung von *BDNF* (Heberlein *et al.* 2015). Heberlein *et al.* (2015) stellten außerdem an Tag 14 des Alkoholentzugs eine signifikant höhere Methylierungsrate bei den Patienten fest, die länger abstinent blieben (Heberlein *et al.* 2015). In einer Pilotstudie analysierten Philibert *et al.* (2014) die Dynamik der genomweiten DNAm während eines vierwöchigen stationären Abstinenzprogramms (Philibert *et al.* 2014). Dabei zeigte sich die Tendenz, dass sich die durch schweren Alkoholkonsum hervorgerufenen Veränderungen der DNAm nach etwa einem Monat Abstinenz zurückbildeten. Analysen der Signalwege ergaben, dass die Veränderungen mit Gennetzwerken zusammenhingen, die an der Apoptose beteiligt sind (Philibert *et al.* 2014). Eines der signifikantesten Ergebnisse von Philibert *et al.* (2014) war die Hypomethylierung im Gen des *ganglioside induced differentiation associated protein 1* (*GDAP1*) bei Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden (Philibert *et al.* 2014). Dieses Ergebnis konnte von Brückmann *et al.* (2016) validiert und repliziert werden (Brückmann *et al.* 2016). Sie fanden

außerdem eine Umkehr der *GDAP1*-Hypomethylierung während einer dreiwöchigen Entwöhnungstherapie sowie eine negative Assoziation der *GDAP1*-DNAm mit dem AUDIT- und GSI(*Global Severity Index*)-Score (Brückmann *et al.* 2016). Koller *et al.* (2019) wiesen signifikante Unterschiede der globalen Methylierung während des Alkoholentzugs nach (Koller *et al.* 2019) und auch Witt *et al.* (2020) fanden epigenomweit signifikante Unterschiede zwischen der DNAm von Patienten zu Beginn des Entzugs und nach zwei Wochen (Witt *et al.* 2020). Zudem verringerten sich die Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollprobanden nach zweiwöchigem Entzug (Witt *et al.* 2020).

Sowohl Philibert *et al.* (2018) als auch Liu *et al.* (2018) identifizierten DNAm-Signaturen für starken Alkoholkonsum und kamen zu dem Schluss, dass DNAm-Tests als klinisch nützliche diagnostische Tests in der Lage seien, den Status des Alkoholkonsums zu quantifizieren (Liu *et al.* 2018; Philibert *et al.* 2018). Bisher konnte sich jedoch trotz aller Entdeckungen und Fortschritte kein neuer Biomarker in der Praxis durchsetzen.

Im Hinblick auf Epigenetik als potentielles therapeutisches Angriffsziel bei Alkoholabhängigkeit konnten Untersuchungen an Nagern einen positiven Effekt von DNMT-Inhibitoren auf exzessiven Alkoholkonsum (Barbier *et al.* 2015; Warnault *et al.* 2013) bzw. die Ethanolaufnahme (Ponomarev *et al.* 2017) nachweisen. Auch Histon-Deacetylase-Inhibitoren führten zu einer Reduktion der Alkoholaufnahme und des Suchtverhaltens (Warnault *et al.* 2013).

1.4 HECW2

Die *HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin ligase 2* (HECW2), auch bekannt als NEDL2 (*NEDD4-like ubiquitin protein ligase 2*), ist eine Ubiquitin-Protein-Ligase der NEDD4(*neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4*)-Familie. Diese gehört zur HECT(*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*)-Familie der E3-Ligasen (Miyazaki *et al.* 2003; National Library of Medicine (US) 2004; Qian *et al.* 2020), die eine wesentliche Rolle bei der Markierung von Proteinen für die Degradierung durch das Ubiquitin-Proteasom-System spielen (Rotin und Kumar 2009). Sie wird auf dem *HECW2*-Gen auf Chromosom 2 (2q32.3) codiert und u. a. in Gehirn, Lunge, Herz, Plazenta, Milz,

Fettgewebe und Schilddrüse exprimiert (National Library of Medicine (US) 2004). HECW2 ist in diverse Prozesse der Zellphysiologie involviert. Sie stabilisiert das Tumorsuppressor-Protein p73 und steigert dessen transkriptionelle Aktivität (Miyazaki *et al.* 2003). p73 wiederum, ein Mitglied der p53-Familie, reguliert Zellwachstum und induziert Apoptose und/oder Zellzyklusarrest in bestimmten Krebszellen (Fang *et al.* 1999; Jost *et al.* 1997; Miyazaki *et al.* 2003). p73 spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle als Regulator des Überlebens, der Selbsterneuerung und der Proliferation von neuronalen Stammzellen und ist damit essentiell für die embryonale und adulte Neurogenese (Killick *et al.* 2011; Talos *et al.* 2010). HECW2 ist über die Regulation von AMOTL1 (Angiomotin-like 1) außerdem an der Stabilisierung von endothelialen Zell-Zell-Verbindungen und damit an der Regulation der Angiogenese beteiligt (Choi *et al.* 2016). Wei *et al.* (2015) diskutieren eine Rolle als positiver Regulator der Entwicklung des enterischen Nervensystems über die Aktivierung des GDNF/Ret(*glial cell line-derived neurotrophic factor / rearranged during transfection*)-Signalwegs (Wei *et al.* 2015). Des Weiteren nehmen Lu *et al.* (2013) an, dass HECW2 ein Substrat des *anaphase-promoting complex / cyclosome* (APC/C) und des Cadherins 1 (Cdh1) darstellt und als dieses im Rahmen der Mitose den Übergang der Meta- zur Anaphase reguliert (Lu *et al.* 2013). HECW2 interagiert zudem mit zwei Lamin-A-Bindeproteinen (*proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) und Lamin B1) sowie mit zwei Isoformen des Heterochromatin-Proteins 1 (HP1) (HP1 α und HP1 β), vermittelt deren Ubiquitinierung und reguliert damit deren homöostatische Level. Lamine sind zentral für die nukleäre Struktur und Organisation, HP1-Proteine für die Chromatinstruktur (Krishnamoorthy *et al.* 2018b; Krishnamoorthy *et al.* 2018a).

HECW2 wurde in der Vergangenheit mit verschiedenen neurologischen Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht. So sind Mutationen im *HECW2*-Gen mit Epilepsie, geistiger Behinderung, Entwicklungsstörungen und Muskelhypotonie assoziiert (Acharya *et al.* 2022; Berko *et al.* 2017; Halvardson *et al.* 2016; Krami *et al.* 2022; Ullman *et al.* 2018; Yanagishita *et al.* 2021). Peikes *et al.* (2021) berichteten einen Fall von erworbener Mikrozephalie, Tedesco Silva *et al.* (2023) einen von episodischer Ataxie in Verbindung mit einer *HECW2*-

Mutation (Peikes *et al.* 2021; Tedesco Silva *et al.* 2023). O'Donnell *et al.* (2016) beschrieben darüber hinaus einen potentiellen Zusammenhang der *HECW2*-Expression im Kolon mit dem Morbus Hirschsprung (O'Donnell *et al.* 2016), einer kongenitalen intestinalen Aganglionose. Auch an der Progression sowie der Zytostatikaresistenz des kolorektalen Karzinoms ist *HECW2* nach Li *et al.* (2023) über die Aktivierung des AKT/mTOR(Proteinkinase B / *mechanistic target of rapamycin*)-Signalwegs beteiligt, indem es die Degradierung von Lamin B1 vermittelt (Li *et al.* 2023). Schließlich wurde *HECW2* wie in Abschnitt 1.3 beschrieben in einer vorangegangenen epigenomweiten Studie von Brückmann *et al.* (2017) als differentiell methyliertes Gen bei Alkoholabhängigkeit identifiziert (Brückmann *et al.* 2017). Lohoff *et al.* (2021) konnten ebenfalls eine signifikante Assoziation zwischen Alkoholabhängigkeit und einer veränderten *HECW2*-(cg18752527)-DNAm nachweisen (Lohoff *et al.* 2021). Darüber hinaus fanden Witt *et al.* (2020) mehrere zwischen Patienten und Kontrollprobanden signifikant differentiell methylierte CpG-Dinukleotide innerhalb von *HECW2* (nicht cg18752527) – sowohl zu Beginn des Alkoholentzugs als auch nach zwei Wochen (Witt *et al.* 2020) – sodass eine potentielle Bedeutung von *HECW2* für den Pathomechanismus der Alkoholabhängigkeit hervorgehoben wurde.

1.5 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Alkoholabhängigkeit ist eine schwerwiegende Erkrankung mit hohen Rückfallraten, die auf den Bedarf verbesserter Therapieangebote hindeuten. Für deren Entwicklung müssen die Ursachen und Folgen von Alkoholabhängigkeit weiter erforscht und die zugrundeliegenden Prozesse besser verstanden werden. Die molekularen Mechanismen der Alkoholabhängigkeit wurden bereits vielfach untersucht, jedoch fehlt bisher ein umfassendes Verständnis. Auch die Notwendigkeit einer Identifizierung von Faktoren, die einen Rückfall begünstigen bzw. vorhersagen können wurde bereits von vielen Autoren erkannt und sowohl mögliche psychische als auch psychobiologische Faktoren untersucht.

Vor diesem Hintergrund soll in der vorliegenden Arbeit die differentielle Methylierung des im *HECW2*-Gen gelegenen CpG-Dinukleotids cg18752527 alkoholabhängiger Patienten, das von Brückmann *et al.* (2017) identifiziert werden konnte (Brückmann *et al.* 2017), validiert werden. Darüber hinaus soll

insbesondere die Entwicklung der DNAm-Level nach der Therapie erforscht und die potentielle Funktion als epigenetischer Biomarker für Diagnostik, Krankheitsschwere, Therapieansprechen und Rückfall in klinisch leicht zugänglichem Gewebe evaluiert werden.

Hierzu wurden die DNAm-Level von *HECW2*² in peripher-venösem Vollblut (im Folgenden zur Vereinfachung häufig als Blut bezeichnet) und Speichel von alkoholabhängigen Patienten über einen Zeitraum von einem Jahr ab Therapiebeginn mittels Pyrosequenzierung analysiert und mit denen von gesunden Kontrollprobanden verglichen. Wir vermuten, dass sich die *HECW2*-DNAm zwischen Patienten und Kontrollprobanden in Blut und Speichel unterscheidet und es darüber hinaus eine Korrelation zwischen der *HECW2*-DNAm und der Schwere der Alkoholabhängigkeit, gemessen an der Korrelation mit Selbstbefragungsinstrumenten, gibt. Außerdem soll ein potentieller Zusammenhang zwischen der DNAm und der Wahrscheinlichkeit, einen Rückfall zu erleiden, untersucht werden. Zur Bestimmung der DNAm-Level wurden sowohl Vollblut- als auch Speichelproben verwendet, um zu analysieren, ob die *HECW2*-DNAm auch bei weniger invasiver Probennahme (Speichel anstelle von Blut) als Biomarker dienen kann.

Ein tiefgreifenderes Verständnis der epigenetischen Regulation von Alkoholabhängigkeit, -entzug und -rückfall könnte dazu führen, Individuen mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit bzw. eines Rückfalls zu identifizieren. Die Möglichkeit einer frühzeitigen Einschätzung des Behandlungserfolgs und der Rückfallwahrscheinlichkeit wäre eine vielversprechende Entwicklung im Hinblick auf verbesserte und gezielt eingesetzte Diagnostik, Therapieansätze und Rückfallprävention im Sinne einer personalisierten Medizin für das Krankheitsbild der Alkoholabhängigkeit.

² Wenn in dieser Arbeit von DNAm oder *HECW2*-DNAm gesprochen wird, so ist i. d. R. die DNAm des im *HECW2*-Gen gelegenen CpG-Dinukleotids cg18752527 gemeint. Hiervon ausgenommen sind allgemeine Aussagen über DNAm wie bspw. in Abschnitt 1.2, 1.2.1, 1.3, 2.2, 4.2.1, 4.2.2 oder 4.2.3.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Diese Arbeit ist Teil des DFG-geförderten Forschungsprojekts „*Characterization of novel epigenetic biomarkers of alcohol dependence, therapy outcome and the risk of relapse*“, an dem in der Arbeitsgruppe Molekulare Psychiatrie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Vanessa Nieratschker in der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen seit 2020 gearbeitet wird.

Die Studienteilnahme der Patienten und Kontrollprobanden erstreckte sich über 12 Monate und bestand aus vier Studienzeitpunkten (siehe Tabelle 2), zu denen jeweils Blut- und Speichelproben (siehe Abschnitt 2.4) entnommen sowie Fragebogen (siehe Abschnitt 2.3) ausgefüllt wurden.

Tabelle 2: Die vier Zeitpunkte der Studienteilnahme.

	T1	T2	T3	T4
Zeitpunkt	0	1–3 Wochen	6 Monate	12 Monate

Anmerkung. Zu jedem Studienzeitpunkt wurden Blut- und Speichelproben entnommen sowie Fragebogen ausgefüllt.

Die Durchführung der Studie erfolgte mit Genehmigung der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen (Aktenzeichen: 264/2018BO2) und schriftlicher, informierter Einwilligung der Teilnehmer.

2.2 Patienten- und Kontrollprobandenkollektiv

Insgesamt wurden 149 Teilnehmer europäischer Herkunft im Alter zwischen 20 und 71 Jahren in die Studie eingeschlossen (siehe Abschnitt 3.1). Personen anderer Herkunft wurden aufgrund des Einflusses der Ethnie auf DNAm-Muster (Xia *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2011) nicht in die Studie eingeschlossen. Die Versuchspersonen des Patienten- und Kontrollprobandenkollektivs wurden soweit möglich in Bezug auf Geschlecht, Alter und Rauchverhalten aufeinander abgestimmt.

Das Patientenkollektiv umfasst 68 Patienten aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen, die zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie die diagnostischen Kriterien der ICD-10 (siehe Tabelle 1) für

Alkoholabhängigkeit erfüllten, jedoch bereits ausgenüchtert waren. Sie durchliefen im Anschluss an die Studienaufnahme eine ein- bis dreiwöchige stationäre Entzugstherapie im Sinne einer QE.

Ausschlusskriterien waren ein aktuell bestehendes substanzbezogenes Abhängigkeitssyndrom, abgesehen von Alkohol- oder Nikotinabhängigkeit, sowie das Vorliegen weiterer akuter psychiatrischer Erkrankungen wie einer Schizophrenie oder psychotischen Störung, da diese zu veränderten DNAm-Leveln führen können (Shirvani-Farsani *et al.* 2021). Depressive Störungen führten nicht zum Ausschluss von der Studie, da sie als Komorbidität der Alkoholabhängigkeit sehr häufig vorkommen (Boden und Fergusson 2011; Rehm *et al.* 2017).

Das Kontrollprobandenkollektiv setzt sich aus 81 gesunden Personen zusammen, die mittels öffentlichen Aufrufs über die E-Mail-Verteiler der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und des Universitätsklinikums Tübingen rekrutiert wurden.

Genauere Informationen zu den Charakteristika der Studienteilnehmer sowie zur Abbruchrate sind in Abschnitt 3.1 aufgeführt.

2.3 Fragebogen

Die im Folgenden detaillierter beschriebenen Fragebogen wurden von den Studienteilnehmern zu allen vier Studienzeitpunkten ausgefüllt. Das Rauchverhalten sowie weitere soziodemografische Daten wurden anhand einer Basisdokumentation erhoben.

2.3.1 *Symptom-Checklist-90-Revised* (SCL-90-R) und *Global Severity Index* (GSI)

Die SCL-90-R (siehe Anhang 5.1) von Derogatis (1977) (deutsche Version von Franke (1995) bzw. Franke (2002)) ist eine Checkliste mit 90 Items, die Auskunft über die psychische Belastung der vergangenen sieben Tage gibt (Franke 2002). Sie besteht aus neun Skalen (Somatisierung, Zwanghaftigkeit, Unsicherheit im Sozialkontakt, Depressivität, Ängstlichkeit, Aggressivität/Feindseligkeit, Phobische Angst, Paranoides Denken, Psychotizismus) und drei globalen Kennwerten (GSI, PSDI, PST). Die Ausprägung der Belastung durch jedes

Symptom wird auf einer fünfstufigen Likert-Skala abgefragt. Der GSI gibt als einer der drei globalen Kennwerte die durchschnittliche psychische Belastung in Bezug auf alle 90 Items an (Franke 2002) und wurde hier verwendet, um die grundsätzliche psychische Verfassung der Teilnehmer über die Studie hinweg zu beurteilen. Ein Proband galt dabei als psychisch auffällig belastet, wenn der T-transformierte GSI-Wert ≥ 63 war (Franke 2002).

2.3.2 Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT)

Zur Dokumentation des Trinkverhaltens (Alkoholkonsum) aller Studienteilnehmer über den Verlauf der Studie hinweg wurde der AUDIT (siehe Anhang 5.2) eingesetzt – ein von der WHO entwickeltes Screening-Instrument für riskanten und schädlichen Alkoholkonsum mit 10 Items (Saunders et al. 1993). Scores > 15 deuten auf ein hohes Maß an Alkoholproblemen hin (minimale Gesamtpunktzahl = 0, maximale Gesamtpunktzahl = 40) (Babor et al. 2001). Abgefragt werden bspw. die Häufigkeit und Menge des Alkoholkonsums sowie dessen soziale Auswirkungen (Babor et al. 2001; Saunders et al. 1993).

2.3.3 Obsessive Compulsive Drinking Scale (OCDS)

Mit der deutschen Version der OCDS (siehe Anhang 5.3) von Mann und Ackermann (2000) erfolgte die psychometrische Erfassung des während der letzten sieben Tage subjektiv empfundenen Alkoholverlangens (Mann und Ackermann 2000). Die OCDS wurde von Anton et al. (1995) entwickelt (Anton et al. 1995). Anhand von 14 Items werden in diesem Fragebogen u. a. alkoholbezogene Gedanken, Handlungsimpulse, Kontrolle sowie Konsequenzen des Alkoholkonsums erfasst. Aus diesen Items werden die zwei Scores „Gedanken“ und „Handlungsimpulse“ sowie ein Gesamtscore gebildet, wobei nach Mann und Ackermann (2000) die Zusatzinformation der beiden Subscores beschränkt ist (Mann und Ackermann 2000), sodass in dieser Studie lediglich der Gesamtscore verwendet wurde. Ein Wert > 15 wurde als Hinweis auf ein erhebliches Alkoholverlangen gedeutet. Zusätzlicher Bestandteil des Fragebogens sind drei visuelle Analogskalen sowie die Frage nach der Anzahl der Abstinenztage.

2.4 Probenmaterial

Die *HECW2*-DNAm wurde in Vollblut- und Speichelproben untersucht. Das peripher-venöse Blut wurde mit S-Monovetten® 9 ml K3E (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht; K3E: 1.6 mg EDTA(Ethylendiamintetraacetat) / ml) abgenommen, der Speichel in Oragene® DNA Collection Kits (OG-500) (DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Kanada) gesammelt. Die Proben wurden zu allen vier Studienzeitpunkten gewonnen und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.5 Materialien und Hersteller

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte und Materialien (siehe Tabelle 3), Chemikalien und Kits (siehe Tabelle 4) sowie über die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung (siehe Tabelle 5). Zusätzlich sind die entsprechenden Hersteller aufgeführt. Der Firmensitz der Hersteller befindet sich, sofern nicht anders angegeben, in Deutschland.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Hersteller.

Geräte und Materialien	Hersteller
EDTA-Röhrchen: S-Monovette® 9 ml K3E (1.6 mg EDTA/ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Flügelkanüle: Safety-Multifly®-Kanüle 21G	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Fluorometer: Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Geldokumentationssystem: E-BOX VX5	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelkammer: Model 40-0911, Class II, Serial No. 034697	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelkämme: 14 WELL, 1.5 mm, Cat. No. 700-0764	VWR International GmbH, Darmstadt
Grafikprogramme: Affinity Publisher + Affinity Designer (Version 1.10.6)	Serif (Europe) Ltd, Nottingham, UK
BioRender.com	Science Suite Inc., Toronto, ON, Kanada
Heizblock: RSM-10HS	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen

Geräte und Materialien	Hersteller
Mikroplatten-Schüttler: MicroMix 5 Shaker	DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim
Mikrozentrifuge: PerfectSpin Mini	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR-Arbeitsstation: VWR® PCR Workstation	VWR International GmbH, Darmstadt
PyroMark® Q24 Vacuum Workstation	QIAGEN GmbH, Hilden
Pyrosequenzierer: PyroMark® Q24	QIAGEN GmbH, Hilden
Speichelprobenahmeröhrchen: Oragene® DNA Collection Kit (OG-500)	DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Kanada
Statistiksoftware: IBM® SPSS® Statistics (Version 29.0.0.0)	IBM Corp., Armonk, NY, USA
Stromquelle für Elektrophorese: Electrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA
Thermocycler: peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermoschüttler: Thermoschüttler pro	CellMedia GmbH & Co. KG, Zeitz
Vortexmischer: Vortex-Genie™ 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Waage: Mettler PM 4600 DeltaRange®	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Wärmeschrank: Typ 29028230001010, No. #991475	BINDER GmbH, Tuttlingen
Wasserbad: GFL Schüttelwasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge groß: Thermo Heraeus Multifuge 3 L-R Refrigerated Centrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifugen klein: Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Osterode
ABBOTT TDX™ Centrifuge	Abbott, Abbott Park, IL, USA

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Kits sowie deren Hersteller.

Chemikalien und Kits	Hersteller
AE Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
Agarose: SeaKem® LE Agarose	Lonza Group AG, Basel, Schweiz

Chemikalien und Kits	Hersteller
Borsäure $\geq 99.8\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA-Gel-Färbemittel: SYBR™ Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DNA-Ladder (100 bp)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100 %: AnalaR NORMAPUR®, Ethanol absolute	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Loading Dye: Blue/Orange 6x Loading Dye	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser: Ultra Pure Water	Biochrom GmbH, Berlin
Polysorbat 20: Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
prepIT®.L2P	DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Kanada
Primer (siehe Tabelle 6)	metabion international AG, Planegg/Steinkirchen
PyroMark® PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark® Annealing Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark® Q24 Gold Reagents	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAamp® DNA Blood Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Qubit® dsDNA-BR(Broad Range)-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Salzsäure (HCl), 1 N	Merck KGaA, Darmstadt
Steriles und endotoxinfreies Wasser: Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Streptavidin-beschichtete Sepharose®-Beads: Streptavidin Sepharose™ High Performance	Cytiva Sweden AB, Uppsala, Schweden
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS): TRIS PUFFERAN® $\geq 99.3\%$, Buffer Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	10 mM TRIS
	10 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0.1 % Tween® 20
	pH 7.6 (mit 1 M HCl eingestellt)
Denaturierungslösung	0.2 M NaOH
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE), 1x	90 mM TRIS
	90 mM Borsäure
	2 mM EDTA
Waschpuffer	10 mM TRIS pH 7.6 (mit Essigsäure (100 %) eingestellt)

Anmerkung. TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, EDTA = Ethylendiamintetraacetat.

2.6 Primer von *HECW2*

Das untersuchte CpG-Dinukleotid cg18752527 liegt innerhalb des 162,970 Basenpaaren (bp) langen Transkripts des *HECW2*-Gens auf Chromosom 2 (2q32.3) in einem Intron an Position 197,132,870 (Nassar *et al.* 2023).

Für die Analyse des CpG-Dinukleotids wurde ein Genabschnitt von 135 bp amplifiziert (197,132,798–197,132,932). Hierzu wurden die in Tabelle 6 dargestellten Vorwärts- und Rückwärts-Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) verwendet. Für die Pyrosequenzierung wurde der ebenfalls in Tabelle 6 abgebildete Sequenzierungsprimer genutzt.

Weitere Informationen, die Sequenz des amplifizierten Abschnitts von *HECW2* sowie der Pyrosequenzierungs-Assay sind im Anhang (siehe Anhang 1 bzw. Anhang 2) aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primer.

Primer	Primersequenz	Annealing-Temperatur
Fw-Primer	5'-GTGTTTGTGGGAATGTTTTTTATA-3'	57 °C
Rev-Primer	5'-Biotin-CACACTACACTTTCATTTTCTATCAA-3'	60 °C
Seq-Primer	5'-TTTTTAGATATATAAATTTTTTTTTT-3'	49 °C

Anmerkung. Der Vorwärts(Fw)-Primer und der Rückwärts(Rev)-Primer wurden für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet, der Sequenzierungs(Seq)-Primer wurde für die Pyrosequenzierung verwendet. G = Guanin, T = Thymin, A = Adenin, C = Cytosin.

2.7 Methoden zur Analyse des *HECW2*-Methylierungslevels

Um das Methylierungslevel des im *HECW2*-Gen gelegenen CpG-Dinukleotids cg18752527 mittels Pyrosequenzierung bestimmen zu können, wurde die DNA zunächst aus den Blut- und Speichelproben extrahiert und anschließend Bisulfit-konvertiert. Der Bisulfit-konvertierte Genabschnitt (siehe Anhang 1) wurde daraufhin mittels PCR amplifiziert, sodass im letzten Schritt durch Pyrosequenzierung die Basenabfolge bestimmt und das Methylierungslevel berechnet werden konnte. Die durchgeführten Methoden werden in den nächsten Abschnitten genauer beschrieben.

2.7.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Die genomische DNA der EDTA-Vollblutproben wurde mithilfe des QIAamp® DNA Blood Maxi Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.7.2 DNA-Extraktion aus Speichel

Für die Extraktion der genomischen DNA aus den Speichelproben wurde prepIT®.L2P (DNA Genotek Inc., Ottawa, ON, Kanada) verwendet und die Isolierung entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend vom Standardprotokoll wurden die Proben im zweiten Schritt nicht für mind. 1 h bei 50 °C, sondern entsprechend den Herstellerinformationen zur Inaktivierung von SARS-CoV-2 für 1 bis 3 h im 72-°C-warmen Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.7.3 Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration der Eluate, die aus den Blut- und Speichelproben gewonnen wurden, wurde unter Verwendung des Qubit® 2.0 Fluorometers (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und des Qubit® dsDNA-BR(Broad Range)-Assay-Kits (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gemessen. Die Proben wurden schließlich auf eine DNA-Konzentration von 50 ng/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert. Lag die gemessene DNA-Konzentration unter 50 ng/µl, wurden die Proben auf 25 ng/µl verdünnt, unterschritt sie 25 ng/µl wurde keine Verdünnung vorgenommen.

2.7.4 Bisulfit-Konvertierung

Im Rahmen einer Bisulfit-Konvertierung werden alle unmethylierten Cytosine in Uracil umgewandelt, wohingegen alle methylierten Cytosine unverändert bleiben (Clark *et al.* 2006). Die eingebauten Uracile werden bei einer anschließenden PCR (siehe Abschnitt 2.7.5) durch Thymin ersetzt (Clark *et al.* 2006). Dies ermöglicht bei der Pyrosequenzierung (siehe Abschnitt 2.7.7) das Methylierungslevel des CpG-Dinukleotids anhand des Verhältnisses von Thyminen zu Cytosinen zu berechnen.

Für die Bisulfit-Konvertierung wurde das EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes mit hoch- bzw. niedrig-konzentrierten Proben ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Bisulfit-Konvertierung.

Komponente	hoch-konzentrierte Proben (50 ng/µl)	niedrig-konzentrierte Proben (≤ 25 ng/µl)
	Volumen (µl)	
DNA	10	20
RNase-freies Wasser	10	/
Bisulfite Solution	85	85
DNA Protect Buffer	35	35
Gesamt	140	140

Anmerkung. Die Komponenten (außer die DNA) sind im EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) enthalten.

Die Bisulfit-Konvertierung erfolgte im peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) entsprechend dem in Tabelle 8 abgebildeten Programm.

Tabelle 8: Programm für die Bisulfit-Konvertierung im Thermocycler.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (mm:ss)
Denaturierung	95	05:00
Inkubation	60	15:00
Denaturierung	95	05:00
Inkubation	60	15:00
Lagerung	20	unbestimmt ^a

Anmerkung. Das Programm umfasst die zweimalige Abfolge einer Denaturierung bei 95 °C und einer Inkubation bei 60 °C. Die Denaturierung führt zur Auftrennung des DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge, was die vollständige Bisulfit-Konvertierung ermöglicht. Anschließend wird die Probe bei 20 °C gelagert.

^a Eine Lagerung der Bisulfit-konvertierten DNA im Thermocycler über Nacht hat keine Performance-Einschränkung zur Folge (QIAGEN 2019).

Die Bisulfit-konvertierte DNA wurde im Anschluss an das Programm im Thermocycler entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C gelagert.

2.7.5 Amplifikation des Bisulfit-konvertierten Genabschnitts von *HECW2* mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Durchführung der Pyrosequenzierung muss die DNA in ausreichender Menge vorhanden sein. Der zu analysierende Bisulfit-konvertierte Genabschnitt von *HECW2* wurde im nächsten Schritt daher mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden der Master Mix, das RNase-freie Wasser und das CoralLoad®-Konzentrat aus dem PyroMark® PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) sowie Vorwärts- und Rückwärts-Primer (siehe Tabelle 6) der metabion international AG (Planegg/Steinkirchen) verwendet. Die Zusammensetzung des Ansatzes für jedes PCR-Tube ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung eines Ansatzes pro PCR-Tube.

Komponente	Menge (µl)
Master Mix	12.5
RNase-freies Wasser	7
CoralLoad®-Konzentrat, 10x	2.5
Vorwärtsprimer	1
Rückwärtsprimer	1
Bisulfit-konvertierte DNA	1
Gesamt	25

Die PCR-Tubes wurden entsprechend dem in Tabelle 10 abgebildeten Programm im peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) inkubiert.

Tabelle 10: Programm für die PCR im Thermocycler.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (mm:ss)
Initiale PCR-Aktivierung	95	15:00
45 x Denaturierung	94	00:30
45 x Annealing	50	00:30
45 x Extension	72	00:30
Finale Extension	72	10:00
Lagerung	4	unbestimmt

Anmerkung. PCR = Polymerase-Kettenreaktion.

Die Proben wurden daraufhin bei –20 °C gelagert.

2.7.6 Gelelektrophorese

Die im Anschluss an die PCR durchgeführte Gelelektrophorese diente der Überprüfung des Erfolgs und der Spezifität der DNA-Amplifikation sowie dem Ausschluss von Verunreinigungen.

Als Trägermedium wurde ein zweiprozentiges Agarosegel mit SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), eingebettet in TRIS-Borat-EDTA-Puffer, 1x (TBE), verwendet. In die Geltaschen wurden je 5 µl des PCR-Produkts gefüllt. Eine Tasche wurde mit 5 µl der 100 bp DNA-Ladder

(Promega Corporation, Madison, WI, USA) und eine als Negativkontrolle mit einer Kontroll-PCR, der keine DNA zugegeben wurde, befüllt. 50 µl der DNA-Ladder wurden zuvor mit 10 µl des Blue/Orange 6x Loading Dyes (Promega Corporation, Madison, WI, USA) vermischt. Die DNA wurde bei einer Spannung von 100 V bzw. 200 mA für 35 min aufgetrennt.

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden unter UV-Licht mit der Geldokumentationssystem E-BOX VX5 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) visualisiert und fotografiert (siehe Beispiel in Anhang 3, Abbildung A1).

2.7.7 Pyrosequenzierung

Die Analyse des DNAm-Levels wurde mittels Pyrosequenzierung, einer Methode zur Gensequenzierung, realisiert.

Das Prinzip der Pyrosequenzierung beruht auf der Messung von Lichtblitzen, die durch enzymatisch katalysierte Reaktionen beim Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) entstehen: An die amplifizierte Einzelstrang-Template-DNA wird ein Primer hybridisiert und das Template anschließend mit den in Tabelle 11 aufgeführten Enzymen und Substraten inkubiert. Entsprechend der durch den ausgewählten Assay vorgegebenen Reihenfolge wird nacheinander jeweils eines der vier Nukleotide hinzugegeben. Handelt es sich dabei um das zur Template-DNA komplementäre dNTP, wird es von der DNA-Polymerase in den DNA-Strang eingebaut und dabei Pyrophosphat (PPi) freigesetzt. Die Menge des freigesetzten PPi ist äquivalent zur Anzahl der eingebauten dNTPs. Die ATP-Sulfurylase baut das PPi mit Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) zu Adenosintriphosphat (ATP) um. Dieses ATP liefert die Energie für die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin durch die Luciferase. Bei dieser Reaktion wird proportional zur ATP-Menge Energie in Form von Licht freigesetzt, das von CCD(*charge-coupled device*)-Sensoren detektiert und als Peak im Pyrogram® sichtbar wird (siehe Beispiel in Anhang 4, Abbildung A2). Nicht-eingebaute dNTPs und überschüssiges ATP werden von der Apyrase abgebaut und nach vollständigem Abbau ein anderes dNTP hinzugegeben. Anstelle des natürlich vorkommenden Nukleotids Desoxyadenosintriphosphat (dATP) wird Desoxyadenosin-alpha-thio-triphosphat (dATPαS) eingesetzt,

welches von der DNA-Polymerase, nicht jedoch von der Luciferase erkannt wird. Die Nukleotidsequenz wird über die Peaks im Pyrogram® ermittelt (QIAGEN 2016). Wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben, kann das Methylierungslevel durch die vorangegangene Bisulfit-Konvertierung bestimmt werden, indem das Verhältnis von eingebautem Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) (komplementär zu Cytosin) zu dATPαS (komplementär zu Thymin) von der PyroMark® Q24 Software untersucht und die prozentuale Methylierung berechnet wird.

Tabelle 11: Übersicht über die Bestandteile und Funktionen des Enzym- und Substratgemischs sowie der Nukleotide, die für die Pyrosequenzierung verwendet wurden.

Reagenzien	Bestandteile	Funktion
Enzymgemisch	DNA-Polymerase	Einbau der der Nukleotide
	ATP-Sulfurylase	Umwandlung von Pyrophosphat in ATP
	Luciferase	Erzeugung des Lichtsignals
	Apyrase	Abbau von ATP und nicht-eingebauten Nukleotiden
	Einzelstrang-bindendes Protein	Verhinderung der Ausbildung von Sekundärstrukturen in der Template-DNA
Substratgemisch	Adenosin-5'-phosphosulfat (APS)	Bildung von ATP
	Luciferin	Substrat für die Luciferase
	dATPαS	
Nukleotide	dCTP	Substrate für die DNA-Polymerase
	dGTP	
	dTTP	

Anmerkung. Anstelle des natürlich vorkommenden Nukleotids Desoxyadenosintriphosphat (dATP) wird Desoxyadenosin-alpha-thio-triphosphat (dATPαS) eingesetzt, da dieses von der Luciferase nicht erkannt wird. ATP = Adenosintriphosphat, dCTP = Desoxycytidintriphosphat, dGTP = Desoxyguanosintriphosphat, dTTP = Desoxythymidintriphosphat. Basierend auf PyroMark® Gold Q24 Reagents Handbook, Version 2009 (QIAGEN 2009).

In dieser Studie wurden der Pyrosequenzierer PyroMark® Q24 (QIAGEN GmbH, Hilden), die Pyromark® Vacuum Workstation (QIAGEN GmbH, Hilden), die PyroMark® Gold Q24 Reagents (QIAGEN GmbH, Hilden), Streptavidin-beschichtete Sepharose®-Beads (Cytiva Sweden AB, Uppsala, Schweden) und

ein Sequenzierungs-Primer der metabion international AG (Planegg/Steinkirchen) verwendet.

Die Sequenz des verwendeten Primers ist in Tabelle 6 abgebildet, der Assay in Anhang 2. Ein exemplarisches Ergebnis der Pyrosequenzierung im Pyrogram® ist ebenfalls im Anhang zu finden (siehe Anhang 4, Abbildung A2).

Abweichend von den Herstellerangaben wurden das Enzym- und Substratgemisch teilweise in der doppelten Menge (1240 µl statt 620 µl) hochreinen Wassers gelöst. Außerdem wurde der Sequenzierungsprimer auf 0.4 µM statt 0.3 µM verdünnt.

Jede Probe wurde zweimal analysiert (inklusive PCR, Gelelektrophorese und Pyrosequenzierung). Bei einem Unterschied der prozentualen Methylierung beider Analysen von weniger als 3 Prozentpunkten wurde der Mittelwert gebildet und für die statistische Auswertung verwendet. Bei einem Unterschied von ≥ 3 Prozentpunkten wurden die PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung dieser Probe wiederholt. Dies war bei elf Speichelproben notwendig.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Fragebogen und der Methylierungslevel wurde mit IBM® SPSS® Statistics, Version 29.0.0.0, durchgeführt. Diagramme wurden mit SPSS erstellt und mit Affinity Publisher sowie Affinity Designer, Version 1.10.6, bearbeitet. Die Grafiken wurden mit BioRender.com erstellt.

Die Charakteristika der Fragebogen und der DNAm wurden als Mittelwert (M) mit Standardabweichung (SD) sowie Median (Mdn) mit minimalem (x_{min}) und maximalem (x_{max}) Wert angegeben.

2.8.1 Normalverteilungsanalyse

Die Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde jeweils pro (Sub-)Gruppe, Variable und Zeitpunkt (siehe Anhang 6, Tabelle A1 und Tabelle A3) bzw. Differenz zweier Zeitpunkte (siehe Anhang 6, Tabelle A2 und Tabelle A4; für Analysen mit abhängigen Variablen) statistisch mit dem Shapiro-Wilk-Test sowie grafisch mittels Histogramms durchgeführt. Für $p > .05$ und entsprechender grafischer Darstellung wurde eine normalverteilte, für $p < .05$ und passendem Diagramm eine nicht normalverteilte Stichprobe angenommen. Die meisten

Daten, sowohl die der DNAm als auch die der Fragebogen, waren bei mind. einer der beiden (Sub-)Gruppen entweder statistisch und/oder grafisch nicht normalverteilt (siehe Anhang 6, Tabelle A1 bis Tabelle A4).

2.8.2 Identifikation und Ausschluss von Ausreißern

DNAm-Werte, die grafisch das 1.5-Fache des Interquartilsabstands (*IQA*) überschritten, wurden als Ausreißer bewertet und von den Analysen ausgeschlossen, da technische oder biologische Besonderheiten als Ursache nicht auszuschließen waren. Hierzu wurden jeweils die Boxplots pro Variable (DNAm in Blut bzw. Speichel), Gruppe (Patienten bzw. Kontrollprobanden) und Zeitpunkt betrachtet. Bei der DNAm der Blutproben wurde ein Wert eines Patienten (T1) und vier Werte von Kontrollprobanden (einer zu T1, zwei zu T2 und einer zu T3) ausgeschlossen. Bei der DNAm der Speichelproben wurden sieben Werte von Patienten (drei zu T1, zwei zu T2, jeweils einer zu T3 und T4) und acht Werte von Kontrollprobanden (drei zu T1, zwei zu T2, zwei zu T3 und einer zu T4) ausgeschlossen. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die ausgeschlossenen Ausreißer, aufgeteilt nach leichten ($> 1.5 \times IQA$) und extremen ($> 3 \times IQA$) Ausreißern.

Tabelle 12: Bericht über ausgeschlossene Ausreißer. Analysiert pro Variable, Gruppe (Patienten/Kontrollprobanden) und Zeitpunkt.

Variable	Zeitpunkt	Patienten		Kontrollprobanden	
		$> 1.5 \times IQA$	$> 3 \times IQA$	$> 1.5 \times IQA$	$> 3 \times IQA$
DNAm in Blut	T1	1	0	1	0
	T2	0	0	2	0
	T3	0	0	1	0
	T4	0	0	0	0
DNAm in Speichel	T1	1	2	1	2
	T2	1	1	2	0
	T3	1	0	2	0
	T4	1	0	1	0

Anmerkung. Ausreißer wurden grafisch (mittels Boxplots) ermittelt und ausgeschlossen bei $> 1.5 \times$ Interquartilsabstand. *IQA* = Interquartilsabstand, DNAm = DNA-Methylierung.

Ausreißer in den weiteren und den nach Subgruppen aufgeteilten Analysen wurden im Datensatz belassen, da sie biologisch und technisch plausibel waren und ihr Ausschluss die Stichprobengröße und damit die statistische Power eingeschränkt hätte. Zudem wurden aufgrund überwiegend nicht-normalverteilter Daten (vgl. Abschnitt 2.8.1) ausschließlich nicht-parametrische Tests verwendet, die nicht sensitiv auf Ausreißer reagieren. Ausreißer bei den Fragebogen-Scores wurden im Datensatz belassen, da sie nicht wie die DNAm-Werte durch technische oder biologische Besonderheiten verzerrt sein konnten und bei den Kontrollprobanden das Spektrum verschiedener Gewohnheiten des Alkoholkonsums außerhalb der Alkoholabhängigkeit abbildeten.

2.8.3 Statistische Tests

Aufgrund überwiegend nicht-normalverteilter Daten wurden ausschließlich nicht-parametrische Verfahren angewendet: für den Vergleich von zwei unabhängigen Variablen (Vergleich von Patienten und Kontrollprobanden) der Mann-Whitney-U-Test, für den Vergleich von drei unabhängigen Variablen (Vergleich von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden) der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Dunns Post-hoc-Test, für abhängige Variablen (Messzeitpunktwiederholungen) der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Für die Analyse von Korrelationen wurde die Rangkorrelation nach Spearman verwendet. Auf die Anwendung des Friedman-Tests für die Analyse der Messzeitpunktwiederholungen wurde verzichtet, da der Informationsverlust aufgrund der nötigen Stichprobenverkleinerung auf die jeweils kleinste Stichprobengröße der vier Studienzeitpunkte sehr groß geworden wäre. Der dadurch resultierenden multiplen Testung mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und konsekutiver Vergrößerung des α -Fehlers wurde mit der Anwendung der Bonferroni-Holm-Korrektur Rechnung getragen. Für den Mann-Whitney-U-Test, die Untersuchung des Zusammenhangs der DNAm mit dem Alter mittels Rangkorrelation nach Spearman, den Kruskal-Wallis-Test sowie Dunns Post-hoc-Tests wurde das Signifikanzniveau ebenfalls nach Bonferroni-Holm für die vier Messzeitpunkte sowie im Falle von Dunns Post-hoc-Tests zusätzlich für die drei (Sub-)Gruppen angepasst, um die *Family-wise Error Rate* zu kontrollieren. Dazu wurden die *p*-Werte der entsprechenden Analysen zunächst in

aufsteigender Reihe angeordnet (jeweiliger Rang in den Tabellen aufgeführt). Das Signifikanzniveau α (hier allgemein auf .05 festgelegt) wurde anschließend wie folgt angepasst: Für den kleinsten p -Wert galt α/k , mit k = Gesamtzahl der Vergleiche, für den zweitkleinsten p -Wert $\alpha/(k-1)$, für den drittkleinsten $\alpha/(k-2)$ bis zum größten p -Wert mit $\alpha/1$. Sobald ein p -Wert größer als das korrigierte Signifikanzniveau war, wurden alle folgenden (größereren) p -Werte als statistisch nicht signifikant betrachtet.

Der Vergleich zweier (Sub-)Gruppen hinsichtlich nominal skalierten Variablen erfolgte mittels Chi-Quadrat-Tests nach Pearson bzw. exaktem Test nach Fisher, wenn mind. eine der erwarteten Zellhäufigkeiten unter 5 lag.

Beim Mann-Whitney-U-Test und dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde je nach Größe der Gesamtstichprobe N des Tests die asymptotische (für $N \geq 30$) oder die exakte (für $N < 30$) zweiseitige Signifikanz berichtet (Dinneen und Blakesley 1973). Letzteres wurde zusätzlich erwähnt. Für den exakten Test nach Fisher wurde ebenfalls die exakte zweiseitige Signifikanz berichtet.

Signifikante Ergebnisse wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Für die Effektstärke wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet ($r = \frac{|Z|}{\sqrt{N}}$), wobei nach Cohen (1992) $.1 \leq r < .3$ einen kleinen, $.3 \leq r < .5$ einen mittleren und $r \geq .5$ einen starken Effekt anzeigt (Cohen 1992). Die gleiche Einteilung wurde für den Rangkorrelationskoeffizienten r_s nach Spearman bei der Analyse von Korrelationen sowie für ϕ bei der Anwendung des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson bzw. des exakten Tests nach Fisher verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Demografische Charakteristika der Studienkohorten

Insgesamt wurden 149 Teilnehmer in die Studie eingeschlossen. Das Alter der 68 Patienten lag zwischen 21 und 71 Jahren, mit einem durchschnittlichen Alter von 49.54 Jahren ($SD = 11.02$). Das Alter der 81 Kontrollprobanden lag zwischen 20 und 69 Jahren, mit einem durchschnittlichen Alter von 41.04 Jahren ($SD = 13.66$) (siehe Tabelle 13). Der Altersunterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch signifikant ($U(67,81) = 1696.5$, $Z = -3.919$, $p < .001^*$, $r = .322$).

Das Patientenkollektiv bestand aus 24 weiblichen und 44 männlichen Teilnehmern, das Kontrollprobandenkollektiv aus 54 weiblichen und 27 männlichen Teilnehmern (siehe Tabelle 13). Dies entsprach einem statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Gruppe und Geschlecht ($\chi^2(1) = 14.586$, $p < .001^*$, $\phi = .313$).

Unter den Patienten mit bekanntem Raucherstatus (64 von 68 Patienten) waren 49 Raucher (76.6 % der Patienten mit bekanntem Raucherstatus), während unter den Kontrollprobanden mit bekanntem Raucherstatus (79 von 81 Kontrollprobanden) nur 4 Raucher waren (5.1 % der Kontrollprobanden mit bekanntem Raucherstatus) (siehe Tabelle 13). Der Zusammenhang zwischen Gruppe und Raucherstatus war statistisch signifikant ($\chi^2(1) = 77.487$, $p < .001^*$, $\phi = -.736$).

Tabelle 13: Deskriptive Analyse der Charakteristika der Studienteilnehmer getrennt nach Gruppen.

		Patienten ($n = 68$)	Kontrollprobanden ($n = 81$)	Signifikanz
Mittleres Alter $\pm SD$		49.54 $\pm$ 11.02	41.04 $\pm$ 13.66	$p < .001^*$
Geschlecht	weiblich	$n = 24$ (35.3 %)	$n = 54$ (66.7 %)	$p < .001^*$
	männlich	$n = 44$ (64.7 %)	$n = 27$ (33.3 %)	
Raucher	ja	$n = 49$ (76.6 %)	$n = 4$ (5.1 %)	$p < .001^*$
	nein	$n = 15$ (23.4 %)	$n = 75$ (94.9 %)	

Anmerkung. Durchschnittsalter in Jahren. Prozentangabe entspricht dem Anteil innerhalb der jeweiligen Gruppe (mit bekanntem Status). Mann-Whitney-U-Test (Alter) bzw. Chi-Quadrat-Test (Geschlecht und Rauchen). * = statistisch signifikant. n = Größe der Teilstichprobe, SD = Standardabweichung.

Die Abbruchrate der Studienteilnahme über den gesamten Zeitraum betrug 79.4 % für die Patienten und 38.3 % für die Kontrollprobanden (vgl. Abbildung 2). Ursächlich waren persönliche oder logistische Gründe, ein Kontaktverlust durch veränderte Kontaktdaten sowie die Tatsache, dass die Rekrutierung zum Zeitpunkt der Datenauswertung noch nicht abgeschlossen war. Es standen 3 T3- und 8 T4-Studientermine von Patienten sowie 17 T4-Studientermine von Kontrollprobanden aus. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Stichprobengrößen zu T1 bis T4 sowie den *Loss to follow-up*. Die Stichprobengrößen der statistischen Tests weichen teilweise ab, da nicht von allen Probanden zu jedem Studienzeitpunkt Blut- und Speichelproben oder alle Fragebogen vorhanden waren.

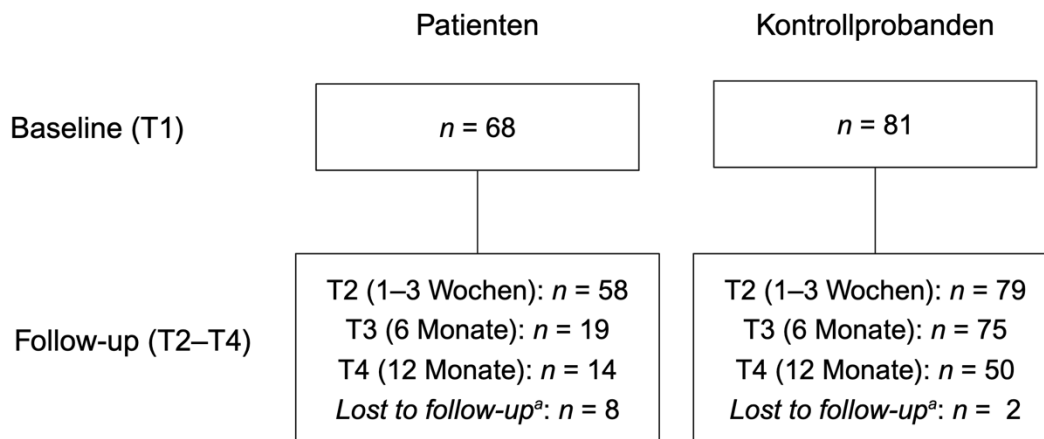


Abbildung 2: Übersicht der Stichprobengrößen zu T1–T4 und *Loss to follow-up*. *n* = Größe der Teilstichprobe. Erstellt mit BioRender.com.

^a *Lost to follow-up* wurde definiert als fehlend zu allen Follow-ups (T2–T4).

Die Patienten wurden entsprechend ihrem Rückfallstatus zu T3 oder T4 in zwei Subgruppen unterteilt (rückfällige bzw. nicht-rückfällige Patienten). Ein Rückfall wurde angenommen, wenn der letzte Alkoholkonsum zu T3 (im OCDS-Fragebogen dokumentiert, siehe Anhang 5.3) etwa 180 Tage oder zu T4 etwa 365 Tage unterschritt und zusätzlich der AUDIT-Score und/oder der OCDS-Score mind. 16 betrug. Bei 6 Patienten, die zu T3 und T4 nicht an der Studie teilnahmen, konnte der Rückfallstatus telefonisch oder per E-Mail ermittelt werden. Für die Auswertung wurden die Patienten mit bekanntem Rückfallstatus zu T3 oder T4 bereits ab T1 in die genannten Subgruppen eingeteilt. Die

Bezeichnung rückfällige bzw. nicht-rückfällige Patienten bezieht sich nicht auf den Krankheitsverlauf vor Aufnahme in diese Studie.

Bei 29 der insgesamt 68 Patienten lagen Informationen über den Rückfallstatus im Verlauf der Studie vor. 21 dieser 29 Patienten (72.4 %) wurden nach der Entzugsbehandlung innerhalb des Studienzeitraums rückfällig, 8 Patienten (27.6 %) nicht. Von den 21 rückfälligen Patienten wurden mind. 14, also 66.7 %, innerhalb des ersten halben Jahres nach Therapiebeginn rückfällig. Für 7 Patienten lag keine Information über den Zeitpunkt des Rückfalls vor.

Das Alter der 21 im Verlauf rückfällig gewordenen Patienten lag zwischen 21 und 62 Jahren, mit einem durchschnittlichen Alter von 43.71 Jahren ($SD = 10.41$). Das Alter der nicht-rückfälligen Patienten lag zwischen 47 und 69 Jahren, mit einem durchschnittlichen Alter von 56.75 Jahren ($SD = 7.42$) (siehe Tabelle 14). Der Altersunterschied zwischen beiden Subgruppen war signifikant ($U(21,8) = 23.0$, $Z = -2.981$, $p = .002^*$, $r = .554$) (exakte Signifikanz angegeben). Die Kohorte der rückfälligen Patienten bestand aus 10 weiblichen und 11 männlichen Teilnehmern, die Kohorte der nicht-rückfälligen Patienten aus 1 weiblichen und 7 männlichen Teilnehmern (siehe Tabelle 14). Der Zusammenhang zwischen Subgruppe und Geschlecht war statistisch nicht signifikant ($\chi^2(1) = 3.035$, $p = .110$, $\phi = .323$) (exakte Signifikanz angegeben). Unter den rückfälligen Patienten waren 16 Raucher (76.2 % aller rückfälligen Patienten), während unter den nicht-rückfälligen Patienten 4 Raucher waren (50.0 % aller nicht-rückfälligen Patienten) (siehe Tabelle 14). Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten hinsichtlich Raucherstatus ($\chi^2(1) = 1.857$, $p = .209$, $\phi = .253$) (exakte Signifikanz angegeben).

Tabelle 14: Deskriptive Analyse der Charakteristika der Studienteilnehmer getrennt nach Rückfallstatus.

	rückfällige Patienten (<i>n</i> = 21)	nicht-rückfällige Patienten (<i>n</i> = 8)	Signifikanz
Mittleres Alter ± <i>SD</i>	43.71 ± 10.41	56.75 ± 7.42	<i>p</i> = .002*
Geschlecht weiblich	<i>n</i> = 10 (47.6 %)	<i>n</i> = 1 (12.5 %)	<i>p</i> = .110
männlich	<i>n</i> = 11 (52.4 %)	<i>n</i> = 7 (87.5 %)	
Raucher ja	<i>n</i> = 16 (76.2 %)	<i>n</i> = 4 (50.0 %)	<i>p</i> = .209
nein	<i>n</i> = 5 (23.8 %)	<i>n</i> = 4 (50.0 %)	

Anmerkung. Durchschnittsalter in Jahren. Prozentangabe entspricht dem Anteil innerhalb der jeweiligen Subgruppe (mit bekanntem Status). Mann-Whitney-U-Test (Alter) bzw. exakter Test nach Fisher (Geschlecht und Rauchen). * = statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, *SD* = Standardabweichung.

3.2 Vergleich der Fragebogen-Scores zwischen den (Sub-)Gruppen und über die Zeit

Die mittleren Fragebogen-Scores inklusive Standardabweichung sowie die Mediane mit minimalem und maximalem Wert der drei unter 2.3 näher beschriebenen Fragebogen zur psychometrischen Erfassung von psychischer Belastung (GSI), Alkoholkonsum (AUDIT) und Alkoholverlangen (OCDS) sind in Tabelle 15 bzw. Tabelle 16 jeweils getrennt nach (Sub-)Gruppen (Patienten und Kontrollprobanden bzw. rückfällige und nicht-rückfällige Patienten) dargestellt. Die statistischen Analysen sind in den folgenden Abschnitten (3.2.1–3.2.3) genauer beschrieben.

Tabelle 15: Deskriptive Analyse der GSI-, AUDIT- und OCDS-Scores von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.

Variable	Zeitpunkt	Patienten			Kontrollprobanden		
		<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)
GSI	T1	62	65.77 (9.72)	65.0 (44.0–80.0)	81	45.69 (8.88)	46.0 (26.0–68.0)
	T2	53	55.83 (11.07)	55.0 (36.0–80.0)	76	44.49 (9.10)	44.0 (26.0–67.0)
	T3	18	60.83 (10.45)	62.0 (41.0–80.0)	75	44.88 (8.71)	45.0 (26.0–66.0)
	T4	14	58.86 (14.21)	58.0 (35.0–80.0)	50	45.24 (8.62)	44.0 (26.0–61.0)
AUDIT	T1	60	26.42 (8.01)	27.5 (5.0–38.0)	81	3.12 (2.49)	2.0 (0.0–11.0)
	T2	30	22.10 (9.04)	23.0 (2.0–37.0)	46	3.33 (2.54)	3.0 (0.0–11.0)
	T3	18	19.89 (10.09)	18.5 (4.0–38.0)	71	2.95 (2.80)	2.0 (0.0–12.5)
	T4	10	21.50 (13.20)	23.5 (1.0–44.0)	40	2.18 (1.92)	2.0 (0.0–9.0)
OCDS	T1	61	21.26 (7.60)	21.0 (4.0–40.0)	77	2.16 (2.70)	1.0 (0.0–15.0)
	T2	56	13.35 (6.26)	13.0 (1.0–34.0)	78	1.72 (2.26)	1.0 (0.0–13.0)
	T3	18	13.33 (9.12)	12.5 (0.0–32.0)	74	1.71 (2.16)	1.0 (0.0–9.0)
	T4	15	13.93 (9.58)	12.0 (1.0–37.0)	49	1.51 (1.88)	1.0 (0.0–9.0)

Anmerkung. *n* = Größe der Teilstichprobe, *M* = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung, *Mdn* = Median, *x_{min}* = Minimum, *x_{max}* = Maximum, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

Tabelle 16: Deskriptive Analyse der GSI-, AUDIT- und OCDS-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu T1–T4.

Variable	Zeitpunkt	rückfällige Patienten			nicht-rückfällige Patienten		
		<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)
GSI	T1	20	67.10 (10.87)	65.5 (44.0–80.0)	8	60.88 (8.86)	64.0 (46.0–75.0)
	T2	19	56.32 (13.79)	56.0 (36.0–80.0)	7	52.00 (7.72)	55.0 (40.0–59.0)
	T3	13	63.46 (9.64)	64.0 (46.0–80.0)	5	54.00 (10.22)	55.0 (41.0–68.0)
	T4	9	60.11 (16.42)	61.0 (35.0–80.0)	5	56.60 (10.36)	55.0 (42.0–68.0)
AUDIT	T1	21	27.62 (6.72)	28.0 (14.0–38.0)	8	23.25 (7.94)	25.5 (11.0–35.0)
	T2	9	22.67 (9.35)	23.0 (5.0–37.0)	5	21.40 (3.78)	23.0 (17.0–26.0)
	T3	13	24.31 (7.83)	22.0 (15.0–38.0)	5	8.40 (4.56)	8.0 (4.0–16.0)
	T4	8	26.50 (9.01)	26.5 (15.0–44.0)	2	1.50 (0.71)	1.5 (1.0–2.0)
OCDS	T1	21	23.45 (6.88)	23.0 (11.0–38.0)	7	19.86 (3.34)	20.0 (15.0–26.0)
	T2	19	13.74 (4.81)	13.0 (6.0–22.0)	8	12.63 (4.69)	11.5 (7.0–21.0)
	T3	13	17.08 (7.41)	15.0 (7.0–32.0)	5	3.60 (4.98)	2.0 (0.0–12.0)
	T4	10	18.40 (8.03)	19.0 (10.0–37.0)	5	5.00 (5.15)	2.0 (1.0–12.0)

Anmerkung. *n* = Größe der Teilstichprobe, *M* = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung, *Mdn* = Median, *x_{min}* = Minimum, *x_{max}* = Maximum, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

3.2.1 Psychische Belastung (GSI)

Die GSI-Scores der Patienten (Median zu T1 (Mdn_{T1}) = 65.0, Mdn_{T2} = 55.0, Mdn_{T3} = 62.0, Mdn_{T4} = 58.0) waren im Vergleich zu denen der Kontrollprobanden

($Mdn_{T1} = 46.0$, $Mdn_{T2} = 44.0$, $Mdn_{T3} = 45.0$, $Mdn_{T4} = 44.0$) zu allen vier Zeitpunkten auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant erhöht (T1: $U(62,81) = 317.5$, $Z = -8.942$, $p < .001^*$, $r = .748$; T2: $U(53,76) = 866.5$, $Z = -5.498$, $p < .001^*$, $r = .484$; T3: $U(18,75) = 163.5$, $Z = -4.978$, $p < .001^*$, $r = .516$; T4: $U(14,50) = 151.5$, $Z = -3.229$, $p = .001^*$, $r = .404$) (siehe Tabelle 17 und Abbildung 3). Nach Cohen (1992) handelte es sich zu T2 und T4 um mittlere und zu T1 und T3 um starke Effekte.

Tabelle 17: Unterschiede der GSI-Scores von Patienten und Kontrollprobanden.

Zeitpunkt	n (P,K)	Mdn_P	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	62,81	65.0	46.0	$< .001^*$	1	$.05/4 = .013$
T2	53,76	55.0	44.0	$< .001^*$	2	$.05/3 = .017$
T3	18,75	62.0	45.0	$< .001^*$	3	$.05/2 = .025$
T4	14,50	58.0	44.0	$.001^*$	4	$.05/1 = .050$

Anmerkung. Mann-Whitney-U-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, Mdn_P = Median der Patienten, Mdn_K = Median der Kontrollprobanden, GSI = *Global Severity Index*.

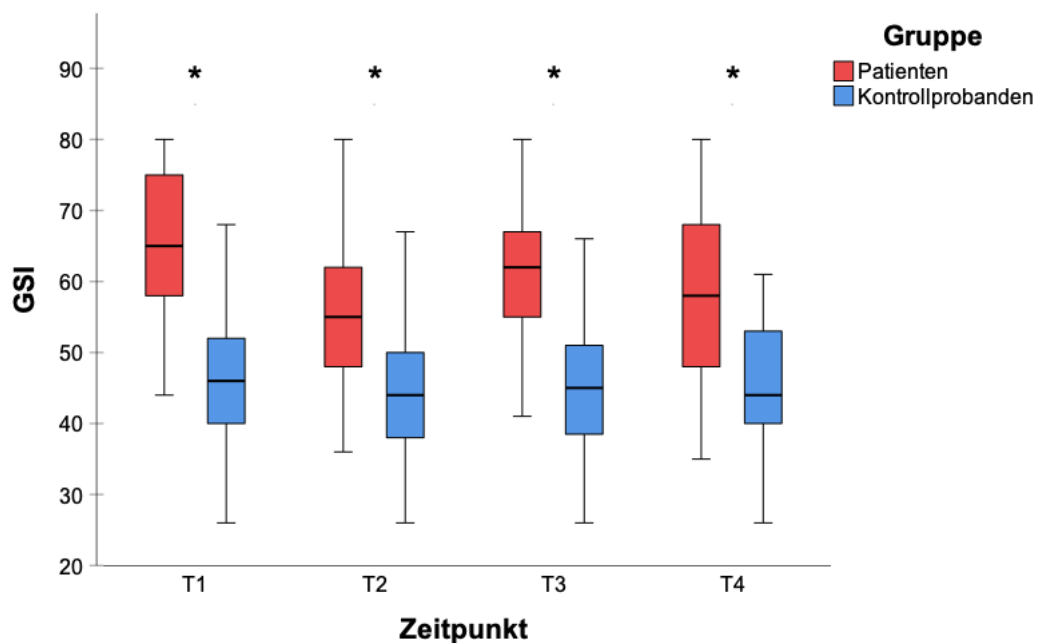


Abbildung 3: Vergleich der GSI-Scores von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1(62,81), T2(53,76), T3(18,75), T4(14,50). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, GSI = *Global Severity Index*.

