

**Untersuchungen der Assoziationen der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-  
und Catechol-O-Methyltransferase-Polymorphismen auf  
den postoperativen Verlauf kardiochirurgischer Patienten**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Julia Tews

geboren am 13.10.1986 in Schkeuditz

angefertigt in der Universität Leipzig

Herzzentrum, Klinik für Herzchirurgie

Betreuer: Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 21.04.2015

## Bibliografische Beschreibung

Tews, Julia

Untersuchungen der Assoziationen der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor- und Catechol-O-Methyltransferase-Polymorphismen auf den postoperativen Verlauf kardiochirurgischer Patienten

Universität Leipzig, Dissertation

161 S., 199 Lit., 78 Abb., 17 Tab.

Referat:

Das Ziel der Untersuchungen war einen möglichen Einfluss von Genpolymorphismen auf den postoperativen Verlauf kardiochirurgischer Patienten aufzudecken. Es wurde präoperativ das zu untersuchende Blut entnommen und zentrifugiert. Das überstehende Blutplasma diente der Bestimmung des Catecholaminspiegels mittels HPLC. Aus den korpuskulären Bestandteilen wurde die DNA isoliert und zur Genanalyse verwendet. Die Polymerase-Ketten-Reaktion mit anschließender Schmelzkurvenanalyse ermöglichte eine Differenzierung der 145A>G, 1165G>C  $\beta_1$ -Adrenorezeptor- und 472G>A COMT-Polymorphismen. Der postoperative Verlauf der Patienten wurde bis zu deren Entlassung aufgezeichnet. Unter Betrachtung der einzelnen Polymorphismen zeigten sich Unterschiede im postoperativen Noradrenalinverbrauch, im postoperativen Gesamtcatecholaminverbrauch, in der Aufenthaltsdauer im Krankenhaus und im präoperativen Noradrenalinplasma Spiegel. Patienten mit dem 145G/X und 1165CC waren signifikant länger im Krankenhaus als die Träger des 145AA und 1165G/X. Der postoperative Noradrenalinverbrauch und Gesamtcatecholaminverbrauch unterlag der Beeinflussung der drei Polymorphismen. Die Träger des 145G/X, 1165G/X und 472GG hatten einen signifikant höheren Noradrenalinverbrauch als die 145AA, 1165CC und 472A/X Träger. Im zweiten Schritt der Analyse wurden die SNP-Kombinationen berücksichtigt. Es stellte sich heraus, dass sich unter Betrachtung dieser die zuvor festgestellten signifikanten Zusammenhänge auflösten. Demzufolge ist eine Betrachtung der SNP-Kombinationen wichtig um genetische Risiken identifizieren zu können und keine Risiken in Datensätze hinein zu interpretieren.

## Abkürzungsverzeichnis

### Aminosäuren:

|                   |   |
|-------------------|---|
| Arg               | Arginin                                   |
| Gly               | Glycin                                    |
| Ser               | Serin                                     |
| Met               | Methionin                                 |
| Val               | Valin                                     |
| Å                 | Angström                                  |
| α                 | alpha                                     |
| AMP               | Adenosinmonophosphat                      |
| β                 | beta                                      |
| °C                | Grad Celsius                              |
| °C/s              | Grad Celsius pro Sekunde                  |
| CCS               | Canadian Cardiovascular Society           |
| cm                | Zentimeter                                |
| Da                | Dalton                                    |
| DNA (engl)        | Desoxyribonukleinsäure                    |
| γ                 | gamma                                     |
| GDP               | Guanosindiphosphat                        |
| GTP               | Guanosintriphosphat                       |
| HCl               | Wasserstoffchlorid                        |
| KCl               | Kaliumchlorid                             |
| kb                | Kilobasen                                 |
| kDa               | Kilodalton                                |
| kg                | Kilogramm                                 |
| kg/m <sup>2</sup> | Kilogramm pro Quadratmeter                |
| LVEDD             | linksventrikulärer enddiastolischer Druck |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid                          |
| μl                | Mikroliter                                |
| μmol/l            | Mikroliter pro Liter                      |
| min               | Minute                                    |
| ml/min            | Milliliter pro Minute                     |
| ml                | Milliliter                                |
| mmol/l            | Millimol pro Liter                        |

|             |   |
|-------------|---|
| mRNA (engl) | messenger (Boten-) Ribonukleinsäure   |
| nA          | Nanoampere  |
| ng          | Nanogramm   |
| nm          | Nanometer   |
| n.s.        | nicht signifikant   |
| Nukleotide: |   |
| A           | Adenin  |
| G           | Guanin  |
| C           | Cytosin   |
| T           | Thymin  |
| U           | Uracil  |
| NYHA        | New York Heart Association  |
| OH-Gruppe   | Hydroxylgruppe  |
| p           | petit – kurzer Arm eines Chromosoms   |
| pg/ml       | Pikogramm pro Milliliter  |
| pg/μl       | Pikogramm pro Mikroliter  |
| q           | langer Arm eines Chromosoms   |
| rpm (engl)  | rounds per minute (Umdrehung pro Minute)  |
| s           | Sekunde   |
| SNP         | Single Nucleotide Polymorphism  |
| TBE         | Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- <b>B</b> orat- <b>E</b> DTA (Ethylendiamintetraessigsäure)) |
| Tbl         | Tabelle   |
| U/min       | Umdrehung pro Minute  |
| V           | Volt  |
| Vgl         | Vergleich   |

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1      | Die Catecholaminsynthese  | 9         |
| 1.2      | Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren  | 10        |
| 1.3      | Die adrenergen Rezeptoren   | 11        |
| 1.4      | Die $\beta$ -adrenergen Rezeptoren  | 11        |
| 1.5      | Der $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor   | 12        |
| 1.5.1    | Interaktionen mit dem $\beta_1$ -Adrenorezeptor   | 13        |
| 1.5.2    | Die Signaltransduktion in einer Herzmuskelzelle   | 15        |
| 1.5.3    | Die Regulation des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors  | 15        |
| 1.6      | Die $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen   | 17        |
| 1.6.1    | Der 145A>G (Ser49Gly) $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus                             | 17        |
| 1.6.2    | Der 1165G>C (Arg389Gly) $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus                           | 19        |
| 1.6.3    | Die $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und das insuffiziente Herz                    | 21        |
| 1.6.4    | Wechselwirkungen der beiden $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen                       | 24        |
| 1.6.5    | Der Einfluss der $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen auf die Wirkung des Noradrenalin | 25        |
| 1.7      | Die Metabolisierung des Adrenalin und Noradrenalin  | 26        |
| 1.8      | Die Catechol-O-Methyltransferase - COMT   | 27        |
| 1.8.1    | Die genetische Codierung der COMT   | 29        |
| 1.8.2    | Die Struktur der COMT   | 30        |
| 1.8.3    | Der COMT-Polymorphismus   | 31        |
| 1.9      | Aufgabenstellung  | 32        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>34</b> |
| 2.1      | Materialien   | 34        |
| 2.1.1    | Geräte  | 34        |
| 2.1.2    | Verbrauchsmaterialien   | 35        |
| 2.1.3    | Reagenzien  | 36        |
| 2.2      | Methoden  | 38        |
| 2.2.1    | DNA-Isolierung  | 39        |
| 2.2.2    | Die Polymerase-Ketten-Reaktion  | 40        |
| 2.2.2.1  | Der Ablauf der Polymerase-Ketten-Reaktion   | 40        |
| 2.2.2.2  | Die Real Time (RT) – PCR  | 43        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.2.2.3  | Der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) zur Polymorphismusanalyse.....                             | 45        |
| 2.2.2.4  | Die SYBR Green I Methode.....   | 55        |
| 2.2.3    | Sequenzierung und Verifizierung der Polymorphismen.....   | 56        |
| 2.2.3.1  | Die Gelelektrophorese.....  | 56        |
| 2.2.4    | Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) .....   | 64        |
| 2.2.4.1  | Das Grundprinzip der HPLC .....   | 65        |
| 2.2.4.2  | Der Aufbau der HPLC-Apparatur .....   | 65        |
| 2.2.4.3  | chromatographische Trennverfahren .....   | 70        |
| 2.2.4.4  | Die Elution.....  | 71        |
| 2.2.4.5  | Die Probengewinnung.....  | 71        |
| 2.2.4.6  | Die Probenaufbereitung .....  | 72        |
| 2.2.4.7  | Die HPLC zur Bestimmung des Catecholamingehalts der Proben .....  | 72        |
| 2.2.4.8  | Die Auswertung.....   | 79        |
| 2.2.4.9  | Die Berechnung der Catecholaminkonzentrationen.....   | 82        |
| 2.2.4.10 | Die Wiederfindungsrate.....   | 83        |
| 2.3      | Statistik .....   | 84        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>86</b> |
| 3.1      | Patienten des Herzzentrum Leipzig.....  | 86        |
| 3.2      | Verteilung der Polymorphismen im Probandenkollektiv .....   | 89        |
| 3.3      | Liegezeiten der Patienten.....  | 92        |
| 3.3.1    | Das gesamte Studienkollektiv .....  | 92        |
| 3.3.2    | Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf die Liegezeiten ..  | 94        |
| 3.3.3    | Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Liegezeiten .....                                   | 95        |
| 3.3.4    | Einfluss des COMT-Polymorphismus auf die Liegezeiten.....   | 96        |
| 3.3.5    | Einflüsse des Euroscores auf die Liegezeiten und den Catecholaminverbrauch.....                             | 97        |
| 3.3.5.1  | Einfluss der Polymorphismen auf die Liegezeiten unter Berücksichtigung des Euroscores .....                 | 99        |
| 3.3.5.2  | Einfluss der Polymorphismen auf die Liegezeiten unter Berücksichtigung des hausinternen Risikomarkers ..... | 100       |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.4   | Der postoperative Noradrenalinverbrauch.....   | 101 |
| 3.4.1 | Das gesamte Studienkollektiv .....   | 101 |
| 3.4.2 | Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf den<br>Noradrenalinverbrauch .....   | 102 |
| 3.4.3 | Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf den<br>Noradrenalinverbrauch .....                                       | 103 |
| 3.4.4 | Einfluss des COMT-Polymorphismus auf den<br>Noradrenalinverbrauch .....  | 105 |
| 3.4.5 | Einfluss der Polymorphismen auf den Noradrenalinverbrauch unter<br>Berücksichtigung des Euroscores .....                     | 106 |
| 3.4.6 | Einfluss der Polymorphismen auf den Noradrenalinverbrauch unter<br>Berücksichtigung des hausinternen Risikomarkers .....     | 107 |
| 3.5   | Der postoperative Verbrauch von Catecholaminen.....  | 108 |
| 3.5.1 | Das gesamte Studienkollektiv .....   | 108 |
| 3.5.2 | Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf den gesamten<br>Catecholaminbedarf .....                                   | 109 |
| 3.5.3 | Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf den gesamten<br>Catecholaminbedarf .....                                 | 110 |
| 3.5.4 | Einfluss des COMT-Polymorphismus auf den gesamten<br>Catecholaminbedarf .....  | 110 |
| 3.5.5 | Abhängigkeit des Catecholaminverbrauchs von den Polymorphismen<br>unter Berücksichtigung des Euroscores .....                | 111 |
| 3.5.6 | Abhängigkeit des Catecholaminverbrauchs von den Polymorphismen<br>unter Berücksichtigung des hausinternen Risikomarkers..... | 112 |
| 3.6   | Die Konzentrationen des Adrenalin und Noradrenalin im<br>Patientenplasma .....   | 113 |
| 3.6.1 | Das gesamte Studienkollektiv .....   | 113 |
| 3.6.2 | Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf die Adrenalin-<br>und Noradrenalinplasmaspiegel .....                      | 114 |
| 3.6.3 | Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Adrenalin-<br>und Noradrenalinplasmaspiegel .....                    | 114 |
| 3.6.4 | Einfluss des COMT-Polymorphismus auf die Adrenalin- und<br>Noradrenalinplasmaspiegel.....                                    | 115 |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.6.5    | Abhängigkeiten der Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel von den Polymorphismen unter Berücksichtigung des Euroscores.....           | 116        |
| 3.6.6    | Abhängigkeiten der Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel von den Polymorphismen unter Berücksichtigung des hausinternen Risikomarker | 116        |
| 3.7      | Einfluss anderer Faktoren auf die Polymorphisabhängigkeiten.....  | 116        |
| 3.8      | Einflüsse der SNP-Kombinationen auf den postoperativen Verlauf.....   | 120        |
| 3.8.1    | Einfluss der SNP-Kombinationen auf die Liegezeiten.....   | 121        |
| 3.8.2    | Einfluss der SNP-Kombinationen auf den postoperativen Noradrenalinverbrauch.....  | 124        |
| 3.8.3    | Einfluss der SNP-Kombinationen auf den postoperativen Gesamtcatecholaminverbrauch.....  | 126        |
| 3.8.4    | Einfluss der SNP-Kombinationen auf die präoperativen Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel.....                                      | 127        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>137</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>142</b> |
|          | <b>Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit .....</b>  | <b>159</b> |
|          | <b>Lebenslauf .....</b>   | <b>160</b> |
|          | <b>Publikation .....</b>  | <b>160</b> |
|          | <b>Danksagung.....</b>  | <b>161</b> |

## 1 Einleitung

Der menschliche Körper passt sich verschiedenen Stresssituationen an. Er ist in der Lage sowohl auf körperliche Anstrengung als auch auf psychische Belastungen adäquat zu reagieren. Ein wichtiges Organ hierfür ist das sympathische Nervensystem. Es wird unter anderem durch sportliche Ertüchtigung aktiviert und bewirkt eine dreifache Erhöhung des Noradrenalinplasmaspiegels. Psychischer Stress verursacht andererseits eine verstärkte Adrenalinfreisetzung. Die beiden Hormone vermitteln über die adrenergen Rezeptoren den entsprechenden Anpassungsmechanismus auf die Gefahrensituation (Dimsdale und Moss 1980, McDevitt 1989).

### 1.1 Die Catecholaminsynthese

Die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin sind wichtige Mediatoren des sympathischen Nervensystems. Ihre Wirkung wird über die adrenergen Rezeptoren vermittelt (Insel 1996, Small et al. 2003). Sie werden freigesetzt um den Blutdruck, die Herzfrequenz, die Kontraktionskraft des Herzens, die Atemwege, die metabolischen, cerebralen und immunologischen Funktionen zu regulieren (Bylund et al. 1994, Cagliani et al. 2009).

Das 1,2-Dihydroxybenzol (Catechol) bildet die Grundstruktur des Adrenalins und Noradrenalins. Sie werden in den A-Zellen des Nebennierenmarks synthetisiert (Löffler 2003). Die Ausgangsaminosäure ist L-Tyrosin. Es wird im Zytoplasma durch die Tyrosinhydroxylase in 3,4-Dihydroxyphenylethylamin (Dopa) umgewandelt (Nagatsu et al. 1964, Hanna 1965). Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Catecholaminsynthese (Levin et al. 1960) läuft unter der Wirkung von Eisen(II)-Ionen, Tetrahydrobiopterin und Sauerstoff ab (Nagatsu et al. 1964). Anschließend reagiert Dopa mit der Dopadecarboxylase zu Dopamin (Hanna 1965). Der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) transferiert das Dopamin in die chromaffinen Granula (Löffler 2003). Dort wird es durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase zu Noradrenalin umgewandelt. Die Hydroxylierung erfolgt unter der Anwesenheit von Ascorbinsäure, Sauerstoff und Kupferionen (Levin et al. 1960, Levin und Kaufman 1961). Die Ascorbinsäure beschleunigt die Noradrenalinsynthese (Levine et al. 1985, Levine 1986). Noradrenalin wird schließlich durch die  $\beta$ -Phenylethanolamin-N-Methyltransferase zu Adrenalin umgewandelt (Hanna 1965).

Adrenalin wird im Nebennierenmark (Insel 1996) und Noradrenalin in den sympathischen Neuronen und im Nebennierenmark (Benedict et al. 1978) gespeichert. Acetylcholin wird durch die präganglionären Neurone des Nebennierenmarks freigesetzt und bindet an die nicotinergeren Acetylcholinrezeptoren der sekretorischen Zellen. Es verursacht somit die Freisetzung des Adrenalins und Noradrenalins in das Blut (Löffler 2003).

Über den Blutweg verteilen sich die Hormone im Körper und gelangen zu den Zielzellen um dort an die adrenergen Rezeptoren zu binden (Iversen 1965, Insel 1996). Die Adrenorezeptoren sind nahezu im gesamten peripheren Gewebe und im zentralen Nervensystem nachweisbar (Bylund et al. 1994). Sie gehören zu den sogenannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Wallukat 2002).

## **1.2 Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren**

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) sind die größte und vielseitigste Gruppe der Oberflächenrezeptoren. Sie haben alle den gleichen Grundaufbau. Auf der extrazellulären Seite befindet sich der Aminoterminus für die N-Glykosylierung, es schließen sich die sieben transmembranösen Helices an. Der Carboxyterminus ist in der Zelle situiert und dient der regulierenden Phosphorylierung diverser Proteinkinasen (Insel 1996, Lefkowitz 2007, Warne et al. 2008). Der aminoterminal Abschnitt ist für die Ligandenbindung von Bedeutung (Lefkowitz 2007). Die erste und zweite extrazelluläre Schleife sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und sind somit für die Rezeptorkonformation verantwortlich (Dixon et al. 1987a). Die Aufgabe der Rezeptoren ist es ein extrazelluläres Signal in ein Intrazelluläres umzuwandeln (Cerione et al. 1983, Hoebeke 1996). Dieses Signal wird durch verschiedene Hormone vermittelt. Dazu zählen zum Beispiel Acetylcholin, Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Vasopressin, Histamin, Glucagon, Geschmacksmoleküle und Thyreotropin (Insel 1996).

Es sind derzeit 800 verschiedene GPCR bekannt (Hill 2006, Warne et al. 2008). Aus diesem Grund wurden sie durch die Aminosäuresequenzanalyse der Polymerase-Ketten-Reaktion klassifiziert (Warne et al. 2008). In der GPCRDB (database) werden sie in sechs Klassen eingeteilt:

|          |  |
|----------|--|
| Klasse A | rhodopsin-like (80% aller menschlichen GPCR) |
| Klasse B | secretin-like                                |
| Klasse C | metabotrope Glutamat-Rezeptoren              |
| Klasse D | Pheromon-Rezeptoren                          |
| Klasse E | cAMP-Rezeptoren                              |
| Klasse F | frizzled/smoothened family                   |

**Tabelle 1** Einteilung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren in die Klassen A bis F

Die Klassen werden wiederum in Subklassen unterteilt und diese in Sub-sub-Klassen (Davies et al. 2008). Die größte Familie ist die Familie A, darunter zählen unter anderem die humanen adrenergen Rezeptoren (Warne et al. 2008).

### 1.3 Die adrenerge Rezeptoren

1948 unterschied der Pharmakologe Raymond Ahlquist als erster die  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren von den  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (Stiles et al. 1984, Bylund et al. 1994, Wallukat 2002). Über 20 Jahre später verbreitete sich eine tiefe Skepsis über die Existenz der Rezeptoren in der Wissenschaft. Raymond Ahlquist unterstrich diese Zweifel 1973, indem er die Rezeptoren als ein abstraktes und ausgedachtes Konzept beschrieb (Ahlquist 1973). Die ersten  $\beta$ -Adrenorezeptorforschungen und -nachweise begannen in den frühen 1970er Jahren durch den Kardiologen Robert Lefkowitz (Lefkowitz 2007).

Lands teilte bereits 1967 die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in zwei Subtypen ein. Subtyp 1 dominiere am Herzen und interagiere mit Adrenalin und Noradrenalin. Der Subtyp 2 verursache eine Vasodilatation, Uterusrelaxierung und eine Bronchodilatation und binde bevorzugt Adrenalin (Stiles et al. 1984, McDevitt 1989).

Aufgrund der verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften differenzierte Frielle die  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -Adrenorezeptorsubtypen (Frielle et al. 1987). Derzeit sind neun Rezeptoren bekannt. Der  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptor wird in die  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - und  $\alpha_{1D}$ -Adrenorezeptoren unterteilt. Die  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren unterteilen sich in die  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Adrenorezeptoren. Die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren gliedern sich in die  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -Adrenorezeptoren (Brodde und Michel 1999, Small et al. 2003)

### 1.4 Die $\beta$ -adrenergen Rezeptoren

Die  $\beta$ -Adrenorezeptoren sind im gesamten humanen Gewebe verteilt. Mittels Antagonisierung konnte eine Differenzierung zwischen dem  $\beta_1$ - und dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor am Herzen und im Gewebe erfolgen (Stiles et al. 1984). Der

$\beta_1$ -Subtyp dominiert am Herz, im Auge und an den reninsekretierenden Zellen der Niere. Der  $\beta_2$ -Subtyp befindet sich bevorzugt im bronchialen Gewebe, in den peripheren Blutgefäßen und dem Uterus.

Das mit einer hohen sympathischen Innervation verbundene Gewebe hat einen hohen  $\beta_1$ -Adrenorezeptorbesatz und reagiert sensibel auf Noradrenalin. Die Organe ohne sympathische Innervation sind bevorzugt mit  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren ausgestattet und werden vor allem über das zirkulierende Adrenalin reguliert (McDevitt 1989).

Das Herz ist sowohl mit den  $\beta_1$ - als auch mit den  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren ausgestattet (Bristow et al. 1986). Diese These wurde mit dem Nachweis von zwei verschiedenen mRNAs unterstützt (Ungerer 1993, Engelhardt 1996). Del Monte belegte eine Coexistenz der beiden Subtypen in einer einzelnen Myokardzelle (del Monte 1993). Der Sinusknoten ist zudem mit einer dreifach höheren Rezeptordichte als in den Vorhöfen versehen, wobei der Subtyp 1 dominiert (Rodefeld et al. 1996).

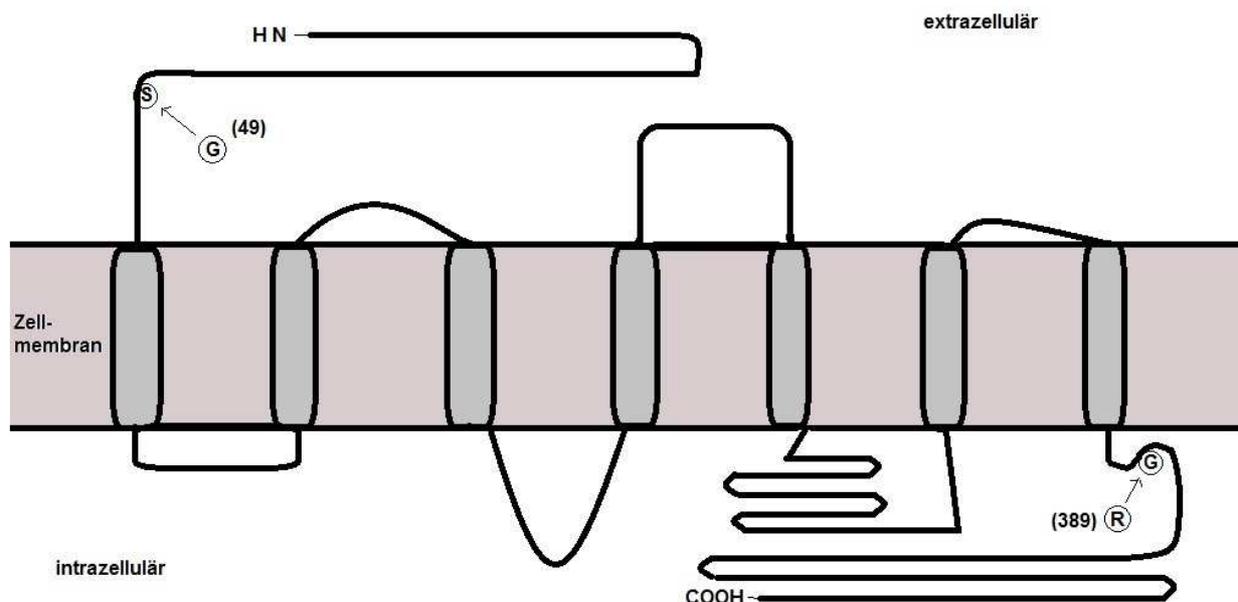
Die endogenen Catecholamine interagieren mit den beiden  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, so dass die kardiale Chronotropie und Inotropie erhöht werden (Kaumann et al. 1989). Wird Noradrenalin bei einer sympathischen Innervation des Myokards freigesetzt oder intravenös verabreicht, so bindet es bevorzugt an die  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren, was zu einem verstärkten Anstieg der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft führt. Adrenalin verursacht eine Zunahme der Kontraktilität über die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren (McDevitt 1989, Kaumann et al. 1989, Leenen et al. 1998, Brodde und Michel 1999).

### **1.5 Der $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor**

Die  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren ( $\beta_1$ -AR) wurden von Thomas Frielle et al. 1987 entdeckt. Die entsprechende cDNA wurde aus der Plazenta cDNA Library geklont, indem sie mit dem Genomklon G-21 gescreent wurde. Diese Nukleinsäure ist 2,4 kb lang, besitzt am 5´Ende eine nichttranslatierte Sequenz von 86 bp, am 3´Ende eine nichttranslatierte Sequenz von 900 bp. Das intronfreie Gen wird auf dem Chromosom 10q24 bis 26 codiert (Mason et al. 1999, Moore et al. 1999, Brodde 2008). Sein Initiator Codon für Methionin umgeben von der Kozak Sequenz bildet den open reading frame für die Proteinsynthese eines 477 Aminosäure (51 220 Da) langen Produktes (Frielle et al. 1987).

Der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor, ein integrales Membranprotein, gehört zu den GPCR, was seinen klassischen Aufbau erklärt. Die Abbildung 1.1 bildet diese Struktur ab. Der

Aminoterminus ist extrazellulär gelegen, gefolgt von den sieben transmembranösen Domänen (H1-7) und dem abschließenden Carboxyterminus intrazellulär (Mason et al. 1999). Demzufolge sind drei Schleifen (EL1-3) extrazellulär und drei cytoplasmatische Schleifen (CL1-3) intrazellulär lokalisiert. Eine wichtige Rolle wird dabei dem CL2 und CL3 zugeschrieben, da sie an der Bindung und Selektivität des Liganden, sowie an der Aktivierung des guaninnukleotidregulierenden Proteins (G-Proteins) beteiligt sind. Wobei anzumerken ist, dass CL2 für die Stärke der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand und CL3, aus einer unüblich langen prolinreichen Sequenz aufgebaut (Steinberg 1999), für die Spezifität maßgebend ist. Bereits bekannt ist, dass CL2 als eine kurze  $\alpha$ -Helix strukturiert und parallel zur Membranoberfläche situiert ist. Es fungiert als Schalter zur Aktivierung des G-Proteins. Des Weiteren kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dieser  $\alpha$ -Helix und dem H3.



**Abbildung 1.1** Die Struktur des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors, an der 49. und 389. Position der Aminosäurekette sind der 145A>G (Ser49Gly) und der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus lokalisiert (in Anlehnung an Johnson und Lima 2003)

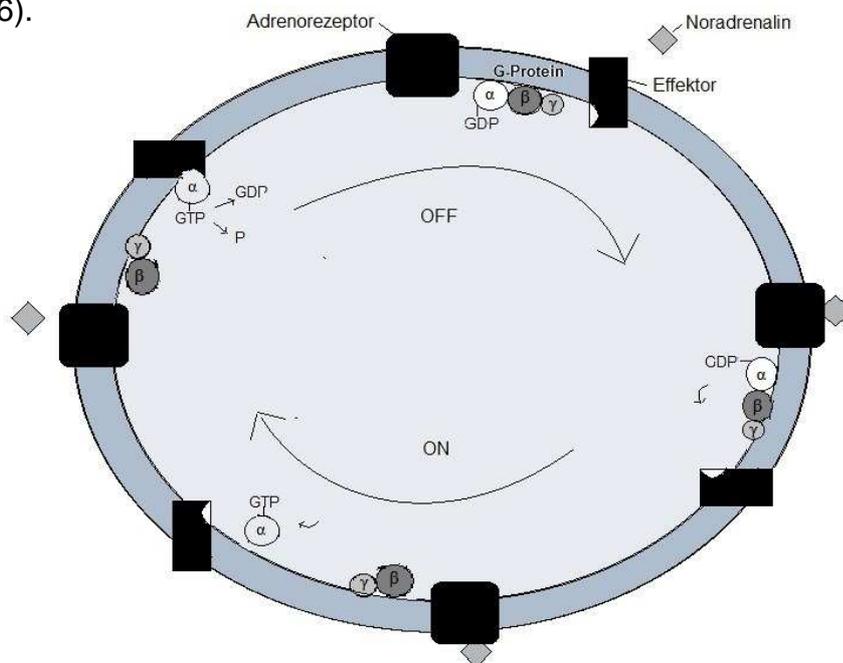
### 1.5.1 Interaktionen mit dem $\beta_1$ -Adrenorezeptor

Noradrenalin interagiert als typischer Agonist mit dem  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor. Dieses hydrophile Catecholamin wird von den hydrophoberen membranständigen Domänen gebunden (Dixon et al. 1987b, Hoebeke 1996). Es wird eine Änderung der

Molekülkonformation verursacht. Besonders betroffen ist die dritte intrazelluläre Schleife, welche mit dem G-Protein assoziiert ist (Clapham und Neer 1993).

Das G-Protein ist ein essentielles Bindeglied der Signaltransduktion und aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) aufgebaut. Die  $\alpha$ -Untereinheit geht eine feste, nicht kovalente Bindung mit dem  $\beta$ - $\gamma$ -Heterodimer ein. Eine Klassifizierung nach der  $\alpha$ -Untereinheit macht eine Unterscheidung der verschiedenen G-Proteine möglich. Vier Klassen sind bis heute aufgeklärt:  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha q}$  und  $G_{\alpha 12/13}$ . Der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor interagiert mit dem  $G_s$ -Protein (Mason et al. 1999, Steinberg 1999).