Die GSI-Scores der Patienten sanken von T1 zu T2 signifikant von einem Median von 65.0 auf 55.0 (T1/T2: $Z = -5.444$, $p < .001^*$, $r = .762$, $N = 51$). Von T2 zu T3 stiegen sie wieder signifikant auf 62.0 (T2/T3: $Z = -2.848$, $p = .003^*$, $r = .712$, $N = 16$), blieben jedoch unterhalb des Ausgangsniveaus, bevor sie von T3 zu T4 erneut auf 58.0 absanken (nicht signifikant, T3/T4: $Z = -0.561$, $p = .617$, $r = .177$, $N = 10$). Von T2 zu T4 konnte ein signifikanter Anstieg beobachtet werden (T2/T4: $Z = -2.671$, $p = .005^*$, $r = .741$, $N = 13$) (bis auf T1/T2 (asymptotische) jeweils exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 18 und Abbildung 4). Die GSI-Scores der Kontrollprobanden blieben hingegen, wie in Tabelle 19 und Abbildung 4 gezeigt, über alle Zeitpunkte hinweg auf einem ähnlichen Niveau von 44.0 bis 46.0 (Mediane) (T1/T2: $Z = -2.204$, $p = .028$, $r = .253$, $N = 76$; T1/T3: $Z = -0.698$, $p = .485$, $r = .081$, $N = 75$; T1/T4: $Z = -0.896$, $p = .371$, $r = .127$, $N = 50$; T2/T3: $Z = -0.769$, $p = .442$, $r = .091$, $N = 72$; T2/T4: $Z = -0.175$, $p = .861$, $r = .025$, $N = 48$; T3/T4: $Z = -1.132$, $p = .258$, $r = .162$, $N = 49$).

Tabelle 18: Unterschiede der GSI-Scores von Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	51	65.0	55.0	< .001*	1	.05/6 = .008
T1/T3	18	65.0	62.0	.148	5	.05/2 = .025
T1/T4	13	65.0	58.0	.026	4	.05/3 = .017
T2/T3	16	55.0	62.0	.003*	2	.05/5 = .010
T2/T4	13	55.0	58.0	.005*	3	.05/4 = .013
T3/T4	10	62.0	58.0	.617	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Bis auf T1/T2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, GSI = *Global Severity Index*.

Tabelle 19: Unterschiede der GSI-Scores von Kontrollprobanden über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	76	46.0	44.0	.028	1	.05/6 = .008
T1/T3	75	46.0	45.0	.485	5	.05/2 = .025
T1/T4	50	46.0	44.0	.371	3	.05/4 = .013

Zeitpunkte	N	Mdn_1	Mdn_2	p-Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T2/T3	72	44.0	45.0	.442	4	.05/3 = .017
T2/T4	48	44.0	44.0	.861	6	.05/1 = .050
T3/T4	49	45.0	44.0	.258	2	.05/5 = .010

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. N = Größe der Gesamtstichprobe, Mdn_1 = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, Mdn_2 = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, GSI = *Global Severity Index*.

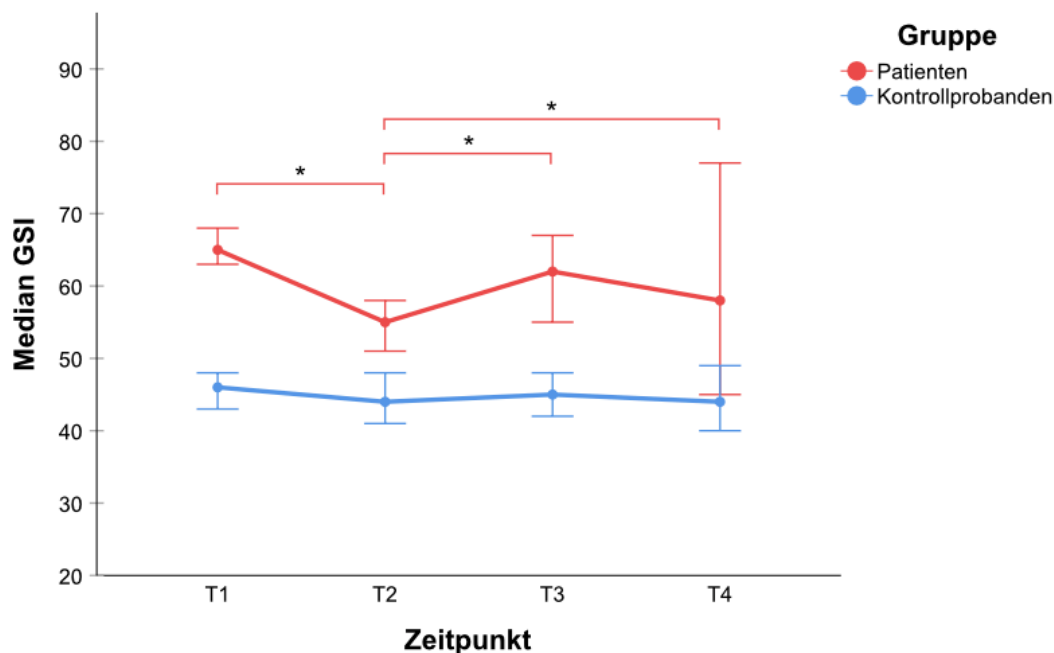


Abbildung 4: Entwicklung der GSI-Scores von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1/T2(51,76), T1/T3(18,75), T1/T4(13,50), T2/T3(16,72), T2/T4(13,48), T3/T4(10,49). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, GSI = *Global Severity Index*.

Die drei (Sub-)Gruppen (rückfällige und nicht-rückfällige Patienten sowie Kontrollprobanden) unterschieden sich in ihren GSI-Scores zu allen vier Zeitpunkten signifikant (T1: $H(2) = 45.094$, $p < .001^*$, $N = 109$; T2: $H(2) = 13.901$, $p < .001^*$, $N = 102$; T3: $H(2) = 26.225$, $p < .001^*$, $N = 93$; T4: $H(2) = 10.433$, $p = .005^*$, $N = 64$).

Die GSI-Scores der rückfälligen Patienten ($Mdn_{T1} = 65.5$, $Mdn_{T2} = 56.0$, $Mdn_{T3} = 64.0$, $Mdn_{T4} = 61.0$) waren zu allen Zeitpunkten höher als die der nicht-rückfälligen Patienten ($Mdn_{T1} = 64.0$, $Mdn_{T2} = 55.0$, $Mdn_{T3} = 55.0$, $Mdn_{T4} = 55.0$), jedoch ohne signifikanten Unterschied (T1: $Z = -0.676$, $p = .499$, $r = .128$, $n(R,N) = 20,8$; T2: $Z = -0.061$, $p = .951$, $r = .012$, $n(R,N) = 19,7$; T3: $Z = -1.202$,

$p = .229$, $r = .283$, $n(R,N) = 13,5$); T4: $Z = 0.093$, $p = .926$, $r = .025$, $n(R,N) = 9,5$; Nach Cohen (1992) handelte es sich um kleine Effekte. Die GSI-Scores sowohl der rückfälligen als auch der nicht-rückfälligen Patienten waren außerdem zu allen Zeitpunkten höher als die der Kontrollprobanden. Von T1 bis T3 war dieser Unterschied zwischen rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden signifikant (T1: $Z = 6.189$, $p < .001^*$, $r = .616$, $n(R,K) = 20,81$; T2: $Z = 3.330$, $p < .001^*$, $r = .342$, $n(R,K) = 19,76$; T3: $Z = 4,934$, $p < .001^*$, $r = .526$, $n(R,K) = 13,75$). Nach Cohen (1992) handelte es sich zu T1 und T3 um einen starken und zu T2 um einen mittleren Effekt. Zu T4 handelte es sich ebenfalls um einen mittleren Effekt, der jedoch auf dem korrigierten Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm nicht als signifikant nachgewiesen werden konnte (T4: $Z = 2.645$, $p = .008$, $r = .344$, $n(R,K) = 9,50$). Zwischen den nicht-rückfälligen Patienten und den Kontrollprobanden war der Unterschied bei einem mittleren Effekt nur zu T1 signifikant (T1: $Z = 3.407$, $p < .001^*$, $r = .361$, $n(N,K) = 8,81$). Zu den späteren Zeitpunkten gab es nur kleine, nicht signifikante Effekte (T2: $Z = 2.094$, $p = .036$, $r = .230$, $n(N,K) = 7,76$; T3: $Z = 1.840$, $p = .066$, $r = .206$, $n(N,K) = 5,75$; T4: $Z = 2.153$, $p = .031$, $r = .290$, $n(N,K) = 5,50$) (siehe Tabelle 20 und Abbildung 5).

Tabelle 20: Unterschiede der GSI-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.

Zeitpunkt	n (R,N)	Mdn_R	Mdn_N	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	20,8	65.5	64.0	.499	10	.05/3 = .017
T2	19,7	56.0	55.0	.951	12	.05/1 = .050
T3	13,5	64.0	55.0	.229	9	.05/4 = .013
T4	9,5	61.0	55.0	.926	11	.05/2 = .025
Zeitpunkt	n (R,K)	Mdn_R	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	20,81	65.5	46.0	< .001*	1	.05/12 = .004
T2	19,76	56.0	44.0	< .001*	4	.05/9 = .006
T3	13,75	64.0	45.0	< .001*	2	.05/11 = .005
T4	9,50	61.0	44.0	.008	5	.05/8 = .006

Zeitpunkt	<i>n</i> (N,K)	<i>Mdn_N</i>	<i>Mdn_K</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	8,81	64.0	46.0	< .001*	3	.05/10 = .005
T2	7,76	55.0	44.0	.036	7	.05/6 = .008
T3	5,75	55.0	45.0	.066	8	.05/5 = .010
T4	5,50	55.0	44.0	.031	6	.05/7 = .007

Anmerkung. Dunns Post-hoc-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, *Mdn_R* = Median der rückfälligen Patienten, *Mdn_N* = Median der nicht-rückfälligen Patienten, *Mdn_K* = Median der Kontrollprobanden, GSI = *Global Severity Index*.

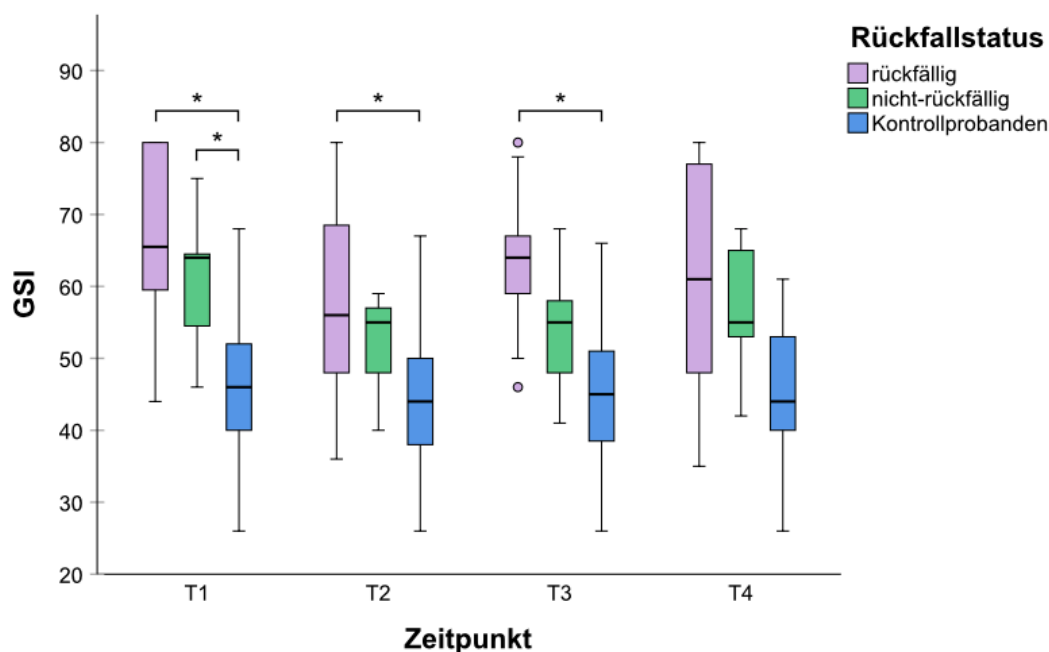


Abbildung 5: Vergleich der GSI-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4. Kreise entsprechen leichten Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Dunns Post-hoc-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1(20,8,81), T2(19,7,76), T3(13,5,75), T4(9,5,50). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, GSI = *Global Severity Index*.

Die GSI-Scores der rückfälligen Patienten sanken von T1 zu T2 signifikant (T1/T2: $Z = -3.504$, $p < .001^*$, $r = .826$, $N = 18$), stiegen von T2 zu T3 wieder fast bis auf das Ausgangsniveau an (nicht signifikant, T2/T3: $Z = -2.358$, $p = .015$, $r = .711$, $N = 11$) und sanken von T3 zu T4 erneut leicht ab (nicht signifikant, T3/T4: $Z = -0.944$, $p = .438$, $r = .385$, $N = 6$) (jeweils exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 21 und Abbildung 6). Bei den nicht-rückfälligen Patienten zeigte sich von T1 zu T2 ebenfalls ein starker, jedoch nicht signifikanter Abwärtstrend (T1/T2: $Z = -1.997$, $p = .063$, $r = .755$, $N = 7$) (T1/T3: $Z = -1.214$,

$p = .313$, $r = .543$, $N = 5$), woraufhin die Scores bis zu T4 auf einem Niveau von 55.0 blieben (jeweils exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 22 und Abbildung 6).

Tabelle 21: Unterschiede der GSI-Scores von rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	18	65.5	56.0	< .001*	1	.05/6 = .008
T1/T3	13	65.5	64.0	.366	5	.05/2 = .025
T1/T4	8	65.5	61.0	.031	4	.05/3 = .017
T2/T3	11	56.0	64.0	.015	2	.05/5 = .010
T2/T4	9	56.0	61.0	.016	3	.05/4 = .013
T3/T4	6	64.0	61.0	.438	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, GSI = *Global Severity Index*.

Tabelle 22: Unterschiede der GSI-Scores von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	7	64.0	55.0	.063	1	.05/6 = .008
T1/T3	5	64.0	55.0	.313	3	.05/4 = .013
T1/T4	5	64.0	55.0	.438	4	.05/3 = .017
T2/T3	5	55.0	55.0	.188	2	.05/5 = .010
T2/T4	4	55.0	55.0	.500	5	.05/2 = .025
T3/T4	4	55.0	55.0	.750	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, GSI = *Global Severity Index*.

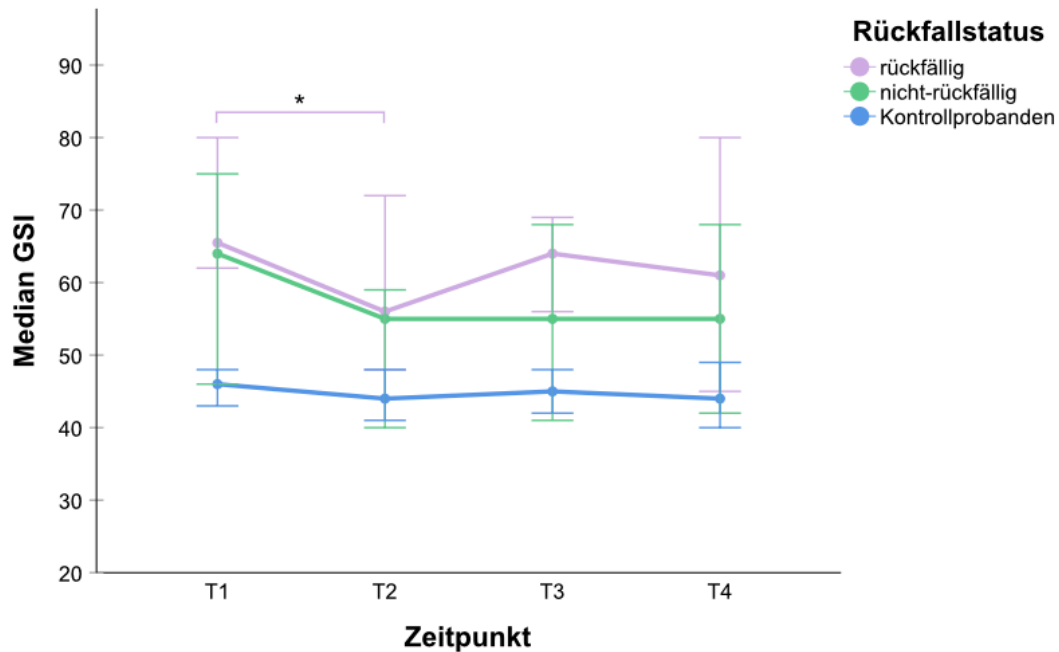


Abbildung 6: Entwicklung der GSI-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1/T2(18,7,76), T1/T3(13,5,75), T1/T4(8,5,50), T2/T3(11,5,72), T2/T4(9,4,48), T3/T4(6,4,49). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, GSI = *Global Severity Index*.

3.2.2 Alkoholkonsum (AUDIT)

Die AUDIT-Scores der Patienten ($Mdn_{T1} = 27.5$, $Mdn_{T2} = 23.0$, $Mdn_{T3} = 18.5$, $Mdn_{T4} = 23.5$) waren im Vergleich zu den Kontrollprobanden ($Mdn_{T1} = 2.0$, $Mdn_{T2} = 3.0$, $Mdn_{T3} = 2.0$, $Mdn_{T4} = 2.0$) zu allen vier Zeitpunkten signifikant erhöht (T1: $U(60,81) = 22.5$, $Z = -10.069$, $p < .001^*$, $r = .848$; T2: $U(30,46) = 54.5$, $Z = -6.781$, $p < .001^*$, $r = .778$; T3: $U(18,71) = 37.0$, $Z = -6.218$, $p < .001^*$, $r = .659$; T4: $U(10,40) = 46.5$, $Z = -3.802$, $p < .001^*$, $r = .538$) (siehe Tabelle 23 und Abbildung 7). Nach Cohen (1992) handelte es sich dabei um starke Effekte.

Tabelle 23: Unterschiede der AUDIT-Scores von Patienten und Kontrollprobanden.

Zeitpunkt	<i>n</i> (P,K)	<i>Mdn_P</i>	<i>Mdn_K</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	60,81	27.5	2.0	< .001*	1	.05/4 = .013
T2	30,46	23.0	3.0	< .001*	2	.05/3 = .017
T3	18,71	18.5	2.0	< .001*	3	.05/2 = .025
T4	10,40	23.5	2.0	< .001*	4	.05/1 = .050

Anmerkung. Mann-Whitney-U-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, *Mdn_P* = Median der Patienten, *Mdn_K* = Median der Kontrollprobanden, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

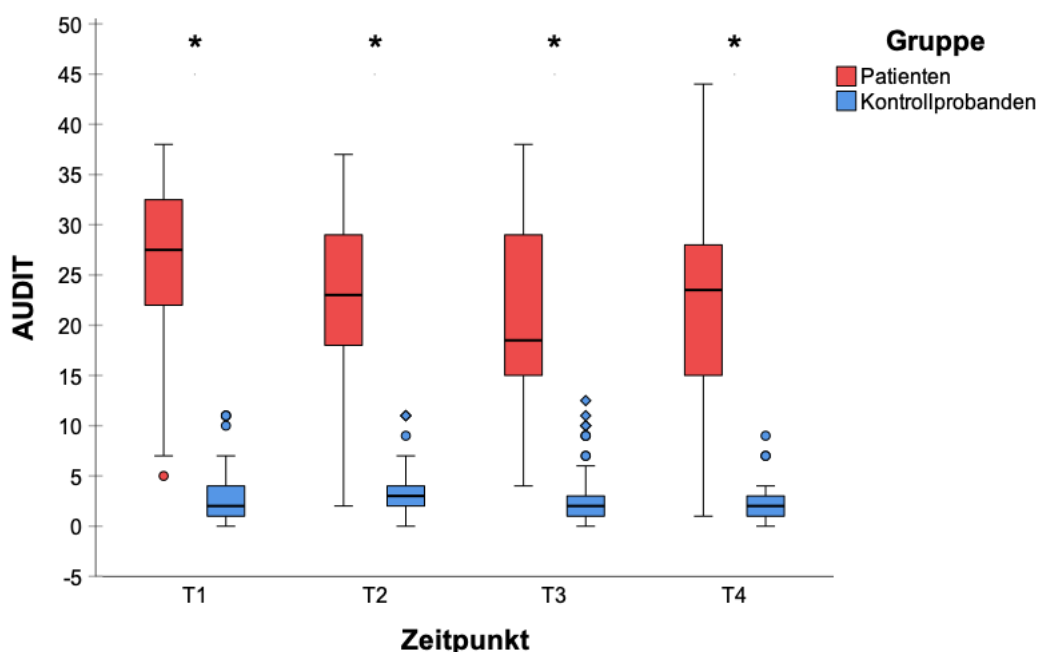


Abbildung 7: Vergleich der AUDIT-Scores von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4. Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1(60,81), T2(30,46), T3(18,71), T4(10,40). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

Die AUDIT-Scores der Patienten sanken von T1 bis T3 signifikant von einem Median von 27.5 auf 18.5 ab (T1/T3: $Z = -3.249$, $p < .001^*$, $r = .766$, $N = 18$). Vom Beginn bis zum Ende der Therapie (T1 bis T2) zeigte sich kein signifikanter Abfall der AUDIT-Scores (T1/T2: $Z = -2.440$, $p = .015$, $r = .445$, $N = 30$). Von T3 zu T4 stiegen die Scores (Mediane) wieder auf 23.5 an (nicht signifikant, T3/T4: $Z = -0.679$, $p = .578$, $r = .257$, $N = 7$) (bis auf T1/T2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 24 und Abbildung 8). Bei den

Kontrollprobanden blieben die AUDIT-Scores über die Zeit auf einem vergleichbar niedrigen Niveau zwischen 2.0 und 3.0 (Mediane) (T1/T2: $Z = -1.155$, $p = .248$, $r = .170$, $N = 46$; T1/T3: $Z = -1.204$, $p = .229$, $r = .143$, $N = 71$; T1/T4: $Z = -2.591$, $p = .010$, $r = .410$, $N = 40$; T2/T3: $Z = -0.771$, $p = .441$, $r = .118$, $N = 43$; T2/T4: $Z = -1.611$, $p = .180$, $r = .352$, $N = 21$; T3/T4: $Z = -1.745$, $p = .081$, $r = .279$, $N = 39$) (zu T2/T4 exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 25 und Abbildung 8).

Tabelle 24: Unterschiede der AUDIT-Scores von Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	30	27.5	23.0	.015	2	.05/5 = .010
T1/T3	18	27.5	18.5	< .001*	1	.05/6 = .008
T1/T4	10	27.5	23.5	.070	4	.05/3 = .017
T2/T3	10	23.0	18.5	.066	3	.05/4 = .013
T2/T4	5	23.0	23.5	.625	6	.05/1 = .050
T3/T4	7	18.5	23.5	.578	5	.05/2 = .025

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Bis auf T1/T2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

Tabelle 25: Unterschiede der AUDIT-Scores von Kontrollprobanden über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	46	2.0	3.0	.248	5	.05/2 = .025
T1/T3	71	2.0	2.0	.229	4	.05/3 = .017
T1/T4	40	2.0	2.0	.010	1	.05/6 = .008
T2/T3	43	3.0	2.0	.441	6	.05/1 = .050
T2/T4	21	3.0	2.0	.180	3	.05/4 = .013
T3/T4	39	2.0	2.0	.081	2	.05/5 = .010

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Zu T2/T4 exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

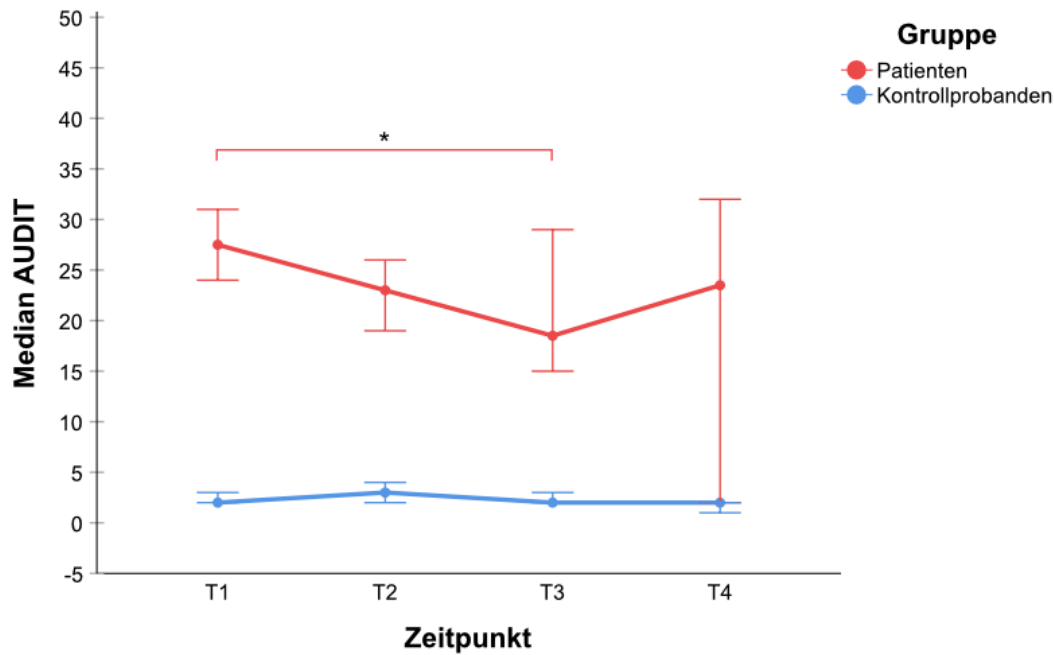


Abbildung 8: Entwicklung der AUDIT-Scores von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1/T2(30,46), T1/T3(18,71), T1/T4(10,40), T2/T3(10,43), T2/T4(5,21), T3/T4(7,39). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

Die Unterschiede zwischen den AUDIT-Scores der drei (Sub-)Gruppen (rückfällige und nicht-rückfällige Patienten sowie Kontrollprobanden) waren zu allen vier Zeitpunkten signifikant (T1: $H(2) = 64.226$, $p < .001^*$, $N = 110$; T2: $H(2) = 30.526$, $p < .001^*$, $N = 60$; T3: $H(2) = 40.074$, $p < .001^*$, $N = 89$; T4: $H(2) = 20.720$, $p < .001^*$, $N = 50$).

Im paarweisen Vergleich hatten die rückfälligen Patienten zu allen vier Zeitpunkten signifikant höhere AUDIT-Scores als die Kontrollprobanden (T1: $Z = 7.241$, $p < .001^*$, $r = .717$, $n(R,K) = 21,81$; T2: $Z = 4.612$, $p < .001^*$, $r = .622$, $n(R,K) = 9,46$; T3: $Z = 6.015$, $p < .001^*$, $r = .656$, $n(R,K) = 13,71$; T4: $Z = 4.492$, $p < .001^*$, $r = .648$, $n(R,K) = 8,40$). Die nicht-rückfälligen Patienten hingegen hatten nur zu T1 und T2 signifikant höhere Werte als die Kontrollprobanden (T1: $Z = 4.387$, $p < .001^*$, $r = .465$, $n(N,K) = 8,81$; T2: $Z = 3.602$, $p < .001^*$, $r = .504$, $n(N,K) = 5,46$; T3: $Z = 2.570$, $p = .010$, $r = .295$, $n(N,K) = 5,71$; T4: $Z = -0.330$, $p = .741$, $r = .051$, $n(N,K) = 2,40$). Die Scores der rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten unterschieden sich nicht signifikant (T1: $Z = -0.355$, $p = .723$, $r = .066$, $n(R,N) = 21,8$; T2: $Z = 0.028$, $p = .978$, $r = .007$, $n(R,N) = 9,5$;

T3: $Z = -1.189$, $p = .234$, $r = .280$, $n(R,N) = 13,5$; T4: $Z = -2.503$, $p = .012$, $r = .792$, $n(R,N) = 8,2$), jedoch zeigte sich zu T4 nach Cohen (1992) ein großer Effekt (siehe Tabelle 26 und Abbildung 9).

Tabelle 26: Unterschiede der AUDIT-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.

Zeitpunkt	n (R,N)	Mdn_R	Mdn_N	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	21,8	28.0	25.5	.723	10	.05/3 = .017
T2	9,5	23.0	23.0	.978	12	.05/1 = .050
T3	13,5	22.0	8.0	.234	9	.05/4 = .013
T4	8,2	26.5	1.5	.012	8	.05/5 = .010
Zeitpunkt	n (R,K)	Mdn_R	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	21,81	28.0	2.0	< .001*	1	.05/12 = .004
T2	9,46	23.0	3.0	< .001*	3	.05/10 = .005
T3	13,71	22.0	2.0	< .001*	2	.05/11 = .005
T4	8,40	26.5	2.0	< .001*	4	.05/9 = .006
Zeitpunkt	n (N,K)	Mdn_N	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	8,81	25.5	2.0	< .001*	5	.05/8 = .006
T2	5,46	23.0	3.0	< .001*	6	.05/7 = .007
T3	5,71	8.0	2.0	.010	7	.05/6 = .008
T4	2,40	1.5	2.0	.741	11	.05/2 = .025

Anmerkung. Dunns Post-hoc-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. n = Größe der Teilstichprobe, R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, Mdn_R = Median der rückfälligen Patienten, Mdn_N = Median der nicht-rückfälligen Patienten, Mdn_K = Median der Kontrollprobanden, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

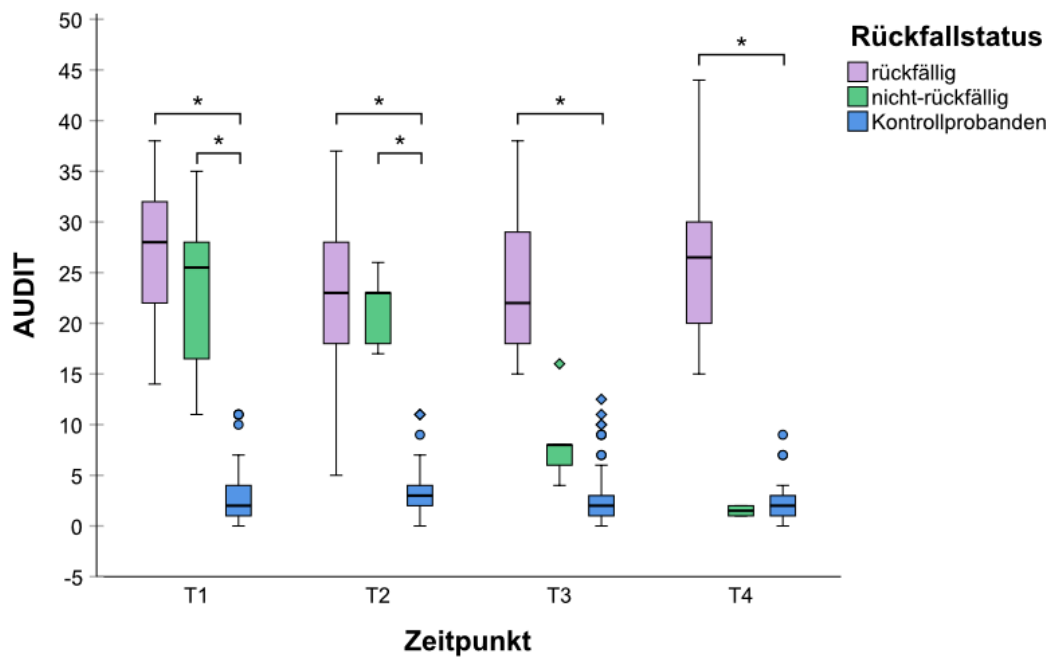


Abbildung 9: Vergleich der AUDIT-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4. Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Dunns Post-hoc-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1(21,8,81), T2(9,5,46), T3(13,5,71), T4(8,2,40). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

Die AUDIT-Scores der rückfälligen Patienten zeigten einen signifikanten Abfall von T1 bis T3 (T1/T3: $Z = -2.673$, $p = .005^*$, $r = .741$, $N = 13$), der von T1 zu T2 von größerem Effekt war als von T2 zu T3 (nicht signifikant, T1/T2: $Z = -1.614$, $p = .117$, $r = .538$, $N = 9$; T2/T3: $Z = -0.763$, $p = .484$, $r = .288$, $N = 7$), bevor sie von T3 zu T4 wieder anstiegen (nicht signifikant, T3/T4: $Z = -1.483$, $p = .188$, $r = .663$, $N = 5$) (exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 27 und Abbildung 10). Bei den nicht-rückfälligen Patienten sank der AUDIT-Score von T1 bis T4 nicht signifikant ab. Am stärksten war der Effekt dieser Abnahme von T1 auf T4 (T1/T4: $Z = -1.342$, $p = .500$, $r = .949$, $N = 2$), von T2 auf T3 (T2/T3: $Z = -1.604$, $p = .250$, $r = .926$, $N = 3$), von T2 auf T4 (T2/T4: $Z = -1.342$, $p = .500$, $r = .949$, $N = 2$) und von T3 auf T4 (T3/T4: $Z = -1.342$, $p = .500$, $r = .949$, $N = 2$). Aber auch zwischen den anderen Zeitpunkten zeigte sich ein starker Trend mit großer Effektstärke (T1/T2: $Z = -1.214$, $p = .313$, $r = .543$, $N = 5$; T1/T3: $Z = -1.753$, $p = .125$, $r = .784$, $N = 5$) (exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 28 und Abbildung 10).

Tabelle 27: Unterschiede der AUDIT-Scores von rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	9	28.0	23.0	.117	2	.05/5 = .010
T1/T3	13	28.0	22.0	.005*	1	.05/6 = .008
T1/T4	8	28.0	26.5	.281	4	.05/3 = .017
T2/T3	7	23.0	22.0	.484	5	.05/2 = .025
T2/T4	3	23.0	26.5	.500	6	.05/1 = .050
T3/T4	5	22.0	26.5	.188	3	.05/4 = .013

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

Tabelle 28: Unterschiede der AUDIT-Scores von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	5	25.5	23.0	.313	3	.05/4 = .013
T1/T3	5	25.5	8.0	.125	1	.05/6 = .008
T1/T4	2	25.5	1.5	.500	4	.05/3 = .017
T2/T3	3	23.0	8.0	.250	2	.05/5 = .010
T2/T4	2	23.0	1.5	.500	5	.05/2 = .025
T3/T4	2	8.0	1.5	.500	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

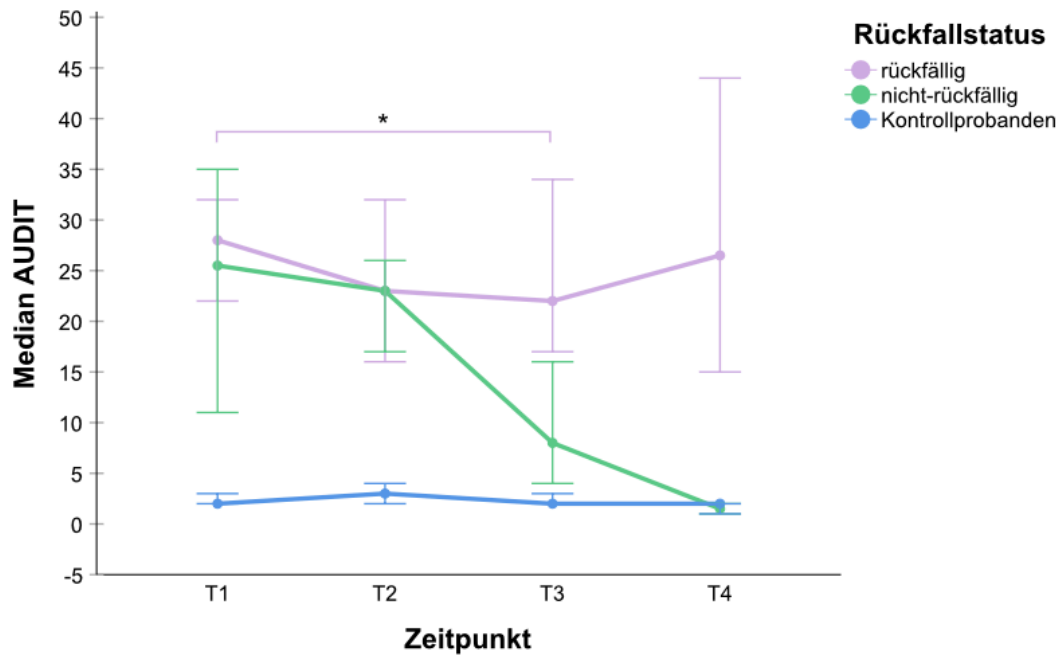


Abbildung 10: Entwicklung der AUDIT-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1/T2(9,5,46), T1/T3(13,5,71), T1/T4(8,2,40), T2/T3(7,3,43), T2/T4(3,2,21), T3/T4(5,2,39). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

3.2.3 Alkoholverlangen (OCDS)

Die OCDS-Scores waren bei den Patienten ($Mdn_{T1} = 21.0$, $Mdn_{T2} = 13.0$, $Mdn_{T3} = 12.5$, $Mdn_{T4} = 12.0$) im Vergleich zu den Kontrollprobanden ($Mdn_{T1} = 1.0$, $Mdn_{T2} = 1.0$, $Mdn_{T3} = 1.0$, $Mdn_{T4} = 1.0$) zu allen vier Zeitpunkten signifikant erhöht (T1: $U(61,77) = 34.5$, $Z = -9.966$, $p < .001^*$, $r = .848$; T2: $U(56,78) = 163.0$, $Z = -9.205$, $p < .001^*$, $r = .795$; T3: $U(18,74) = 161.0$, $Z = -5.114$, $p < .001^*$, $r = .533$; T4: $U(15,49) = 61.0$, $Z = -4.977$, $p < .001^*$, $r = .622$) (siehe Tabelle 29 und Abbildung 11). Nach Cohen (1992) handelte es sich dabei um starke Effekte.

Tabelle 29: Unterschiede der OCDS-Scores von Patienten und Kontrollprobanden.

Zeitpunkt	<i>n</i> (P,K)	<i>Mdn_P</i>	<i>Mdn_K</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	61,77	21.0	1.0	< .001*	1	.05/4 = .013
T2	56,78	13.0	1.0	< .001*	2	.05/3 = .017
T3	18,74	12.5	1.0	< .001*	3	.05/2 = .025
T4	15,49	12.0	1.0	< .001*	4	.05/1 = .050

Anmerkung. Mann-Whitney-U-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, *Mdn_P* = Median der Patienten, *Mdn_K* = Median der Kontrollprobanden, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

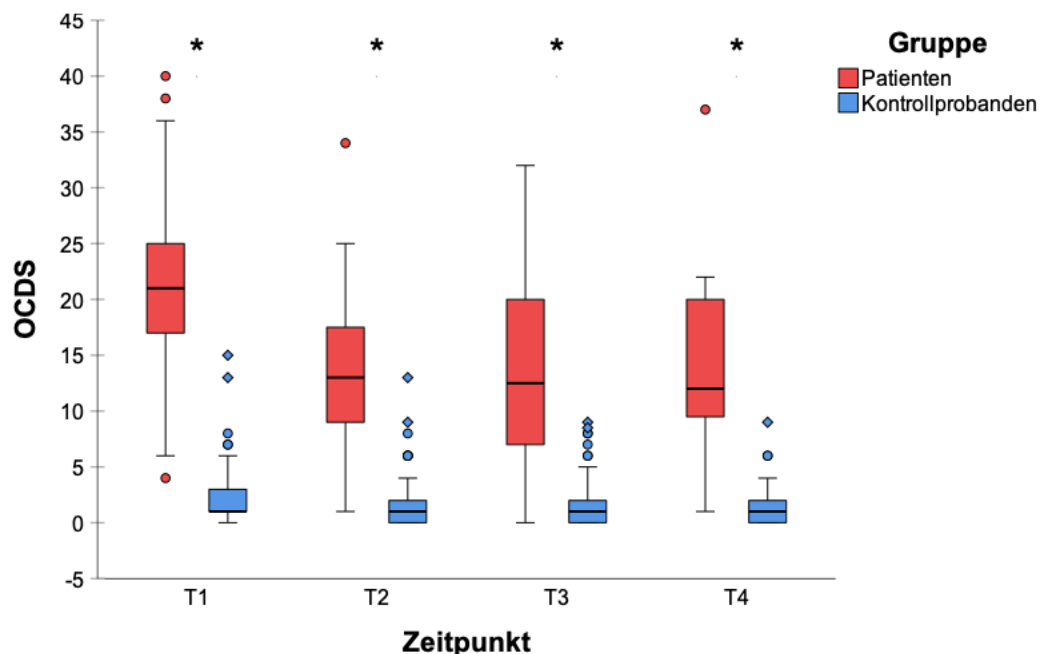


Abbildung 11: Vergleich der OCDS-Scores von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4. Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1(61,77), T2(56,78), T3(18,74), T4(15,49). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

Die OCDS-Scores der Patienten sanken von T1 zu T2 signifikant von 21.0 auf 13.0 ab (T1/T2: $Z = -5.946$, $p < .001^*$, $r = .817$, $N = 53$). Auch von T1 zu T3 und T1 zu T4 war der Abfall signifikant (T1/T3: $Z = -3.505$, $p < .001^*$, $r = .850$, $N = 17$; T1/T4: $Z = -2.701$, $p = .004^*$, $r = .697$, $N = 15$). Von T2 bis T4 nahmen die Scores weiter ab, jedoch nur mit kleinem, nicht signifikantem Effekt (T2/T3: $Z = -1.088$, $p = .292$, $r = .272$, $N = 16$; T2/T4: $Z = -0.210$, $p = .852$, $r = .054$, $N = 15$; T3/T4: $Z = -0.513$, $p = .643$, $r = .162$, $N = 10$) (bis auf T1/T2 (asymptotische) exakte

Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 30 und Abbildung 12). Die Mediane der OCDS-Scores der Kontrollprobanden blieben über die Zeit konstant bei 1.0 (T1/T2: $Z = -2.373$, $p = .018$, $r = .276$, $N = 74$; T1/T3: $Z = -1.663$, $p = .096$, $r = .199$, $N = 70$; T1/T4: $Z = -0.648$, $p = .517$, $r = .097$, $N = 45$; T2/T3: $Z = -0.007$, $p = .994$, $r = .001$, $N = 73$; T2/T4: $Z = -0.664$, $p = .506$, $r = .095$, $N = 49$; T3/T4: $Z = -0.765$, $p = .444$, $r = .112$, $N = 47$) (siehe Tabelle 31 und Abbildung 12).

Tabelle 30: Unterschiede der OCDS-Scores von Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	53	21.0	13.0	< .001*	1	.05/6 = .008
T1/T3	17	21.0	12.5	< .001*	2	.05/5 = .010
T1/T4	15	21.0	12.0	.004*	3	.05/4 = .013
T2/T3	16	13.0	12.5	.292	4	.05/3 = .017
T2/T4	15	13.0	12.0	.852	6	.05/1 = .050
T3/T4	10	12.5	12.0	.643	5	.05/2 = .025

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Bis auf T1/T2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

Tabelle 31: Unterschiede der OCDS-Scores von Kontrollprobanden über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	74	1.0	1.0	.018	1	.05/6 = .008
T1/T3	70	1.0	1.0	.096	2	.05/5 = .010
T1/T4	45	1.0	1.0	.517	5	.05/2 = .025
T2/T3	73	1.0	1.0	.994	6	.05/1 = .050
T2/T4	49	1.0	1.0	.506	4	.05/3 = .017
T3/T4	47	1.0	1.0	.444	3	.05/4 = .013

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

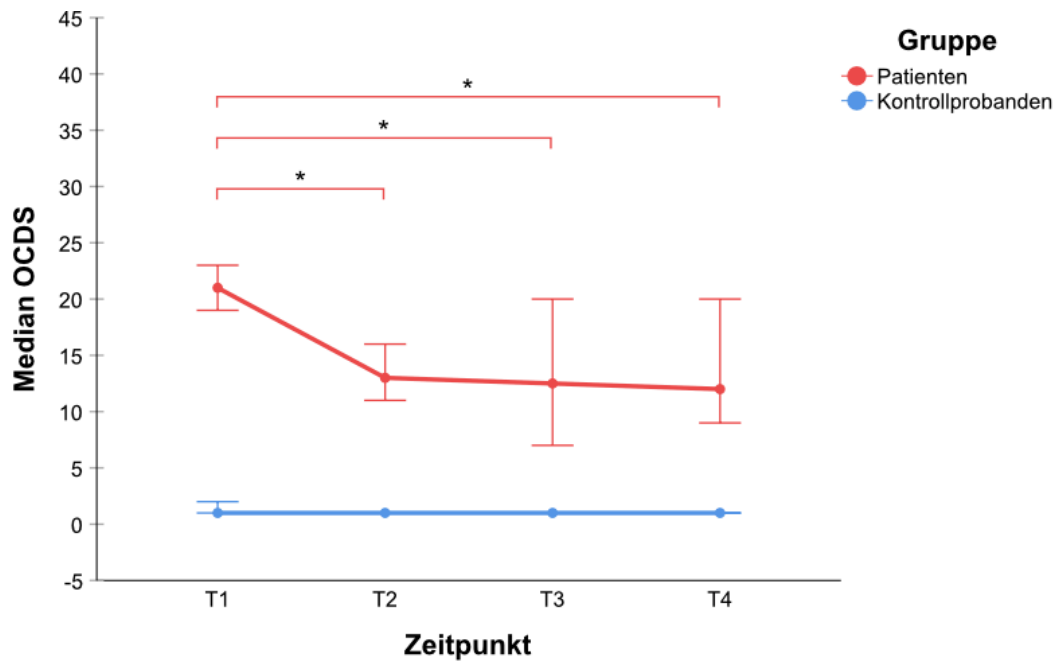


Abbildung 12: Entwicklung der OCDS-Scores von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1/T2(53,74), T1/T3(17,70), T1/T4(15,45), T2/T3(16,73), T2/T4(15,49), T3/T4(10,47). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

Die drei (Sub-)Gruppen (rückfällige und nicht-rückfällige Patienten sowie Kontrollprobanden) unterschieden sich in ihren OCDS-Scores zu allen vier Zeitpunkten signifikant (T1: $H(2) = 62.050$, $p < .001^*$, $N = 105$; T2: $H(2) = 58.467$, $p < .001^*$, $N = 105$; T3: $H(2) = 34.244$, $p < .001^*$, $N = 92$; T4: $H(2) = 28.337$, $p < .001^*$, $N = 64$).

Die OCDS-Scores der rückfälligen Patienten waren im paarweisen Vergleich zu allen Zeitpunkten signifikant höher als die der Kontrollprobanden (T1: $Z = 7.221$, $p < .001^*$, $r = .729$, $n(R,K) = 21,77$; T2: $Z = 6.749$, $p < .001^*$, $r = .685$, $n(R,K) = 19,78$; T3: $Z = 5.852$, $p < .001^*$, $r = .627$, $n(R,K) = 13,74$; T4: $Z = 5.226$, $p < .001^*$, $r = .680$, $n(R,K) = 10,49$). Zwischen den nicht-rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden zeigten sich nur zu T1 und T2 signifikante Unterschiede, zu T3 und T4 lagen ihre Scores auf vergleichbarem Niveau (T1: $Z = 4.083$, $p < .001^*$, $r = .445$, $n(N,K) = 7,77$; T2: $Z = 4.472$, $p < .001^*$, $r = .482$, $n(N,K) = 8,78$; T3: $Z = 0.569$, $p = .569$, $r = .064$, $n(N,K) = 5,74$; T4: $Z = 1.659$, $p = .097$, $r = .226$, $n(N,K) = 5,49$). Die OCDS-Scores der rückfälligen Patienten ($Mdn_{T1} = 23.0$, $Mdn_{T2} = 13.0$, $Mdn_{T3} = 15.0$, $Mdn_{T4} = 19.0$) waren zu allen

Zeitpunkten höher als die der nicht-rückfälligen Patienten ($Mdn_{T1} = 20.0$, $Mdn_{T2} = 11.5$, $Mdn_{T3} = 2.0$, $Mdn_{T4} = 2.0$). Zu T3 war dieser Unterschied signifikant, zu T4 zeigte sich ein nicht signifikanter mittlerer Effekt (T1: $Z = -0.380$, $p = .704$, $r = .072$, $n(R,N) = 21,7$; T2: $Z = -0.158$, $p = .875$, $r = .030$, $n(R,N) = 19,8$; T3: $Z = -2.844$, $p = .004^*$, $r = .670$, $n(R,N) = 13,5$; T4: $Z = -1.889$, $p = .059$, $r = .488$, $n(R,N) = 10,5$) (siehe Tabelle 32 und Abbildung 13).

Tabelle 32: Unterschiede der OCDS-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.

Zeitpunkt	n (R,N)	Mdn_R	Mdn_N	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	21,7	23.0	20.0	.704	11	.05/2 = .025
T2	19,8	13.0	11.5	.875	12	.05/1 = .050
T3	13,5	15.0	2.0	.004*	7	.05/6 = .008
T4	10,5	19.0	2.0	.059	8	.05/5 = .010
Zeitpunkt	n (R,K)	Mdn_R	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	21,77	23.0	1.0	< .001*	1	.05/12 = .004
T2	19,78	13.0	1.0	< .001*	2	.05/11 = .005
T3	13,74	15.0	1.0	< .001*	3	.05/10 = .005
T4	10,49	19.0	1.0	< .001*	4	.05/9 = .006
Zeitpunkt	n (N,K)	Mdn_N	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	7,77	20.0	1.0	< .001*	6	.05/7 = .007
T2	8,78	11.5	1.0	< .001*	5	.05/8 = .006
T3	5,74	2.0	1.0	.569	10	.05/3 = .017
T4	5,49	2.0	1.0	.097	9	.05/4 = .013

Anmerkung. Dunns Post-hoc-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. n = Größe der Teilstichprobe, R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, Mdn_R = Median der rückfälligen Patienten, Mdn_N = Median der nicht-rückfälligen Patienten, Mdn_K = Median der Kontrollprobanden, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

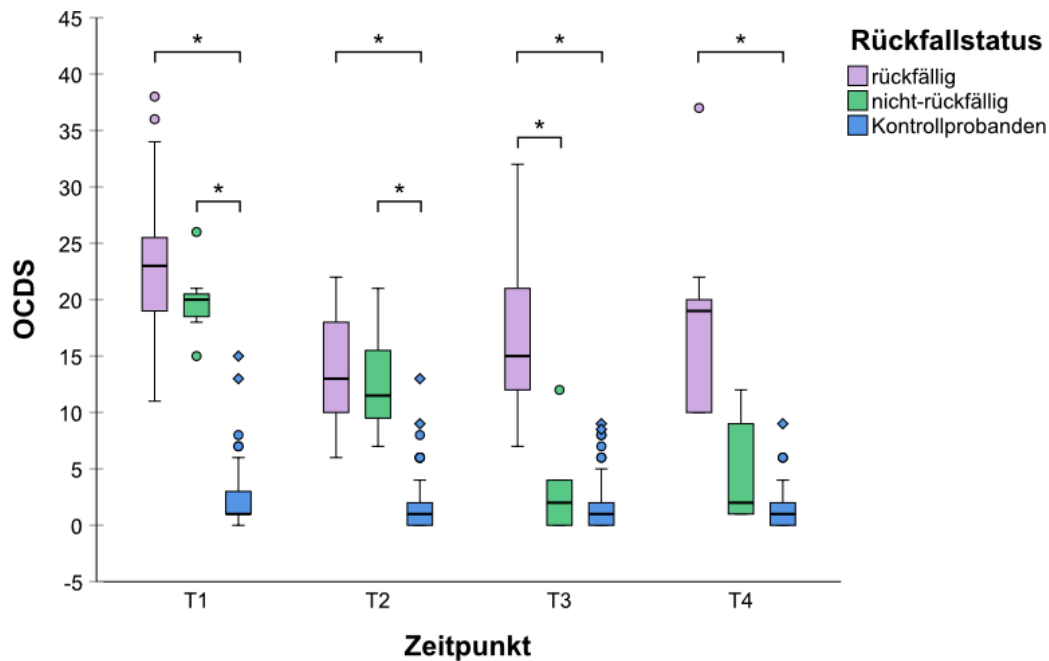


Abbildung 13: Vergleich der OCDS-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4. Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Dunns Post-hoc-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1(21,7,77), T2(19,8,78), T3(13,5,74), T4(10,5,49). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

Die OCDS-Scores der rückfälligen Patienten sanken von T1 zu T2 (T1/T2: $Z = -3.728$, $p < .001^*$, $r = .855$, $N = 19$) bzw. von T1 zu T3 (T1/T3: $Z = -3.008$, $p < .001^*$, $r = .834$, $N = 13$) signifikant ab, zwischen T2 und T3 nahmen sie jedoch zu (nicht signifikant, T2/T3: $Z = -0.490$, $p = .652$, $r = .148$, $N = 11$). Dieser Aufwärtstrend setzte sich von T3 bis T4 fort (nicht signifikant, T3/T4: $Z = -0.420$, $p = .719$, $r = .171$, $N = 6$) (exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 33 und Abbildung 14). Die Mediane blieben von T2 bis T4 unterhalb des initialen Werts von 23.0. Bei den nicht-rückfälligen Patienten hingegen sank der OCDS-Score nach einem anfänglich starken Abfall jeweils nicht signifikant von T1 zu T2 (T1/T2: $Z = -2.371$, $p = .016$, $r = .896$, $N = 7$) weiter bis T3 (T2/T3: $Z = -2.032$, $p = .063$, $r = .909$, $N = 5$; T1/T3: $Z = -1.826$, $p = .125$, $r = .913$, $N = 4$) und blieb anschließend von T3 bis T4 auf einem niedrigen Niveau (T3/T4: $Z = -0.368$, $p = .750$, $r = .184$, $N = 4$) (exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 34 und Abbildung 14).

Tabelle 33: Unterschiede der OCDS-Scores von rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	19	23.0	13.0	< .001*	1	.05/6 = .008
T1/T3	13	23.0	15.0	< .001*	2	.05/5 = .010
T1/T4	10	23.0	19.0	.086	3	.05/4 = .013
T2/T3	11	13.0	15.0	.652	5	.05/2 = .025
T2/T4	10	13.0	19.0	.090	4	.05/3 = .017
T3/T4	6	15.0	19.0	.719	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

Tabelle 34: Unterschiede der OCDS-Scores von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	7	20.0	11.5	.016	1	.05/6 = .008
T1/T3	4	20.0	2.0	.125	4	.05/3 = .017
T1/T4	5	20.0	2.0	.063	2	.05/5 = .010
T2/T3	5	11.5	2.0	.063	3	.05/4 = .013
T2/T4	5	11.5	2.0	.125	5	.05/2 = .025
T3/T4	4	2.0	2.0	.750	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts, *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

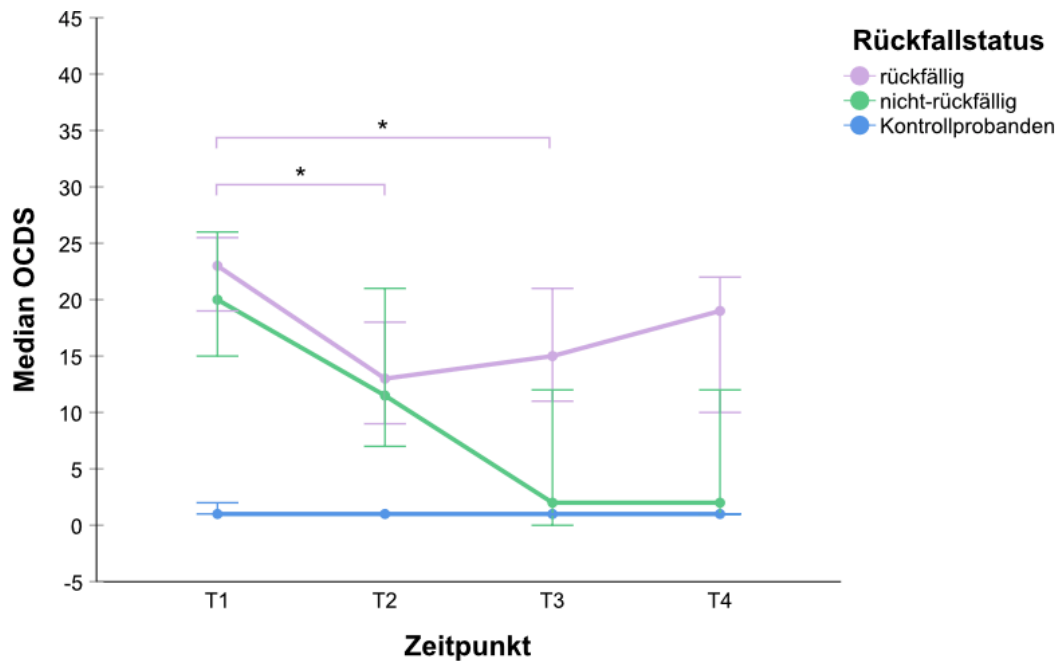


Abbildung 14: Entwicklung der OCDS-Scores von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1/T2(19,7,74), T1/T3(13,4,70), T1/T4(10,5,45), T2/T3(11,5,73), T2/T4(10,5,49), T3/T4(6,4,47). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

3.3 Korrelationen zwischen den Fragebogen-Scores

Um die wechselseitige Beziehung zwischen psychischer Belastung, Alkoholkonsum und Alkoholverlangen zu untersuchen, wurde der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Fragebogen-Scores (GSI, AUDIT und OCDS) mittels Spearman-Rho-Korrelation bestimmt. Wurden die Scores von Patienten und Kontrollprobanden sowie allen vier Zeitpunkten gemeinsam untersucht, korrelierten GSI-, AUDIT- und OCDS-Score in jeder Kombination signifikant positiv miteinander (GSI/OCDS: $r_s(421) = .554^*$, $p < .001$; GSI/AUDIT: $r_s(354) = .589^*$, $p < .001$; OCDS/AUDIT: $r_s(349) = .874^*$, $p < .001$; siehe Abbildung 15a und Anhang 6 (Tabelle A5)). Nach Cohen (1992) handelte es sich bei allen Korrelationen um einen starken Effekt. Bei der nach Gruppen getrennten Betrachtung korrelierten die Fragebogen-Scores der Patienten weiterhin in allen Kombinationen signifikant und mittelstark bis stark positiv miteinander (siehe Tabelle A6 in Anhang 6 und Abbildung 15b). Unter den Scores der Kontrollprobanden wiesen GSI und AUDIT einen kleinen signifikanten sowie

AUDIT und OCDS einen starken signifikanten positiven Zusammenhang auf, nicht jedoch GSI und OCDS (siehe Tabelle A6 in Anhang 6 und Abbildung 15b).

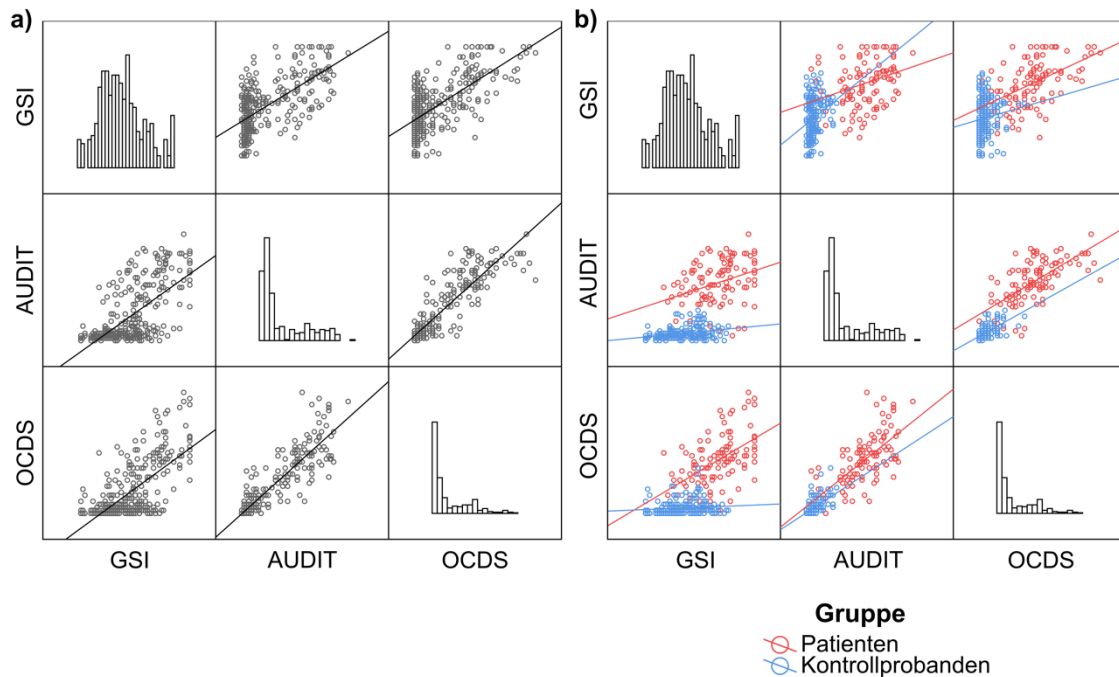


Abbildung 15: Korrelationen zwischen den Fragebogen-Scores a) über beide Gruppen (Patienten und Kontrollprobanden) und alle Zeitpunkte hinweg und b) getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden über alle Zeitpunkte hinweg. Bivariate Korrelation nach Spearman. In der Diagonalen sind die Histogramme der Normalverteilung des jeweiligen Scores dargestellt. **Zu a):** GSI/OCDS: $r_s(421) = .554^*$, $p < .001$; GSI/AUDIT: $r_s(354) = .589^*$, $p < .001$; OCDS/AUDIT: $r_s(349) = .874^*$, $p < .001$; $N(\text{Streudiagramm-Matrix}) = 347$. **Zu b):** Patienten: GSI/OCDS: $r_s(145) = .547^*$, $p < .001$; GSI/AUDIT: $r_s(116) = .384^*$, $p < .001$; OCDS/AUDIT: $r_s(116) = .677^*$, $p < .001$. Kontrollprobanden: GSI/OCDS: $r_s(276) = .098$, $p = .103$; GSI/AUDIT: $r_s(238) = .241^*$, $p < .001$; OCDS/AUDIT: $r_s(233) = .705^*$, $p < .001$; $n(\text{Streudiagramm-Matrix Patienten}) = 114$, $n(\text{Streudiagramm-Matrix Kontrollprobanden}) = 233$. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, N = Größe der Gesamtstichprobe, n = Größe der Teilstichprobe, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

3.4 HECW2-DNA_m in Blut

Im Folgenden wurde die DNA_m von *HECW2* in Blut analysiert.

3.4.1 Vergleich der *HECW2*-DNA_m in Blut zwischen den (Sub-)Gruppen und über die Zeit

Tabelle 35 zeigt die Stichprobengrößen, Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane sowie die minimalen und maximalen Werte der *HECW2*-DNA_m-Untersuchung der Blutproben von Patienten und Kontrollprobanden. Die DNA_m-Werte (Mediane) lagen bei den Patienten zwischen 6.02 % und 6.33 %, bei den Kontrollprobanden zwischen 7.79 % und 8.05 % (siehe Tabelle 35).

Tabelle 35: Deskriptive Analyse der *HECW2*-DNA_m (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.

Zeitpunkt	Patienten			Kontrollprobanden		
	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)
T1	67	6.53 (1.31)	6.33 (4.24–9.92)	80	8.07 (1.46)	7.79 (5.14–11.57)
T2	56	6.67 (1.69)	6.08 (4.14–11.07)	76	8.24 (1.54)	8.05 (4.51–11.86)
T3	19	6.48 (1.09)	6.23 (4.93–8.78)	73	7.91 (1.47)	7.79 (4.61–11.54)
T4	14	6.59 (1.16)	6.02 (5.24–8.15)	48	7.81 (1.38)	7.83 (5.11–10.54)

Anmerkung. *n* = Größe der Teilstichprobe, *M* = Mittelwert (%), *SD* = Standardabweichung (Prozentpunkte), *Mdn* = Median (%), *x_{min}* = Minimum (%), *x_{max}* = Maximum (%), DNA_m = DNA-Methylierung.

Die prozentuale DNA_m des untersuchten CpG-Dinukleotids von *HECW2* in Blut war bei den Patienten ($Mdn_{T1} = 6.33\%$, $Mdn_{T2} = 6.08\%$, $Mdn_{T3} = 6.23\%$, $Mdn_{T4} = 6.02\%$) im Vergleich zu den Kontrollprobanden ($Mdn_{T1} = 7.79\%$, $Mdn_{T2} = 8.05\%$, $Mdn_{T3} = 7.79\%$, $Mdn_{T4} = 7.83\%$) zu allen vier Zeitpunkten signifikant geringer (T1: $U(67,80) = 1167.5$, $Z = -5.883$, $p < .001^*$, $r = .485$; T2: $U(56,76) = 1010.0$, $Z = -5.148$, $p < .001^*$, $r = .448$; T3: $U(19,73) = 290.5$, $Z = -3.887$, $p < .001^*$, $r = .405$; T4: $U(14,48) = 174.0$, $Z = -2.728$, $p = .006^*$, $r = .346$) (siehe Tabelle 36 und Abbildung 16). Nach Cohen (1992) handelte es

sich dabei um mittlere Effekte. Die mittlere Differenz der Mediane von Patienten und Kontrollprobanden betrug 1.7 Prozentpunkte.

Tabelle 36: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden.

Zeitpunkt	<i>n</i> (P,K)	<i>Mdn_P</i>	<i>Mdn_K</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	67,80	6.33	7.79	< .001*	1	.05/4 = .013
T2	56,76	6.08	8.05	< .001*	2	.05/3 = .017
T3	19,73	6.23	7.79	< .001*	3	.05/2 = .025
T4	14,48	6.02	7.83	.006*	4	.05/1 = .050

Anmerkung. Mann-Whitney-U-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, *Mdn_P* = Median der Patienten (%), *Mdn_K* = Median der Kontrollprobanden (%), DNAm = DNA-Methylierung.

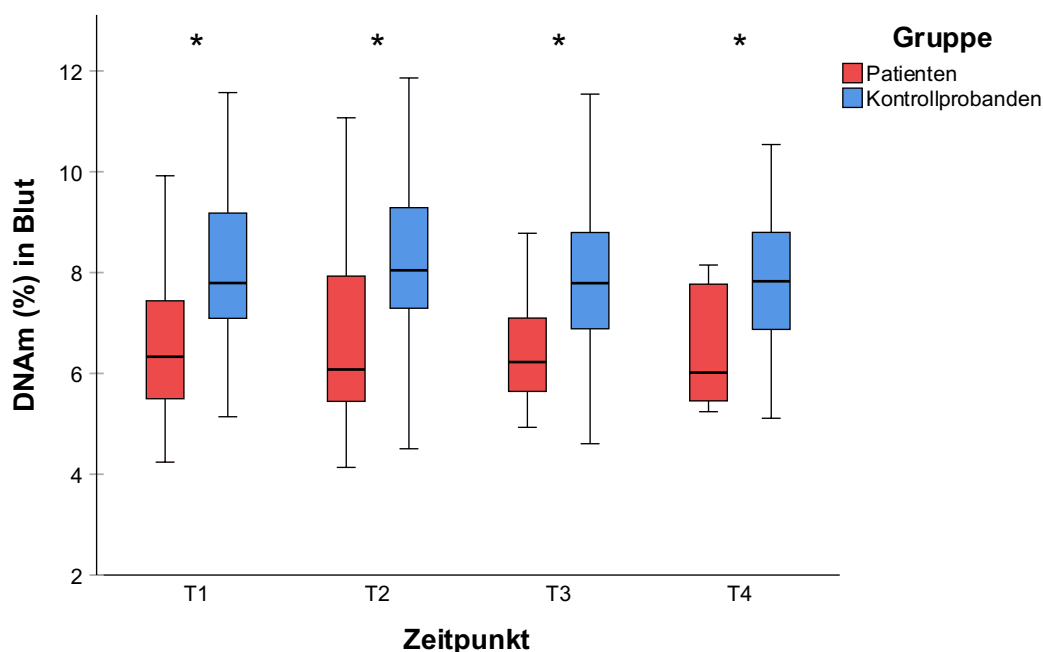


Abbildung 16: Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1(67,80), T2(56,76), T3(19,73), T4(14,48). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

Die prozentuale *HECW2*-DNAm der Patienten in Blut blieb über alle vier Zeitpunkte auf einem ähnlichen Niveau mit einem Median zwischen 6.02 % und 6.33 % und veränderte sich zwischen den Zeitpunkten nicht signifikant (T1/T2: $Z = -0.443$, $p = .657$, $r = .060$, $N = 55$; T1/T3: $Z = -0.241$, $p = .829$, $r = .055$, $N = 19$; T1/T4: $Z = -0.345$, $p = .761$, $r = .092$, $N = 14$; T2/T3: $Z = -0.734$, $p = .487$,

$r = .178$, $N = 17$; T2/T4: $Z = -0.157$, $p = .903$, $r = .042$, $N = 14$; T3/T4: $Z = -0.415$, $p = .734$, $r = .138$, $N = 9$; bis auf T1/2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 37 und Abbildung 17). Auch bei den Kontrollprobanden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede über die Zeit (T1/T2: $Z = -1.230$, $p = .219$, $r = .142$, $N = 75$; T1/T3: $Z = -0.842$, $p = .400$, $r = .099$, $N = 72$; T1/T4: $Z = -1.725$, $p = .085$, $r = .252$, $N = 47$; T2/T3: $Z = -1.946$, $p = .052$, $r = .233$, $N = 70$; T2/T4: $Z = -2.392$, $p = .017$, $r = .349$, $N = 47$; T3/T4: $Z = -0.290$, $p = .772$, $r = .043$, $N = 46$). Die Mediane lagen zwischen 7.79 % und 8.05 % (siehe Tabelle 38 und Abbildung 17).

Tabelle 37: Unterschiede der HECW2-DNA_m (%) in Blut von Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	55	6.33	6.08	.657	2	.05/5 = .010
T1/T3	19	6.33	6.23	.829	5	.05/2 = .025
T1/T4	14	6.33	6.02	.761	4	.05/3 = .017
T2/T3	17	6.08	6.23	.487	1	.05/6 = .008
T2/T4	14	6.08	6.02	.903	6	.05/1 = .050
T3/T4	9	6.23	6.02	.734	3	.05/4 = .013

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Bis auf T1/T2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), DNA_m = DNA-Methylierung.

Tabelle 38: Unterschiede der HECW2-DNA_m (%) in Blut von Kontrollprobanden über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	75	7.79	8.05	.219	4	.05/3 = .017
T1/T3	72	7.79	7.79	.400	5	.05/2 = .025
T1/T4	47	7.79	7.83	.085	3	.05/4 = .013
T2/T3	70	8.05	7.79	.052	2	.05/5 = .010
T2/T4	47	8.05	7.83	.017	1	.05/6 = .008
T3/T4	46	7.79	7.83	.772	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), DNA_m = DNA-Methylierung.

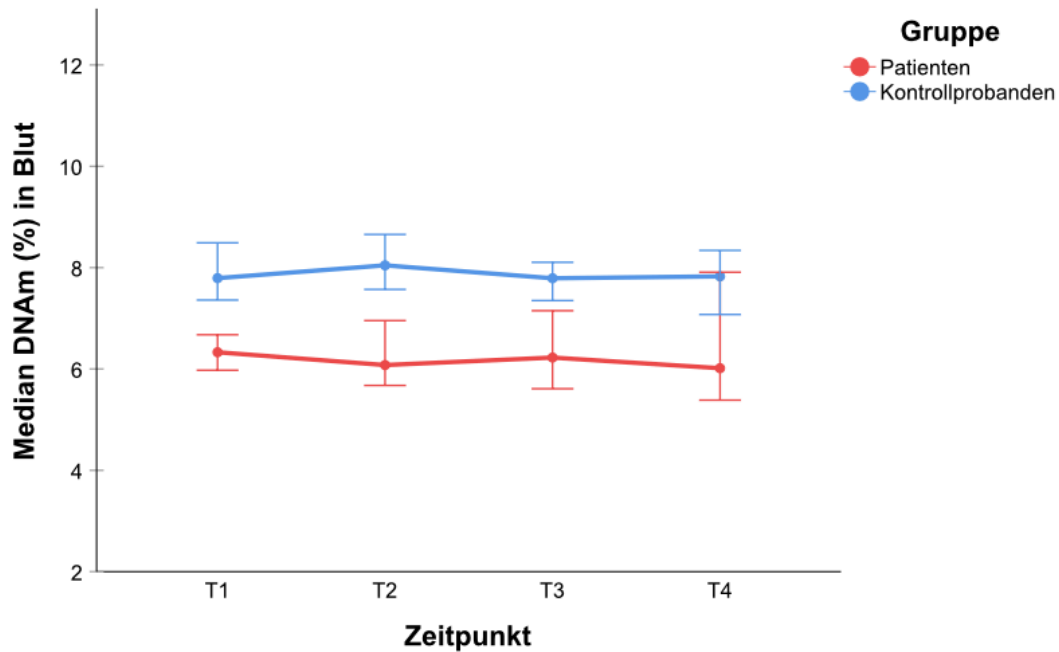


Abbildung 17: Entwicklung der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1/T2(55,75), T1/T3(19,72), T1/T4(14,47), T2/T3(17,70), T2/T4(14,47), T3/T4(9,46). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 39 bietet einen Überblick über die deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten. Die DNAm-Werte (Mediane) der rückfälligen Patienten lagen zwischen 5.83 % und 7.45 %, die der nicht-rückfälligen Patienten zwischen 5.99 % und 6.83 % (siehe Tabelle 39).

Tabelle 39: Deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu T1–T4.

Zeitpunkt	rückfällige Patienten			nicht-rückfällige Patienten		
	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)
T1	20	6.64 (1.27)	6.45 (4.95–9.17)	8	7.09 (1.77)	6.83 (4.79–9.92)
T2	19	6.72 (1.91)	5.83 (4.14–10.52)	8	6.48 (1.47)	6.56 (4.50–8.35)
T3	13	6.45 (1.03)	6.19 (5.27–8.34)	5	6.60 (1.44)	6.49 (4.93–8.78)
T4	9	6.80 (1.30)	7.45 (5.24–8.15)	5	6.21 (0.83)	5.99 (5.46–7.65)

Anmerkung. *n* = Größe der Teilstichprobe, *M* = Mittelwert (%), *SD* = Standardabweichung (Prozentpunkte), *Mdn* = Median (%), *x_{min}* = Minimum (%), *x_{max}* = Maximum (%), DNAm = DNA-Methylierung.

Die drei (Sub-)Gruppen (rückfällige und nicht-rückfällige Patienten sowie Kontrollprobanden) unterschieden sich in ihrer prozentualen *HECW2*-DNAm in Blut zu allen vier Zeitpunkten signifikant (T1: $H(2) = 13.655$, $p = .001^*$, $N = 108$; T2: $H(2) = 14.921$, $p < .001^*$, $N = 103$; T3: $H(2) = 14.057$, $p < .001^*$, $N = 91$; T4: $H(2) = 8.068$, $p = .018^*$, $N = 62$).

Von T1 bis T3 lagen die Mediane der nicht-rückfälligen Patienten ($Mdn_{T1} = 6.83\%$, $Mdn_{T2} = 6.56\%$, $Mdn_{T3} = 6.49\%$) näher an denen der Kontrollprobanden ($Mdn_{T1} = 7.79\%$, $Mdn_{T2} = 8.05\%$, $Mdn_{T3} = 7.79\%$) als die der rückfälligen Patienten ($Mdn_{T1} = 6.45\%$, $Mdn_{T2} = 5.83\%$, $Mdn_{T3} = 6.19\%$). Die DNAm der rückfälligen Patienten war zu T1 bis T3 signifikant niedriger als die der Kontrollprobanden (T1: $Z = -3.504$, $p < .001^*$, $r = .350$, $n(R,K) = 20,80$; T2: $Z = -3.128$, $p = .002^*$, $r = .321$, $n(R,K) = 19,76$; T3: $Z = -3.390$, $p < .001^*$, $r = .366$, $n(R,K) = 13,73$). Zu T4 war der Median der rückfälligen Patienten ($Mdn_{T4} = 7.45\%$) auf einem ähnlichen Niveau wie der der Kontrollprobanden ($Mdn_{T4} = 7.83\%$) ($Z = -1.846$, $p = .065$, $r = .245$, $n(R,K) = 9,48$) und die nicht-rückfälligen Patienten wichen stärker von den Kontrollprobanden ab, jedoch ohne signifikanten Unterschied ($Mdn_{T4} = 5.99\%$, $Z = -2.368$, $p = .018$, $r = .325$, $n(N,K) = 5,48$). Nicht-rückfällige Patienten und Kontrollprobanden unterschieden

sich auch von T1 bis T3 nicht signifikant (T1: $Z = -1.635$, $p = .102$, $r = .174$, $n(N,K) = 8,80$; T2: $Z = -2.677$, $p = .007$, $r = .292$, $n(N,K) = 8,76$; T3: $Z = -1.928$, $p = .054$, $r = .218$, $n(N,K) = 5,73$). Zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (T1: $Z = 0.645$, $p = .519$, $r = .122$, $n(R,N) = 20,8$; T2: $Z = -0.458$, $p = .647$, $r = .088$, $n(R,N) = 19,8$; T3: $Z = 0.245$, $p = .806$, $r = .058$, $n(R,N) = 13,5$; T4: $Z = -0.793$, $p = .428$, $r = .212$, $n(R,N) = 9,5$) (siehe Tabelle 40 und Abbildung 18).

Tabelle 40: Unterschiede der HECW2-DNA_m (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.

Zeitpunkt	n (R,N)	Mdn_R	Mdn_N	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	20,8	6.45	6.83	.519	10	.05/3 = .017
T2	19,8	5.83	6.56	.647	11	.05/2 = .025
T3	13,5	6.19	6.49	.806	12	.05/1 = .050
T4	9,5	7.45	5.99	.428	9	.05/4 = .013
	n (R,K)	Mdn_R	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	20,80	6.45	7.79	< .001*	1	.05/12 = .004
T2	19,76	5.83	8.05	.002*	3	.05/10 = .005
T3	13,73	6.19	7.79	< .001*	2	.05/11 = .005
T4	9,48	7.45	7.83	.065	7	.05/6 = .008
	n (N,K)	Mdn_N	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	8,80	6.83	7.79	.102	8	.05/5 = .010
T2	8,76	6.56	8.05	.007	4	.05/9 = .006
T3	5,73	6.49	7.79	.054	6	.05/7 = .007
T4	5,48	5.99	7.83	.018	5	.05/8 = .006

Anmerkung. Dunns Post-hoc-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. n = Größe der Teilstichprobe, R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, Mdn_R = Median der rückfälligen Patienten (%), Mdn_N = Median der nicht-rückfälligen Patienten (%), Mdn_K = Median der Kontrollprobanden (%), DNA_m = DNA-Methylierung.

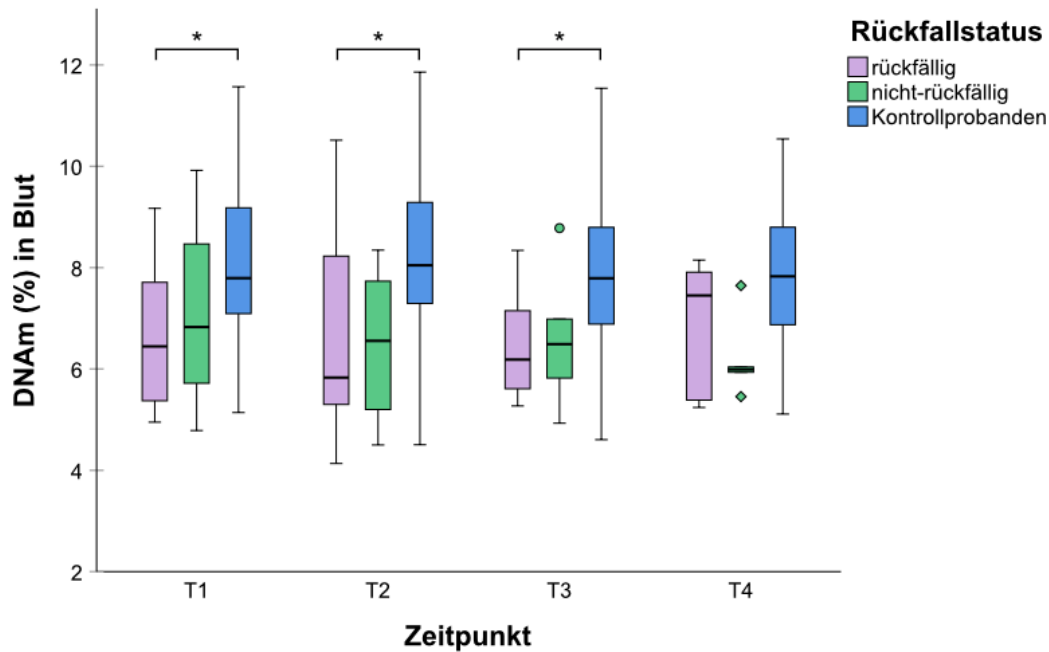


Abbildung 18: Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4. Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Dunns Post-hoc-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1(20,8,80), T2(19,8,76), T3(13,5,73), T4(9,5,48). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

Die *HECW2*-DNAm der rückfälligen Patienten in Blut variierte über die Zeit in einem Bereich von 5.83 % bis 7.45 % (Mediane). Nachdem sie von T1 zu T2 leicht absank (T1/T2: $Z = -0.327$, $p = .766$, $r = .077$, $N = 18$) stieg sie von T2 zu T3 (T2/T3: $Z = -0.445$, $p = .700$, $r = .134$, $N = 11$) und von T3 zu T4 immer weiter an (T3/T4: $Z = -0.674$, $p = .625$, $r = .301$, $N = 5$). Hierbei handelte es sich jedoch um kleine bis mittlere Effekte, die statistisch, auch in den übrigen Kombinationen, nicht signifikant waren (jeweils exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 41 und Abbildung 19). Bei den nicht-rückfälligen Patienten nahm die DNAm im Blut schrittweise von 6.83 % auf 5.99 % (Mediane) ab, jedoch ohne signifikante Unterschiede (T1/T2: $Z = -0.845$, $p = .469$, $r = .299$, $N = 8$; T1/T3: $Z = -0.135$, $p = 1.000$, $r = .060$, $N = 5$; T1/T4: $Z = -1.483$, $p = .188$, $r = .663$, $N = 5$; T2/T3: $Z = -0.405$, $p = .813$, $r = .181$, $N = 5$; T2/T4: $Z = -0.405$, $p = .813$, $r = .181$, $N = 5$; T3/T4: $Z = -0.000$, $p = 1.000$, $r = .000$, $N = 4$; jeweils exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 42 und Abbildung 19).

Tabelle 41: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	18	6.45	5.83	.766	5	.05/2 = .025
T1/T3	13	6.45	6.19	.839	6	.05/1 = .050
T1/T4	9	6.45	7.45	.426	1	.05/6 = .008
T2/T3	11	5.83	6.19	.700	3	.05/4 = .013
T2/T4	9	5.83	7.45	.734	4	.05/3 = .017
T3/T4	5	6.19	7.45	.625	2	.05/5 = .010

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 42: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	8	6.83	6.56	.469	2	.05/5 = .010
T1/T3	5	6.83	6.49	1.000	5	.05/2 = .025
T1/T4	5	6.83	5.99	.188	1	.05/6 = .008
T2/T3	5	6.56	6.49	.813	3	.05/4 = .013
T2/T4	5	6.56	5.99	.813	4	.05/3 = .017
T3/T4	4	6.49	5.99	1.000	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), DNAm = DNA-Methylierung.

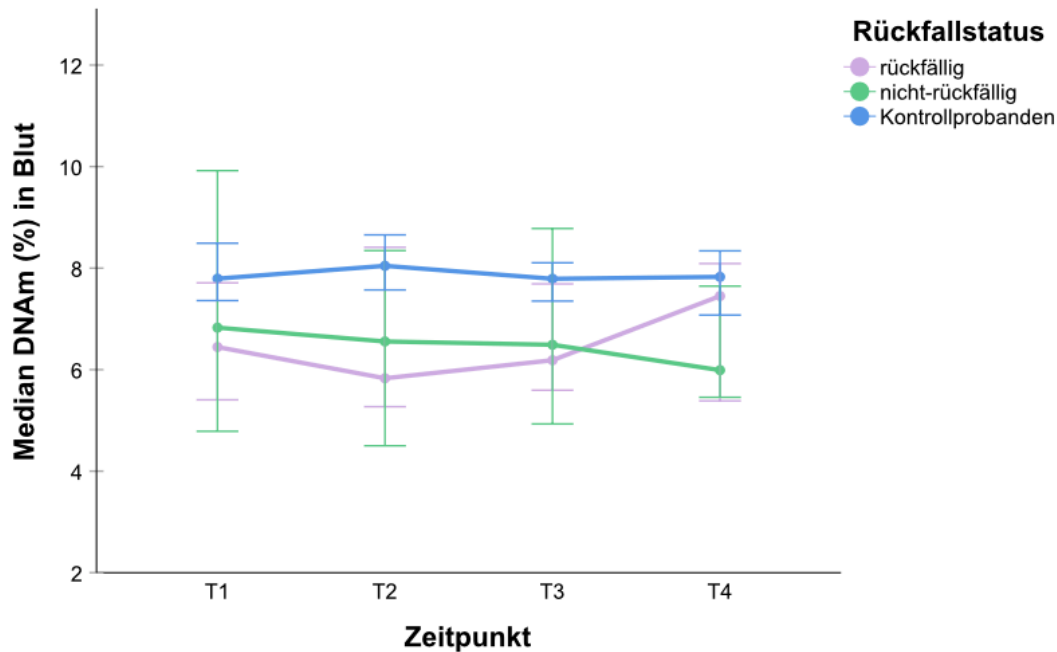


Abbildung 19: Entwicklung der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1/T2(18,8,75), T1/T3(13,5,72), T1/T4(9,5,47), T2/T3(11,5,70), T2/T4(9,5,47), T3/T4(5,4,46). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

3.4.2 Alter als Störfaktor der *HECW2*-DNAm in Blut

Das mittlere Alter der Patienten war mit 49.54 Jahren ($SD = 11.02$) signifikant höher als das der Kontrollprobanden mit 41.04 Jahren ($SD = 13.66$) ($U(67,81) = 1696.5$, $Z = -3.919$, $p < .001^*$, $r = .322$) (siehe Abbildung 20).

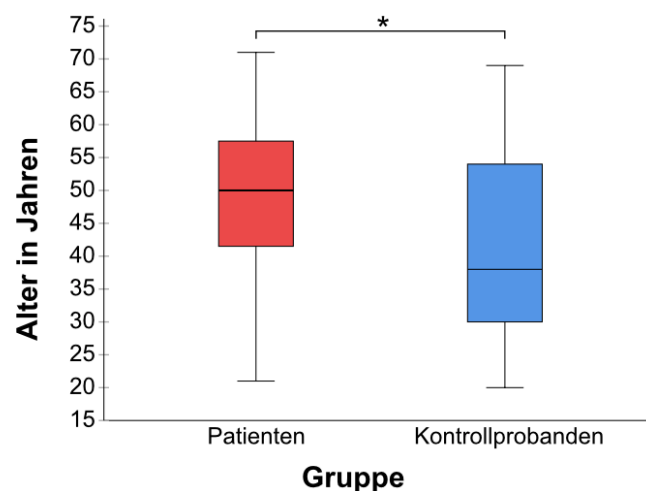


Abbildung 20: Altersunterschied zwischen Patienten und Kontrollprobanden. * = statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, $n(\text{Patienten}) = 67$, $n(\text{Kontrollprobanden}) = 81$. n = Größe der Teilstichprobe.

Auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau fand sich zu jedem Studienzeitpunkt eine signifikante schwache bis mittelstarke negative Korrelation zwischen dem Alter und der *HECW2*-DNAm in Blut (T1: $r_s = -.329^*$, $p < .001$, $n = 146$; T2: $r_s = -.275^*$, $p = .001$, $n = 132$; T3: $r_s = -.228^*$, $p = .029$, $n = 92$; T4: $r_s = -.352^*$, $p = .005$, $n = 62$) (siehe Tabelle 43). Abbildung 21 zeigt exemplarisch das Streudiagramm für T1. Die Streudiagramme der anderen Zeitpunkte sind im Anhang abgebildet (siehe Anhang 7, Abbildung A3 bis Abbildung A5). Bei Betrachtung der Korrelation des Alters mit der DNAm in Blut getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden ergaben sich nur bei den Kontrollprobanden signifikante Korrelationen, hier jedoch zu jedem Zeitpunkt (T1: $r_s = -.496^*$, $p < .001$, $n = 80$; T2: $r_s = -.295^*$, $p = .010$, $n = 76$; T3: $r_s = -.290^*$, $p = .013$, $n = 73$; T4: $r_s = -.315^*$, $p = .029$, $n = 48$) (siehe Tabelle 44 und Abbildung 21).

Tabelle 43: Korrelation der *HECW2*-DNAm (%) in Blut zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, gemeinsam für Patienten und Kontrollprobanden.

		DNAm Blut T1	DNAm Blut T2	DNAm Blut T3	DNAm Blut T4
r_s		-.392*	-.275*	-.228*	-.352*
Signifikanz	Alter	< .001	.001	.029	.005
n		146	132	92	62

Anmerkung. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 44: Korrelation der *HECW2*-DNAm (%) in Blut zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden.

			DNAm Blut T1	DNAm Blut T2	DNAm Blut T3	DNAm Blut T4
Patienten	r_s		.062	.030	.324	.222
	Signifikanz	Alter	.623	.827	.176	.445
	n		66	56	19	14
Kontroll- probanden	r_s		-.496*	-.295*	-.290*	-.315*
	Signifikanz	Alter	< .001	.010	.013	.029
	n		80	76	73	48

Anmerkung. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, DNAm = DNA-Methylierung.

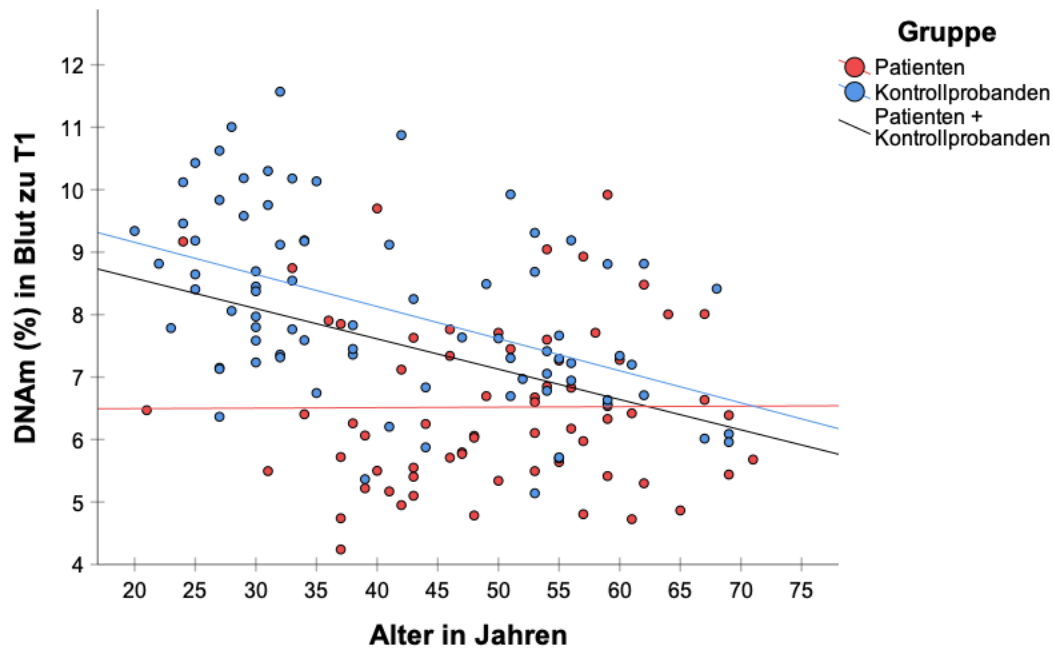


Abbildung 21: Korrelation zwischen der HECW2-DNAm (%) in Blut zu T1 und dem Alter in Jahren. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.329^*$, $p < .001$, $n = 146$; P: $r_s = .062$, $p = .623$, $n = 66$; K: $r_s = -.496^*$, $p < .001$, $n = 80$. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

Eine Alters-Subgruppe, in der die DNAm in Blut nicht mit dem Alter korrelierte, wurde bei einer Grenze von 35 Jahren gefunden. Wurden Probanden im Alter von 35 Jahren und jünger ausgeschlossen (6 Patienten und 40 Kontrollprobanden) und nur die Alters-Subgruppe derjenigen, die 36 Jahre alt oder älter waren betrachtet (fortan als SG36 bezeichnet), so war der Altersunterschied zwischen Patienten (mittleres Alter in der SG36 = 51.23 ± 9.51) und Kontrollprobanden (mittleres Alter in der SG36 = 52.76 ± 8.63) nicht mehr statistisch signifikant ($U(62,41) = 1148.5$, $Z = -0.826$, $p = .409$, $r = .081$) (siehe Abbildung 22).

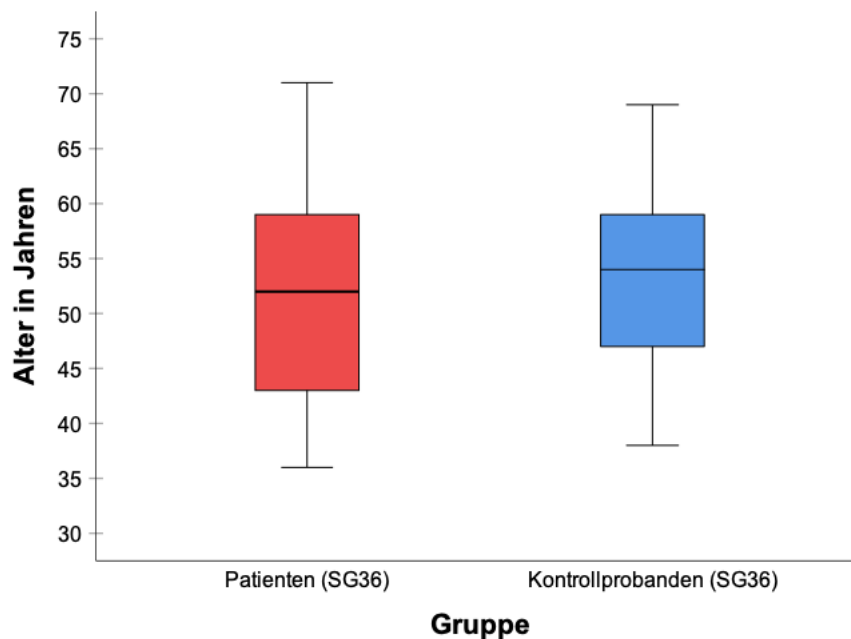


Abbildung 22: Altersunterschied zwischen Patienten und Kontrollprobanden der SG36. Mann-Whitney-U-Test, $n(\text{Patienten (SG36)}) = 62$, $n(\text{Kontrollprobanden (SG36)}) = 41$. SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, n = Größe der Teilstichprobe.

In der SG36 korrelierte die DNAm in Blut nicht länger mit dem Alter (siehe Tabelle 45 und Tabelle 46 sowie Abbildung 23 und Abbildung A6 bis Abbildung A8 in Anhang 7).

Tabelle 45: Korrelation der HECW2-DNAm (%) in Blut zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, gemeinsam für Patienten und Kontrollprobanden der SG36.

		DNAm Blut T1	DNAm Blut T2	DNAm Blut T3	DNAm Blut T4
r_s		.055	-.060	.048	-.190
Signifikanz	Alter	.583	.579	.730	.246
n		102	89	54	39

Anmerkung. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 46: Korrelation der HECW2-DNAm (%) in Blut zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden der SG36.

			DNAm Blut T1	DNAm Blut T2	DNAm Blut T3	DNAm Blut T4
Patienten (SG36)	r_s		.153	-.035	.166	.222
	Signifikanz	Alter	.240	.805	.538	.445
	n		61	51	16	14

			DNAm Blut T1	DNAm Blut T2	DNAm Blut T3	DNAm Blut T4
Kontroll- probanden (SG36)	r_s		-.194	-.204	-.101	-.369
	Signifikanz	Alter	.224	.219	.547	.070
	n		41	38	38	25

Anmerkung. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, DNAm = DNA-Methylierung.

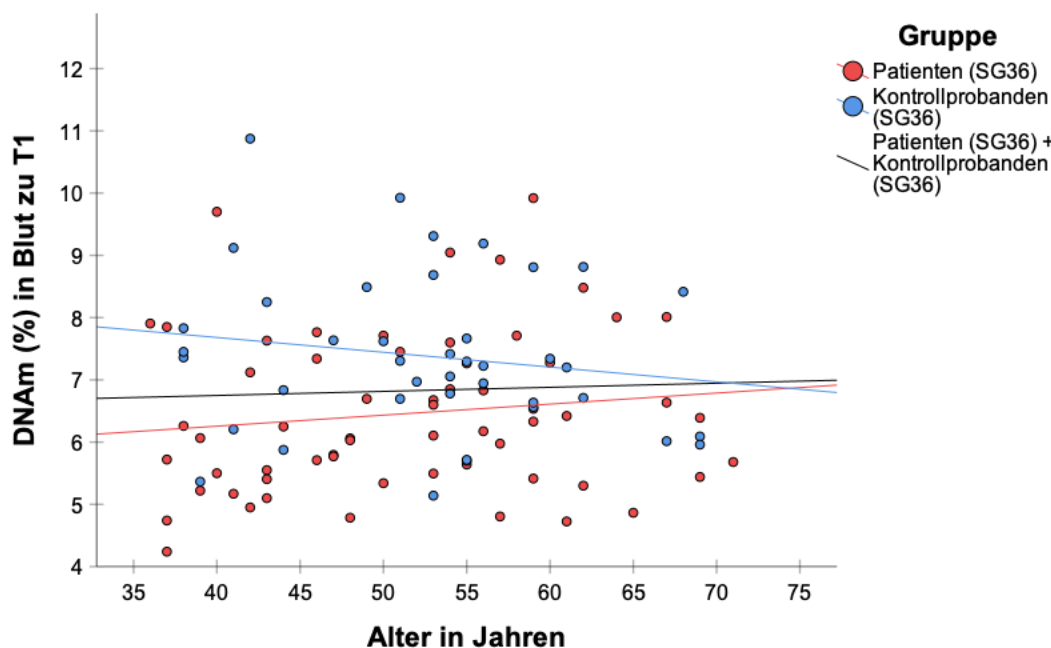


Abbildung 23: Korrelation zwischen der HECW2-DNAm (%) in Blut zu T1 und dem Alter in Jahren in der SG36. Bivariate Korrelation nach Spearman. P(SG36)+K(SG36): $r_s = .055$, $p = .583$, $n = 102$; P(SG36): $r_s = .153$, $p = .240$, $n = 61$; K(SG36): $r_s = -.194$, $p = .224$, $n = 41$. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

3.4.3 Vergleich der HECW2-DNAm in Blut zwischen den (Sub-)Gruppen und über die Zeit in der SG36

Die Analysen aus Abschnitt 3.4.1 wurden nachfolgend mit der SG36 wiederholt.

Die Charakteristika der Patienten und Kontrollprobanden der SG36 sind in Tabelle 47 dargestellt. Zwischen Gruppe und Geschlecht bzw. Gruppe und Raucherstatus gab es jeweils einen statistisch signifikanten Zusammenhang (Geschlecht: $\chi^2(1) = 9.693$, $p = .002^*$, $\phi = .307$; Raucherstatus: $\chi^2(1) = 44.189$, $p < .001^*$, $\phi = -.671$).

Tabelle 47: Deskriptive Analyse der Charakteristika der Studienteilnehmer der SG36 getrennt nach Gruppen.

		Patienten (SG36) (<i>n</i> = 62)	Kontrollprobanden (SG36) (<i>n</i> = 41)	Signifikanz
Mittleres Alter ± <i>SD</i>		51.23 ± 9.51	52.76 ± 8.63	<i>p</i> = .409
Geschlecht	weiblich	<i>n</i> = 20 (32.3 %)	<i>n</i> = 26 (63.4 %)	<i>p</i> = .002*
	männlich	<i>n</i> = 42 (67.7 %)	<i>n</i> = 15 (36.6 %)	
Raucher	ja	<i>n</i> = 45 (76.3 %)	<i>n</i> = 3 (7.7 %)	<i>p</i> < .001*
	nein	<i>n</i> = 14 (23.7 %)	<i>n</i> = 36 (92.3 %)	

Anmerkung. Durchschnittsalter in Jahren. Prozentangabe entspricht dem Anteil innerhalb der jeweiligen Gruppe (mit bekanntem Status). Mann-Whitney-U-Test (Alter) bzw. Chi-Quadrat-Test (Geschlecht und Rauchen). * = statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, *SD* = Standardabweichung, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre.

Tabelle 48 bietet einen Überblick über die deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm der Blutproben von Patienten und Kontrollprobanden der SG36. Bei den Patienten der SG36 lagen die DNAm-Werte (Mediane) zwischen 6.02 % und 6.39 %, bei den Kontrollprobanden der SG36 zwischen 7.08 % und 7.72 % (siehe Tabelle 48).

Tabelle 48: Deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36 zu T1–T4.

Zeitpunkt	Patienten (SG36)			Kontrollprobanden (SG36)		
	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)
T1	61	6.46 (1.28)	6.25 (4.24–9.92)	41	7.38 (1.28)	7.30 (5.14–10.88)
T2	51	6.74 (1.75)	6.06 (4.14–11.07)	38	7.85 (1.45)	7.72 (4.51–11.59)
T3	16	6.61 (1.13)	6.39 (4.93–8.78)	38	7.55 (1.35)	7.38 (4.61–11.54)
T4	14	6.59 (1.16)	6.02 (5.24–8.15)	25	7.59 (1.45)	7.08 (5.18–10.54)

Anmerkung. *n* = Größe der Teilstichprobe, *M* = Mittelwert (%), *SD* = Standardabweichung (Prozentpunkte), *Mdn* = Median (%), *x_{min}* = Minimum (%), *x_{max}* = Maximum (%), SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

In der Alterssubgruppe SG36 war die *HECW2*-DNAm in Blut bei den Patienten ($Mdn_{T1} = 6.25\%$, $Mdn_{T2} = 6.06\%$, $Mdn_{T3} = 6.39\%$, $Mdn_{T4} = 6.02\%$) weiterhin zu allen Zeitpunkten signifikant niedriger als bei den Kontrollprobanden ($Mdn_{T1} = 7.30\%$, $Mdn_{T2} = 7.72\%$, $Mdn_{T3} = 7.38\%$, $Mdn_{T4} = 7.08\%$) (T1: $U(61,41) = 752.0$, $Z = -3.402$, $p < .001^*$, $r = .337$; T2: $U(51,38) = 581.5$, $Z = -3.214$, $p = .001^*$, $r = .341$; T3: $U(16,38) = 178.0$, $Z = -2.387$, $p = .017^*$, $r = .325$; T4: $U(14,25) = 105.0$, $Z = -2.050$, $p = .040^*$, $r = .328$) (siehe Tabelle 49 und Abbildung 24a). Nach Cohen (1992) handelte es sich dabei um mittlere Effekte. Die Mediane von Patienten und Kontrollprobanden der SG36 unterschieden sich im Mittel um 1.19 Prozentpunkte.

Tabelle 49: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36.

Zeitpunkt	<i>n</i> (P(SG36), K(SG36))	<i>Mdn_P</i>	<i>Mdn_K</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	61,41	6.25	7.30	< .001*	1	.05/4 = .013
T2	51,38	6.06	7.72	.001*	2	.05/3 = .017
T3	16,38	6.39	7.38	.017*	3	.05/2 = .025
T4	14,25	6.02	7.08	.040*	4	.05/1 = .050

Anmerkung. Mann-Whitney-U-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, *Mdn_P* = Median der Patienten (%), *Mdn_K* = Median der Kontrollprobanden (%), SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

Die DNAm in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36 zeigte über die Studienzeitpunkte hinweg nur geringfügige Schwankungen ohne signifikante Veränderungen (Patienten (SG36): T1/T2: $Z = -1.149$, $p = .251$, $r = .162$, $N = 50$; T1/T3: $Z = -1.138$, $p = .274$, $r = .285$, $N = 16$; T1/T4: $Z = -0.345$, $p = .761$, $r = .092$, $N = 14$; T2/T3: $Z = -0.534$, $p = .626$, $r = .143$, $N = 14$; T2/T4: $Z = -0.157$, $p = .903$, $r = .042$, $N = 14$; T3/T4: $Z = -0.415$, $p = .734$, $r = .138$, $N = 9$ (bis auf T1/2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 50 und Abbildung 24b); Kontrollprobanden (SG36): T1/T2: $Z = -1.914$, $p = .056$, $r = .310$, $N = 38$; T1/T3: $Z = -0.769$, $p = .442$, $r = .124$, $N = 38$; T1/T4: $Z = -0.081$, $p = .942$, $r = .016$, $N = 25$; T2/T3: $Z = -1.100$, $p = .271$, $r = .183$, $N = 36$; T2/T4: $Z = -2.371$, $p = .016$, $r = .484$, $N = 24$; T3/T4: $Z = -0.057$, $p = .966$, $r = .012$, $N = 24$ (zu T1/T4,

T2/T4 und T3/T4 exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 51 und Abbildung 24b)).

Tabelle 50: Unterschiede der HECW2-DNA_m (%) in Blut von Patienten der SG36 über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	50	6.25	6.06	.251	1	.05/6 = .008
T1/T3	16	6.25	6.39	.274	2	.05/5 = .010
T1/T4	14	6.25	6.02	.761	5	.05/2 = .025
T2/T3	14	6.06	6.39	.626	3	.05/4 = .013
T2/T4	14	6.06	6.02	.903	6	.05/1 = .050
T3/T4	9	6.39	6.02	.734	4	.05/3 = .017

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Bis auf T1/T2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNA_m = DNA-Methylierung.

Tabelle 51: Unterschiede der HECW2-DNA_m (%) in Blut von Kontrollprobanden der SG36 über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	38	7.30	7.72	.056	2	.05/5 = .010
T1/T3	38	7.30	7.38	.442	4	.05/3 = .017
T1/T4	25	7.30	7.08	.942	5	.05/2 = .025
T2/T3	36	7.72	7.38	.271	3	.05/4 = .013
T2/T4	24	7.72	7.08	.016	1	.05/6 = .008
T3/T4	24	7.38	7.08	.966	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Zu T1/T4, T2/T4 und T3/T4 exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNA_m = DNA-Methylierung.

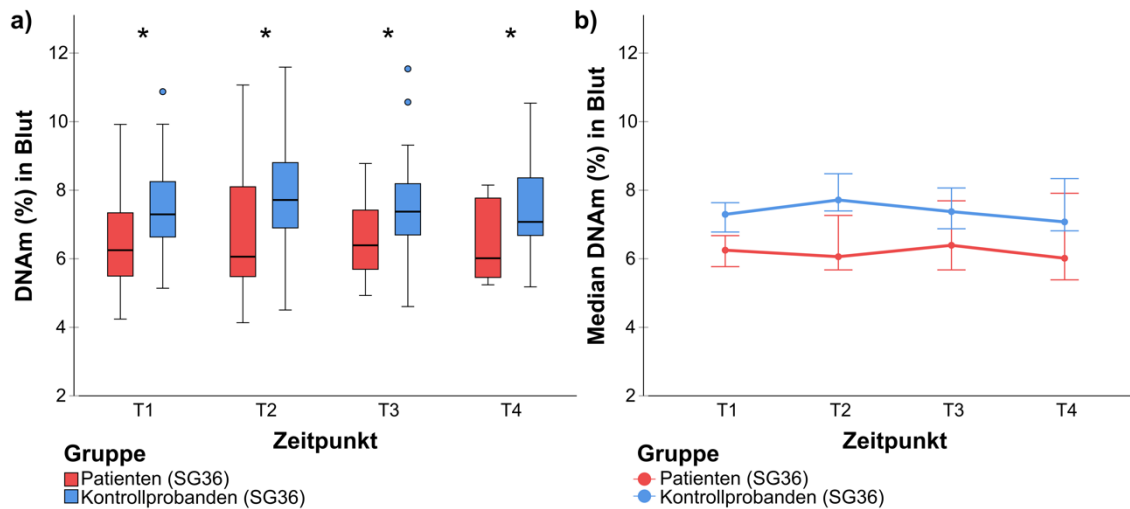


Abbildung 24: a) Vergleich der HECW2-DNA-Methylierung (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36 zu T1–T4. b) Entwicklung der HECW2-DNA-Methylierung (%) in Blut von Patienten und Kontrollprobanden der SG36 über die Zeit. Zu a): * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, Stichprobengrößen (P(SG36),K(SG36)): T1(61,41), T2(51,38), T3(16,38), T4(14,25). **Zu b):** Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (P(SG36),K(SG36)): T1/T2(50,38), T1/T3(16,38), T1/T4(14,25), T2/T3(14,36), T2/T4(14,24), T3/T4(9,24). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 52 zeigt die Charakteristika der rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten der SG36. Das Alter unterschied sich zwischen beiden Subgruppen statistisch signifikant ($U(18,8) = 23.0$, $Z = -2.727$, $p = .005^*$, $r = .535$) (exakte Signifikanz angegeben). Der Zusammenhang zwischen Subgruppe und Geschlecht bzw. Raucherstatus war jeweils nicht signifikant (Geschlecht: $\chi^2(1) = 2.497$, $p = .190$, $\phi = .310$; Raucherstatus: $\chi^2(1) = 1.208$, $p = .382$, $\phi = .216$) (exakte Signifikanz angegeben).

Tabelle 52: Deskriptive Analyse der Charakteristika der Studienteilnehmer der SG36 getrennt nach Rückfallstatus.

		rückfällige Patienten (SG36) (<i>n</i> = 18)	nicht-rückfällige Patienten (SG36) (<i>n</i> = 8)	Signifikanz
Mittleres Alter ± <i>SD</i>		46.61 ± 7.73	56.75 ± 7.42	<i>p</i> = .005*
Geschlecht	weiblich	<i>n</i> = 8 (44.4 %)	<i>n</i> = 1 (12.5 %)	<i>p</i> = .190
	männlich	<i>n</i> = 10 (55.6 %)	<i>n</i> = 7 (87.5 %)	
Raucher	ja	<i>n</i> = 13 (72.2 %)	<i>n</i> = 4 (50.0 %)	<i>p</i> = .382
	nein	<i>n</i> = 5 (27.8 %)	<i>n</i> = 4 (50.0 %)	

Anmerkung. Durchschnittsalter in Jahren. Prozentangabe entspricht dem Anteil innerhalb der jeweiligen Subgruppe (mit bekanntem Status). Mann-Whitney-U-Test (Alter) bzw. exakter Test nach Fisher (Geschlecht und Rauchen). * = statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, *SD* = Standardabweichung, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre.

In Tabelle 53 ist die deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten der SG36 dargestellt. Die DNAm-Werte (Mediane) der rückfälligen Patienten (SG36) erstreckten sich von 6.33 % bis 7.45 %, die der nicht-rückfälligen Patienten (SG36) von 5.99 % bis 6.83 % (siehe Tabelle 53).

Tabelle 53: Deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten der SG36 zu T1–T4.

Zeitpunkt	rückfällige Patienten (SG36)			nicht-rückfällige Patienten (SG36)		
	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)
T1	17	6.52 (1.22)	6.42 (4.95–8.48)	8	7.09 (1.77)	6.83 (4.79–9.92)
T2	16	6.93 (2.01)	6.33 (4.14–10.52)	8	6.48 (1.47)	6.56 (4.50–8.35)
T3	10	6.65 (1.09)	6.64 (5.27–8.34)	5	6.60 (1.44)	6.49 (4.93–8.78)
T4	9	6.80 (1.30)	7.45 (5.24–8.15)	5	6.21 (0.83)	5.99 (5.46–7.65)

Anmerkung. *n* = Größe der Teilstichprobe, *M* = Mittelwert (%), *SD* = Standardabweichung (Prozentpunkte), *Mdn* = Median (%), *x_{min}* = Minimum (%), *x_{max}* = Maximum (%), SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

In der SG36 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden (T1: $H(2) = 3.702$, $p = .157$, $N = 66$; T2: $H(2) = 5.589$, $p = .061$, $N = 62$; T3: $H(2) = 4.985$, $p = .083$, $N = 53$; T4: $H(2) = 4.814$, $p = .090$, $N = 39$). Demnach ergaben auch die paarweisen Vergleiche der (Sub-)Gruppen keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 54 und Abbildung 25a).

Tabelle 54: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden der SG36 im paarweisen Vergleich.

Zeitpunkt	<i>n</i> (R(SG36), N(SG36))	<i>Mdn_R</i>	<i>Mdn_N</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	17,8	6.42	6.83	.472	9	.05/5 = .010
T2	16,8	6.33	6.56	.507	10	.05/3 = .017
T3	10,5	6.64	6.49	.934	12	.05/1 = .050
T4	9,5	7.45	5.99	.434	8	.05/5 = .010
	<i>n</i> (R(SG36), K(SG36))	<i>Mdn_R</i>	<i>Mdn_K</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	17,41	6.42	7.30	.056	3	.05/10 = .005
T2	16,38	6.33	7.72	.096	5	.05/8 = .006
T3	10,38	6.64	7.38	.061	4	.05/9 = .006
T4	9,25	7.45	7.08	.174	7	.05/6 = .008
	<i>n</i> (N(SG36), K(SG36))	<i>Mdn_N</i>	<i>Mdn_K</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	8,41	6.83	7.30	.529	11	.05/2 = .025
T2	8,38	6.56	7.72	.044	1	.05/12 = .004
T3	5,38	6.49	7.38	.135	6	.05/7 = .007
T4	5,25	5.99	7.08	.049	2	.05/11 = .005

Anmerkung. Dunns Post-hoc-Test. *n* = Größe der Teilstichprobe, R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, *Mdn_R* = Median der rückfälligen Patienten (%), *Mdn_N* = Median der nicht-rückfälligen Patienten (%), *Mdn_K* = Median der Kontrollprobanden (%), SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

Über die Zeit betrachtet zeigten sich weder bei den rückfälligen noch bei den nicht-rückfälligen Patienten der SG36 signifikante Unterschiede. Beide Subgruppen zeigten jedoch von T1 zu T2 einen Abwärtstrend (rückfällige Patienten (SG36): T1/T2: $Z = -0.682$, $p = .524$, $r = .176$, $N = 15$; nicht-rückfällige Patienten (SG36): T1/T2: $Z = -0.845$, $p = .469$, $r = .299$, $N = 8$). Während die prozentuale *HECW2*-DNAm in Blut bei den rückfälligen Patienten der SG36 ab T2 immer weiter zunahm (T2/T3: $Z = -0.280$, $p = .844$, $r = .099$, $N = 8$; T2/T4: $Z = -0.415$, $p = .734$, $r = .138$, $N = 9$; T3/T4: $Z = -0.674$, $p = .625$, $r = .301$, $N = 5$) und zu T4 mit einem Median von 7.45 % ihren Höhepunkt erreichte (jeweils exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 55 und Abbildung 25b), nahm die DNAm der nicht-rückfälligen Patienten der SG36 immer weiter ab (T2/T3: $Z = -0.405$, $p = .813$, $r = .181$, $N = 5$; T2/T4: $Z = -0.405$, $p = .813$, $r = .181$, $N = 5$; T3/T4: $Z = 0.000$, $p = 1.000$, $r = .000$, $N = 4$) und erreichte zu T4 mit einem Median von 5.99 % ihren Tiefpunkt (jeweils exakte Signifikanz angegeben) (siehe Tabelle 56 und Abbildung 25b).

Tabelle 55: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen Patienten der SG36 über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	15	6.42	6.33	.524	3	.05/4 = .013
T1/T3	10	6.42	6.64	.492	2	.05/5 = .010
T1/T4	9	6.42	7.45	.426	1	.05/6 = .008
T2/T3	8	6.33	6.64	.844	6	.05/1 = .050
T2/T4	9	6.33	7.45	.734	5	.05/2 = .025
T3/T4	5	6.64	7.45	.625	4	.05/3 = .017

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 56: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von nicht-rückfälligen Patienten der SG36 über die Zeit.

Zeitpunkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	8	6.83	6.56	.469	2	.05/5 = .010
T1/T3	5	6.83	6.49	1.000	5	.05/2 = .025
T1/T4	5	6.83	5.99	.188	1	.05/6 = .008
T2/T3	5	6.56	6.49	.813	3	.05/4 = .013
T2/T4	5	6.56	5.99	.813	4	.05/3 = .017
T3/T4	4	6.49	5.99	1.000	6	.05/1 = .050

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

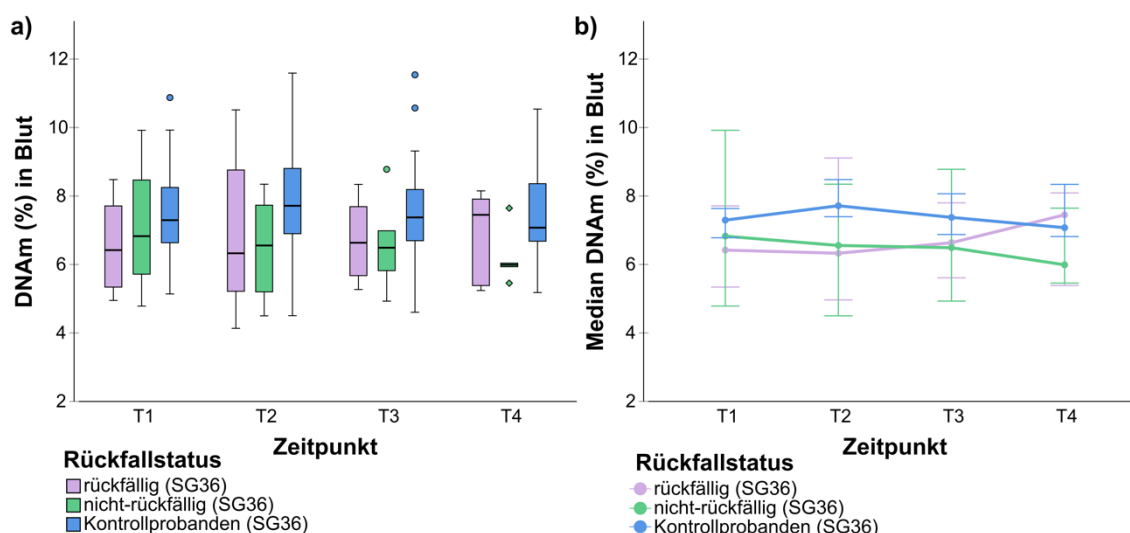


Abbildung 25: a) Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden der SG36 zu T1–T4. b) Entwicklung der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden der SG36 über die Zeit. Zu a): Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. Dunns Post-hoc-Test, Stichprobengrößen (R(SG36),N(SG36),K(SG36)): T1(17,8,41), T2(16,8,38), T3(10,5,38), T4(9,5,25). Zu b): Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (R(SG36),N(SG36),K(SG36)): T1/T2(15,8,38), T1/T3(10,5,38), T1/T4(9,5,25), T2/T3(8,5,36), T2/T4(9,5,24), T3/T4(5,4,24). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

3.4.4 Geschlecht und Rauchen als Störfaktoren der *HECW2*-DNAm in Blut

Der Anteil von weiblichen und männlichen Teilnehmern war sowohl zwischen beiden Gruppen als auch innerhalb der Gruppen ungleich verteilt: Das

Patientenkollektiv der SG36 bestand zu 32.3 % aus weiblichen und zu 67.7 % aus männlichen Teilnehmern, das Kontrollprobandenkollektiv der SG36 bestand zu 63.4 % aus weiblichen und zu 36.6 % aus männlichen Teilnehmern. Um zu untersuchen, ob die *HECW2*-DNAm in Blut vom Geschlecht abhängt, wurde die DNAm getrennt für Patienten und Kontrollprobanden der SG36 zu jedem Zeitpunkt einzeln auf einen Unterschied zwischen den Geschlechtern untersucht. Die *HECW2*-DNAm in Blut war zwischen männlichen und weiblichen Patienten der SG36 zu T3 signifikant unterschiedlich (T3: $U(10,6) = 0.0$, $Z = -3.254$, $p < .001^*$, $r = .814$; exakte Signifikanz angegeben), zu den anderen Zeitpunkten jedoch vergleichbar (T1: $U(42,19) = 388.0$, $Z = -0.171$, $p = .864$, $r = .022$; T2: $U(35,16) = 261.5$, $Z = -0.376$, $p = .707$, $r = .053$; T4: $U(9,5) = 12.5$, $Z = -1.335$, $p = .190$, $r = .357$; zu T4 exakte Signifikanz angegeben). Zwischen männlichen und weiblichen Kontrollprobanden zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der *HECW2*-DNAm in Blut (T1: $U(15,26) = 145.0$, $Z = -1.353$, $p = .176$, $r = .211$; T2: $U(14,24) = 151.0$, $Z = -0.514$, $p = .607$, $r = .083$; T3: $U(12,26) = 152.0$, $Z = -0.126$, $p = .900$, $r = .020$; T4: $U(9,16) = 49.0$, $Z = -1.302$, $p = .207$, $r = .260$; zu T4 exakte Signifikanz angegeben) (siehe Abbildung 26).

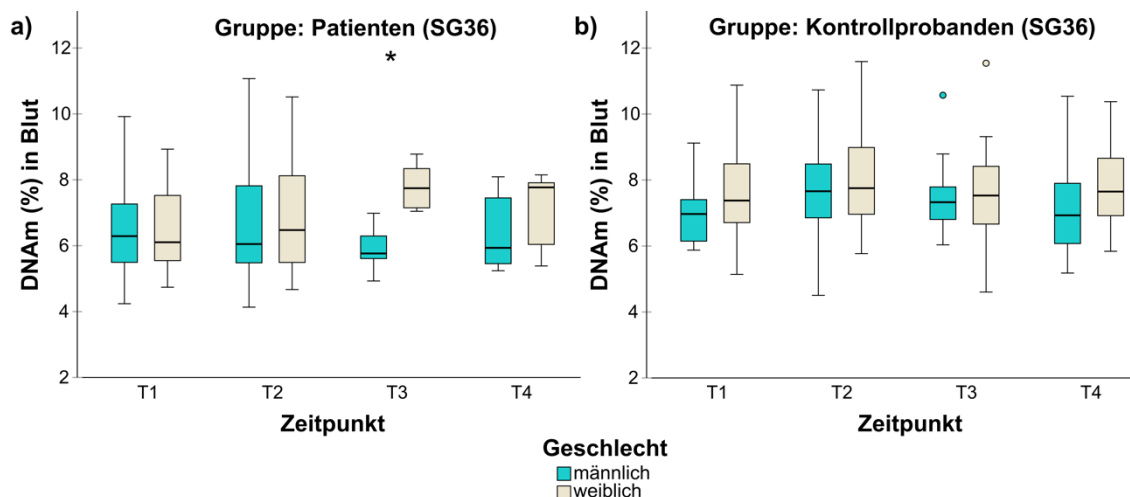


Abbildung 26: Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von männlichen und weiblichen Probanden der SG36 zu T1–T4 getrennt nach a) Patienten und b) Kontrollprobanden. Kreise entsprechen leichten Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, $n(\text{Patienten}(\text{männlich}, \text{weiblich}))$: $n_{T1} = 42,19$; $n_{T2} = 35,16$; $n_{T3} = 10,6$; $n_{T4} = 9,5$; $n(\text{Kontrollprobanden}(\text{männlich}, \text{weiblich}))$: $n_{T1} = 15,26$; $n_{T2} = 14,24$; $n_{T3} = 12,26$; $n_{T4} = 9,16$. n = Größe der Teilstichprobe, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

Auch das Rauchen wurde als möglicher Störfaktor untersucht, da in der SG36 76.3 % der Patienten mit bekanntem Raucherstatus, aber nur 7.7 % der Kontrollprobanden mit bekanntem Raucherstatus Raucher waren. Die *HECW2*-DNAm in Blut war zwischen Rauchern und Nichtrauchern der SG36 getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden zu jedem Studienzeitpunkt auf einem ähnlichen Niveau (Patienten: T1: $U(14,44) = 254.0$, $Z = -0.981$, $p = .326$, $r = .129$; T2: $U(13,36) = 174.0$, $Z = -1.359$, $p = .174$, $r = .194$; T3: $U(6,10) = 30.0$, $Z = 0.0$, $p = 1.000$, $r = .000$; T4: $U(7,7) = 20.5$, $Z = -0.512$, $p = .620$, $r = .137$; zu T3 und T4 exakte Signifikanz angegeben; Kontrollprobanden: T1: $U(36,3) = 24.0$, $Z = -1.581$, $p = .114$, $r = .253$; T2: $U(34,3) = 48.0$, $Z = -0.167$, $p = .867$, $r = .027$; T3: $U(34,2) = 13.0$, $Z = -1.450$, $p = .147$, $r = .242$; T4: $U(24,1) = 9.0$, $Z = -0.416$, $p = .800$, $r = .083$; zu T4 exakte Signifikanz angegeben) (siehe Abbildung 27).