Das G-Protein hat an der Guaninnukleotidbindungsstelle der  $\alpha$ -Untereinheit im inaktiven Zustand GDP gebunden. Wird ein Agonist gebunden, erfolgt ein Austausch des GDP mit GTP. Dies löst eine Konformationsänderung des Proteins aus und bewirkt eine Ablösung des  $\beta$ - $\gamma$ -Heterodimers, wie es in der Abbildung 1.2 dargestellt ist. Die abgetrennten Untereinheiten dienen der Regulation der Effektormolekülaktivität und sind wichtig für die Bildung des zweiten Botenstoffes, das zyklische AMP (cAMP) (Clapham und Neer 1993). Wenn ein G-Protein das GTP gebunden hat, ist es in einem aktiven Zustand. Die Adenylylcyclase hydrolysiert das GTP in GDP und überführt das G-Protein wieder in einem inaktiven Zustand (siehe Abbildung 1.2). Die drei Untereinheiten refusionieren (Cassel und Selinger 1978, Insel 1996).



**Abbildung 1.2** Aktivitätszustände des G-Proteins. GDP ist an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Protein gebunden. Das G-Protein ist inaktiv (im „off“-Zustand). Mit dem GDP-GTP-Austausch wird das G-Protein aktiviert. Es ist im „on“-Zustand. Die Hydrolyse des GTP in GDP und Phosphat überführt das G-Protein wieder in den inaktiven Zustand. (in Anlehnung an Insel 1996)

Die Aktivierung des G-Proteins ist ein Mechanismus um das Signal des Rezeptors zu verstärken. Ein  $\beta_1$ -Adrenorezeptor ist in der Lage mehrere G-Proteine zu aktivieren, zudem übersteigt die Anzahl der G-Proteine deutlich die der Rezeptoren (Alousi et al. 1991, Post et al. 1995). Demzufolge kann ein einziger Agonist ein Übermaß an G-Proteinen aktivieren (Pederson und Ross 1982, Ransnäs und Insel 1988).

### **1.5.2 Die Signaltransduktion in einer Herzmuskelzelle**

Noadrenalin bindet an dem  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor und aktiviert das  $G_s$ -Protein (Lefkowitz et al. 1983). Über das heterotrimere Protein ist der Rezeptor mit der Adenylylcyclase gekoppelt (Cerione et al. 1983, Stiles et al. 1984). Sie bildet das cAMP als zweiten Botenstoff (Molinoff 1984, Stiles et al. 1984). Die Produktion des cAMP ist abhängig von der Agonistenaffinität und -konzentration (Gilman 1987, Freissmuth et al. 1989).

Es aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA). Diese phosphoryliert daraufhin das Phospholamban, das Troponin I und die Proteine des Sarkolemms, zum Beispiel den L-Typ des Calciumkanals (Walsh und van Patten 1994, Schröder und Herzig 1999, Liggett 2001). Die damit verbundene Aktivierung des Calciumkanals verursacht einen Calciumeinstrom entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle. Der Anstieg der intrazellulären Calciumionen bewirkt eine Freisetzung dieser Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den ryanodinabhängigen Calciumkanal in das Zytoplasma. Die Calciumionen interagieren mit dem Troponin C, was eine Kontraktion auslöst. Der Vorgang entspricht der systolischen Phase der Herzaktion.

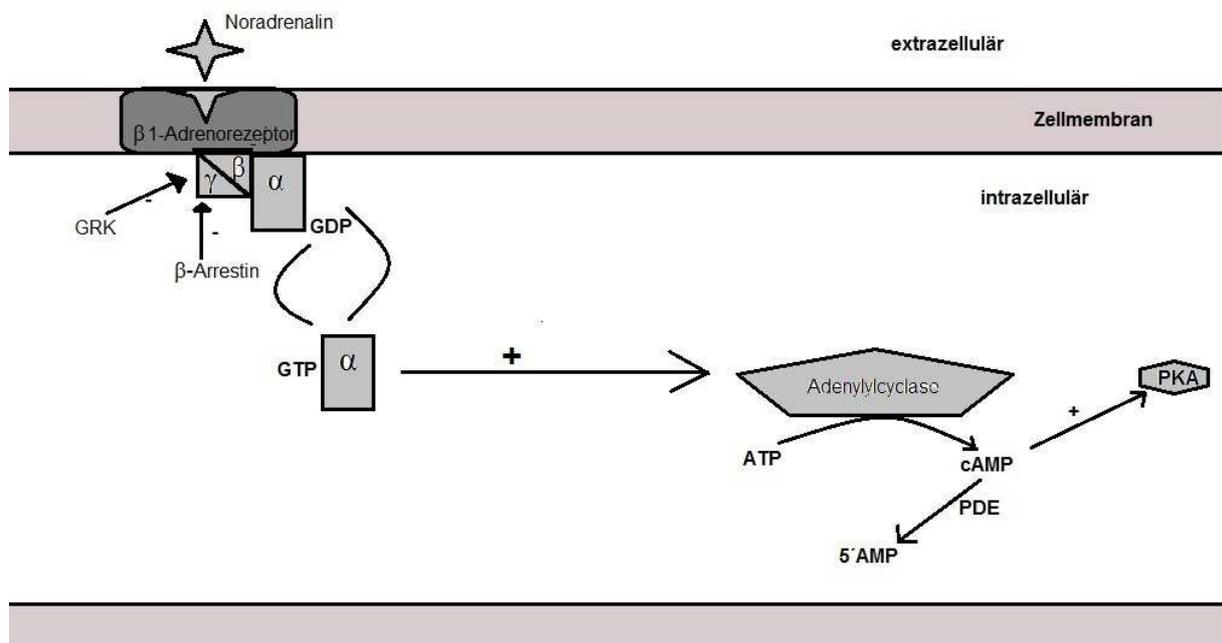
Die Phosphorylierung des Phospholamban bewirkt eine vermehrte Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum, was mit einer verstärkten diastolischen Relaxierung verbunden ist. Der Natrium-Calcium-Austauscher transferiert während der Diastole die Calciumionen aus der Zelle (Kaumann und Molenaar 1997, Brodde und Michel 1999, Steinberg 1999).

### **1.5.3 Die Regulation des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors**

Die Anzahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche wird durch die Konzentration der Catecholamine reguliert (Insel 1996). Die Bindung von Agonisten oder Antagonisten verursacht eine Konformationsänderung des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors. Daraufhin werden

die Serin- und Threoninreste der intrazellulären Schleifen und des Carboxyterminus freigelegt und durch die Proteinkinase A und die G-Proteinrezeptorkinase (GRK) phosphoryliert (Benovic et al. 1985, Kohout und Lefkowitz 2003). Es folgt eine Bindung des Inhibitorproteins  $\beta$ -Arrestin an dem phosphorylierten Rezeptor. Damit wird eine Entkopplung des Rezeptors von dem G-Protein ausgelöst. Die Funktion des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors wird um 70% reduziert (Stiles et al. 1984, Ungerer et al. 1993, Wallukat 2002, Lefkowitz 2007). Es erfolgt eine Aufnahme des inaktivierten Rezeptors über Vesikelbildung in die Herzmuskelzelle. Er ist weiteren Stimulationen somit endgültig entzogen. In den Vesikeln findet ein Recyclingprozess statt (Kallal et al. 1998, Wallukat 2002).

Eine chronische Catecholaminstimulation führt zu einer Herunterregulation der  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren auf der mRNA- und Proteinbiosyntheseebene. Dieser Anpassungsmechanismus nimmt Stunden bis Tage in Anspruch (Ungerer et al. 1993, Wallukat 2002).



**Abbildung 1.3** Die Regulation des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors. Die Bindung des Liganden führt zu einem GDP-GTP-Austausch. Die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit stimuliert die Adenylylzyklase. cAMP wird gebildet. Es aktiviert die Proteinkinase A. Darauf folgend wird das cAMP durch die Phosphodiesterase inaktiviert. Eine Phosphorylierung des Rezeptors durch  $\beta$ -Arrestin und durch die G-Proteinrezeptorkinase (GRK) führt zu einer Inaktivierung. (in Anlehnung an Johnson und Lima 2003)

## 1.6 Die $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen

Der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor weist zwei klinisch relevante Polymorphismen, den 145A>G (Ser49Gly) und den 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus, auf. Der 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus (rs1801252) ist an dem 145sten Nukleotid lokalisiert. Adenin ist durch Guanin ausgetauscht. Diese punktmutative Veränderung wirkt sich auf die Aminosäure an der 49sten Position aus, so dass Serin durch Glycin ersetzt wird. Der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus (rs1801253) befindet sich an dem 1165sten Nukleotid. Guanin wird von Cytosin substituiert. Folglich findet ein Aminosäurewechsel von Glycin zu Arginin an der 389sten Stelle statt (Maqbool et al. 1999). Die beiden Polymorphismen sind nur im humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor vorzufinden, in anderen Spezies (Maus, Ratte, Schwein, Hund, Rhesusaffe) sind sie nicht nachweisbar (Podlowski et al. 2000).

### 1.6.1 Der 145A>G (Ser49Gly) $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus

Das 145A (Serin-Allel) ist die Wildtyp-Variante und liegt zu 85% homozygot in der chinesischen und kaukasischen Bevölkerung vor, 15% sind heterozygot. Die Afroamerikaner weisen einen geringeren 145G (Gly49) Anteil von 13% auf (Moore et al. 1999, Small et al. 2003). Mit 0,3% ist das 145G (Glycin-Allel) sehr selten in einem homozygoten Chromosomensatz zu finden (Ulucan et al. 2008). Die 49ste Position in der Aminosäuresequenz ist am Aminoterminal lokalisiert (Moore et al. 1999) und ist 10 Aminosäuren von der ersten transmembranösen Region beziehungsweise 9 Aminosäuren von der Zellmembran entfernt (Rathz et al. 2002, Small et al. 2003).

Der Polymorphismus ist wichtig für die Platzierung des Rezeptors in der Zellmembran und für die Interaktionen des Rezeptors mit seinem Liganden (Moore et al. 1999).

Die beiden Varianten haben die gleichen Bindungsaffinitäten für die Agonisten und Antagonisten, da die Bindung über dem hydrophoben Kern des Proteins erfolgt. Es ist kein Unterschied in der basalen Aktivität der Adenylylcyclase nachweisbar, weil die G-Proteine an den intrazellulären Schleifen verankert sind (Rathz et al. 2002). Der aminoterminal Abschnitt beeinflusst zudem das Falten des Rezeptors in der Membran. Dieser Aspekt ist essentiell für dessen Herunterregulation und für die Catecholaminbindung (Dixon et al. 1987a, Börjesson 2000).

Findet an der Herzmuskelzelle eine langandauernde Agonistenaktivierung statt, zeigen sich Unterschiede in den beiden Polymorphismusvarianten. Die basale und maximale agonistenbedingte Aktivierung der Adenylylcyclase ist deutlich höher bei dem 145G (Gly49). Außerdem reagiert es empfindlicher auf hemmende Einflüsse inverser Antagonisten wie Metoprolol. Die Ursache könnten die unterschiedlichen konformationsbedingten Vorzüge des 145A (Ser49) und des 145G (Gly49) sein (Koehl und Levitt 1999). Zudem verursacht das 145G unter den genannten Bedingungen eine stärkere Herunterregulation des Rezeptors (Rathz et al. 2002, Levin et al. 2002, Sandilands und O'Shaughnessy 2005). Das 145A (Ser49) ist mit einem höheren Glykosylierungsgrad assoziiert, was eine Erklärung für die differente Herunterregulation darstellt (Small et al. 2003, Sandilands und O'Shaughnessy 2005). Levin et al. beschrieben 2002 eine deutlich niedrigere Affinitätskonstante des 145G (Gly49), demzufolge soll diese Rezeptorvariante affiner für Agonisten sein. Fand eine kurzzeitige Rezeptoraktivierung von 10 bis 20 Minuten statt, so war das 145A (Ser49) resistenter als das 145G (Gly49) (Levin et al. 2002).

Es war kein Unterschied in der 145A>G (Ser49Gly) Frequenz zwischen den Hypertonikern und gesunden Patienten feststellbar (Bengtsson et al. 2001). 2002 wurde unter 1348 Chinesen und Japanern ein deutlicher Unterschied in der Herzfrequenz im Ruhezustand festgestellt. Probanden, die homozygot für das 145A (Ser49) waren, hatten eine signifikant höhere Herzfrequenz als die Träger mit dem einen oder den beiden 145G (Gly49). Die niedrigste Rate war bei den homozygoten 145G (Gly49) Trägern nachweisbar (Ranade et al. 2002). Trug ein Proband das 145G (Gly49), so war eine stärkere Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDD) nachweisbar. Homozygote 145A (Ser49) Träger zeigten einen höheren LVEDD (Terra et al. 2005).

Unter einer niedrig dosierten  $\beta$ -Blockertherapie war die 5-Jahresmortalitätsrate bei den 145G (Gly49) enthaltenen Patienten niedriger als bei den 145A (Ser49) Trägern. Der 145AA (Ser49Ser-) Genotyp zeigte eine verminderte Ansprechbarkeit auf diese Antagonistentherapie (Magnusson et al. 2005).

### 1.6.2 Der 1165G>C (Arg389Gly) $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus

Frielle bezeichnete das 1165G (Glycin-Allel) als Wildtyp, da es in dem ersten Klon des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors vorhanden war (Frielle et al. 1987). Das 1165G (Glycin-Allel) unterliegt jedoch der rezessiven Vererbung und liegt zu 29% in der chinesischen, zu 27% in der kaukasischen und zu 42% in der afroamerikanischen Bevölkerung vor (Moore et al. 1999).

Der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus ist neun Aminosäuren von der transmembranösen Domäne entfernt. Er ist in dem proximalen Abschnitt des intrazellulären carboxyterminalen Endes situiert. Diese Domäne ist für die Kopplung des G-Proteins von entscheidender Bedeutung (Maqbool et al. 1999, Moore et al. 1999, Tesson et al. 1999, Johnson et al. 2003, Small et al. 2003). Das Arginin, eine große und basische Aminosäure, ist stärker mit dem G-Protein verbunden als das Glycin, eine kleine und neutrale Aminosäure (Mason et al. 1999, Xie et al. 2001). Dieses bewirkt eine Unterbrechung der  $\alpha$ -Helix und führt zu einer Entkopplung des G-Proteins. Das führt bei Agonistenstimulation zu einer verminderten cAMP-Bildung und unterdrückten Adenylylcyclaseaktivität. Sie ist bei der Arginin-Variante größer als bei der Glycin-Variante (Xie et al. 2001, Small et al. 2003, Liggett et al. 2006). Eine Beeinflussung der Agonistenaffinität bezüglich Isoprenalin, Adrenalin oder Noradrenalin war nicht feststellbar.

Die basale und agonistenbedingte Aktivität der Adenylylcyclase ist in der Anwesenheit des Arginins um das zwei- bis dreifache höher (Mason et al. 1999).

Der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus reguliert die Funktion des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors in der Vermittlung der Inotropie und Chronotropie (Moore et al. 1999). Zudem ist er beteiligt an der Desensibilisierung des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors. Das 1165C (Arg389) geht mit einer stärkeren agonistenvermittelten Herunterregulation, bedingt durch die höhere Adenylylcyclaseaktivität, als das 1165G (Gly389) einher (Rathz et al. 2003).

Verschiedene Studien deckten eine Beeinflussung des Polymorphismus auf die kardiovaskulären Parameter auf. So war die homozygote 1165CC (Arg389Arg) Variante mit einem erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruck im ruhenden Zustand assoziiert (McCaffery et al. 2002). Humma et al. setzten Patienten, welche unter Symptomen einer ischämischen Herzkrankheit litten und keine  $\beta$ -Blockertherapie erhielten, unter Dobutaminstress. Es wurden eine signifikant höhere

Herzfrequenz und ein deutlich erhöhter diastolischer Blutdruck bei dem homozygoten 1165CC (Arg389Arg) registriert (Humma et al. 2001).

Eine derartige Wirkung des Polymorphismus wurde auch unter  $\beta$ -Blockertherapie aufgedeckt. Liu et al. gaben gesunden Chinesen Metoprolol in unterschiedlicher Dosierung. Sie wiesen eine stärkere Abnahme der Herzfrequenz in Ruhe und in sportlicher Übung sowie eine deutliche Verminderung des systolischen Blutdruckes für das homozygote 1165CC (Arg389Arg) nach (Liu et al. 2003). Eine Reduktion des diastolischen 24-Stunden-Blutdruckes war bei den 1165CC (Arg389Arg) Trägern um das zweifache stärker als bei den glycinenthaltenen Probanden (Johnson et al. 2003). Erhielten Probanden Atenolol, so war eine signifikante Senkung des systolischen und mittleren arteriellen Blutdruckes unter den homozygoten 1165CC (Arg389Arg) Trägern erkennbar (Sofowora et al. 2003).

Bengtsson et al. dokumentierten, dass die homozygoten 1165CC (Arg389Arg) Träger mit einem zu hohen Blutdruck belastet seien. Sie schrieben dieses Phänomen der erhöhten Rezeptoraktivität der 1165C (Arg389) Variante zu. Das führe zu einem erhöhten Herzauswurfvolumen und somit zu der Hypertonie. Die Herzfrequenz, der systolische und diastolische Blutdruck unterschieden sich allerdings nicht in den beiden Polymorphismusvarianten. Hypertone Geschwisterpaare unterlagen einem höheren diastolischen Blutdruck und einer erhöhten Herzfrequenz, wenn sie die homozygote 1165CC (Arg389Arg) Variante trugen. O'Shaughnessy et al. stellten ebenfalls keinen Zusammenhang des Polymorphismus mit den basalen Blutdruckwerten und der Herzfrequenz der Hypertoniker fest. Sie waren der Meinung, dass eine Genotypisierung nicht hilfreich in der Auswahl eines  $\beta$ -Blockers sei (O'Shaughnessy et al. 2000).

Erhielten die hypertonen Patienten jedoch Metoprolol, so war ein deutlich geringer Abfall des systolischen Blutdruckes bei den homozygoten 1165GG (Gly389Gly) Trägern, eine intermediäre Abnahme bei den heterozygoten 1165CG (Arg389Gly) Varianten und eine starke Reduktion bei den homozygoten 1165CC (Arg389Arg) enthaltenen Probanden nachweisbar. Ebenso verhielt es sich mit dem diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruck. Die Herzfrequenz unterlag diesem Einfluss nicht (Liu et al. 2006).

La Rosée et al. infundierten 30 gesunden Probanden Dobutamin. Unter herzechografischer Kontrolle wurde eine ausgeprägte Inotropiesteigerung bei dem 1165CC (Arg389Arg) gemessen. Der systolische Blutdruck war ebenfalls deutlich

höher als bei den Trägern des 1165G (Gly389) (La Rosée et al. 2004). Wurden Probanden unter Dobutaminstress gesetzt, so war die Zunahme der Plasmareninaktivität stärker bei den 1165C (Arg389) als bei den 1165G (Gly389) tragenden Patienten. Zudem war die maximale Zunahme der Herzfrequenz und der Kontraktilität deutlicher bei dem 1165C. Unter  $\beta$ -Blockertherapie werden die Patienten mit dem 1165CC (Arg389Arg) als „good responder“ und die mit dem 1165G (Gly389) als „poor responder“ bezeichnet (Bruck et al. 2005).

Bei Patienten, die unter einem Nierenversagen leiden und das 1165GG (Gly389Gly) tragen, wurde eine größere linksventrikuläre Muskelmasse mittels der Herzsonografie bestimmt (Stanton et al. 2002).

Es liegen allerdings Studien vor, in denen kein Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Plasmareninaktivität, Herzfrequenz oder Kontraktilität nachzuweisen war (Büscher et al. 2001, Leineweber et al. 2006).

Iwai et al. stellten eine Assoziation zwischen dem Auftreten eines Myokardinfarktes und dem 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus her. Die homozygoten 1165CC (Arg389Arg) erlitten signifikant mehr Herzinfarkte (Iwai et al. 2003).

### **1.6.3 Die $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und das insuffiziente Herz**

Der dominierende Rezeptor des Myokards ist der  $\beta_1$ -adernerge Rezeptor mit 80% (La Rosée et al. 2004). Das Verhältnis der beiden kardialen  $\beta$ -Rezeptorsubtypen ist in den Vorhöfen 70:30 und in den Ventrikeln 80:20 (Brodde und Michel 1999). Mit dem zunehmenden Lebensalter nehmen die Myozytenanzahl (Olivetti et al. 1991) und die  $\beta_1$ -Adrenorezeptorempfindlichkeit (Brodde und Michel 1999) ab, hieraus resultiert eine Zunahme des Plasmanoradrenalinpiegels (Esler et al. 1990, Lakatta 1993, Folkow und Svanborg 1993). Die sympathische Aktivität erhöht sich um 10 bis 15% pro Dekade (Seals und Esler 2000).

Dieser Effekt ähnelt dem der chronischen Herzinsuffizienz, wobei die sympathische Innervation rascher ansteigt (Francis und Cohn 1986, Packer 1992). Die Zunahme des sympathischen Nervensystems kompensiert die verminderte Herzfunktion, um den Blutdruck und Blutfluss aufrecht zu halten (Lakatta 1993, Swedberg et al. 1990). Die damit verbundene fünf- bis zehnfache Erhöhung der Noradrenalinfreisetzung (Hasking et al. 1986) wird im zentralen Nervensystem beeinflusst. Es bestehen ein geringerer inhibitorischer und ein stärkerer exzitatorischer Input in der zentralen Steuerungsanlage. Außerdem ist eine Veränderung der humoralen oder lokalen

Überträgerstoffe in der zentralen neuronalen sympathischen Regulation nachgewiesen. Demnach ist der normalerweise hemmende Baroreflex abgeschwächt (Middlekauff und Mark 1998).

Der erhöhte Noradrenalinspiegel verursacht eine selektive Herunterregulation des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors und eine Unterdrückung der damit verbundenen Signaltransduktionsachse. Das Verhältnis der beiden Rezeptorsubtypen verändert sich von 77:23 auf 60:40 (Francis und Cohn 1986, Bristow et al. 1986).

Messungen der mRNA-Spiegel in den Myozyten ergaben eine 50%ige Reduktion für den  $\beta_1$ -Adrenorezeptor und eine Erhöhung für das GRK. Die Verminderung korreliert deutlich mit der Schwere des NYHA-Grades. Hinzukommend ist die Rezeptordichte um 56% reduziert (Bristow et al. 1993, Ungerer et al. 1993, Engelhardt et al. 1996, Wallukat 2002). Diese reduzierte  $\beta$ -adrenerge Stimulation limitiert den Energieverbrauch des Herzens, welches generell geringe metabolische Reserven aufweist. Es ist ein dynamischer, schnell aufhebbarer Schutzmechanismus des versagenden Myokards (Francis und Cohn 1986, van Campen et al. 1998, Liggett 2001).

Brodde et al. sind zu der Erkenntnis gekommen, dass der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus an Bedeutung gewinnt, wenn eine chronische Herzinsuffizienz vorliegt, aufgrund einer damit verbundenen Rezeptordesensibilisierung (Brodde und Michel 1999, Brodde und Stein 2003). Er hat keinen kausalen Einfluss, jedoch ist er ein wichtiger Risikofaktor. Diese These stützte sich auf diverse Studien. So ist zum Beispiel auffällig, dass mehr Afroamerikaner, die einen erhöhten 1165C (Arg389) Anteil haben, an einer chronischen Herzinsuffizienz leiden als Kaukasier (Moore et al. 1999, Leineweber et al. 2003, Brodde 2008). Demzufolge könnte man darauf schließen, dass das 1165C (Arg389) mit einer schlechteren Herzfunktion assoziiert sei. Das 1165C (Arg389) hat eine stärkere Antwort auf die Agonistenstimulation als das 1165G (Gly389), weshalb der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auch als „Gain of function polymorphism“ bezeichnet wurde (Liggett et al. 2006). Wagoner et al. erklärten 2002, dass das 1165C (Arg389) eines insuffizienten Herzens mit einem höheren systolischen Blutdruck assoziiert sei. Der Sauerstoffverbrauch während sportlicher Ertüchtigungen war außerdem signifikant niedriger bei dem 1165GG (Gly389Gly) als bei dem 1165CC (Arg389Arg). Der größte Unterschied stellte sich unter Berücksichtigung des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus ein

(145AA1165GG (Ser49SerGly389Gly) < 145GG1165CC (Gly49GlyArg389Arg))  
(Wagoner et al. 2002).

Der protektive Effekt einer  $\beta$ -Blockertherapie über einen längeren Zeitraum ist erwiesen und unterscheidet sich in dem 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus (Mialet Perez et al. 2003, Liggett et al. 2006). Er ist besonders wirkungsvoll, wenn das 1165C (Arg389) vorliegt. Unter Carvedilolgabe wurde eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei Vorliegen des 1165C (Arg389) registriert (Mialet Perez et al. 2003). Die Steigerung der Ejektionsfraktion wurde in einer weiteren Studie bestätigt, ebenso der Benefit des linksventrikulären Remodelings. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck nahm bei den 1165G (Gly389) Trägern signifikant zu. Zudem war eine Wechselwirkung des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus vorhanden. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck war geringer bei 145AG1165CC (Ser49GlyArg389Arg) als bei 145AA1165CG (Ser49SerArg389Gly). Letzteres ist mit einem niedrigeren Benefit der  $\beta$ -Blockertherapie assoziiert. Liggett präsentierte 2004 bei der Heart Failure Society of America ein verbessertes Überleben und eine geringere Todesrate und Hospitalisierung unter Anwesenheit des 1165CC (Arg389Arg) mit entsprechender  $\beta$ -Blockertherapie (Terra et al. 2005).

Tragen an der dilatativen Kardiomyopathie erkrankte Patienten ein oder zwei 1165G (Gly389) Allele, wird das Auftreten einer ventrikulären Tachykardie unterdrückt. Außerdem besteht ein geringeres Risiko einen plötzlichen Herztod zu erleiden (Iwai et al. 2002). Erhalten die Patienten über sechs Monate den  $\beta$ -Blocker Carvedilol, ist eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei ein oder zwei 1165C (Arg389) Allelen bevorzugt auszumachen (Brodde 2008).

Der 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus beeinflusst ebenfalls das insuffiziente Herz. Die Patienten mit dem 145G (Gly49) unterliegen einem geringeren Risiko eine Herzinsuffizienz bei bestehender idiopatischer dilatativer Kardiomyopathie zu entwickeln (Forleo et al. 2004). Allerdings stellte Podlowski fest, dass an dilatativer Kardiomyopathie Erkrankte oftmals homozygot oder heterozygot für das 145G (Gly49) sind (Podlowski et al. 2000). Das Codon 49 beeinflusst das Langzeitüberleben der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Die 5-Jahresmortalitätsrate ist sowohl bei dem homozygoten als auch bei dem heterozygoten 145G (Gly49) deutlich niedriger als bei dem 145A (Ser49). Dem 145G

(Gly49) wird ein kardioprotektiver Effekt bei vorliegender Herzinsuffizienz zugeschrieben (Börjesson 2000, Levin et al. 2002).

#### **1.6.4 Wechselwirkungen der beiden $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen**

Die homozygote 145GG (Gly49Gly) Variante ist beinahe immer mit dem homozygoten 1165CC (Arg389Arg) verbunden, das 145A (Ser49) kann sowohl mit dem 1165C (Arg389) als auch mit dem 1165G (Gly389) auftreten (Magnusson et al. 2005, Brodde 2008). Das 145GG1165GG (Gly49GlyGly389Gly) ist sehr selten in der Bevölkerung vorzufinden.

Der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus wird wahrscheinlich von dem 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus moduliert. Das 145G1165C (Gly49Arg389) und 145A1165C (Ser49Arg389) verursachen eine stärkere Antwort als das 145A1165G (Ser49Gly389) (Johnson et al. 2003, Sandilands et al. 2004, Bruck et al. 2005). Dies ist an der erhöhten cAMP-Konzentration nach Isoprenalinstimulation erkennbar. Die damit verbundene Desensibilisierung ist bei 145G1165C (Gly49Arg389) größer als bei 145A1165G (Ser49Gly389) (Sandilands et al. 2004).

Unter sportlicher Ertüchtigung war eine Zunahme der Herzfrequenz bei dem homozygoten 145AA (Ser49Ser) stärker als bei den 145G (Gly49). Dieser Anstieg unterschied sich nicht zwischen dem 1165C (Arg389) und dem 1165G (Gly389). Der diastolische Blutdruck war bei dem 145GG (Gly49Gly) signifikant höher als bei einem oder beiden 145A (Ser49). Der maximale Sauerstoffverbrauch war bei dem 145GG1165CC (Gly49GlyArg389Arg) am höchsten und bei dem 145AA1165GG (Ser49SerGly389Gly) am geringsten (Defoor et al. 2006).

Der 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus habe nach Johnson et al. keinen Einfluss auf den Blutdruck. Unter Metoprololtherapie ließ sich eine deutliche Verminderung des diastolischen Blutdrucks bei dem homozygoten 145AA1165CC (Ser49SerArg389Arg) verzeichnen. Das 145AG1165CG (Ser49GlyArg389Gly) zeigte keine Reduktion (Johnson et al. 2003). Liu et al. beschrieben die Patienten mit dem 145AA1165CC (Ser49SerArg389Arg) und dem 145AG1165CC (Ser49GlyArg389Arg) als „good responder“ für die Metoprololtherapie. Es war eine Reduktion des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruckes nachweisbar. Die Träger des 145AG1165CG (Ser49GlyArg389Gly) und des 145AA1165GG (Ser49SerGly389Gly) wurden als „nonresponder“ bezeichnet (Liu et al. 2006). Allerdings liegen drei Studien vor, die keine unterschiedlichen Effekte der

Polymorphismen unter Atenolol- oder Bisoprololtherapie aufzeigten (O'Shaughnessy et al. 2000).

White et al. konnten keine Abhängigkeiten der 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismen mit dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit feststellen (White et al. 2002).

### **1.6.5 Der Einfluss der $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen auf die Wirkung des Noradrenalin**

Nur wenige Prozent des im Blutplasma befindlichen Noradrenalins werden von dem Nebennierenmark gebildet. Der größte Teil wird von den sympathischen Nerven als Neurotransmitter freigesetzt, 20 bis 30% gelangen in das Blut. 80 bis 90% des neuronal freigesetzten Noradrenalins werden wieder von den sympathischen Nervenendigungen über einen aktiven Transporter (Reuptake 1) aufgenommen. Die restlichen 10 bis 20% werden extraneuronal entfernt (Esler et al. 1990, Seals und Esler 2000). Das aus therapeutischen Zwecken infundierte Noradrenalin wird hauptsächlich neuronal aufgenommen.