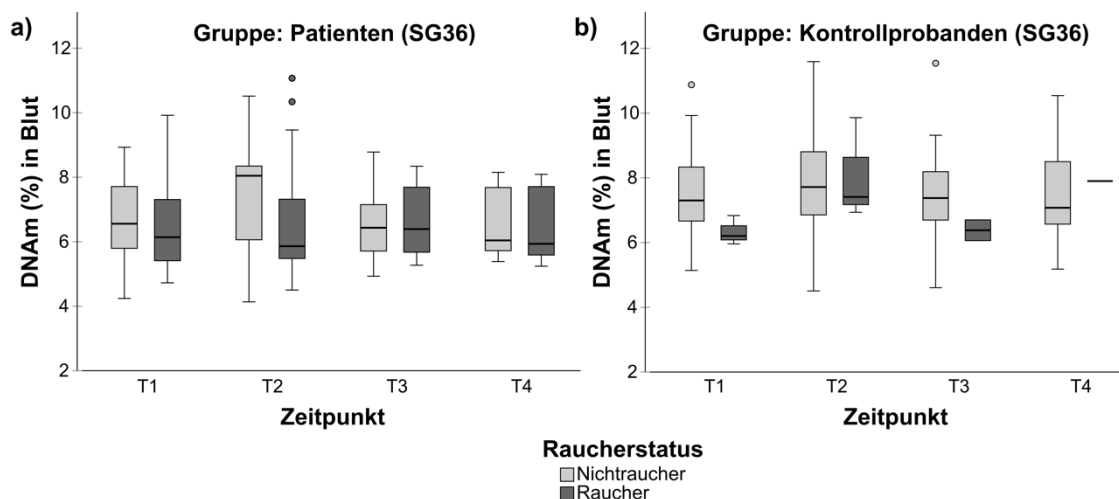


Abbildung 27: Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in Blut von Nichtrauchern und Rauchern der SG36 zu T1–T4 getrennt nach a) Patienten und b) Kontrollprobanden. Kreise entsprechen leichten Ausreißern. Mann-Whitney-U-Test, $n(\text{Patienten}(\text{Nichtraucher}, \text{Raucher}))$: $n_{T1} = 14,44$; $n_{T2} = 13,36$; $n_{T3} = 6,10$; $n_{T4} = 7,7$; $n(\text{Kontrollprobanden}(\text{Nichtraucher}, \text{Raucher}))$: $n_{T1} = 36,3$; $n_{T2} = 34,3$; $n_{T3} = 34,2$; $n_{T4} = 24,1$. n = Größe der Teilstichprobe, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

3.4.5 Korrelation der *HECW2*-DNAm in Blut mit den Fragebogen-Scores

Um zu untersuchen, ob die Höhe der *HECW2*-DNAm in Blut mit Faktoren wie der psychischen Belastung (GSI), dem Alkoholkonsum (AUDIT) oder dem Alkoholverlangen (OCDS) zusammenhängt, wurde die DNAm mit den jeweiligen Fragebogen-Scores korreliert. Da hier v. a. die allgemeine Beziehung zwischen jeweiligem Score auf der einen und DNAm auf der anderen Seite von Interesse

war, wurden zunächst Patienten und Kontrollprobanden gemeinsam über alle Zeitpunkte zusammen untersucht. Um zu erfahren, ob die Beziehung zwischen beiden Variablen so eng verknüpft war, dass auch jeweils innerhalb der beiden Gruppen eine signifikante Korrelation bestand, wurden diese anschließend auch getrennt voneinander untersucht. Da sich das Alter – wie in Abschnitt 3.4.2 gezeigt – als Störfaktor der *HECW2*-DNAm in Blut herausstellte, wurden die Probanden der SG36 verwendet.

Der GSI-Score korrelierte schwach, aber signifikant negativ mit der *HECW2*-DNAm in Blut ($r_s = -.215^*$, $p < .001$, $n = 271$) (siehe Abbildung 28). Getrennt nach Gruppen fand sich keine Korrelation (Patienten: $r_s = .074$, $p = .404$, $n = 131$; Kontrollprobanden: $r_s = -.095$, $p = .262$, $n = 140$).

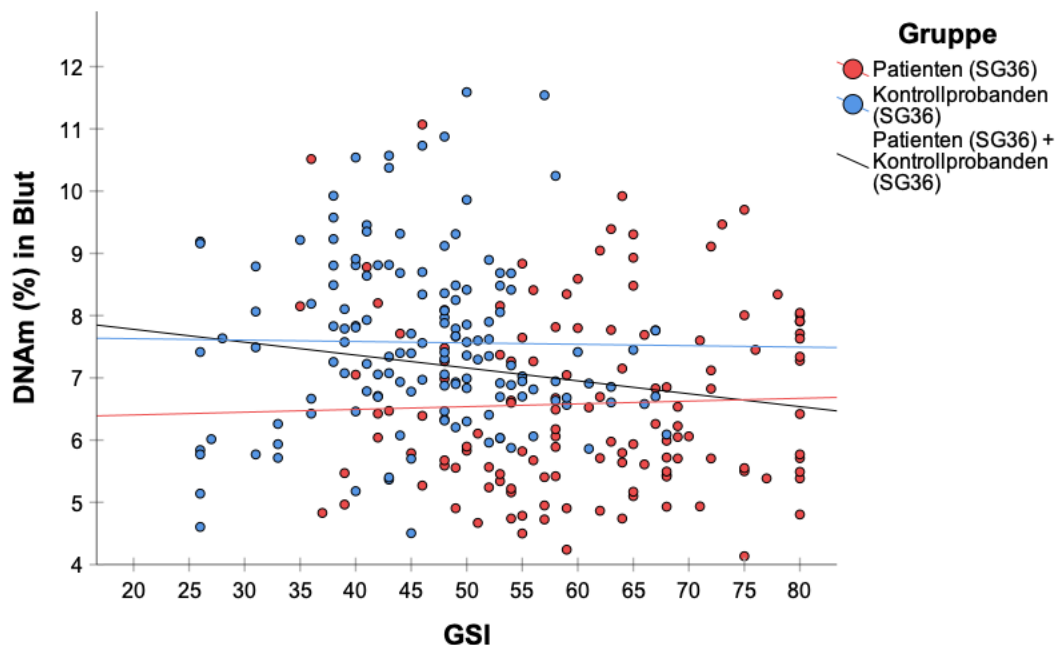


Abbildung 28: Korrelation zwischen der *HECW2*-DNAm (%) in Blut und dem GSI-Score in der SG36. Bivariate Korrelation nach Spearman. P(SG36)+K(SG36): $r_s = -.215^*$, $p < .001$, $n = 271$; P(SG36): $r_s = .074$, $p = .404$, $n = 131$; K(SG36): $r_s = -.095$, $p = .262$, $n = 140$. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung, GSI = *Global Severity Index*.

Der AUDIT-Score wies eine signifikante mittelstarke negative Korrelation mit der DNAm in Blut auf. ($r_s = -.362^*$, $p < .001$, $n = 218$) (siehe Abbildung 29). Getrennt nach Gruppen fand sich keine Korrelation (Patienten: $r_s = -.096$, $p = .330$, $n = 106$; Kontrollprobanden: $r_s = -.077$, $p = .419$, $n = 112$).

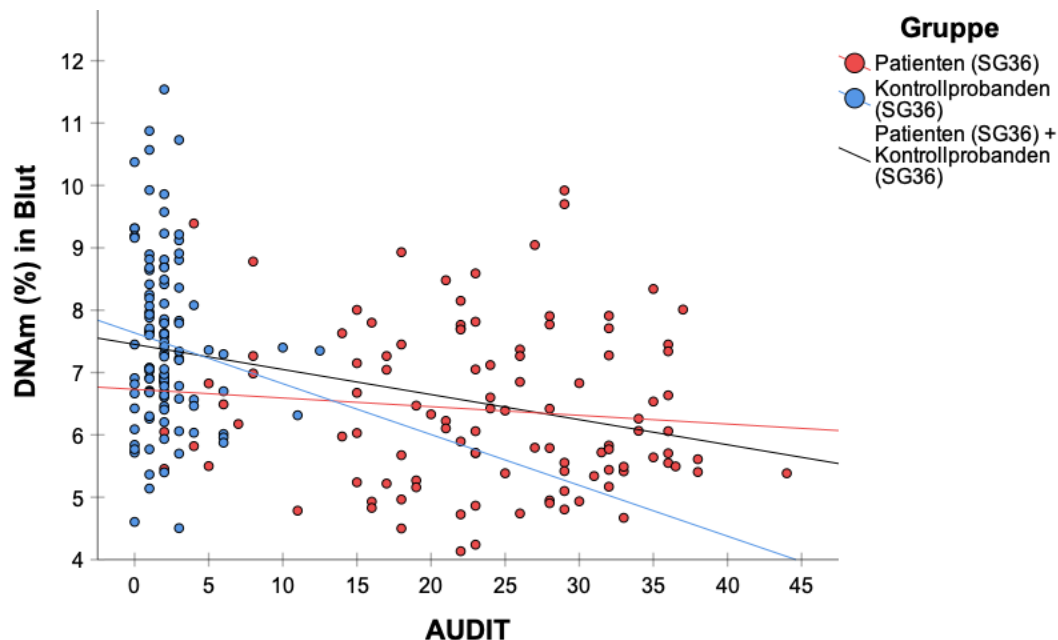


Abbildung 29: Korrelation zwischen der HECW2-DNAm (%) in Blut und dem AUDIT-Score in der SG36. Bivariate Korrelation nach Spearman. P(SG36)+K(SG36): $r_s = -.362^*$, $p < .001$, $n = 218$; P(SG36): $r_s = -.096$, $p = .330$, $n = 106$; K(SG36): $r_s = -.077$, $p = .419$, $n = 112$. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung, AUDIT = Alcohol Use Disorders Identification Test.

Der OCDS-Score korrelierte signifikant moderat negativ mit der DNAm in Blut ($r_s = -.351^*$, $p < .001$, $n = 270$) (siehe Abbildung 30). Getrennt nach Gruppen fand sich jeweils eine schwache negative nicht signifikante Korrelation (Patienten: $r_s = -.103$, $p = .239$, $n = 133$; Kontrollprobanden: $r_s = -.142$, $p = .099$, $n = 137$).

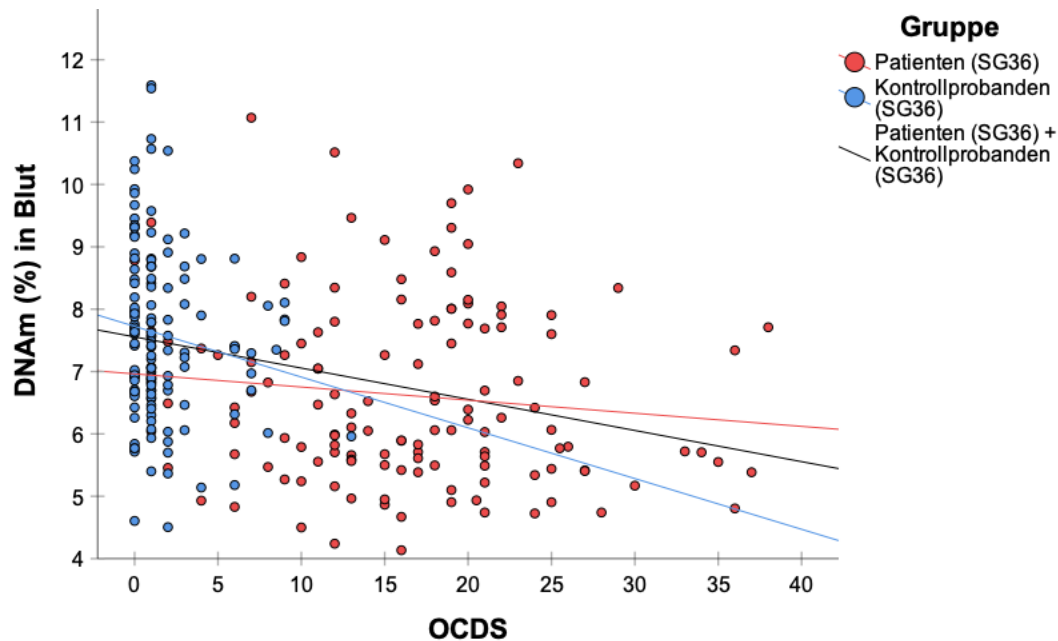


Abbildung 30: Korrelation zwischen der *HECW2*-DNAm (%) in Blut und dem OCDS-Score in der SG36. Bivariate Korrelation nach Spearman. P(SG36)+K(SG36): $r_s = -.351^*$, $p < .001$, $n = 270$; P(SG36): $r_s = -.103$, $p = .239$, $n = 133$; K(SG36): $r_s = -.142$, $p = .099$, $n = 137$. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

3.5 *HECW2*-DNAm in Speichel

Im Folgenden wurde die DNAm von *HECW2* (cg18752527) in Speichel analysiert.

3.5.1 Vergleich der *HECW2*-DNAm in Speichel zwischen den (Sub-)Gruppen und über die Zeit

Tabelle 57 gibt einen Überblick über die Stichprobengrößen, Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane sowie die minimalen und maximalen Werte der *HECW2*-DNAm-Untersuchung der Speichelproben von Patienten und Kontrollprobanden. Die DNAm-Werte (Mediane) bewegten sich bei den Patienten zwischen 12.47 % und 15.87 %, bei den Kontrollprobanden zwischen 15.89 % und 20.48 % (siehe Tabelle 57).

Tabelle 57: Deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4.

Zeitpunkt	Patienten			Kontrollprobanden		
	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)
T1	53	14.49 (6.05)	13.91 (5.37–29.49)	64	20.29 (9.42)	17.81 (8.25–43.06)
T2	51	15.59 (5.48)	15.87 (5.71–30.29)	48	22.74 (12.03)	19.31 (7.22–52.54)
T3	17	16.02 (9.10)	12.47 (4.97–39.25)	54	22.15 (9.89)	20.48 (8.08–52.49)
T4	13	15.95 (8.73)	13.19 (7.75–34.90)	34	18.63 (8.87)	15.89 (6.31–38.07)

Anmerkung. *n* = Größe der Teilstichprobe, *M* = Mittelwert (%), *SD* = Standardabweichung (Prozentpunkte), *Mdn* = Median (%), *x_{min}* = Minimum (%), *x_{max}* = Maximum (%), DNAm = DNA-Methylierung.

Die prozentuale *HECW2*-DNAm in Speichel war bei den Patienten ($Mdn_{T1} = 13.91\%$, $Mdn_{T2} = 15.87\%$, $Mdn_{T3} = 12.47\%$, $Mdn_{T4} = 13.19\%$) im Vergleich zu den Kontrollprobanden ($Mdn_{T1} = 17.81\%$, $Mdn_{T2} = 19.31\%$, $Mdn_{T3} = 20.48\%$, $Mdn_{T4} = 15.89\%$) zu allen vier Zeitpunkten niedriger – bis auf T4 war dieser Unterschied statistisch signifikant (T1: $U(53,64) = 1073.0$, $Z = -3.411$, $p < .001^*$, $r = .315$; T2: $U(51,48) = 800.0$, $Z = -2.969$, $p = .003^*$, $r = .298$; T3: $U(17,54) = 278.0$, $Z = -2.439$, $p = .015^*$, $r = .289$; T4: $U(13,34) = 161.0$, $Z = -1.427$, $p = .154$, $r = .208$) (siehe Tabelle 58 und Abbildung 31). Nach Cohen (1992) handelte es sich zu T2 bis T4 um kleine Effekte und zu T1 um einen mittleren Effekt. Die mittlere Differenz der Mediane von Patienten und Kontrollprobanden betrug 4.51 Prozentpunkte.

Tabelle 58: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von Patienten und Kontrollprobanden.

Zeitpunkt	<i>n</i> (P,K)	<i>Mdn_P</i>	<i>Mdn_K</i>	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	53,64	13.91	17.81	< .001*	1	.05/4 = .013
T2	51,48	15.87	19.31	.003*	2	.05/3 = .017
T3	17,54	12.47	20.48	.015*	3	.05/2 = .025
T4	13,34	13.19	15.89	.154	4	.05/1 = .050

Anmerkung. Mann-Whitney-U-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. *n* = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, *Mdn_P* = Median der Patienten (%), *Mdn_K* = Median der Kontrollprobanden (%), DNAm = DNA-Methylierung.

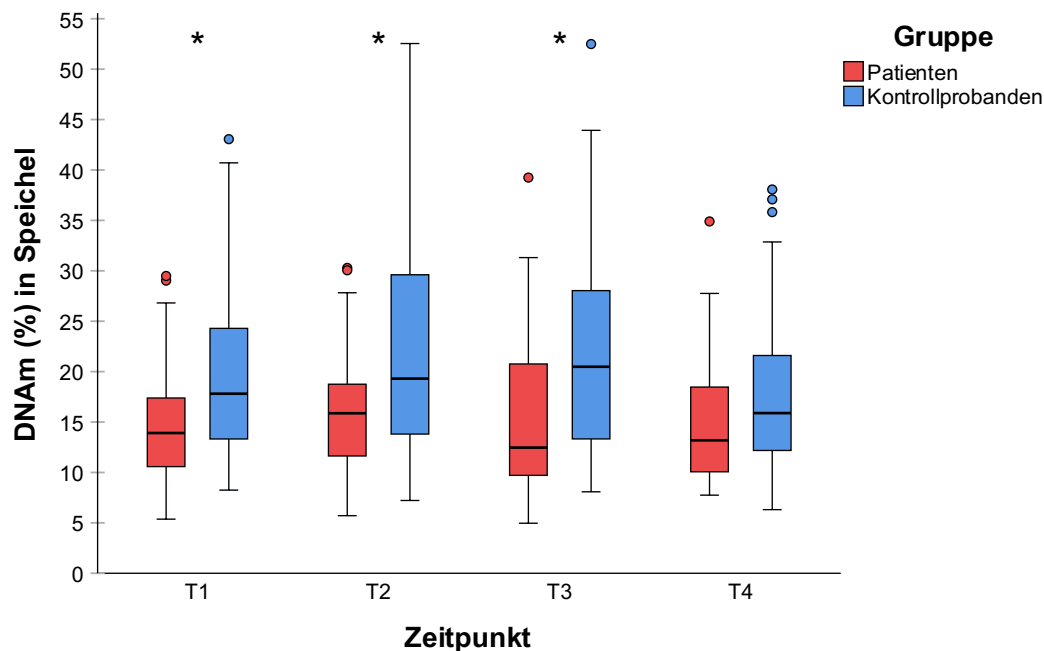


Abbildung 31: Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von Patienten und Kontrollprobanden zu T1–T4. Kreise entsprechen leichten Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1(53,64), T2(51,48), T3(17,54), T4(13,34). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

Die *HECW2*-DNAm in Speichel veränderte sich über die Zeit weder bei den Patienten noch bei den Kontrollprobanden signifikant. Bei den Patienten zeigte sich jedoch ein schwacher Aufwärtstrend von T1 (*Mdn* = 13.91 %) zu T2 (*Mdn* = 15.87 %) (T1/T2: *Z* = -0.807, *p* = .420, *r* = .120, *N* = 45). Von T2 zu T3 fiel der Median auf 12.47 % ab (T2/T3: *Z* = -0.682, *p* = .524, *r* = .176, *N* = 15) und blieb von T3 bis T4 auf einem vergleichbaren Level (*Mdn* = 13.19 %) (T3/T4:

$Z = -0.280$, $p = .844$, $r = .099$, $N = 8$) (bis auf T1/T2 (asymptotisch) exakte Signifikanz) (siehe Tabelle 59 und Abbildung 32). Das DNAm-Level der Kontrollprobanden zeigte ebenfalls einen kleinen Aufwärtstrend von T1 ($Mdn = 17.81\%$) zu T2 ($Mdn = 19.31\%$) (T1/T2: $Z = -1.075$, $p = .283$, $r = .164$, $N = 43$) und weiter zu T3 ($Mdn = 20.48\%$) (T2/T3: $Z = -0.631$, $p = .528$, $r = .101$, $N = 39$; T1/T3: $Z = -0.897$, $p = .370$, $r = .134$, $N = 45$). Von T3 zu T4 zeigte sich ein Abwärtstrend (T3/T4: $Z = -1.752$, $p = .080$, $r = .320$, $N = 30$) (siehe Tabelle 60 und Abbildung 32).

Tabelle 59: Unterschiede der HECW2-DNAm (%) in Speichel von Patienten über die Zeit.

Zeit-punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	45	13.91	15.87	.420	2	.05/5 = .010
T1/T3	15	13.91	12.47	.599	4	.05/3 = .017
T1/T4	10	13.91	13.19	1.000	6	.05/1 = .050
T2/T3	15	15.87	12.47	.524	3	.05/4 = .013
T2/T4	13	15.87	13.19	.168	1	.05/6 = .008
T3/T4	8	12.47	13.19	.844	5	.05/2 = .025

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Bis auf T1/T2 (asymptotische) exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 60: Unterschiede der HECW2-DNAm (%) in Speichel von Kontrollprobanden über die Zeit.

Zeit-punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	43	17.81	19.31	.283	3	.05/4 = .013
T1/T3	45	17.81	20.48	.370	4	.05/3 = .017
T1/T4	32	17.81	15.89	.852	6	.05/1 = .050
T2/T3	39	19.31	20.48	.528	5	.05/2 = .025
T2/T4	31	19.31	15.89	.104	2	.05/5 = .010
T3/T4	30	20.48	15.89	.080	1	.05/6 = .008

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), DNAm = DNA-Methylierung.

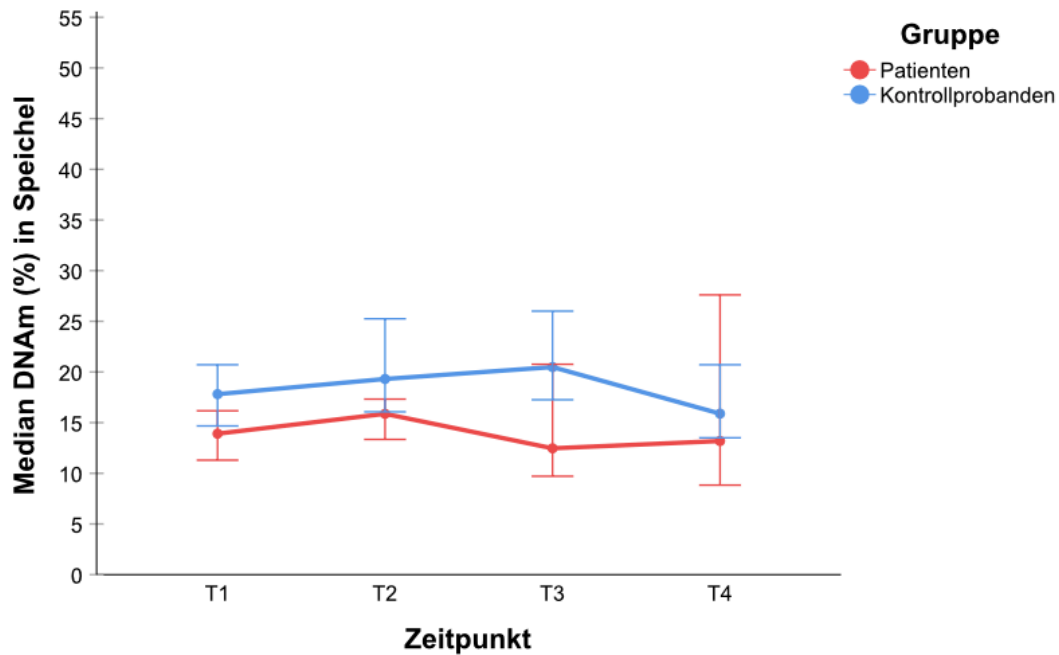


Abbildung 32: Entwicklung der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von Patienten und Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (P,K): T1/T2(45,43), T1/T3(15,45), T1/T4(10,32), T2/T3(15,39), T2/T4(13,31), T3/T4(8,30). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

In Tabelle 61 ist die deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten dargestellt. Die DNAm-Werte (Mediane) der rückfälligen Patienten reichten von 13.39 % bis 17.07 %, die der nicht-rückfälligen Patienten von 9.07 % bis 13.91 % (siehe Tabelle 61).

Tabelle 61: Deskriptive Analyse der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu T1–T4.

Zeitpunkt	rückfällige Patienten			nicht-rückfällige Patienten		
	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)	<i>n</i>	<i>M</i> (<i>SD</i>)	<i>Mdn</i> (<i>x_{min}</i> – <i>x_{max}</i>)
T1	17	16.87 (5.30)	17.07 (8.98–29.49)	7	11.32 (5.87)	9.23 (6.29–23.31)
T2	19	17.22 (5.04)	16.48 (8.44–30.29)	8	13.36 (4.06)	13.91 (6.27–17.59)
T3	11	18.32 (9.64)	13.39 (8.46–39.25)	5	9.28 (3.12)	9.07 (4.97–13.75)
T4	8	19.59 (9.39)	16.61 (8.84–34.90)	5	10.14 (2.37)	10.07 (7.75–13.97)

Anmerkung. *n* = Größe der Teilstichprobe, *M* = Mittelwert (%), *SD* = Standardabweichung (Prozentpunkte), *Mdn* = Median (%), *x_{min}* = Minimum (%), *x_{max}* = Maximum (%), DNAm = DNA-Methylierung.

Die drei (Sub-)Gruppen (rückfällige und nicht-rückfällige Patienten sowie Kontrollprobanden) wiesen in ihrer prozentualen *HECW2*-DNAm in Speichel zu allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede auf (T1: $H(2) = 8.866$, $p = .012^*$, $N = 88$; T2: $H(2) = 6.490$, $p = .039^*$, $N = 75$; T3: $H(2) = 10.346$, $p = .006^*$, $N = 70$; T4: $H(2) = 7.443$, $p = .024^*$, $N = 47$).

Zu allen vier Zeitpunkten lagen die Mediane der rückfälligen Patienten näher an denen der Kontrollprobanden als die der nicht-rückfälligen Patienten. Zwischen rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (T1: $Z = -0.878$, $p = .380$, $r = .098$, $n(R,K) = 17,64$; T2: $Z = -1.230$, $p = .219$, $r = .150$, $n(R,K) = 19,48$; T3: $Z = -1.275$, $p = .202$, $r = .158$, $n(R,K) = 11,54$; T4: $Z = 0.113$, $p = .910$, $r = .017$, $n(R,K) = 8,34$). Die DNAm der nicht-rückfälligen Patienten war zu T1 und T3 signifikant niedriger als die der Kontrollprobanden (T1: $Z = -2.942$, $p = .003^*$, $r = .349$, $n(N,K) = 7,64$; T3: $Z = -3.085$, $p = .002^*$, $r = .402$, $n(N,K) = 5,54$). Zu T2 und T4 waren die Unterschiede auf dem nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveau bei mittlerer Effektstärke statistisch nicht signifikant (T2: $Z = -2.433$, $p = .015$, $r = .325$, $n(N,K) = 8,48$; T4: $Z = -2.675$, $p = .007$, $r = .428$, $n(N,K) = 5,34$). Die Mediane der rückfälligen Patienten ($Mdn_{T1} = 17.07\%$, $Mdn_{T2} = 16.48\%$,

$Mdn_{T3} = 13.39 \%$, $Mdn_{T4} = 16.61 \%$) waren von T1 bis T4 höher als die der nicht-rückfälligen Patienten ($Mdn_{T1} = 9.23 \%$, $Mdn_{T2} = 13.91 \%$, $Mdn_{T3} = 9.07 \%$, $Mdn_{T4} = 10.07 \%$). Zu T1 entsprach dies einem mittleren Effekt (T1: $Z = -2.074$, $p = .038$, $r = .423$, $n(R,N) = 17,7$), zu T2 einem kleinen (T2: $Z = -1.414$, $p = .157$, $r = .272$, $n(R,N) = 19,8$), zu T3 wieder einem mittleren (T3: $Z = -1.892$, $p = .059$, $r = .473$, $n(R,N) = 11,5$) und zu T4 einem starken Effekt (T4: $Z = -2.325$, $p = .020$, $r = .645$, $n(R,N) = 8,5$). Die p -Werte blieben jedoch oberhalb des angepassten Signifikanzniveaus (siehe Tabelle 62 und Abbildung 33).

Tabelle 62: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden im paarweisen Vergleich.

Zeitpunkt	n (R,N)	Mdn_R	Mdn_N	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	17,7	17.07	9.23	.038	6	.05/7 = .007
T2	19,8	16.48	13.91	.157	8	.05/5 = .010
T3	11,5	13.39	9.07	.059	7	.05/6 = .008
T4	8,5	16.61	10.07	.020	5	.05/8 = .006
	n (R,K)	Mdn_R	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	17,64	17.07	17.81	.380	11	.05/2 = .025
T2	19,48	16.48	19.31	.219	10	.05/3 = .017
T3	11,54	13.39	20.48	.202	9	.05/4 = .013
T4	8,34	16.61	15.89	.910	12	.05/1 = .050
	n (N,K)	Mdn_N	Mdn_K	p -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1	7,64	9.23	17.81	.003*	2	.05/11 = .005
T2	8,48	13.91	19.31	.015	4	.05/9 = .006
T3	5,54	9.07	20.48	.002*	1	.05/12 = .004
T4	5,34	10.07	15.89	.007	3	.05/10 = .005

Anmerkung. Dunns Post-hoc-Test. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. n = Größe der Teilstichprobe, R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, Mdn_R = Median der rückfälligen Patienten (%), Mdn_N = Median der nicht-rückfälligen Patienten (%), Mdn_K = Median der Kontrollprobanden (%), DNAm = DNA-Methylierung.

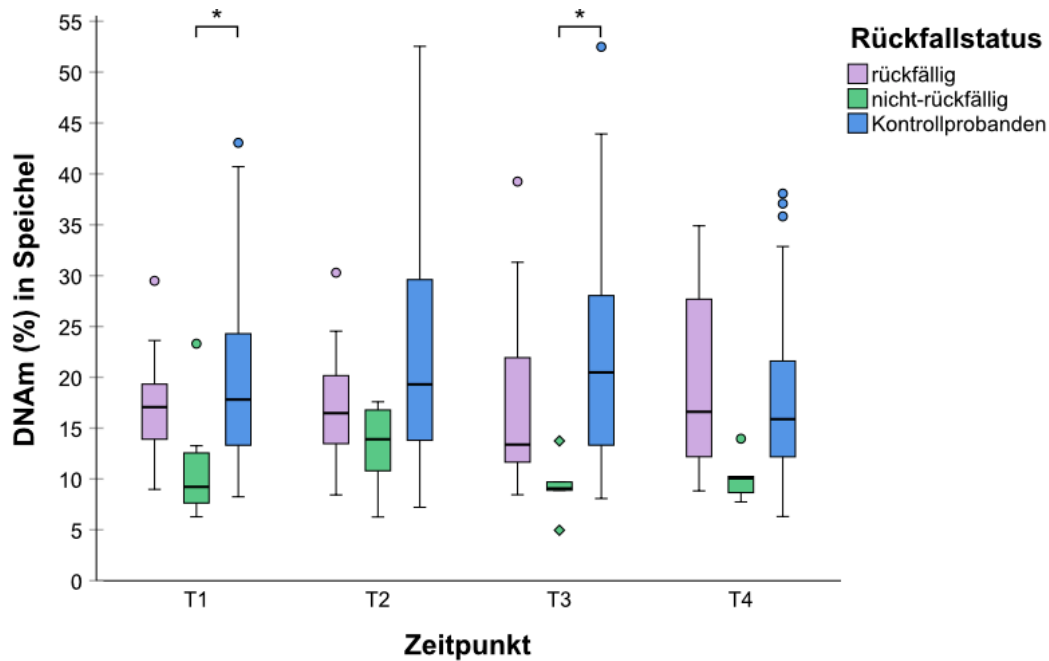


Abbildung 33: Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden zu T1–T4. Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Dunns Post-hoc-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1(17,7,64), T2(19,8,48), T3(11,5,54), T4(8,5,34). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

Die Dynamik der *HECW2*-DNAm über die Zeit blieb bei den rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten in Speichel ohne statistische Signifikanz. Bei den rückfälligen Patienten zeigte sich von T1 bis T3 allerdings ein Abwärtstrend (T1/T2: $Z = -0.724$, $p = .495$, $r = .181$, $N = 16$; T1/T3: $Z = -0.561$, $p = .625$, $r = .177$, $N = 10$; T2/T3: $Z = -0.652$, $p = .570$, $r = .217$, $N = 9$) und von T3 zu T4 wieder ein Anstieg (T3/T4: $Z = -0.730$, $p = .625$, $r = .365$, $N = 4$) (jeweils exakte Signifikanz angegeben (siehe Tabelle 63 und Abbildung 34)). Bei den nicht-rückfälligen Patienten zeigte sich ein ähnliches Muster – mit dem Unterschied, dass die DNAm von T1 zu T2 anstieg (T1/T2: $Z = -0.676$, $p = .578$, $r = .256$, $N = 7$) und erst von T2 zu T3 absank (T2/T3: $Z = -0.944$, $p = .438$, $r = .422$, $N = 5$) (jeweils exakte Signifikanz angegeben (siehe Tabelle 64 und Abbildung 34)).

Tabelle 63: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	16	17.07	16.48	.495	1	.05/6 = .008
T1/T3	10	17.07	13.39	.625	4	.05/3 = .017
T1/T4	6	17.07	16.61	.563	2	.05/5 = .010
T2/T3	9	16.48	13.39	.570	3	.05/4 = .013
T2/T4	8	16.48	16.61	.742	6	.05/1 = .050
T3/T4	4	13.39	16.61	.625	5	.05/2 = .025

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 64: Unterschiede der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von nicht-rückfälligen Patienten über die Zeit.

Zeit- punkte	<i>N</i>	<i>Mdn</i> ₁	<i>Mdn</i> ₂	<i>p</i> -Wert	Rang	angepasstes Signifikanzniveau
T1/T2	7	9.23	13.91	.578	4	.05/3 = .017
T1/T3	5	9.23	9.07	1.000	6	.05/1 = .050
T1/T4	4	9.23	10.07	.375	2	.05/5 = .010
T2/T3	5	13.91	9.07	.438	3	.05/4 = .013
T2/T4	5	13.91	10.07	.063	1	.05/6 = .008
T3/T4	4	9.07	10.07	.625	5	.05/2 = .025

Anmerkung. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Exakte Signifikanz angegeben. *N* = Größe der Gesamtstichprobe, *Mdn*₁ = Median des jeweiligen 1. Zeitpunkts (%), *Mdn*₂ = Median des jeweiligen 2. Zeitpunkts (%), DNAm = DNA-Methylierung.

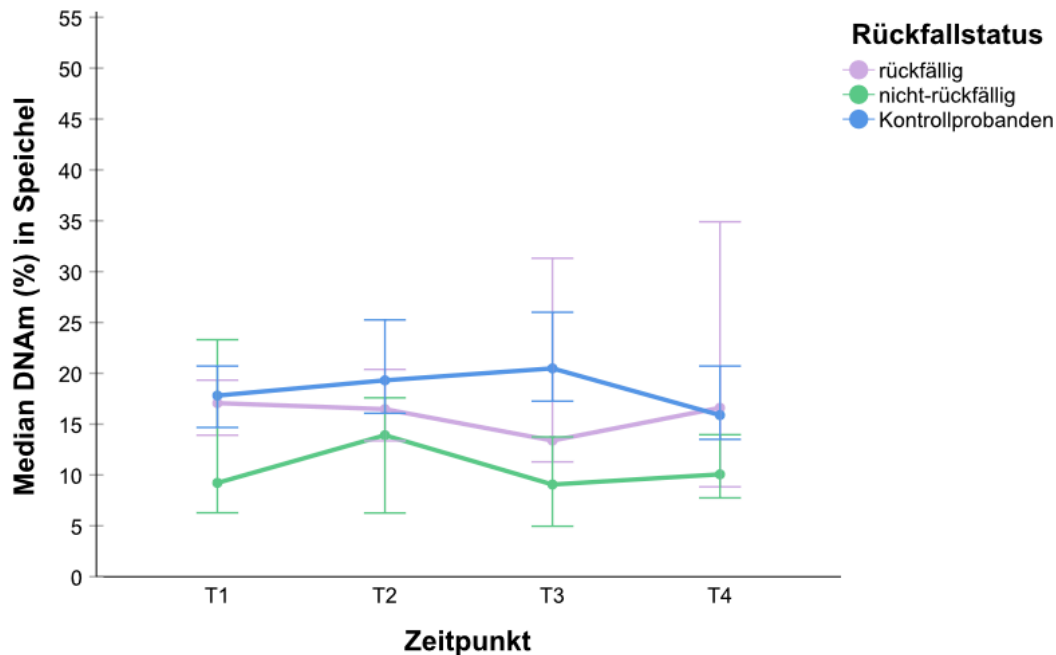


Abbildung 34: Entwicklung der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sowie Kontrollprobanden über die Zeit. Kreise entsprechen den Medianen, Fehlerbalken dem 95%-Konfidenzintervall. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Stichprobengrößen (R,N,K): T1/T2(16,7,43), T1/T3(10,5,45), T1/T4(6,4,32), T2/T3(9,5,39), T2/T4(8,5,31), T3/T4(4,4,30). R = rückfällige Patienten, N = nicht-rückfällige Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

3.5.2 Alter als Störfaktor der *HECW2*-DNAm in Speichel

Wie bereits in Abschnitt 3.4.2 für die *HECW2*-DNAm in Blut wurde auch für die *HECW2*-DNAm in Speichel untersucht, inwieweit das Alter einen relevanten Störfaktor darstellt. Hierzu wurde die Korrelation des Alters (jeweils Alter zu T1) mit der DNAm in Speichel zu T1, T2, T3 und T4 untersucht.

Auf dem nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveau war die DNAm in Speichel in der Gesamtkohorte bis auf eine signifikante negative Korrelation zu T3 ($r_s = -.421^*$, $p < .001$, $n = 71$) nicht signifikant mit dem Alter korreliert (siehe Tabelle 65). Abbildung 35 zeigt exemplarisch die Korrelation zu T1 und T3 (für T2 und T4 siehe Anhang 7, Abbildung A9 und Abbildung A10). Das gleiche Muster zeigte sich auch bei der getrennten Untersuchung beider Gruppen (siehe Tabelle 66 und Abbildung 35).

Da sich nur zu T3 eine signifikante Korrelation zeigte, konnte nicht von einer allgemeinen Beeinflussung der *HECW2*-DNAm in Speichel ausgegangen werden und es wurde keine Alters-Subgruppe gebildet.

Tabelle 65: Korrelation der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, gemeinsam für Patienten und Kontrollprobanden.

		DNAm Speichel T1	DNAm Speichel T2	DNAm Speichel T3	DNAm Speichel T4
r_s		-.194	-.214	-.421*	-.214
Signifikanz	Alter	.036	.033	< .001	.150
n		117	99	71	47

Anmerkung. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, DNAm = DNA-Methylierung.

Tabelle 66: Korrelation der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel zu T1–T4 mit dem Alter in Jahren, getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden.

			DNAm Speichel T1	DNAm Speichel T2	DNAm Speichel T3	DNAm Speichel T4
	r_s		-.057	.075	-.624*	-.006
Patienten	Signifikanz	Alter	.688	.601	.007	.986
	n		53	51	17	13
	r_s		-.145	-.257	-.390*	-.208
Kontroll- probanden	Signifikanz	Alter	.253	.077	.004	.237
	n		64	48	54	34

Anmerkung. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, DNAm = DNA-Methylierung.

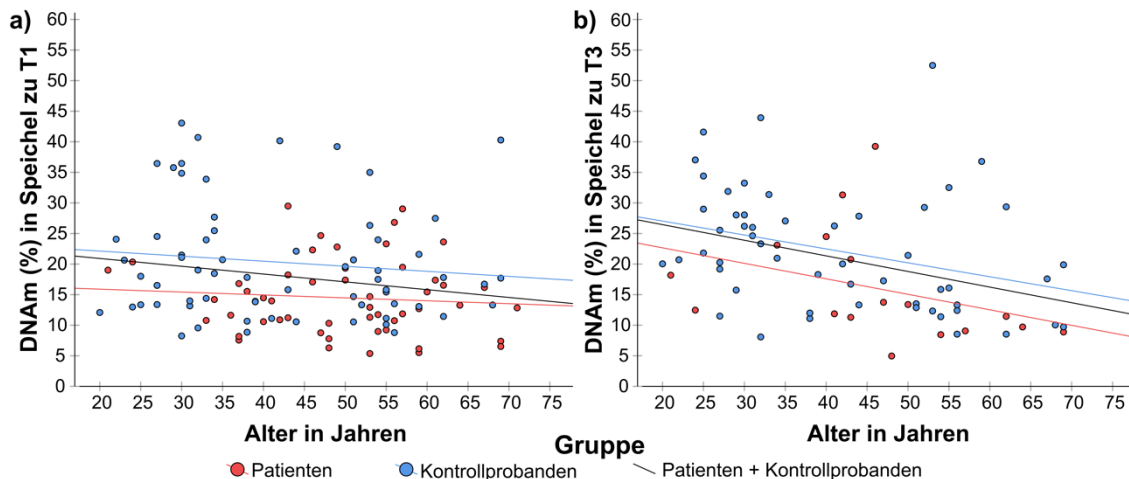


Abbildung 35: Korrelation zwischen der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel a) zu T1 bzw. b) zu T3 und dem Alter in Jahren. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. **Zu a):** P+K: $r_s = -.194$, $p = .036$, $n = 117$; P: $r_s = -.057$, $p = .688$, $n = 53$; K: $r_s = -.145$, $p = .253$, $n = 64$. **Zu b):** P+K: $r_s = -.421^*$, $p < .001$, $n = 71$; P: $r_s = -.624^*$, $p = .007$, $n = 17$; K: $r_s = -.390^*$, $p = .004$, $n = 54$. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

3.5.3 Geschlecht und Rauchen als Störfaktoren der *HECW2*-DNAm in Speichel

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der *HECW2*-DNAm in Speichel und dem Geschlecht wurde – wie in Abschnitt 3.4.4 für Blut – die prozentuale DNAm zwischen männlichen und weiblichen Probanden zu jedem Zeitpunkt getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden verglichen. Die *HECW2*-DNAm in Speichel war bis auf einen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Kontrollprobanden zu T2 und T4 (T2: $U(19,29) = 154.0$, $Z = -2.561$, $p = .010^*$, $r = .370$; T4: $U(12,22) = 57.0$, $Z = -2.703$, $p = .007^*$, $r = .464$) bei beiden Geschlechtern vergleichbar (Kontrollprobanden: T1: $U(23,41) = 427.0$, $Z = -0.623$, $p = .534$, $r = .078$; T3: $U(19,35) = 265.0$, $Z = -1.223$, $p = .221$, $r = .166$; Patienten: T1: $U(35,18) = 303.0$, $Z = -0.225$, $p = .822$, $r = .031$; T2: $U(34,17) = 262.0$, $Z = -0.539$, $p = .590$, $r = .075$; T3: $U(9,8) = 34.0$, $Z = -0.192$, $p = .888$, $r = .047$; T4: $U(8,5) = 14.0$, $Z = -0.878$, $p = .435$, $r = .244$; zu T3 und T4 exakte Signifikanz angegeben) (siehe Abbildung 36).

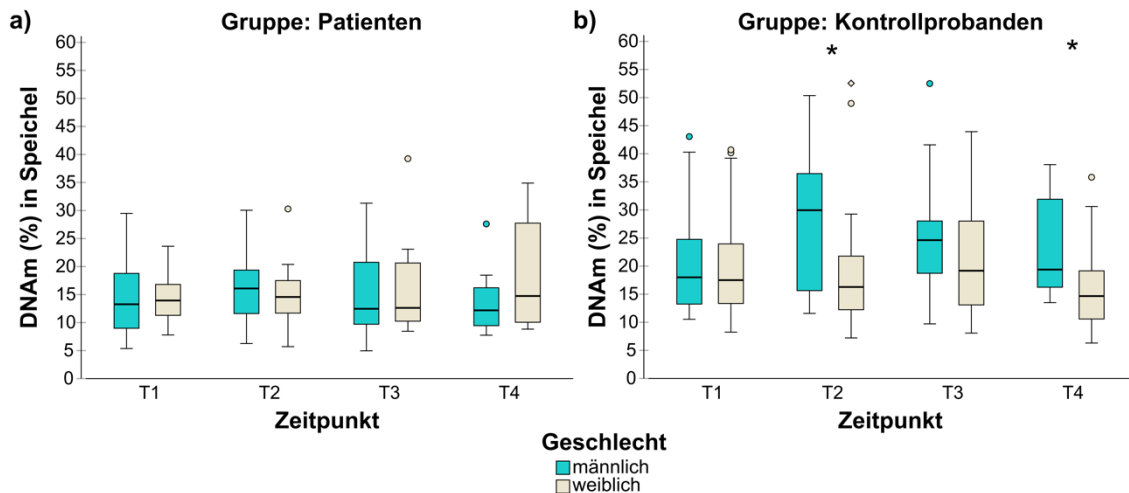


Abbildung 36: Vergleich der *HECW2*-DNA-Methylierung (%) in Speichel von männlichen und weiblichen Probanden zu T1–T4 getrennt nach a) Patienten und b) Kontrollprobanden. Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test, $n(\text{Patienten(männlich, weiblich)})$: $n_{T1} = 35, 18$; $n_{T2} = 34, 17$; $n_{T3} = 9, 8$; $n_{T4} = 8, 5$; $n(\text{Kontrollprobanden(männlich, weiblich)})$: $n_{T1} = 23, 41$; $n_{T2} = 19, 29$; $n_{T3} = 19, 35$; $n_{T4} = 12, 22$. n = Größe der Teilstichprobe, DNA-Methylierung.

Auch der Effekt des Rauchens wurde als möglicher Störfaktor untersucht. Bei der *HECW2*-DNA-Methylierung in Speichel zeigten sich jedoch weder für Patienten noch für Kontrollprobanden Hinweise auf einen Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern (Patienten: T1: $U(12, 39) = 197.0$, $Z = -0.822$, $p = .411$, $r = .115$; T2: $U(12, 38) = 208.0$, $Z = -0.454$, $p = .650$, $r = .064$; T3: $U(5, 12) = 17.0$, $Z = -1.370$, $p = .195$, $r = .332$; T4: $U(6, 7) = 17.0$, $Z = -0.571$, $p = .628$, $r = .158$; zu T3 und T4 exakte Signifikanz angegeben; Kontrollprobanden: T1: $U(60, 3) = 41.0$, $Z = -1.581$, $p = .114$, $r = .199$; T2: $U(45, 3) = 50.0$, $Z = -0.745$, $p = .456$, $r = .108$; T3: $U(51, 2) = 14.5$, $Z = -1.704$, $p = .088$, $r = .234$; T4: $U(32, 2) = 21.0$, $Z = -0.805$, $p = .421$, $r = .138$) (siehe Abbildung 37).

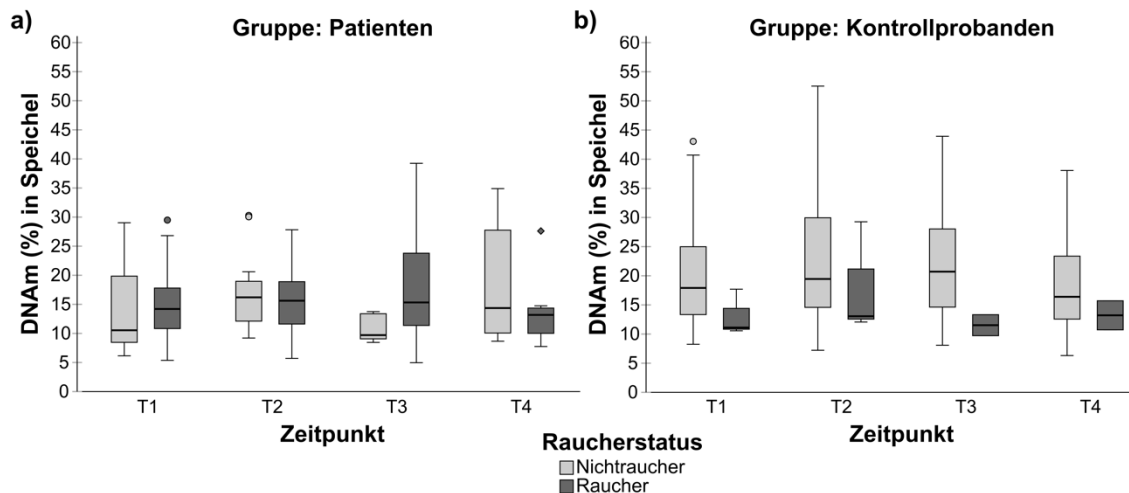


Abbildung 37: Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel von Nichtrauchern und Rauchern zu T1–T4 getrennt nach a) Patienten und b) Kontrollprobanden. Kreise entsprechen leichten, Rauten extremen Ausreißern. Mann-Whitney-U-Test, $n(\text{Patienten}(\text{Nichtraucher}, \text{Raucher}))$: $n_{T1} = 12,39$; $n_{T2} = 12,38$; $n_{T3} = 5,12$; $n_{T4} = 6,7$; $n(\text{Kontrollprobanden}(\text{Nichtraucher}, \text{Raucher}))$: $n_{T1} = 60,3$; $n_{T2} = 45,3$; $n_{T3} = 51,2$; $n_{T4} = 32,2$. n = Größe der Teilstichprobe, DNAm = DNA-Methylierung.

3.5.4 Korrelation der *HECW2*-DNAm in Speichel mit den Fragebogen-Scores

Der GSI-Score korrelierte über alle Zeitpunkte und beide Gruppen gemeinsam signifikant schwach negativ mit der *HECW2*-DNAm in Speichel ($r_s = -.126^*$, $p = .023$, $n = 325$) (siehe Abbildung 38). Bei Patienten und Kontrollprobanden zeigte sich jeweils kein Zusammenhang (Patienten: $r_s = .089$, $p = .322$, $n = 127$; Kontrollprobanden: $r_s = .060$, $p = .398$, $n = 198$).

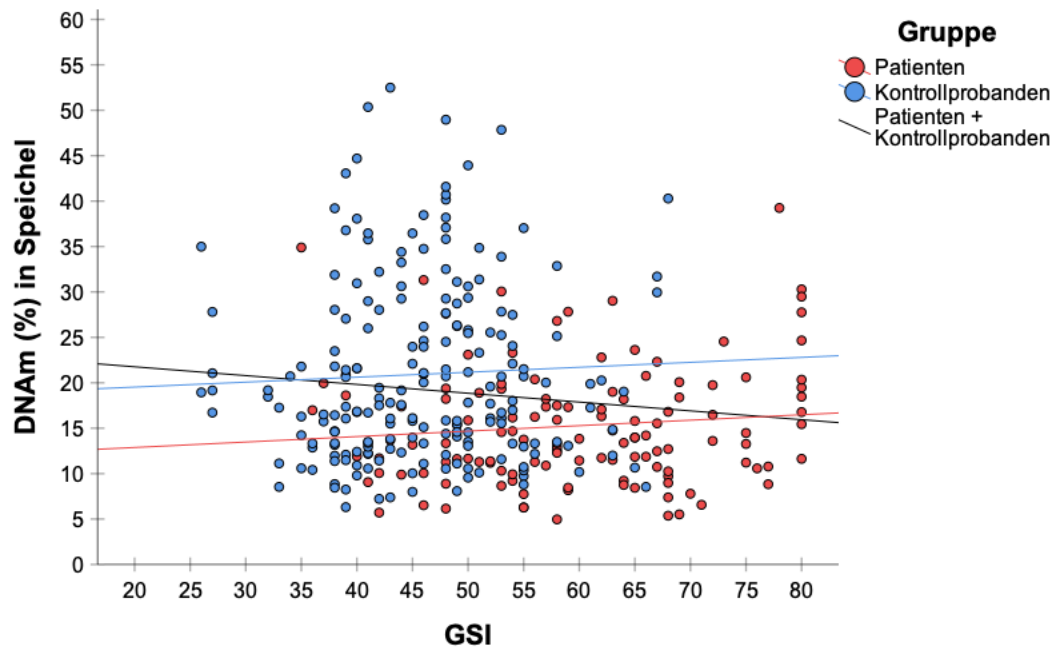


Abbildung 38: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Speichel und dem GSI-Score. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.126^*$, $p = .023$, $n = 325$; P: $r_s = .089$, $p = .322$, $n = 127$; K: $r_s = .060$, $p = .398$, $n = 198$. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNA_m = DNA-Methylierung, GSI = *Global Severity Index*.

Der AUDIT-Score zeigte eine signifikante schwache negative Korrelation mit der HECW2-DNA_m in Speichel ($r_s = -.147^*$, $p = .017$, $n = 264$) (siehe Abbildung 39). Getrennt nach Gruppen zeigte sich bei den Patienten ein kleiner, nicht signifikanter positiver Zusammenhang ($r_s = .145$, $p = .141$, $n = 104$) und bei den Kontrollprobanden ein ebenfalls kleiner, jedoch signifikanter positiver Zusammenhang ($r_s = .253^*$, $p = .001$, $n = 160$).

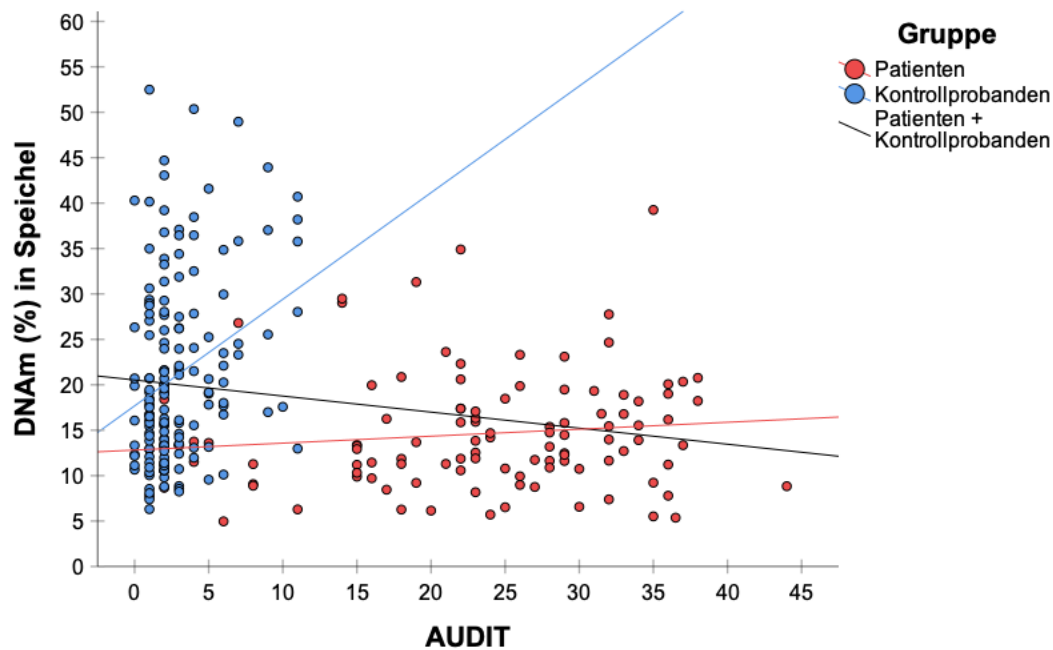


Abbildung 39: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Speichel und dem AUDIT-Score. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.147^*$, $p = .017$, $n = 264$; P: $r_s = .145$, $p = .141$, $n = 104$; K: $r_s = .253^*$, $p = .001$, $n = 160$. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*.

Die OCDS-Scores wiesen eine signifikante schwache negative Korrelation mit der HECW2-DNA_m in Speichel auf ($r_s = -.141^*$, $p = .011$, $n = 321$) (siehe Abbildung 40). Getrennt betrachtet gab es in keiner der beiden Gruppen eine signifikante Korrelation (Patienten: $r_s = .146$, $p = .101$, $n = 127$; Kontrollprobanden: $r_s = .093$, $p = .199$, $n = 194$).

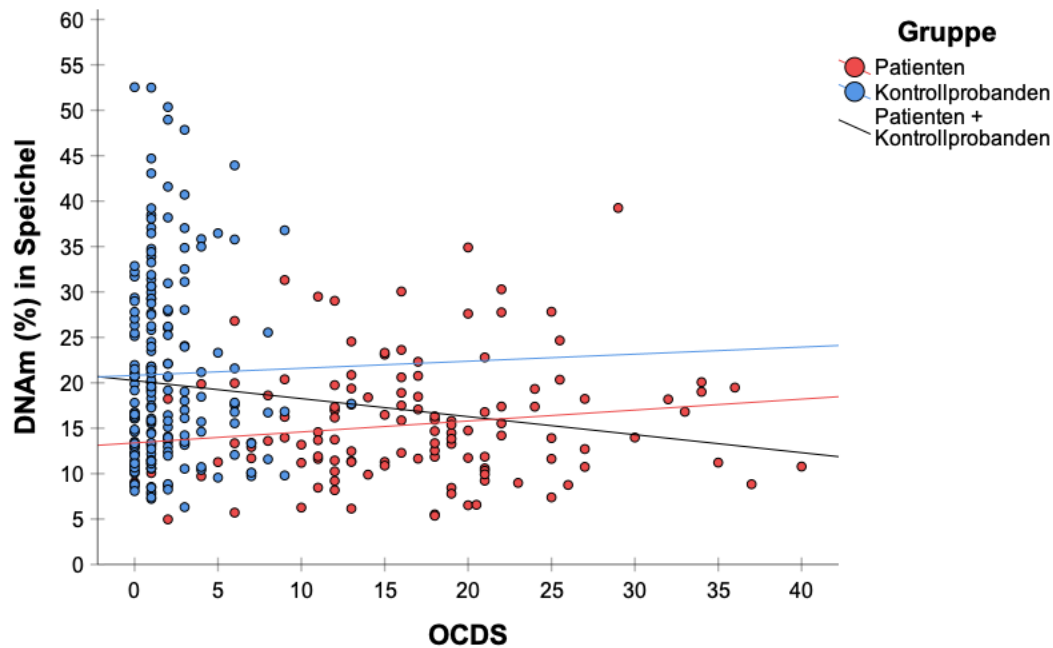


Abbildung 40: Korrelation zwischen der *HECW2*-DNAm (%) in Speichel und dem OCDS-Score. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.141^*$, $p = .011$, $n = 321$; P: $r_s = .146$, $p = .101$, $n = 127$; K: $r_s = .093$, $p = .199$, $n = 194$. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

3.6 Vergleich und Korrelation der *HECW2*-DNAm in Blut und Speichel

Bei der Gegenüberstellung der *HECW2*-DNAm in Blut (siehe Abbildung 41a) und Speichel (siehe Abbildung 41b) zeigte sich, dass die prozentuale *HECW2*-DNAm in Speichel mit einem Median von 16.38 % über beide Gruppen und alle Zeitpunkte hinweg allgemein höher war als in Blut mit einem Median von 7.41 %. Auch die Spannweite der *HECW2*-DNAm war mit 47.58 Prozentpunkten im Speichel größer als im Blut mit 7.73 Prozentpunkten.

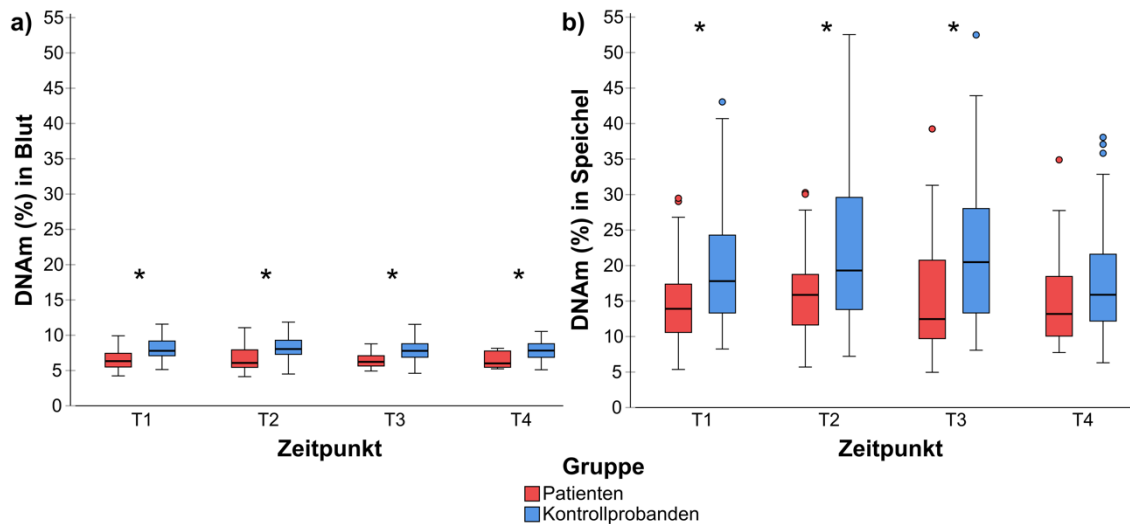


Abbildung 41: Vergleich der *HECW2*-DNAm (%) in a) Blut und b) Speichel. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. Mann-Whitney-U-Test. **Zu a):** Stichprobengrößen (P,K): T1(67,80), T2(56,76), T3(19,73), T4(14,48). **Zu b):** Kreise entsprechen leichten Ausreißern. Stichprobengrößen (P,K): T1(53,64), T2(51,48), T3(17,54), T4(13,34). P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

Um zu untersuchen, inwiefern die *HECW2*-DNAm über verschiedene Gewebe (hier Blut und Speichel) hinweg kongruent ist, wurde die Korrelation zwischen der DNAm in Blut und Speichel untersucht. Über beide Gruppen hinweg korrelierte die DNAm in Blut und Speichel signifikant schwach positiv miteinander ($r_s = .263^*$, $p < .001$, $n = 329$) (siehe Abbildung 42). Bei den Patienten zeigte sich eine mittlere positive, jedoch nicht signifikante Korrelation ($r_s = .343$, $p = .083$, $n = 132$). Bei den Kontrollprobanden war die Korrelation signifikant, aber von kleinem Effekt ($r_s = .170^*$, $p = .008$, $n = 197$).

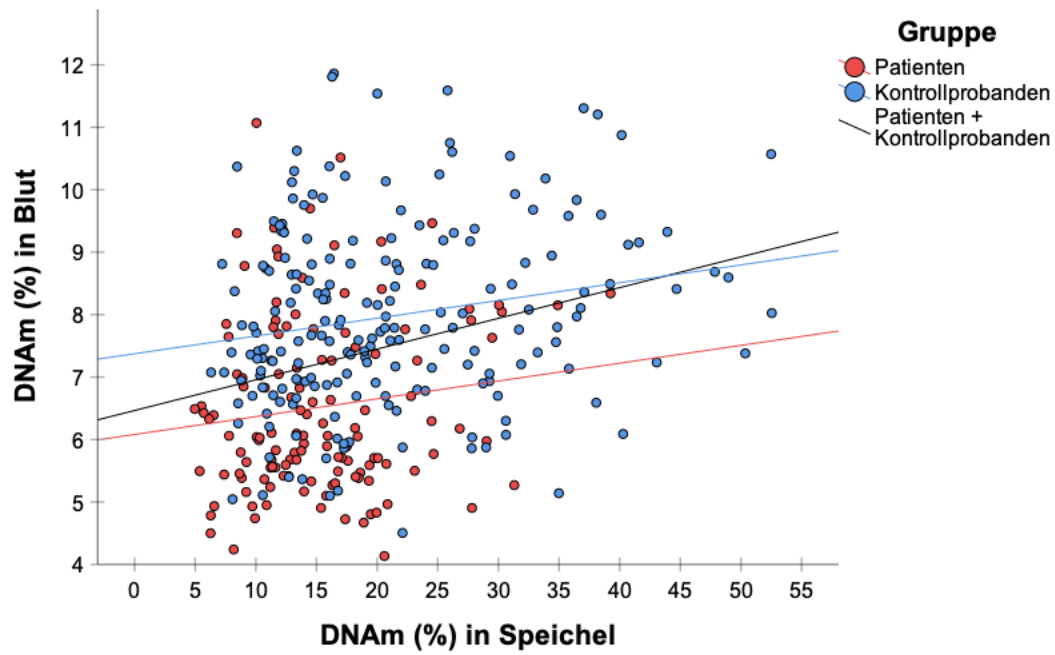


Abbildung 42: Korrelation zwischen der *HECW2*-DNAm (%) in Blut und Speichel über beide Gruppen (Patienten und Kontrollprobanden) und alle Zeitpunkte hinweg. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = .263^*$, $p < .001$, $n = 329$; P: $r_s = .343$, $p = .083$, $n = 132$; K: $r_s = .170^*$, $p = .008$, $n = 197$. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

4 Diskussion

Weltweit leiden schätzungsweise 400 Millionen der über 15-jährigen Menschen unter einer AUD (Zahlen aus dem Jahr 2019) (WHO 2024) und den vielseitigen gesundheitlichen und sozialen Folgen, die diese Erkrankung für die Betroffenen und deren Angehörige mit sich bringt. Zusätzlich trägt Alkoholabhängigkeit – die schwerste Form der AUD – wesentlich zur globalen Krankheitslast bei (Griswold *et al.* 2018) und stellt die Gesellschaft damit auch vor eine ökonomische Herausforderung. Trotz – insbesondere in Deutschland – etablierter Therapiekonzepte und vorhandener Nachsorgeprogramme sind die Rückfallraten hoch: Etwa 50 bis 70 % der Patienten werden innerhalb eines Jahres nach der Therapie rückfällig (Durazzo und Meyerhoff 2017; Hunt *et al.* 1971; Nguyen *et al.* 2020; Schellekens *et al.* 2015). Vergleichbar damit lag die Rückfallrate nach der Entzugsbehandlung in unserer Studie bei 72.4 % (21 von 29 Patienten). Es ist zu beachten, dass sich diese Rate nur auf einen beschränkten Zeitraum (1 Jahr ab Therapiebeginn) bezieht und die Rückfallrate insgesamt noch größer sein kann. Objektive Biomarker, die frühzeitig das Risiko für die Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit oder eines Rückfalls sowie den Behandlungserfolg abschätzen ließen, könnten die Entwicklung nachhaltigerer Therapie- oder Präventionskonzepte sowie den gezielteren und individuelleren Einsatz therapeutischer Angebote verbessern bzw. ermöglichen. Als objektive Biomarker eignen sich bspw. Merkmale aus dem Bereich der Epigenetik wie Histonmodifikationen oder DNAm. Epigenetische Veränderungen stellen darüber hinaus selbst potentielle therapeutische Angriffsziele dar (Hamm und Costa 2015). Die Aufklärung der molekularen Pathomechanismen von Alkoholabhängigkeit, -entzug und -rückfall kann dazu beitragen, die Erkrankung besser zu verstehen und ihre Prävalenz im besten Fall zukünftig zu verringern.

Brückmann *et al.* (2017) fanden bei der Suche nach einem solchen Biomarker u. a. ein CpG-Dinukleotid im Genkörper von *HECW2* (cg18752527) (Brückmann *et al.* 2017), dessen differentielle Methylierung im Rahmen von Alkoholabhängigkeit in der vorliegenden Studie validiert werden sollte. Darüber hinaus sollte die Entwicklung der *HECW2*-DNAm in der Zeit nach dem Entzug sowie deren potentielle Eignung als epigenetischer Biomarker für Diagnostik,

Krankheitsschwere, Therapieansprechen und Rückfall untersucht werden. Dazu wurde das DNAm-Level dieses CpG-Dinukleotids in Blut und Speichel sowohl von alkoholabhängigen Patienten als auch von gesunden Kontrollprobanden zu vier Zeitpunkten innerhalb eines Jahres mittels Pyrosequenzierung analysiert.

4.1 Fragebogen

Anhand von Fragebogen wurden die allgemeine psychische Belastung (GSI-Score der SCL-90-R), der Alkoholkonsum und dessen Einfluss auf das tägliche Leben (AUDIT) sowie das Alkoholverlangen in Form von Gedanken, Bildern und Impulsen (OCDS) der Studienteilnehmer zu den vier Studienzeitpunkten erfasst.

Diese drei Bereiche wiesen bei den Patienten jeweils eine signifikante positive Korrelation miteinander auf, wodurch eine enge Verknüpfung von Trinkmenge, Craving und psychischem Wohlbefinden deutlich wird. Die Rolle der psychischen Belastung im Rahmen einer Alkoholabhängigkeit und insbesondere des Rückfallrisikos wurde bereits in diversen Studien diskutiert und ein im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöhtes Level psychischer Belastung bei alkoholabhängigen Patienten (Mercier *et al.* 1992) sowie ein positiver Zusammenhang zwischen psychischer Belastung und Rückfallwahrscheinlichkeit nachgewiesen (Engel *et al.* 2015; Sander und Jux 2006). Die Frage der Kausalität dieses Zusammenhangs bleibt in dieser Studie unbeantwortet.

4.1.1 Fragebogen-Scores der Patienten und Kontrollprobanden

Gemäß unserer Annahme erreichten die Patienten in allen drei Bereichen und zu allen vier Zeitpunkten signifikant höhere Scores als die Kontrollprobanden. Die Scores (Mediane) aller Fragebogen lagen bei den Kontrollprobanden wie erwartet auf einem konstant niedrigen Niveau unterhalb des jeweiligen Grenzwertes für eine Pathologie. Bei den Patienten lagen die Scores (Mediane) aller drei Fragebogen zu T1 deutlich über dem entsprechenden Grenzwert. Dies hebt hervor, was neben anderen Merkmalen (vgl. Tabelle 1) typisch für eine Alkoholabhängigkeit ist: ein hoher Alkoholkonsum und dessen Beeinflussung des alltäglichen Lebens, obsessive Gedanken und Handlungsimpulse in Bezug auf Alkohol sowie eine allgemein erhöhte psychische Belastung (Mercier *et al.* 1992).

Von T1 zu T2 – also vom Beginn bis zum Ende der Therapie – verringerten sich die GSI- und OCDS-Scores der Patienten signifikant. Sie blieben zwar signifikant höher als die der Kontrollprobanden, lagen jedoch bis einschließlich T4 unterhalb der pathologischen Grenzwerte. Dies zeigt in Übereinstimmung mit einer Studie von Sander und Jux (2006), dass die Entzugstherapie – im Falle unserer Studie die QE – nicht nur erfolgreich das Alkoholverlangen, sondern auch die psychische Belastung reduzieren kann (Sander und Jux 2006) und gibt Grund zur Annahme, dass die Therapie in dieser Hinsicht erfolgreich war. Die QE stellt in Deutschland die S3-leitliniengerechte Therapie der Alkoholabhängigkeit dar (DGPPN und DG-SUCHT 2020) und zeichnet sich u. a. durch eine Erweiterung der reinen körperlichen Entgiftung um psycho- und soziotherapeutische Interventionen zur Steigerung der Änderungskompetenz aus (Batra *et al.* 2016; DGPPN und DG-SUCHT 2020). Eine bessere Wirksamkeit der QE im Vergleich zur reinen körperlichen Entgiftung im Sinne einer höheren Abstinenzrate zeigte sich in ersten Studien (Driessen *et al.* 1999; Loeber *et al.* 2009). Beim AUDIT zeigte sich eine signifikante Abnahme der Scores von T1 zu T3. Dabei ist zu beachten, dass die Aussagekraft der AUDIT-Scores zu den Zeitpunkten T2 bis T4 eingeschränkt ist, da sich 7 von 10 Fragen nicht auf die aktuelle Situation, sondern den Zeitraum des letzten Jahres bzw. allgemein auf die Vergangenheit beziehen. Dies erklärt, warum die Scores nicht bis zum Ende der Therapie signifikant abfielen sowie von T2 bis T4 den Grenzwert von 15 überschritten (Mediane). Eine weitere Erklärung für diese hohen Werte ergibt sich durch die hohe Rückfallrate in unserer Studie und die damit einhergehenden hohen Werte der rückfälligen Patienten (vgl. Abschnitt 4.1.2). Der erneute (statistisch nicht signifikante) Anstieg der AUDIT-Scores (Mediane) von T3 zu T4 weist ebenfalls auf eine hohe Rückfallrate hin.

Der GSI, nicht jedoch die AUDIT- und OCDS-Scores, stieg von T2 zu T3 erneut signifikant an. Dieses Phänomen kann auf eine steigende psychische Belastung mit Verlassen des geschützten Kliniksettings und Rückkehr in den potentiell problembelasteten Alltag zurückzuführen sein. Diese frühe Phase nach der Entlassung aus einem psychiatrischen Klinikaufenthalt ist für ihr hohes Risiko für eine Rehospitalisierung (Tulloch *et al.* 2016) oder Suizid (Chung *et al.* 2017)

bekannt, wobei u. a. externe Faktoren wie Armut oder Stigmatisierung eine erfolgreiche Transition erschweren (Mutschler *et al.* 2019).

Schließlich gehen wir anhand unserer Beobachtungen davon aus, dass die Selbsteinschätzung von Patienten und Kontrollprobanden durch o. g. Fragebogen – wie auch in anderen Studien gezeigt (Mann und Ackermann 2000; Mercier *et al.* 1992; Saunders *et al.* 1993) – ein geeignetes Mittel für die Erfassung von psychischer Belastung, Alkoholkonsum und Alkoholverlangen darstellt. Die Patienten hatten bezüglich dieser Variablen signifikant höhere Werte als die Kontrollprobanden und alle drei Variablen verringerten sich bei den Patienten im Zuge der Therapie, was deren Wirkung auf diese Aspekte unterstreicht. Dennoch blieben zu jedem Studienzeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Es ist davon auszugehen, dass die hohe Rückfallrate dabei eine wesentliche Rolle spielt. Von 29 Patienten mit bekanntem Rückfallstatus wurden 21 rückfällig – nur 8 Patienten hatten keinen Rückfall. Damit zeigte sich in unserer Studie kein langfristiger Erfolg der Therapie für den Großteil der Patienten. Unklar ist jedoch, ob und wenn ja, welche Patienten im Anschluss an den stationären Aufenthalt weitere Nachsorgemaßnahmen in Anspruch nahmen, sodass der reale Einfluss der Entzugstherapie auf den späteren Rückfallstatus nicht sicher festzustellen ist.

4.1.2 Fragebogen-Scores der rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten

Um ein besseres Verständnis für die unterschiedlichen Krankheitsverläufe einer Alkoholabhängigkeit zu erlangen, wurden die Unterschiede und Muster der Fragebogen von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten untersucht. Es gilt zu berücksichtigen, dass die Stichprobengrößen für beide Subgruppen klein und die Ergebnisse damit nur eingeschränkt generalisierbar sind.

Die GSI-, AUDIT- und OCDS-Scores (Mediane) der Patienten, die im Verlauf der Studie rückfällig wurden, waren vor Therapiebeginn höher als die der Patienten, die nicht rückfällig wurden, allerdings ohne statistisch signifikanten Unterschied. Dieser Trend lässt vermuten, dass Patienten mit höheren Fragebogen-Scores, die auf eine schwerere Abhängigkeit hindeuten, im weiteren Verlauf mit höherer Wahrscheinlichkeit rückfällig werden. Ein Zusammenhang zwischen

Schweregrad der Abhängigkeit und schlechterer Prognose im Sinne einer niedrigeren Abstinenzrate wurde bereits in anderen Studien beobachtet (Bottlender und Soyka 2005; Yoshimura *et al.* 2021).

In beiden Subgruppen zeigte sich ein Effekt durch die Therapie: Alle drei Variablen verbesserten sich von T1 zu T2. Die GSI- und OCDS-Scores verringerten sich bei den rückfälligen Patienten von T1 zu T2 signifikant, der AUDIT-Score verringerte sich von T1 zu T3 signifikant, lag aber mit einem Median von 22.0 nach wie vor über dem Grenzwert. Bei den nicht-rückfälligen Patienten zeigte sich ebenfalls ein Abfall der Scores durch die Therapie, teils mit großer Effektstärke, jedoch ohne statistische Signifikanz. Hierbei sei erneut auf die kleinen Stichprobengrößen insbesondere der nicht-rückfälligen Patienten hingewiesen (*N* lag zwischen 2 und 7). Zu T2 lagen die Scores (Mediane) beider Subgruppen auf einem vergleichbaren Niveau, was darauf hindeutet, dass alle Patienten hinsichtlich psychischer Belastung, Trinkverhalten und Alkoholverlangen in vergleichbarem Maße von der Therapie profitierten.

Wesentliche Unterschiede zeigten sich v. a. nach der Therapie (zu T3 und T4): Die Werte (Mediane) der nicht-rückfälligen Patienten blieben nach der Therapie wie erwartet unterhalb der pathologischen Grenzwerte und unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollprobanden bzw. unterschritten diese im Falle des AUDIT sogar. Letzteres kann durch die Abstinenz der nicht-rückfälligen Patienten im Vergleich zu einem in Maßen weiterbestehenden Alkoholkonsum der Kontrollprobanden erklärt werden. Im Gegensatz dazu stiegen die Werte (Mediane) der rückfälligen Patienten in den Monaten nach der Therapie wieder über die Grenzwerte an und unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollprobanden. Interessant ist die genauere Betrachtung der psychischen Belastung: Bei den nicht-rückfälligen Patienten zeigte sich, anders als für Alkoholkonsum und -verlangen, nach Therapieende kein weiterer Trend zur Abnahme. Stattdessen blieb die psychische Belastung relativ konstant – zwar unterhalb des pathologischen Grenzwertes, jedoch oberhalb des Niveaus der Kontrollprobanden (ohne statistisch signifikanten Unterschied). Bei den rückfälligen Patienten lag die psychische Belastung zu T3 erneut über dem pathologischen Grenzwert. Diese Beobachtungen legen den Verdacht nahe,

dass alle Patienten in ihrem gewohnten Umfeld und Alltag eine erhöhte psychische Belastung erfuhren. Ein Faktor, der das psychische Wohlbefinden negativ beeinflussen und sowohl Konsequenz als auch Ursache einer vorangegangenen Alkoholabhängigkeit sein kann, ist Arbeitslosigkeit (Airagnes *et al.* 2019; Olesen *et al.* 2013; Popovici und French 2013). In unserer Studie gaben 25.5 % der Patienten, die nicht bereits in Rente waren, an arbeitslos zu sein (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich dazu lag die Arbeitslosenquote in Deutschland im Jahr 2023 bei 5.7 % (Statistik der Bundesagentur für Arbeit 2023). Unter den Kontrollprobanden gab niemand an, arbeitslos zu sein (Studenten wurden nicht als arbeitslos gewertet). Im Hinblick auf Erwerbstätigkeit ist die Stichprobe der Kontrollprobanden aufgrund der gezielten Rekrutierung an einer Universität und einem Universitätsklinikum jedoch nicht repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung. Die im Vergleich zum Kontrollprobandenkollektiv nachhaltig erhöhte psychische Belastung der Patienten kann außerdem auch durch langanhaltende Komorbiditäten der Alkoholabhängigkeit wie Depressionen oder Angststörungen sowie Symptome eines protraumierten Entzugssyndroms wie bspw. Anhedonie (Martinotti *et al.* 2008) erklärt werden.

Insgesamt zeigen die Fragebogenergebnisse deutlich die Unterschiede von Alkoholkonsum und -verlangen zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten nach der Therapie. Vor Therapiebeginn gaben die rückfälligen Patienten für alle drei Bereiche höhere Werte an (statistisch nicht signifikant), die Therapie hatte jedoch auf beide Subgruppen in Bezug auf die Fragebogen-Scores eine positive Wirkung mit vergleichbarem Outcome zum Zeitpunkt der Entlassung.

4.2 HECW2-DNAM

HECW2 bzw. das im Genkörper von *HECW2* gelegene CpG-Dinukleotid cg18752527 wurde erstmals 2017 im Rahmen einer EWAS von Brückmann *et al.* (2017) als bei alkoholabhängigen Patienten differentiell methyliert beschrieben (Brückmann *et al.* 2017). Die differentielle *HECW2*-DNAM der Patienten zu Beginn der Therapie wurde dabei in CD3⁺-T-Zellen mittels *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays* entdeckt und konnte mittels Pyrosequenzierung sowohl in der ursprünglichen als auch in einer zweiten,

unabhängigen Kohorte validiert und repliziert werden (Brückmann *et al.* 2017). In beiden Kohorten wurde die differentielle *HECW2*-DNAm außerdem auch in Vollblut mittels Pyrosequenzierung nachgewiesen (Brückmann *et al.* 2017). In der vorliegenden Studie konnte diese differentielle DNAm in Vollblut mittels Pyrosequenzierung validiert und repliziert werden: Das *HECW2*-DNAm-Level der Patienten lag zu Therapiebeginn bei Brückmann *et al.* (2017) in Vollblut bei 6.13 % (1. Kohorte) bzw. 6.27 % (2. Kohorte), in der vorliegenden Studie bei 6.33 % (jeweils Median angegeben). Damit war das *HECW2*-DNAm-Level der Patienten in beiden Studien signifikant niedriger als das der Kontrollprobanden ($Mdn_{Brückmann1} = 7.64 \%$; $Mdn_{Brückmann2} = 7.07 \%$; $Mdn_{vorliegend} = 7.79 \%$) (Brückmann *et al.* 2017).

Eine bei Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden signifikant geringere *HECW2*-DNAm zu Therapiebeginn zeigte sich in der vorliegenden Studie auch in Speichel ($Mdn_P = 13.91 \%$; $Mdn_K = 17.81 \%$). Die vorliegende Studie war unseres Wissens nach die erste, in der die *HECW2*-DNAm in Speichel untersucht wurde, sodass diese Daten nicht im Kontext bisheriger Ergebnisse diskutiert werden können. Dennoch unterstreicht die gewebeübergreifende differentielle DNAm von *HECW2* dessen Bedeutung im Kontext der Alkoholabhängigkeit. Mögliche pathophysiologische Hintergründe der beobachteten differentiellen *HECW2*-DNAm werden in Abschnitt 4.4 beleuchtet.

Die nachgewiesene Hypomethylierung im *HECW2*-Gen (cg18752527) bei alkoholabhängigen Patienten sowohl in Blut als auch in Speichel steht im Einklang mit einer mehrfach beschriebenen globalen Hypomethylierung bei AUDs (Brückmann *et al.* 2017; Ponomarev *et al.* 2012; Schuch *et al.* 2023; Zhang *et al.* 2013). Andere Studien fanden im Gegensatz dazu eine globale Hypermethylierung (Bönsch *et al.* 2004; Koller *et al.* 2019; Semmler *et al.* 2015). Um eindeutige Aussagen zur Richtung der Auswirkungen von Alkoholkonsum auf das globale Methylierungslevel treffen zu können, sind weitere Studien auf epigenomweiter Ebene erforderlich.

4.2.1 Gewebespezifische Unterschiede

Die *HECW2*-DNAm wurde in dieser Studie in klinisch leicht zugänglichem Gewebe (Vollblut und Speichel) untersucht. Im Hinblick auf eine potentielle

Nutzung der *HECW2*-DNAm als klinischer Biomarker ist damit die klinische Praktikabilität gewährleistet. Zudem ist die Verfügbarkeit von hochwertigen Gehirnproben, welche für die Erforschung psychischer Erkrankungen von großem Interesse sind, und insbesondere von Gehirnproben alkoholabhängiger Personen sehr begrenzt. Epigenetische Veränderungen, inklusive DNAm, sind jedoch gewebe- und zelltypspezifisch (Gama-Sosa *et al.* 1983; Loyfer *et al.* 2023; Novak *et al.* 2012). Bei der Erforschung psychischer Erkrankungen an peripheren Geweben und bei der Aufklärung molekularer Pathomechanismen (vgl. Abschnitt 4.4) muss diese Gewebespezifität berücksichtigt werden. Da Alkohol jedoch nicht nur auf das Gehirn, sondern auf den gesamten Körper wirkt, erscheint eine – zumindest teilweise – gewebeübergreifende DNAm-Veränderung möglich (Nieratschker *et al.* 2013). Allgemeine Untersuchungen von Braun *et al.* (2019) und Nishitani *et al.* (2023b) zum Zusammenhang zwischen peripherer und zentraler DNAm ergaben unabhängig von Alkoholkonsum eine höhere Korrelation der epigenomweiten DNAm zwischen Speichel und Gehirn im Vergleich zu Blut und Gehirn (Braun *et al.* 2019; Nishitani *et al.* 2023b). Auch Smith *et al.* (2015) beobachteten, dass die DNAm-Level im Speichel denen der Hirngewebe ähnlicher waren als die DNAm-Level im Blut (Smith *et al.* 2015). Sie nahmen an, dass dies auf einen gemeinsamen entwicklungsgeschichtlichen Ursprung (Wangenepithel und zentrales Nervensystem entwickeln sich beide aus dem Ektoderm) oder die erhöhte Variation der DNAm-Werte im Speichel zurückzuführen sein könnte (Smith *et al.* 2015).

Die Korrelation der peripheren DNAm mit der DNAm im Gehirn variiert zusätzlich abhängig vom jeweiligen CpG-Dinukleotid und Gen (Braun *et al.* 2019). Verschiedene Autoren veröffentlichten daher Datenbanken bzw. Online-Tools, die Auskunft über die gewebeübergreifende Korrelation der DNAm für benutzerdefinierte CpG-Dinukleotide geben (Braun *et al.* 2019; Edgar *et al.* 2017a; Hannon *et al.* 2015b; Nishitani *et al.* 2023b; Sommerer *et al.* 2022). Für das im *HECW2*-Gen gelegene und in dieser Studie untersuchte CpG-Dinukleotid cg18752527 ergab das Online-Tool von Hannon *et al.* (2015a) eine signifikante gering negative Korrelation zwischen der DNAm von Blut und Kleinhirn ($r = -.269$, $p = .023$, $n = 71$) (Hannon *et al.* 2015a). Die zugrundeliegende Datenbank basiert

auf DNAm-Daten von 71 bis 75 zusammengehörigen Gehirn- und Blutproben, die mit dem *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array* erhoben wurden (Hannon *et al.* 2015a). Mit den weiteren in der Datenbank enthaltenen Hirnarealen (präfrontaler Cortex, entorhinaler Cortex, Gyrus temporalis superior) zeigte sich keine Korrelation (Hannon *et al.* 2015a).

Die Korrelation mit dem Kleinhirn stellt vor dem Hintergrund der aktuellen Studie eine interessante Beobachtung dar, da Alkoholabhängigkeit zu zerebellärer Dysfunktion und zerebellärer Degeneration führen kann (Allsop und Turner 1966; Sullivan und Pfefferbaum 2005). Zudem wurde eine genetische Variante des *HECW2*-Gens bereits in einer Einzelfallstudie mit einer Acetazolamid-responsiven episodischen Ataxie vom Typ 2 in Verbindung gebracht (Tedesco Silva *et al.* 2023) – eine Erkrankung, die oftmals mit progressiver zerebellärer Dysfunktion einhergeht (Choi und Choi 2016; Strupp *et al.* 2007). Die potentielle Rolle von *HECW2* im Gehirn – insbesondere bei Alkoholabhängigkeit – wird in Abschnitt 4.4 genauer betrachtet.

In der Datenbank von Nishitani *et al.* (2023a), die auf Proben von 19 japanischen Patienten basiert, ergab sich für cg18752527 weder für die DNAm von Speichel noch für die von Blut eine Korrelation mit der DNAm im Gehirn (dabei wurden verschiedene Hirnareale gemeinsam untersucht, Areale im Kleinhirn waren nicht darunter) (Nishitani *et al.* 2023a). Diese Beobachtung könnte neben einer tatsächlich fehlenden Korrelation auch auf einen Effekt der Ethnie oder die fehlende Hinzunahme des Kleinhirns zurückzuführen sein. Das Online-Tool von Edgar *et al.* (2017b), basierend auf gepaarten Proben von 16 Individuen, ergab für cg18752527 eine starke positive Korrelation zwischen Blut und Brodmann-Areal (BA) 20 ($r = 0.54$), eine moderate positive Korrelation zwischen Blut und BA 10 ($r = 0.37$) und keine Korrelation zwischen Blut und BA 7 (Edgar *et al.* 2017b). Die Datenbank von Braun *et al.* (2019), die ebenfalls u. a. den Zusammenhang der DNAm zwischen Speichel und Gehirn untersucht (Braun *et al.* 2019), stand zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation nicht zur Verfügung. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Datenbanken bzgl. Existenz, Richtung und Stärke einer Korrelation verwehren eine Aussage über die Repräsentativität der peripheren *HECW2*-DNAm für die *HECW2*-DNAm im

Gehirn. Generell scheint die *HECW2*-DNAm im Gehirn mit Werten im Bereich von etwa 75 bis 80 % höher zu sein als in Blut oder Speichel (Edgar *et al.* 2017b; Hannon *et al.* 2015a; Nishitani *et al.* 2023a).

Zwei Studien zur *HECW2*-DNAm an postmortalen Gehirnproben brachten uneinheitliche Ergebnisse hervor: Lohoff *et al.* (2021) konnten in Proben aus dem präfrontalen Cortex zweier verschiedener Kohorten keine signifikante Assoziation zwischen der *HECW2*-DNAm und dem Alkoholkonsumstatus finden (Lohoff *et al.* 2021). Die vorläufigen Untersuchungen von Wiegand *et al.* (2019) an Proben aus dem BA 9 im präfrontalen Cortex ergaben hingegen eine differentielle *HECW2*-DNAm zwischen alkoholabhängigen Patienten und gesunden Kontrollprobanden – im Vergleich mit den DNAm-Veränderungen in Vollblut (Brückmann *et al.* 2017) jedoch in entgegengesetzter Richtung (Wiegand *et al.* 2019). Dies steht im Einklang mit der oben beschriebenen negativen Korrelation der *HECW2*-DNAm von Blut und Kleinhirn (Hannon *et al.* 2015a).

In der vorliegenden Studie war die *HECW2*-DNAm in Speichel mit einem Median von 16.38 % über beide Gruppen und alle Zeitpunkte hinweg mehr als doppelt so hoch wie in Blut mit einem Median von 7.41 %. Dieser Unterschied unterstreicht die große gewebespezifische Variation der DNAm, die – wie Studien zeigten – die interindividuelle Variation übersteigt (Davies *et al.* 2012; Jiang *et al.* 2015).

Interessante Differenzen zwischen beiden Geweben zeigten sich auch in der Spannweite der *HECW2*-DNAm: Während die Spannweite im Blut insgesamt 7.73 Prozentpunkte betrug, lag sie im Speichel bei 47.58 Prozentpunkten. Die im Vergleich zum Blut größere Spannweite und Standardabweichung im Speichel könnte u. a. auf die große interindividuelle Variabilität des Anteils an bukkalen Epithelzellen im Speichel zurückzuführen sein, da DNAm-Messungen nach Smith *et al.* (2015) durch den Epithelzellanteil beeinflusst werden (Smith *et al.* 2015). Auch intraindividuell kann sich die Zellzusammensetzung in verschiedenen Proben oder zu verschiedenen Zeitpunkten unterscheiden (Bearer und Mulligan 2018). In der vorliegenden Studie wurde der Epithelzellanteil im Speichel nicht bestimmt, sodass eine Berücksichtigung der

Variation – wie von Smith *et al.* (2015) empfohlen – nicht erfolgen konnte (Smith *et al.* 2015).

Der *HECW2*-DNAm-Status im Blut war bei Brückmann *et al.* (2017) in hohem Maße mit T-Zellen und NK-Zellen assoziiert, sodass sie annahmen, dass die im Vollblut gemessenen DNAm-Unterschiede zum Teil von T-Zellen verursacht wurden (Brückmann *et al.* 2017). Auf Basis dieser Ergebnisse kann in der vorliegenden Studie ebenfalls ein durch T-Zellen mitverursachter Effekt angenommen werden. Die inter- und intraindividuelle Variabilität des Anteils an T-Zellen im Blut hat möglicherweise weniger Einfluss auf die DNAm-Messungen als der Epithelzellanteil im Speichel. Dennoch sollten auch Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung von Vollblutproben (bspw. aufgrund der Immunreaktion auf eine subklinische Infektion) nicht außer Acht gelassen werden (Heijmans und Mill 2012). Um klare Aussagen über eine mögliche Verzerrung von DNAm-Unterschieden durch die Blutzusammensetzung treffen zu können, bedarf es einer Kontrolle der zellulären Heterogenität bspw. mittels Blutzellzählung (Campbell *et al.* 2020).

Trotz der bekannten Gewebespezifität der DNAm zeigten Ergebnisse von Thompson *et al.* (2013) genomweit ein relativ ähnliches DNAm-Muster in Speichel und Vollblut (Thompson *et al.* 2013). Auch Smith *et al.* (2015) fanden trotz deutlicher Unterschiede zwischen der DNAm in Speichel und Blut auf genomweiter Ebene intraindividuell für 88.5 % der untersuchten CpG-Dinukleotide eine positive Korrelation (Smith *et al.* 2015). Dabei schien die DNAm der Speichelproben bei geringem Epithelzellanteil der DNAm der Blutproben ähnlicher zu sein als bei höherem Anteil an Epithelzellen (Smith *et al.* 2015). Sowohl Smith *et al.* (2015) als auch Murata *et al.* (2019) berichteten von einer Häufung von CpG-Dinukleotiden mit fehlender Korrelation zwischen Blut und Speichel (Smith *et al.* 2015) bzw. CpG-Dinukleotiden mit großen Methylierungsunterschieden zwischen beiden Geweben (Murata *et al.* 2019), wenn diese in Genkörpern lagen. Dies steht im Einklang mit den beobachteten großen Unterschieden der DNAm des in dieser Studie untersuchten CpG-Dinukleotids, das sich in einem Intron im Genkörper von *HECW2* befindet. Nichtsdestotrotz korrelierte die *HECW2*-DNAm in Blut in der vorliegenden Studie

mit der in Speichel bei der gemeinsamen Betrachtung beider Gruppen signifikant schwach positiv miteinander. Bei der getrennten Betrachtung zeigte sich eine signifikante schwache positive Korrelation bei den Kontrollprobanden und eine moderate positive, jedoch statistisch nicht signifikante Korrelation bei den Patienten. Gewisse Überschneidungen der *HECW2*-Regulation in Blut und Speichel können somit angenommen werden.

4.2.2 Alter als Störfaktor

Es ist allgemein bekannt, dass der Prozess des Alterns mit epigenetischen Veränderungen und insbesondere mit Veränderungen der DNAm einhergeht (Pal und Tyler 2016; Unnikrishnan *et al.* 2019). Mithilfe sog. epigenetischer Uhren, die auf der DNAm verschiedener CpG-Dinukleotide basieren, lässt sich das chronologische Alter bis auf wenige Jahre genau bestimmen (Hannum *et al.* 2013; Horvath 2013; Weidner *et al.* 2014). Die Bestimmung des biologischen Alters, also des funktionellen Zustands des Körpers mittels epigenetischer Uhren, ist ebenfalls Gegenstand der Forschung (Levine *et al.* 2018; Lu *et al.* 2019). Abweichungen zwischen chronologischem und biologischem Alter werden auf eine veränderte Geschwindigkeit des biologischen Alterns zurückgeführt (Horvath und Raj 2018). Es gibt Hinweise darauf, dass die Alterung der DNAm bei Vorliegen einer AUD beschleunigt abläuft (Luo *et al.* 2020; Rosen *et al.* 2018).

In der vorliegenden Studie wies die *HECW2*-DNAm in Blut bei gemeinsamer Betrachtung von Patienten und Kontrollprobanden zu jedem Studienzeitpunkt eine signifikante schwache bis moderate negative Korrelation mit dem Alter auf (vgl. Abschnitt 3.4.2). Aufgrund der möglichen Verzerrung durch den Gruppeneffekt wurden beide Gruppen zusätzlich getrennt untersucht. Eine signifikante Korrelation im Sinne geringerer DNAm mit zunehmendem Alter fand sich hierbei nur bei den Kontrollprobanden. Es erscheint möglich, dass sich bei den Patienten lediglich aufgrund der geringen Anzahl junger Probanden keine signifikante Korrelation zeigte. Es ist außerdem denkbar, dass die Korrelation der *HECW2*-DNAm mit dem Alter bei den Patienten aufgrund differentieller DNAm im Rahmen der Alkoholabhängigkeit überdeckt wurde. Um den potentiellen Einfluss des Alters auf die *HECW2*-DNAm bei Patienten weiter zu untersuchen, sollte eine größere Anzahl junger Patienten rekrutiert werden.

Abgesehen von einem SNP im *HECW2*-Gen, das in einer Metaanalyse von neun genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) mit der Gesamtmortalität (Zeit bis zum Tod) in Verbindung gebracht wurde (Walter *et al.* 2011), gibt es in der Literatur bisher keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen *HECW2* oder der *HECW2*-DNAm und dem Alter bzw. dem Altern.

Wie in Abschnitt 4.2.1 erwähnt, war die *HECW2*-DNAm bei Brückmann *et al.* (2017) mit T-Zellen und NK-Zellen assoziiert (Brückmann *et al.* 2017). Es erscheint folglich möglich, dass die in der vorliegenden Studie beobachtete *HECW2*-Hypomethylierung bei alkoholabhängigen Patienten auf einem Unterschied der Zelltyp-Anteile beruhen könnte, da Veränderungen der zellulären Zusammensetzung eines Gewebes Grund für eine Verschiebung des DNAm-Levels sein können (Bauer *et al.* 2015; Jaffe und Irizarry 2014) und chronischer Alkoholmissbrauch bekanntermaßen die Anzahl und Aktivität von T-Zellen sowie das Verhältnis von T-Zell-Subtypen verändert (Pasala *et al.* 2015). Bei Brückmann *et al.* (2017) war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl naiver CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen oder in den geschätzten Zelltyp-Anteilen zwischen Patienten und Kontrollprobanden feststellbar und die differentielle *HECW2*-DNAm war auch bei der gezielten Untersuchung von T-Zellen beobachtbar (Brückmann *et al.* 2017). Allerdings zeigte eine Studie von Bauer *et al.* (2015), dass DNAm-Profile auch durch Unterschiede kleinerer Immunzellfraktionen oder -subtypen, die von standardmäßig verwendeten Markern nicht erfasst werden, beeinflusst werden können (Bauer *et al.* 2015). Daher wäre es möglich, dass die *HECW2*-Hypomethylierung der Patienten auf einen spezialisierten Zellsubtyp zurückgeht, der bei der regressionsbasierten Anpassung des Datensatzes bei Brückmann *et al.* (2017) nicht berücksichtigt wurde. Zur Vermeidung falscher Annahmen sollten nach Bauer *et al.* (2015) Unterschiede auf Methylierungsebene deshalb auf Genexpressionsebene repliziert und auf Protein- und Zellebene validiert werden (Bauer *et al.* 2015). In der Vergangenheit wurde außerdem gezeigt, dass altersbedingte DNAm-Unterschiede in Blut zu großen Teilen durch altersbedingte Unterschiede in der Zellzusammensetzung des Bluts erklärt werden können (Jaffe und Irizarry 2014; Lu *et al.* 2019). Hypothetisch könnte daher eine mit dem Alter einhergehende

Veränderung in der Anzahl des bei alkoholabhängigen Patienten potentiell veränderten Immunzell-Subtyps die bei den Kontrollprobanden beobachtete Korrelation mit dem Alter erklären. Da der Fokus in dieser Studie auf der Frage nach Eignung als Biomarker in klinisch leicht zugänglichem Gewebe lag, wurde keine Methode zur Berücksichtigung der zellulären Heterogenität angewandt. Somit bleibt unbeantwortet, ob die differentielle *HECW2*-DNAm in Vollblut auf Veränderungen in der zellulären Heterogenität oder auf direkte Auswirkungen der Alkoholabhängigkeit auf die DNAm bestimmter Zelltypen zurückzuführen ist. Nachfolgende Studien sollten die Zellzusammensetzung berücksichtigen, um dieser Frage nachzugehen und damit Informationen über die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen zu gewinnen sowie den Zusammenhang mit dem Alter weiter aufklären zu können.

Um die Korrelation mit dem Alter im Blut zu berücksichtigen, wurde eine Subgruppe von Probanden im Alter ab einschl. 36 Jahren gebildet (SG36), da sich bei dieser Grenze das Alter von Patienten und Kontrollprobanden nicht länger signifikant voneinander unterschied und keine signifikante Korrelation der *HECW2*-DNAm mit dem Alter mehr feststellbar war. Der statistisch signifikante *HECW2*-DNAm-Unterschied zwischen Patienten und Kontrollprobanden blieb bestehen. Es kann nicht garantiert werden, dass der Störfaktor Alter durch die Bildung der SG36 genug berücksichtigt wurde. Einige Anhaltspunkte sprechen jedoch dafür, dass der Gruppenunterschied nicht bzw. nicht nur auf das Alter oder mit dem Alter zusammenhängende Veränderungen der Zellzusammensetzung, sondern auch auf den Faktor Alkoholabhängigkeit zurückzuführen sind. Zum einen waren die Gruppen in der Studie von Brückmann *et al.* (2017), in der die differentielle *HECW2*-DNAm bei Alkoholabhängigkeit erstmals beschrieben wurde, hinsichtlich des Alters (und Rauchverhaltens) gut aufeinander abgestimmt und die zelluläre Heterogenität wurde berücksichtigt (Brückmann *et al.* 2017). Zudem waren auch in den Studien von Witt *et al.* (2020) und Lohoff *et al.* (2021), in denen u. a. für Alter und Zelltyp korrigiert wurde, CpG-Dinukleotide im *HECW2*-Gen bei Patienten mit AUD differentiell methyliert (Lohoff *et al.* 2021; Witt *et al.* 2020). Zum anderen war eine differentielle *HECW2*-

DNAm auch in Hirngewebe, in dem T-Zellen eine untergeordnete Rolle spielen, zu beobachten (Wiegand *et al.* 2019).

In Speichel zeigte sich sowohl bei gemeinsamer als auch bei getrennter Betrachtung von Patienten und Kontrollprobanden lediglich zu T3 eine signifikante negative Korrelation der *HECW2*-DNAm mit dem Alter, sodass kein allgemeiner Alterseinfluss angenommen und keine Subgruppe gebildet wurde. Dennoch kann aufgrund dieser Ergebnisse ein Einfluss des Alters nicht vollständig ausgeschlossen werden, sodass zukünftige Studien mit größeren Kohorten das Alter als möglichen Störfaktor der *HECW2*-DNAm in Speichel erneut untersuchen und gegebenenfalls berücksichtigen sollten.

Uneinheitliche Ergebnisse des Alterseinflusses auf die DNAm von Blut und Speichel sind aufgrund der großen Gewebespezifität der DNAm (vgl. Abschnitt 4.2.1) nicht überraschend. Auch die Ergebnisse einer Studie zu beschleunigtem biologischem Altern bei Alkoholabhängigkeit und Alkoholmissbrauch, in der neben DNAm-Daten aus Blut auch DNAm-Daten aus Leber- und postmortalem Hirngewebe (präfrontaler Cortex) untersucht wurden, deuten auf eine gewebespezifische Verknüpfung von übermäßigem Alkoholkonsum und epigenetischer Alterung hin (Rosen *et al.* 2018). Sie fanden Trends zu beschleunigten Alterungsprozessen in Blut und Lebergewebe und einen Trend zu verlangsamten Alterungsprozessen im präfrontalen Cortex (Rosen *et al.* 2018).

Schließlich sollte der Zusammenhang der *HECW2*-DNAm mit dem Alter sowie der Zellzusammensetzung weiter erforscht werden, um einerseits die molekularen Pathomechanismen der differentiellen DNAm alkoholabhängiger Patienten aufklären zu können und andererseits potentiell benötigte altersadjustierte Referenzbereiche für den Gebrauch als Biomarker bestimmen zu können.

4.2.3 Geschlecht und Rauchen als Störfaktoren

Neben dem Alter (vgl. Abschnitt 4.2.2) sind sowohl das Geschlecht (Liu *et al.* 2010; Solomon *et al.* 2022) als auch das Rauchverhalten (Breitling *et al.* 2011; Zeilinger *et al.* 2013) Faktoren, die bekanntermaßen Einfluss auf DNAm haben

können. Trotz gezielter Rekrutierung gelang es in dieser Studie nicht, eine ausgeglichene Verteilung hinsichtlich dieser Variablen zwischen den Gruppen (Patienten und Kontrollprobanden) bzw. innerhalb der jeweiligen Gruppe zu erreichen. In Verbindung mit der *HECW2*-DNAm wurde nach unserem Kenntnisstand bisher (2024) für keinen der beiden Faktoren ein Zusammenhang beschrieben. Um den potentiellen Zusammenhang von Geschlecht bzw. Raucherstatus mit der *HECW2*-DNAm in unserer Studie dennoch zu untersuchen und diese Faktoren als potentielle Störfaktoren berücksichtigen zu können, wurde die *HECW2*-DNAm von männlichen und weiblichen Studienteilnehmern bzw. Rauchern und Nichtrauchern getrennt nach Gruppe und Zeitpunkt miteinander verglichen.

In Blut fand sich zwischen weiblichen und männlichen Kontrollprobanden der SG36 kein signifikanter Unterschied, während weibliche Patienten der SG36 zu T3 eine signifikant höhere DNAm als männliche Patienten aufwiesen. In Speichel zeigten sich zu T2 und T4 signifikant höhere DNAm-Werte bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Kontrollprobanden, die Patienten beider Geschlechter hatten vergleichbare Werte. Im Allgemeinen zeigte sich kein klares und beständiges Muster zwischen den Variablen, sodass eine Rolle des Geschlechts als Störfaktor der *HECW2*-DNAm unwahrscheinlich erscheint.

Der Raucherstatus stellte weder in Blut (SG36) noch in Speichel einen Störfaktor dar. Da die Prävalenz des Rauchens unter Alkoholabhängigen mit etwa 65.5 bis 89.6 % (Burling und Ziff 1988; Daepfen *et al.* 2000) sehr hoch ist – auch in unserer Studie waren 76.6 % der alkoholabhängigen Patienten Raucher – ist die fehlende Beeinflussung der *HECW2*-DNAm durch Rauchen eine wichtige Eigenschaft bzw. Voraussetzung für die Eignung als Biomarker bei Alkoholabhängigkeit. Zu berücksichtigen sind die teilweise sehr kleinen Stichprobengrößen der Nichtraucher in der Patientenkohorte bzw. der Raucher in der Kontrollprobandenkohorte. Für eine sichere Beurteilung des Einflusses von Rauchen auf die *HECW2*-DNAm wären weitere Untersuchungen an größeren Kohorten notwendig.

4.3 Potentielle Funktion der *HECW2*-DNAm als Biomarker bei Alkoholabhängigkeit

In den letzten Jahren wurde bereits in mehreren Studien eine differentielle DNAm im *HECW2*-Gen im Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit beschrieben (Brückmann *et al.* 2017; Lohoff *et al.* 2021; Witt *et al.* 2020). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern neue Erkenntnisse im Hinblick auf die potentielle Eignung der *HECW2*-DNAm als epigenetischer Biomarker für Diagnostik, Krankheitsschwere, Therapieansprechen und Rückfall bei dieser Erkrankung.

Generell muss dabei berücksichtigt werden, dass Alkoholabhängigkeit ein komplexes Krankheitsbild darstellt, das durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Ein einzelner Biomarker wird somit vermutlich nicht aussagekräftig und zuverlässig genug sein können – vielmehr könnte ein epigenetischer Biomarker eine sinnvolle Ergänzung zu anderen epigenetischen, klinischen und/oder laborchemischen Parametern darstellen.

4.3.1 Diagnostik

Alkoholbezogene Störungen sind häufig und werden häufig unterdiagnostiziert (DGPPN und DG-SUCHT 2020). Die Identifizierung betroffener Personen mittels Screenings und Case-Findings bietet die Chance auf eine frühzeitige Diagnosestellung und Therapie, sodass langfristige alkoholbezogene Folgeerkrankungen (vgl. Abschnitt 1.1.1) vermieden werden können (DGPPN und DG-SUCHT 2020). In diesem Zusammenhang könnten ergänzend zum Screeningverfahren mittels Fragebogen (insbesondere dem AUDIT) (DGPPN und DG-SUCHT 2020) eingesetzte Biomarker die Diagnosestellung in Fällen uneindeutiger oder unzuverlässiger Selbsteinschätzung bzw. klinischer Beurteilung zuverlässiger machen.

Das *HECW2*-DNAm-Level der Patienten war in Blut vor Therapiebeginn und zu allen späteren Studienzeitpunkten signifikant niedriger als das der Kontrollprobanden. Dieser Effekt zeigte sich sowohl unter Einschluss aller Altersgruppen als auch in der SG36. Der absolute Unterschied der prozentualen *HECW2*-DNAm zwischen Patienten und Kontrollprobanden war dabei gering und lag beim Vergleich der Mediane zu den verschiedenen Studienzeitpunkten im

Bereich von 1.46 bis 1.97 Prozentpunkten (1.46 Prozentpunkte zu T1) bzw. zwischen 0.99 und 1.66 Prozentpunkten in der SG36 (1.05 Prozentpunkte zu T1). Die Detektion und Analyse solch geringer DNAm-Unterschiede kann sich schwierig gestalten, da die Abweichung der meisten DNAm-Messmethoden inklusive der Pyrosequenzierung in diesem Bereich liegt (Bock *et al.* 2016). In CD3⁺-T-Zellen war der Unterschied bei Brückmann *et al.* (2017) mit 6.6 Prozentpunkten größer (Brückmann *et al.* 2017).

Die große Spannweite der *HECW2*-DNAm beider Gruppen und die daraus resultierenden Überschneidungen der Werte von Patienten und Kontrollprobanden deuten – wie eingangs erwähnt – darauf hin, dass ein einzelner epigenetischer Biomarker nicht als alleiniger Biomarker für Alkoholabhängigkeit dienen kann. Dennoch ist aufgrund des signifikanten Gruppenunterschieds anzunehmen, dass die *HECW2*-DNAm in Blut bspw. als Bestandteil eines Panels verschiedener Biomarker oder bei der Analyse spezifischer Zellpopulationen wie CD3⁺-T-Zellen als diagnostischer Biomarker geeignet sein könnte.

Auch im Speichel war das *HECW2*-DNAm-Level der Patienten vor Therapiebeginn signifikant niedriger als das der Kontrollprobanden. Im Vergleich zum Blut war die absolute Differenz der Mediane mit 2.70 bis 8.01 Prozentpunkten (3.90 Prozentpunkte zu T1) größer. Somit stellt die *HECW2*-DNAm in Speichel für den Bereich der Diagnostik einen vielversprechenden, nicht-invasiven Biomarkerkandidaten für die gemeinsame Anwendung mit anderen Parametern dar.

Schließlich heben die gezeigten Gruppenunterschiede eine Bedeutung von *HECW2* im Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit hervor, die in Abschnitt 4.4 diskutiert wird.

4.3.2 Krankheitsschwere

Die Umsetzung einer leitliniengerechten 21-tägigen QE erfordert ein multidisziplinäres Behandlungsteam und ist nach Kiefer *et al.* (2016) mit den in der Psychiatrie-Personalverordnung vorgesehen Personalressourcen nicht möglich (Kiefer *et al.* 2016). Objektive Biomarker für den Schweregrad einer

Alkoholabhängigkeit könnten die Entwicklung individuell angepasster Therapien unterstützen und damit einhergehend einen gezielteren Einsatz der limitierten klinischen Ressourcen ermöglichen.

Die Schwere der Alkoholabhängigkeit wurde in dieser Studie über die drei Faktoren psychische Belastung (GSI), Alkoholkonsum (AUDIT) und Alkoholverlangen (OCDS) definiert.

Bei der gemeinsamen Betrachtung von Patienten und Kontrollprobanden sowie allen vier Studienzeitpunkten korrelierten die Scores aller drei Fragebogen signifikant schwach bis moderat negativ mit der *HECW2*-DNAm – sowohl in Blut (SG36) als auch in Speichel. Eine größere psychische Belastung, ein höherer Alkoholkonsum und ein stärkeres Alkoholverlangen gingen folglich mit einer geringeren *HECW2*-DNAm einher. Dieser Zusammenhang war aufgrund des Gruppenunterschieds von Patienten und Kontrollprobanden sowohl bzgl. der *HECW2*-DNAm als auch der Fragebogen-Scores zu erwarten. Eine ähnliche Beobachtung machten Brückmann *et al.* (2016) bzgl. der *GDAP1*-DNAm, welche ebenfalls signifikant schwach negativ mit dem GSI- und AUDIT-Score korrelierte (Brückmann *et al.* 2016).

Für die Frage nach einem Biomarker der Krankheitsschwere ist jedoch insbesondere die Korrelation zwischen Fragebogen-Scores und DNAm der Patienten von Interesse. Hierbei zeigte sich weder für Blut (SG36) noch für Speichel ein signifikanter Zusammenhang, sodass sich die *HECW2*-DNAm auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studie nicht als Biomarker für die Schwere der Alkoholabhängigkeit eignet.

4.3.3 Therapieansprechen

Bezüglich des Therapieansprechens können prinzipiell zwei Biomarker-Typen mit verschiedenen Funktionen unterschieden werden: Einerseits kann die Veränderung eines Biomarker-Levels in Reaktion auf eine Therapie – in diesem Fall entspräche dies einer Annäherung des DNAm-Levels der Patienten an das Niveau der Kontrollprobanden zu T2 – als sog. *Response*-Biomarker dienen (Califf 2018). Dieser wäre im Sinne eines objektiven Outcome-Parameters bspw. für den Wirksamkeitsvergleich verschiedener Therapieansätze oder für die

Möglichkeit einer frühzeitigen Therapieanpassung bei Nichtansprechen nützlich. Andererseits kann ein sog. prädiktiver Biomarker – in diesem Fall entspräche dies einem gewissen DNAm-Level zu T1 – Personen vorhersagen, die mit größerer Wahrscheinlichkeit auf die Therapie ansprechen (Califf 2018). Letzteres wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht und stellt einen potentiellen Gegenstand zukünftiger Forschung dar.

Beide Biomarker-Typen könnten zudem Aufschluss über zugrundeliegende biologische Erkrankungsprozesse geben und potentielle Zielstrukturen neuer Medikamente darstellen.

Die *HECW2*-DNAm der Patienten zeigte im Zuge der Therapie (von T1 zu T2) weder in Blut (sowohl aller Altersgruppen als auch der SG36) noch in Speichel eine signifikante Zunahme und damit Annäherung an das Level der Kontrollprobanden. Folglich unterschieden sich beide Gruppen auch nach Therapieende (zu T2) weiterhin signifikant voneinander. Da die Therapie – basierend auf der Auswertung der Fragebogenergebnisse – einen positiven Effekt hatte (vgl. Abschnitt 4.1.1), ist die ausbleibende Annäherung nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auf einen Misserfolg der Therapie zurückzuführen. Darüber hinaus fand sich für *HECW2* auch in den Studien von Brückmann *et al.* (2017) (für cg18752527) und Witt *et al.* (2020) (für andere CpG-Dinukleotide) – im Gegensatz zu anderen Genen – keine Reversibilität der DNAm (Brückmann *et al.* 2017; Witt *et al.* 2020). Gemeinsam mit der Beobachtung einer auch 6 bzw. 12 Monate nach der Therapie weiterhin signifikant erniedrigten *HECW2*-DNAm der Patienten (im Speichel nach 6 Monaten) deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die differentielle *HECW2*-DNAm alkoholabhängiger Patienten einer langanhaltenden Veränderung entspricht.

Soundararajan *et al.* (2021) untersuchten die Frage, ob sich molekulare Marker auf epigenetischer Ebene genau wie gestörte biochemische Parameter (wie bspw. Homocystein) bei Alkoholabstinenz umkehren und fanden in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen bei Männern mit behandlungsbedürftiger AUD keine Veränderung der genspezifischen (*ALDH2* und *MTHFR* (Methylentetrahydrofolat-Reduktase-Gen)) oder globalen DNAm direkt nach dem Entzug und nach 3 Monaten (Soundararajan *et al.* 2021).

Andere Autoren berichteten hingegen von einer Normalisierung der DNAm nach Beendigung des Alkoholkonsums – sowohl im globalen (Brückmann *et al.* 2017; Koller *et al.* 2019; Philibert *et al.* 2014; Witt *et al.* 2020) als auch im genspezifischen Kontext (Brückmann *et al.* 2016; Heberlein *et al.* 2015).

Witt *et al.* (2020) schlossen aus ihren uneinheitlichen Ergebnissen für verschiedene Gene, dass es sich bei Signalwegen, die auch nach dem Entzug zwischen Patienten und Kontrollprobanden unterschiedlich bleiben, um solche handeln könnte, die mit der Alkoholabhängigkeit selbst oder der Anfälligkeit dafür zusammenhängen (Witt *et al.* 2020). Um diese Hypothese sowie die potentielle Eignung als Biomarker für die Identifizierung von Risikogruppen zu testen, wären longitudinale Studien, die zusätzlich Daten aus der Zeit vor Beginn einer Alkoholabhängigkeit miteinbeziehen, von großem Interesse.

Zusammenfassend scheint sich die *HECW2*-DNAm in Blut und Speichel nicht als *Response*-Biomarker zu eignen. Die fehlende Umkehr der DNAm nach der Therapie lässt jedoch interessante Rückschlüsse auf die pathophysiologische Bedeutung von *HECW2* zu (vgl. Abschnitt 4.4).

4.3.4 Rückfall

Ähnlich wie für das Therapieansprechen (vgl. Abschnitt 4.3.3) können auch für das Thema Rückfall zwei Biomarker-Typen unterschieden werden: Zum einen – im Sinne eines prognostischen Biomarkers (Califf 2018) – ein Biomarker, der zu Therapiebeginn oder zu Therapieende bestimmt wird und die Wahrscheinlichkeit, im weiteren Verlauf einen Rückfall zu erleiden, vorhersagt. Zum anderen – im Sinne eines Verlaufsparameters bzw. *Monitoring*-Biomarkers (Califf 2018) – ein Biomarker, der den aktuellen Krankheitsstatus (Abstinenz versus Rückfall) anzeigt und somit langfristig den Krankheitsverlauf abbildet.

In Übereinstimmung mit den in der Literatur berichteten hohen Rückfallraten von ca. 50 bis 70 % innerhalb eines Jahres (Durazzo und Meyerhoff 2017; Hunt *et al.* 1971; Nguyen *et al.* 2020; Schellekens *et al.* 2015) betrug die Rückfallrate in der vorliegenden Studie nach einem Jahr 72.4 % (vgl. Abschnitt 3.1). Mithilfe eines prognostischen Biomarkers könnte die Therapie für besonders rückfallgefährdete Patienten individuell angepasst werden, intensive Nachsorgeprogramme angeboten und die Ressourcen zur Rückfallprävention gezielt eingesetzt werden,

um die hohen Rückfallraten langfristig zu senken. Die Verlaufskontrolle mittels objektiven Biomarkers würde im Falle eines Rückfalls außerdem frühzeitig die Möglichkeit zur erneuten Intervention bieten.

Die *HECW2*-DNAm der rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten unterschied sich in Blut weder zu Therapiebeginn (T1) noch zu Therapieende (T2) statistisch signifikant; die DNAm-Werte (Mediane) der rückfälligen Patienten lagen dabei mit einem Unterschied von 0.38 Prozentpunkten zu T1 bzw. 0.73 Prozentpunkten zu T2 unterhalb des DNAm-Levels der nicht-rückfälligen Patienten.

Beim Vergleich mit den Kontrollprobanden ergab sich für diese Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden, nicht jedoch zwischen nicht-rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden. Diese Beobachtung könnte einerseits darauf hindeuten, dass sich nicht-rückfällige Patienten bzgl. der *HECW2*-DNAm tatsächlich weniger von Kontrollprobanden unterscheiden als rückfällige Patienten – andererseits könnte der fehlende Unterschied auch auf die geringe Anzahl von 8 nicht-rückfälligen Patienten und die damit einhergehende mangelnde statistische Power zurückzuführen sein. Der Unterschied zwischen nicht-rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden wäre zudem zu T2 (und T4) ohne Anpassung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm statistisch signifikant – ein weiteres Indiz für die geringe statistische Power. Zur weiteren Abklärung dieses Umstands sind Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv notwendig.

Aufgrund des fehlenden signifikanten Unterschieds zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu T1 und T2 eignet sich die *HECW2*-DNAm nicht als alleiniger prognostischer Biomarker für die Rückfallwahrscheinlichkeit. Dennoch ist eine Tendenz niedrigerer DNAm rückfälliger Patienten erkennbar, die an größeren Kohorten weiter untersucht werden sollte. Möglicherweise könnte die *HECW2*-DNAm im Rahmen eines Biomarker-Panels eingesetzt werden.

Zu T3, ein halbes Jahr nach Therapiebeginn, war das gleiche Muster wie zu T1 und T2 erkennbar, weshalb sich die *HECW2*-DNAm auf Basis dieser Untersuchung an einer kleinen Stichprobe nicht als *Monitoring*-Biomarker eignet. Der absolute Unterschied zwischen den Medianen von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten betrug lediglich 0.3 Prozentpunkte.

Ein Jahr nach Therapiebeginn war zwischen rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar – hier beschränkte sich die Anzahl rückfälliger Patienten jedoch auf 9, sodass erneut die mangelnde statistische Power zu berücksichtigen und schließlich Untersuchungen an größeren Subgruppen abzuwarten sind.

Im zeitlichen Verlauf waren weder bei den rückfälligen noch bei den nicht-rückfälligen Patienten signifikante Veränderungen beobachtbar. Dies steht im Einklang mit den in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen langfristigen Veränderungen der *HECW2*-DNAm, sodass sich diese nicht als Verlaufsparemeter eignet.

Bei Betrachtung der SG36 waren die signifikanten Unterschiede zwischen rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden von T1 bis T3 nicht länger nachweisbar. Grund dafür könnte die reduzierte statistische Power aufgrund verringerter Stichprobengrößen sein.