Die Konzentration des Noradrenalins im Blutplasma wird von seiner Freisetzung und Entfernung begrenzt. Die sogenannte Plasmareinigung ist vermindert und somit der Plasmaspiegel erhöht, wenn ein reduziertes Herzauswurfvolumen und ein verminderter peripherer Blutfluss bestehen. Dies ist bei der chronischen Herzinsuffizienz der Fall. Der resultierende Noradrenalinüberschuss liegt am Herz bei 500% und an der Niere bei 200% (Hasking et al. 1986).

Snapir et al. konnten keinen Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Wirkungen des Adrenalins und Noradrenalins feststellen (Snapir et al. 2003). Bei jungen Erwachsenen war ebenfalls kein Unterschied des übungsbedingten Herzfrequenzanstiegs durch neuronale Noradrenalinfreisetzung nachweisbar (Xie et al. 2001, Büscher et al. 2001). In der Studie von Molenaar wurde den Patienten während der koronaren Bypassoperation eine Probe der rechten Vorhofmuskulatur entnommen. Unter in vitro-Bedingungen konnten jedoch keine Unterschiede in den maximalen Effekten des Noradrenalin bezüglich der 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismen nachgewiesen werden (Molenaar et al. 2002).

Während eines kardiochirurgischen Eingriffs wurde Myokard aus dem Vorhof entnommen. Daraufhin folgte die direkte Gabe von Noradrenalin auf das entnommene Gewebe. Das 1165CC (Arg389Arg) zeigte eine signifikant stärkere Antwort als das 1165GG (Gly389Gly). Demzufolge lag bei dem 1165CC (Arg389Arg) ein höherer intrazellulärer cAMP-Spiegel vor als bei dem 1165GG (Gly389Gly) (Sandilands et al. 2003).

Nach einer koronaren Bypassoperation wurde den Patienten Adrenalin verabreicht, um das Herz in seiner Inotropie zu unterstützen. Die 1165CC (Arg389Arg) Träger benötigen hierbei eine geringere Dosis über einem kürzeren Zeitraum. Zusätzlich wurden an den Patienten Herzfrequenz und systolischer Blutdruck gemessen, beide Werte waren bei den homozygoten 1165CC (Arg389Arg) niedriger (Leinweber et al. 2007).

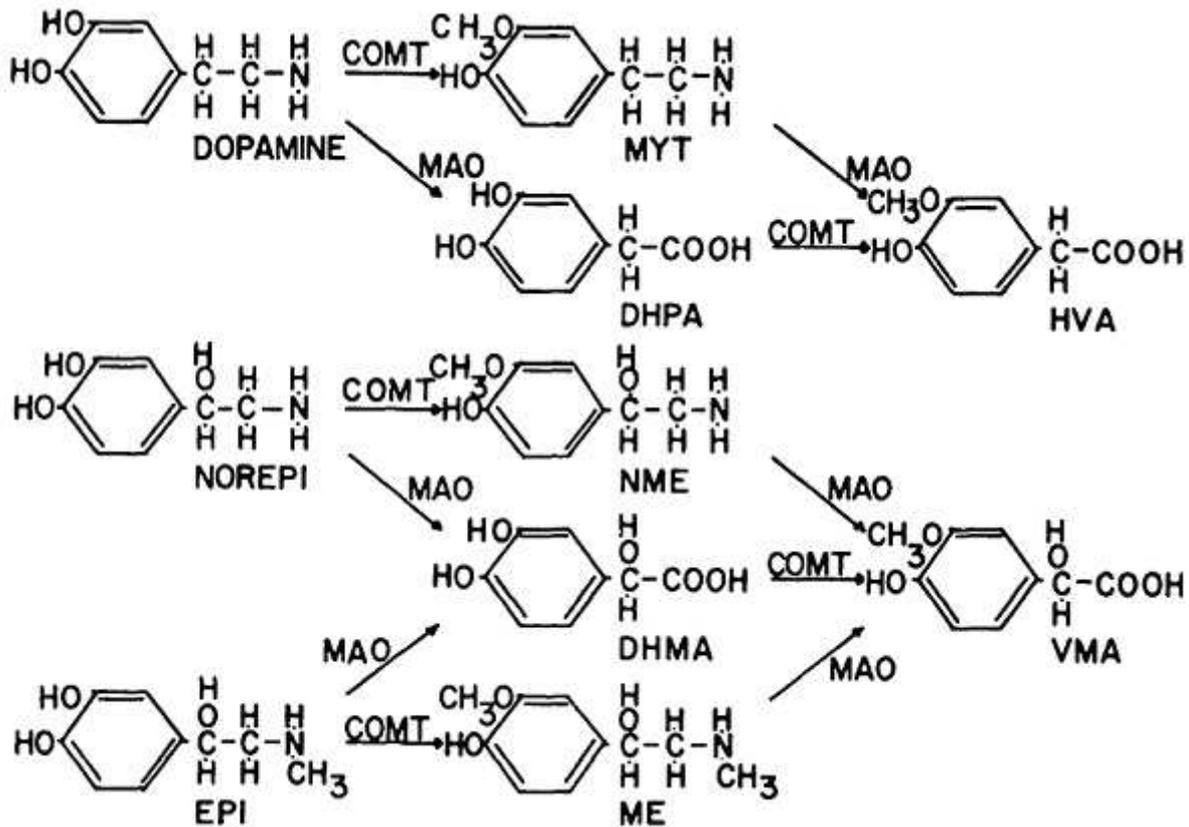
## **1.7 Die Metabolisierung des Adrenalin und Noradrenalin**

Die Metabolisierung der Catecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin erfolgt entweder intraneuronal über oxidative Deaminierung der Monoaminoxidase (MAO) oder extraneuronal durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) (Lightman und Iversen 1969, Esler et al. 1990). Jarrott erklärte, dass es keinen Unterschied in der Aktivität der MAO und COMT in verschiedenen Spezies gäbe (Jarrott 1970). Aus diesem Grund wurden viele Studien an der COMT der Ratte durchgeführt. Der prinzipielle Abbauweg des Adrenalins (Epinephrins) und Noradrenalins (Norepinephrins) ist die O-Methylierung in das Metanephrin und Normetanephrin. Diese Reaktion erfolgt durch die COMT. Die entstandenen Metanephrine sind somit inaktiviert (Axelrod et al. 1958, Axelrod und Tomchick 1958, LaBrosse et al. 1958).

In der Inaktivierung der Epinephrine spielt die MAO eine geringe Rolle. Das unspezifische Enzym ist in den Mitochondrien der Gewebszellen vorzufinden und katalysiert die Deaminierung der Aminogruppe (Corne und Graham 1957, Hanna 1965).

Die Abbildung 1.5 bildet die folgenden Metabolisierungsschritte ab. Das Noradrenalin wird über die COMT in Normetanephrin umgewandelt, anschließend wird dieses durch die MAO in die 3-Methoxy-4-Hydroxymandelsäure (Vanillinmandelsäure) deaminiert. In den Nervenzellen wird das Noradrenalin zu Beginn über die MAO in die 3,4-Dihydroxymandelsäure metabolisiert. Daraufhin wird das Reaktionszwischenprodukt durch die COMT in die Vanillinmandelsäure katalysiert

(Axelrod 1957, Axelrod und Tomchick 1958, Hanna 1965, Esler et al. 1990). Die Ausscheidung der Abbauprodukte, in zum Teil glykronidierter Form, erfolgt über den Urin. 1 bis 2% des produzierten Adrenalins und Noradrenalins werden unverändert über den Urin eliminiert (Axelrod et al. 1958, Esler et al. 1990).

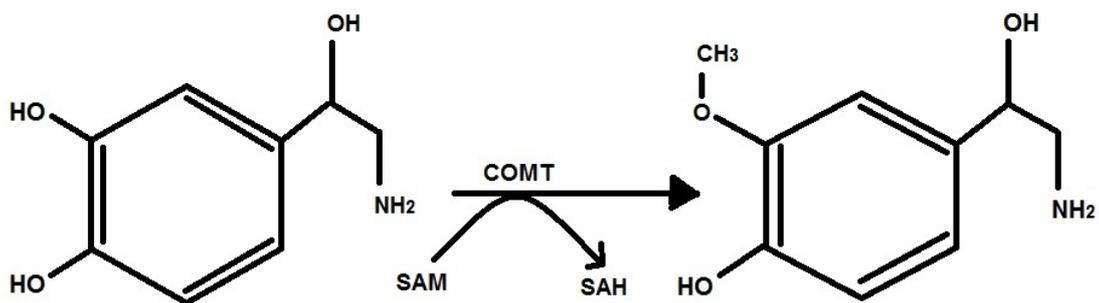


**Abbildung 1.4** Die Metabolisierungswege der Catecholamine. Dopamin, Noradrenalin (NOREPI) und Adrenalin (EPI) werden durch die Catechol-O-Methyltransferase oder Monoaminoxidase (MAO) in 3-Methoxytyramin (MYT), 3,4-Dihydroxyphenylacetat (DHPA), Normethanephrin (NME), 3,4-Dihydroxymandelsäure (DHMA) und Methanephrin (ME) metabolisiert. Die Endprodukte sind die Homovanillinmandelsäure (HVA) und Vanillinmandelsäure (VMA). (Hanna 1965, mit Genehmigung des Verlags, ARVO)

## 1.8 Die Catechol-O-Methyltransferase - COMT

Die COMT ist ein wichtiges Enzym für die Metabolisierung der endogenen Catecholamine und Catecholestrogene (Axelrod und Tomchick 1958, Lotta et al. 1995, Hagen et al. 2007). Bereits 1957 isolierte Axelrod in der Rattenleber die COMT. Außerdem wies er die Metabolite Methoxyepinephrin und -norepinephrin im Urin nach. Das wichtigste Organ des Abbaus ist die Leber. Das Gehirn, die Nieren und die Milz sind zur O-Methylierung ebenfalls fähig (Axelrod 1957). 1958 entdeckten Axelrod und Tomchick dieses Enzym auch im Menschen (Axelrod und Tomchick 1958).

Die COMT transferiert eine Methylgruppe unter Vermittlung der Cofaktoren, S-Adenosylmethionin und einem Magnesiumion, zu einer 3-Hydroxylgruppe des Catecholkerns (Axelrod 1957, Axelrod und Tomchick 1958, Waltman und Sears 1964, Campbell et al. 1984). Es wird 1 mol d- oder l-Epinephrin (Adrenalin) in 1 mol Methanephrin umgewandelt. Der Reaktionsprozess ist in der Abbildung 1.5 dargestellt. Das pH-Optimum ist von 7,5 bis 8,2 definiert. Die Inhibitoren der COMT sind Pyrogallole, Catechole, Tropolone und Dihydroxyphenylacetamide (Waltman und Sears 1964).



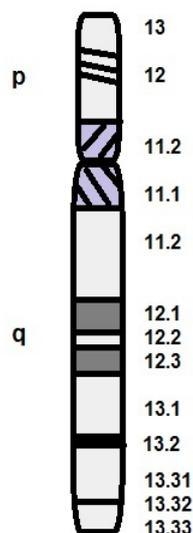
**Abbildung 1.5** Die Metabolisierung eines Catecholamins über die COMT. S-Adenosylmethionin (SAM) dient als Cofaktor und wird zu S-Adenosylhomocystein (SAH) demethyliert.

Die COMT ist ein intrazelluläres Enzym und ist praktisch in jedem Gewebe vorzufinden (Hanna 1965, Männistö und Kaakkola 1999). Die Leber weist eine dreifach höhere Aktivität als die Nieren auf. Die Aktivität in dem Duodenum ist 30% niedriger als in der Niere. Im Blut ist die COMT in den Erythrozyten und Lymphozyten situiert (Männistö und Kaakkola 1999). Karhunen et al. beschrieben das Vorhandensein der COMT in der Ohrspeicheldrüse, Pankreas, Adenohypophyse, Gehirn, periphere Nerven, Ganglien und Blutgefäßen (Karhunen et al. 1994).

Es zeigen sich Unterschiede in der COMT-Aktivität zwischen Männern und Frauen. Die männliche Leber besitzt eine signifikant höhere Metabolisierungskraft als die Weibliche (Boudíková et al. 1990). Sie nimmt außerdem von der Geburt bis zum Erwachsenenalter um das zehnfache zu (Männistö und Kaakkola 1999). In der Niere verhält es sich ebenso, die Aktivitätssteigerung ist jedoch nur das Fünffache (Vieira-Coelho und Soares-da-Silva 1996).

### 1.8.1 Die genetische Codierung der COMT

Die COMT ist auf dem Chromosom 22 zwischen den Banden q11.1 bis q11.2 codiert (Grossman et al. 1992, Winqvist et al. 1992). Das Gen, welches die Information für zwei Proteine, der löslichen und der membrangebundenen COMT, enthält, besteht aus sechs Exons, wobei die ersten beiden nicht codierend sind. Die Initiationscodone, ATG, sind im dritten Exon und die Stoppcodone im sechsten Exon situiert. Es liegen zwei regulierende Promotorregionen vor. Der Promotor P2 ist für Synthese einer 1,5 kb langen mRNA, die für die membrangebundene COMT (MB-COMT) codiert, verantwortlich. Der zweite Promotor P1 ist zwischen den Startcodonen der beiden COMT-Varianten lokalisiert und reguliert die Bildung der 1,3 kb langen mRNA. Letztere enthält die Translationsinformation der löslichen COMT (S-COMT). Die größere mRNA wird konstitutiv gebildet. Der Promotor 1 wird entsprechend gewebsspezifischer Funktionen reguliert. Demzufolge differieren die Mengen der kürzeren mRNA von Gewebe zu Gewebe. Die höchsten 1,3 kb mRNA-Konzentrationen sind in der Leber und der Niere vorzufinden. In der Leber sind die beiden Promotoren P1 und P2 hoch aktiv. Im Gehirn ist der Promotor 1 kaum aktiv. (Tenhunen et al.1994, Lundström et al. 1995). Die Synthese der MB- und S-COMT wird auf den Transkriptions- und Translationsebenen geregelt. Zudem ist eine Beeinflussung durch die Auswahl der beiden AUG Initiationscodone von Bedeutung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit des alternativen Spleißens (Ulmanen und Lundström 1991, Lundström et al. 1995).



**Abbildung 1.6** Darstellung des Chromosom 22. Die COMT ist in den Banden von q11.1 bis q11.2 codiert. (in Anlehnung an Grossman et al. 1992)

Die im Zytoplasma lokalisierte S-COMT ist aus 221 Aminosäuren zusammen gesetzt und hat ein Molekulargewicht von 25 kDa. Die MB-COMT ist 50 Aminosäuren länger als die S-COMT und ist mit einem Molekulargewicht von 30 kDa gekennzeichnet. Die 50 Aminosäuren bilden einen hydrophoben aminoterminalen Anker (Lundström et al. 1991, Tenhunen et al. 1994). Er wird in die zellulären Membranen eingebaut. Der katalytische Abschnitt des integralen Proteins ist in die Richtung des Zytoplasmas orientiert. Die carboxyterminale Region ist auf der zytoplasmatischen Seite der Membran situiert (Ulmanen und Lundström 1991).

Die MB-COMT konnte an dem rauen Endoplasmatischen Retikulum und an der Membran des Zellkerns nachgewiesen werden. Eine Bindung an der Plasmamembran wurde ausgeschlossen. Die S-COMT wurde im Zytosol und im Zellkern vorgefunden (Ulmanen et al. 1997).

Die S-COMT dominiert in den meisten Geweben. Die Leber enthält 85%, die Nebenniere 74%, die Niere 77% und das Duodenum 89% der S-COMT bezogen auf die gesamte COMT-Menge. Das Gehirn ist mit einem 30%igen S-COMT-Anteil versehen. Demnach überwiegt die MB-COMT im zentralen Nervensystem. Diese COMT-Variante ist auch in der Leber, Niere, Lunge und Nebenniere nachweisbar. Das Herz, die Lymphozyten und die Brustdrüsen enthalten nur einen geringen MB-COMT-Anteil (Tenhunen et al. 1994).

Die MB-COMT hat eine 100-fach höhere Noradrenalinaffinität, jedoch eine niedrigere katalytische Aktivität als die S-COMT (Grossman et al. 1992, Lotta et al. 1995, Vieira-Coelho und Soares-da-Silva 1996). Die in der Leber befindliche MB-COMT kennzeichnet eine drei- bis vierfache unterschiedliche Enzymaktivität (Lachman et al. 1996).

### **1.8.2 Die Struktur der COMT**

Die COMT ist aus acht  $\alpha$ -Helices und sieben  $\beta$ -Strängen aufgebaut. Sie sind in einer typischen  $\alpha/\beta$ -Struktur gefaltet. Das aktive Zentrum beinhaltet die Bindungsstellen für die Cofaktoren. Zudem werden Wasser und das eigentliche Substrat gebunden. Zu Beginn wird das S-Adenosylmethionin in das aktive Zentrum gebunden, da die Assoziationsstelle sehr tief im Enzym situiert ist. Es folgt das Magnesiumion. Es bindet das Wassermolekül und erhöht die katalytische Aktivität. Als letztes wird das Substrat aufgenommen. Die Methylierung erfolgt entweder an der meta- oder an der para-Hydroxylgruppe des Catechols. Sowohl die MB-COMT als auch die S-COMT

bevorzugen die meta-O-Methylierung. Das Substrat und der Inhibitor werden über eine flache Furche an der Enzymoberfläche gebunden (Vidgren et al. 1994, Lundström et al. 1995, Männistö und Kaakkola 1999). Die COMT ist ein relativ langsames Enzym (Schultz und Nissinen 1989).

### 1.8.3 Der COMT-Polymorphismus

Der 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus (rs4680) ist wichtig für individuelle Differenzen in der Metabolisierung von Catecholaminmedikamenten und endogenen Catecholen (Grossman et al. 1992). Weinshilboum und Raymond beschrieben bereits 1977 unterschiedliche COMT-Aktivitäten (Weinshilboum und Raymond 1977). Der Polymorphismusnachweis im vierten Exon bekräftigte dies. Es wurde in dem Codon 158 der MB-COMT und in dem Codon 108 der S-COMT eine Punktmutation nachgewiesen. Guanin wird ausgetauscht durch Adenin. Daraus resultiert ein Aminosäureaustausch des COMT-Proteins. Valin wird durch das Codon **GTG** codiert und entspricht dem Wildtyp. Es wird durch Methionin (Codon **ATG**) ersetzt.

Der Aminosäureaustausch bewirkt eine unterschiedliche Thermostabilität und katalytische Aktivität des Enzyms. Die valintragende MB-COMT ist bei 37°C stabiler als die methioninenthaltene MB-COMT. Eine erhöhte Proteinstabilität besteht, wenn sich eine hydrophobe Aminosäure an der Oberfläche befindet. Das Valin ist hydrophober als das Methionin. Demzufolge ist die Wildtyp-COMT stabiler als die mutierte COMT (Chen et al. 2004). Folglich ist die Thermostabilität ein sensitives Maß für die Unterscheidung der beiden COMT-Varianten (Weinshilboum et al. 1999). Die Substitution des Valins durch das Methionin beeinflusst die Enzymaktivität.

Die Personen mit dem homozygoten 472GG (Val158Val) weisen eine drei- bis vierfach höhere Aktivität als die Träger des homozygoten 472AA (Met158Met) auf (Weinshilboum und Raymond 1977, Lotta et al. 1995, Lachman et al. 1996). Die Thermostabilität wurde bereits 1977 von Scanlon getestet. Das homozygote 472GG (Val158Val) ist mit einer hohen Enzymaktivität (H-COMT) und Thermostabilität verbunden. Die valin- und methioninenthaltene (472GA) COMT besitzt eine intermediäre Aktivität und ist thermostabil. Liegt das 472AA (Met158Met) in homozygoter Form vor, ist die katalytische Wirkung um 60-70% reduziert (L-COMT) und es fällt eine Temperaturlabilität auf (Scanlon et al. 1979, Weinshilboum und Dunnette 1981, Lachman et al. 1996).

Weinshilboum und Raymond vertraten 1977 die Auffassung, dass die COMT mit verminderter Umsatzrate autosomal rezessiv vererbt werden würde (Weinshilboum und Raymond 1977). Zwei Jahre später widersprachen Scanlon et al. dieser These und beschrieben einen codominanten Vererbungsmechanismus (Scanlon et al. 1979). Das wurde von Weinshilboum et al. 1999 bestätigt.

Die Verteilung der beiden Allelvarianten ist nahezu ausgeglichen in der kaukasischen Bevölkerung (Weinshilboum et al. 1999). Die 472GG COMT liegt im asiatischen Raum zu 70-80% vor (Kunugi et al. 1997). Die Afroamerikaner weisen einen erhöhten H-COMT-Anteil (472GG) von 55% auf, die intermediär aktive COMT (472GA) liegt zu 38% vor und die mit der verminderten katalytische Wirkung verbundene COMT (472AA) zu 7% (McLeod et al. 1994).

In einigen Studien wurde eine Beeinflussung des 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus auf kardiovaskuläre Ereignisse geprüft. Das homozygote 472GG (Val158Val) ist mit erhöhten systolischen Blutdruckwerten verbunden (Hagen et al. 2007). Daraus ergab sich laut Eriksson et al. ein erhöhtes Herzinfarkttrisiko der 472GG COMT-enthaltenen, hypertensiven Patienten. Möglicherweise wirkt die 472AA COMT kardioprotektiv (Eriksson et al. 2004). In einer finnischen Studie wurde allerdings eine Assoziation der 472AA COMT mit der erhöhten Neigung zu koronaren Herzkrankheiten festgestellt (Voutilainen et al. 2007).

## 1.9 Aufgabenstellung

Mit der Entdeckung verschiedener Polymorphismen an dem  $\beta_1$ -Adrenorezeptor stellten sich die 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismen als aktivitätsrelevant dar (Maqbool et al. 1999). In zahlreichen Studien konnten Assoziationen des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus mit einer agonistenbedingten Herunterregulation des Rezeptors (Levin et al. 2002, Rathz et al. 2002), der Herzfrequenz (Ranade et al. 2002, Defoor et al. 2006), der Mortalitätsrate (Magnusson et al. 2005), des LVEDD (Terra et al. 2005) und der agonistenbedingten Aktivierung des Adenylzyklase (Levin et al. 2002) festgestellt werden.

Der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus beeinflusst die Kopplung des G-Protein und ist somit mit einer unterschiedlichen Adenylzyklaseaktivität verbunden (Small et al. 2003). Es konnten Zusammenhänge mit dem Blutdruck, dem kardialen Auswurfvolumen und der damit verbundenen Hypertonie nachgewiesen werden (Bengtsson et al. 2001, McCaffery et al. 2002). Der Sauerstoffverbrauch und die

Wirkung einer  $\beta$ -Blockertherapie wurden in zahlreichen Studien berücksichtigt (Wagoner et al. 2002, Johnson et al. 2003, Liu et al. 2003, Sofowora et al. 2003, Bruck et al. 2005, Terra et al. 2005, Liggett et al. 2006). Es liegen wenige Studien vor, in denen kardiochirurgische Patienten im Mittelpunkt der Untersuchung standen. Nach den Herzoperationen wurde die agonistenbedingte Kontraktionskraftsteigerung des Herzens unter Einfluss der Rezeptorpolymorphismen untersucht (Molenaar et al. 2002, Sandilands et al. 2003).

Der Catechol-O-Methyltransferase wurden ebenfalls polymorphismusbedingte Einflüsse auf das Herz-Kreislaufsystem nachgewiesen. Das Herzinfarkttrisiko und der Blutdruck unterliegen ihrer Beeinflussung. Jedoch wurde eine Abhängigkeit des COMT-Polymorphismus auf den postoperativen Verlauf schwer kardialkranker Patienten nicht berücksichtigt. Ebenso fanden keine Untersuchungen der  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen unter Berücksichtigung der Catechol-O-Methyltransferase auf das Herz-Kreislaufsystem statt.

Es sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine Studien veröffentlicht worden, in denen der postoperative Verlauf schwer kranker Patienten unter Einfluss der drei Polymorphismen untersucht wurde. Dieser Aspekt gab Anlass eine solche Untersuchung durchzuführen. Es stellte sich das Ziel eine Assoziation der 145A>G (Ser49Gly), 1165G>C (Arg389Gly), 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismen und deren Kombinationen auf den Noradrenalinverbrauch eines speziellen Patientenkontingents festzustellen. Aus diesem Grund wurden Probanden ausgewählt, welche unter starken Stressbedingungen des Körpers in Form eines kardiochirurgischen Eingriffs standen. Außerdem waren sie aufgrund verschiedener Comorbiditäten zusätzlich einem erhöhten Risiko ausgesetzt, was der Euroscore in Form eines Punktwertes wiedergab. Zielparameter der Studie war der postoperative kumulative Noradrenalinverbrauch, wichtige Nebenparameter waren der Gesamtcatecholaminverbrauch, der präoperative Plasmacatecholaminspiegel, der Euroscore, die Liegezeiten auf der Intermediate Care und Intensivstation und der Aufenthalt im Krankenhaus.

Zudem waren nahezu alle Studienpatienten an einer Herzinsuffizienz unterschiedlichen Grades erkrankt. Das stellte einen weiteren Aspekt dar, dass die Auswirkungen der Polymorphismen zum Tragen kommen könnten (Brodde und Michel 1999, Brodde und Stein 2003).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Autosampler                | Knauer Advanced Scientific Instruments Smartline Autosampler 3950, Berlin        |
| Brucheisautomat            | intercontinentale Ziegra-Eismaschinen GmbH, Isernhagen                           |
| Elektrochemischer Detektor | Recipe Amperometric Detector EC 3000, Chemicals + Instruments GmbH München       |
| Fotometer                  | BioPhotometer Eppendorf, Hamburg   |
| Gefrierschrank (-21°C)     | Comfort, Liebherr, Bibera ch an der Riß  |
| Gelkammer                  | EasyCast™ ElektrophoresisSystem Model #B2, OwlScientific, Inc., Woburn (USA)     |
| Kühlschrank                | Bosch, Stuttgart   |
| Magnetrührer               | Hotplate Stirrer Model L-81, Hartenstein Laborbedarf für die Forschung, Würzburg |
| Manager                    | Knauer Advanced Scientific Instruments Smartline Manager 5000, Berlin            |
| Messzylinder               | Hirschmann EM Techcolor Germany, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt |
| Mikrowelle                 | Moulinex Micro-CHEF Mo 505, Frankreich   |
| Pipetten                   | Eppendorf, Hamburg   |
| PCR-Gerät                  | LightCycler 1.2, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim                                |
| PCR-Gerät                  | LightCycler®480II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim                              |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Präzisionswaage         | Faust Laborbedarf AG, Schaffhausen  |
| Personalcomputer        | HP rp 5700, Windows Vista®Buisness<br>EM B32/64, OEM Software, Böblingen        |
| Personalcomputermonitor | Brilliance 190B, Philips, Hamburg   |
| Säulenofen              | Knauer Advanced Scientific<br>Instruments Smartline Column Oven<br>4050, Berlin |
| Spannungsgerät          | Blue Power, Serva Electrophoresis<br>GmbH, Heidelberg                           |
| Transilluminator        | BioView UV light, UST-20M-BK<br>wavelength 312nm, biostep®,<br>Jahnsdorf        |
| Abdeckung               | Dark Hood DH-10, biostep®, Jahns-<br>dorf                                       |
| Geldokumentationssystem | Gerix 1000, biostep®, Jahnsdorf   |
| Überkopfschüttler       | BioRS-24, LAB4You GmbH, Berlin  |
| UV-Platte               | Angewandte Gentechnologie System<br>GmbH, Heidelberg                            |
| Vortex Mixer            | VM-300, Gemmy Industrial<br>Cooperation, Taipei (Taiwan)                        |
| Wärmeschüttler          | Thermomixer 5436 eppendorf,<br>Hamburg  |
| Zentrifuge              | Centrifuge 5417R eppendorf,<br>Hamburg  |
| Zentrifuge              | Biofuge stratos, Heraeus Instruments<br>GmbH, Osterode                          |
| Zweikolbenpumpe         | Knauer Advanced Scientific<br>Instruments Smartline Pump 1000,<br>Berlin        |

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

|             |  |
|-------------|--|
| 15-ml Tubes | Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen |
|-------------|--|

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| EDTA-Monovetten               | S-Monovette® 2,7ml, Sarstedt AG + Co, Nürnberg   |
| Fotometerküvetten             | UVette® 220-1600nm Eppendorf, Hamburg  |
| Glaskapillaren                | LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  |
| Multiwell                     | LightCycler®480 Multiwell Plate 96 white, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim   |
| Handschuhe                    | Nitril®Next Gen®, Meditrade, Kieferfelden  |
| Handschuhe                    | roli®protect-Vinyl, Roth, Karlsruhe  |
| HPLC-Glasbehälter             | vwr international GmbH, Darmstadt  |
| HPLC-Deckel                   | vwr international GmbH, Darmstadt  |
| Pipettenspitzen               | Laborfachhandel Dr. Ilona Schubert, Leipzig<br>Multi Guard Barrier Tips, Sorenson™, BioScience, Inc., Salt Lake City (USA) |
| Plastikvials für Kartuschen   | Chromsystems, München  |
| Probenaufbereitungskartuschen | Chromsystems, München  |
| Trennsäule                    | Trennsäule 5100, RP 18, Knauer Advanced Scientific Instruments<br>Smartline Column Oven 4050, Berlin                       |
| Verblomber                    | VZ 11mm  |
| Zentrifugenröhrchen           | Pegle- Darmstadt, Darmstadt  |

### 2.1.3 Reagenzien

#### für die DNA-Isolierung:

Kit DNA Isolierung  
peqGOLD Blood DNA Minikit, peq Lab, Erlangen

#### für die PCR:

BSA  
Sigma-Aldrich, Schnellendorf  
DMSO  
Dimethylsulfoxid Roth GmbH, Karlsruhe

|  |   |
|--|---|
| dNTPs  | dNTP-Set Roth GmbH, Karlsruhe   |
| MgCl <sub>2</sub>  | invitrogen, Karlsruhe   |
| PCR-Puffer   | invitrogen, Karlsruhe   |
| PCR-Wasser   | Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe   |
| Referenzfarbstoff  | Rox Reference Dye, invitrogen,<br>Carlsbad  |
| SYBR Green Mix   | Platinum® SYBR® Green, qPCR<br>Super Mix-UDG, invitrogen, Carlsbad                  |
| Taq-Polymerase   | Platinum Taq-Polymerase, invitrogen,<br>Karlsruhe                                   |
| <u>für die Gelelektrophorese:</u>  |   |
| Agarosegel   | peqGold Universal Agarose, peqlab<br>Biotechnologie GmbH, Erlangen                  |
| DNA Marker   | 100bp DNA Ladder Plus, peqlab,<br>Erlangen  |
| Ethidiumbromidlösung 7%  | Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe   |
| Ladepuffer   | blue loading buffer 6x0,5ml, peqlab,<br>Erlangen                                    |
| 10x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer<br>(0,89M Tris, 0,89M Borsäure, 0,02M EDTA) | Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe   |
| <u>für die HPLC:</u>   |   |
| Methanol   | Methanol Rotisolv® HPLC Ultra<br>Gradient Grade, Carl Roth<br>GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Mobile Phase   | mobile Phase Catecholamines,<br>Chromsystems, München                               |
| Elutionspuffer   | Chromsystems, München   |
| Waschpuffer  | Chromsystems, München   |
| Extraktionspuffer  | Chromsystems, München   |
| Interner Standard  | Chromsystems, München   |
| Kalibrationsstandard   | Chromsystems, München   |
| Plasma Kalibrationsstandard  | Chromsystems, München   |
| Wasser   | 34877 Wasser G Chromasol® für   |

## Verwendete Primer und Sonden

| 1165G>C (Arg389Gly) |   |
|---------------------|---|
| Bezeichnung         | Sequenzfolge                            |
| Vorwärtsprimer      | 5' - GCTGGGCTACGCCAACTC - 3'            |
| Rückwärtsprimer     | 5' - GTGCGCTGGGTGCCTCT - 3'             |
| Anker               | 5' - CGCAGCCCCGACTTCCGCAA-FL - 3'       |
| Sensor              | 5' - LC640-GCCTTCCAGCGACTGCTCT - 3'     |
| 145A>G (Ser49Gly)   |   |
| Vorwärtsprimer      | 5' - CCGAGCCCGGTAACCTG - 3'             |
| Rückwärtsprimer     | 5' - CTGTCCACTGCTGAGACATCG - 3'         |
| Anker               | 5' - CCGCCTCGTTGCTGCCTCCC-FL-3'         |
| Sensor              | 5' - LC640-CCAGCGAAAGCCCCGAGC - 3'      |
| 472G>A (Val158Met)  |   |
| Vorwärtsprimer      | 5' - GGGCCTACTGTGGCTACTCA - 3'          |
| Rückwärtsprimer     | 5' - GGCCCTTTTTCCAGGTCTG - 3'           |
| Anker               | 5' - LC640-TGTGCATGCCTGACCCGTTGTCA - 3' |
| Sensor              | 5' - ATTCGCTGGCATGAAGGACAAG -FL- 3'     |

**Tabelle 2.1** Zusammenfassung der verwendeten Vorwärts- und Rückwärtsprimer, Sensor und Anchor für die 1165G>C (Arg389Gly-), 145A>G (Ser49Gly)  $\beta$ 1-Adrenorezeptorpolymorphismen und den 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus. von der Firma TIB Molbiol, Berlin

## 2.2 Methoden

Es wurden 116 Patienten des Herzzentrum Leipzig in unsere Studie aufgenommen. Sie waren weiß, kaukasischer Abstammung und unterzogen sich entsprechend ihrer kardialen Grunderkrankung einer kardiochirurgischen Operation. Wir schlossen lediglich Patienten aus, welche bereits präoperativ catecholaminpflichtig waren. Sie wurden über die Studie, den damit verbundenen Folgen und Risiken aufgeklärt und willigten der Teilnahme schriftlich zu. Die Durchführung der Studie erfolgte unter

Zustimmung der Ethikkommission der Universität Leipzig in Übereinstimmung der Deklaration von Helsinki.

### **2.2.1 DNA-Isolierung**

Der erste Schritt der DNA-Isolierung stellte die Lyse kernhaltiger Blutzellen dar. Demzufolge wurden als erstes 250 µl des Patientenbluts und 25 µl der Protease in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurden nach Vorgaben des Herstellers 250 µl des BL-Puffers hinzu pipettiert. Nach 10-sekündigem Vortexen wurden die Proben in einem Wärmeschüttler für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Um eine ständige Vermischung des Probeninhaltes, in welchem die Lyse nun begonnen hatte, zu erreichen, wurde der Thermomixer auf ein geringes Maß an Bewegung eingestellt.

War die Inkubationszeit abgelaufen, wurden die Zentrifugenröhrchen kurzzeitig mit dem Vortex vermischt. Nachdem 260 µl absoluten Ethanol hinzugegeben wurde, ist nochmaliges Mischen des Lysates mit dem Vortexer von Nöten gewesen. Der gesamte Ansatz wurde schließlich auf eine HiBind®-DNA-Säule gegeben. Ein Zentrifugationsschritt von 12000 rpm für eine Minute folgte. Der sich daraus ergebende zentrifugierte Rückstand wurde verworfen.

Mehrere Waschschrte wurden nun vorgenommen, zum einen mittels 500 µl des HB-Puffers und darauf folgenden Zentrifugierens, zum anderen mittels zweimaliger Gabe von je 600 µl komplettierten DNA-Waschpuffers und folgender Zentrifugation bei 12000 rpm. Nachdem die DNA von jeglichen Blutbestandteilen und Verunreinigungen ausgewaschen wurde, wurde final ein Trockenvorgang vorgenommen. Dies erreichte man durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm.

Die gewonnene DNA wurde aus der Trennsäulenmatrix eluiert, indem zweimalig 100 µl des auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffers hinzu pipettiert wurden, sich jeweils eine fünfminütige Inkubation bei 70°C und eine einminütige Zentrifugation bei 10000 rpm anschlossen. Die DNA-Proben wurden für die zukünftigen Verwendungen in dem Kühlschrank aufbewahrt.

## **2.2.2 Die Polymerase-Ketten-Reaktion**

### **2.2.2.1 Der Ablauf der Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), eines der wichtigsten Verfahren in der Molekularbiologie, dient der quantitativen Analyse von spezifischen Nukleinsäuresequenzen (Raeymaekers 1995, Heid et al. 1996) und ermöglicht einzelne DNA-Kopien auf das über 10-Millionen-fache zu vermehren (Innis et al. 1988).

Es können verschiedene Nukleinsäuren, wie Plasmid-DNA, Phagen-DNA, komplementäre DNA, genomische DNA, amplifiziert werden. Folgende Materialien werden generell für jede PCR benötigt:

eine thermostabile Polymerase, eine Ausgangs-DNA (Template), zwei komplementäre Oligonukleotidprimer, einen Puffer um das pH-Optimum der Polymerase aufrechtzuerhalten und die Nukleotide.

Das Verfahren verläuft im Allgemeinen in drei Schritten, wie es auch in der Abbildung 2.1 dargestellt ist:

#### **1. Die Denaturierung**

Bei einer Temperatur von 94°C denaturieren die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen.

#### **2. Das Annealing**

Die Temperatur wird auf 57°C reduziert, damit die Oligonukleotidprimer, welche im Übermaß vorherrschen, an die einzelsträngige Template-DNA hybridisieren.

Es werden bevorzugt Primer mit 18 bis 30 Basen und einem 30- bis 70%igen Guanin- und Cytosinanteil verwendet (Mülhardt 2006, Wilfingseder und Stoiber). Da ein zu hoher Guanidin- und Cytosinanteil die Amplifikationseffizienz deutlich vermindert (McDowell et al. 1998). Am 3'-Ende der Primer sind eins bis zwei Guanine und Cytosine enthalten. Dies ermöglicht eine bessere Bindung an der Template-DNA (Mülhardt 2006). Die Sequenz sollte möglichst spezifisch für das Amplifikationsprodukt sein. Haarnadelstrukturen, Poly(T) – Bereiche und eine 3'-Komplementarität müssen vermieden werden, da diese eine Hybridisierung beinahe unmöglich machen (Mülhardt 2006, Wilfingseder und Stoiber). Außerdem sollten keine Primer verwendet werden, die untereinander hybridisieren. Es besteht die Gefahr der Bildung von Primerdimeren.

### 3. Die Elongation

Es wird die Temperatur auf das entsprechende Polymeraseoptimum erhöht. Das sind für die Taq-Polymerase 72°C. Sie verlängert den hybridisierten Primer bis die Template-DNA einen vollständigen Doppelstrang ergibt. Sie ist der Ursprungs-DNA äquivalent.

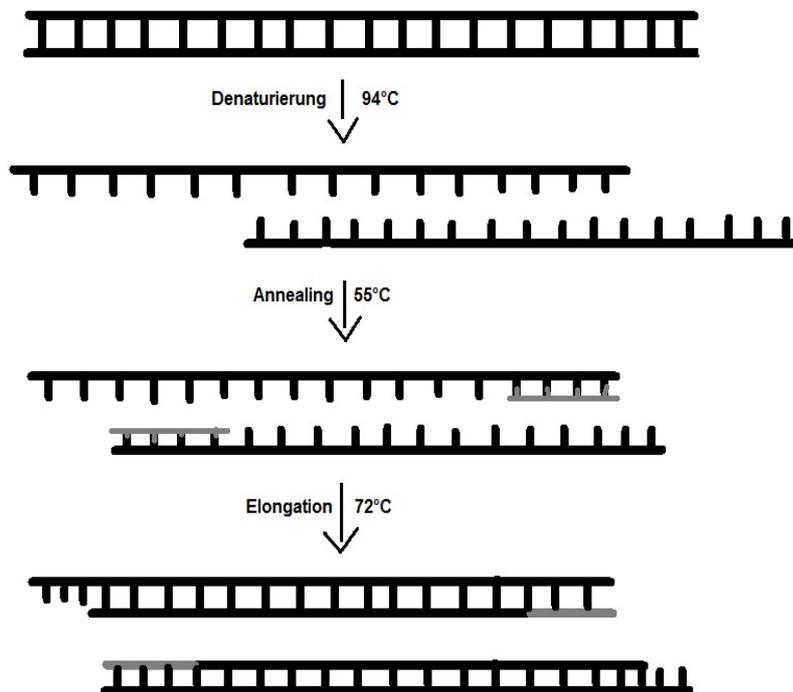
Die Elongation kann durch verschiedene Polymerasen realisiert werden. Dazu zählen zum Beispiel Pfu, Pwo und Tgo. Sie sind durch eine erhöhte Temperaturstabilität und eine zusätzliche 3'-5'-Exonucleaseaktivität charakterisiert. Allerdings ist die Syntheserate nur 550 Nukleotide pro Minute. Weiterhin sind Tth und Tfl zu erwähnen, sie haben eine hohe reverse Transkriptaseaktivität. Demzufolge sind sie für eine cDNA-Synthese beinhalteten PCR geeignet.

Die klassische Polymerase ist die des *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Sie ist mit einem Temperaturoptimum von 72°C gekennzeichnet (Mülhardt 2006) und ist in ihrer Funktion schnell und progressiv (Innis et al. 1988). Zudem fördert sie den Automatismus der PCR und erhöht die Spezifität der Produkte (Holland et al. 1991). Charakteristisch für das Enzym ist außerdem eine 5'-3'-nucleolytische Aktivität (Livak et al. 1995) und eine Syntheserate von 2800 Nukleotiden pro Minute.

Die Fehlerrate der Polymerasen liegt trotz der Fähigkeit des Korrekturlesen bei  $10^6$  Basen, Enzyme ohne dieser Eigenschaft verursachen einen Fehler von  $10^7$  Basen.

Aus diesem Grund werden des Öfteren Polymerasemixe, aus diversen Polymerasen bestehend, verwendet. Das vermindert die Fehlerrate und ermöglicht eine Amplifikation von langen PCR-Fragmenten.

Nach 45 Zyklen ist die Amplifikation beendet. Es werden mindestens 30 Durchgänge von 30 s bei 94°C, 30s bei 55°C und 90 s bei 72°C empfohlen (Mülhardt 2006).



**Abbildung 2.1** Zusammenfassend die drei Schritte der PCR (in Anlehnung an Mülhardt 2006) Der DNA-Doppelstrang wird bei 94°C in ihre Einzelstränge gelöst. Die Primer binden bei 55°C an die DNA. Mittels Taq-Polymerase findet eine Elongation bei 72°C statt.

Die vereinfachte Theorie beschreibt, dass beide Stränge der Template-DNA komplementiert werden, folglich geht aus dem ersten Zyklus die doppelte Anzahl der ursprünglichen Template-DNA hervor. In dem darauf folgenden Zyklus ist die vierfache Menge der Template-DNA nachweisbar. Jedoch ist eine Verdopplung pro Zyklus nicht realisierbar. Es ist wahrscheinlicher mit einem Faktor von 1,6-1,7 zu rechnen (Mülhardt 2006). Die Begründung liegt in einer verminderten initialen Vermehrungsrate, da die Wahrscheinlichkeit, dass Primer und Enzym die Template-DNA zur passenden Zeit finden, recht gering ist (Mülhardt 2006, Wilfingseder und Stoiber). Mit der zunehmenden Anzahl an Template-DNA steigt die Wahrscheinlichkeit an, gegen Ende der Amplifikation sinkt sie wieder. Die Ursache hierfür liegt in der Akkumulation der Endprodukte, wie DNA und Pyrophosphate, in der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Reannealings zweier fertiger DNA-Stränge, in der sinkenden Substratkonzentration und in der Menge an abnehmender intakter Polymerase (Raeymaekers 1995, Mülhardt 2006). Demzufolge ist der PCR-Verlauf

gekennzeichnet durch einen linearen Anstieg zu Beginn, gefolgt von einer exponentiellen Phase, übergehend in ein gesättigtes Plateauniveau (Raeymaekers 1995, Wilfingseder und Stoiber).

Darüber hinaus ist es wichtig  $MgCl_2$  in das Tube zugeben, da Magnesium das Primerannealing, die Strangtrennung während der Denaturierung und die Bildung von Primerdimeren beeinflusst. Zusätzlich ist freies Magnesium für die Enzymaktivität essentiell.

Um die Ausbeute einer Amplifikation zu erhöhen, könnten die Pyrophosphate aus dem Tube entfernt werden. Folglich wird das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Produktes verschoben (Mülhardt 2006).

### **2.2.2.2 Die Real Time (RT) – PCR**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht geringe DNA-Mengen zu vervielfältigen. Die vervielfachte DNA kann durch aufwendige Detektionsmethoden nachgewiesen werden. Dazu zählen unter anderem die Agarosegelverfahren oder die Kapillarelektrophorese, in der fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte mittels Laserbestrahlung dargestellt werden (Heid et al. 1996).

Eine elegantere Methode den Vervielfältigungsprozess darzustellen wurde bereits 1992 von Higuchi entwickelt. Er baute in die PCR-Anlage eine UV(Ultraviolett)-Lampe und eine CCD (Charge-coupled Device)-Kamera ein und gab zusätzlich Ethidiumbromid in das Reaktionsgemisch hinzu. Das Ethidiumbromid wurde während der Amplifikation in die DNA eingebaut und fluoreszierte unter UV-Bestrahlung. Das Fluoreszenzsignal konnte mittels der Kamera detektiert werden, so dass eine Konzentrationsbestimmung der Ziel-DNA möglich war (Higuchi et al. 1992). Er stellte die Grundlage für die Real Time (RT)-PCR (Wilfingseder und Stoiber).

Heutzutage wird nicht mehr das Ethidiumbromid verwendet. Die PCR wird nun in Echtzeit mittels fluoreszierender Farbstoffe sichtbar gemacht (wie die SYBR Green I PCR). Ein Oligonukleotid, welches als Rezeptor dient, kann unspezifisch oder spezifisch an der Ziel-DNA binden. Das detektierte Fluoreszenzsignal steigt proportional mit der Produktmenge (Mülhardt 2006, Wilfingseder und Stoiber).

Ein wichtiges Instrument der heutigen RT-PCR ist die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase. Werden Oligonukleotidproben in das PCR-Reaktionsgemisch gegeben, so wird die Amplifikation nicht gehemmt. Denn die Taq-Polymerase baut aufgrund ihrer nukleolytischen Aktivität nur die hybridisierten Oligonukleotidproben

während der Elongationsphase ab (Holland et al. 1991). Diese Eigenschaft machten sich sowohl Heid et al. als auch Livak et al. zu nutze.

Es wurde ein Oligonukleotid mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der eine Farbstoff war 6-Carboxyfluorescein und diente als Reporter. Der andere Farbstoff war 6-Carboxymethylrhodamin und wirkte als Löscher. Die mit Farbstoffen versehene Probe wurde in das PCR-Reaktionsgemisch gegeben und hybridisierte während der Elongationsphase mit der Ziel-DNA. Das Emissionsspektrum des Fluorescein wurde, sofern die Probe intakt war, durch das Rhodamin absorbiert. Wurde die Probe während der Extensionsphase durch die nukleolytische Aktivität der Taq-Polymerase zerstört, so war eine ausreichende Löschung des Fluoreszenzsignals nicht mehr gewährleistet. Demzufolge konnte die Fluoreszenzemission des Reporters detektiert werden. Die Messung erfolgte in Echtzeit während der exponentiellen Phase der PCR. Es konnte festgestellt werden, dass die Zunahme der Emission proportional der PCR-Produktmenge gewesen ist. Erreichte die PCR schließlich eine hohe Zykluszahl, so konnte eine Plateauphase der Fluoreszenzemission aufgezeichnet werden (Livak et al. 1995, Heid et al. 1996, Gibson et al. 1996).

Die Lokalisation der Fluoreszenzfarbstoffe spielte dabei eine entscheidende Rolle. Generell befand sich der Reporterfarbstoff am 5'-Ende des Oligonukleotids. Der Löscherfarbstoff konnte entweder in der Mitte des Oligonukleotids oder an dessen 3'-Ende lokalisiert sein (Livak et al. 1995). Wichtig war, dass die beiden Farbstoffe eine ausreichende Nähe zu einander hatten. Stryer und Haugland erklärten nämlich, dass das Auslöschung eines Emissionssignals vom Abstand der beiden Farbstoffe abhängig sei (Stryer und Haugland 1967).

Livak meinte jedoch, dass die Lokalisation des Rhodamin am 3'-Ende des Oligonukleotids besser sei. Denn befand sich der auslöschende Farbstoff in der Mitte des Oligonukleotids, gelang nicht immer die Emissionsdetektion. Zudem stellte er eine effizientere Probenspaltung fest, wenn der Reporter und der Auslöcher an den entgegen gesetzten Enden positioniert waren (Livak et al. 1995).

Es wurden schließlich verschiedene Hybridisierungssonden mit höherer Spezifität entwickelt. Dazu zählt zum Beispiel die TaqMan-Sonde. Sie arbeitet nach dem Prinzip von Livak und Heid. Eine Weiterentwicklung der Sonde sind die Molecular Beacons. Diese Oligonukleotide bilden eine Haarnadelstruktur, da deren beiden Enden komplementär zueinander sind. Der Abstand der beiden Fluoreszenzfarbstoffe ist somit immer ausreichend, damit eine Auslöschung der

Reporteremission gewährleistet ist. Hybridisiert die Probe mit der Ziel-DNA, so wird eine Konformationsänderung ausgelöst und die Reporterfarbstoffemission kann nicht mehr gelöscht werden (Wilfingseder und Stoiber).

### **2.2.2.3 Der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) zur Polymorphismusanalyse**

#### **a) Der Ablauf der FRET**

Die FRET ermöglicht ohne Strahlenbelastung eine Quantifizierung von Nukleinsäuren in Kombination mit der real time PCR.

Die in dem PCR-Gemisch enthaltene DNA wird durch den zuvor beschriebenen PCR-Schritt in zwei Stränge zerlegt. Während des Annealingschrittes hybridisieren jeweils zwei Oligonukleotide, der Sensor und der Anker, an bestimmten Stellen der DNA (siehe unten). An den 5'-Enden der Oligonukleotide ist jeweils ein Fluoreszenzfarbstoff (das Fluorochrom) gekoppelt. Wird einer der beiden mit Licht einer definierten Wellenlänge (A1) erregt, so wird das Fluorochrom aktiviert und emittiert Licht der Wellenlänge E1. Das Anregungs- und Emissionsspektrum ist für das Fluorochrom charakteristisch. Das emittierte Licht des Fluorochrom 1 aktiviert nun das zweite Fluorochrom, welches sich in ausreichender Nähe zu ihm befindet. Die Wellenlänge des emittierten Lichts entspricht somit dem Anregungsspektrum des zweiten Fluorochroms. Das aktivierte zweite Fluorochrom emittiert dann Licht mit der Wellenlänge E2.

Die Effizienz einer solchen Energieübertragung fällt rapide mit zunehmender Distanz zwischen den Fluorochromen ab. Ist der Abstand zu groß, das heißt über 70 Å, wird das zweite Fluorochrom nicht mehr aktiviert. Es wird nur das emittierte Licht mit der Wellenlänge E1 des ersten Fluorochroms gemessen. Ist der Abstand der beiden Fluorochrome kleiner als 70 Å, ist ein Resonanzenergie transfer möglich. Demzufolge wird das zweite Fluorochrom aktiviert und emittiert Licht mit der Wellenlänge E2.

Misst ein Spektrofluorimeter nur E1, somit wird das Fluorochrom 1 (F1) als Reporter und das Fluorochrom 2 (F2) als Löscher bezeichnet. Misst es aber E2 wird F1 als Donor oder Anker und F2 als Akzeptor oder Sensor bezeichnet (Cardullo et al. 1988).

## b) Die FRET und Schmelzkurvenanalyse der $\beta_1$ -Adrenorezeptor- und COMT-Polymorphismen

Das Reaktionsgemisch von 20  $\mu$ l je Ansatz wurde für die PCR-Reaktion wie folgt vorbereitet:

destilliertes Wasser

10 mg Bovines Serum Albumin (BSA)

1 x PCR Puffer (20 mmol/l Tris-HCl (pH 8,4), 50 mmol/l KCl)

3 mmol/l  $MgCl_2$

5% Dimethylsulfoxid (DMSO)

0,5  $\mu$ mol/l Vorwärtsprimer

0,5  $\mu$ mol/l Rückwärtsprimer

0,25  $\mu$ mol/l Sensor (0,225  $\mu$ mol/l bezüglich des 145A>G Polymorphismus)

0,25  $\mu$ mol/l Anker (0,225  $\mu$ mol/l Sensor bezüglich des 145A>G Polymorphismus)

0,2 mmol/l von jedem Deoxynukleotidtriphosphat (dNTP)

1 U Taq-Polymerase

15-30 ng isolierte DNA

Die Ansätze für die Polymorphismusanalysen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Dieses Reaktionsgemisch wird anschließend in die Glaskapillare pipettiert und für 10s zentrifugiert. Anschließend werden die gefüllten Glaskapillaren in die vorgesehene Vorrichtung des LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Software 3.5) gegeben und die real time PCR mit FRET wird gestartet.

|                                 | 1165G>C<br>(Arg389Gly) | 145A>G<br>(Ser49Gly) | 472G>A<br>(Val158Met) |
|---------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| destilliertes Wasser in $\mu$ l | 9,1                    | 6,7                  | 11                    |
| BSA in $\mu$ l                  | 0,5                    | 0,5                  | 0,5                   |
| PCR-Puffer in $\mu$ l           | 2                      | 2                    | 2                     |
| $MgCl_2$ in $\mu$ l             | 1,2                    | 1,2                  | 1                     |
| DMSO in $\mu$ l                 | 1                      | 3                    | 0                     |
| Vorwärtsprimer in $\mu$ l       | 1                      | 1                    | 1                     |
| Rückwärtsprimer in $\mu$ l      | 1                      | 1                    | 1                     |

|                                 |     |     |     |
|---------------------------------|-----|-----|-----|
| Sensor in $\mu\text{l}$         | 1,3 | 1,5 | 1   |
| Anker in $\mu\text{l}$          | 1,3 | 1,5 | 1   |
| dNTP in $\mu\text{l}$           | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Taq-Polymerase in $\mu\text{l}$ | 0,2 | 0,5 | 0,2 |

**Tabelle 2.2** PCR-Ansätze für die 1165G>C (Arg389Gly), 145A>G (Ser49Gly)  $\beta$ 1-Adrenozeptorpolymorphismen und den 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus. Zu diesen Ansätzen von 19  $\mu\text{l}$  wird 1  $\mu\text{l}$  genomische DNA hinzupipettiert.

Der erste Schritt der PCR ist die initiale Denaturierung. Die Temperatur wird auf 95°C mit einer Transitionsrate von 20°C/s erhöht. Die Inkubationszeit beträgt 10 min. Daraufhin folgt die Amplifikation der Target-DNA mit 45 Zyklen von 95°C für 10 s, 57°C für 10 s und 72°C für 10 s. Es wird die Temperatur jeweils mit einer Transitionsrate von 20°C/s erhöht. Die Tabelle 2.3 fasst die LightCycler-Bedingungen für die drei Polymorphismusanalysen zusammen.

| 1165G>C (Arg389Gly)                     |               |               |     |     |                      |          |     |         |
|---|---------------|---------------|-----|-----|----------------------|----------|-----|---------|
|   | Denaturierung | Amplifikation |     |     | Schmelzkurvenanalyse |          |     | Kühlung |
| Temperatur in $^{\circ}\text{C}$        | 95            | 95            | 57  | 72  | 95                   | 55/40    | 85  | 40      |
| Inkubationszeit                         | 10 min        | 10s           | 10s | 10s | 20s                  | 20s/120s | 1s  | 30 min  |
| Transitionsrate in $^{\circ}\text{C/s}$ | 20            | 20            | 20  | 20  | 20                   | 20/0,05  | 0,5 | 20      |
| 145A>G (Ser49Gly)                       |               |               |     |     |                      |          |     |         |
| Temperatur in $^{\circ}\text{C}$        | 95            | 95            | 56  | 72  | 95                   | 40       | 85  | 40      |
| Inkubationszeit                         | 10 min        | 10s           | 10s | 10s | 30s                  | 20s      | 0s  | 30 min  |
| Transitionsrate in $^{\circ}\text{C/s}$ | 20            | 20            | 1   | 20  | 20                   | 0,5      | 0,2 | 20      |

| 472G>A (Val158Met)      |        |    |     |     |     |     |     |        |
|-------------------------|--------|----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| Temperatur in °C        | 95     | 95 | 57  | 72  | 95  | 40  | 90  | 40     |
| Inkubationszeit         | 10 min | 5s | 10s | 15s | 20s | 20s | 0s  | 30 min |
| Transitionsrate in °C/s | 20     | 20 | 20  | 20  | 30  | 20  | 0,2 | 20     |

**Tabelle 2.3** Zusammenfassung der PCR-Bedingungen für die Polymorphismusanalyse: initiale Denaturierung, Amplifikation und die anschließende Schmelzkurvenanalyse für die beiden  $\beta$ 1-Adrenozeptorpolymorphismen und dem COMT-Polymorphismus, mit terminalen Kühlungsschritt

In dem vorbereiteten PCR-Ansatz befinden sich sowohl Vorwärts- und Rückwärtsprimer als auch Sensor und Anker. Die Primer binden während des Annealingschrittes der PCR komplementär an die folgende DNA-Sequenzen. Hier am Beispiel des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus: Der Vorwärtsprimer (5' - GCTGGGCTACGCCAACTC - 3') bindet komplementär an die DNA-Sequenz (3' - CGACCCGATGCGGTTGAG - 5') und der Rückwärtsprimer (3' - TCTCCGTGGGTCGCGTG - 5') bindet komplementär an die DNA (5' - AGAGGCACCCAGCGCAC - 3'). Der Elongationsschritt schließt sich an. Die DNA wird vervielfacht.

Im Anschluss an den PCR-Läufen erfolgt die Mutationsanalyse unter Auswertung spezieller Schmelzkurven. Bereits Wallace beschrieb, dass verschiedene Genotypen auch unterschiedliche Schmelzkurven haben (Wallace et al. 1979). Diese Form der Mutationsanalyse wurde für die Untersuchung von genetisch bedingten Erkrankungen und Veränderungen genutzt. Es ist eine schnelle Methode um Patienten mit einem Faktor V Leiden zu identifizieren (Lay und Wittwer 1997) oder die beiden  $\beta$ 2-Adrenorezeptorallelvarianten zu analysieren (Sábato et al. 2008).

Die Mutationsanalyse des  $\beta$ 1-Adrenorezeptors an der 1165sten Position ist durch den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer grundlegend möglich geworden. Eine schematische Darstellung der FRET-Reaktion wird unter anderem in der Abbildung 2.2 wider gegeben.

Die Schmelzkurvenanalyse beginnt mit einer Denaturierung bei 95°C für 20 s. Die doppelsträngige DNA wird in ihre Einzelstränge getrennt. Es schließt sich der Kühlungsprozess an. Er läuft in zwei Schritten ab (der erste Schritt: 55°C,

Inkubationszeit: 20 s, Transitionsrate: 20°C/s und der zweite Schritt: 40°C, Inkubationszeit 120 s, Transitionsrate 0,05°C/s) (Vergleich Tabelle 2.3). Während des Kühlungsprozesses soll eine maximale Hybridisierung des Sensors und des Ankers erreicht werden.

Die Schmelzkurvenanalyse des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus beruht auf der Arbeit von Sauer et al. 2008.

Der Sensor (5´ - LC640-GCCTTCCAGCGACTGCTCT - 3´), welcher den zu analysierenden SNP des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus enthält, bindet komplementär an die DNA (3´ - CGGAAGGTCGCTGACGAGA - 5´). Das 10te Nukleotid der Sensorsequenz ist Cytosin und entspricht dem Cytosin an der 1165sten Position der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-DNA, welches für die Aminosäure Arginin an der 389sten Position des Rezeptorproteins kodiert. Der Sensor bindet komplementär an der Gegenstrang-DNA.