Interessanterweise war in Speichel ein umgekehrtes Muster erkennbar: Zwar unterschieden sich rückfällige und nicht-rückfällige Patienten in ihrer *HECW2*-DNAm auch im Speichel zu keinem Zeitpunkt signifikant, jedoch lag das DNAm-Level der rückfälligen Patienten diesmal durchschnittlich 5.32 Prozentpunkte über dem der nicht-rückfälligen Patienten und damit näher am Niveau der Kontrollprobanden. Signifikante Differenzen zeigten sich nach Bonferroni-Holm-Korrektur zwischen nicht-rückfälligen Patienten und Kontrollprobanden zu T1 und T3 (ohne Korrektur auch zu T2 und T4). Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand könnte aufgrund des direkten Kontakts der Mundschleimhaut mit konsumierten Getränken in unterschiedlichen Trinkgewohnheiten zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu finden sein. Es wäre denkbar, dass die Art der konsumierten alkoholischen Getränke einen Einfluss auf die DNAm selbst oder auf die Anzahl der oralen Epithelzellen hat (eigene Hypothese ohne Evidenz) und sich die Art der konsumierten Getränke zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten unterschied. Tatsächlich gaben 62.5 % der nicht-rückfälligen Patienten (5 von 8) unter den üblicherweise konsumierten alkoholischen Getränken auch hochprozentige Getränke an, während der Anteil bei den rückfälligen Patienten lediglich 28.6 % (6 von 21) betrug (Daten nicht gezeigt). Aufgrund kleiner Stichprobengrößen haben diese Beobachtungen

deskriptiven Charakter. Im Widerspruch zu dieser Hypothese steht außerdem das Ergebnis einer Studie zum Zusammenhang zwischen der Präferenz für alkoholische Getränke und der Schwere einer Alkoholabhängigkeit sowie der Therapieadhärenz, die zeigte, dass Patienten mit Spirituosenkonsum u. a. einen höheren Schweregrad sowie häufigere Behandlungen wegen Alkoholismus in der Vergangenheit aufwiesen (Baltieri *et al.* 2009). Nichtsdestotrotz könnte die weitere Untersuchung eines Einflusses des Alkoholgehalts auf die DNAm in Speichel interessante Erkenntnisse liefern.

Ohne angepasstes Signifikanzniveau wäre außerdem der Unterschied der *HECW2*-DNAm in Speichel zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten zu T1 und T4 statistisch signifikant. Das angepasste Signifikanzniveau könnte bei diesen kleinen Stichprobenzahlen zu streng sein, sodass tatsächliche Effekte verdeckt wurden. Folgestudien könnten hier vielversprechende Erkenntnisse liefern. Nichtsdestotrotz wird durch den entgegengesetzten Trend in Blut und Speichel erneut die Gewebespezifität von DNAm hervorgehoben (vgl. Abschnitt 4.2.1).

Über die Zeit blieb die *HECW2*-DNAm von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten im Speichel ohne signifikante Dynamiken.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die *HECW2*-DNAm in Speichel mit dem Faktor Rückfall verknüpft sein könnte. Aufgrund geringer statistischer Power ist jedoch keine zuverlässige Aussage möglich. Die in dieser Studie nach Bonferroni-Holm-Korrektur statistisch nicht signifikanten Unterschiede zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten sollten an größeren Stichproben untersucht werden. Außerdem müssten weitere Studien zeigen, inwiefern dieser Trend zur differentiellen *HECW2*-DNAm tatsächlich auf den Faktor Rückfall zurückzuführen ist bzw. inwiefern andere Einflüsse wie bspw. das Trinkverhalten ursächlich sein könnten. Zusätzlich erschweren große Spannweiten und sich zu großen Teilen überschneidende Wertebereiche den Einsatz als alleinigen Biomarker.

Über den Zusammenhang von DNAm und Rückfall bei Alkoholabhängigkeit ist nur wenig bekannt, da sich bisherige Studien überwiegend auf Veränderungen

der DNAm bei Alkoholabhängigkeit im Allgemeinen und auf Veränderungen im Verlauf eines Entzugs konzentrierten. Erste Studien brachten uneinheitliche Ergebnisse hervor: Heberlein *et al.* (2015) wiesen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der DNAm des *BDNF*-Promotors und der Dauer der Abstinenz an Tag 14 des Alkoholentzugs nach (Heberlein *et al.* 2015). Friedel *et al.* (2020) zeigten, dass sich das Methylierungsmuster einzelner CpG-Dinukleotide über die Zeit von einem Jahr zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten nicht unterschied (Friedel *et al.* 2020) und auch Soundararajan *et al.* (2021) konnten 3 Monate nach Therapiebeginn keine signifikanten Unterschiede zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten in der genspezifischen (*ALDH2* und *MTHFR*) DNAm oder Veränderungen der globalen DNAm über die Zeit in einer der beiden Subgruppen feststellen (Soundararajan *et al.* 2021). Auch diese Studien waren jedoch aufgrund geringer Stichprobengrößen in ihrer Aussagekraft limitiert.

Um die molekularen Mechanismen hinter dem Rückfallphänomen aufzuklären, sind groß angelegte Langzeitstudien erforderlich. Dennoch liefert die vorliegende Studie erste Einblicke in mögliche Unterschiede der *HECW2*-DNAm zwischen rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten.

4.4 Bedeutung von *HECW2* und der *HECW2*-DNAm für die Pathophysiologie der Alkoholabhängigkeit

Die Entstehung einer Alkoholabhängigkeit basiert auf dem komplexen Zusammenspiel genetischer, neurobiologischer, psychologischer und psychosozialer Faktoren. Ein umfassendes Verständnis der beteiligten Faktoren, insbesondere der molekularen Mechanismen, fehlt jedoch bis heute.

HECW2 ist als E3-Ubiquitinligase an der Regulation diverser zellulärer Prozesse und Stoffwechselwege beteiligt, indem es Proteine mittels Ubiquitinierung entweder stabilisiert oder sie für Abbau durch das Proteasom markiert: Zu den durch *HECW2* stabilisierten Proteinen zählen bspw. p73, ein Mitglied der p53-Familie (Miyazaki *et al.* 2003) und *AMOTL1*, das an Endothelzellverbindungen beteiligt ist (Choi *et al.* 2016). *HP1* (Krishnamoorthy *et al.* 2018a) und *PCNA/Lamin B1* (Krishnamoorthy *et al.* 2018b), die für die Chromatinstruktur

bzw. die nukleäre Organisation von Bedeutung sind, sowie die ATR(*ataxia telangiectasia and Rad3-related*)-Kinase, ein DNA-Schadenssensor (Muralikrishna *et al.* 2012), werden von HECW2 für den Abbau markiert. Die Vermittlung der Lamin-B1-Degradierung fördert nach Li *et al.* (2023) über die Aktivierung des AKT/mTOR-Signalwegs das Fortschreiten und die Zytostatikaresistenz des kolorektalen Karzinoms (Li *et al.* 2023). Auch Lu *et al.* (2013) diskutierten eine Rolle von HECW2 bei der Onkogenese: Sie wiesen dessen Rolle bei der Regulation des Übergangs der Meta- zur Anaphase als Substrat des APC/C-Cdh1-Komplexes nach und fanden eine erhöhte Expression des HECW2-Proteins in Tumorgeweben von Kolon und Zervix (Lu *et al.* 2013). Zudem spielt HECW2 als positiver Regulator des GDNF/Ret-Signalwegs eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen der Neuralleiste und somit der Entwicklung des enterischen Nervensystems (Heanue und Pachnis 2007; Wei *et al.* 2015).

Über die Stabilisierung und Aktivitätssteigerung von p73 ist HECW2 darüber hinaus an weiteren zellulären Prozessen beteiligt. Wie Studien an Zellkulturen und Nagern zeigen, spielt p73 u. a. als Regulator von Proliferation, Apoptose und neuronaler Differenzierung eine wichtige Rolle bei der embryonalen und adulten Neurogenese und dem Erhalt neuraler Stammzellen (Agostini *et al.* 2010; Fujitani *et al.* 2010; Gonzalez-Cano *et al.* 2010; Killick *et al.* 2011; Talos *et al.* 2010), ist in den Glutamat-Metabolismus involviert (Velletri *et al.* 2013), an der Reaktion auf oxidativen Stress (Marini *et al.* 2018; Wang *et al.* 2007) und DNA-Schäden (Gong *et al.* 1999; Yuan *et al.* 1999) beteiligt sowie bei neurodegenerativen Prozessen von Bedeutung (Klein *et al.* 2011; Wetzol *et al.* 2008).

Seit der erstmaligen Beschreibung von *HECW2* im Jahr 2003 (Miyazaki *et al.* 2003) wurden Mutationen im *HECW2*-Gen v. a. mit neurologischen Störungen wie Epilepsie, geistiger Behinderung, Entwicklungsstörungen, Muskelhypotonie (Acharya *et al.* 2022; Berko *et al.* 2017; Halvardson *et al.* 2016; Heide *et al.* 2021; Krami *et al.* 2022; Ullman *et al.* 2018; Yanagishita *et al.* 2021), erworbener Mikrozephalie (Peikes *et al.* 2021) oder episodischer Ataxie (Tedesco Silva *et al.* 2023) in Verbindung gebracht.

Knockout-Experimente an Mäusen führten zu einem verringerten GDNF/Ret-Signaling, Störungen der Darm- und Nierenentwicklung, verringertem Körpergewicht und innerhalb von zwei Wochen nach der Geburt zum Tod (Qiu *et al.* 2016; Wei *et al.* 2015). Knockdown-Experimente an Zebrafischen führten zu frühen morphologischen Anomalien des Gehirns, des Rückenmarks und anderer Gewebe (Lu *et al.* 2021).

Diese Beobachtungen lassen auf eine wichtige Bedeutung von *HECW2* im Rahmen der neurologischen Entwicklung schließen.

Zusammenfassend wirkt *HECW2* als E3-Ubiquitinligase über die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse an der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase mit und ist nach heutigem Kenntnisstand insbesondere im Zusammenhang mit der Entwicklung und dem Erhalt des zentralen und enterischen Nervensystems, der Onkogenese und der Bewältigung von Stresssignalen von Bedeutung. In Bezug auf Alkoholabhängigkeit ist die Rolle von *HECW2* bisher ungeklärt.

Das in dieser Studie untersuchte CpG-Dinukleotid (cg18752527) befindet sich im Genkörper von *HECW2*. Da Hypomethylierung im Genkörper im Gegensatz zu Hypomethylierung im Promotor meist mit verringerter Genexpression assoziiert ist (Ball *et al.* 2009; Rauch *et al.* 2009), deuten die Ergebnisse dieser Studie auf eine verminderte *HECW2*-Expression bei Alkoholabhängigkeit hin. DNAm ist jedoch nur einer von vielen Mechanismen, die zur Genexpression beitragen, sodass eine sichere Aussage über die Richtung der veränderten Genexpression auf Basis der in dieser Studie erzielten Ergebnisse nicht möglich ist. Zudem deuten erste Daten zur *HECW2*-DNAm in postmortalem Hirngewebe auf eine entgegengesetzte Richtung des DNAm-Unterschieds zwischen Patienten und Kontrollprobanden im Gehirn hin (Wiegand *et al.* 2019), sodass keine pauschale Aussage über die Auswirkungen einer veränderten *HECW2*-DNAm getroffen werden kann. Darüber hinaus kann intragenische DNAm bspw. auch an alternativem Spleißen beteiligt sein (Lev Maor *et al.* 2015). Um den Zusammenhang zwischen *HECW2*-DNAm und -Transkription und damit die Funktion von *HECW2* im Rahmen von Alkoholabhängigkeit untersuchen zu

können, werden funktionelle Daten wie Ergebnisse von Genexpressionsanalysen benötigt.

Geht man dennoch von einer verringerten *HECW2*-Expression bei Patienten aus, kann folglich auch eine verminderte p73-Aktivität angenommen werden, da p73 in Abwesenheit von *HECW2* schneller zerfällt (Miyazaki *et al.* 2003). Eine reduzierte p73-Aktivität kann wiederum mit vielfältigen (neuro-)pathologischen Veränderungen wie einer gestörten adulten Neurogenese (Fujitani *et al.* 2010; Talos *et al.* 2010) oder einer eingeschränkten Bewältigung von oxidativem Stress (Marini *et al.* 2018; Wang *et al.* 2007) einhergehen. Sowohl die Entstehung von oxidativem Stress (Zima *et al.* 2001) als auch die Reduktion adulter Neurogenese (insbesondere im Hippocampus) (Anderson *et al.* 2012; Herrera *et al.* 2003; Nixon und Crews 2002) sind als Folgen von Alkoholkonsum bzw. -abhängigkeit bekannt und tragen zu der bei Alkoholabhängigkeit zu beobachtenden Neurodegeneration und kognitiven Dysfunktion bei (Crews und Nixon 2008; Nixon 2006). Wie bereits von anderen Autoren beschrieben, ist insbesondere der Hippocampus von Jugendlichen anfällig für alkoholbedingte neurodegenerative Prozesse (Nixon *et al.* 2010; Wooden *et al.* 2021). Eine Studie von Hargreaves *et al.* (2009) an Ratten zeigte bspw., dass der Hippocampus von Jugendlichen im Vergleich zu dem von Erwachsenen nach wiederholter Alkoholexposition anfälliger für langfristige Veränderungen des Proteoms war (Hargreaves *et al.* 2009). Betroffen war dabei insbesondere die Expression von Proteinen, die mit dem Zytoskelett, dem Glutamat-Metabolismus, der Glykolyse, der Proteindegradierung und Synapsen zusammenhängen (Hargreaves *et al.* 2009). Um zu verstehen, inwiefern diese Veränderungen die Vulnerabilität für die Entwicklung einer AUD beeinflussen können, ist weitere Forschung erforderlich. Eine verringerte *HECW2*-Expression aufgrund intragenischer Hypomethylierung könnte über die verminderte Stabilisierung von p73 an diesen neurodegenerativen Prozessen beteiligt sein. Da es sich bei der differentiellen *HECW2*-DNAm alkoholabhängiger Patienten, basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie, um eine langanhaltende Veränderung zu handeln scheint, wäre die Beteiligung an einem längerfristigen Pathomechanismus wie Neurodegeneration denkbar.

Interessanterweise führte in der Studie von Witt *et al.* (2020) eine weitere E3-Ubiquitin-Ligase die Rangliste der bei Patienten im Zuge der Entzugstherapie differentiell methylierten Regionen an: TRIM39 (*tripartite motif-containing 39*) (Witt *et al.* 2020). TRIM39 ist über die Stabilisierung von MOAP1 (*modulator of apoptosis 1*) (Huang *et al.* 2012; Lee *et al.* 2009) und p21 (Zhang *et al.* 2012) ebenfalls an der Reaktion auf DNA-Schäden beteiligt. Auch andere Studien zur Epigenetik bei Alkoholabhängigkeit brachten Gene, Gennetzwerke und Signalwege hervor, die mit der Stressantwort und Apoptose verknüpft sind (Liu *et al.* 2018; Lohoff *et al.* 2021; Philibert *et al.* 2014), sodass eine Bedeutung der epigenetischen Regulierung dieser Prozesse für die Pathomechanismen einer Alkoholabhängigkeit und deren Folgen hervorgehoben wird.

Die DNAm des in dieser Studie untersuchten CpG-Dinukleotids cg18752527 wies in der Studie von Lohoff *et al.* (2021) außerdem eine signifikante positive Korrelation mit fMRT(funktionellen Magnetresonanztomographie)-Signalen im rechten rostralen ACC im Zusammenhang mit einem Paradigma zur Konditionierung und Extinktion von Angst auf (Lohoff *et al.* 2021). Der ACC ist sowohl im Kontext der Angstkonditionierung (Sehlmeyer *et al.* 2009) bzw. Konditionierung im Allgemeinen (Devinsky *et al.* 1995) als auch im Kontext der Alkoholabhängigkeit (Bauer *et al.* 2013) und als Bestandteil des belohnungsgesteuerten Verhaltens (Rushworth *et al.* 2004) bekannt. Zudem sind Menschen mit Alkoholabhängigkeit häufig auch von Angststörungen betroffen (Gallagher *et al.* 2018). Diese Beobachtung deutet auf einen möglichen Zusammenhang von *HECW2* mit Angst, Konditionierung und dem Belohnungssystem hin – Elemente, die eng mit Alkoholabhängigkeit verknüpft sind.

Eine weitere mögliche Folge verminderter *HECW2*-Expression könnte sich aus dessen Funktion als positiver Regulator des GDNF/Ret-Signalwegs (Qiu *et al.* 2016; Wei *et al.* 2015) ergeben, da sich in der Literatur Belege für eine suppressive Wirkung von GDNF auf das Alkoholkonsumverhalten häufen (Barak *et al.* 2019). Die Rezeptor-Tyrosinkinase Ret, die durch Bindung des Liganden GDNF aktiviert wird, kann diverse weitere Signalkaskaden in Gang setzen – darunter Ras/Erk (*rat sarcoma / extracellular signal-regulated kinase*) und

PI3K/Akt (Phosphoinositid-3-Kinase / Proteinkinase B) (Kawai und Takahashi 2020). In den enterischen Nervenzellen von *HECW2*-Knockout-Mäusen war lediglich die PI3K/Akt-Signalaktivität, nicht jedoch die Ras/Erk-Signalaktivität unterdrückt (Wei *et al.* 2015). Der in der Literatur beschriebene Einfluss von GDNF auf den Alkoholkonsum von Ratten war jedoch auf die Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs im ventralen tegmental Areal (VTA) zurückzuführen (Barak *et al.* 2011; Carnicella *et al.* 2008), sodass eine Beteiligung von *HECW2* an diesem Wirkmechanismus als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Betrachtet man potentielle Folgen einer veränderten *HECW2*-Expression im Blut, so sind insbesondere T-Zellen von Interesse, da Brückmann *et al.* (2017) eine signifikante Assoziation der *HECW2*-DNAm mit CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie NK-Zellen feststellten (Brückmann *et al.* 2017). Chronischer Alkoholmissbrauch beeinflusst bekanntermaßen die Anzahl und Aktivität dieser Immunzellen (Pasala *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2016) und führt dadurch bspw. zu einer erhöhten Anfälligkeit für virale und bakterielle Infektionen (Pasala *et al.* 2015). Inwiefern *HECW2* auf molekularer Ebene an den Veränderungen des Immunsystems beteiligt sein könnte ist bislang unklar.

Die grundlegende Frage, ob die differentielle *HECW2*-DNAm alkoholabhängiger Patienten reaktiv auf den chronischen Alkoholkonsum zurückzuführen oder ursächlich an der Entwicklung der Alkoholabhängigkeit mitbeteiligt ist, bleibt in dieser Studie unbeantwortet. Da DNAm sowohl Merkmale eines Genotyps – also eines vererbbaaren Merkmals, welches das Krankheitsrisiko beeinflussen kann – als auch Merkmale eines zellulären Phänotyps – d. h. eines durch Krankheiten veränderbaren molekularen Mechanismus – aufweist (Bock 2012), wird die Beantwortung dieser Frage erschwert. Harlaar und Hutchison (2013) beschreiben insgesamt sechs mögliche Szenarien für die Zusammenhänge zwischen DNAm, Alkoholkonsum, anderen Risikofaktoren und dem Risiko für bzw. den Symptomen von AUDs: eine kausale Verknüpfung (direkte Veränderung von DNAm-Mustern durch Alkoholkonsum), ein vermittelnder Effekt (bestimmte Risikofaktoren führen über eine epigenetisch vermittelte Veränderung der Genexpression zur Entwicklung von AUD-Symptomen), ein *Priming* (anfängliche Alkoholexposition kann bestimmte Gene epigenetisch

primen – sie weisen zwar anfänglich keine veränderten DNAm- und Expressionsmuster auf, werden jedoch durch nachfolgenden Alkoholkonsum mit größerer Wahrscheinlichkeit exprimiert), eine Desensibilisierung (bestimmte Gene werden nur nach anfänglicher, nicht nach späterer Alkoholexposition aktiviert), eine umgekehrte Kausalität (AUD-Risiko oder AUD-Symptome führen zu DNAm-Veränderungen) und ein Korrelationsmodell (im Wesentlichen deskriptives Szenario) (Harlaar und Hutchison 2013). Auf Basis der in dieser Studie beobachteten langanhaltenden Veränderung der *HECW2*-DNAm wären insbesondere eine (längerfristige) direkte Veränderung durch Alkoholkonsum, ein vermittelnder Effekt oder eine umgekehrte Kausalität denkbar. Welche Art des Zusammenhangs für die *HECW2*-DNAm und Alkoholabhängigkeit tatsächlich gilt, sollte in zukünftigen Studien beantwortet werden.

Schließlich kann eine Beteiligung von *HECW2* an den pathophysiologischen Mechanismen, die einer Alkoholabhängigkeit zugrunde liegen, aufgrund der Ergebnisse dieser Studie sowie ähnlicher Ergebnisse anderer Studien (Brückmann *et al.* 2017; Lohoff *et al.* 2021; Witt *et al.* 2020) angenommen werden. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass Untersuchungen an peripheren Geweben nur eingeschränkt Rückschlüsse auf zugrundeliegende Prozesse im Gehirn zulassen. Die Untersuchung der genauen Funktionsweise der *HECW2*-Regulation auf zellulärer Ebene und ein tiefgreifenderes Verständnis der Rolle von *HECW2* im Rahmen der Alkoholabhängigkeit könnten jedoch wertvolle Erkenntnisse für die Weiterentwicklung präventiver, diagnostischer oder therapeutischer Methoden liefern.

4.5 Limitationen der Studie und zukünftige Forschung

Im Folgenden soll auf einige Limitationen dieser Studie hingewiesen werden, um die Ergebnisse im richtigen Kontext interpretieren zu können und Wege für zukünftige Forschung aufzuzeigen.

Eine wesentliche Einschränkung der Studie ergibt sich aus der hohen Abbruchrate der Patienten von 79.4 % – eine Herausforderung, die bereits aus anderen Studien zum Thema Sucht bekannt ist (Daigre *et al.* 2021; Flórez *et al.* 2015; Gjestad *et al.* 2011) – und dem daraus resultierenden Unterschied der

Stichprobengrößen von Patienten und Kontrollprobanden insbesondere zu den späteren Studienzeitpunkten. Da zusätzlich die Rekrutierung zum Zeitpunkt der Datenauswertung noch nicht abgeschlossen war, standen insgesamt mehr Daten für T1 und T2 als für T3 und T4 zur Verfügung.

Ein weiteres Missverhältnis ergab sich aufgrund der hohen Rückfallrate für die Stichprobengrößen von rückfälligen und nicht-rückfälligen Patienten. Der Rückfallstatus vieler Patienten war aufgrund der hohen Abbruchrate außerdem unbekannt, sodass diese Stichproben klein ausfielen und die Aussagekraft und Generalisierbarkeit der Ergebnisse zur potentiellen Assoziation der *HECW2*-DNAm mit dem Rückfallstatus eingeschränkt ist. Für aussagekräftigere Ergebnisse wäre eine Follow-up-Studie mit mehr Patienten zu den späteren Studienzeitpunkten wünschenswert. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Information über einen Rückfall in dieser Studie anhand von Fragebogen ermittelt wurde und sich somit auf das Vertrauen auf wahrheitsgemäße Selbstauskunft stützt, nicht auf laborchemische direkte Zustandsmarker für Alkoholkonsum wie Ethanol, EtG, EtS oder PEth. Zukünftige Studien sollten zudem Informationen über weitere (medikamentöse oder psychosoziale) Therapien bzw. Nachsorgemaßnahmen nach Therapieende erheben.

Aufgrund der Korrelation der *HECW2*-DNAm in Blut mit dem Alter musste für die weiteren Analysen eine Alters-Subgruppe (SG36, siehe Abschnitt 3.4.2) gebildet werden, wodurch sich die Stichprobengröße weiter verringerte. In Folgestudien sollte zur besseren Kontrolle und Berücksichtigung der Altersvariable und dem Einbezug aller vorhandenen Daten die Verwendung eines linearen gemischten Modells oder ähnlicher Modelle in Betracht gezogen werden. Aussagen über *a posteriori* definierte Subgruppen wie die SG36 haben außerdem nach Bender *et al.* (2007) nur explorativen Charakter (Bender *et al.* 2007).

Für eine bessere Vergleichbarkeit von Patienten und Kontrollprobanden sollten die Gruppen außerdem in Bezug auf Alter, Geschlecht und Rauchverhalten besser aufeinander abgestimmt werden. Das Patientenkollektiv bestand zu 64.7 % aus männlichen Teilnehmern, während es bei den Kontrollprobanden nur 33.3 % waren. 76.6 % der Patienten, aber nur 5.1 % der Kontrollprobanden waren Raucher. Schließlich waren 91.2 % der Patienten, jedoch nur 50.6 % der

Kontrollprobanden mind. 36 Jahre alt. Eine gezielte Nachrekrutierung wäre für ein besseres *Matching* erstrebenswert.

Eine weitere Einschränkung der Studie bestand darin, dass der potentielle Einfluss der Medikation auf die DNAm-Level nicht berücksichtigt wurde. Koller *et al.* (2019) zeigten jedoch, dass die Dosis der Entzugsmedikation keinen signifikanten Einfluss auf epigenetische Veränderungen hat (Koller *et al.* 2019). Außerdem darf auch die mögliche Beeinflussung der DNAm durch genetische Varianten nicht außer Acht gelassen werden. Um die genetische Heterogenität zu verringern, wurden nur Teilnehmer europäischer Herkunft rekrutiert. Zukünftige Studien sollten auch Teilnehmer anderer Ethnien einschließen, um generalisierbare Aussagen treffen zu können.

Eine weitere Limitation stellt die fehlende Berücksichtigung der Zellzusammensetzung der Blut- und Speichelproben dar, da diese das DNAm-Level beeinflussen kann (Bauer *et al.* 2015; Jaffe und Irizarry 2014) und die Aufklärung der zugrundeliegenden biologischen Mechanismen somit nur eingeschränkt möglich ist (Campbell *et al.* 2020).

Die Pyrosequenzierungsdaten dieser Studie wurden zudem von zwei verschiedenen Personen erhoben, sodass ein *Batch*-Effekt nicht auszuschließen ist. Durch Verwendung des gleichen Protokolls und Equipments wurde versucht, diesen Effekt möglichst gering zu halten.

Der Fokus der vorliegenden Studie lag auf dem Zeitraum der Studienteilnahme, also den ersten 12 Monaten nach Therapiebeginn. Künftige Untersuchungen unter Einbeziehung der vergangenen Krankheitsgeschichte, also bspw. der Dauer der Abhängigkeit und der Anzahl bisheriger Therapien, könnten weitere interessante Erkenntnisse liefern. Eine Längsschnittstudie mit Verwendung von Daten aus dem Zeitraum vor der Manifestation einer Alkoholabhängigkeit könnte die Frage des kausalen Zusammenhangs zwischen *HECW2*-DNAm und chronischem Alkoholkonsum bzw. Alkoholabhängigkeit adressieren sowie die potentielle Funktion der *HECW2*-DNAm als Biomarker für das Risiko der Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit untersuchen.

Vor dem Hintergrund einer potentiellen Eignung als klinisch praktikabler Biomarker wurde in dieser Studie außerdem leicht zugängliches Material

untersucht. Für die weitere Aufklärung der Beteiligung von *HECW2* am Pathomechanismus der Alkoholabhängigkeit wären Untersuchungen an Hirngewebe von großem Interesse.

4.6 Schlussfolgerung

Die von Brückmann *et al.* (2017) beschriebene Hypomethylierung des im *HECW2*-Genkörper gelegenen CpG-Dinukleotids cg18752527 bei alkoholabhängigen Patienten vor und nach einer ein- bis dreiwöchigen Entzugstherapie konnte in dieser Studie sowohl in Vollblut als auch in Speichel validiert und repliziert werden. Diese Hypomethylierung blieb außerdem 6 Monate und in Vollblut zusätzlich 12 Monate nach Therapiebeginn bestehen, sodass die Veränderung der *HECW2*-DNAm im Rahmen einer Alkoholabhängigkeit wahrscheinlich einem längerfristigen Phänomen entspricht. Geschlecht und Rauchverhalten schienen die *HECW2*-DNAm weder in Blut noch in Speichel zu beeinflussen. Das Alter hingegen erwies sich als Störfaktor der DNAm in Blut. Die differentielle *HECW2*-DNAm der Patienten blieb jedoch auch in einer daraufhin gebildeten Alterssubgruppe, in der sich das Alter zwischen Patienten und Kontrollprobanden nicht länger signifikant unterschied, erhalten. Nichtsdestotrotz stellt die Beeinflussung der *HECW2*-DNAm durch das Alter eine Limitation dieser Studie dar, sodass eine sichere Aussage zum jeweiligen Beitrag des Alters bzw. der Alkoholabhängigkeit zur differentiellen *HECW2*-DNAm alkoholabhängiger Patienten nicht möglich ist. Gleichzeitig bietet dieser Zusammenhang einen bedeutenden Ansatz für zukünftige Forschung.

Große inter- und intraindividuelle Varianzen der DNAm insbesondere im Speichel sowie geringe absolute DNAm-Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollprobanden erschweren den Einsatz der *HECW2*-DNAm als alleinigen Biomarker. Die Ergebnisse dieser Studie deuten dennoch darauf hin, dass die *HECW2*-DNAm im Kontext eines größeren Panels epigenetischer Marker potentiell als Biomarker für die Diagnostik einer Alkoholabhängigkeit geeignet sein könnte. Im Hinblick auf einen potentiellen Einsatz als Biomarker für die Krankheitsschwere oder das Therapieansprechen erwies sich die *HECW2*-DNAm als ungeeignet. Aufgrund der geringen Anzahl rückfälliger sowie nicht-rückfälliger Patienten konnten außerdem keine endgültigen Schlussfolgerungen

für die Eignung als Biomarker für Rückfall gezogen werden. Dennoch lieferten die Ergebnisse dieser Studie erste interessante Trends zu Veränderungen der *HECW2*-DNAm im Rahmen des Rückfallgeschehens wie bspw. eine im Vergleich zu rückfälligen Patienten stärkere Hypomethylierung nicht-rückfälliger Patienten in Speichel zu allen Studienzeitpunkten. Eine Folgestudie an einem größeren Patientenkollektiv wäre wünschenswert, um diese Trends zu überprüfen.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass *HECW2* in die pathophysiologischen Mechanismen einer Alkoholabhängigkeit involviert sein könnte. Rückschlüsse der peripheren DNAm auf Vorgänge im Gehirn sind zwar nicht ohne weiteres möglich, aufgrund der Bedeutung von *HECW2* für die Entwicklung und den Erhalt des zentralen Nervensystems kann jedoch bspw. eine Rolle im Rahmen alkoholassoziierter neurodegenerativer Prozesse vermutet werden. Andererseits könnte die von Brückmann *et al.* (2017) dargelegte Assoziation mit T-Zellen und NK-Zellen sowie die Korrelation mit dem Alter in dieser Studie auch auf eine für die differentielle DNAm ursächliche Veränderung in der Anzahl bestimmter Immunzell-Populationen hindeuten.

Weiterführende Untersuchungen der *HECW2*-DNAm in Hirngewebe sowie die Analyse funktioneller Daten sollten den Zusammenhang zwischen *HECW2* und dem Krankheitsbild der Alkoholabhängigkeit vertiefen.

5 Zusammenfassung

Alkoholabhängigkeit ist eine schwerwiegende Erkrankung, die durch hohe Rückfallraten gekennzeichnet ist und wesentlich zur globalen Krankheitslast beiträgt. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung (DNAm) als Schnittstelle zwischen genetischer Veranlagung und Umweltfaktoren für die Entstehung einer Alkoholabhängigkeit von Bedeutung sind und als Biomarker für dieses Krankheitsbild geeignet sein könnten. Eine epigenomweite Assoziationsstudie von Brückmann *et al.* (2017) identifizierte im Vergleich mit gesunden Kontrollprobanden 59 differentiell methylierte CpG-Dinukleotide in CD3⁺-T-Zellen bei alkoholabhängigen Patienten vor der Behandlung (Brückmann *et al.* 2017). Ziel der vorliegenden Studie war es, einen der wichtigsten Befunde dieser früheren Untersuchung, die Hypomethylierung des im Genkörper von *HECW2* gelegenen CpG-Dinukleotids cg18752527 bei alkoholabhängigen Patienten vor und nach der Therapie in einer unabhängigen und größeren Kohorte sowie in leicht zugänglichem Probenmaterial (peripher-venöses Vollblut und Speichel) zu validieren. Darüber hinaus sollte die Entwicklung der *HECW2*-DNAm nach der Therapie – inklusive eines potentiellen Zusammenhangs mit der Rückfallwahrscheinlichkeit – sowie die potentielle Funktion als epigenetischer Biomarker für Diagnostik, Krankheitsschwere, Therapieansprechen und Rückfall untersucht werden.

Hierzu wurde die *HECW2*-DNAm 68 alkoholabhängiger Patienten und 81 gesunder Kontrollprobanden in Vollblut und Speichel zu vier Zeitpunkten innerhalb eines Jahres (0, 1 bis 3 Wochen, 6 Monate und 12 Monate) mittels Pyrosequenzierung analysiert. Die Patienten durchliefen dabei zu Beginn des Studienzeitraums eine ein- bis dreiwöchige stationäre Entzugsbehandlung. Zusätzlich wurden die psychische Belastung, der Alkoholkonsum sowie das Alkoholverlangen mittels Fragebogen (SCL-90-R, AUDIT und OCDS) erfasst.

Die Ergebnisse der Fragebogenauswertung bildeten die erwarteten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollprobanden ab, korrelierten jedoch weder in Blut noch in Speichel signifikant mit der DNAm der Patienten, sodass sich die *HECW2*-DNAm nicht als Biomarker für die Krankheitsschwere zu eignen scheint. Die Hypomethylierung alkoholabhängiger Patienten sowohl vor als auch nach der

Entzugstherapie konnte in dieser Studie in Blut und Speichel validiert werden. Demnach könnte sich die *HECW2*-DNAm in einem Panel weiterer epigenetischer Marker als Biomarker für diagnostische Zwecke, nicht jedoch für das Therapieansprechen eignen. In Blut und Speichel persistierte die differentielle DNAm der Patienten zudem auch 6 Monate, in Blut zusätzlich 12 Monate nach Therapiebeginn, sodass eine längerfristige Veränderung angenommen werden kann. In Blut erwies sich außerdem das Alter aufgrund seiner Korrelation mit der DNAm der Kontrollprobanden als Störvariable. Die differentielle *HECW2*-DNAm der Patienten bestätigte sich jedoch als ein robuster Befund, der sich auch in einer daraufhin gebildeten Alterssubgruppe zeigte. Hinsichtlich des Komplexes Rückfall verdeutlichte die hohe Rückfallrate von 72.4 % innerhalb eines Jahres den dringenden Verbesserungsbedarf vorhandener Therapien bzw. die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Signifikante Unterschiede der *HECW2*-DNAm rückfälliger und nicht-rückfälliger Patienten konnten weder in Blut noch in Speichel festgestellt werden. Aufgrund einer hohen Abbruchrate unter den Patienten war die statistische Aussagekraft der Daten dieser Patientensubgruppen allerdings eingeschränkt. Eine abschließende Beurteilung der Eignung als Biomarker für Rückfall und die Rückfallwahrscheinlichkeit konnte daher nicht erfolgen. Eine weitere interessante Beobachtung stellten die gewebespezifischen Unterschiede der *HECW2*-DNAm in Bezug auf Spannweite, Standardabweichung und allgemeines Niveau dar. Große inter- und intraindividuelle Varianzen in Speichel sowie geringe absolute DNAm-Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollprobanden v. a. in Blut erschweren den Einsatz als alleinigen Biomarker. Schließlich wurden mögliche zelluläre Funktionen von *HECW2* im Zusammenhang mit den Pathomechanismen einer Alkoholabhängigkeit diskutiert.

Die Ergebnisse dieser Studie ergänzen das wachsende Wissen über epigenetische Veränderungen bei Alkoholabhängigkeit und deuten darauf hin, dass *HECW2* bei dieser Erkrankung eine Rolle spielt und die *HECW2*-DNAm als Biomarker für die Diagnostik geeignet sein könnte. Die Aufklärung der genauen Funktion dieses Gens im Kontext der Alkoholabhängigkeit stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt für zukünftige Studien dar.

6 Literaturverzeichnis

- Acharya A, Kavus H, Dunn P, Nasir A, Folk L, Withrow K, Wentzensen IM, Ruzhnikov MRZ, Fallot C, Smol T, Rama M, Brown K, Whalen S, Ziegler A, Barth M, Chassevent A, Smith-Hicks C, Afenjar A, Courtin T, Heide S, Font-Montgomery E, Heid C, Hamm JA, Love DR, Thabet F, Misra VK, Cunningham M, Leal SM, Jarvela I, Normand EA, Zou F, Helal M, Keren B, Torti E, Chung WK & Schrauwen I (2022): Delineating the genotypic and phenotypic spectrum of HECW2-related neurodevelopmental disorders. *J Med Genet* 59: 669-677.
- Agostini M, Tucci P, Chen H, Knight RA, Bano D, Nicotera P, McKeon F & Melino G (2010): p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 13-17.
- Airagnes G, Lemogne C, Meneton P, Plessz M, Goldberg M, Hoertel N, Roquelaure Y, Limosin F & Zins M (2019): Alcohol, tobacco and cannabis use are associated with job loss at follow-up: Findings from the CONSTANCES cohort [online]. *PLoS One* 14: e0222361. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222361> [Zugriff 07.12.2024].
- Allsop J & Turner B (1966): Cerebellar degeneration associated with chronic alcoholism. *J Neurol Sci* 3: 238-258.
- American Psychiatric Association (2013): Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.): DSM-5® [online]. *American Psychiatric Publishing*. URL: <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>.
- Anacker C, O'Donnell KJ & Meaney MJ (2014): Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Dialogues Clin Neurosci* 16: 321-333.
- Andersen AM, Dogan MV, Beach SRH & Philibert RA (2015): Current and Future Prospects for Epigenetic Biomarkers of Substance Use Disorders. *Genes (Basel)* 6: 991-1022.
- Anderson ML, Nokia MS, Govindaraju KP & Shors TJ (2012): Moderate drinking? Alcohol consumption significantly decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Neuroscience* 224: 202-209.
- Anderson P, Chisholm D & Fuhr DC (2009): Effectiveness and cost-effectiveness of policies and programmes to reduce the harm caused by alcohol. *Lancet* 373: 2234-2246.
- Andresen-Streichert H, Müller A, Glahn A, Skopp G & Sterneck M (2018): Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts. *Dtsch Arztebl Int* 115: 309-315.
- Anton RF, Moak DH & Latham P (1995): The Obsessive Compulsive Drinking Scale: A Self-Rated Instrument for the Quantification of Thoughts about Alcohol and Drinking Behavior. *Alcohol Clin Exp Res* 19: 92-99.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M & Skinner MK (2005): Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science* 308: 1466-1469.
- Aran D, Toperoff G, Rosenberg M & Hellman A (2010): Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Hum Mol Genet* 20: 670-680.
- Atzendorf J, Rauschert C, Seitz N-N, Lochböhler K & Kraus L (2019): The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines. *Dtsch Arztebl Int* 116: 577-584.
- Babor TF, Higgins-Biddle JC, Saunders JB & Monteiro MG (2001): *AUDIT - The Alcohol Use Disorders Identification Test: Guidelines for Use in Primary Care (second edition)*. Geneva: Department of Mental Health and Substance Dependence, World Health Organization.
- Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee J-H, LeProust EM, Park I-H, Xie B, Daley GQ & Church GM (2009): Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol* 27: 361-368.

- Baltieri DA, Daró FR, Ribeiro PL & De Andrade AG (2009): The role of alcoholic beverage preference in the severity of alcohol dependence and adherence to the treatment. *Alcohol* 43: 185-195.
- Banerjee RV & Matthews RG (1990): Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 4: 1450-1459.
- Barak S, Ahmadiantehrani S, Kharazia V & Ron D (2011): Positive autoregulation of GDNF levels in the ventral tegmental area mediates long-lasting inhibition of excessive alcohol consumption [online]. *Transl Psychiatry* 1: e60. URL: <https://doi.org/10.1038/tp.2011.57> [Zugriff 07.12.2024].
- Barak S, Ahmadiantehrani S, Logrip ML & Ron D (2019): GDNF and alcohol use disorder. *Addict Biol* 24: 335-343.
- Barbier E, Tapocik JD, Juergens N, Pitcairn C, Borich A, Schank JR, Sun H, Schuebel K, Zhou Z, Yuan Q, Vendruscolo LF, Goldman D & Heilig M (2015): DNA Methylation in the Medial Prefrontal Cortex Regulates Alcohol-Induced Behavior and Plasticity. *J Neurosci* 35: 6153-6164.
- Batra A, Müller CA, Mann K & Heinz A (2016): Abhängigkeit und schädlicher Gebrauch von Alkohol. *Dtsch Arztebl Int* 113: 301-310.
- Bauer J, Pedersen A, Scherbaum N, Bening J, Patschke J, Kugel H, Heindel W, Arolt V & Ohrmann P (2013): Craving in Alcohol-Dependent Patients After Detoxification Is Related to Glutamatergic Dysfunction in the Nucleus Accumbens and the Anterior Cingulate Cortex. *Neuropsychopharmacology* 38: 1401-1408.
- Bauer M, Linsel G, Fink B, Offenberg K, Hahn AM, Sack U, Knaack H, Eszlinger M & Herberth G (2015): A varying T cell subtype explains apparent tobacco smoking induced single CpG hypomethylation in whole blood [online]. *Clin Epigenetics* 7: 81. URL: <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0113-1> [Zugriff 07.12.2024].
- Bearer EL & Mulligan BS (2018): Epigenetic Changes Associated with Early Life Experiences: Saliva, A Biospecimen for DNA Methylation Signatures. *Curr Genomics* 19: 676-698.
- Belsky DW, Caspi A, Corcoran DL, Sugden K, Poulton R, Arseneault L, Baccarelli A, Chamarti K, Gao X, Hannon E, Harrington HL, Houts R, Kothari M, Kwon D, Mill J, Schwartz J, Vokonas P, Wang C, Williams BS & Moffitt TE (2022): DunedinPACE, a DNA methylation biomarker of the pace of aging [online]. *Elife* 11: e73420. URL: <https://doi.org/10.7554/eLife.73420> [Zugriff 07.12.2024].
- Bender R, Lange S & Ziegler A (2007): Multiples Testen - Artikel Nr. 12 der Statistik-Serie in der DMW [online]. *Dtsch Med Wochenschr* 132: e26-e29. URL: <http://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-959035> [Zugriff 07.12.2024].
- Berkel TD & Pandey SC (2017): Emerging Role of Epigenetic Mechanisms in Alcohol Addiction. *Alcohol Clin Exp Res* 41: 666-680.
- Berko ER, Cho MT, Eng C, Shao Y, Sweetser DA, Waxler J, Robin NH, Brewer F, Donkervoort S, Mohassel P, Bönnemann CG, Bialer M, Moore C, Wolfe LA, Tiffit CJ, Shen Y, Retterer K, Millan F & Chung WK (2017): De novo missense variants in HECW2 are associated with neurodevelopmental delay and hypotonia. *J Med Genet* 54: 84-86.
- Bestor T, Laudano A, Mattaliano R & Ingram V (1988): Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells: The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203: 971-983.
- Biermann T, Reulbach U, Lenz B, Frieling H, Muschler M, Hillemacher T, Kornhuber J & Bleich S (2009): N-methyl-d-aspartate 2b receptor subtype (NR2B) promoter methylation in patients during alcohol withdrawal. *J Neural Transm* 116: 615-622.

- Bierut LJ, Goate AM, Breslau N, Johnson EO, Bertelsen S, Fox L, Agrawal A, Bucholz KK, Grucza R, Hesselbrock V, Kramer J, Kuperman S, Nurnberger J, Porjesz B, Saccone NL, Schuckit M, Tischfield J, Wang JC, Foroud T, Rice JP & Edenberg HJ (2012): ADH1B is associated with alcohol dependence and alcohol consumption in populations of European and African ancestry. *Mol Psychiatry* 17: 445-450.
- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ & Macleod D (1985): A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40: 91-99.
- Bird AP (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213.
- Blasco C, Caballería J, Deulofeu R, Lligoña A, Parés A, Lluís JM, Gual A & Rodés J (2005): Prevalence and Mechanisms of Hyperhomocysteinemia in Chronic Alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 1044-1048.
- Bleich S, Carl M, Bayerlein K, Reulbach U, Biermann T, Hillemacher T, Bönsch D & Kornhuber J (2005): Evidence of Increased Homocysteine Levels in Alcoholism: The Franconian Alcoholism Research Studies (FARS). *Alcohol Clin Exp Res* 29: 334-336.
- Bleich S, Lenz B, Ziegenbein M, Beutler S, Frieling H, Kornhuber J & Bönsch D (2006): Epigenetic DNA Hypermethylation of the HEP Gene Promoter Induces Down-regulation of Its mRNA Expression in Patients With Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 30: 587-591.
- Bock C (2012): Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet* 13: 705-719.
- Bock C, Halbritter F, Carmona FJ, Tierling S, Datlinger P, Assenov Y, Berdasco M, Bergmann AK, Booher K, Busato F, Campan M, Dahl C, Dahmcke CM, Diep D, Fernández AF, Gerhauser C, Haake A, Heilmann K, Holcomb T, Hussmann D, Ito M, Kläver R, Kreutz M, Kulis M, Lopez V, Nair SS, Paul DS, Plongthongkum N, Qu W, Queirós AC, Reinicke F, Sauter G, Schlomm T, Statham A, Stirzaker C, Strogantsev R, Urdinguio RG, Walter K, Weichenhan D, Weisenberger DJ, Beck S, Clark SJ, Esteller M, Ferguson-Smith AC, Fraga MF, Guldborg P, Hansen LL, Laird PW, Martín-Subero JI, Nygren AOH, Peist R, Plass C, Shames DS, Siebert R, Sun X, Tost J, Walter J, Zhang K & The Bc (2016): Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications. *Nat Biotechnol* 34: 726-737.
- Boden JM & Fergusson DM (2011): Alcohol and depression. *Addiction* 106: 906-914.
- Bohnsack JP & Pandey SC (2021): Histone modifications, DNA methylation, and the epigenetic code of alcohol use disorder. *Int Rev Neurobiol* 156: 1-62.
- Bollati V & Baccarelli A (2010): Environmental epigenetics. *Heredity (Edinb)* 105: 105-112.
- Bonasio R, Tu S & Reinberg D (2010): Molecular Signals of Epigenetic States. *Science* 330: 612-616.
- Bönsch D, Hothorn T, Krieglstein C, Koch M, Nehmer C, Lenz B, Reulbach U, Kornhuber J & Bleich S (2007): Daily Variations of Homocysteine Concentration May Influence Methylation of DNA in Normal Healthy Individuals. *Chronobiol Int* 24: 315-326.
- Bönsch D, Lenz B, Fiszer R, Frieling H, Kornhuber J & Bleich S (2006): Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm* 113: 1299-1304.
- Bönsch D, Lenz B, Reulbach U, Kornhuber J & Bleich S (2004): Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm* 111: 1611-1616.

- Bottlender M & Soyka M (2005): Efficacy of an intensive outpatient rehabilitation program in alcoholism: predictors of outcome 6 months after treatment. *Eur Addict Res* 11: 132-137.
- Braun PR, Han S, Hing B, Nagahama Y, Gaul LN, Heinzman JT, Grossbach AJ, Close L, Dlouhy BJ, Howard MA, Kawasaki H, Potash JB & Shinozaki G (2019): Genome-wide DNA methylation comparison between live human brain and peripheral tissues within individuals [online]. *Transl Psychiatry* 9: 47. URL: <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0376-y> [Zugriff 16.10.2024].
- Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B & Brenner H (2011): Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet* 88: 450-457.
- Brückmann C, Di Santo A, Karle KN, Batra A & Nieratschker V (2016): Validation of differential GDAP1 DNA methylation in alcohol dependence and its potential function as a biomarker for disease severity and therapy outcome. *Epigenetics* 11: 456-463.
- Brückmann C, Islam SA, MacIsaac JL, Morin AM, Karle KN, Di Santo A, Wust R, Lang I, Batra A, Kobor MS & Nieratschker V (2017): DNA methylation signatures of chronic alcohol dependence in purified CD3(+) T-cells of patients undergoing alcohol treatment [online]. *Sci Rep* 7: 6605. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06847-z> [Zugriff 07.12.2024].
- Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG) (2022): ICD-10-GM Version 2023, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision. Stand: 21.09.2022 [online]. URL: www.bfarm.de – Kodiersysteme – Services – Downloads – ICD-10-GM – Version 2023.
- Burling TA & Ziff DC (1988): Tobacco smoking: A comparison between alcohol and drug abuse inpatients. *Addict Behav* 13: 185-190.
- Califf RM (2018): Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)* 243: 213-221.
- Campagna MP, Xavier A, Lechner-Scott J, Maltby V, Scott RJ, Butzkueven H, Jokubaitis VG & Lea RA (2021): Epigenome-wide association studies: current knowledge, strategies and recommendations [online]. *Clin Epigenetics* 13: 214. URL: <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01200-8> [Zugriff 07.12.2024].
- Campbell CA, Hahn RA, Elder R, Brewer R, Chattopadhyay S, Fielding J, Naimi TS, Toomey T, Lawrence B & Middleton JC (2009): The Effectiveness of Limiting Alcohol Outlet Density As a Means of Reducing Excessive Alcohol Consumption and Alcohol-Related Harms. *Am J Prev Med* 37: 556-569.
- Campbell KA, Colacino JA, Park SK & Bakulski KM (2020): Cell Types in Environmental Epigenetic Studies: Biological and Epidemiological Frameworks. *Curr Environ Health Rep* 7: 185-197.
- Carnicella S, Kharazia V, Jeanblanc J, Janak PH & Ron D (2008): GDNF is a fast-acting potent inhibitor of alcohol consumption and relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8114-8119.
- Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EEW, Ravasco P, Camilo ME, Blom HJ, Jakobs C & Tavares de Almeida I (2003): Increased Homocysteine and S-Adenosylhomocysteine Concentrations and DNA Hypomethylation in Vascular Disease. *Clin Chem* 49: 1292-1296.
- Cedar H & Bergman Y (2009): Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10: 295-304.

- Chen Y, Gao W, Luo J, Tian R, Sun H & Zou S (2011): Methyl-CpG binding protein MBD2 is implicated in methylation-mediated suppression of miR-373 in hilar cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* 25: 443-451.
- Cheong J, Yamada Y, Yamashita R, Irie T, Kanai A, Wakaguri H, Nakai K, Ito T, Saito I, Sugano S & Suzuki Y (2006): Diverse DNA Methylation Statuses at Alternative Promoters of Human Genes in Various Tissues. *DNA Res* 13: 155-167.
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K & McCann PP (1996): S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 10: 471-480.
- Choi K-S, Choi H-J, Lee J-K, Im S, Zhang H, Jeong Y, Park JA, Lee I-K, Kim Y-M & Kwon Y-G (2016): The endothelial E3 ligase HECW2 promotes endothelial cell junctions by increasing AMOTL1 protein stability via K63-linked ubiquitination. *Cell Signal* 28: 1642-1651.
- Choi KD & Choi JH (2016): Episodic Ataxias: Clinical and Genetic Features. *J Mov Disord* 9: 129-135.
- Chung DT, Ryan CJ, Hadzi-Pavlovic D, Singh SP, Stanton C & Large MM (2017): Suicide Rates After Discharge From Psychiatric Facilities: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* 74: 694-702.
- Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL & Frommer M (2006): DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc* 1: 2353-2364.
- Cohen J (1992): A power primer. *Psychol Bull* 112: 155-159.
- Coit P, Ognenovski M, Gensterblum E, Maksimowicz-McKinnon K, Wren JD & Sawalha AH (2015): Ethnicity-specific epigenetic variation in naïve CD4+ T cells and the susceptibility to autoimmunity [online]. *Epigenetics Chromatin* 8: 49. URL: <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0037-1> [Zugriff 07.12.2024].
- Connors GJ, Maisto SA & Donovan DM (1996): Conceptualizations of relapse: a summary of psychological and psychobiological models. *Addiction* 91: 5-14.
- Crews FT & Nixon K (2008): Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol Alcohol* 44: 115-127.
- Daeppen J-B, Smith TL, Danko GP, Gordon L, Landi NA, Nurnberger JI, Jr, Bucholz KK, Raimo E, Schuckit MA & the Collaborative Study Group On The Genetics Of Alcoholism (2000): Clinical Correlates Of Cigarette Smoking And Nicotine Dependence In Alcohol-Dependent Men And Women. *Alcohol Alcohol* 35: 171-175.
- Dahlet T, Argüeso Lleida A, Al Adhami H, Dumas M, Bender A, Ngondo RP, Tanguy M, Vallet J, Auclair G, Bardet AF & Weber M (2020): Genome-wide analysis in the mouse embryo reveals the importance of DNA methylation for transcription integrity [online]. *Nat Commun* 11: 3153. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16919-w> [Zugriff 07.12.2024].
- Daigre C, Rodríguez L, Roncero C, Palma-Álvarez RF, Perea-Ortueta M, Sorribes-Puertas M, Martínez-Luna N, Ros-Cucurull E, Ramos-Quiroga JA & Grau-López L (2021): Treatment retention and abstinence of patients with substance use disorders according to addiction severity and psychiatry comorbidity: A six-month follow-up study in an outpatient unit. *Addict Behav* 117: 106832.
- Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C, Al-Sarraj S, Dobson R, Schalkwyk LC & Mill J (2012): Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood [online]. *Genome Biol* 13: R43. URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r43> [Zugriff 07.12.2024].
- Derogatis LR (1977): *SCL-90-R, administration, scoring & procedures manual-I for the R(evised) version*. Baltimore: John Hopkins University School of Medicine, Clinical Psychometrics Unit.

- Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) & Deutsche Gesellschaft für Suchtforschung und Suchttherapie e.V. (DG-SUCHT) (2020): S3-Leitlinie Screening, Diagnose und Behandlung alkoholbezogener Störungen [online]. URL: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/076-001.html> [Zugriff 06.12.2023].
- Devinsky O, Morrell MJ & Vogt BA (1995): Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 118: 279-306.
- Diehl A & Mann K (2004): Qualifizierte Entzugsbehandlung bei Alkoholabhängigkeit. *psychoneuro* 30: 37-41.
- Dinneen LC & Blakesley BC (1973): Algorithm AS 62: A Generator for the Sampling Distribution of the Mann-Whitney U Statistic. *J R Stat Soc Ser C Appl Stat* 22: 269-273.
- Doerfler W (1983): DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 52: 93-124.
- Driessen M, Veltrup C, Junghanns K, Przywara A & Dilling H (1999): Kosten-Nutzen-Analyse klinisch-evaluierter Behandlungsprogramme Erweiterte Entzugstherapie bei Alkoholabhängigkeit. *Nervenarzt* 70: 463-470.
- Durazzo TC & Meyerhoff DJ (2017): Psychiatric, Demographic, and Brain Morphological Predictors of Relapse After Treatment for an Alcohol Use Disorder. *Alcohol Clin Exp Res* 41: 107-116.
- Edenberg HJ, Dick DM, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer LO, Crowe RR, Goate A, Hesselbrock V & Jones K (2004): Variations in GABRA2, encoding the $\alpha 2$ subunit of the GABAA receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. *Am J Hum Genet* 74: 705-714.
- Edenberg HJ & Foroud T (2013): Genetics and alcoholism. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 487-494.
- Edenberg HJ & McClintick JN (2018): Alcohol Dehydrogenases, Aldehyde Dehydrogenases, and Alcohol Use Disorders: A Critical Review. *Alcohol Clin Exp Res* 42: 2281-2297.
- Edgar RD, Jones MJ, Meaney MJ, Turecki G & Kobor MS (2017a): BECon: a tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain [online]. *Transl Psychiatry* 7: e1187. URL: <https://doi.org/10.1038/tp.2017.171> [Zugriff 16.10.2024].
- Edgar RD, Jones MJ, Meaney MJ, Turecki G & Kobor MS (2017b): BECon: A tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain [online]. URL: <https://redgar598.shinyapps.io/BECon/> [Zugriff 16.10.2024].
- Effertz T (2020): Die volkswirtschaftlichen Kosten von Alkohol- und Tabakkonsum in Deutschland. In: Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (Hrsg.): DHS Jahrbuch Sucht 2020. Lengerich: Pabst Science Publishers, 225-234.
- Egervari G, Siciliano CA, Whiteley EL & Ron D (2021): Alcohol and the brain: from genes to circuits. *Trends Neurosci* 44: 1004-1015.
- Engel K, Schaefer M, Stickel A, Binder H, Heinz A & Richter C (2015): The Role of Psychological Distress in Relapse Prevention of Alcohol Addiction. Can High Scores on the SCL-90-R Predict Alcohol Relapse? *Alcohol Alcohol* 51: 27-31.
- Enoch MA (2011): The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 214: 17-31.
- Estey EH (2013): Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 27: 1803-1812.
- Falkai P & Wittchen H-U (Hrsg.) (2015): *Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen DSM-5®*, Göttingen, Bern, Wien [u.a.]: Hogrefe.
- Fang L, Lee SW & Aaronson SA (1999): Comparative Analysis of P73 and P53 Regulation and Effector Functions. *J Cell Biol* 147: 823-830.

- Fitz-James MH & Cavalli G (2022): Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Nat Rev Genet* 23: 325-341.
- Fleury MJ, Djouini A, Huynh C, Tremblay J, Ferland F, Ménard JM & Belleville G (2016): Remission from substance use disorders: A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend* 168: 293-306.
- Flórez G, Saiz PA, García-Portilla P, De Cos FJ, Dapía S, Álvarez S, Nogueiras L & Bobes J (2015): Predictors of Posttreatment Drinking Outcomes in Patients with Alcohol Dependence. *Eur Addict Res* 21: 19-30.
- Franke GH (1995): *SCL-90-R. Die Symptom-Checkliste von Derogatis - Deutsche Version - Manual*. Göttingen: Beltz.
- Franke GH (2002): *SCL-90-R. Symptom-Checkliste von L. R. Derogatis - Deutsche Version - Manual. 2., vollst. überarbeitete Auflage*. Göttingen: Beltz.
- Fransquet PD & Ryan J (2018): Micro RNA as a potential blood-based epigenetic biomarker for Alzheimer's disease. *Clin Biochem* 58: 5-14.
- Friedel E, Walter H, Veer IM, Zimmermann US, Heinz A, Frieling H & Zindler T (2020): Impact of Long-Term Alcohol Consumption and Relapse on Genome-Wide DNA Methylation Changes in Alcohol-Dependent Subjects: A Longitudinal Study. *Alcohol Clin Exp Res* 44: 1356-1365.
- Fujitani M, Cancino GI, Dugani CB, Weaver ICG, Gauthier-Fisher A, Paquin A, Mak TW, Wojtowicz MJ, Miller FD & Kaplan DR (2010): TAp73 Acts via the bHLH Hey2 to Promote Long-Term Maintenance of Neural Precursors. *Curr Biol* 20: 2058-2065.
- Gallagher C, Radmall Z, O'Gara C & Burke T (2018): Anxiety and depression among patients with alcohol dependence: co-morbid or substance-related problems? *Ir J Psychol Med* 35: 121-126.
- Gama-Sosa MA, Midgett RM, Slagel VA, Githens S, Kuo KC, Gehrke CW & Ehrlich M (1983): Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *Biochim Biophys Acta* 740: 212-219.
- Garbusow M, Sebold M, Beck A & Heinz A (2014): Too Difficult to Stop: Mechanisms Facilitating Relapse in Alcohol Dependence. *Neuropsychobiology* 70: 103-110.
- Gardiner-Garden M & Frommer M (1987): CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261-282.
- Gatta E, Grayson DR, Auta J, Saudagar V, Dong E, Chen Y, Krishnan HR, Drnevich J, Pandey SC & Guidotti A (2021): Genome-wide methylation in alcohol use disorder subjects: implications for an epigenetic regulation of the cortico-limbic glucocorticoid receptors (NR3C1). *Mol Psychiatry* 26: 1029-1041.
- Gjestad R, Franck J, Lindberg S & Haver B (2011): Early Treatment for Women with Alcohol Addiction (EWA) Reduces Mortality: A Randomized Controlled Trial with Long-Term Register Follow-up. *Alcohol Alcohol* 46: 170-176.
- Glahn A, Riera Knorrenschild R, Rhein M, Haschemi Nassab M, Gröschl M, Heberlein A, Muschler M, Frieling H, Bleich S & Hillemacher T (2014): Alcohol-induced changes in methylation status of individual CpG sites, and serum levels of vasopressin and atrial natriuretic peptide in alcohol-dependent patients during detoxification treatment. *Eur Addict Res* 20: 143-150.
- Goll MG & Bestor TH (2005): Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74: 481-514.
- Gong J, Costanzo A, Yang H-Q, Melino G, Kaelin WG, Levrero M & Wang JYJ (1999): The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 399: 806-809.
- Gonzalez-Cano L, Herreros-Villanueva M, Fernandez-Alonso R, Ayuso-Sacido A, Meyer G, Garcia-Verdugo JM, Silva A, Marques MM & Marin MC (2010): p73 deficiency results in impaired self renewal and premature neuronal differentiation of mouse neural progenitors independently of p53 [online]. *Cell*

- Death Dis* 1: e109. URL: <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.87> [Zugriff 07.12.2024].
- Gore SD, Jones C & Kirkpatrick P (2006): Decitabine. *Nat Rev Drug Discov* 5: 891-892.
- Greenberg MVC & Bourc'h D (2019): The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 590-607.
- Griswold MG, Fullman N, Hawley C, Arian N, Zimsen SRM, Tymeson HD, Venkateswaran V, Tapp AD, Forouzanfar MH, Salama JS, Abate KH, Abate D, Abay SM, Abbafati C, Abdulkader RS, Abebe Z, Aboyans V, Abrar MM, Acharya P, Adetokunboh OO, Adhikari TB, Adsuar JC, Afarideh M, Agardh EE, Agarwal G, Aghayan SA, Agrawal S, Ahmed MB, Akibu M, Akinyemiju T, Akseer N, Asfoor DHA, Al-Aly Z, Alahdab F, Alam K, Albujeer A, Alene KA, Ali R, Ali SD, Alijanzadeh M, Aljunid SM, Alkerwi Aa, Allebeck P, Alvis-Guzman N, Amare AT, Aminde LN, Ammar W, Amoako YA, Amul GGH, Andrei CL, Angus C, Ansha MG, Antonio CAT, Aremu O, Ärnlov J, Artaman A, Aryal KK, Assadi R, Ausloos M, Avila-Burgos L, Avokpaho EF, Awasthi A, Ayele HT, Ayer R, Ayuk TB, Azzopardi PS, Badali H, Badawi A, Banach M, Barker-Collo SL, Barrero LH, Basaleem H, Baye E, Bazargan-Hejazi S, Bedi N, Béjot Y, Belachew AB, Belay SA, Bennett DA, Bensenor IM, Bernabe E, Bernstein RS, Beyene AS, Beyranvand T, Bhaumik S, Bhutta ZA, Biadgo B, Bijani A, Bililign N, Birlik SM, Birungi C, Bizuneh H, Bjerregaard P, Bjørge T, Borges G, Bosetti C, Boufous S, Bragazzi NL, Brenner H, Butt ZA, et al. (2018): Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 392: 1015-1035.
- Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H & Razin A (1981): Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett* 124: 67-71.
- Guo T, Luo F & Lin Q (2020): You are affected by what your parents eat: Diet, epigenetics, transgeneration and intergeneration. *Trends Food Sci Technol* 100: 248-261.
- Hagerty SL, Bidwell LC, Harlaar N & Hutchison KE (2016): An Exploratory Association Study of Alcohol Use Disorder and DNA Methylation. *Alcohol Clin Exp Res* 40: 1633-1640.
- Halvardson J, Zhao JJ, Zaghlool A, Wentzel C, Georgii-Hemming P, Månsson E, Ederth Sävmarker H, Brandberg G, Soussi Zander C, Thuresson AC & Feuk L (2016): Mutations in HECW2 are associated with intellectual disability and epilepsy. *J Med Genet* 53: 697-704.
- Hamm CA & Costa FF (2015): Epigenomes as therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 151: 72-86.
- Hannon E, Lunnon K, Schalkwyk L & Mill J (2015a): Blood Brain DNA Methylation Comparison Tool [online]. URL: <https://epigenetics.essex.ac.uk/bloodbrain/> [Zugriff 12.06.2024].
- Hannon E, Lunnon K, Schalkwyk L & Mill J (2015b): Interindividual methylomic variation across blood, cortex, and cerebellum: implications for epigenetic studies of neurological and neuropsychiatric phenotypes. *Epigenetics* 10: 1024-1032.
- Hannuksela ML, Liisanantti MK, Nissinen AE & Savolainen MJ (2007): Biochemical markers of alcoholism. *Clin Chem Lab Med* 45: 953-961.
- Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, Klotzle B, Bibikova M, Fan J-B, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T & Zhang K (2013): Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell* 49: 359-367.
- Hargreaves GA, Quinn H, Kashem MA, Matsumoto I & McGregor IS (2009): Proteomic Analysis Demonstrates Adolescent Vulnerability to Lasting Hippocampal

- Changes Following Chronic Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 86-94.
- Harlaar N & Hutchison KE (2013): Alcohol and the methylome: Design and analysis considerations for research using human samples. *Drug Alcohol Depend* 133: 305-316.
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C & Xu GL (2011): Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333: 1303-1307.
- Heanue TA & Pachnis V (2007): Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 8: 466-479.
- Heberlein A, Büscher P, Schuster R, Kleimann A, Lichtinghagen R, Rhein M, Kornhuber J, Bleich S, Frieling H & Hillemacher T (2015): Do changes in the BDNF promoter methylation indicate the risk of alcohol relapse? *Eur Neuropsychopharmacol* 25: 1892-1897.
- Heberlein A, Muschler M, Frieling H, Behr M, Eberlein C, Wilhelm J, Gröschl M, Kornhuber J, Bleich S & Hillemacher T (2013): Epigenetic down regulation of nerve growth factor during alcohol withdrawal. *Addict Biol* 18: 508-510.
- Heide E-C, Puk O, Biskup S, Krahn A, Rauf E, Kreilkamp BAK, Paulus W & Focke NK (2021): A novel likely pathogenic heterozygous missense variant in a family with variable expressivity of neurodevelopmental delay, hypotonia, and epileptiform EEG patterns. *Am J Med Genet A* 185: 3838-3843.
- Heijmans BT & Mill J (2012): Commentary: The seven plagues of epigenetic epidemiology. *Int J Epidemiol* 41: 74-78.
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE & Lumey LH (2008): Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17046-17049.
- Hendershot CS, Witkiewitz K, George WH & Marlatt GA (2011): Relapse prevention for addictive behaviors [online]. *Subst Abuse Treat Prev Policy* 6: 17. URL: <https://doi.org/10.1186/1747-597X-6-17> [Zugriff 07.12.2024].
- Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ & Garcia-Verdugo JM (2003): Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7919-7924.
- Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J & Esteller M (2012): Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10522-10527.
- Hillemacher T, Frieling H, Luber K, Yazici A, Muschler MAN, Lenz B, Wilhelm J, Kornhuber J & Bleich S (2009): Epigenetic regulation and gene expression of vasopressin and atrial natriuretic peptide in alcohol withdrawal. *Psychoneuroendocrinology* 34: 555-560.
- Hillemacher T, Weinland C, Lenz B, Kraus T, Heberlein A, Glahn A, Muschler MAN, Bleich S, Kornhuber J & Frieling H (2015): DNA methylation of the LEP gene is associated with craving during alcohol withdrawal. *Psychoneuroendocrinology* 51: 371-377.
- Holliday R & Grigg GW (1993): DNA methylation and mutation. *Mutat Res* 285: 61-67.
- Horvath S (2013): DNA methylation age of human tissues and cell types [online]. *Genome Biol* 14: R115. URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115> [Zugriff 07.12.2024].