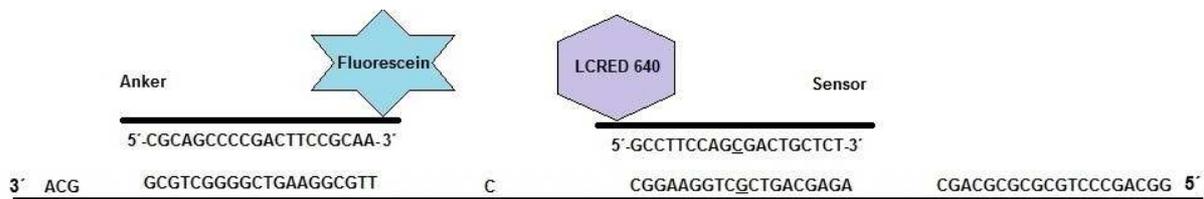
Liegt jedoch anstelle des Arginin das Glycin an der 389sten Position im Rezeptorprotein vor, so ist das Nukleotid Cytosin durch Guanin ausgetauscht. Demzufolge ist das komplementäre Nukleotid des Gegenstrangs Cytosin. Die Bindung des Sensors, welcher wie bereits erwähnt an seiner 10ten Position das Cytosin enthält, ist an der zu untersuchenden DNA-Sequenz folglich schlechter. Weil dieses Cytosin des Sensors nicht komplementär an dem Cytosin der Gegenstrang-DNA binden kann. Zudem ist der Sensor an seinem 5´-Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff LightCycler (LC)-Red markiert.

Der Anker (5´-CGCAGCCCCGACTTCCGCAA-FL-3´) ist mit dem Farbstoff Fluorescein an seinem 3´-Ende markiert und bindet komplementär ein Nukleotid entfernt von dem Sensor an die Gegenstrang-DNA (3´-GCGTCGGGGTGAAGGCGTT-5´).

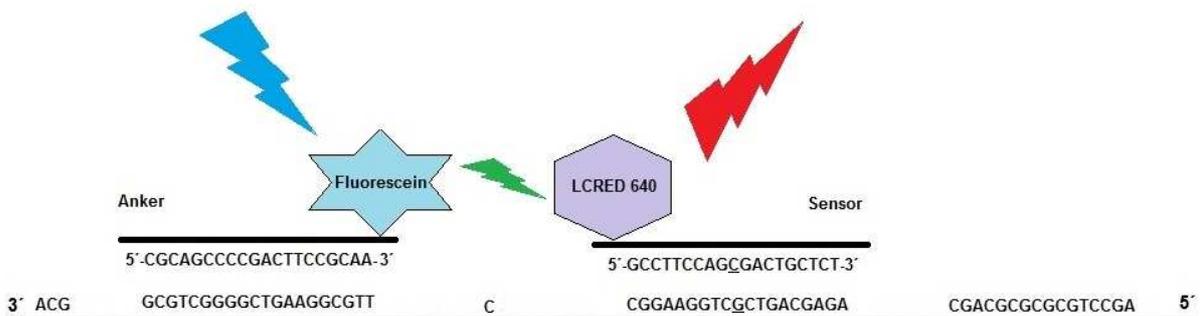
Die Diode des Light Cyclers emittiert blaues Licht und aktiviert somit spezifisch das Fluorescein. Dieser angeregte Fluoreszenzfarbstoff emittiert dann grünes Licht. Das grüne Licht regt spezifisch den Fluoreszenzfarbstoff LC-Red des Sensors an, so dass dieser rotes Licht der Wellenlänge von 640 nm abgibt. Das rote Licht wird von dem Light Cycler sofort gemessen und auf dem Monitor dargestellt.

Nach dem Hybridisierungsschritt der Schmelzkurvenanalyse folgt eine langsame Temperaturerhöhung auf 85°C mit einer Inkubationszeit von 1 s und einer Transitionsrate von 0,5°C/s. Ist der Schmelzpunkt erreicht, so löst sich der Sensor

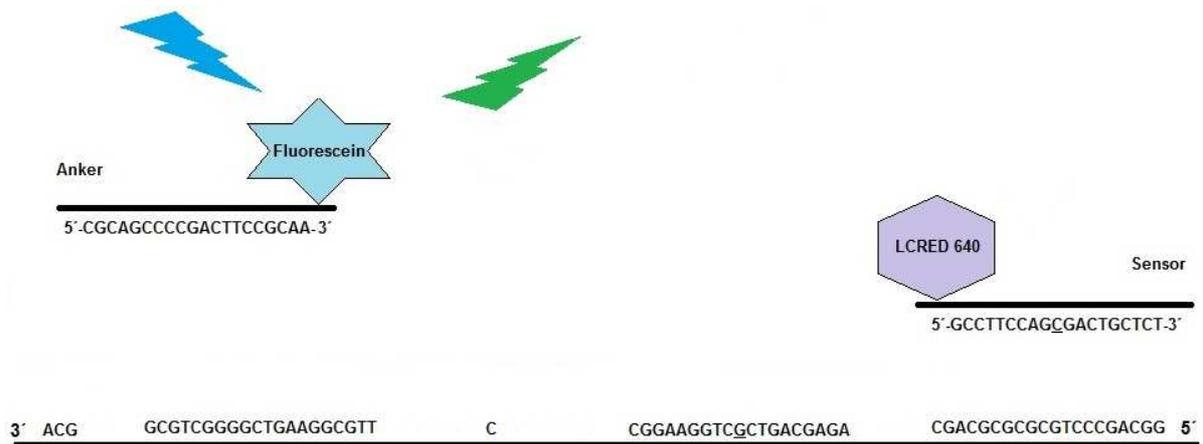
von der DNA. Der Schmelzpunkt ist abhängig von der Komplementarität zwischen dem Sensor und der DNA. Eine Punktmutation bewirkt eine verminderte Bindungsstärke zwischen dem Sensor und der DNA. Somit ist der Schmelzpunkt niedriger. Wird dieser Temperaturpunkt erreicht, so kommt es zu einem plötzlichen Abfall des Fluoreszenzsignals, da sich die Oligonukleotide von der DNA gelöst haben und ein Fluoreszenz-Energie-Transfer nicht mehr möglich ist (siehe Abbildung 2.3). Die erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung über die Temperatur ergibt ein Maximum der Funktion und das entspricht dem Schmelzpunkt (siehe Abbildungen 2.3 bis 2.11).



**1. komplementäre Bindung des Ankers und Sensors an der DNA**

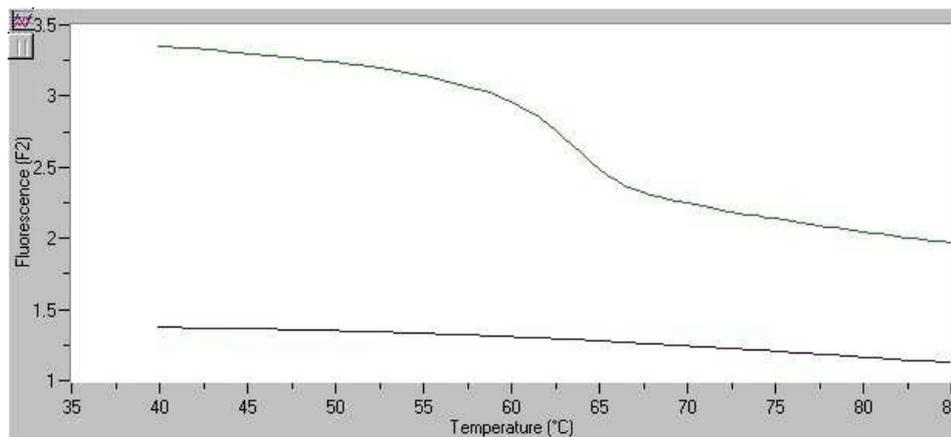


**2. Blaues Licht der Light Cycler Diode emittiert zum Fluorescein des Ankers, dieses wird aktiviert und emittiert grünes Licht. Das grüne Licht aktiviert das LCRED des Sensors und es emittiert rotes Licht, welches der Light Cycler misst.**



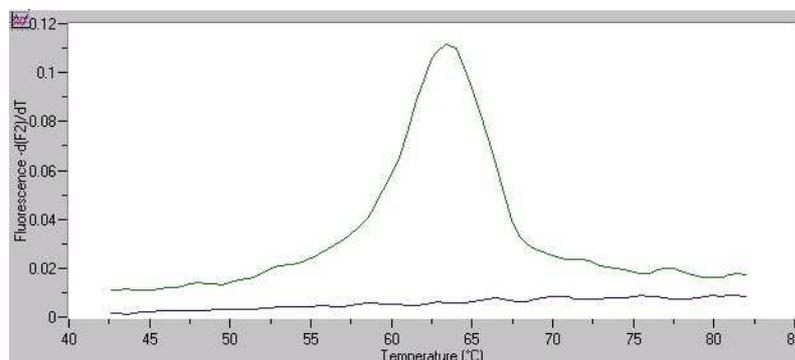
3. Ablösen des Sensors und Ankers bei Erreichen des Schmelzpunktes. Das blaue Licht der Light Cycler Diode wird von dem Fluorescein absorbiert und es emittiert grünes Licht. Dieses wird von dem Light Cycler in Echtzeit registriert.

**Abbildung 2.2** Schematische Darstellung der FRET und Schmelzkurvenanalyse am Beispiel des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus. **1.** Nach dem Ablauf der PCR-Zyklen und der Denaturierung der DNA-Doppelstränge findet der Hybridisierungsschritt der Sonden statt. Der Anker und Sensor binden komplementär an dem bzw. in der Nähe der rezeptorpolymorphismuskodierenden gegensträngigen DNA. Der Anker ist an seinem 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert und der Sensor an seinem 5'-Ende mit dem LCRED 640. **2.** Die Diode des Light Cyclers emittiert blaues Licht, welches spezifisch das Fluorescein aktiviert, woraufhin dieses grünes Licht emittiert. Das grüne Licht bewirkt eine Aktivierung des LCRED und dieses emittiert rotes Licht. Das wird in Echtzeit vom Light Cycler registriert. **3.** Die Temperatur wird nun langsam wieder erhöht. Ist der Schmelzpunkt erreicht, so löst sich der Sensor von der DNA ab. Der Abstand zwischen Sensor und Anker ist zu groß, so dass kein Lichtquant zwischen dem Fluorescein und dem LCRED emittieren kann. Es folgt ein plötzlicher Abfall des zuvor registrierten roten Lichtes.

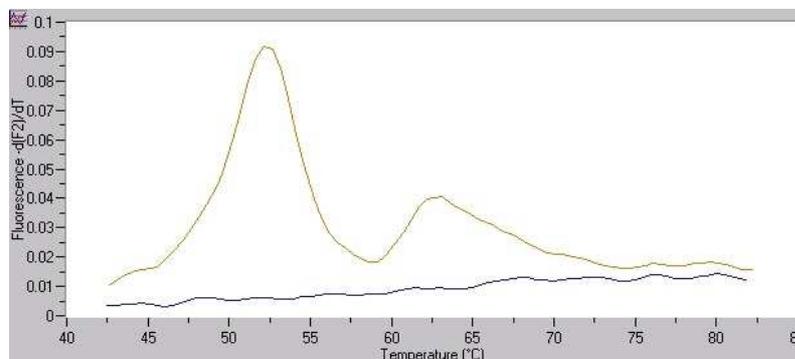


**Abbildung 2.3** Abfall des Fluoreszenzsignals bei Erreichen des Schmelzpunktes für das 1165CC (Arg389Arg)

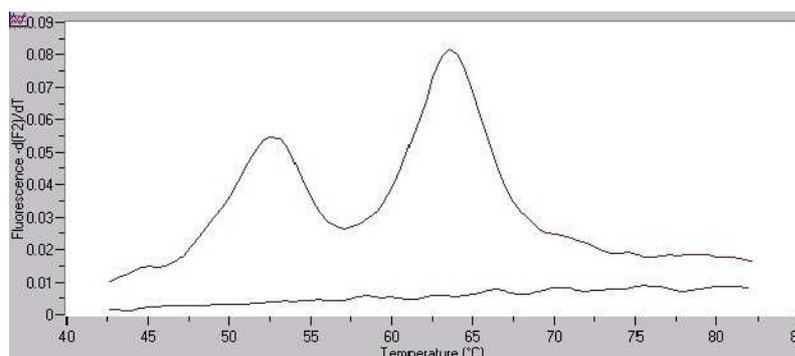
Der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus ist durch zwei spezifische Schmelzpunkte charakterisiert. Liegt das 1165CC (Arg389Arg) vor, so ist der Schmelzpunkt (63,6°C) höher als der Schmelzpunkt des 1165GG (Gly389Gly) (52,5°C). Die Schmelzkurven sind in den Abbildungen 2.4 bis 2.6 dargestellt. Demzufolge ergibt sich für das homozygote 1165CC (Arg389Arg) eine Schmelzkurve mit einem Maximum bei 63,6°C. Die Schmelzkurve für den homozygoten 1165GG (Gly389Gly) ist mit einem Maximum von 52,5°C charakterisiert. Das heterozygote 1165CG (Arg389Gly) ist mit zwei Maxima bei 52,5°C und 63,6°C gekennzeichnet.



**Abbildung 2.4** Schmelzkurve von 1165CC (Arg389Arg) – Schmelzpunkt 63,6°C

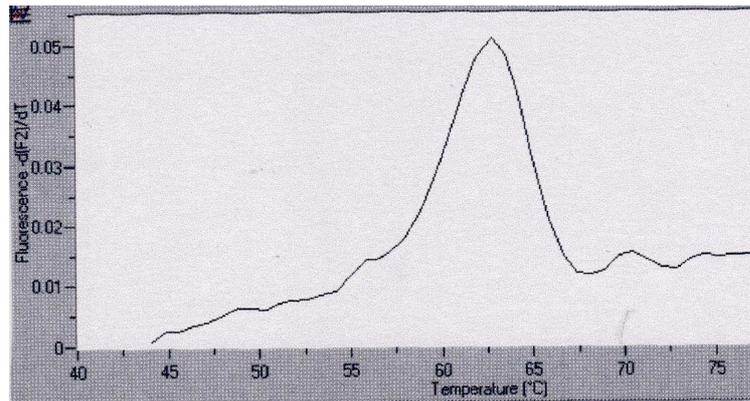


**Abbildung 2.5** Schmelzkurve von 1165GG (Gly389Gly) – Schmelzpunkt 52,5°C

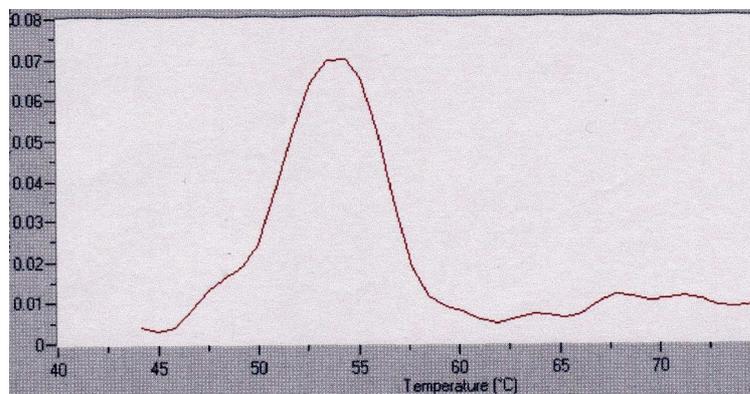


**Abbildung 2.6** Schmelzkurve von 1165CG (Arg389Gly) – Schmelzpunkte 63,6°C und 52,5°C

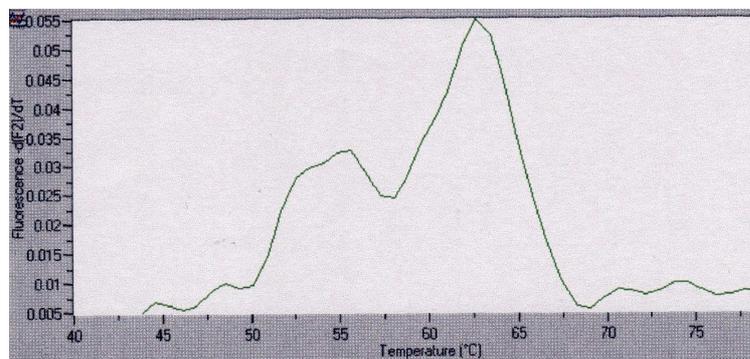
Der 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus hat je nach Genotyp ebenfalls charakteristische Schmelzkurven, die in den Abbildungen 2.7 bis 2.9 zu sehen sind. Ist der Genotyp homozygot für das 145AA (Ser49Ser), so hat die Schmelzkurve einen Peak bei 62°C. Liegt das homozygote 145GG (Gly49Gly) vor, so ist der Schmelzpunkt bei 52°C kennzeichnend. Das heterozygote 145AG (Ser49Gly) hat eine Schmelzkurve mit zwei Maxima bei 52°C und 62°C .



**Abbildung 2.7** Schmelzkurve von 145AA (Ser49Ser) – Schmelzpunkt 62°C



**Abbildung 2.8** Schmelzkurve von 145GG (Gly49Gly) – Schmelzpunkt 52°C



**Abbildung 2.9** Schmelzkurve von 145AG (Ser49Gly) – Schmelzpunkt 52°C und 62°C

Die charakteristischen Schmelzkurven des COMT-Polymorphismus sind in den Abbildungen 2.10 bis 2.12 dargestellt. Der Schmelzpunkt des homozygoten 472AA (Met158Met) ist bei einer Temperatur von 67°C aufgezeichnet worden. Das homozygote 472GG (Val158Val) hat einen Schmelzpunkt bei 61°C. Liegen die beiden Allele in Form eines heterozygoten Genotyps vor, so sind zwei Schmelzkurvenmaxima bei 61°C und 67°C charakteristisch.

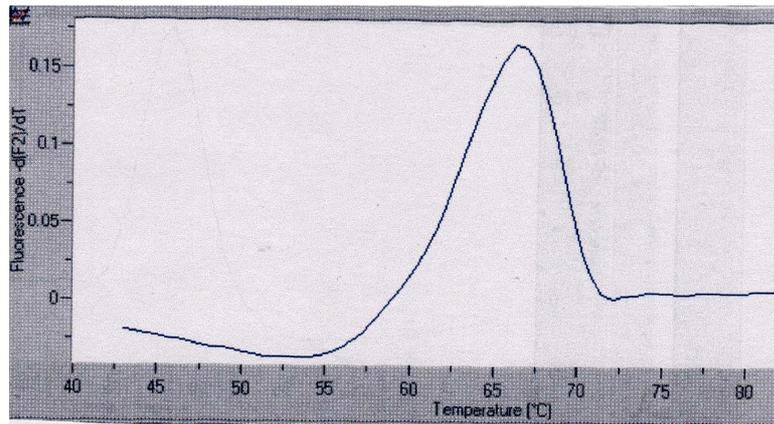


Abbildung 2.10 Schmelzkurve von 472AA (Met158Met) – Schmelzpunkt 67°C

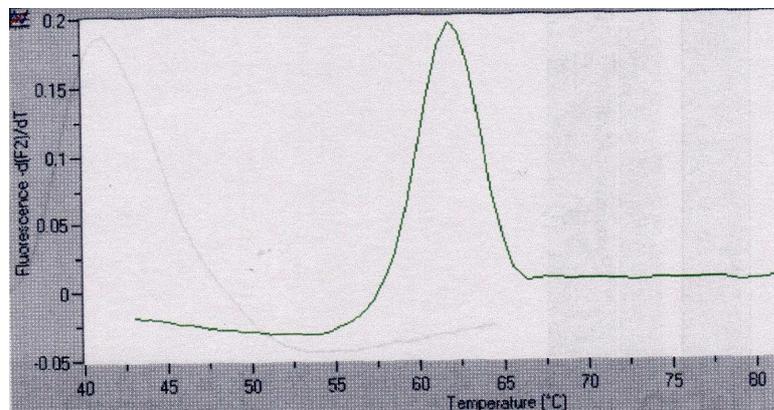


Abbildung 2.11 Schmelzkurve von 472GG (Val158Val) – Schmelzpunkt 61°C

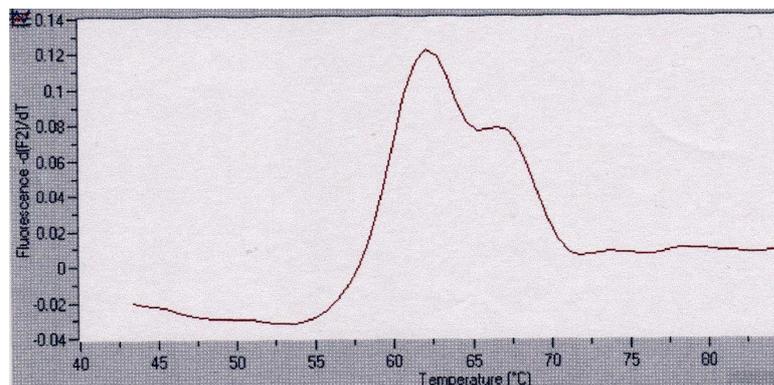


Abbildung 2.12 Schmelzkurve 472GA (Val158Met) – Schmelzpunkte 61°C und 67°C

### 2.2.2.4 Die SYBR Green I Methode

Die SYBR Green I Methode ist ein weiteres Verfahren einer real time PCR. Hier bindet der fluoreszierende Farbstoff unspezifisch an die doppelsträngige DNA und emittiert Lichtquanten. Die Signalintensität ist direkt proportional der doppelsträngigen DNA-Menge. Eine Schmelzkurvenanalyse erfolgt mit dem Erreichen des Schmelzpunktes der DNA. Sie liegt bei dieser Temperatur zu 50% einzelsträngig und 50% doppelsträngig vor. Es kommt zu einem plötzlichen Abfall des Fluoreszenzsignals, was zeitgleich registriert wird (Mülhardt 2006).

Diese Form der DNA-Analyse wurde zusätzlich bei dem COMT-Polymorphismus angewandt. Zunächst wurde ein Master-Mix folgender Weise hergestellt:

12,5 µl SYBR Green

1 µl Vorwärtsprimer

1 µl Rückwärtsprimer

0,5 µl Rox Reference Dye

9 µl DEPC Wasser

Die SYBR Green Materialien entsprachen dem Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG.

In diesem Master-Mix wurde anschließend 1 µl DNA hinzu pipettiert. Nach dem Verbringen der Gemische in den LightCycler®480II Roche wurde folgendes Programm gestartet:

| Programmname     | Zyklen | Analyse-methode | Temperatur in °C | Acquisitionsmodus | Zeit  | Transitionsrate in °C/s |
|------------------|--------|-----------------|------------------|-------------------|-------|-------------------------|
| Preinkubation I  | 1      | keine           | 50               | keiner            | 2 min | 4,4                     |
| Preinkubation II | 1      | keine           | 95               | keiner            | 2 min | 4,4                     |
| Amplifikation    | 50     | Quantifizierung | 95               | keiner            | 15 s  | 4,4                     |
|                  |        |                 | 60               | einfach           | 30 s  | 2,2                     |
| Schmelzkurve     | 1      | Schmelzkurve    | 95               | keiner            | 5 s   | 4,4                     |
|                  |        |                 | 65               | keiner            | 1 min | 2,2                     |
|                  |        |                 | 97               | kontinuierlich    |       | 0,11                    |
| Kühlung          | 1      | keine           | 40               | keiner            | 30 s  | 2,2                     |

**Tabelle 2.4** SYBR Green Programm zur Amplifikation des COMT-Polymorphismus: Preinkubationsschritte I und II, Amplifikation, Schmelzkurve und abschließende Kühlung

Die amplifizierte DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese gereinigt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG GmbH durchgeführt.

## **2.2.3 Sequenzierung und Verifizierung der Polymorphismen**

### **2.2.3.1 Die Gelelektrophorese**

Nachdem die entsprechenden DNA-Sequenzen mittels FRET beziehungsweise SYBR Green amplifiziert wurden, war der nächste Schritt der DNA-Verifizierung die Agarose-Gelelektrophorese.

#### **a) Funktionsweise der Agarosegelelektrophorese**

Die Agarose ist ein Polymer aus 1,3-verbundenen  $\beta$ -D-Galaktose und 1,4-verbundenen 3,6-Anhydro- $\alpha$ -L-Galaktose, zusätzlich sind Carboxyl-, Pyruvat- und Sulfatgruppen an den Zuckern gebunden. Im heißen, flüssigen Zustand liegen die Strukturen durcheinander vor. Erst während des Abkühlvorgangs richten sich die Agaroseketten in helikale Faserbündel aus. Die Faserbündel sind über nicht kovalente Hydrogenverbindungen assoziiert.

Die Fasern formen Poren und Kanäle. Die Größe der Poren bei 1%iger Agarose sind 100 nm. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes findet eine Ausrichtung der Faserbündel entsprechend ihrer Ladung statt. Die DNA-Moleküle wandern in diesem elektrischen Feld durch die Poren und Kanäle des Agarosegels. Diese Migration wird von deren molekularen Massen beeinflusst. Mit zunehmender Molekülmasse nimmt die Mobilität der DNA-Moleküle ab. Durch Interaktionen zwischen der negativ geladenen DNA und den Fasern findet schließlich eine Hemmung der Wandeurng durch das Gel statt. Die DNA-Moleküle werden demnach entsprechend ihrer Größe zwischen 100 bp und 20 kbp getrennt.

Außerdem wird die Mobilität durch die Stärke des elektrischen Feldes bestimmt. Je stärker das elektrische Feld ist, desto mobiler sind die DNA-Moleküle (Stellwagen 2009 und Stellwagen und Stellwagen 2009).

## **b) Aufbereitung des Agarosegels**

Die Gelkammer wurde in die Elektrophoresekammer eingeschoben und der Kamm für die zukünftigen Geltaschen eingehangen.

Es folgte die Herstellung des 1%-igen Agarosegels. Zunächst wurden 2 g der peqGOLD Universal Agarose abgewogen und in einem Kolben gegeben. In dem Kolben wurden anschließend 200 ml des selbstangefertigten TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer hinzugegeben. In der Mikrowelle wurde das Gemisch so lange erhitzt bis eine klare Flüssigkeit entstanden ist. Es folgte eine 10-minütige Abkühlungsphase auf dem Magnetrührer.

Bevor das Gel in die Gelkammer gegeben wurde, wurden 14 µl Ethidiumbromid hinzu pipettiert. Nach dem Einfüllen des Agarosegels in die Gelkammer wurden Luftblasen mit Hilfe einer Pipettenspitze aus diesem entfernt. Nach 30 Minuten Wartezeit war das Gel auspolymerisiert, so dass die Gelkammer entsprechend der Polarisierung in der Elektrophoresekammer gedreht werden konnte. Die Kammer wurde anschließend mit einfachen TBE Puffer aufgefüllt bis das Gel bedeckt war. Der Kamm wurde entfernt.

Bevor die DNA in die Geltaschen überführt werden konnten, musste diese mittels 6xLadepuffer markiert werden. Eine 26 µl Probe wurde mit 5 µl des 6xLadepuffers vermischt. Ebenso wurden 2 µl des entsprechenden 100 bp DNA Ladder Plus mit 1 µl des 6xLadepuffers vermischt.

Die Geltaschen wurden nun mit den DNA-Proben und der Vergleichsprobe des DNA-Leiers befüllt und eine Spannung von 80 Volt wurde an der Elektrophoresekammer angelegt. Nach 1 Stunde war der Lauf beendet und die DNA-Banden konnten mittels ultravioletten Lichts auf der UV-Platte sichtbar gemacht werden. Mit dem Gerix 1000 wurde ein repräsentatives Abbild dargestellt und auf ein Speichermedium gespeichert.

### c) Die Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung der DNA-Proben

Die Elektrophorese und Sequenzierung des 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus:

Dies erfolgte entsprechend dem Paper von Sauer et al. 2009.

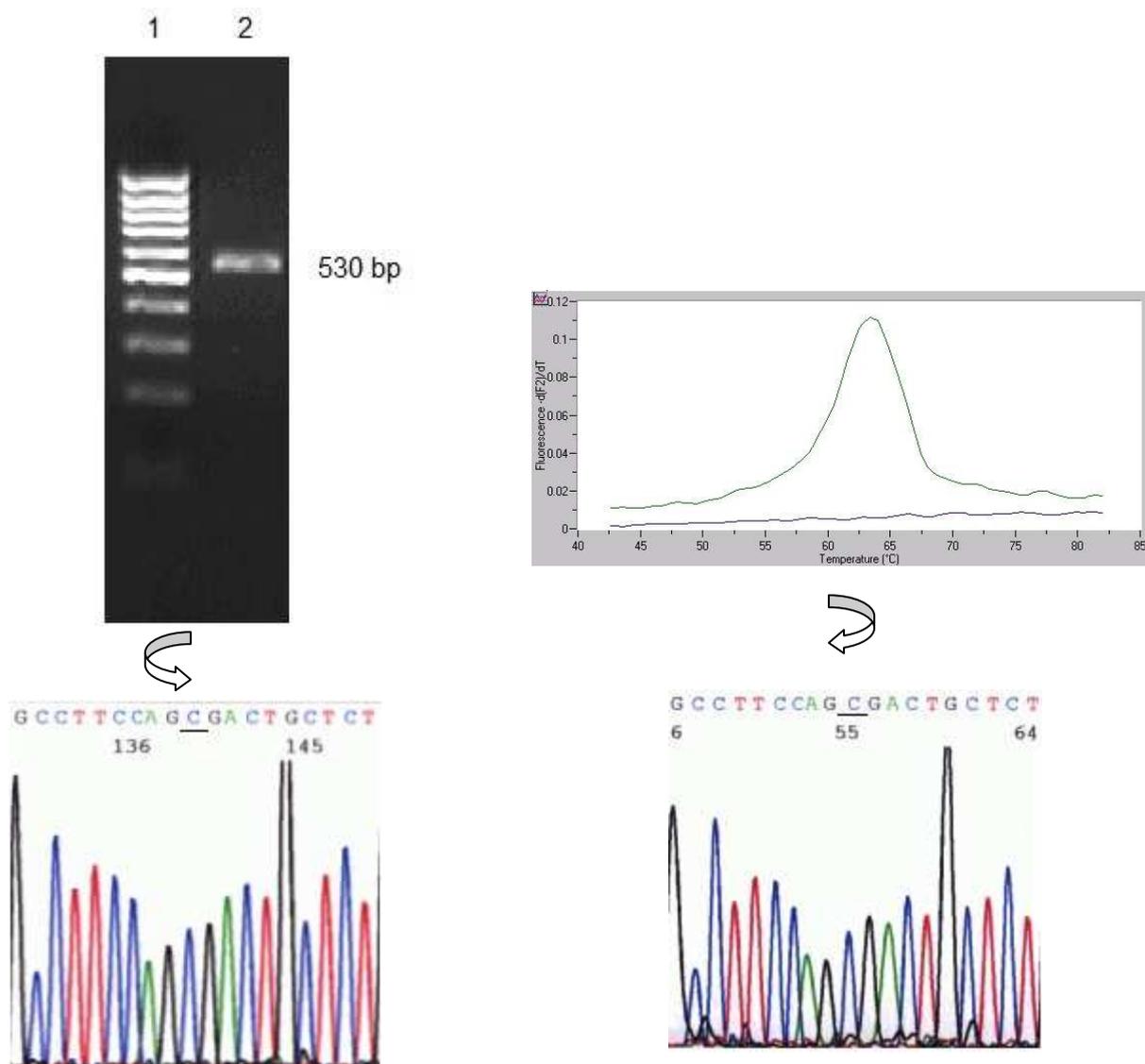
Hier wurde nach der DNA-Amplifikation das Verfahren des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) angewandt. Das Restriktionsenzym BsmFI spaltet die DNA am Codon 389, wenn die Glycin-Variante vorhanden war. Codierte das Codon 389 für die Arginin-Variante, wurde die DNA nicht durch das Enzym gespalten. Nach dem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente mit der Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.

Es war eine DNA-Fragmentbande der Größe von 530 bp sichtbar, wenn das homozygote 1165CC (Arg398Arg) vorlag. Wenn die Glycin-Variante vorhanden war, wurde die 530 bp lange DNA in zwei Fragmente der Größe 366 bp und 164 bp gespalten. Lag das 1165GG (Gly389Gly) homozygot vor, waren zwei DNA-Fragmente in der Länge von 366 bp und 164 bp vorhanden. Bei einem heterozygoten Genotyp waren demnach drei Banden in den Längen von 530 bp, 366 bp und 164 bp in der Gelelektrophorese sichtbar.

Parallel wurde die Schmelzkurvenanalyse mit diesen Proben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2.13, 2.14, 2.15 dargestellt. Lag das 1165CC (Arg389Arg) vor, so war eine Bande der Größe von 530 bp in Restriktionsverdau und eine Schmelzkurve bei 63,6°C nachweisbar. War das 1165GG (Gly389Gly) vorhanden, waren zwei Banden der Größen von 366 bp und von 164 bp nach dem RFLP und eine Schmelzkurve bei 52,5°C nachweisbar. Bei der heterozygoten 1165CG (Arg389Gly) Variante waren drei Banden der Größen von 530 bp, 366 bp und 164 bp und zwei Schmelzkurven bei 52,5°C und 63,6°C nachweisbar.

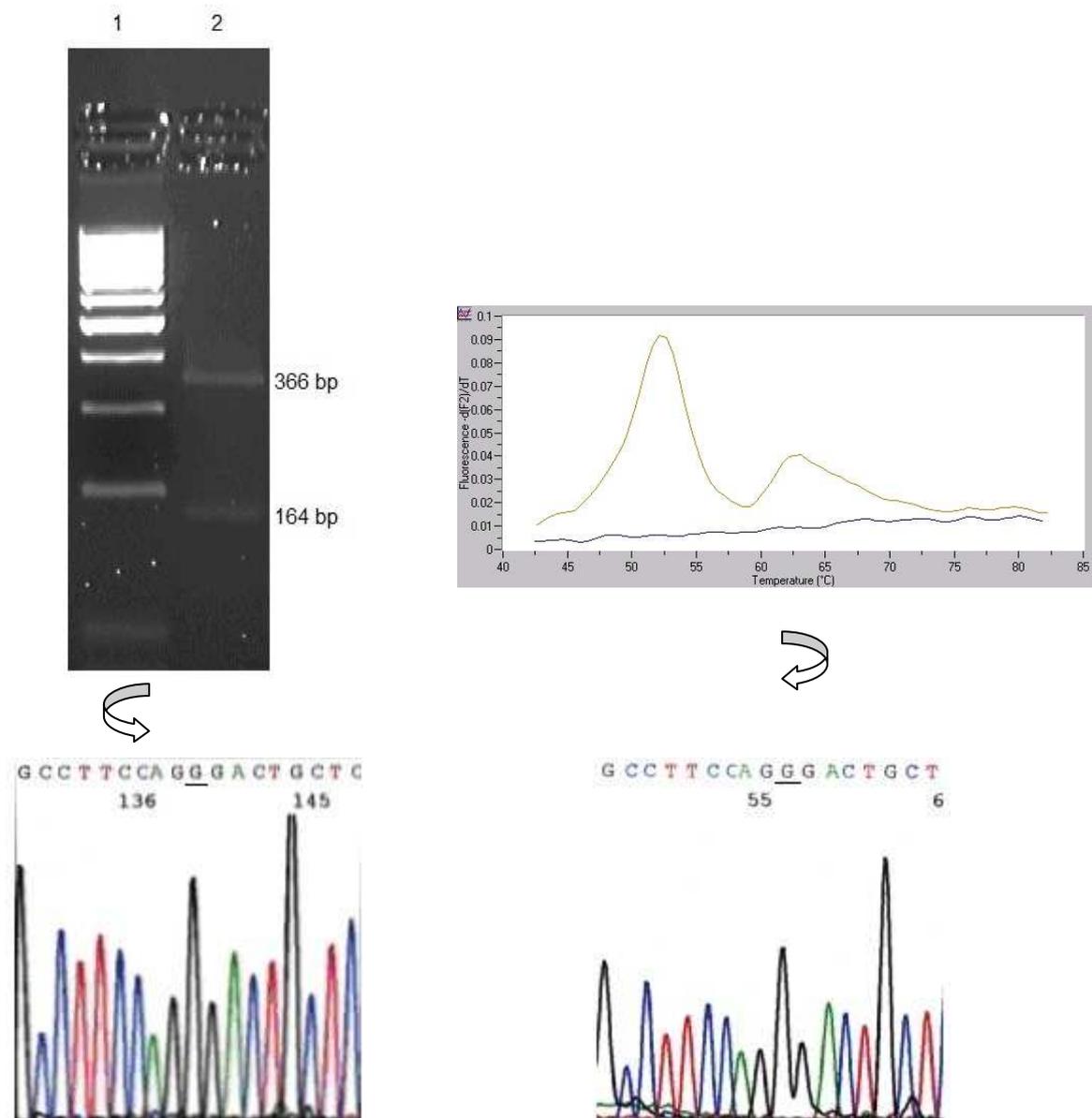
Diese analysierten DNA-Abschnitte wurden anschließend sequenziert.

## 1165CC (Arg389Arg)



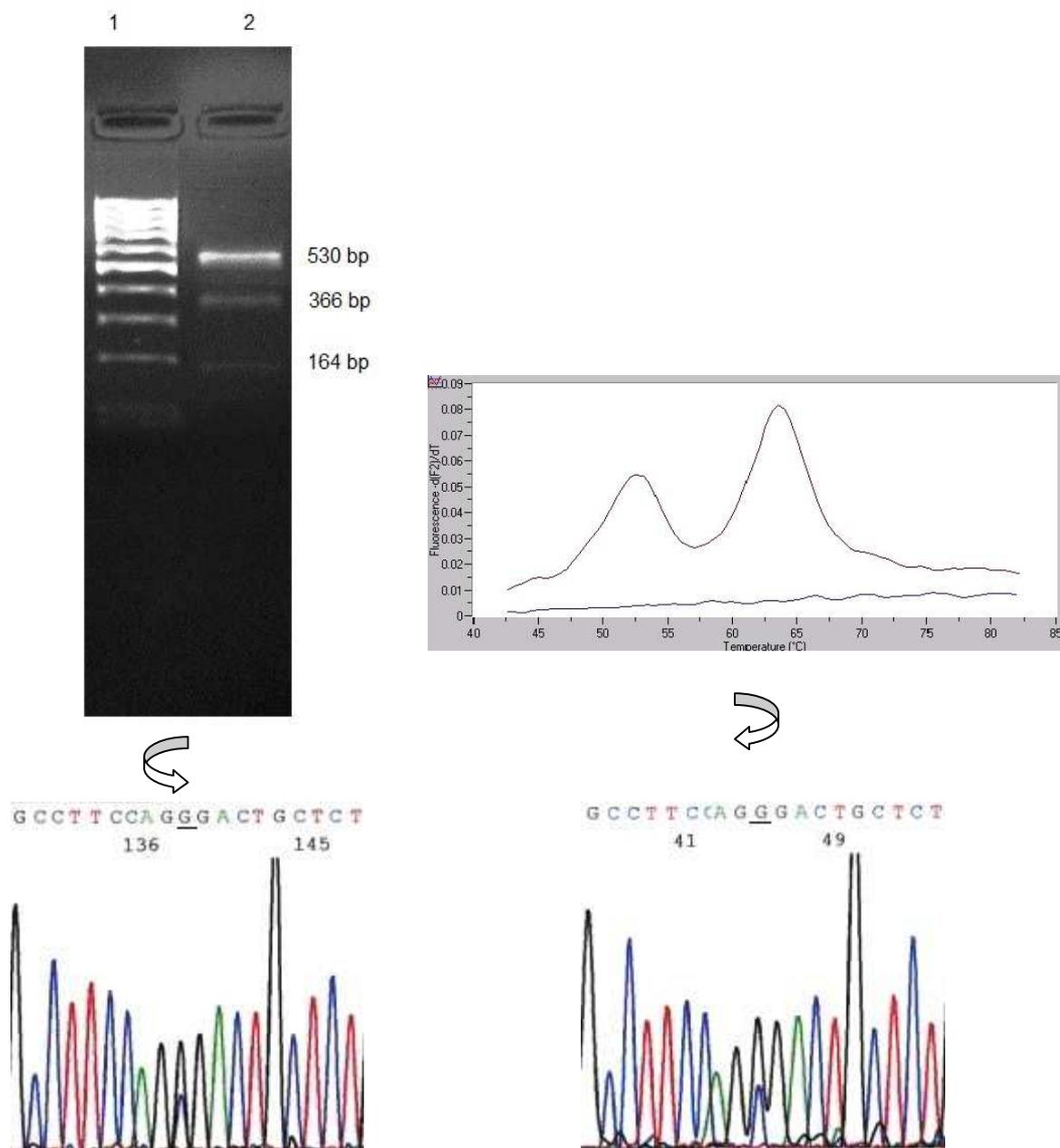
**Abbildung 2.13** In der Gelelektrophorese ist eine DNA-Bande nach dem Restriktionsenzymverdau dargestellt (2). Lag das 1165CC (Arg389Arg) homozygot vor, so wurde die DNA-Probe durch das Enzym BsmFI nicht gespalten und es besteht nur ein Fragment. Diese entsprach im Vergleich zu dem DNA-Marker (1) einer DNA-Fragmentgröße von 530 bp. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte eine Schmelzkurve bei 63,6°C. Die DNA-Proben der beiden Verfahren wurden anschließend sequenziert und es ergab sich das oben dargestellte Sequenzierungsmuster. An der Position 1165 ist das unterstrichene C = Cytosin, welches im Codon 389 für die Aminosäure Arginin kodiert, nachweisbar gewesen (Anlehnung an Sauer et al. 2009).

## 1165GG (Gly389Gly)



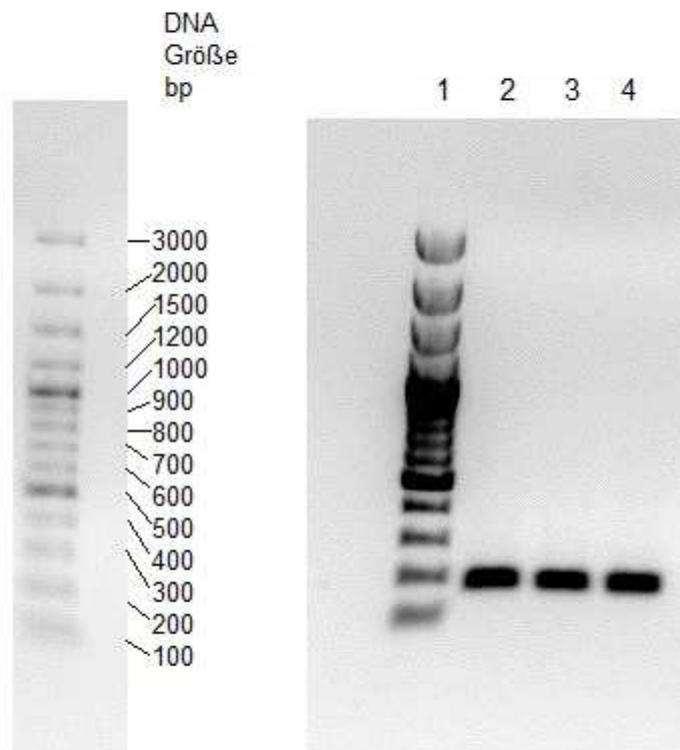
**Abbildung 2.14** In der Gelelektrophorese sind zwei DNA-Banden nach dem Restriktionsenzymverdau dargestellt (2). Lag das 1165GG (Gly389Gly) homozygot vor, so wurde die DNA-Probe durch das Enzym BsmFI in zwei Fragmente gespalten. Diese entsprachen mit dem DNA-Marker (1) vergleichend den DNA-Fragmentgrößen von 366 bp und 164 bp. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte eine Schmelzkurve bei 52,5°C. Die DNA-Proben der beiden Verfahren wurden sequenziert und es ergaben sich die oben dargestellten Sequenzierungsmuster. An der Position 1165 ist das unterstrichene G = Guanin, welches im Codon 389 für die Aminosäure Glycin kodiert, nachweisbar gewesen (Anlehnung an Sauer et al. 2009).

## 1165CG (Arg389Gly)



**Abbildung 2.15** In der Gelelektrophorese sind drei DNA-Banden nach dem Restriktionsenzymverdau dargestellt (2). Lag das 1165CG (Arg389Gly) heterozygot vor, so wurde ein Teil der DNA-Probe, welcher das Guanin an der 1165. Position enthielt, durch das Enzym BsmFI in zwei Fragmente gespalten. Der andere Teil der DNA-Probe, welcher das Cytosin an der 1165. Position enthielt, wurde nicht von dem Enzym gespalten. Diese drei DNA-Banden entsprachen mit dem DNA-Marker (1) vergleichend den DNA-Fragmentgrößen von 530 bp, 366 bp und 164 bp. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte zwei Schmelzkurven bei 52,5°C und 63,6°C. Die DNA-Proben der beiden Verfahren wurden wieder sequenziert und es ergaben sich die oben dargestellten Sequenzierungsmuster. Die Nukleotidsequenz enthielt die SNP-Varianten, Guanin und Cytosin, an der 1165. Position (Anlehnung an Sauer et al. 2009).

Die Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung des 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus:



#### Elektrophorese 1% Agarosegel COMT-Polymorphismus

- 1... 100 bp DNA Ladder Plus
- 2... 472GA (Val158Met)
- 3... 472AA (Met158Met)
- 4... 472GG (Val158Val)

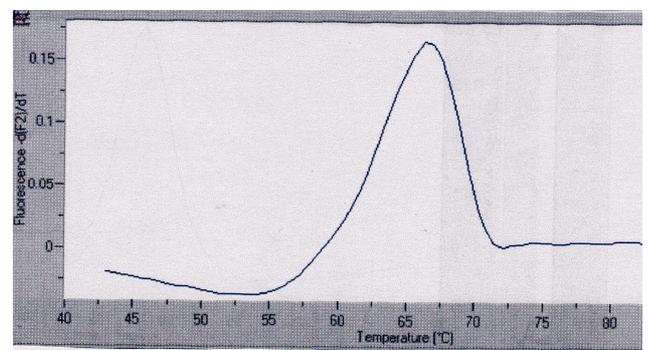
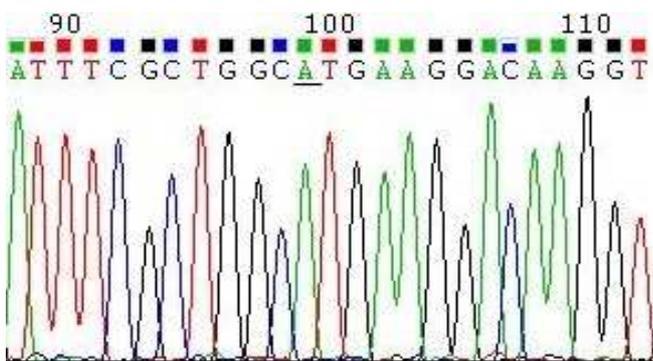
**Abbildung 2.16** In der Gelelektrophorese sind 3 Banden erkennbar. Diese entsprechen einer DNA-Größe im Vergleich mit dem 100 bp DNA Ladder Plus von etwa 200 bp. Das Ergebnis ist vereinbar mit der Größe des amplifizierten Genabschnitts des 472G>A(Val158Met) COMT-Polymorphismus von 178 bp.

Die drei amplifizierten DNA-Proben, welche den 472GA (Val158Met), 472AA (Met158Met) und 472GG (Val158Val) SNP (Vergleich Abbildung 2.16) enthielten, durchliefen anschließend die Agarosegelelektrophorese und es zeigten sich 3 Banden. Vergleichend mit dem 100bp DNA Ladder Plus entsprach das einer DNA-Größe von 200 bp. Das war vereinbar mit der Größe von 178 bp des amplifizierten Genabschnitts des 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus.

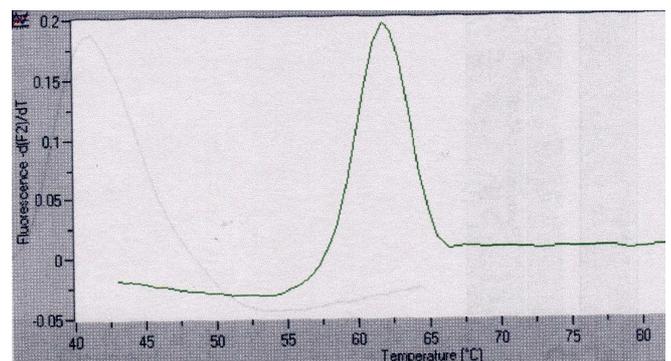
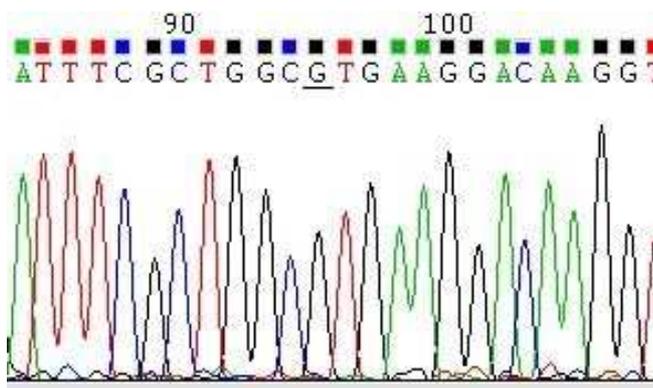
Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Proben zum Sequenzieren an die Firma Eurofins MWG GmbH versandt. Die von der Firma analysierten DNA-Sequenzen wurden anschließend mit Chromas Lite 2.1.1 dargestellt.

In den Sequenzierungsmustern des 472GA (Val158Met) und des 472AA (Met158Met) SNP konnte das mutierte Codon ATG verifiziert werden (Abbildungen

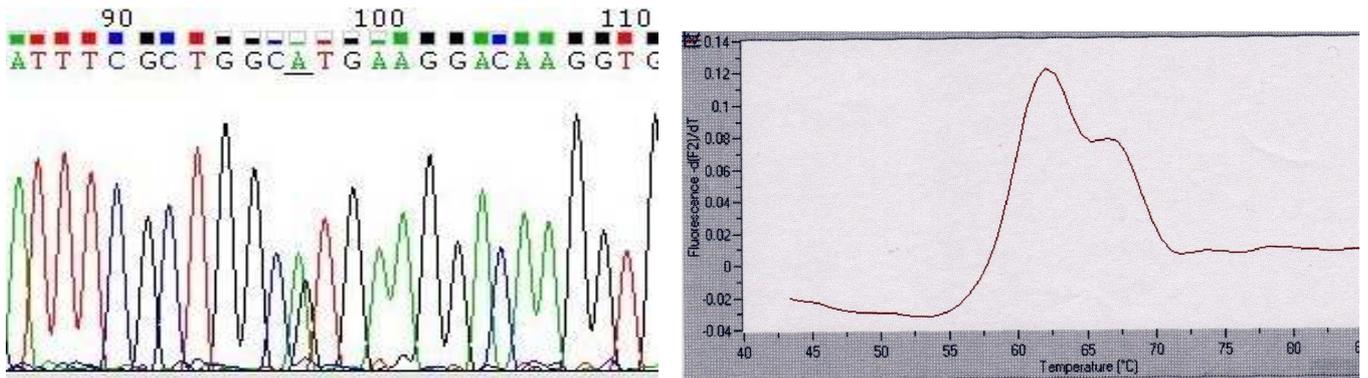
2.17 und 2.19). In der Abbildung 2.16 sind das die DNA-Banden 2 und 3. Das A steht für das Nukleotid Adenin. Es codiert im Codon ATG an der 472. Position für die Aminosäure Methionin. In der Sequenzierung des 472GG (Val158Val) SNP konnte das Codon GTG nachgewiesen werden. In der Abbildung 2.16 entspricht das der DNA-Bande 4. Das G steht für das Wildtyp-Nukleotid Guanin und codiert im Codon GTG die Aminosäure Valin. Dies zeigt die Abbildung 2.18.



**Abbildung 2.17** Das Sequenzierungsmuster des 472AA (Met158Met) SNP. In der Abbildung 2.16 ist das die DNA-Bande 3. Die Aminosäure Methionin wird von dem Codon ATG codiert. Das A steht für das Nukleotid Adenin und ist die mutierte Variante des analysierten SNP. In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich ein Schmelzpunkt bei 67°C.



**Abbildung 2.18** Das Sequenzierungsmuster des 472GG (Val158Val) SNP. In der Abbildung 2.16 entspricht das der Bande 4. Die Aminosäure Valin wird von dem Codon GTG codiert. Das G entspricht dem Nukleotid Guanin und ist die Wildtypvariante des analysierten SNP. In der Schmelzkurvenanalyse war der Schmelzpunkt bei 61°C nachweisbar.



**Abbildung 2.19** Im Sequenzierungsmuster des 472GA (Val158Met) SNP konnte ebenfalls das mutierte Codon ATG nachgewiesen werden, entsprechend in der Abbildung 2.16 der DNA-Bande 2. In der Schmelzkurvenanalyse konnten zwei Schmelzpunkte bei 61°C und 67°C nachgewiesen werden .

Die Elektrophorese und Sequenzierung des 145A>G (Ser49Gly-)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus:

Die Primer und Sonden wurden in Zusammenarbeit mit der Firma TIB Molbiol entwickelt. Die Amplifikationen der DNA-Proben für den 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus sowohl mit der FRET-Methode für den LightCycler 1.2 als auch mit der Sybr Green Methode für den LightCycler 480II und die Agarose-Gelelektrophorese verliefen jedoch frustan. Eine Sequenzierung durch die Firma Eurofins war bei zu geringer DNA-Konzentration nicht möglich.

## 2.2.4 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC ist eine Trennmethode der Chromatographie. 1985 beschreibt sie Eppert als „(...) ein für den Stoffaustausch selektives Zweiphasensystem, bewirkt durch Relativbewegung der Phasen. Eine Phase ist stets kompakt, die andere fluid“ (Eppert 1997). Folglich wird die kompakte Hilfsphase als stationäre Phase, welche einer Adsorption der entsprechenden Analyte dient, und die fluide Hilfsphase als mobile Phase bezeichnet (Meyer 1999).

Im 19. Jahrhundert wurde das älteste chromatographische Verfahren, die frontale Papierchromatographie, von F. F. Runge beschrieben. Mit der Jahrhundertwende bildeten die Tswettschen Arbeiten die Grundlage der Entwicklung der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie (Eppert 1997). 1941 gelangen es Martin und Syngge eine modernere Chromatographie zu entwickeln. Sie definierten elementare Bedingungen, damit eine erfolgreiche Trennung von Flüssigkeitsbestandteilen möglich war. Dazu zählte zum einen, dass in der stationären Phase sehr kleine

Teilchen vorhanden sein müssen. Zum anderen ist ein hoher Druck nötig um die mobile Phase durchpressen zu können. Aus dieser Definition ergab sich der Name HPLC, die high pressure liquid chromatography (Martin und Syngue 1941).

### 2.2.4.1 Das Grundprinzip der HPLC

Die HPLC ist eine leistungsfähige Trennmethode, mit der man eine Vielzahl ähnlicher Analyten aus einer Mischung auslösen kann. Jedoch sind die entsprechenden Verteilungskoeffizienten und demzufolge die verschiedenen Retentionsfaktoren entscheidend. Zum Beispiel werden zwei Komponenten getrennt, welche unterschiedlich mit den Hilfsphasen reagieren. Dies bedeutet, dass Verbindung A bevorzugt mit der stationären Phase und Verbindung B mit der mobilen Phase in Verbindung geht. Dementsprechend wird Analyt B mit dem Fließmittel rascher weiter transportiert. Im Gegensatz dazu wird Analyt A, der mit der stationären Phase in Wechselwirkung steht, erst durch längeres Auswaschen eluiert (Meyer 1999).

### 2.2.4.2 Der Aufbau der HPLC-Apparatur

Ein Chromatograph kann modular oder als Kompaktgerät aufgebaut sein. Der Aufbau, wie in Abbildung 2.20 dargestellt, ist folgender: 1. ein Vorrat an mobiler Phase, 2. eine Zuleitung mittels Fritte, 3. eine Hochdruckpumpe, 4. ein Probenaufgabesystem, 5. eine Säule, 6. ein Detektor, zum Beispiel ein elektrochemischer Detektor, 7. Abfall, 8. die Datenerfassung und -verarbeitung (Meyer 2004).

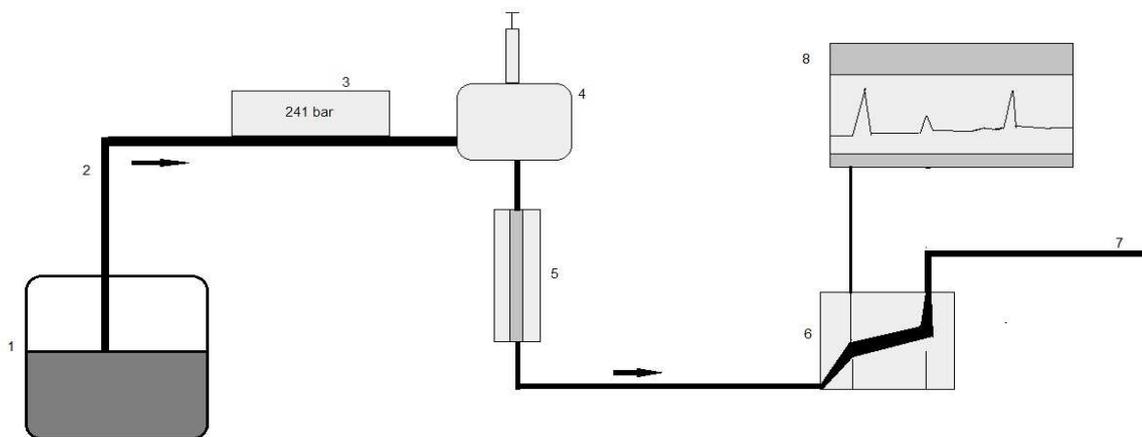


Abbildung 2.20 Aufbau der HPLC - Apparatur (in Anlehnung an Meyer 2004)

### **zu 1. Die mobile Phase**

Für das Gelingen einer Chromatographie ist die mobile Phase unerlässlich. Sie wird entsprechend ihrer Wechselwirkungen mit der stationären Phase ausgewählt. Des Weiteren ist eine niedrige Viskosität (kleiner als Wasser) für eine schnelle Chromatographie von Bedeutung (Meyer 2004). Sie muss bei einer bestimmten Wellenlänge transparent sein, wenn ein UV- oder Fluoreszenzdetektor verwendet wird (Seaver und Sadek 1994). Außerdem muss sie inert gegenüber Probesubstanzen sein, so dass keine Reaktionen mit dem Probegemisch erfolgen können. Sie darf nicht toxisch sein und ein entsprechender Brechungsindex ist von Bedeutung (Meyer 2004).

### **zu 3. Die Hochdruckpumpe**

Die Zweikolbenpumpe von Smartline befördert die Probe mit einem kontinuierlichen Fluss von 1 ml/min und einem Druck von 152 bar zu der Trennsäule.

### **zu 5. Die Trennsäule**

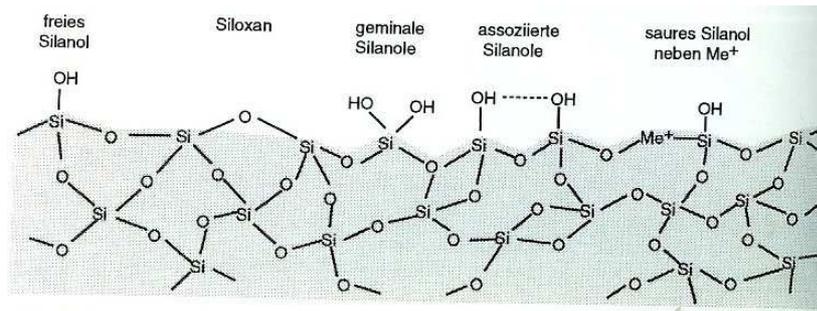
Die Trennsäule ist in den Smartline Column Oven 4050 eingebaut. Der Säulenofen dient der Erwärmung der mobilen Phase am Säuleneingang und ermöglicht eine gleichmäßige Temperaturverteilung über die gesamte Säule. Somit wird eine bessere Trennleistung ermöglicht (Knauer Advanced Scientific Instruments). Die Temperatur lag bei den Catecholaminbestimmungen bei 21°C.