- Horvath S & Raj K (2018): DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* 19: 371-384.
- Hou L, Zhang X, Wang D & Baccarelli A (2011): Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol* 41: 79-105.
- Huang NJ, Zhang L, Tang W, Chen C, Yang CS & Kornbluth S (2012): The Trim39 ubiquitin ligase inhibits APC/CCdh1-mediated degradation of the Bax activator MOAP-1. *J Cell Biol* 197: 361-367.
- Hunt WA, Barnett LW & Branch LG (1971): Relapse rates in addiction programs. *J Clin Psychol* 27: 455-456.
- Hunter DJ (2005): Gene–environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6: 287-298.
- Hunter R (2012): Epigenetic effects of stress and corticosteroids in the brain [online]. *Front Cell Neurosci* 6: 18. URL: <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00018> [Zugriff 07.12.2024].
- Hurley TD & Edenberg HJ (2012): Genes encoding enzymes involved in ethanol metabolism. *Alcohol Res* 34: 339-344.
- Hwang J-Y, Lee HJ, Go MJ, Jang HB, Choi N-H, Bae JB, Castillo-Fernandez JE, Bell JT, Spector TD, Lee H-J & Kim B-J (2018): Genome-wide methylation analysis identifies ELOVL5 as an epigenetic biomarker for the risk of type 2 diabetes mellitus [online]. *Sci Rep* 8: 14862. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33238-9> [Zugriff 07.12.2024].
- Ibrahim J, Peeters M, Van Camp G & Op de Beeck K (2023): Methylation biomarkers for early cancer detection and diagnosis: Current and future perspectives. *Eur J Cancer* 178: 91-113.
- Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, Vacca M, D'Esposito M, D'Urso M, Galletti P & Zappia V (2003): Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet* 361: 1693-1699.
- Issa J-PJ, Kantarjian HM & Kirkpatrick P (2005): Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov* 4: 275-276.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C & Zhang Y (2011): Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333: 1300-1303.
- Jaenisch R & Bird A (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33: 245-254.
- Jaffe AE & Irizarry RA (2014): Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies [online]. *Genome Biol* 15: R31. URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r31> [Zugriff 07.12.2024].
- Jain NP, Shao K, Stewart C & Grant-Kels JM (2021): The effects of alcohol and illicit drug use on the skin. *Clin Dermatol* 39: 772-783.
- Jiang R, Jones MJ, Chen E, Neumann SM, Fraser HB, Miller GE & Kobor MS (2015): Discordance of DNA Methylation Variance Between two Accessible Human Tissues [online]. *Sci Rep* 5: 8257. URL: <https://doi.org/10.1038/srep08257> [Zugriff 07.12.2024].
- John U & Hanke M (2018): Trends des Tabak- und Alkoholkonsums über 65 Jahre in Deutschland. *Gesundheitswesen* 80: 160-171.
- John U, Hanke M, Freyer-Adam J, Baumann S & Meyer C (2022): Alkohol. In: Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (Hrsg.): DHS Jahrbuch Sucht 2022. Lengerich: Pabst Science Publishers, 33-51.
- Jones PA (2012): Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13: 484-492.
- Jones PA & Baylin SB (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428.

- Jones PL, Veenstra GJC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J & Wolffe AP (1998): Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19: 187-191.
- Jost CA, Marin MC & Jr WGK (1997): p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389: 191-194.
- Jung M & Pfeifer GP (2015): Aging and DNA methylation [online]. *BMC Biol* 13: 7. URL: <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0118-4> [Zugriff 07.12.2024].
- Kaikkonen MU, Lam MT & Glass CK (2011): Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res* 90: 430-440.
- Kawai K & Takahashi M (2020): Intracellular RET signaling pathways activated by GDNF. *Cell Tissue Res* 382: 113-123.
- Kenyon SH, Nicolaou A & Gibbons WA (1998): The Effect of Ethanol and Its Metabolites Upon Methionine Synthase Activity In Vitro. *Alcohol* 15: 305-309.
- Kiefer F, Koopmann A, Godemann F, Wolff J, Batra A & Mann K (2016): Personalbedarfsermittlung für eine leitliniengerechte stationäre Qualifizierte Entzugsbehandlung bei Alkoholabhängigkeit. *Nervenarzt* 87: 295-301.
- Killick R, Niklison-Chirou M, Tomasini R, Bano D, Rufini A, Grespi F, Velletri T, Tucci P, Sayan BS, Conforti F, Gallagher E, Nicotera P, Mak TW, Melino G, Knight RA & Agostini M (2011): p73: A Multifunctional Protein in Neurobiology. *Mol Neurobiol* 43: 139-146.
- Kim M, Long TI, Arakawa K, Wang R, Yu MC & Laird PW (2010): DNA Methylation as a Biomarker for Cardiovascular Disease Risk [online]. *PLoS One* 5: e9692. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009692> [Zugriff 07.12.2024].
- Kinreich S, McCutcheon VV, Aliev F, Meyers JL, Kamarajan C, Pandey AK, Chorlian DB, Zhang J, Kuang W, Pandey G, Viteri SS-Sd, Francis MW, Chan G, Bourdon JL, Dick DM, Anokhin AP, Bauer L, Hesselbrock V, Schuckit MA, Nurnberger Jr, Foroud TM, Salvatore JE, Bucholz KK & Porjesz B (2021): Predicting alcohol use disorder remission: a longitudinal multimodal multi-featured machine learning approach [online]. *Transl Psychiatry* 11: 166. URL: <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01281-2> [Zugriff 07.12.2024].
- Klein A, Maldonado C, Vargas LM, Gonzalez M, Robledo F, Perez de Arce K, Muñoz FJ, Hetz C, Alvarez AR & Zanlungo S (2011): Oxidative stress activates the c-Abl/p73 proapoptotic pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Neurobiol Dis* 41: 209-218.
- Koller G, Zill P, Soyka M, Adorjan K, Weiss C, Kern A, Nguyen-Thien M-L, Kamp F, Proebstl L, Krause D, Ruhdorfer S, Bergmann W & Preuss UW (2019): Short-term changes in global methylation and hydroxymethylation during alcohol detoxification. *Eur Neuropsychopharmacol* 29: 897-903.
- Koob GF (2003): Alcoholism: Allostasis and Beyond. *Alcohol Clin Exp Res* 27: 232-243.
- Koob GF & Volkow ND (2016): Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3: 760-773.
- Kouzarides T (2007): Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128: 693-705.
- Krami AM, Bouzidi A, Charif M, Amalou G, Charoute H, Rouba H, Roky R, Lenaers G, Barakat A & Nahili H (2022): A homozygous nonsense HECW2 variant is associated with neurodevelopmental delay and intellectual disability. *Eur J Med Genet* 65: 104515.
- Krishnamoorthy V, Khanna R & Parnaik VK (2018a): E3 ubiquitin ligase HECW2 mediates the proteasomal degradation of HP1 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 503: 2478-2484.
- Krishnamoorthy V, Khanna R & Parnaik VK (2018b): E3 ubiquitin ligase HECW2 targets PCNA and lamin B1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865: 1088-1104.

- Ladd-Acosta C, Shu C, Lee BK, Gidaya N, Singer A, Schieve LA, Schendel DE, Jones N, Daniels JL, Windham GC, Newschaffer CJ, Croen LA, Feinberg AP & Daniele Fallin M (2016): Presence of an epigenetic signature of prenatal cigarette smoke exposure in childhood. *Environ Res* 144: 139-148.
- Lam LL, Emberly E, Fraser HB, Neumann SM, Chen E, Miller GE & Kobor MS (2012): Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 Suppl 2: 17253-17260.
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R & Prydz H (1992): CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13: 1095-1107.
- Lee SS, Fu NY, Sukumaran SK, Wan KF, Wan Q & Yu VC (2009): TRIM39 is a MOAP-1-binding protein that stabilizes MOAP-1 through inhibition of its poly-ubiquitination process. *Exp Cell Res* 315: 1313-1325.
- Lev Maor G, Yearim A & Ast G (2015): The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet* 31: 274-280.
- Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, Hou L, Baccarelli AA, Stewart JD, Li Y, Whitsel EA, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Lohman K, Liu Y, Ferrucci L & Horvath S (2018): An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)* 10: 573-591.
- Li D, Zhao H & Gelernter J (2012): Strong protective effect of the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) 504lys (*2) allele against alcoholism and alcohol-induced medical diseases in Asians. *Hum Genet* 131: 725-737.
- Li F, Wang L, Wang Y, Shen H, Kou Q, Shen C, Xu X, Zhang Y & Zhang J (2023): HECW2 promotes the progression and chemoresistance of colorectal cancer via AKT/mTOR signaling activation by mediating the ubiquitin-proteasome degradation of lamin B1. *J Cancer* 14: 2820-2832.
- Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Amann M, Anderson HR, Andrews KG, Aryee M, Atkinson C, Bacchus LJ, Bahalim AN, Balakrishnan K, Balmes J, Barker-Collo S, Baxter A, Bell ML, Blore JD, Blyth F, Bonner C, Borges G, Bourne R, Boussinesq M, Brauer M, Brooks P, Bruce NG, Brunekreef B, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Bull F, Burnett RT, Byers TE, Calabria B, Carapetis J, Carnahan E, Chafe Z, Charlson F, Chen H, Chen JS, Cheng AT, Child JC, Cohen A, Colson KE, Cowie BC, Darby S, Darling S, Davis A, Degenhardt L, Dentener F, Des Jarlais DC, Devries K, Dherani M, Ding EL, Dorsey ER, Driscoll T, Edmond K, Ali SE, Engell RE, Erwin PJ, Fahimi S, Falder G, Farzadfar F, Ferrari A, Finucane MM, Flaxman S, Fowkes FG, Freedman G, Freeman MK, Gakidou E, Ghosh S, Giovannucci E, Gmel G, Graham K, Grainger R, Grant B, Gunnell D, Gutierrez HR, Hall W, Hoek HW, Hogan A, Hosgood HD, 3rd, Hoy D, Hu H, Hubbell BJ, Hutchings SJ, Ibeanusi SE, Jacklyn GL, Jasrasaria R, Jonas JB, Kan H, Kanis JA, Kassebaum N, Kawakami N, Khang YH, Khatibzadeh S, Khoo JP, Kok C, Laden F, et al. (2012): A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2224-2260.
- Ling C & Rönn T (2019): Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* 29: 1028-1044.
- Liu C, Marioni RE, Hedman ÅK, Pfeiffer L, Tsai PC, Reynolds LM, Just AC, Duan Q, Boer CG, Tanaka T, Elks CE, Aslibekyan S, Brody JA, Kühnel B, Herder C, Almlí LM, Zhi D, Wang Y, Huan T, Yao C, Mendelson MM, Joeannes R, Liang L, Love SA, Guan W, Shah S, McRae AF, Kretschmer A, Prokisch H, Strauch K, Peters A, Visscher PM, Wray NR, Guo X, Wiggins KL, Smith AK, Binder EB, Ressler KJ, Irvin MR, Absher DM, Hernandez D, Ferrucci L, Bandinelli S, Lohman K, Ding J, Trevisi L, Gustafsson S, Sandling JH, Stolk L, Uitterlinden

- AG, Yet I, Castillo-Fernandez JE, Spector TD, Schwartz JD, Vokonas P, Lind L, Li Y, Fornage M, Arnett DK, Wareham NJ, Sotoodehnia N, Ong KK, van Meurs JBJ, Conneely KN, Baccarelli AA, Deary IJ, Bell JT, North KE, Liu Y, Waldenberger M, London SJ, Ingelsson E & Levy D (2018): A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. *Mol Psychiatry* 23: 422-433.
- Liu J, Morgan M, Hutchison K & Calhoun VD (2010): A Study of the Influence of Sex on Genome Wide Methylation [online]. *PLoS One* 5: e10028. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010028> [Zugriff 07.12.2024].
- Loeber S, Kiefer F, Wagner F, Mann K & Croissant B (2009): Behandlungserfolg nach qualifiziertem Alkoholentzug. *Nervenarzt* 80: 1085-1092.
- Lohoff FW, Roy A, Jung J, Longley M, Rosoff DB, Luo A, O'Connell E, Sorcher JL, Sun H, Schwandt M, Hodgkinson CA, Goldman D, Momenan R, McIntosh AM, Adams MJ, Walker RM, Evans KL, Porteous D, Smith AK, Lee J, Muench C, Charlet K, Clarke T-K & Kaminsky ZA (2021): Epigenome-wide association study and multi-tissue replication of individuals with alcohol use disorder: evidence for abnormal glucocorticoid signaling pathway gene regulation. *Mol Psychiatry* 26: 2224-2237.
- Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M & Groudine M (2004): Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1068-75.
- Loyfer N, Magenheim J, Peretz A, Cann G, Bredno J, Klochendler A, Fox-Fisher I, Shabi-Porat S, Hecht M, Pelet T, Moss J, Drawshy Z, Amini H, Moradi P, Nagaraju S, Bauman D, Shveiky D, Porat S, Dior U, Rivkin G, Or O, Hirshoren N, Carmon E, Pikarsky A, Khalaileh A, Zamir G, Grinbaum R, Abu Gazala M, Mizrahi I, Shussman N, Korach A, Wald O, Izhar U, Erez E, Yutkin V, Samet Y, Rotnemer Golinkin D, Spalding KL, Druid H, Arner P, Shapiro AMJ, Grompe M, Aravanis A, Venn O, Jamshidi A, Shemer R, Dor Y, Glaser B & Kaplan T (2023): A DNA methylation atlas of normal human cell types. *Nature* 613: 355-364.
- Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Assimes TL, Ferrucci L & Horvath S (2019): DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)* 11: 303-327.
- Lu L, Hu S, Wei R, Qiu X, Lu K, Fu Y, Li H, Xing G, Li D, Peng R, He F & Zhang L (2013): The HECT Type Ubiquitin Ligase NEDL2 Is Degraded by Anaphase-promoting Complex/Cyclosome (APC/C)-Cdh1, and Its Tight Regulation Maintains the Metaphase to Anaphase Transition. *J Biol Chem* 288: 35637-35650.
- Lu Q, Zhang M-N, Shi X-Y, Zhang L-Q, Wang Y-Y, Liu L-Y, He W, Chen H-M, He B & Zou L-P (2021): Association of variants with developmental and epileptic encephalopathy and knockdown of zebrafish hecw2a. *Am J Med Genet A* 185: 377-383.
- Luo A, Jung J, Longley M, Rosoff DB, Charlet K, Muench C, Lee J, Hodgkinson CA, Goldman D, Horvath S, Kaminsky ZA & Lohoff FW (2020): Epigenetic aging is accelerated in alcohol use disorder and regulated by genetic variation in APOL2. *Neuropsychopharmacology* 45: 327-336.
- Magrabi A, Beck A, Schad DJ, Lett TA, Stoppel CM, Charlet K, Kiefer F, Heinz A & Walter H (2022): Alcohol dependence decreases functional activation of the caudate nucleus during model-based decision processes. *Alcohol Clin Exp Res* 46: 749-758.
- Magwai T, Shangase KB, Oginga FO, Chiliza B, Mpofana T & Xulu KR (2021): DNA Methylation and Schizophrenia: Current Literature and Future Perspective. *Cells* 10: 2890.

- Mahna D, Puri S & Sharma S (2018): DNA methylation signatures: Biomarkers of drug and alcohol abuse. *Mutat Res Rev Mutat Res* 777: 19-28.
- Mann K & Ackermann K (2000): Die OCDS-G: Psychometrische Kennwerte der deutschen Version der Obsessive Compulsive Drinking Scale. *Sucht* 46: 90-100.
- Marini A, Rotblat B, Sbarrato T, Niklison-Chirou MV, Knight JRP, Dudek K, Jones C, Bushell M, Knight RA, Amelio I, Willis AE & Melino G (2018): TAp73 contributes to the oxidative stress response by regulating protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 6219-6224.
- Martinez D, Gil R, Slifstein M, Hwang D-R, Huang Y, Perez A, Kegeles L, Talbot P, Evans S, Krystal J, Laruelle M & Abi-Dargham A (2005): Alcohol Dependence Is Associated with Blunted Dopamine Transmission in the Ventral Striatum. *Biol Psychiatry* 58: 779-786.
- Martinotti G, Di Nicola M, Reina D, Andreoli S, Focà F, Cuniff A, Tonioni F, Bria P & Janiri L (2008): Alcohol Protracted Withdrawal Syndrome: The Role of Anhedonia. *Subst Use Misuse* 43: 271-284.
- Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJM, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T & Costello JF (2010): Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466: 253-257.
- Mayfield RD (2017): Emerging roles for ncRNAs in alcohol use disorders. *Alcohol* 60: 31-39.
- McCartney DL, Min JL, Richmond RC, Lu AT, Sobczyk MK, Davies G, Broer L, Guo X, Jeong A, Jung J, Kasela S, Katrinli S, Kuo PL, Matias-Garcia PR, Mishra PP, Nygaard M, Palviainen T, Patki A, Raffield LM, Ratliff SM, Richardson TG, Robinson O, Soerensen M, Sun D, Tsai PC, van der Zee MD, Walker RM, Wang X, Wang Y, Xia R, Xu Z, Yao J, Zhao W, Correa A, Boerwinkle E, Dugué PA, Durda P, Elliott HR, Gieger C, de Geus EJC, Harris SE, Hemani G, Imboden M, Kähönen M, Kardina SLR, Kresovich JK, Li S, Lunetta KL, Mangino M, Mason D, McIntosh AM, Mengel-From J, Moore AZ, Murabito JM, Ollikainen M, Pankow JS, Pedersen NL, Peters A, Polidoro S, Porteous DJ, Raitakari O, Rich SS, Sandler DP, Sillanpää E, Smith AK, Southey MC, Strauch K, Tiwari H, Tanaka T, Tillin T, Uitterlinden AG, Van Den Berg DJ, van Dongen J, Wilson JG, Wright J, Yet I, Arnett D, Bandinelli S, Bell JT, Binder AM, Boomsma DI, Chen W, Christensen K, Conneely KN, Elliott P, Ferrucci L, Fornage M, Hägg S, Hayward C, Irvin M, Kaprio J, Lawlor DA, Lehtimäki T, Lohoff FW, Milani L, Milne RL, Probst-Hensch N, Reiner AP, Ritz B, Rotter JI, et al. (2021): Genome-wide association studies identify 137 genetic loci for DNA methylation biomarkers of aging [online]. *Genome Biol* 22: 194. URL: <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02398-9> [Zugriff 07.12.2024].
- McCartney DL, Stevenson AJ, Hillary RF, Walker RM, Birmingham ML, Morris SW, Clarke TK, Campbell A, Murray AD, Whalley HC, Porteous DJ, Visscher PM, McIntosh AM, Evans KL, Deary IJ & Marioni RE (2018): Epigenetic signatures of starting and stopping smoking. *EBioMedicine* 37: 214-220.
- Meaney MJ (2010): Epigenetics and the Biological Definition of Gene × Environment Interactions. *Child Dev* 81: 41-79.
- Meda F, Folci M, Baccarelli A & Selmi C (2011): The epigenetics of autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 8: 226-236.
- Medici V & Halsted CH (2013): Folate, alcohol, and liver disease. *Mol Nutr Food Res* 57: 596-606.

- Medvedeva YA, Fridman MV, Oparina NJ, Malko DB, Ermakova EO, Kulakovskiy IV, Heinzel A & Makeev VJ (2010): Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome [online]. *BMC Genomics* 11: 48. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-48> [Zugriff 07.12.2024].
- Mekonen T, Chan GCK, Connor J, Hall W, Hides L & Leung J (2021): Treatment rates for alcohol use disorders: a systematic review and meta-analysis. *Addiction* 116: 2617-2634.
- Mercier C, Brochu S, Girard M, Gravel J, Ouellet R & ParÉ R (1992): Profiles of Alcoholics According to the SCL-90-R: A Confirmative Study. *Int J Addict* 27: 1267-1282.
- Messerschmidt DM, Knowles BB & Solter D (2014): DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev* 28: 812-828.
- Mikeska T & Craig JM (2014): DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes (Basel)* 5: 821-864.
- Miller WR, Westerberg VS, Harris RJ & Tonigan JS (1996): What predicts relapse? Prospective testing of antecedent models. *Addiction* 91: 155-172.
- Miranda TB & Jones PA (2007): DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 213: 384-390.
- Miyazaki K, Ozaki T, Kato C, Hanamoto T, Fujita T, Irino S, Watanabe K-i, Nakagawa T & Nakagawara A (2003): A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 106-113.
- Morgan HD, Sutherland HGE, Martin DIK & Whitelaw E (1999): Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23: 314-318.
- Muralikrishna B, Chaturvedi P, Sinha K & Parnaik VK (2012): Lamin misexpression upregulates three distinct ubiquitin ligase systems that degrade ATR kinase in HeLa cells. *Mol Cell Biochem* 365: 323-332.
- Murata Y, Fujii A, Kanata S, Fujikawa S, Ikegame T, Nakachi Y, Zhao Z, Jinde S, Kasai K, Bundo M & Iwamoto K (2019): Evaluation of the usefulness of saliva for DNA methylation analysis in cohort studies. *Neuropsychopharmacol Rep* 39: 301-305.
- Muschler MAN, Hillemacher T, Kraus C, Kornhuber J, Bleich S & Frieeling H (2010): DNA methylation of the POMC gene promoter is associated with craving in alcohol dependence. *J Neural Transm* 117: 513-519.
- Mutschler C, Lichtenstein S, Kidd SA & Davidson L (2019): Transition Experiences Following Psychiatric Hospitalization: A systematic Review of the Literature. *Community Ment Health J* 55: 1255-1274.
- Nanau RM & Neuman MG (2015): Biomolecules and Biomarkers Used in Diagnosis of Alcohol Drinking and in Monitoring Therapeutic Interventions. *Biomolecules* 5: 1339-1385.
- Nassar LR, Barber GP, Benet-Pagès A, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Fischer C, Gonzalez JN, Hinrichs AS, Lee BT, Lee CM, Muthuraman P, Nguy B, Pereira T, Nejad P, Perez G, Raney BJ, Schmelter D, Speir ML, Wick BD, Zweig AS, Haussler D, Kuhn RM, Haeussler M & Kent WJ (2023): The UCSC Genome Browser database: 2023 update. *Nucleic Acids Res* 51: D1188-D1195.
- National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (2004): Gene [57520]. Bethesda (MD) [online]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57520> [Zugriff 18.12.2023].
- Neri F, Rapelli S, Krepelova A, Incarnato D, Parlato C, Basile G, Maldotti M, Anselmi F & Oliviero S (2017): Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation. *Nature* 543: 72-77.

- Nervi C, De Marinis E & Codacci-Pisanelli G (2015): Epigenetic treatment of solid tumours: a review of clinical trials [online]. *Clin Epigenetics* 7: 127. URL: <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0157-2> [Zugriff 07.12.2024].
- Nguyen L-C, Durazzo TC, Dwyer CL, Rauch AA, Humphreys K, Williams LM & Padula CB (2020): Predicting relapse after alcohol use disorder treatment in a high-risk cohort: The roles of anhedonia and smoking. *J Psychiatr Res* 126: 1-7.
- Nieratschker V, Batra A & Fallgatter AJ (2013): Genetics and epigenetics of alcohol dependence [online]. *J Mol Psychiatry* 1: 11. URL: <https://doi.org/10.1186/2049-9256-1-11> [Zugriff 07.12.2024].
- Nieratschker V, Grosshans M, Frank J, Strohmaier J, von der Goltz C, El-Maarri O, Witt SH, Cichon S, Nöthen MM, Kiefer F & Rietschel M (2014): Epigenetic alteration of the dopamine transporter gene in alcohol-dependent patients is associated with age. *Addict Biol* 19: 305-311.
- Nishitani S, Isozaki M, Yao A, Higashino Y, Yamauchi T, Kidoguchi M, Kawajiri S, Tsunetoshi K, Neish H, Imoto H, Arishima H, Kodera T, Fujisawa TX, Nomura S, Kikuta K, Shinozaki G & Tomoda A (2023a): AMAZE-CpG (ver.1.0) – Asia Methylation array Apprizing for Experimental Comparison of Peripheral tissue & Gray matter (Brain) [online]. URL: <https://snishit-amaze-cpg.web.app/> [Zugriff 12.06.2024].
- Nishitani S, Isozaki M, Yao A, Higashino Y, Yamauchi T, Kidoguchi M, Kawajiri S, Tsunetoshi K, Neish H, Imoto H, Arishima H, Kodera T, Fujisawa TX, Nomura S, Kikuta K, Shinozaki G & Tomoda A (2023b): Cross-tissue correlations of genome-wide DNA methylation in Japanese live human brain and blood, saliva, and buccal epithelial tissues [online]. *Transl Psychiatry* 13: 72. URL: <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02370-0> [Zugriff 07.12.2024].
- Nishiyama A & Nakanishi M (2021): Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends Genet* 37: 1012-1027.
- Nixon K (2006): Alcohol and adult neurogenesis: Roles in neurodegeneration and recovery in chronic alcoholism. *Hippocampus* 16: 287-295.
- Nixon K & Crews FT (2002): Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem* 83: 1087-1093.
- Nixon K, Morris SA, Liput DJ & Kelso ML (2010): Roles of neural stem cells and adult neurogenesis in adolescent alcohol use disorders. *Alcohol* 44: 39-56.
- Novak P, Stampfer MR, Munoz-Rodriguez JL, Garbe JC, Ehrich M, Futscher BW & Jensen TJ (2012): Cell-Type Specific DNA Methylation Patterns Define Human Breast Cellular Identity [online]. *PLoS One* 7: e52299. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052299> [Zugriff 07.12.2024].
- Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C & Paramio JM (2020): DNA Methylation as a Therapeutic Target for Bladder Cancer. *Cells* 9: 1850.
- O'Donnell AM, Coyle D & Puri P (2016): Decreased expression of NEDL2 in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 51: 1839-1842.
- Okano M, Bell DW, Haber DA & Li E (1999): DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99: 247-257.
- Okano M, Xie S & Li E (1998): Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19: 219-220.
- Olesen SC, Butterworth P, Leach LS, Kelaher M & Pirkis J (2013): Mental health affects future employment as job loss affects mental health: findings from a longitudinal population study [online]. *BMC Psychiatry* 13: 144. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-244X-13-144> [Zugriff 07.12.2024].
- Pal S & Tyler JK (2016): Epigenetics and aging [online]. *Sci Adv* 2: e1600584. URL: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciadv.1600584> [Zugriff 07.12.2024].

- Pappalardo XG & Barra V (2021): Losing DNA methylation at repetitive elements and breaking bad [online]. *Epigenetics Chromatin* 14: 25. URL: <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00400-z> [Zugriff 07.12.2024].
- Pasala S, Barr T & Messaoudi I (2015): Impact of Alcohol Abuse on the Adaptive Immune System. *Alcohol Res* 37: 185-197.
- Pastor WA, Aravind L & Rao A (2013): TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 341-356.
- Peikes T, O'Carroll A, Frosk P & Salman MS (2021): Acquired Microcephaly in a Patient with HECW2 Mutation. *Can J Neurol Sci* 48: 435-437.
- Pheiffer C, Erasmus RT, Kengne AP & Matsha TE (2016): Differential DNA methylation of microRNAs within promoters, intergenic and intragenic regions of type 2 diabetic, pre-diabetic and non-diabetic individuals. *Clin Biochem* 49: 433-438.
- Philibert R, Dogan M, Noel A, Miller S, Krukow B, Papworth E, Cowley J, Knudsen A, Beach SRH & Black D (2018): Genome-wide and digital polymerase chain reaction epigenetic assessments of alcohol consumption. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 177: 479-488.
- Philibert RA, Penaluna B, White T, Shires S, Gunter T, Liesveld J, Erwin C, Hollenbeck N & Osborn T (2014): A pilot examination of the genome-wide DNA methylation signatures of subjects entering and exiting short-term alcohol dependence treatment programs. *Epigenetics* 9: 1212-1219.
- Ponomarev I, Stelly CE, Morikawa H, Blednov YA, Mayfield RD & Harris RA (2017): Mechanistic insights into epigenetic modulation of ethanol consumption. *Alcohol* 60: 95-101.
- Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA & Mayfield RD (2012): Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci* 32: 1884-1897.
- Poon CH, Tse LSR & Lim LW (2020): DNA methylation in the pathology of Alzheimer's disease: from gene to cognition. *Ann N Y Acad Sci* 1475: 15-33.
- Popova S, Giesbrecht N, Bekmuradov D & Patra J (2009): Hours and Days of Sale and Density of Alcohol Outlets: Impacts on Alcohol Consumption and Damage: A Systematic Review. *Alcohol Alcohol* 44: 500-516.
- Popovici I & French MT (2013): Does Unemployment Lead to Greater Alcohol Consumption? *Ind Relat (Berkeley)* 52: 444-466.
- QIAGEN (2009): PyroMark® Gold Q24 Reagents Handbook [online]. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=7a6871a5-c3aa-409d-9dcc-89593a24c197&lang=en> [Zugriff 16.05.2024].
- QIAGEN (2016): PyroMark® Q24 User Manual. Version 5 [online]. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=59f0275d-e60f-4517-b786-b0e0ca13952e&lang=en> [Zugriff 16.05.2024].
- QIAGEN (2019): Epiect® Fast Bisulfite Conversion Handbook [online]. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=ab2427dc-3da9-412c-8c37-7e78d397b6ac&lang=en> [Zugriff 16.05.2024].
- Qian H, Zhang Y, Wu B, Wu S, You S, Zhang N & Sun Y (2020): Structure and Function of HECT E3 Ubiquitin Ligases and their Role in Oxidative Stress. *J Transl Int Med* 8: 71-79.
- Qiu X, Wei R, Li Y, Zhu Q, Xiong C, Chen Y, Zhang Y, Lu K, He F & Zhang L (2016): NEDL2 regulates enteric nervous system and kidney development in its Nedd8 ligase activity-dependent manner. *Oncotarget* 7: 31440-31453.
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N & Szyf M (1999): DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6107-6112.
- Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD & Pfeifer GP (2009): A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 671-678.

- Ray LA & Hutchison KE (2004): A Polymorphism of the μ -Opioid Receptor Gene (OPRM1) and Sensitivity to the Effects of Alcohol in Humans. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 1789-1795.
- Refn MR, Andersen MM, Kampmann ML, Tfelt-Hansen J, Sørensen E, Larsen MH, Morling N, Børsting C & Pereira V (2023): Longitudinal changes and variation in human DNA methylation analysed with the Illumina MethylationEPIC BeadChip assay and their implications on forensic age prediction [online]. *Sci Rep* 13: 21658. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49064-7> [Zugriff 08.12.2024].
- Rehm J, Gmel GE, Sr., Gmel G, Hasan OSM, Imtiaz S, Popova S, Probst C, Roerecke M, Room R, Samokhvalov AV, Shield KD & Shuper PA (2017): The relationship between different dimensions of alcohol use and the burden of disease-an update. *Addiction* 112: 968-1001.
- Robison AJ & Nestler EJ (2011): Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12: 623-637.
- Romani M, Pistillo MP & Banelli B (2015): Environmental Epigenetics: Crossroad between Public Health, Lifestyle, and Cancer Prevention [online]. *Biomed Res Int* 2015: 587983. URL: <https://doi.org/10.1155/2015/587983> [Zugriff 08.12.2024].
- Rosen AD, Robertson KD, Hlady RA, Muench C, Lee J, Philibert R, Horvath S, Kaminsky ZA & Lohoff FW (2018): DNA methylation age is accelerated in alcohol dependence [online]. *Transl Psychiatry* 8: 182. URL: <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0233-4> [Zugriff 08.12.2024].
- Roth TL, Lubin FD, Funk AJ & Sweatt JD (2009): Lasting Epigenetic Influence of Early-Life Adversity on the BDNF Gene. *Biol Psychiatry* 65: 760-769.
- Rotin D & Kumar S (2009): Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 398-409.
- Rushworth MFS, Walton ME, Kennerley SW & Bannerman DM (2004): Action sets and decisions in the medial frontal cortex. *Trends Cogn Sci* 8: 410-417.
- Sanchez-Mut JV & Gräff J (2015): Epigenetic Alterations in Alzheimer's Disease [online]. *Front Behav Neurosci* 9: 347. URL: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00347> [Zugriff 08.12.2024].
- Sander W & Jux M (2006): Psychological Distress in Alcohol-Dependent Patients: Evaluating Inpatient Treatment with the Symptom Checklist (SCL-90-R). *Eur Addict Res* 12: 61-66.
- Saul D & Kosinsky RL (2021): Epigenetics of Aging and Aging-Associated Diseases [online]. *Int J Mol Sci* 22: 401. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22010401> [Zugriff 08.12.2024].
- Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR & Grant M (1993): Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II. *Addiction* 88: 791-804.
- Schellekens AFA, de Jong CAJ, Buitelaar JK & Verkes RJ (2015): Co-morbid anxiety disorders predict early relapse after inpatient alcohol treatment. *Eur Psychiatry* 30: 128-136.
- Schuch JB, Bandeira CE, Junior JLS, Müller D, Charão MF, Silva BSd, Grevet EH, Kessler FHP, von Diemen L, Rovaris DL & Bau CHD (2023): Global DNA methylation patterns in Alcohol Use Disorder [online]. *Genet Mol Biol* 46(3 Suppl 1): e20230139. URL: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2023-0139> [Zugriff 08.12.2024].
- Seale K, Horvath S, Teschendorff A, Eynon N & Voisin S (2022): Making sense of the ageing methylome. *Nat Rev Genet* 23: 585-605.
- Sebold M, Nebe S, Garbusow M, Guggenmos M, Schad DJ, Beck A, Kuitunen-Paul S, Sommer C, Frank R, Neu P, Zimmermann US, Rapp MA, Smolka MN, Huys

- QJM, Schlagenhauf F & Heinz A (2017): When Habits Are Dangerous: Alcohol Expectancies and Habitual Decision Making Predict Relapse in Alcohol Dependence. *Biol Psychiatry* 82: 847-856.
- Sehlmeyer C, Schöning S, Zwitterlood P, Pfeleiderer B, Kircher T, Arolt V & Konrad C (2009): Human Fear Conditioning and Extinction in Neuroimaging: A Systematic Review [online]. *PLoS One* 4: e5865. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005865> [Zugriff 08.12.2024].
- Semmler A, Heese P, Stoffel-Wagner B, Muschler M, Heberlein A, Bigler L, Prost J-C, Frieling H, Kornhuber J, Banger M, Bleich S, Hillemacher T & Linnebank M (2015): Alcohol abuse and cigarette smoking are associated with global DNA hypermethylation: Results from the German Investigation on Neurobiology in Alcoholism (GINA). *Alcohol* 49: 97-101.
- Seo D & Sinha R (2015): Neuroplasticity and Predictors of Alcohol Recovery. *Alcohol Res* 37: 143-152.
- Shayevitch R, Askayo D, Keydar I & Ast G (2018): The importance of DNA methylation of exons on alternative splicing. *RNA* 24: 1351-1362.
- Shirvani-Farsani Z, Maloum Z, Bagheri-Hosseinabadi Z, Vilor-Tejedor N & Sadeghi I (2021): DNA methylation signature as a biomarker of major neuropsychiatric disorders. *J Psychiatr Res* 141: 34-49.
- Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R & Oberdoerffer S (2011): CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479: 74-79.
- Sinsheimer RL (1955): The Action Of Pancreatic Deoxyribonuclease: II. Isomeric Dinucleotides. *J Biol Chem* 215: 579-583.
- Slidrecht W, de Waart R, Witkiewitz K & Roozen HG (2019): Alcohol use disorder relapse factors: A systematic review. *Psychiatry Res* 278: 97-115.
- Smith AK, Kilaru V, Klengel T, Mercer KB, Bradley B, Conneely KN, Ressler KJ & Binder EB (2015): DNA extracted from saliva for methylation studies of psychiatric traits: Evidence tissue specificity and relatedness to brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 168: 36-44.
- Solomon O, Huen K, Yousefi P, Küpers LK, González JR, Suderman M, Reese SE, Page CM, Gruzieva O, Rzehak P, Gao L, Bakulski KM, Novoloaca A, Allard C, Pappa I, Llambrich M, Vives M, Jima DD, Kvist T, Baccarelli A, White C, Rezwan FI, Sharp GC, Tindula G, Bergström A, Grote V, Dou JF, Isaevska E, Magnus MC, Corpeleijn E, Perron P, Jaddoe VWV, Nohr EA, Maitre L, Foraster M, Hoyo C, Håberg SE, Lahti J, DeMeo DL, Zhang H, Karmaus W, Kull I, Koletzko B, Feinberg JL, Gagliardi L, Bouchard L, Ramlau-Hansen CH, Tiemeier H, Santorelli G, Maguire RL, Czamara D, Litonjua AA, Langhendries J-P, Plusquin M, Lepeule J, Binder EB, Verduci E, Dwyer T, Carracedo Á, Ferre N, Eskenazi B, Kogevinas M, Nawrot TS, Munthe-Kaas MC, Herceg Z, Relton C, Melén E, Grusfeld D, Breton C, Fallin MD, Ghantous A, Nystad W, Heude B, Snieder H, Hivert M-F, Felix JF, Sørensen TIA, Bustamante M, Murphy SK, Raikkönen K, Oken E, Holloway JW, Arshad SH, London SJ & Holland N (2022): Meta-analysis of epigenome-wide association studies in newborns and children show widespread sex differences in blood DNA methylation. *Mutat Res Rev Mutat Res* 789: 108415.
- Sommerer Y, Ohlei O, Dobricic V, Oakley DH, Wesse T, Sedghpour Sabet S, Demuth I, Franke A, Hyman BT, Lill CM & Bertram L (2022): A correlation map of genome-wide DNA methylation patterns between paired human brain and buccal samples [online]. *Clin Epigenetics* 14: 139. URL: <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01357-w> [Zugriff 08.12.2024].
- Song Z, Zhou Z, Song M, Uriarte S, Chen T, Deaciuc I & McClain CJ (2007): Alcohol-induced S-adenosylhomocysteine accumulation in the liver sensitizes to TNF

- hepatotoxicity: Possible involvement of mitochondrial S-adenosylmethionine transport. *Biochem Pharmacol* 74: 521-531.
- Song Z, Zhou Z, Uriarte S, Wang L, Kang JY, Chen T, Barve S & McClain CJ (2004): S-adenosylhomocysteine sensitizes to TNF- α hepatotoxicity in mice and liver cells: A possible etiological factor in alcoholic liver disease. *Hepatology* 40: 989-997.
- Soundararajan S, Agrawal A, Purushottam M, Anand SD, Shankarappa B, Sharma P, Jain S & Murthy P (2021): Changes in DNA methylation persist over time in males with severe alcohol use disorder—A longitudinal follow-up study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 186: 183-192.
- Statistik der Bundesagentur für Arbeit (2023): Arbeitslosenquote im Jahr 2023. Stand: 12/2023 [online]. URL: https://www.arbeitsagentur.de/datei/arbeitslosenquote-2023_ba046402.pdf [Zugriff 21.04.2024].
- Stickel F, Choi S-W, Kim Y-I, Bagley PJ, Seitz HK, Russell RM, Selhub J & Mason JB (2000): Effect of Chronic Alcohol Consumption on Total Plasma Homocysteine Level in Rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24: 259-264.
- Stoccoro A, Conti E, Scaffei E, Calderoni S, Coppedè F, Migliore L & Battini R (2023): DNA Methylation Biomarkers for Young Children with Idiopathic Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review [online]. *Int J Mol Sci* 24: 9138. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24119138> [Zugriff 08.12.2024].
- Strahl BD & Allis CD (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- Strupp M, Zwergal A & Brandt T (2007): Episodic ataxia type 2. *Neurotherapeutics* 4: 267-273.
- Sullivan EV & Pfefferbaum A (2005): Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology (Berl)* 180: 583-594.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L & Rao A (2009): Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 324: 930-935.
- Takai D & Jones PA (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3740-3745.
- Talos F, Abraham A, Vaseva AV, Holembowski L, Tsirka SE, Scheel A, Bode D, Döbelstein M, Brück W & Moll UM (2010): p73 is an essential regulator of neural stem cell maintenance in embryonal and adult CNS neurogenesis. *Cell Death Differ* 17: 1816-1829.
- Tawa EA, Hall SD & Lohoff FW (2016): Overview of the Genetics of Alcohol Use Disorder. *Alcohol Alcohol* 51: 507-514.
- Tedesco Silva LM, Sharma S, Schrauwen I, Margolesky J & Detyniecki K (2023): A De Novo HECW2 Variant in a Patient with Acetazolamide-Responsive Episodic Ataxia. *Cerebellum* 22: 1029-1033.
- Thiesen H & Hesse M (2010): Biological markers of problem drinking in homeless patients. *Addict Behav* 35: 260-262.
- Thompson TM, Sharfi D, Lee M, Yrigollen CM, Naumova OY & Grigorenko EL (2013): Comparison of Whole-Genome DNA Methylation Patterns in Whole Blood, Saliva, and Lymphoblastoid Cell Lines. *Behav Genet* 43: 168-176.
- Tulloch AD, David AS & Thornicroft G (2016): Exploring the predictors of early readmission to psychiatric hospital. *Epidemiol Psychiatr Sci* 25: 181-193.
- Tykocinski ML & Max EE (1984): CG dinucleotide clusters in MHC genes and in 5' demethylated genes. *Nucleic Acids Res* 12: 4385-4396.
- Ullman NL, Smith-Hicks CL, Desai S & Stafstrom CE (2018): De Novo HECW2 Mutation Associated With Epilepsy, Developmental Decline, and Intellectual Disability: Case Report and Review of Literature. *Pediatr Neurol* 85: 76-78.

- Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H & Richardson A (2019): The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacol Ther* 195: 172-185.
- Velletri T, Romeo F, Tucci P, Peschiaroli A, Annicchiarico-Petruzzelli M, Niklison-Chirou M, Amelio I, Knight R, Mak T, Melino G & Agostini M (2013): GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle* 12: 3564-3573.
- Verhulst B, Neale MC & Kendler KS (2015): The heritability of alcohol use disorders: a meta-analysis of twin and adoption studies. *Psychol Med* 45: 1061-1072.
- Villa C & Stocco A (2022): Epigenetic Peripheral Biomarkers for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease [online]. *Genes (Basel)* 13: 1308. URL: <https://doi.org/10.3390/genes13081308> [Zugriff 08.12.2024].
- Wall TL, Carr LG & Ehlers CL (2003): Protective Association of Genetic Variation in Alcohol Dehydrogenase With Alcohol Dependence in Native American Mission Indians. *Am J Psychiatry* 160: 41-46.
- Walter S, Atzmon G, Demerath EW, Garcia ME, Kaplan RC, Kumari M, Lunetta KL, Milaneschi Y, Tanaka T, Tranah GJ, Völker U, Yu L, Arnold A, Benjamin EJ, Biffar R, Buchman AS, Boerwinkle E, Couper D, De Jager PL, Evans DA, Harris TB, Hoffmann W, Hofman A, Karasik D, Kiel DP, Kocher T, Kuningas M, Launer LJ, Lohman KK, Lutsey PL, Mackenbach J, Marcianti K, Psaty BM, Reiman EM, Rotter JI, Seshadri S, Shardell MD, Smith AV, van Duijn C, Walston J, Zillikens MC, Bandinelli S, Baumeister SE, Bennett DA, Ferrucci L, Gudnason V, Kivimaki M, Liu Y, Murabito JM, Newman AB, Tiemeier H & Franceschini N (2011): A genome-wide association study of aging [online]. *Neurobiol Aging* 32: 2109.e15-2109.e28. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.026> [Zugriff 08.12.2024].
- Wang J, Liu Y-X, Hande MP, Wong AC, Jin YJ & Yin Y (2007): TAp73 Is a Downstream Target of p53 in Controlling the Cellular Defense against Stress. *J Biol Chem* 282: 29152-29162.
- Wang JC, Hinrichs AL, Stock H, Budde J, Allen R, Bertelsen S, Kwon JM, Wu W, Dick DM, Rice J, Jones K, Nurnberger JI, Jr, Tischfield J, Porjesz B, Edenberg HJ, Hesselbrock V, Crowe R, Schuckit M, Begleiter H, Reich T, Goate AM & Bierut LJ (2004): Evidence of common and specific genetic effects: association of the muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2) gene with alcohol dependence and major depressive syndrome. *Hum Mol Genet* 13: 1903-1911.
- Wang JQ, Liu YR, Xia QR, Liang J, Wang JL & Li J (2023): Functional roles, regulatory mechanisms and theranostics applications of ncRNAs in alcohol use disorder. *Int J Biol Sci* 19: 1316-1335.
- Warnault V, Darcq E, Levine A, Barak S & Ron D (2013): Chromatin remodeling — a novel strategy to control excessive alcohol drinking [online]. *Transl Psychiatry* 3: e231. URL: <https://doi.org/10.1038/tp.2013.4> [Zugriff 08.12.2024].
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M & Schübeler D (2007): Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39: 457-466.
- Wei R, Qiu X, Wang S, Li Y, Wang Y, Lu K, Fu Y, Xing G, He F & Zhang L (2015): NEDL2 is an essential regulator of enteric neural development and GDNF/Ret signaling. *Cell Signal* 27: 578-586.
- Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel K-H, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brümmendorf TH & Wagner W (2014): Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites [online]. *Genome Biol* 15: R24. URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24> [Zugriff 08.12.2024].

- Wetzel MK, Naska S, Laliberté CL, Rymar VV, Fujitani M, Biernaskie JA, Cole CJ, Lerch JP, Spring S, Wang SH, Frankland PW, Henkelman RM, Josselyn SA, Sadikot AF, Miller FD & Kaplan DR (2008): p73 Regulates Neurodegeneration and Phospho-Tau Accumulation during Aging and Alzheimer's Disease. *Neuron* 59: 708-721.
- Wiegand A, Olmos VG, Sommer WH, Hansson AC & Nieratschker V (2019): SA64 Differential DNA Methylation Of GDAP1 And HECW2 In Post Mortem Brain Samples And In A Rat Model For Alcohol Dependence. *Eur Neuropsychopharmacol* 29, Supplement 4: S1222-S1223.
- Witkiewitz K, Litten RZ & Leggio L (2019): Advances in the science and treatment of alcohol use disorder [online]. *Sci Adv* 5: eaax4043. URL: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4043> [Zugriff 08.12.2024].
- Witt SH, Frank J, Frischknecht U, Treutlein J, Streit F, Foo JC, Sirignano L, Dukal H, Degenhardt F, Koopmann A, Hoffmann S, Koller G, Pogarell O, Preuss UW, Zill P, Adorjan K, Schulze TG, Nöthen M, Spanagel R, Kiefer F & Rietschel M (2020): Acute alcohol withdrawal and recovery in men lead to profound changes in DNA methylation profiles: a longitudinal clinical study. *Addiction* 115: 2034-2044.
- Wojnar M, Brower KJ, Strobbe S, Ilgen M, Matsumoto H, Nowosad I, Sliwerska E & Burmeister M (2009): Association Between Val66Met Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene Polymorphism and Post-Treatment Relapse in Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 693-702.
- Wooden JI, Thompson KR, Guerin SP, Nawarawong NN & Nixon K (2021): Consequences of adolescent alcohol use on adult hippocampal neurogenesis and hippocampal integrity. *Int Rev Neurobiol* 160: 281-304.
- World Health Organization (WHO) (2015): International statistical classification of diseases and related health problems, 10th revision, Fifth edition, 2016. World Health Organization [online]. URL: <https://iris.who.int/handle/10665/246208>.
- World Health Organization (WHO) (2018): *Global status report on alcohol and health 2018*. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Health Organization (WHO) (2024): *Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders*. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Woźniak MK, Wiergowski M, Namieśnik J & Biziuk M (2019): Biomarkers of Alcohol Consumption in Body Fluids - Possibilities and Limitations of Application in Toxicological Analysis. *Curr Med Chem* 26: 177-196.
- Xia Y, Dai R, Wang K, Jiao C, Zhang C, Xu Y, Li H, Jing X, Chen Y, Jiang Y, Kopp RF, Giase G, Chen C & Liu C (2021): Sex-differential DNA methylation and associated regulation networks in human brain implicated in the sex-biased risks of psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 26: 835-848.
- Xia Y-y, Ding Y-b, Liu X-q, Chen X-m, Cheng S-q, Li L-b, Ma M-f, He J-l & Wang Y-x (2014): Racial/ethnic disparities in human DNA methylation. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1846: 258-262.
- Xu J, Huo D, Chen Y, Nwachukwu C, Collins C, Rowell J, Slamon DJ & Olopade OI (2010): CpG island methylation affects accessibility of the proximal BRCA1 promoter to transcription factors. *Breast Cancer Res Treat* 120: 593-601.
- Yanagishita T, Hirade T, Shimojima Yamamoto K, Funatsuka M, Miyamoto Y, Maeda M, Yanagi K, Kaname T, Nagata S, Nagata M, Ishihara Y, Miyashita Y, Asano Y, Sakata Y, Kosaki K & Yamamoto T (2021): HECW2-related disorder in four Japanese patients. *Am J Med Genet A* 185: 2895-2902.
- Yang X, Han H, De Carvalho Daniel D, Lay Fides D, Jones Peter A & Liang G (2014): Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer Cell* 26: 577-590.

- Yearim A, Gelfman S, Shayevitch R, Melcer S, Glaich O, Mallm J-P, Nissim-Rafinia M, Cohen A-Hashahar S, Rippe K, Meshorer E & Ast G (2015): HP1 Is Involved in Regulating the Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Rep* 10: 1122-1134.
- Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ & James SJ (2000): Increase in Plasma Homocysteine Associated with Parallel Increases in Plasma S-Adenosylhomocysteine and Lymphocyte DNA Hypomethylation. *J Biol Chem* 275: 29318-29323.
- Yoshimura A, Kimura M, Matsushita S, Yoneda J-i, Maesato H, Komoto Y, Nakayama H, Sakuma H, Yumoto Y, Takimura T, Tohyama T, Iwahara C, Mizukami T, Yokoyama A & Higuchi S (2021): Alcohol dependence severity determines the course of treatment-seeking patients. *Alcohol Clin Exp Res* 45: 2335-2346.
- Young-Wolff KC, Enoch M-A & Prescott CA (2011): The influence of gene–environment interactions on alcohol consumption and alcohol use disorders: A comprehensive review. *Clin Psychol Rev* 31: 800-816.
- Yuan Z-M, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang Y, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R & Kufe D (1999): p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399: 814-817.
- Zaidi SK, Young DW, Montecino M, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ & Stein GS (2010): Architectural Epigenetics: Mitotic Retention of Mammalian Transcriptional Regulatory Information. *Mol Cell Biol* 30: 4758-4766.
- Zakhari S (2013): Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res* 35: 6-16.
- Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, Weidinger S, Lattka E, Adamski J, Peters A, Strauch K, Waldenberger M & Illig T (2013): Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation [online]. *PLoS One* 8: e63812. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063812> [Zugriff 08.12.2024].
- Zhang F, Little A & Zhang H (2016): Chronic alcohol consumption inhibits peripheral NK cell development and maturation by decreasing the availability of IL-15. *J Leukoc Biol* 101: 1015-1027.
- Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Fulda KG, Kaur M, Gonzalez K, Vishwanatha JK, Santella RM & Morabia A (2011): Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics* 6: 623-629.
- Zhang L, Mei Y, Fu N-y, Guan L, Xie W, Liu H-h, Yu C-d, Yin Z, Yu VC & You H (2012): TRIM39 regulates cell cycle progression and DNA damage responses via stabilizing p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 20937-20942.
- Zhang R, Miao Q, Wang C, Zhao R, Li W, Haile CN, Hao W & Zhang XY (2013): Genome-wide DNA methylation analysis in alcohol dependence. *Addict Biol* 18: 392-403.
- Zhu J-H, Bo H-H, Liu B-P & Jia C-X (2023): The associations between DNA methylation and depression: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 327: 439-450.
- Zillich L, Frank J, Streit F, Friske MM, Foo JC, Sirignano L, Heilmann-Heimbach S, Dukal H, Degenhardt F, Hoffmann P, Hansson AC, Nöthen MM, Rietschel M, Spanagel R & Witt SH (2022): Epigenome-wide association study of alcohol use disorder in five brain regions. *Neuropsychopharmacology* 47: 832-839.
- Zima T, Fialová L, Mestek O, Janebová M, Crkovská J, Malbohan I, Štípek S, Mikulíková L & Popov P (2001): Oxidative Stress, Metabolism of Ethanol and Alcohol-Related Diseases. *J Biomed Sci* 8: 59-70.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Molekulare Psychiatrie der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Vanessa Nieratschker durchgeführt. Zusätzliche Betreuung wurde durch Frau Dr. Susanne Edelmann geleistet.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Prof. Dr. Vanessa Nieratschker.

Die Rekrutierung der Probanden, die Erhebung der Fragebogendaten, die Entnahme der Blut- und Speichelproben sowie deren DNA-Extraktion und Bisulfit-Konvertierung wurden seit 2020 fortlaufend von medizinischen Doktoranden der Arbeitsgruppe Molekulare Psychiatrie – namentlich Tobias Löffler, Philipp Plessing, Henning Plättner, Dominic Gaisbauer und Christine Kummer – durchgeführt. Im Zeitraum von April 2023 bis Oktober 2023 übernahm ich diese Aufgaben. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte mit Unterstützung durch Ärzte der Station 23 der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Tübingen.

Die weiteren Arbeitsschritte zur Bestimmung der DNA-Methylierung von *HECW2* wurden für etwa die Hälfte der in der vorliegenden Arbeit analysierten Patientenproben und etwa zwei Drittel der analysierten Kontrollprobandenproben von mir durchgeführt. Die restlichen in dieser Arbeit ausgewerteten Methylierungsdaten wurden von Philipp Plessing erhoben.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Susanne Edelmann und Frau Sarah Pasche von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich, in regelmäßiger Rücksprache mit Frau Dr. Susanne Edelmann.

Ein Teil der mittels Fragebogen erhobenen Daten wurde auch in der Doktorarbeit von Christine Kummer verwendet, jedoch unabhängig ausgewertet.

Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurde ein Preprint veröffentlicht, in dem ein Teil der zugrundeliegenden Rohdaten im Rahmen einer eigenständigen Analyse gemeinsam mit weiteren Daten ausgewertet wurde und in dem ich als Co-Autorin geführt werde: Edelmann S, Bender A, Pasche S, Esser S, Heuser

M, Link A, Plessing P, Mueller P, Zimmermann M & Nieratschker V (08.12.2025): Regulation of HECW2 expression in Alcohol Use Disorder, therapy outcome and risk of relapse. PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-8133046/v1>].

Zudem wurde nach Fertigstellung meiner Arbeit ein Teil der Rohdaten im Rahmen der Doktorarbeit von Philipp Plessing verwendet, jedoch unabhängig ausgewertet.