Die meisten Trennsäulen sind aus Stahl 316 (Chrom-Nickel-Molybdän), da dieser druckbeständig und inert gegen chemische Korrosion ist. Es ist wichtig, dass die Innenseite glatt ist, was bei Glasrohren der Fall ist. Sie sind glatt, chemisch inert, stahlummantelt, also druckfest und korrodieren nicht. In dieser Säule befindet sich die stationäre Phase.

### **Die stationäre Phase**

Sie kann von verschiedenen Materialien gebildet werden, zum Beispiel von den porösen Partikeln. Diese werden am häufigsten verwendet. Ihre innere Struktur ist völlig porös ähnlich einem Schwamm. Er ist starr und druckbeständig. Die mobile Phase und die darin enthaltenen Analyten fließen nicht innerhalb der Poren, sondern diffundieren.

Ein anderes Element ist die monolithische Phase. Diese stationäre Phase wird aus einem Stück porösen Materials synthetisiert. Das Silicagel oder auch ein organisches Polymer füllen das Innenvolumen der Säule aus. Das Silicagel besteht aus Siliziumatomen, welche dreidimensional über Sauerstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 2.21). An der Oberfläche eines solchen Netzwerkes befinden sich unter anderem Silanogruppen (OH-Gruppen).



**Abbildung 2.21** Chemischer Aufbau des Kieselgels (Meyer 2004, mit Genehmigung des Verlags)

In dem Gerüst sind Metallionen eingebaut oder bereits vorhanden. Sie bestimmen den Gehalt der sauren Silanole. Moderne Gele haben einen niedrigen Metallgehalt, somit ist eine Trennung basischer Stoffe möglich.

Außerdem sind Silicagele chemisch modifizierbar, so dass die stationäre Phase zum Ionenaustausch, zu einer Enantiomertrennung oder für eine Affinitätschromatographie verwendet werden kann.

Andere stationäre Phasen sind: Perfusionspartikel, Aluminiumoxid, Magnesiumsilikat, poröses Glas, Hydroxyapatit und Agarose (Unger KK 1979, Nawrocki 1997, Meyer 2004).

## zu 6. Der Detektor

Detektoren dienen der Erkennung von Substanzen, die aus der Säule eluiert werden. Demzufolge wird eine Änderung der Zusammensetzung in der mobilen Phase registriert, in ein elektrisches Signal umgewandelt und dieses an einen Schreiber oder Bildschirm gesendet. Der Schreiber zeichnet dies als Abweichung von der Basislinie auf.

Zum einen gibt es konzentrationsabhängige Detektoren, bei denen das Signal proportional der Probenkonzentration ist. Zum anderen gibt es stoffstromabhängige

Detektoren, die Signale wider geben, die proportional dem Stoffstrom, der Anzahl der Probemoleküle/ -ionen pro Zeiteinheit, sind.

Es wurde eine Vielzahl an Detektoren entwickelt.

Der UV-Detektor registriert die UV-Lichtabsorption.

Die Brechungsindex-Detektoren sind unselektiv. Sie registrieren alle Substanzen, die einen anderen Brechungsindex als die reine mobile Phase haben.

Der Fluoreszenz-Detektor erkennt sehr empfindlich und spezifisch fluoreszierende Stoffe.

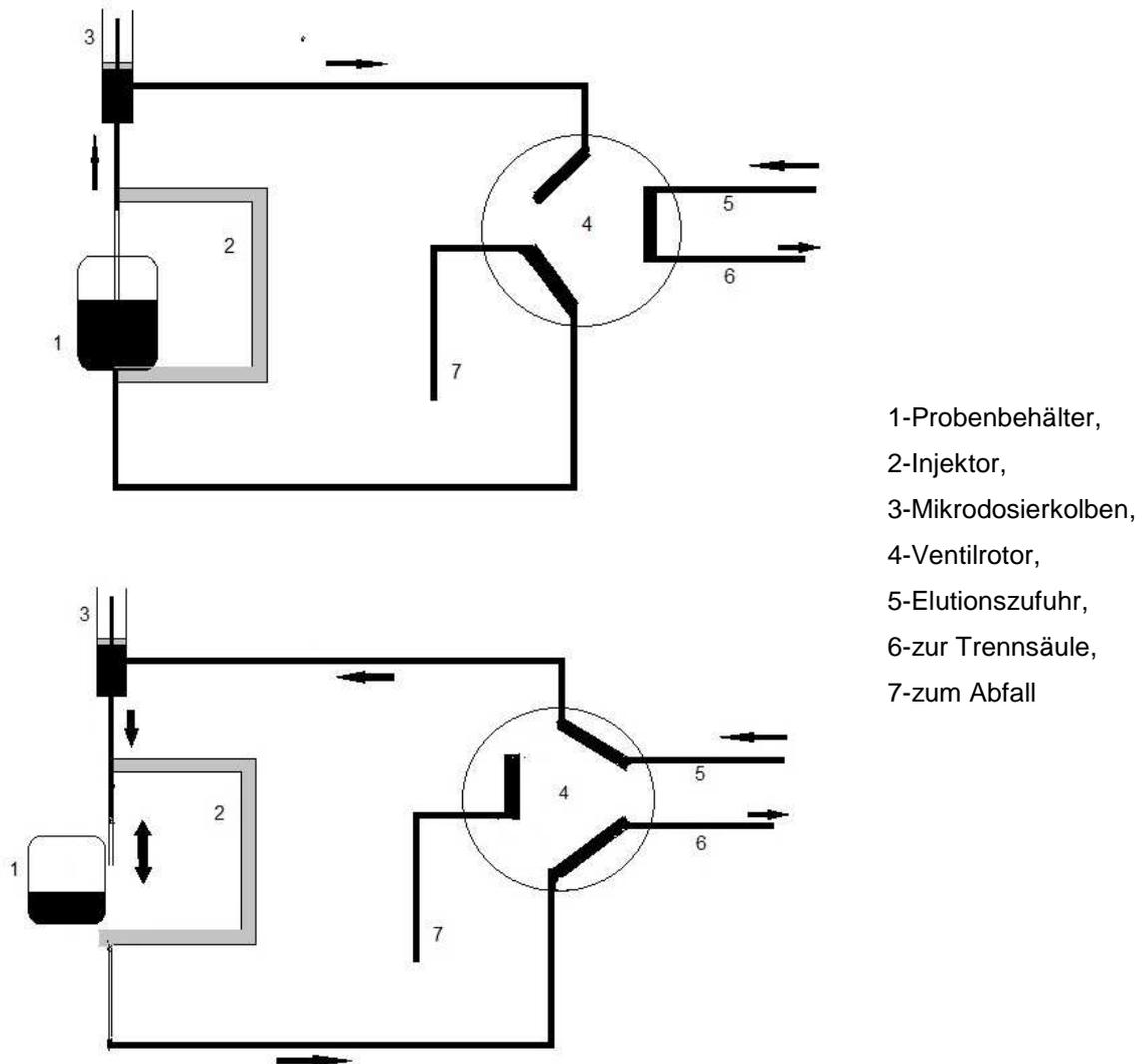
Elektrochemische Detektoren eignen sich zum Nachweis von Spuren leicht oxidierbarer oder reduzierbarer organischer Verbindungen (Meyer 2004). Der EC 3000 Amperometric Detector ist ideal zur Bestimmung von aromatischen Alkoholen und Aminen, von Vitaminen, Purinen, Kohlenhydraten und Aminosäuren (Knauer ClinLab® Amperometric Detector).

## **zu 8. Datenerfassung und -verarbeitung**

Die Daten werden mit dem Programm Clarity Chrom erfasst und in Form eines Chromatogramms wiedergegeben. Dieses vermittelt qualitative und quantitative Informationen. Dazu zählt zum Beispiel die Elutionszeit, die Zeit, nach welcher das Signal auf dem Bildschirm erscheint. Sie ist für jeden Stoff des HPLC-Gemisches charakteristisch. Zudem sind die Fläche und die Höhe eines Signals der Konzentration des entsprechenden Stoffes proportional (Meyer 2004).

### **Der Autosampler**

Der Autosampler 3950 von Smartline ist zusätzlich zwischengeschaltet. Er dient der genauen und sicheren Probendosierung ohne Verunreinigungen. Die Arbeitsweise ist in der Abbildung 2.22 zusammen gefasst. Zu Beginn befindet sich das Probengefäß in der Injektoreinheit und der Verschluss wird von der Injektionskanüle durchstoßen. Ein Mikrokolben saugt eine definierte Probenmenge in eine Kapillare, anschließend wird das Probengefäß wieder entfernt. Das Ventilrohr dreht sich und die Probe wird zusammen mit der mobilen Phase verlustfrei zur Trennsäule transportiert (Eppert 1997).



**Abbildung 2.22** Die Arbeitsweise des Autosamplers die obere Darstellung ist die Probendosierung, die untere Darstellung ist die Probeninjektion (in Anlehnung an Eppert 1997)

Der Autosampler wird heruntergekühlt auf 4°C, da sich der Noradrenalingehalt nach sechs Stunden um 25% bei Raumtemperatur reduziert (Weicker et al. 1984).

### verschiedene Vorsäulen

Es gibt die Möglichkeit eine Vorsäule zwischen der Hochdruckpumpe und dem Probenaufgeber einzuschalten. Diese auch als Opfersäule bezeichnete Vorsäule dient als Puffer für die Trennsäule. Da die mobile Phase Silicagel (Kieselgel) zum Teil in Kieselsäure auflöst, würden solche stationäre Phasen in kürzester Zeit zerstört sein. Eine Opfersäule enthält ebenfalls Silicagel, dieses wird als erstes von dem

Lösungsmittel angegriffen. Die mobile Phase ist nun mit Kieselsäure gesättigt, folglich bleibt die eigentliche stationäre Phase verschont.

Des Weiteren kann auch eine Schutzsäule vor der Trennsäule zwischen geschaltet sein. Diese enthält die identische Zusammensetzung der eigentlichen stationären Phase. Dadurch werden Verunreinigungen und retardierende Substanzen zurückgehalten (Meyer 1999). Es wurden jedoch keine Vorsäulen oder Schutzsäulen in die HPLC-Apparatur für die Probenbestimmungen eingebaut.

### **2.2.4.3 chromatographische Trennverfahren**

Es gibt verschiedene flüssigkeitschromatographische Trennverfahren.

#### Die Ionenaustausch-Chromatographie:

Die stationäre Phase ist für den Ionenaustausch mit einer elektrisch geladenen Oberfläche ausgestattet. Die stationäre Phase ist mit funktionellen Gruppen, wie Sulfat-, Karboxyl- oder Ammoniumgruppen, assoziiert. Passiert die mobile Phase die Säule, konkurrieren die Ionen der mobilen Phase und die ionischen Probemoleküle um einen Platz auf der Oberfläche der stationären Phase. Es gibt Kationenaustauscher, die Bindungen mit den Kationen eingehen, und Anionenaustauscher, die Bindungen mit den Anionen eingehen. Die Auftrennung der einzelnen Inhaltsstoffe erfolgt somit durch das Konkurrieren der Ionen der mobilen Phase mit denen der Probe.

Ein solcher Kationenaustauscher findet Verwendung bei der Bestimmung von Katecholaminen, Carbamaten, Purinen oder Nucleosiden.

Anionenaustauscher werden zur Bestimmung von Nukleotiden, Zucker, Analgetika oder Sulfonamiden verwendet.

#### Die Adsorptions-Chromatographie

Sie dient der Trennung von Aminen, Prostaglandinen, Steroiden, Barbituraten und Vitaminen.

#### Die Umkehrphasenchromatographie

Sie wird eingesetzt für die Bestimmung von Catecholaminen, Fettsäuren, Tensiden und Alkoholen (Meyer 2004).

#### Die Affinitätschromatographie

Sie besitzt die größte Spezifität und arbeitet nach dem Prinzip der Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper, Enzym und Inhibitor, Hormon und Trägerstoff. Beide beteiligten Stoffe sind räumlich und elektrostatisch zueinander kongruent. Die

eine Komponente (Ligand) ist an dem Träger gekoppelt, die andere (Probe) als Lösung wird reversibel adsorbiert. Die übrigen Probeninhaltsprodukte in der Lösung können nicht mit dem Liganden interagieren und werden somit auch nicht adsorbiert. Es ergibt sich hiermit die Möglichkeit eine Probe von allen anderen Begleitstoffen zu bereinigen (Walters 1985, Cooke 1987, Jones 1991).

Weitere Methoden zur Stofftrennung und Analyse sind die Ionen-, Ionenpaar- und Gelchromatographie.

#### **2.2.4.4 Die Elution**

Nach der Bindung der verschiedenen Probenbestandteile an der stationären Phase erfolgt die Elution mit einer spezifischen Lösung. Die adsorbierten Inhaltsstoffe haben unterschiedlich hohe Affinitäten zu der Lösung und werden somit nacheinander eluiert. Es genügt aber auch den pH-Wert oder den Konzentrationsgradienten zu verändern um die spezifischen Wechselwirkungen aufzuheben (Meyer 2004).

#### **2.2.4.5 Die Probengewinnung**

Mit der HPLC-Methode war es möglich den Catecholamingehalt im Blutplasma zu bestimmen. Voraussetzung für die Konzentrationsanalyse war, dass sich die Studienpatienten in Ruhelage befanden. Bei einem Teil der Probanden wurde das Blut unmittelbar vor der Operation von dem Anästhesiepfleger entnommen. Unter diesen Bedingungen wurden externe Einflüsse, wie der Nadelstich für die Blutentnahme oder die unbekannte Umgebung des Operationsraums und interne Einflüsse, wie die Aufregung und Angst vor der Operation, ausgeschaltet. Die herzchirurgischen Patienten wurden mittels des Anästhetikums Propofol in Narkose versetzt. Nach 20 Minuten wurde das Blut über die EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-Monovetten gewonnen.

Dem anderen Teil der Patienten wurde das Blut am Einweisungstag entnommen. Nach dem Aufklärungsgespräch haben sie sich für 20 Minuten in ihre Betten gelegt, um eine ausreichende physische und psychische Entspannung zu erreichen. Äußere Störfaktoren wurden für diesen Zeitraum ausgeschaltet. Anschließend wurde das Blut über die EDTA-Monovetten entnommen.

Die gewonnenen Proben wurden im Anschluss für 10 Minuten bei 2100 U/min zentrifugiert, damit sich die korpuskulären Blutbestandteile von dem Plasma trennten.

Das überstehende Plasma wurde daraufhin in Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei -20°C aufbewahrt (Weicker et al. 1984).

#### **2.2.4.6 Die Probenaufbereitung**

Die Patientenproben mussten für den HPLC-Lauf vorbereitet werden.

Als erstes wurden 1ml Plasma, 500 µl Extraktionspuffer (möglicherweise Tris-Hydroxy-Ethylaminomethan (Weicker et al. 1984)) und 50µl interner Standard (3,4-Dihydroxybenzylamin) in die Probenaufbereitungskartusche pipettiert. Diese enthielt bereits Aluminiumoxid, welches die Catecholamine aus dem Plasma binden sollte (Bauersfeld et al. 1986). Es war wichtig, dass dieses Salz eine optimale Qualität hatte, damit eine gute Bindung der Catecholamine möglich war (Weicker et al. 1984).

Es schloss sich ein 10-minütiges „über den Kopf schütteln“ an. Für die Extraktion wurden die Proben zwei Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit je 1 ml Waschpuffer, dieser konnte zum Beispiel Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 8,7 sein (Weicker et al. 1984). Bevor die am Aluminiumoxid gebundenen Katecholamine eluiert werden konnten, wurden sie bei 3500 U/min für zwei Minuten trocken zentrifugiert. Die Trennung erfolgte mittels der Gabe von 120 µl Elutionspuffer, welcher ein Gemisch aus Bor- und Essigsäure sein konnte (Bauersfeld et al. 1986), einem Aufschütteln der Proben, fünfminütigen Ruhen und einer abschließenden Zentrifugation bei 2500 U/min.

120 µl des gewonnenen Eluats wurden in die HPLC-Glasbehälter gegeben und verblommt. Eine Aufbewahrung war im Kühlschrank für eine Woche möglich (Chromsystems 1999).

#### **2.2.4.7 Die HPLC zur Bestimmung des Catecholamingehalts der Proben**

Die RP18-Säule war in dem Smartline Column Oven 4050 eingebaut. Sie enthielt die stationäre Phase, welche möglicher Weise Octadecylsilan sein konnte (Bouloux und Perrett 1985). Das Octadecylsilan ist für die Umkehrphasenchromatographie ein geeignetes Medium. Dieses Chromatographieverfahren ist eine wichtige Methode um Noradrenalin, Adrenalin, internen Standard, Dopamin und andere unbekannte Substanzen von einander zu trennen. Die Bestandteile der mobilen Phase wurden in bestimmten zeitlichen Abständen mit dem elektrochemischen Detektor registriert. Die

Signale wurden zu dem Integrator geleitet und als Gauß'sche Kurve wiedergegeben (Meyer 1999).

### **a) Die Umkehrphasenchromatographie**

Umkehrphasenchromatographie bedeutet, dass die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase ist. Am häufigsten werden chemisch gebundenes Octadecylsilan (ODS), ein n-Alkan mit 18 Kohlenstoffatomen oder kürzere Alkylketten (< 8 Kohlenstoffe) als stationäre Phase verwendet.

Die Retention ist stärker, wenn

- die Alkylketten länger,
- die Bindungsdichte der Alkylketten dichter,
- die stationäre Phase dicker und
- der Kohlenstoffgehalt höher sind.

Als mobile Phase werden Wassergemische verwendet. Der Grund hierfür ist unter anderem, dass reines Wasser als mobile Phase nicht geeignet ist, weil die stationäre Phase hydrophob ist und damit die Elution sehr langsam erfolgen würde. Ferner werden Substanzen besonders gut an die stationäre Phase gebunden, wenn sie gering wasserlöslich sind. Je höher der Wassergehalt des Elutionsmittels ist, desto länger sind die Retentionen.

Die mobile Phase besteht folglich aus verschiedenen Komponenten. Eine ist zum Beispiel Methanol. Es besitzt eine hohe Polarität und führt jedoch zu einem niedrigen Elutionsergebnis. Tetrahydrofuran kann ein weiterer Bestandteil der mobilen Phase sein. Es hat eine niedrige Polarität und die Elution ist demnach sehr hoch. Außerdem ist anzumerken, dass stark apolare Verbindungen nur mit wasserfreien Eluenten ausgelöst werden können. Als Wasser darf nur spezielles HPLC-Wasser verwendet werden.

Sind Methanol (B-Lösungsmittel) und Wasser (A-Lösungsmittel) die Komponenten der mobilen Phase, so erhöht sich ihre Viskosität und ein höherer Druck wird benötigt um einen kontinuierlichen Transport durch die Trennsäule zu ermöglichen. Es besteht die Möglichkeit ein weiteres organisches Lösungsmittel als dritte Komponente einzuführen um die Selektivität zu erhöhen (Meyer 1999).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die mobile Phase aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt ist, wie zum Beispiel aus:

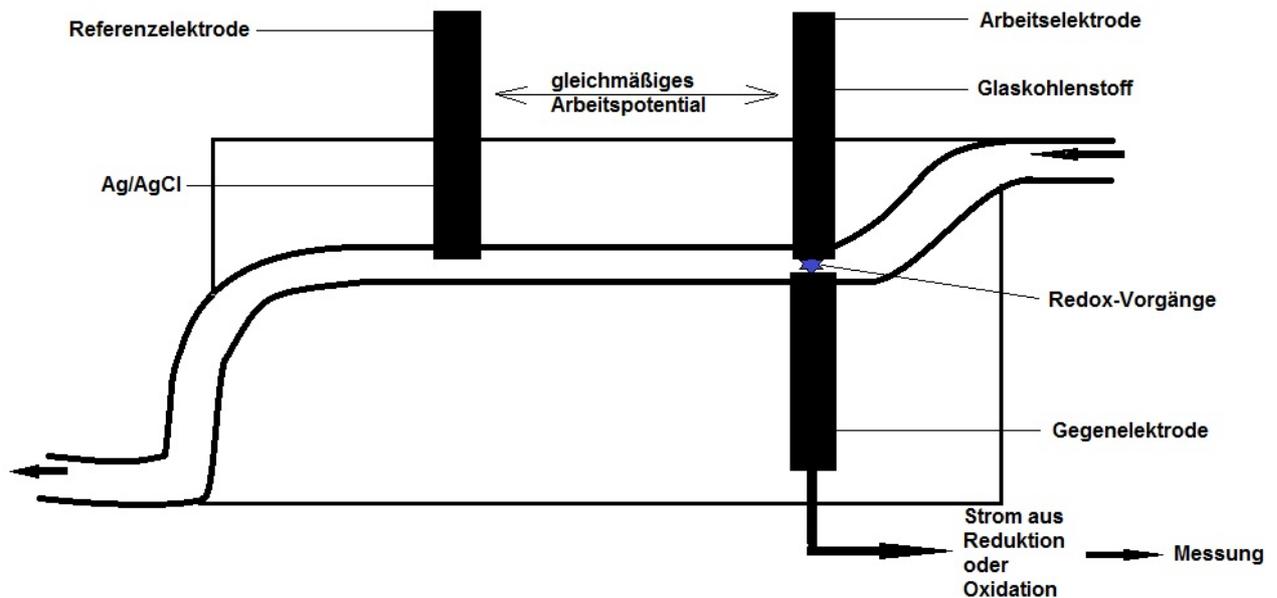
Kaliumhydrogenphosphat, Zitronensäure, Puffer (pH 6) aus Octansulfonat, EDTA und 10% Methanol (Bouloux und Perrett 1985) oder Natriumacetat, Zitronensäure, Natrium1-Octansulfonat, di-n-Butylamin, Natrium-EDTA gelöst in destilliertem Wasser/Methanol (Weicker et al. 1984) oder Essigsäure, Butylamin, Natriumoctylsulfonat, Dinatrium- EDTA, Natriumsulfat (Bauersfeld et al. 1986).

### **b) Die elektrochemische Detektion**

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer Änderung der chemischen Struktur der zu detektierenden Substanz durch Oxidations- beziehungsweise Reduktionsprozesse (ClinLab 2001). 1976 entwickelten Keller et al. die ersten Grundlagen für die elektrochemische Detektion. Watson nutzte schließlich 1981 die Amperometrie für die Detektion des Noradrenalin und Adrenalin.

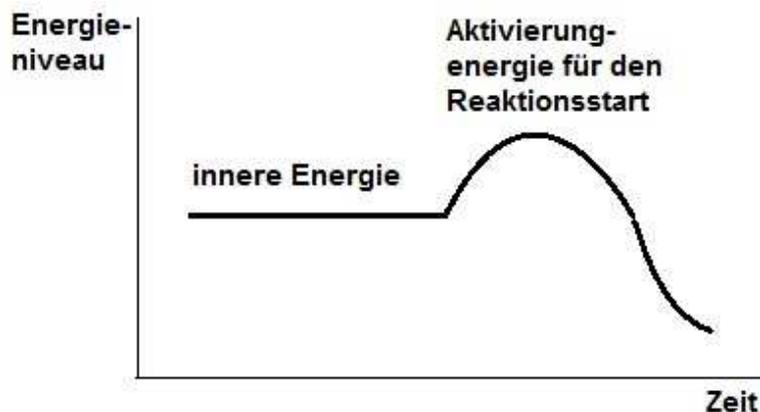
Die Dektorzelle ist aus drei Elektroden, der Gegenelektrode, der Referenzelektrode und der Arbeitselektrode aufgebaut. Letztere kann aus Glaskohlenstoff (Bouloux und Perrett 1985), Kohlepaste oder amalgamiertem Gold (Meyer 1999) bestehen. Zwischen der Referenzelektrode, welche aus Silber/ Silberchlorid (Van der Hoorn et al. 1989) ist, und der Arbeitselektrode liegt eine Polarisationsspannung an (Bouloux und Perrett 1985). Diese ermöglicht eine Oxidation beziehungsweise Reduktion der zu untersuchenden Analyte.

Die Gegenelektrode dient dem Aufrechterhalten des Potentials. Sie verhindert einen Stromfluss, welcher durch die zu untersuchenden Elektrolyte ausgelöst wird, an der Referenzelektrode. Die elektrochemisch aktive Verbindung gelangt, nachdem sie in der Trennsäule eluiert wurde, in die Detektorzelle und wird an der Arbeitselektrode oxidiert beziehungsweise reduziert (Chromsystems 1999). Die Abbildung 2.23 bildet eine Detektorzelle zur elektrochemischen Detektion ab.



**Abbildung 2.23** Darstellung der Detektorzelle. Zwischen der Referenzelektrode, welche aus Ag/AgCl besteht, und der Arbeitselektrode liegt ein gleichmäßiges Arbeitspotential an, dieses ist wichtig für die Bildung von Oxidations- und Reduktionsreaktionen an der Arbeitselektrode. Gelangt eine elektrochemische Substanz zwischen der Arbeitselektrode und Gegenelektrode, so nimmt diese Substanz entweder ein Elektron von der Arbeitselektrode auf oder gibt eines ab. Es wird demnach reduziert bzw oxidiert. Das nun negativ oder positiv geladene Substrat gelangt aufgrund seiner neuen Ladung an die Gegenelektrode und gibt dort 1 Elektron ab oder nimmt eines auf, es entsteht ein Stromfluss. Dieser wird verstärkt und als chromatographisches Signal wider gegeben.

Damit diese chemische Reaktion ablaufen kann, ist jedoch ein gewisses Maß an Aktivierungsenergie nötig. Das wird durch das aufgebaute Potential der Elektroden ermöglicht. Der Verlauf des Energieniveaus ist in der Abbildung 2.24 erklärt.



**Abbildung 2.24** Verlauf der Energieniveaus eines zu detektierenden Moleküls

Alle Moleküle haben eine eigene innere Energie, somit benötigen manche mehr Aktivierungsenergie um das Plateau für den Reaktionsstart zu erreichen als andere.

Diese Reaktion läuft in drei Schritten ab (siehe Abbildung 2.25):

1. Die Diffusion – In der Messzelle diffundieren die Moleküle in der Lösung zu der Elektrodenoberfläche.
2. Die Elektrolyse – An der Elektrodenoberfläche laufen die Redoxreaktionen ab.
3. Die Rediffusion – Die oxidierten/reduzierten Moleküle gehen zurück in die Lösung.

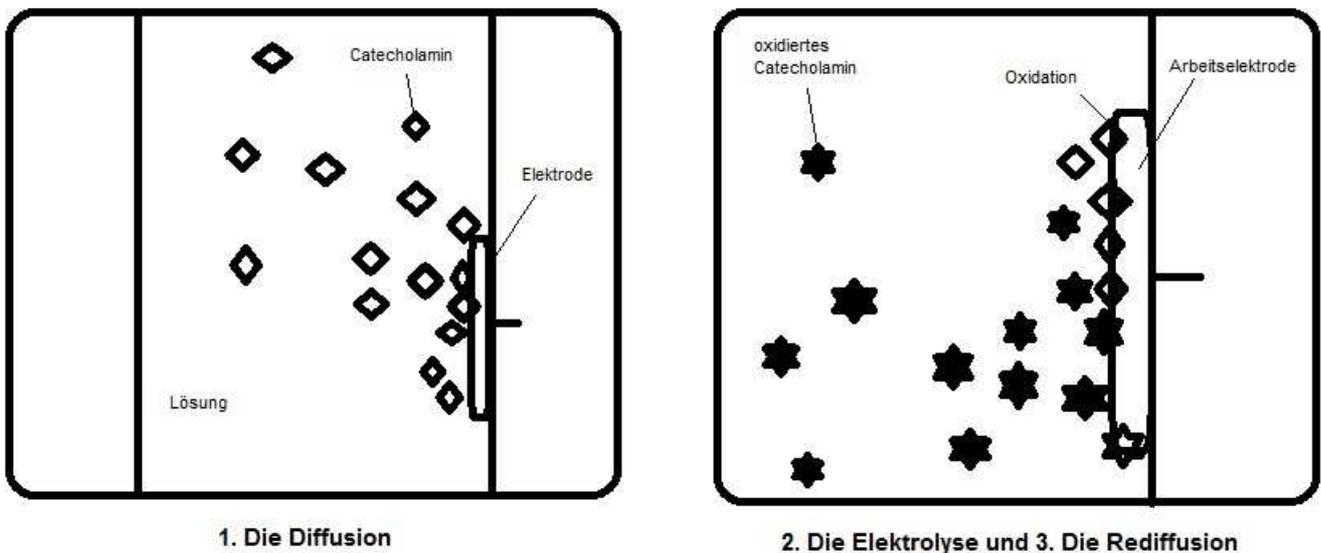


Abbildung 2.25 Die drei Schritte der elektrochemischen Reaktion

Die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte sind sowohl die Diffusion als auch die Rediffusion.

An der Arbeitselektrode findet die Oxidation statt, wenn ein positives Potential anliegt und das Molekül somit ein oder mehrere Elektronen abgibt. Bei der Reduktion liegt ein negatives Potential an und das Molekül nimmt ein oder mehrere Elektronen von der Arbeitselektrode auf.

Der dadurch entstehende Stromfluss ist proportional der Analytenkonzentration. Die nachstehende Gleichung drückt den geschilderten Zusammenhang aus:

$$I = n \cdot F \cdot C \cdot D \cdot c$$

I – Strom durch Redoxreaktion

n – Anzahl der Elektronen, die an der Redoxreaktion teilnehmen

F – Faraday Konstante

C – Widerstandskapazität

D – Diffusionskoeffizient der Analyte

c – die Konzentration der Analyte, die im Moment in der Zelle sind

(ClinLab 2001)

Die Oxidationsreaktionen der Amperometrie finden zum Beispiel an aromatischen Hydroxyverbindungen (Abbildung 2.26), aromatischen Aminen, Indolen, Phenothiazinen und Mercaptanen statt. Die Reduktion ist eine sehr seltene Reaktion, sie erfolgt zum Beispiel an Nitrosaminen (Meyer 1999).