Ich versichere, nach der Beurteilung und vor Publikation dieser Dissertation keine weiteren Änderungen als das Einfügen der Anmerkungen bezüglich des veröffentlichten Preprints und der unabhängigen Auswertung eines Teils der Rohdaten im Rahmen der Doktorarbeit von Philipp Plessing sowie die Korrektur weniger Rechtschreib- und Formatierungsfehler vorgenommen zu haben.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Anhang

Anhangsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis Anhang	172
Tabellenverzeichnis Anhang	173
Anhang 1 Sequenz des amplifizierten Teils von <i>HECW2</i>	174
Anhang 2 Pyrosequenzierungs-Assay	174
Anhang 3 Exemplarisches Ergebnis der Gelelektrophorese	175
Anhang 4 Exemplarisches Ergebnis der Pyrosequenzierung	175
Anhang 5 Fragebogen	176
Anhang 5.1 <i>Symptom-Checklist-90-Revised</i> (SCL-90-R)	176
Anhang 5.2 <i>Alcohol Use Disorders Identification Test</i> (AUDIT)	178
Anhang 5.3 <i>Obsessive Compulsive Drinking Scale</i> (OCDS-G)	179
Anhang 6 Zusätzliche Tabellen statistischer Analysen	183
Anhang 7 Zusätzliche Diagramme	189

Abbildungsverzeichnis Anhang

Abbildung A1: Exemplarisches Ergebnis einer Gelelektrophorese zur Qualitätsbeurteilung der PCR mit vier Proben und einer Negativkontrolle.	175
Abbildung A2: Exemplarisches Ergebnis einer Pyrosequenzierung von <i>HECW2</i> (cg18752527).	175
Abbildung A3: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T2 und dem Alter in Jahren.	189
Abbildung A4: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T3 und dem Alter in Jahren.	189
Abbildung A5: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T4 und dem Alter in Jahren.	190
Abbildung A6: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T2 und dem Alter in Jahren in der SG36.	190
Abbildung A7: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T3 und dem Alter in Jahren in der SG36.	191
Abbildung A8: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Blut zu T4 und dem Alter in Jahren in der SG36.	191
Abbildung A9: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel zu T2 und dem Alter in Jahren.	192
Abbildung A10: Korrelation zwischen der <i>HECW2</i> -DNAm (%) in Speichel zu T4 und dem Alter in Jahren.	192

Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle A1:	Bericht über die Normalverteilung. Analysiert pro Variable, Gruppe (Patienten/Kontrollprobanden) und Zeitpunkt mittels Shapiro-Wilk-Tests.....	183
Tabelle A2:	Bericht über die Normalverteilung. Analysiert pro Variable, Gruppe (Patienten/Kontrollprobanden) und Differenz zweier Zeitpunkte mittels Shapiro-Wilk-Tests.	184
Tabelle A3:	Bericht über die Normalverteilung. Analysiert pro Variable, Subgruppe (rückfällige/nicht-rückfällige Patienten) und Zeitpunkt mittels Shapiro-Wilk-Tests.	185
Tabelle A4:	Bericht über die Normalverteilung. Analysiert pro Variable, Subgruppe (rückfällige/nicht-rückfällige Patienten) und Differenz zweier Zeitpunkte mittels Shapiro-Wilk-Tests.....	186
Tabelle A5:	Korrelationen der Fragebogen-Scores von GSI, AUDIT und OCDS über beide Gruppen und alle Zeitpunkte hinweg.....	187
Tabelle A6:	Korrelationen der Fragebogen-Scores von GSI, AUDIT und OCDS getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden über alle Zeitpunkte hinweg.	188

Anhang 1 Sequenz des amplifizierten Teils von *HECW2* *HECW2/cg18752527*

Referenzgenom: GRCh37/hg19

Position: 2q32.3: 197,132,870

Amplifizierter Abschnitt: 197,132,798–197,132,932

5'-GTGTTTGTGGGAATGCTCCTCACAACATATATAAAACAGAATGTTCTCTTA
GATATACAAACTTCCCCTTTACGATGTTATGATAAGCAAAATATTTAACTCC
CAAAAACCTTGACAGAAAATGAAAGTGCAGTGTG-3' (135 bp)

Quelle: UCSC Genome Browser (URL: <http://genome.ucsc.edu>) (Nassar *et al.* 2023)

Bisulfit-konvertiert:

5'-GTGTTTGTGGGAATGTTTTTTATAATTATATAAAATAGAATGTTTTTTAG
ATATATAAATTTTTTTTACGATGTTATGATAAGTAAATATTTAATTTTTAA
AAATTTGATAGAAAATGAAAGTGTAGTGTG-3' (135 bp)

CG: CpG-Dinukleotid

fett: zu analysierende Sequenz

Primer:

Vorwärtsprimer: 5'-GTGTTTGTGGGAATGTTTTTTATA-3'
(24 bp; 57 °C)

Rückwärtsprimer: 5'-Biotin-CACACTACACTTTCATTTTCTATCAA-3'
(26 bp; 60 °C)

Sequenzierungsprimer: 5'-TTTTTAGATATATAAATTTTTTTTTT-3'
(26 bp; 49 °C)

Anhang 2 Pyrosequenzierungs-Assay

Zu analysierende Sequenz (Bisulfit-konvertiert): AYGATGTTATGATAAGTA

Reihenfolge der Nukleotid-Zugabe: TATCGATGCTA

Anhang 3 Exemplarisches Ergebnis der Gelelektrophorese

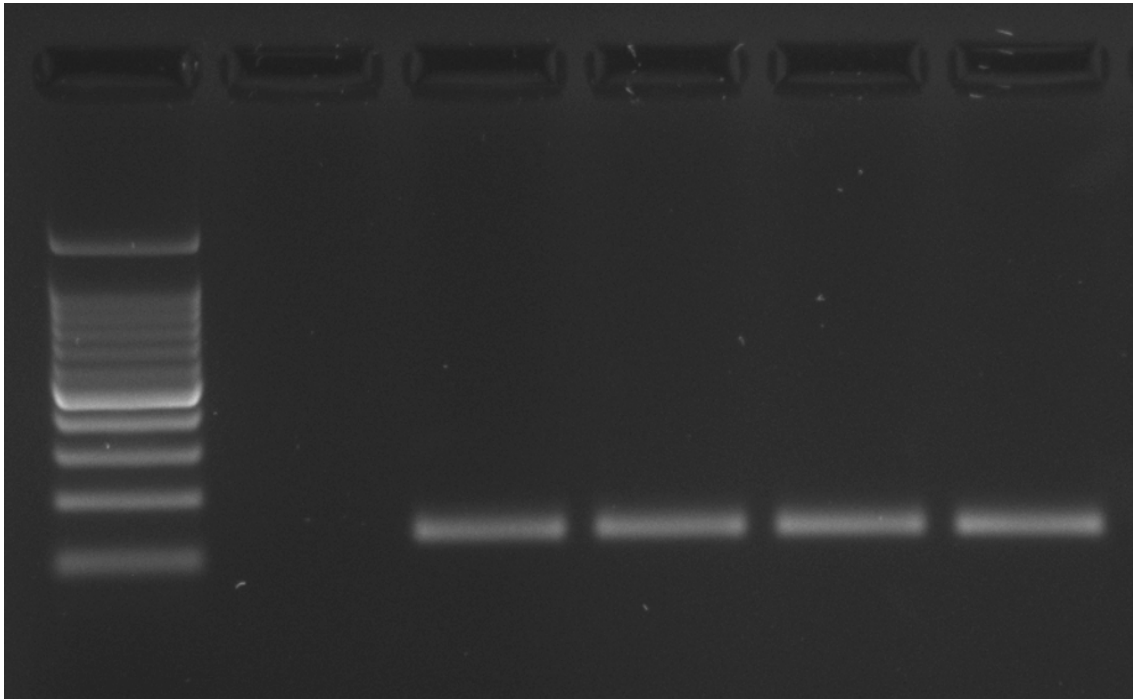


Abbildung A1: Exemplarisches Ergebnis einer Gelelektrophorese zur Qualitätsbeurteilung der PCR mit vier Proben und einer Negativkontrolle. An erster Position befindet sich eine 100 bp-DNA-Ladder als Referenz für die Länge der PCR-Produkte. Die zweite Position enthält als Negativkontrolle den PCR-Master-Mix ohne DNA. Da hier keine Bande zu sehen ist, kann eine Kontamination der verwendeten Reagenzien ausgeschlossen werden. An dritter bis sechster Position sind die Banden der PCR-Produkte mit einer ungefähren Länge von 140 bp zu sehen. Dies lässt auf eine erfolgreiche Amplifikation schließen. PCR = Polymerase-Kettenreaktion, bp = Basenpaare.

Anhang 4 Exemplarisches Ergebnis der Pyrosequenzierung

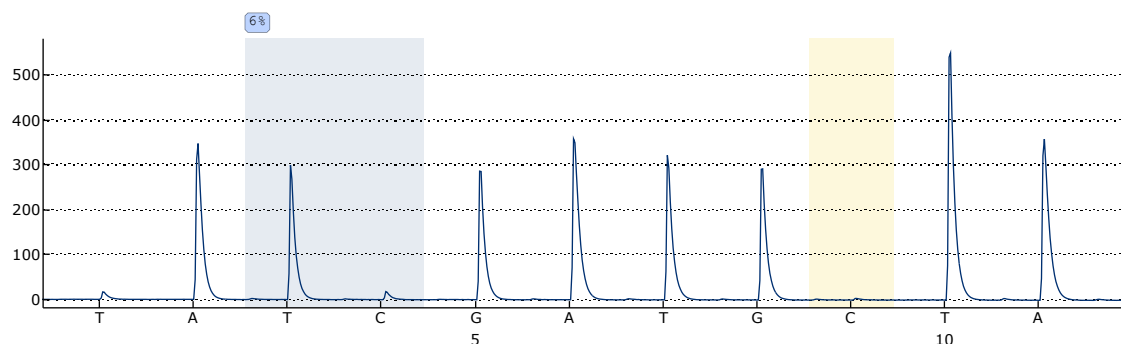


Abbildung A2: Exemplarisches Ergebnis einer Pyrosequenzierung von *HECW2* (cg18752527). Y-Achse: Intensität des Lichtsignals (arbiträre Einheit). X-Achse: Nukleotidfolge. Für diese exemplarische Probe eines Patienten aus EDTA-Vollblut beträgt das Methylierungslevel des untersuchten CpG-Dinukleotids von *HECW2* etwa 6 %. An Position 8 (gelb hinterlegt) wird eine Kontrolle der Bisulfit-Konvertierung durchgeführt. CpG = Cytosin-(Phosphat-)Guanin, T = Thymin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin.

Anhang 5 Fragebogen

Anhang 5.1 Symptom-Checklist-90-Revised (SCL-90-R)

Interne Version AG Molekulare Psychiatrie Probandennummer: Datum:	SCL- 90-R
--	--------------

Anleitung Sie finden auf diesem Blatt eine Liste von Problemen und Beschwerden, die man manchmal hat. Bitte lesen Sie jede Frage sorgfältig durch und entscheiden Sie, wie sehr Sie in den letzten sieben Tagen durch diese Beschwerden gestört oder bedrängt worden sind. Überlegen Sie bitte nicht erst, welche Antwort „den besten Eindruck“ machen könnte, sondern antworten Sie so, wie es für Sie persönlich zutrifft. Machen Sie bitte hinter jeder Frage nur ein Kreuz in das Kästchen mit der für Sie am besten zutreffenden Antwort. Streichen Sie versehentliche Antworten deutlich durch und kreuzen Sie danach das richtige Kästchen an. Bitte beantworten Sie jede Frage!	Beispiel: Frage: Wie sehr litten Sie in den letzten sieben Tagen unter Rückenschmerzen? Wenn bei Ihnen als Antwort auf diese Frage am besten „sehr stark“ zutrifft, dann kreuzen Sie bitte das Kästchen 4 = „sehr stark“ an. Alle Ihre Antworten werden selbstverständlich vertraulich behandelt.
--	--

Stärke Ihrer Zustimmung:

überhaupt nicht	ein wenig	ziemlich	stark	sehr stark
0	1	2	3	4

(4) = „sehr stark“ an.

Wie sehr litten Sie in den letzten sieben Tagen unter...?	Wie sehr litten Sie in den letzten sieben Tagen unter...?
überhaupt nicht ein wenig ziemlich stark sehr stark	überhaupt nicht ein wenig ziemlich stark sehr stark
1. Kopfschmerzen	21. Schüchternheit oder Unbeholfenheit im Umgang mit dem anderen Geschlecht
2. Nervosität oder innerem Zittern	22. der Befürchtung, ertappt oder erwischt zu werden
3. immer wieder auftauchenden unangenehmen Gedanken, Worten oder Ideen, die Ihnen nicht mehr aus dem Kopf gehen	23. plötzlichem Erschrecken ohne Grund
4. Ohnmachts- oder Schwindelgefühlen	24. Gefühlsausbrüchen, gegenüber denen Sie machtlos waren
5. Verminderung Ihres Interesses oder Ihrer Freude an Sexualität	25. Befürchtungen, wenn Sie alleine aus dem Haus gehen
6. allzu kritischer Einstellung gegenüber anderen	26. Selbstvorwürfen über bestimmte Dinge
7. der Idee, daß irgend jemand Macht über Ihre Gedanken hat	27. Kreuzschmerzen
8. dem Gefühl, daß andere an den meisten Ihrer Schwierigkeiten Schuld sind	28. dem Gefühl, daß es Ihnen schwerfällt, etwas anzufangen
9. Gedächtnisschwierigkeiten	29. Einsamkeitsgefühlen
10. Beunruhigung wegen Achtlosigkeit und Nachlässigkeit	30. Schwermut
11. dem Gefühl, leicht reizbar und verärgert zu sein	31. dem Gefühl, sich zu viele Sorgen machen zu müssen
12. Herz- und Brustschmerzen	32. dem Gefühl, sich für nichts zu interessieren
13. Furcht auf offenen Plätzen oder auf der Straße	33. Furchtsamkeit
14. Energielosigkeit oder Verlangsamung in den Bewegungen oder im Denken	34. Verletzlichkeit in Gefühlsdingen
15. Gedanken, sich das Leben zu nehmen	35. der Idee, daß andere Leute von Ihren geheimsten Gedanken wissen
16. Hören von Stimmen, die sonst keiner hört	36. dem Gefühl, daß andere Sie nicht verstehen oder teilnahmslos sind
17. Zittern	37. dem Gefühl, daß die Leute unfreundlich sind oder Sie nicht leiden können
18. dem Gefühl, daß man den meisten Menschen nicht trauen kann	38. der Notwendigkeit, alles sehr langsam zu tun, um sicher zu sein, daß alles richtig ist
19. schlechtem Appetit	39. Herzklopfen oder Herzjagen
20. Neigung zum Weinen	40. Übelkeit oder Magenverstimmung

Wie sehr litten Sie in den letzten sieben Tagen unter...?	überhaupt nicht ein wenig ziemlich sehr stark	Wie sehr litten Sie in den letzten sieben Tagen unter...?	überhaupt nicht ein wenig ziemlich sehr stark
41. Minderwertigkeitsgefühlen gegenüber anderen	0 1 1 2 3 4	66. unruhigem oder gestörtem Schlaf	0 1 1 2 3 4
42. Muskelschmerzen (Muskelkater, Gliederreißen)	0 1 1 2 3 4	67. dem Drang, Dinge zu zerbrechen oder zu zerschmettern	0 1 1 2 3 4
43. dem Gefühl, daß andere Sie beobachten oder über Sie reden	0 1 1 2 3 4	68. Ideen oder Anschauungen, die andere nicht mit Ihnen teilen	0 1 1 2 3 4
44. Einschlafschwierigkeiten	0 1 1 2 3 4	69. starker Befangenheit im Umgang mit anderen	0 1 1 2 3 4
45. dem Zwang, wieder und wieder nachzu- kontrollieren, was Sie tun	0 1 1 2 3 4	70. Abneigung gegen Menschenmengen, z. B. beim Einkaufen oder im Kino	0 1 1 2 3 4
46. Schwierigkeiten, sich zu entscheiden	0 1 1 2 3 4	71. einem Gefühl, daß alles sehr anstrengend ist	0 1 1 2 3 4
47. Furcht vor Fahrten in Bus, Straßenbahn, U-Bahn oder Zug	0 1 1 2 3 4	72. Schreck- und Panikanfällen	0 1 1 2 3 4
48. Schwierigkeiten beim Atmen	0 1 1 2 3 4	73. Unbehagen beim Essen oder Trinken in der Öffentlichkeit	0 1 1 2 3 4
49. Hitzewallungen und Kälteschauern	0 1 1 2 3 4	74. der Neigung, immer wieder in Erörte- rungen oder Auseinandersetzungen zu geraten	0 1 1 2 3 4
50. der Notwendigkeit, bestimmte Dinge, Orte oder Tätigkeiten zu meiden, weil Sie durch diese erschreckt werden	0 1 1 2 3 4	75. Nervosität, wenn Sie alleine gelassen werden	0 1 1 2 3 4
51. Leere im Kopf	0 1 1 2 3 4	76. mangelnder Anerkennung Ihrer Leistungen durch andere	0 1 1 2 3 4
52. Taubheit oder Kribbeln in einzelnen Körperteilen	0 1 1 2 3 4	77. Einsamkeitsgefühlen, selbst wenn Sie in Gesellschaft sind	0 1 1 2 3 4
53. dem Gefühl, einen Klumpen (Kloß) im Hals zu haben	0 1 1 2 3 4	78. so starker Ruhelosigkeit, daß Sie nicht stillsitzen können	0 1 1 2 3 4
54. einem Gefühl der Hoffnungslosigkeit angesichts der Zukunft	0 1 1 2 3 4	79. dem Gefühl, wertlos zu sein	0 1 1 2 3 4
55. Konzentrationsschwierigkeiten	0 1 1 2 3 4	80. dem Gefühl, daß Ihnen etwas Schlimmes passieren wird	0 1 1 2 3 4
56. Schwächegefühl in einzelnen Körperteilen	0 1 1 2 3 4	81. dem Bedürfnis, laut zu schreien oder mit Gegenständen zu werfen	0 1 1 2 3 4
57. dem Gefühl, gespannt oder aufgeregt zu sein	0 1 1 2 3 4	82. der Furcht, in der Öffentlichkeit in Ohn- macht zu fallen	0 1 1 2 3 4
58. Schweregefühl in den Armen oder den Beinen	0 1 1 2 3 4	83. dem Gefühl, daß die Leute Sie aus- nutzten, wenn Sie es zulassen würden	0 1 1 2 3 4
59. Gedanken an den Tod und ans Sterben	0 1 1 2 3 4	84. sexuellen Vorstellungen, die ziemlich unangenehm für Sie sind	0 1 1 2 3 4
60. dem Drang, sich zu überessen	0 1 1 2 3 4	85. dem Gedanken, daß Sie für Ihre Sünden bestraft werden sollten	0 1 1 2 3 4
61. einem unbehaglichen Gefühl, wenn Leute Sie beobachten oder über Sie reden	0 1 1 2 3 4	86. schreckenerregenden Gedanken und Vorstellungen	0 1 1 2 3 4
62. dem Auftauchen von Gedanken, die nicht Ihre eigenen sind	0 1 1 2 3 4	87. dem Gedanken, daß etwas ernstlich mit Ihrem Körper nicht in Ordnung ist	0 1 1 2 3 4
63. dem Drang, jemanden zu schlagen, zu verletzen oder ihm Schmerz zuzufügen	0 1 1 2 3 4	88. dem Eindruck, sich einer anderen Person nie so richtig nahe fühlen zu können	0 1 1 2 3 4
64. frühem Erwachen am Morgen	0 1 1 2 3 4	89. Schuldgefühlen	0 1 1 2 3 4
65. zwanghafter Wiederholung derselben Tätigkeit wie Berühren, Zählen, Waschen	0 1 1 2 3 4	90. dem Gedanken, daß irgend etwas mit Ih- rem Verstand nicht in Ordnung ist	0 1 1 2 3 4

Anhang 5.2 Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT)

	Code	Datum	Termin

AUDIT

Bitte lesen Sie jede Aussage und kreuzen Sie die für Sie zutreffendste Antwort an.

Als Maßeinheit für 1 Drink = ein 0,33 l Glas/Dose/Flasche Bier
 ein 0,2 l Glas Wein
 ein 2cl Glas Rum, Whiskey, Schnaps, usw.

1. Wie oft trinken Sie Alkohol? ☐ Nie ☐ 1mal im Monat oder seltener ☐ 2 bis 4mal im Monat ☐ 2 bis 3mal in der Woche ☐ 4 oder mehrmals in der Woche	6. Wie oft haben Sie im letzten Jahr morgens Alkohol gebraucht, um nach einem starken Alkoholkonsum wieder in die Gänge zu kommen? ☐ Nie ☐ Seltener als 1mal im Monat ☐ Jeden Monat ☐ Jede Woche ☐ Jeden Tag/fast jeden Tag
2. An den Tagen, an denen Sie trinken, wie viele Drinks konsumieren Sie dann typischerweise? ☐ 1-2 ☐ 3-4 ☐ 5-6 ☐ 7-9 ☐ 10 oder mehr	7. Wie oft hatten Sie im letzten Jahr Schuldgefühle oder ein schlechtes Gewissen nach dem Trinken? ☐ Nie ☐ Seltener als 1mal im Monat ☐ Jeden Monat ☐ Jede Woche ☐ Jeden Tag/fast jeden Tag
3. Wie oft trinken Sie 6 oder mehr Drinks pro Tag? ☐ Nie ☐ Seltener als 1 mal im Monat ☐ Jeden Monat ☐ Jede Woche ☐ Jeden Tag/fast jeden Tag	8. Wie oft konnten Sie sich im letzten Jahr nicht mehr an den vorangegangenen Abend erinnern, weil Sie getrunken hatten? ☐ Nie ☐ Seltener als 1mal im Monat ☐ Jeden Monat ☐ Jede Woche ☐ Jeden Tag/fast jeden Tag
4. Wie oft konnten Sie im letzten Jahr nicht mehr aufhören zu trinken, nachdem Sie einmal angefangen hatten? ☐ Nie ☐ Seltener als 1mal im Monat ☐ Jeden Monat ☐ Jede Woche ☐ Jeden Tag/fast jeden Tag	9. Wurden Sie oder jemand anderes infolge Ihres Trinkens schon einmal verletzt? ☐ Nein ☐ Ja, aber nicht im letzten Jahr ☐ Ja, im letzten Jahr
5. Wie oft konnten Sie im letzten Jahr wegen des Trinkens nicht das tun, was von Ihnen normalerweise erwartet wurde? ☐ Nie ☐ Seltener als 1mal im Monat ☐ 1mal im Monat ☐ 1mal in der Woche ☐ Fast täglich	10. War ein Verwandter, Freund oder Arzt um Ihr Trinken besorgt oder haben sie Ihnen geraten, Ihren Alkoholkonsum zu verringern? ☐ Nein ☐ Ja, aber nicht im letzten Jahr ☐ Ja, im letzten Jahr

Anhang 5.3 Obsessive Compulsive Drinking Scale (OCDS-G)

Obsessive Compulsive Drinking Scale, deutsche Version (OCDS-G)

Die folgenden Fragen beziehen sich auf Ihren Alkoholkonsum und auf Gedanken, Vorstellungen, Impulse oder Bilder, die mit dem Trinken von Alkohol zusammenhängen. Bitte kreuzen Sie jeweils die Aussage an, die am ehesten auf Sie zutrifft. Falls nicht anders angegeben, beziehen sich die Fragen auf den Zeitraum der vergangenen sieben Tage.

1. Wenn Sie keinen Alkohol trinken, wie viel Ihrer Zeit wird dann von Vorstellungen, Gedanken, Impulsen oder Bildern beansprucht, die etwas mit dem Trinken zu tun haben?

- ☐ Keine
- ☐ Weniger als eine Stunde am Tag
- ☐ 1-3 Stunden am Tag
- ☐ 4-8 Stunden am Tag
- ☐ Mehr als 8 Stunden am Tag

2. Wie häufig treten diese Gedanken oder Vorstellungen auf?

- ☐ Niemals
- ☐ Nicht häufiger als achtmal am Tag
- ☐ Häufiger als achtmal am Tag, aber die meisten Stunden des Tages sind frei davon
- ☐ Mehr als achtmal am Tag und während der meisten Stunden des Tages
- ☐ Die Gedanken treten so häufig auf, dass man sie nicht mehr zählen kann, und es vergeht kaum eine Stunde, in der sie nicht auftreten

3. Wie stark werden Ihre berufliche Tätigkeit oder Ihr soziales Verhalten von diesen Vorstellungen, Gedanken, Impulsen oder Bildern beeinflusst? Gibt es etwas, was sie deswegen nicht tun oder nicht können? (Falls sie gerade nicht berufstätig sind: Wie sehr wäre Ihre berufliche Tätigkeit dadurch beeinflusst, falls Sie arbeiten würden?)

- ☐ Die Gedanken an Alkohol beeinflussen mich überhaupt nicht - ich arbeite oder verhalte mich völlig normal.
- ☐ Die Gedanken an Alkohol beeinflussen mein soziales Verhalten oder meine beruflichen Tätigkeiten in geringem Maße, mein Auftreten oder meine Leistung insgesamt ist jedoch nicht beeinträchtigt.
- ☐ Die Gedanken an Alkohol beeinflussen mein soziales Verhalten oder meine berufliche Leistung eindeutig, ich komme aber noch damit zurecht.
- ☐ Die Gedanken an Alkohol beeinträchtigen mein soziales Verhalten oder meine berufliche Leistung ganz erheblich.
- ☐ Die Gedanken an Alkohol beeinträchtigen mein soziales Verhalten oder meine Arbeitsleistung vollständig.

4. Wenn Sie keinen Alkohol trinken, wie sehr leiden Sie dann unter den Vorstellungen, Gedanken, Impulsen oder Bildern, die mit dem Trinken zu tun haben bzw. wie sehr werden Sie dadurch gestört.

- ☐ Keine Belastung oder Störung
- ☐ Geringfügig, selten und nicht besonders störend
- ☐ Mäßig, häufig und störend; ich kann aber noch damit zurechtkommen
- ☐ Stark, sehr häufig und sehr störend
- ☐ Extrem stark, fast durchgängig, alles andere wird beeinträchtigt.

5. **Wenn Sie keinen Alkohol trinken, wie sehr bemühen Sie sich dann, diesen Gedanken zu widerstehen, Sie nicht zu beachten oder Ihre Aufmerksamkeit auf etwas Anderes zu lenken?**

(Geben Sie das Ausmaß Ihrer Bemühungen um Widerstand gegen diese Gedanken an, nicht den Erfolg oder Misserfolg, den Sie dabei haben.)

- ☐ Ich habe so selten derartige Gedanken, dass es nicht notwendig ist, dagegen anzugehen. Wenn Sie aber auftauchen, bemühe ich mich immer, diesen Gedanken zu widerstehen.
- ☐ Ich versuche meistens, diesen Gedanken zu widerstehen.
- ☐ Ich unternehme einige Anstrengungen, um diesen Gedanken zu widerstehen.
- ☐ Ich lasse allen derartigen Gedanken freien Lauf, ohne zu versuchen, sie zu kontrollieren. Dabei habe ich allerdings ein ungutes Gefühl.
- ☐ Ich lasse diesen Gedanken freien Lauf.

6. **Wenn Sie keinen Alkohol trinken, wie erfolgreich können Sie dann diese Gedanken beenden oder sie zerstreuen?**

- ☐ Es gelingt mir stets vollkommen, diese Gedanken zu beenden oder sie zu zerstreuen.
- ☐ Gewöhnlich kann ich diese Gedanken mit einiger Anstrengung und Konzentration beenden oder zerstreuen.
- ☐ Manchmal kann ich diese Gedanken beenden oder sie zerstreuen.
- ☐ Ich kann diese Gedanken nur ganz selten beenden und sie nur sehr schwerlich zerstreuen.
- ☐ Selbst für kurze Momente kann ich solche Gedanken nur selten zerstreuen.

7. **Wie viele „drinks“ nehmen Sie täglich zu sich? (Denken Sie an die letzten Wochen, in denen Sie Alkohol getrunken haben.)**

- ☐ Keinen
- ☐ Weniger als einen „drink“ (entspricht *weniger als 0,33 Liter Bier oder 1/8 Liter Wein oder 30 ml Schnaps*)
- ☐ 1-2 „drinks“ täglich (entspricht *maximal 0,66 Liter Bier oder 1/4 Liter Wein oder 60 ml Schnaps*)
- ☐ 3-7 „drinks“ täglich (entspricht *bis 2,5 Liter Bier oder bis 1 Liter Wein oder bis 200 ml Schnaps*)
- ☐ 8 oder mehr „drinks“ täglich (entspricht *mehr als 2,5 Liter Bier oder mehr als 1 Liter Wein oder mehr als 200 ml Schnaps*)

8. **An wie vielen Tagen in der Woche trinken Sie Alkohol? (Denken Sie an die letzten Wochen, in denen Sie Alkohol getrunken haben.)**

- ☐ An keinem
- ☐ An nicht mehr als einem Tag
- ☐ An 2-3 Tagen die Woche
- ☐ An 4-5 Tagen die Woche
- ☐ An 6-7 Tagen die Woche

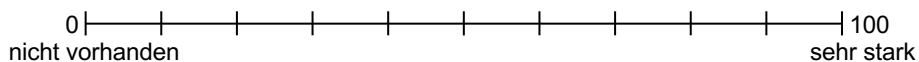
9. **Wie stark wird Ihre berufliche Tätigkeit durch das Trinken von Alkohol beeinflusst? Gibt es etwas, was Sie wegen Ihres Trinkens nicht tun oder nicht können?**

(Falls Sie gerade nicht berufstätig sind: Wie sehr wäre Ihre berufliche Tätigkeit beeinflusst, falls Sie arbeiten würden?)

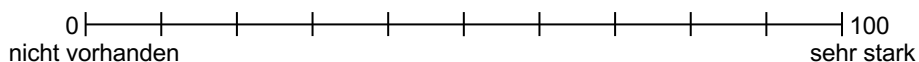
- ☐ Das Trinken beeinflusst mich beruflich überhaupt nicht – ich arbeite völlig normal.
- ☐ Das Trinken beeinflusst meine beruflichen Tätigkeiten in geringem Maße, meine Arbeitskraft insgesamt ist jedoch nicht beeinträchtigt.
- ☐ Das Trinken beeinflusst meine berufliche Leistung eindeutig, ich komme aber noch damit zurecht.
- ☐ Das Trinken beeinträchtigt meine berufliche Leistung ganz erheblich.
- ☐ Das Trinken beeinträchtigt meine Arbeitsleistung völlig.

- 10. Wie stark wird Ihr soziales Verhalten durch das Trinken von Alkohol beeinflusst? Gibt es etwas, was Sie wegen Ihres Trinkens nicht tun oder nicht können?**
- ☐ Das Trinken beeinflusst mein soziales Verhalten überhaupt nicht – ich verhalte mich völlig normal.
 - ☐ Das Trinken beeinflusst mein soziales Verhalten in geringem Maße, mein Auftreten insgesamt ist jedoch nicht beeinträchtigt.
 - ☐ Das Trinken beeinflusst mein soziales Verhalten eindeutig, ich komme aber noch damit zurecht.
 - ☐ Das Trinken beeinträchtigt mein soziales Verhalten ganz erheblich.
 - ☐ Das Trinken beeinträchtigt mein soziales Verhalten völlig.
- 11. Wenn Sie ein alkoholisches Getränk trinken möchten, aber daran gehindert wären, wie ängstlich oder ungehalten würden Sie dann werden?**
- ☐ Ich würde überhaupt nicht ängstlich oder gereizt.
 - ☐ Ich würde in geringem Maße ängstlich oder gereizt.
 - ☐ Angst oder Reizbarkeit würden ansteigen, aber noch zu beherrschen sein.
 - ☐ Angst oder Reizbarkeit würden für mich sehr stark und störend.
 - ☐ Angst oder Reizbarkeit würden mich völlig überwältigen.
- 12. Wie sehr bemühen Sie sich, dem Trinken von Alkohol zu widerstehen? (Geben Sie das Ausmaß Ihrer Bemühungen um Widerstand gegen das Trinken an, nicht den Erfolg oder Misserfolg, den Sie dabei haben.)**
- ☐ Ich trinke so minimal, dass es nicht notwendig ist, dagegen anzugehen. Wenn ich doch trinke, bemühe ich mich immer, dem Trinken zu widerstehen.
 - ☐ Ich versuche meistens, dem Trinken zu widerstehen.
 - ☐ Ich unternehme einige Anstrengungen, um dem Trinken zu widerstehen.
 - ☐ Ich lasse dem Trinken meistens freien Lauf, ohne zu versuchen, es zu kontrollieren. Dabei habe ich ein ungutes Gefühl.
 - ☐ Ich lasse dem Trinken völlig freien Lauf.
- 13. Wie stark ist Ihr Drang, Alkohol zu trinken?**
- ☐ Ich verspüre keinen Drang.
 - ☐ Ich verspüre etwas Drang, Alkohol zu trinken.
 - ☐ Ich verspüre starken Drang, Alkohol zu trinken.
 - ☐ Ich verspüre sehr starken Drang, Alkohol zu trinken.
 - ☐ Der Drang zum Trinken ist völlig überwältigend und nicht zu beeinflussen.
- 14. Wie viel Kontrolle haben Sie über Ihr Trinkverhalten?**
- ☐ Ich habe mein Trinkverhalten völlig unter Kontrolle.
 - ☐ Gewöhnlich kann ich mein Trinkverhalten unter willentlicher Kontrolle halten.
 - ☐ Ich kann mein Trinkverhalten nur unter Schwierigkeiten kontrollieren.
 - ☐ Ich muss trinken und kann es nur unter Schwierigkeiten hinausschieben.
 - ☐ Ich bin kaum in der Lage, das Trinken auch nur für kurze Zeit hinauszuschieben.

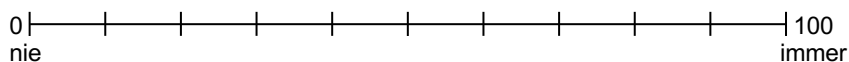
15. Wie stark war während der letzten sieben Tage Ihr Verlangen nach Alkohol (der Wunsch nach Alkohol, während der Zeit, in der sie nicht tranken) im Durchschnitt?



16. Denken Sie bitte einmal an den Moment innerhalb der letzten sieben Tage zurück, als das Verlangen nach Alkohol am stärksten war. Wie stark war dieses Verlangen?



17. Wie häufig hatten Sie während der letzten sieben Tage Verlangen nach Alkohol (den Wunsch nach Alkohol, während der Zeit, in der sie nicht tranken)?



18. Wann haben Sie zuletzt Alkohol getrunken?

. Vor

--	--	--

 Tagen

Bitte prüfen Sie, ob sie alle Fragen beantwortet haben.

Herzlichen Dank!

Anhang 6 Zusätzliche Tabellen statistischer Analysen

Tabelle A1: Bericht über die Normalverteilung. Analysiert pro Variable, Gruppe (Patienten/Kontrollprobanden) und Zeitpunkt mittels Shapiro-Wilk-Tests.

Variable	Zeitpunkt	p-Wert	
		Patienten	Kontrollprobanden
HECW2-DNA _m in Blut	T1	< .001	.197
	T2	.002	.153
	T3	.216 ^a	.061
	T4	.013	.643
HECW2-DNA _m in Speichel	T1	< .001	< .001
	T2	< .001	< .001
	T3	.004	< .001
	T4	< .001	.002
GSI-Score	T1	.022	.327
	T2	.264	.247
	T3	.895	.878
	T4	.715 ^a	.186
AUDIT-Score	T1	.015	< .001
	T2	.183	< .001
	T3	.546	< .001
	T4	.711 ^a	< .001
OCDS-Score	T1	.264	< .001
	T2	.385	< .001
	T3	.645 ^a	< .001
	T4	.199 ^a	< .001
Alter	T1	.587	< .001

Anmerkung. p-Werte von > .05 implizieren eine Normalverteilung. Nicht-normalverteilte Werte sind grau hinterlegt. Analyse vor Ausschluss von Ausreißern. DNA_m = DNA-Methylierung, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

^a Im Histogramm fraglich normalverteilt.

Tabelle A2: Bericht über die Normalverteilung. Analysiert pro Variable, Gruppe (Patienten/Kontrollprobanden) und Differenz zweier Zeitpunkte mittels Shapiro-Wilk-Tests.

Variable	Zeitpunkte	p-Wert	
		Patienten	Kontrollprobanden
HECW2-DNA in Blut	T1/T2	.034	.020
	T1/T3	.061 ^a	.008
	T1/T4	.813	.246
	T2/T3	.109	.173
	T2/T4	.395 ^a	.128
	T3/T4	.027	.041
HECW2-DNA in Speichel	T1/T2	< .001	.110
	T1/T3	.006	.553
	T1/T4	< .001	.231
	T2/T3	< .001	.048
	T2/T4	< .001	.249
	T3/T4	.190 ^a	.233
GSI-Score	T1/T2	.039	< .001
	T1/T3	.970	.077
	T1/T4	.489	.441
	T2/T3	.074 ^a	.277
	T2/T4	.041	.387
	T3/T4	.007	.162 ^a
AUDIT-Score	T1/T2	.741	< .001
	T1/T3	.538 ^a	< .001
	T1/T4	.135 ^a	< .001
	T2/T3	.965 ^a	< .001
	T2/T4	.306 ^a	< .001
	T3/T4	.771 ^a	< .001
OCDS-Score	T1/T2	.123	< .001
	T1/T3	.973	< .001
	T1/T4	.851 ^a	< .001
	T2/T3	.153 ^a	< .001

Variable	Zeitpunkte	p-Wert	
		Patienten	Kontrollprobanden
	T2/T4	.224 ^a	< .001
	T3/T4	.943 ^a	< .001

Anmerkung. p-Werte von > .05 implizieren eine Normalverteilung. Nicht-normalverteilte Werte sind grau hinterlegt. Analyse vor Ausschluss von Ausreißern. DNAm = DNA-Methylierung, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

^a Im Histogramm fraglich normalverteilt.

Tabelle A3: Bericht über die Normalverteilung. Analysiert pro Variable, Subgruppe (rückfällige/nicht-rückfällige Patienten) und Zeitpunkt mittels Shapiro-Wilk-Tests.

Variable	Zeitpunkt	p-Wert	
		rückfällige Patienten	nicht-rückfällige Patienten
HECW2-DNAm in Blut	T1	.003	.828 ^a
	T2	.053 ^a	.522 ^a
	T3	.075 ^a	.879 ^a
	T4	.017	.065 ^a
HECW2-DNAm in Speichel	T1	< .001	.075 ^a
	T2	.494 ^a	.309 ^a
	T3	.027	.630
	T4	.031	.431 ^a
GSI-Score	T1	.053 ^a	.523
	T2	.332 ^a	.045
	T3	.823 ^a	.985 ^a
	T4	.423 ^a	.727 ^a
AUDIT-Score	T1	.624 ^a	.805
	T2	.922 ^a	.429 ^a
	T3	.171 ^a	.228 ^a
	T4	.683 ^a	/ ^b
OCDS-Score	T1	.557 ^a	.590 ^a
	T2	.359 ^a	.431 ^a
	T3	.443 ^a	.090 ^a
	T4	.040	.090 ^a

Variable	Zeitpunkt	p-Wert	
		rückfällige Patienten	nicht-rückfällige Patienten
Alter	T1	.480	.760 ^a

Anmerkung. p-Werte von > .05 implizieren eine Normalverteilung. Nicht-normalverteilte Werte sind grau hinterlegt. Analyse vor Ausschluss von Ausreißern. DNAm = DNA-Methylierung, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

^a Im Histogramm fraglich normalverteilt. ^b Zu T4 bei den nicht-rückfälligen Patienten keine Normalverteilungsberechnung mit dem Shapiro-Wilk-Test für den AUDIT-Score möglich, da $n = 2$. n = Größe der Teilstichprobe.

Tabelle A4: Bericht über die Normalverteilung. Analysiert pro Variable, Subgruppe (rückfällige/nicht-rückfällige Patienten) und Differenz zweier Zeitpunkte mittels Shapiro-Wilk-Tests.

Variable	Zeitpunkte	p-Wert	
		rückfällige Patienten	nicht-rückfällige Patienten
HECW2-DNAm in Blut	T1/T2	.623	.010
	T1/T3	.122 ^a	.387 ^a
	T1/T4	.155	.893 ^a
	T2/T3	.567 ^a	.283 ^a
	T2/T4	.732 ^a	.051 ^a
	T3/T4	.198 ^a	.372 ^a
HECW2-DNAm in Speichel	T1/T2	.049	.493 ^a
	T1/T3	.061 ^a	.473 ^a
	T1/T4	.049	.901 ^a
	T2/T3	.009	.775 ^a
	T2/T4	.005	.534 ^a
	T3/T4	.728 ^a	.286 ^a
GSI-Score	T1/T2	.819 ^a	.731 ^a
	T1/T3	.665 ^a	.384 ^a
	T1/T4	.036	.985 ^a
	T2/T3	.271 ^a	.494 ^a
	T2/T4	.056 ^a	.398 ^a
	T3/T4	.198 ^a	.414 ^a

Variable	Zeitpunkte	p-Wert	
		rückfällige Patienten	nicht-rückfällige Patienten
AUDIT-Score	T1/T2	.720 ^a	.796 ^a
	T1/T3	.473 ^a	.958 ^a
	T1/T4	.317 ^a	/ ^b
	T2/T3	.466 ^a	.567 ^a
	T2/T4	.463 ^a	/ ^b
	T3/T4	.709 ^a	/ ^b
OCDS-Score	T1/T2	.469 ^a	.974
	T1/T3	.665	.650 ^a
	T1/T4	.487 ^a	.916 ^a
	T2/T3	.474 ^a	.492 ^a
	T2/T4	.045	.730 ^a
	T3/T4	.477 ^a	.548 ^a

Anmerkung. p-Werte von > .05 implizieren eine Normalverteilung. Nicht-normalverteilte Werte sind grau hinterlegt. Analyse vor Ausschluss von Ausreißern. DNAm = DNA-Methylierung, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

^a Im Histogramm fraglich normalverteilt. ^b Zu T1/T4, T2/T4 und T3/T4 bei den nicht-rückfälligen Patienten keine Normalverteilungsberechnung mit dem Shapiro-Wilk-Test für den AUDIT-Score möglich, da $N = 2$. N = Größe der Gesamtstichprobe.

Tabelle A5: Korrelationen der Fragebogen-Scores von GSI, AUDIT und OCDS über beide Gruppen und alle Zeitpunkte hinweg.

		GSI	AUDIT	OCDS
r_s		1.000	.589*	.554*
Signifikanz	GSI	/	< .001	< .001
n		429	354	421
r_s		.589*	1.000	.847*
Signifikanz	AUDIT	< .001	/	< .001
n		354	356	349
r_s		.554*	.874*	1.000
Signifikanz	OCDS	< .001	< .001	/
n		421	349	428

Anmerkung. Bivariate Korrelation nach Spearman. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

Tabelle A6: Korrelationen der Fragebogen-Scores von GSI, AUDIT und OCDS getrennt nach Patienten und Kontrollprobanden über alle Zeitpunkte hinweg.

Gruppe			GSI	AUDIT	OCDS
Patienten	r_s		1.000	.384*	.547*
	Signifikanz	GSI	/	< .001	< .001
	n		147	116	145
	r_s		.384*	1.000	.677*
	Signifikanz	AUDIT	< .001	/	< .001
	n		116	118	116
	r_s		.547*	.677*	1.000
	Signifikanz	OCDS	< .001	< .001	/
	n		145	116	150
Kontrollprobanden	r_s		1.000	.241*	.098
	Signifikanz	GSI	/	< .001	.103
	n		282	238	276
	r_s		.241*	1.000	.705*
	Signifikanz	AUDIT	< .001	/	< .001
	n		238	238	233
	r_s		.098	.705*	1.000
	Signifikanz	OCDS	.103	< .001	/
	n		276	233	278

Anmerkung. Bivariate Korrelation nach Spearman. * = statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, GSI = *Global Severity Index*, AUDIT = *Alcohol Use Disorders Identification Test*, OCDS = *Obsessive Compulsive Drinking Scale*.

Anhang 7 Zusätzliche Diagramme

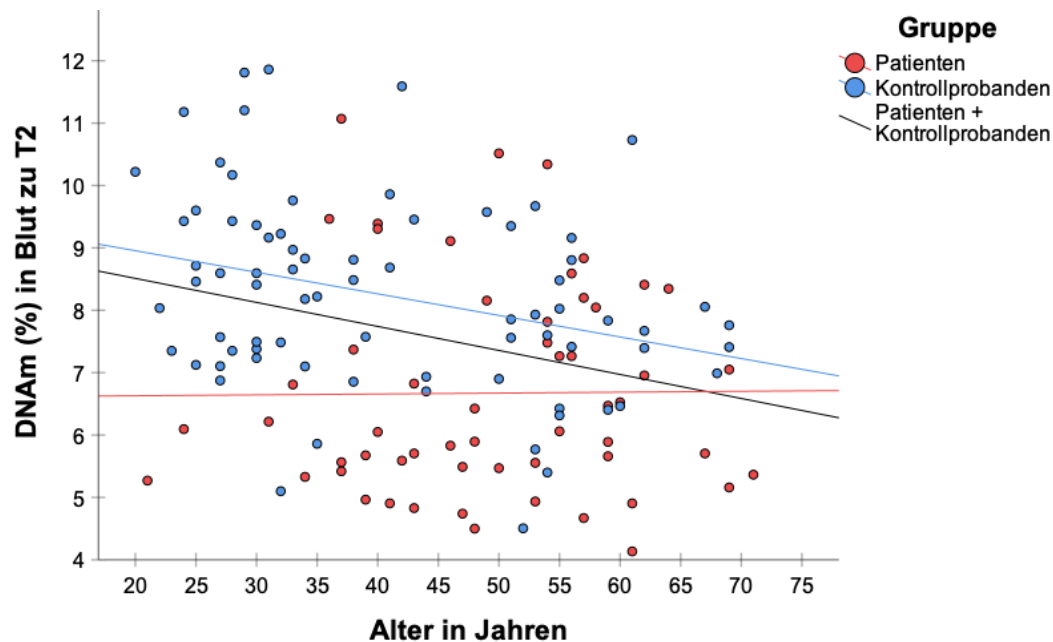


Abbildung A3: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Blut zu T2 und dem Alter in Jahren. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.275^*$, $p = .001$, $n = 132$; P: $r_s = .030$, $p = .827$, $n = 56$; K: $r_s = -.295^*$, $p = .010$, $n = 76$. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

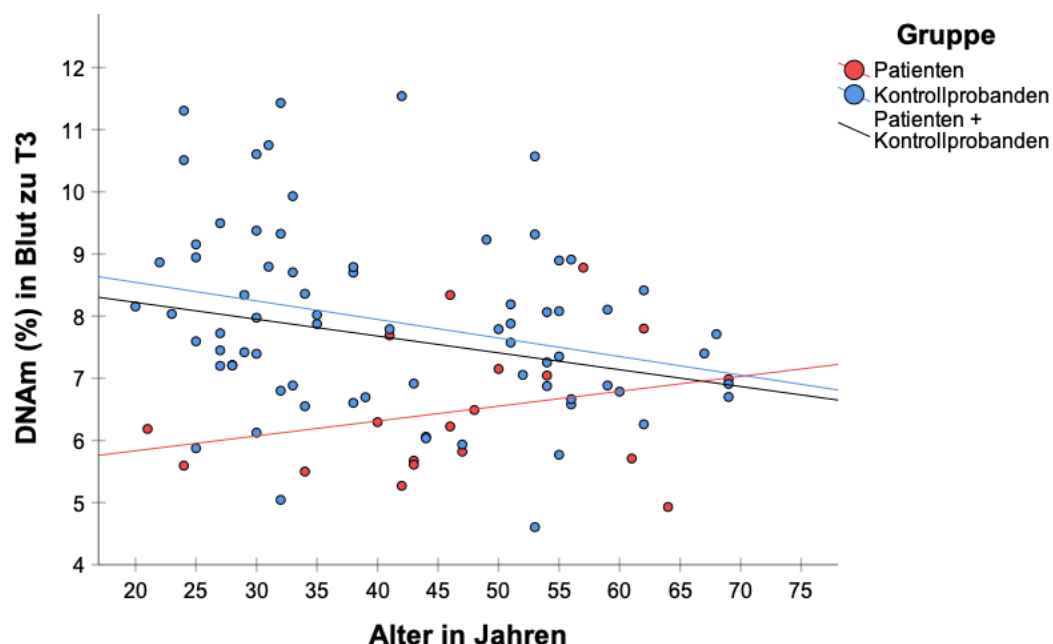


Abbildung A4: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Blut zu T3 und dem Alter in Jahren. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.228^*$, $p = .029$, $n = 92$; P: $r_s = .324$, $p = .176$, $n = 19$; K: $r_s = -.290^*$, $p = .013$, $n = 73$. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

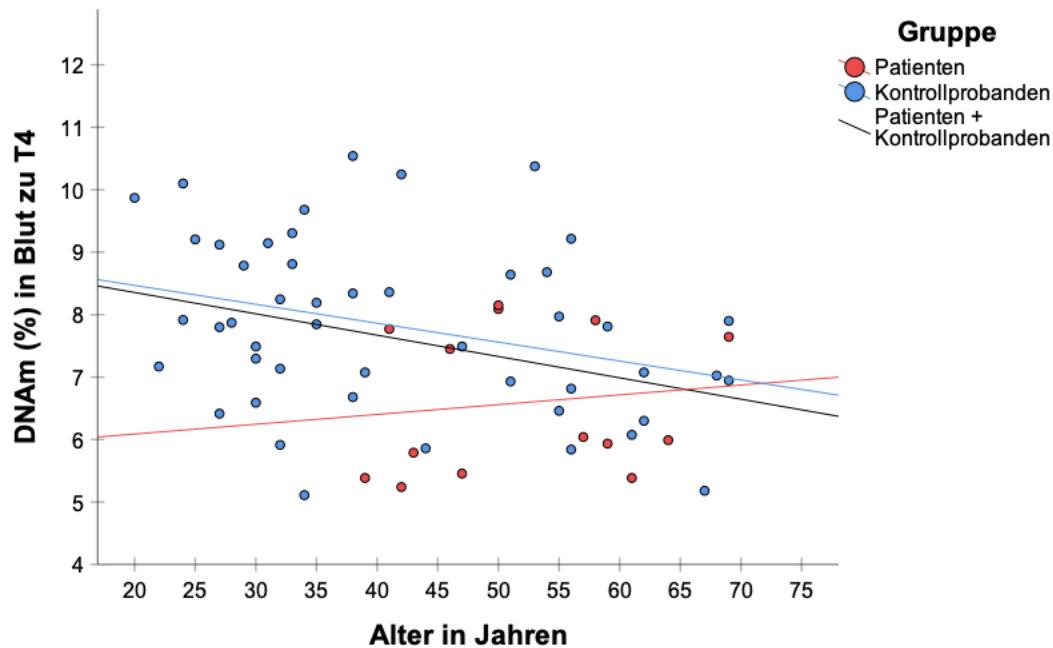


Abbildung A5: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Blut zu T4 und dem Alter in Jahren. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.352^*$, $p = .005$, $n = 62$; P: $r_s = .222$, $p = .445$, $n = 14$; K: $r_s = -.315^*$, $p = .029$, $n = 48$. * = auf nach Bonferroni-Holm korrigiertem Signifikanzniveau statistisch signifikant. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

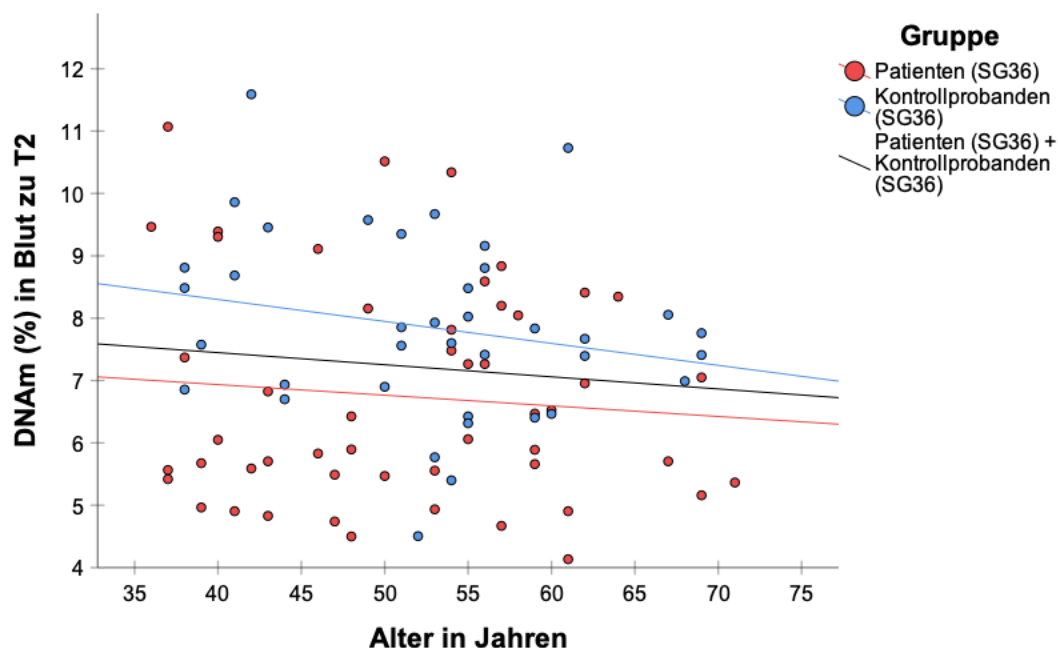


Abbildung A6: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Blut zu T2 und dem Alter in Jahren in der SG36. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. P(SG36)+K(SG36): $r_s = -.060$, $p = .579$, $n = 89$; P(SG36): $r_s = -.035$, $p = .805$, $n = 51$; K(SG36): $r_s = -.204$, $p = .219$, $n = 38$. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

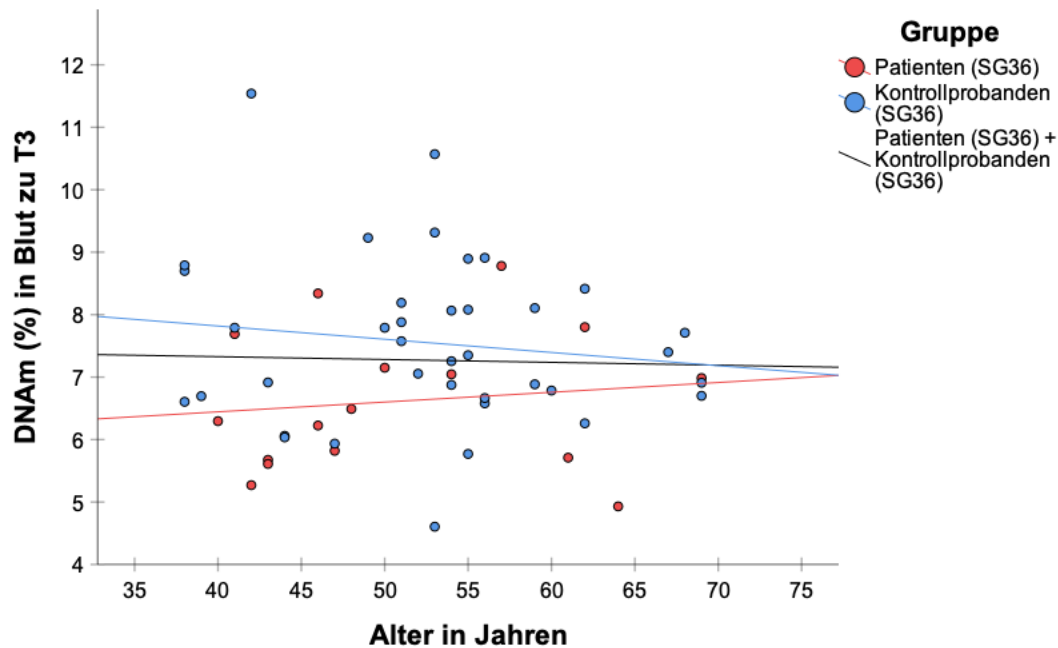


Abbildung A7: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Blut zu T3 und dem Alter in Jahren in der SG36. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. P(SG36)+K(SG36): $r_s = .0548$, $p = .730$, $n = 54$; P(SG36): $r_s = .166$, $p = .538$, $n = 16$; K(SG36): $r_s = -.101$, $p = .547$, $n = 38$. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

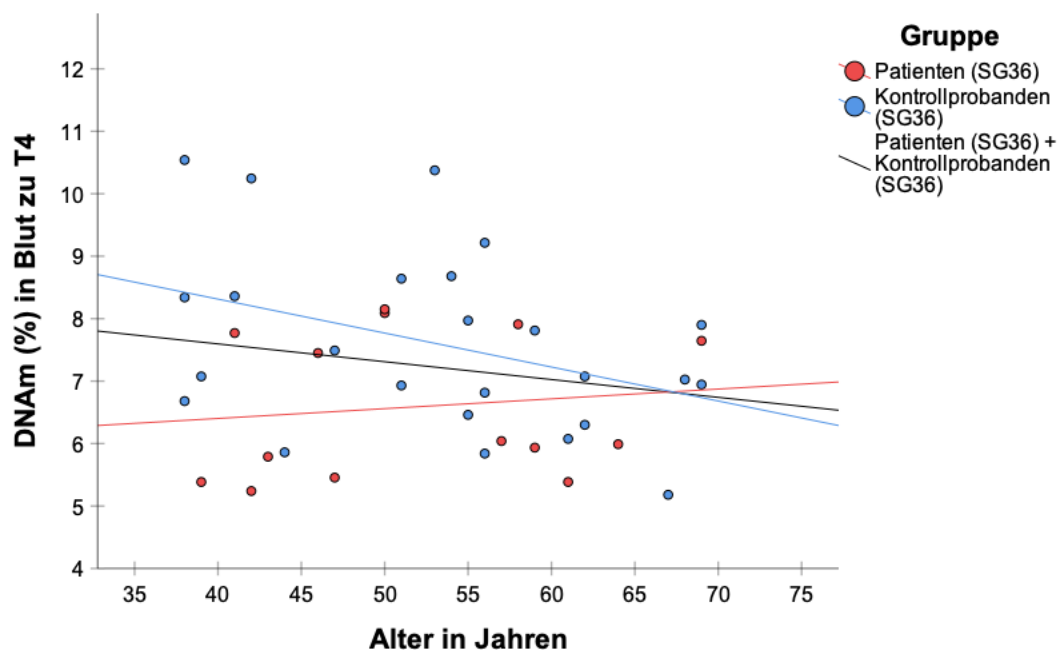


Abbildung A8: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Blut zu T4 und dem Alter in Jahren in der SG36. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. P(SG36)+K(SG36): $r_s = -.190$, $p = .246$, $n = 39$; P(SG36): $r_s = .222$, $p = .445$, $n = 14$; K(SG36): $r_s = -.369$, $p = .070$, $n = 25$. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, SG36 = Alters-Subgruppe der Probanden ≥ 36 Jahre, DNAm = DNA-Methylierung.

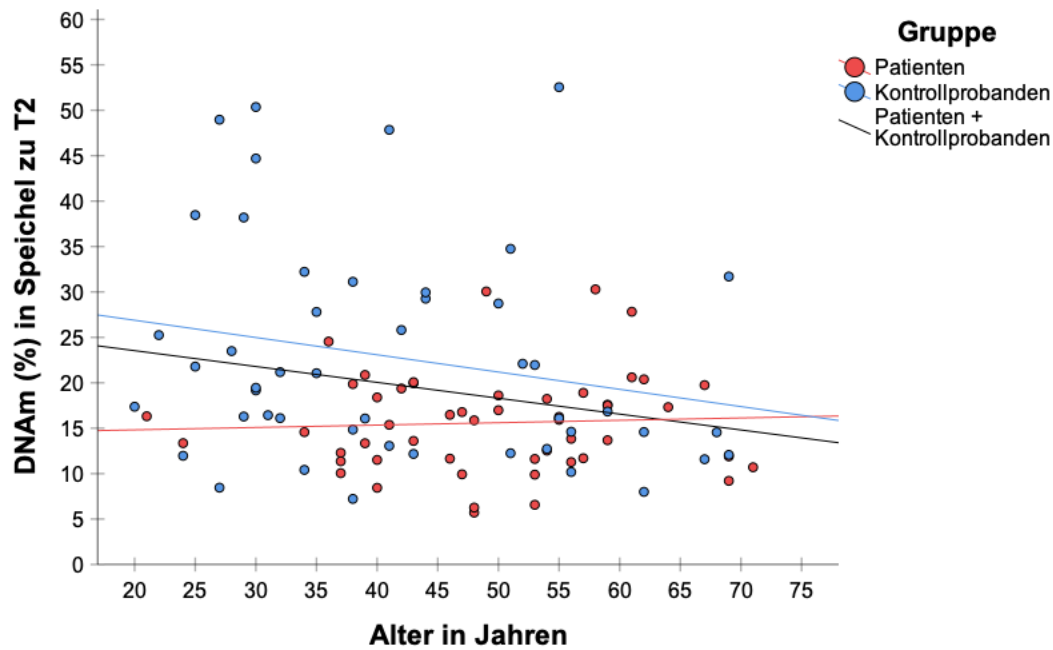


Abbildung A9: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Speichel zu T2 und dem Alter in Jahren. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.214$, $p = .033$, $n = 99$; P: $r_s = .075$, $p = .601$, $n = 51$; K: $r_s = -.257$, $p = .077$, $n = 48$. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.

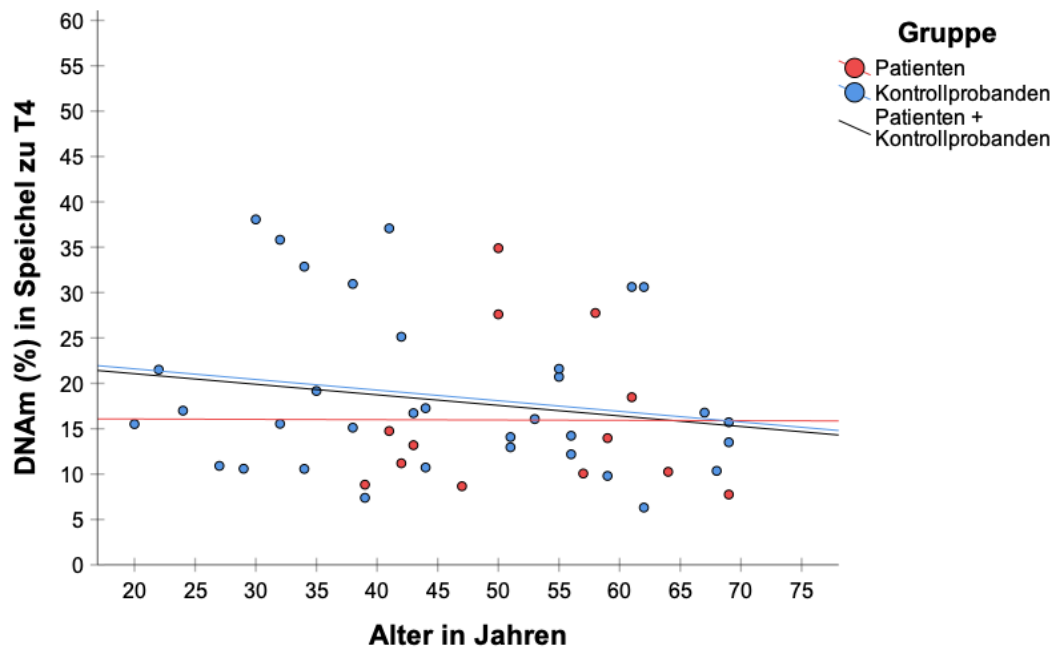


Abbildung A10: Korrelation zwischen der HECW2-DNA_m (%) in Speichel zu T4 und dem Alter in Jahren. Alter entspricht dem Alter zu T1. Bivariate Korrelation nach Spearman. P+K: $r_s = -.214$, $p = .150$, $n = 47$; P: $r_s = -.006$, $p = .986$, $n = 13$; K: $r_s = -.208$, $p = .237$, $n = 34$. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman, n = Größe der Teilstichprobe, P = Patienten, K = Kontrollprobanden, DNAm = DNA-Methylierung.