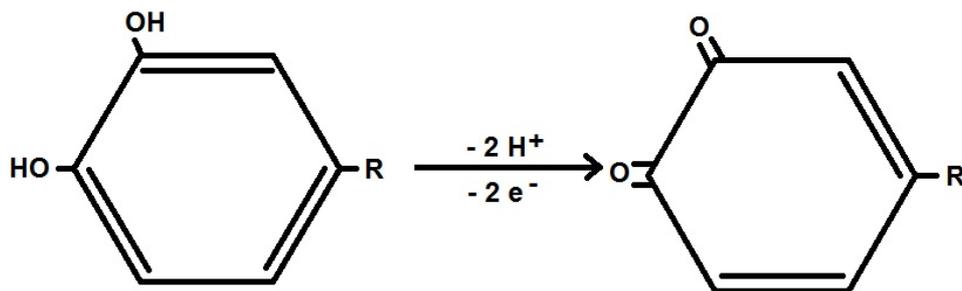


Abbildung 2.26 Die Oxidation einer Katecholverbindung

Der Strom korreliert mit dem Potential, welches an der Arbeitselektrode anliegt. Er ist positiv gerichtet, wenn eine Oxidation an der Arbeitselektrode stattfindet und negativ, wenn eine Reduktion erfolgt (ClinLab 2001). Der Stromfluss wird über das Messgerät (Geräteeinstellung: Potential 0,55V und Messbereich  $\pm 10$  nA) registriert. Das elektrische Signal wird verstärkt und in ein Chromatographisches umgewandelt.

Die dem Messprinzip zugrunde liegende Redoxreaktion ist nur an bestimmten funktionellen Gruppen und chemischen Strukturen bei einem entsprechenden Arbeitspotential möglich.

Das Arbeitspotential wird so gewählt, dass das Detektorsignal maximal ist und die Begleitverbindungen der Probe nicht detektiert werden. Die Einstellung des richtigen Arbeitspotentials ist in Abbildung 2.27 unterstützend dargestellt.

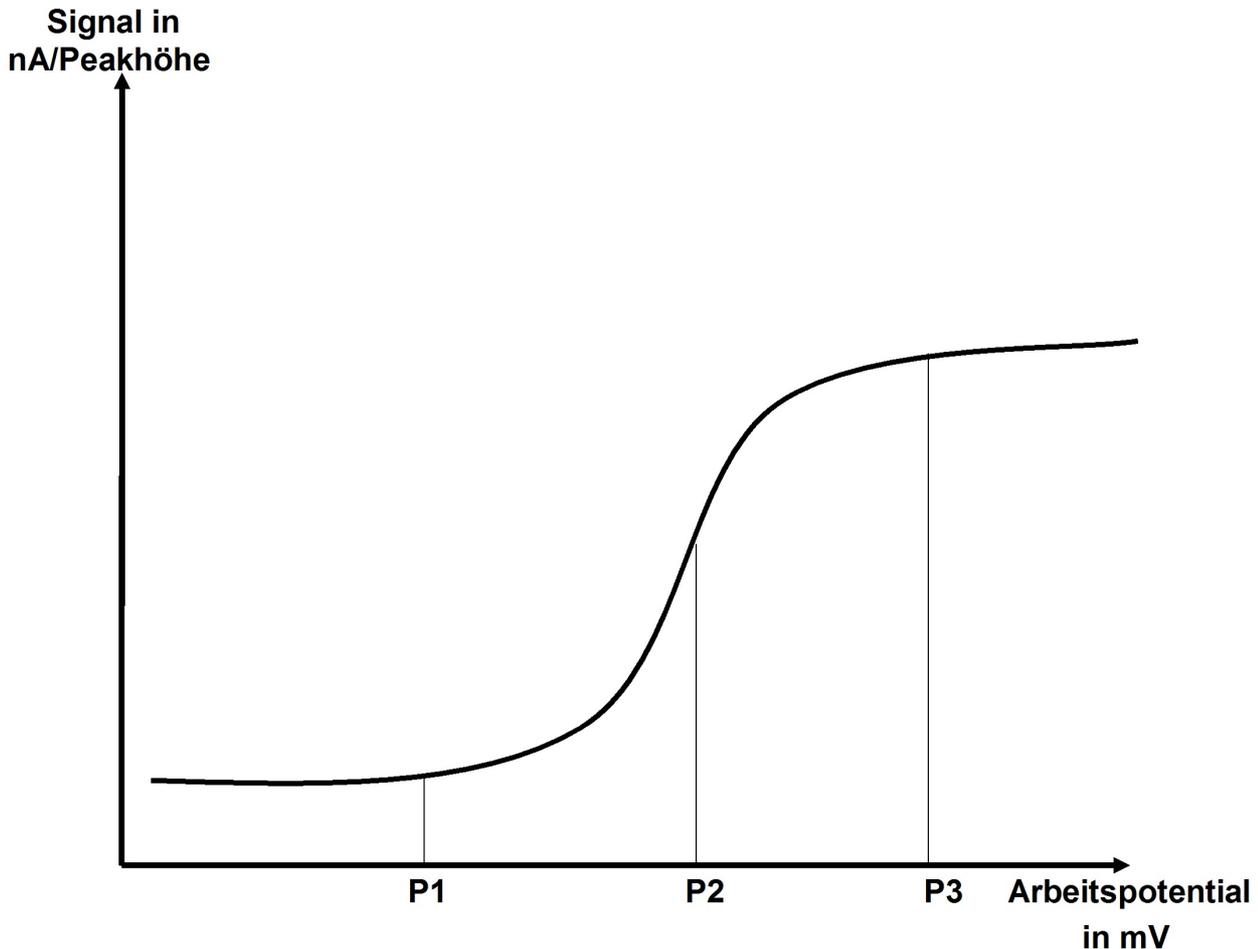


Abbildung 2.27 Einstellung des optimalen Arbeitspotentials

Wird das Arbeitspotential niedriger als P1 eingestellt, reicht die Energie nicht aus um eine Verbindung zu oxidieren. Baut die Arbeitselektrode ein Potential entsprechend P2 auf, so steht mehr Energie zu Verfügung und eine höhere elektrochemische Umsatzrate wird erreicht. Das zu messende Signal verstärkt sich ebenfalls. Steigt die Energie bis auf P3, ist die Umsetzung am stärksten. Potentiale über P3 bewirken keine weitere Signalzunahme, da ein Maximum der elektrochemischen Reaktionsleistung erreicht ist. Das Messsignal wird nur noch von der Konzentration der zu bestimmenden Verbindung beeinflusst. Aus diesem Grund bezeichnet man dieses Phänomen als diffusionskontrollierten Plateaubereich.

Ein Potential, welches größer als P3 eingestellt ist, hat zur Folge, dass die Selektivität vermindert wird. Es werden folglich vermehrt andere Verbindungen umgesetzt (Chromsystems 1999).

Das Arbeitspotential am Electrochemical Detector EC 3000 wurde auf 0,627 V eingestellt. Es floss ein Grundstrom von 0,27 nA.

Eine grundlegende Voraussetzung für die elektrochemische Detektion ist die Wahl der mobilen Phase. Sie muss leitend sein. Apolare Lösungsmittel, wie sie in der

Adsorbtionschromatographie Anwendung finden, sind für eine elektrochemische Detektion ungeeignet. Des Weiteren dürfen keine Chloride oder Hydroxycarbonsäuren enthalten sein (Meyer 1999).

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Selektivität der Amperometrie (Bauersfeld et al. 1986, Chromsystems 1999) ist die deren Ausbeute auf 10% beschränkt.

Der größte Teil verlässt die Messzelle unverändert. Eine 100%ige Umsetzung findet bei der coulometrischen Detektion Anwendung (Meyer 1999).

Die Spezifität und Qualität der HPLC wurde bereits von Nette et al. beschrieben (Nette et al. 2005).

#### 2.2.4.8 Die Auswertung

Einem Chromatogramm können qualitative und quantitative Informationen entnommen werden.

##### a) Die quantitative Auswertung

Ein Chromatogramm stellt verschiedene Gaußkurven (siehe Abbildung 2.28) dar. Deren Flächen und Höhen sind proportional der jeweiligen Stoffmenge.

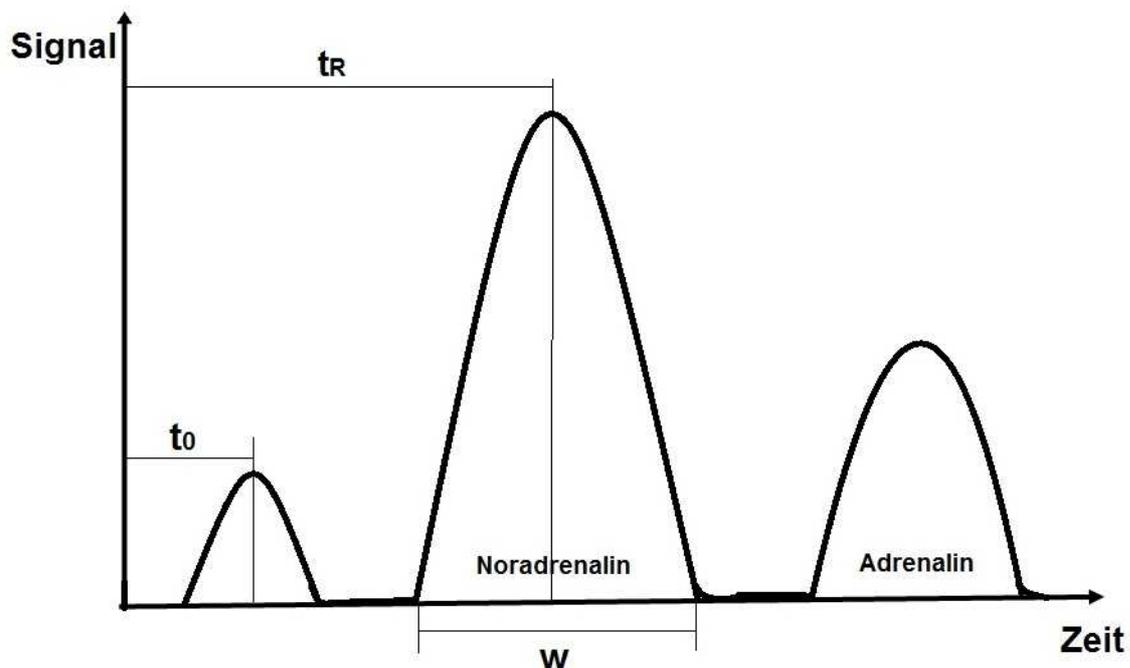


Abbildung 2.28 schematische Darstellung eines Chromatogramms zweier Substanzen

w – Basisbreite des Peaks

$t_0$  – Totzeit: die Zeit, welche die mobile Phase benötigt um durch die Trennsäule zu wandern

Ihre Geschwindigkeit berechnet sich aus:  $u = L / t_0$

L – Länge der Trennsäule

Geht eine Verbindung keine Wechselwirkung mit der stationären Phase ein, so wird sie zu der Zeit  $t_0$  detektiert.

$t_R$ ...Retentionszeit: die Zeit, welche vom Einspritzen bis zum Peakmaximum vergeht

Substanzen unterscheiden sich in verschiedenen Eigenschaften, zum Beispiel im Absorptionsmaximum bei der UV-Detektion oder im Extinktionskoeffizienten. Dies hat starken Einfluss auf das Detektorsignal. Demzufolge war es unabdingbar ein Kalibrationschromatogramm zu erstellen. Die Kalibration erfolgte mittels eines externen Standards und eines internen Standards (Meyer 1999).

### Der externe Standard

Es wird beispielsweise eine Einpunktkalibration durchgeführt (siehe Abbildung 2.29).

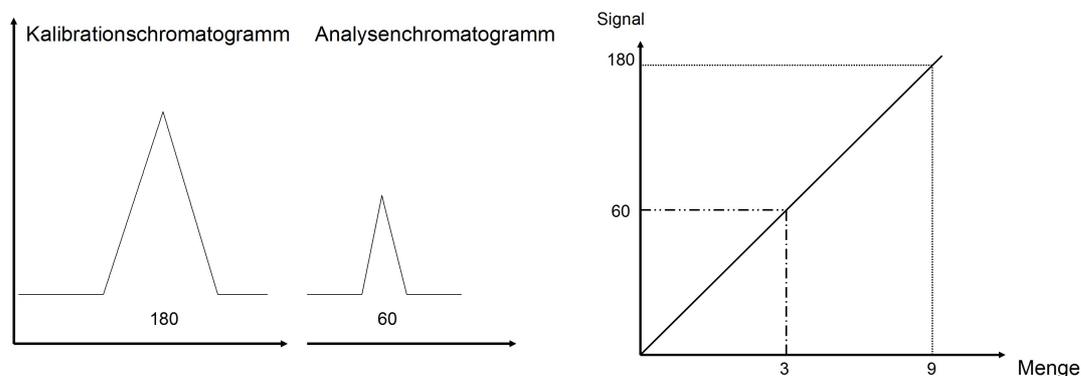


Abbildung 2.29 Einpunktkalibration (in Anlehnung an Meyer 1999)

Die Kalibriergerade muss durch den Nullpunkt verlaufen und linear sein. Die Signalgröße der Analysensubstanz ist auf der Geraden wieder zu finden.

Es war wichtig, dass der externe Standard mit jeder Auswertungsreihe neu bestimmt wurde. Würde ein altes Kalibrierchromatogramm verwendet werden, konnte die Auswertung fehlerhaft sein. Ursächlich hierfür wären möglicherweise andere HPLC-Bedingungen (Asshauer und Ullner 1986, Katz 1987, Lindsay 1992).

Die Zusammensetzung des Kalibrationsstandards der Katecholaminbestimmung sah wie folgt aus:

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| Noradrenalin             | 5000 pg/ml |
| Adrenalin                | 2500 pg/ml |
| Dopamin                  | 2500 pg/ml |
| Interner Standard (DHBA) | 5000 pg/ml |

Der externe Standard wurde am Anfang injiziert um sicher zu stellen, dass das System äquilibriert war und am Ende der Untersuchungsreihe. Letzteres stellte sicher, dass sich die Chromatographiebedingungen nicht verändert hatten (Chromsystems 1999).

### **Der interne Standard**

Der interne Standard (3,4-Dihydroxybenzylamin) (Bauersfeld et al. 1986, Van der Hoorn et al. 1989) ist eine Substanz, welche weder im Probengemisch noch im Kalibrationsstandard vorhanden ist (Meyer 1999).

Dies ermöglicht Verluste bei der Probenvorbereitung auszugleichen und diese mit den anderen Peaks zu verrechnen. 50µl des internen Standards hatte eine Konzentration von 12 pg/µl. Diese wurden während der Aufbereitung in die Probe gegeben. Folglich befanden sich 600mg 3,4-Dihydroxybenzylamin in einem Milliliter der Probe (Chromsystems 1999).

### **b) Die qualitative Auswertung**

Sie beschreibt die Zuordnung eines bestimmten Peaks zu einer bestimmten Substanz, welche sich in dem zu analysierenden Gemisch befindet. Grundlegende Voraussetzung ist, dass die Retentionszeiten einer Verbindung immer identisch sind. Dem gehen identische Chromatographiebedingungen, zum Beispiel die Zusammensetzung der mobilen Phase, die Fließgeschwindigkeit oder die Temperatur, voraus.

Eine Möglichkeit liegt in dem Vergleich des k-Wertes einer Bezugssubstanz mit dem Wert der Probenverbindung. Der k-Wert entspricht dem Retentionsfaktor.

$$k = \frac{\text{Anzahl der Mole des Stoffes Y in der stationären Phase im Gleichgewicht}}{\text{Anzahl der Mole des Stoffes Y in der mobilen Phase im Gleichgewicht}}$$

Eine andere ist das Vergleichen der Retentionszeiten.

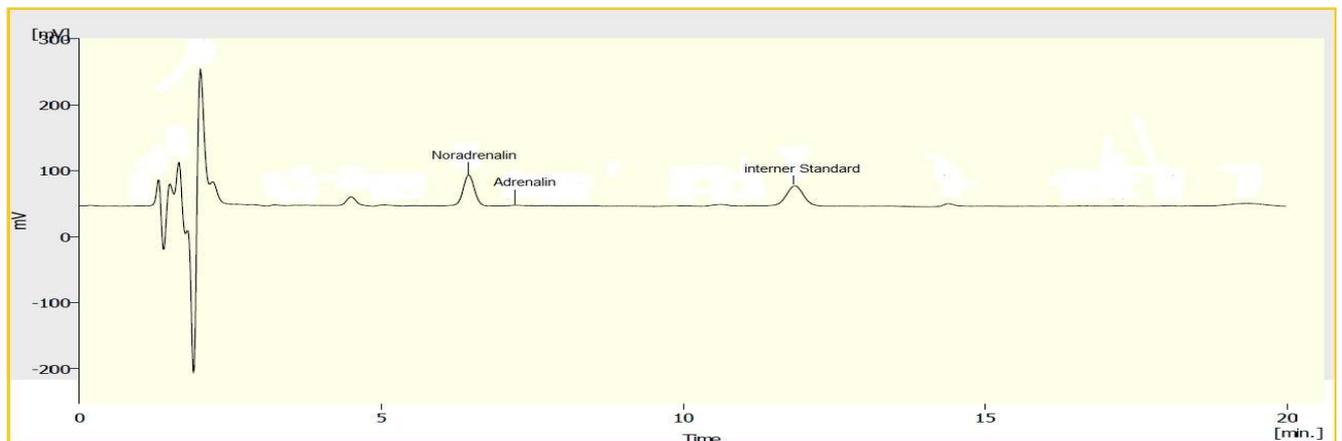
$$k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$t'_R$  ... Netto-Retentionszeit.  $t'_R = t_R - t_0$

Es bestehen Abhängigkeiten der Retentionszeit mit der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und mit der Länge der Trennsäule. Demzufolge ist die Totzeit länger, wenn die Säule lang ist oder wenn die mobile Phase langsam strömt. Somit ist die Retentionszeit nicht geeignet um eine Substanz zu beschreiben. Der Retentionsfaktor sollte hierfür verwendet werden. Der Retentionsfaktor ist sowohl von der Länge der Säule als auch von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase unabhängig.

#### 2.2.4.9 Die Berechnung der Catecholaminkonzentrationen

Mittels quantitativer Analyse wurde die Fläche der Peaks für die Catecholamine und für den internen Standard bestimmt (Meyer 1999).



**Abbildung 2.30** Catecholaminchromatogramm, der Peak bei 5,88 min entspricht dem Noradrenalin, der kleine Peak bei 7,13 min entspricht Adrenalin und der dritte Peak bei 10,7 min entspricht dem internen Standard

Nach einem HPLC-Lauf einer Probe ergab sich das Chromatogramm, wie es in der Abbildung 2.30 dargestellt ist. Um einen Peak dem richtigen Probenbestandteil zuordnen zu können, wurden die Retentionszeiten berücksichtigt. Diese waren für Noradrenalin 5,88 min, für Adrenalin 7,13 min und für den internen Standard 10,7 min. Anschließend wurden die Peak-Flächen bestimmt, daraus wurden die Konzentrationen der Catecholamine im Plasma wie folgt berechnet:

### Beispiel Noradrenalin (NA)

$$[\text{NA}] \text{ (in pg/ml)} = (\text{NA}_{\text{Pr}} * \text{IS}_{\text{St}}) / (\text{NA}_{\text{St}} * \text{IS}_{\text{Pr}}) * \text{Faktor}$$

NA<sub>Pr</sub> – Peakfläche des Noradrenalin im Probenchromatogramm

IS<sub>St</sub> – Peakfläche des internen Standards im Kalibrationschromatogramm

NA<sub>St</sub> – Peakfläche des Noradrenalin im Kalibrationschromatogramm

IS<sub>Pr</sub> – Peakfläche des internen Standards im Probenchromatogramm

|           |              |     |
|-----------|--------------|-----|
| Faktoren: | Noradrenalin | 600 |
|           | Adrenalin    | 300 |
|           | Dopamin      | 300 |

(Chromsystems München 1999)

Normbereiche:

|              |               |
|--------------|---------------|
| Noradrenalin | 185-275 pg/ml |
| Adrenalin    | 30-85 pg/ml   |
| Dopamin      | 30-85 pg/ml   |

(L. Thomas, Marburg)

#### 2.2.4.10 Die Wiederfindungsrate

In der Auswertung eines Chromatogramms können Fehler auftreten.

Der konstant-systematische Fehler tritt auf, wenn die Kalibriergerade nicht durch den Nullpunkt verläuft.

Der proportional-systematische Fehler geht mit einem fehlerhaften Anstieg einher.

Eine quantitative Auswertung wird unter isokratischen Bedingungen durchgeführt, da mit der Gradientenelution Fehler auftreten können. Außerdem können während der Probenaufbereitung Fehler auftreten und die Ergebnisse verfälschen.

Aus diesem Grund wird die Wiederfindungsrate berechnet.

Zum einen wird der Reinstoff ohne Probenaufbereitung gemessen und zum anderen mit der Probenaufbereitung. Beide Ergebnisse werden gegeneinander verrechnet und schlussendlich als Wiederfindungsrate in Prozent angeben (Meyer 1999).

Die absolute Wiederfindung bei 10 Bestimmungen (Mittelwert) beträgt für:

|              |     |
|--------------|-----|
| Noradrenalin | 72% |
|--------------|-----|

|                   |     |
|-------------------|-----|
| Adrenalin         | 70% |
| Dopamin           | 68% |
| Interner Standard | 73% |

Die analytische Wiederfindung mit Korrektur für die Wiederfindung des internen Standards beträgt für (Mittelwert von 10 Bestimmungen):

|              |     |
|--------------|-----|
| Noradrenalin | 99% |
| Adrenalin    | 96% |
| Dopamin      | 93% |

(Bauersfeld et al. 1986)

Die Nachweisgrenze für Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin liegt bei 10-10000 pg/ml Plasma (Chromsystems München 1999)

### 2.3 Statistik

Zur Auswertung der statistischen Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Meinhard Mende des Zentrums für klinische Studien der Universität Leipzig. Zudem wurde das Statistikprogramm SPSS (Statistical Package of Social Science) 15.0 für Windows [Auswertung Version] verwendet. Die Daten der Patienten wurden mittels deskriptiver Statistik, Kovarianzanalyse und Häufigkeitsverteilung ausgewertet und dargestellt. In der Patientencharakteristik wurden die Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler oder in der prozentualen Verteilung angegeben. Der Schwerpunkt der Studie war der postoperative Verlauf der Patienten, so dass die Catecholaminpflichtigkeit, die Liegezeiten auf den Überwachungsstationen und im Krankenhaus, aber auch die präoperativen Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel als die abhängigen Variablen definiert wurden. Es sollte untersucht werden, ob diese von den unabhängigen Variablen, den SNPs, beeinflusst wurden. Demzufolge wurde das homozygote 145AA (Ser49Ser) des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus vom dem heterozygoten 145AG (Ser49Gly) unterschieden. Ebenso verhielt es sich mit dem 1165G>C (Arg389Gly) und dem 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus. Es wurde das homozygote 1165CC (Arg389Arg) bzw das homozygote 1165GG (Val158Val) gegenüber dem homozygoten 1165GG (Gly389Gly)/ heterozygoten 1165CG (Arg389Gly) bzw dem homozygoten 472AA (Met158Met)/ heterozygoten 472GA (Val158Met) unterschieden. Für die jeweiligen SNPs wurden die Mittelwerte der abhängigen Variablen ermittelt.

In einem weiteren Schritt wurden dann die Kombinationen untersucht, sowie die Verteilung der Allelvarianten des Studienkollektivs im Vergleich zu der Allgemeinbevölkerung mittels Hardy-Weinberg-Equilibrium und dem Chi<sup>2</sup>-Test. Die Berechnung der Allelfrequenzen für die SNP erfolgte nach Hardy Weinberg mittels der Formel  $(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2 = 1$  (Hardy 2003).

Des Weiteren wurde mit der Kovarianzanalyse überprüft, ob die Einflüsse der Polymorphismen auf die abhängigen Variablen signifikant waren. Hierbei war relevant, dass die unabhängigen Variablen die abhängigen Variablen nicht alleine beeinflussten. Es wurden weitere Einflussgrößen als Kovariaten einbezogen. Dazu zählte der präoperative individuelle Risikofaktor, welcher mit dem logistischen EuroSCORE I (European System for Cardiac Operative Risk Evaluation) berechnet wurde, und der hausinterne Risikofaktor, welcher durch die durchschnittlichen Verweildauern auf den Überwachungsstationen und im Krankenhaus der Patienten im Zeitraum von 2007 bis 2011 definiert wurde. Ein signifikanter Zusammenhang bestand bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ .

Die dargestellten Diagramme wurden mit dem Programm GraphPad Prism 6 generiert. Diese bilden die Mittelwerte mit den Standardfehlern und die Streuung, in Form von Scatterplots, der postoperativen Parameter auf die einzelnen SNPs und auf die 12 SNP-Kombinationen ab.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten des Herzzentrum Leipzig

Im Herzzentrum Leipzig werden jährlich 3500 Patienten operiert, dazu zählten ebenfalls die 116 Patienten dieser Studie. Ihre Daten wurden anonymisiert und mit dem Statistikprogramm SPSS ausgewertet. Der präoperative Status ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Es ist erkennbar, dass mehr Männer (66%) als Frauen (35%) erfasst wurden. Das mittlere Alter der Patienten hat  $63 \pm 1,2$  Jahre betragen. Der aus der angegebenen Größe und dem Gewicht berechnete Body-Maß-Index hat durchschnittlich bei  $27 \pm 0,4$  kg/m<sup>2</sup> gelegen. Ein Übergewichtig wird nach der Weltgesundheitsorganisation (2012) von 25 kg/m<sup>2</sup> bis 30 kg/m<sup>2</sup> definiert, demzufolge ist ein großer Teil der Patienten mit einem zu hohen Körpergewicht belastet gewesen.

Am Aufnahmetag wurde bei jedem Patienten unter anderem eine Echokardiografie durchgeführt. Die Ejektionsfraktion hat im Mittel  $58,7 \pm 0,9\%$  betragen. Die ermittelten Klappenvitien wurden ab einem Stenose- oder Insuffizienzgrad von Zwei in die Studie aufgenommen. Der häufigste Defekt war das Aortenklappenvitium mit 42,2%, am seltensten war die Pulmonalklappe (2,6%) betroffen.

Eine weitere Standarduntersuchung war die Herzkatheteruntersuchung. Hierunter wurde oftmals eine bis dahin unbekannte koronare Herzkrankheit festgestellt. 45,7% der Patienten haben unter dieser Erkrankung gelitten, bei der ein bis drei Gefäße betroffen waren.

Die NYHA-Klassifikation stellt ein Maß für den Schweregrad der Herzerkrankung dar. Sie beschreibt vier Grade (1994). Die meisten Patienten (40,5%) haben eine Herzerkrankung mit einer geringen Einschränkung der körperlichen Aktivität gehabt, jedoch ohne Beschwerden in physischer oder psychischer Ruhe. Das hat einem Schweregrad von Zwei entsprochen. Die genannten krankhaften Veränderungen des Herzens waren die Indikationen zu einem operativen Eingriff.

Eine andere Einteilung der Schwere einer Herzerkrankung ist die CCS-Klassifikation. Die kanadische Gesellschaft für kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieb in Anlehnung an Campeau Luciens Erkenntnisse vier Schweregrade der Angina pectoris (Campeau 1976). 50,9% der Patienten hatten keine pectanginösen Beschwerden. 26,7% waren in ihren normalen körperlichen Aktivitäten, wie schnellem Laufen oder Treppen steigen und unter emotionalem Stress leicht eingeschränkt. Das entsprach einem CCS-Grad von Zwei. Sehr wenige Patienten

(1,7%) litten unter einer Ruhe-Angina pectoris und einer deutlichen schmerzbedingten Einschränkung der körperlichen Aktivität. Sie wurden in einem Schweregrad von Vier eingeordnet.

Das Risikoprofil der Patienten ist ein entscheidender Faktor für das postoperative Ergebnis gewesen. Hierzu haben zum Beispiel der Nicotinabusus (32,8%) oder eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (6,9%) gezählt. Ein Viertel der Patienten haben unter einem Diabetes mellitus gelitten und 7,8% haben eine Kardiomyopathie gehabt. Die häufigste Comorbidität ist die arterielle Hypertonie (69,8%) gewesen. Eine Niereninsuffizienz haben wir ab einem Serumkreatininwert von 100 µmol/l eingestuft. Demzufolge haben 10,3% der Probanden eine beeinträchtigte Nierenfunktion gehabt.

Der logistische Euroscore I (2003) berücksichtigt diese und weitere Faktoren (extrakardiale Gefäßerkrankungen, neurologische Einschränkungen, vorangegangene Herzoperationen, aktive Endokarditis, kritischer präoperativer Status, instabile Angina pectoris, vorangegangene Herzinfarkte, pulmonale Hypertonie, Art des operativen Eingriffs und Herzseptumruptur nach einem Herzinfarkt). Er stellt ein objektives Maß für das präoperative Risiko dar und erstreckt sich von 0 bis 100 Punkten. Das Patientenkollektiv dieser Studie hat ein durchschnittliches Risiko von  $5,5 \pm 0,5$  Punkten gehabt.

Das Spektrum der herzchirurgischen Operationen erstreckt sich von einem einfachen arteriokoronaren Bypass bis zu den komplizierten Gefäß- und Klappenrekonstruktionen. Mitralklappenrekonstruktionen beziehungsweise –ersätze (36,2%) und arteriokoronare Bypässe (37,1%) sind die häufigsten Eingriffe des Studienkollektivs gewesen (siehe Tabelle 3.1).

| Anzahl der Patienten n = 116 |           |
|------------------------------|-----------|
| Alter in Jahren              | 63 ± 1,2  |
| Frauen                       | 35 %      |
| Gewicht in kg                | 80 ± 1    |
| Größe in cm                  | 171 ± 0,7 |
| BMI in kg/m <sup>2</sup>     | 27 ± 0,4  |
| Diabetes mellitus            | 25 %      |
| Hypertonie                   | 69,8 %    |
| Absolute Arrhythmie          | 22,4 %    |

|  |            |
|--|------------|
| chronisch obstruktive Lungenerkrankung | 6,9 %      |
| Kardiomyopathie                        | 6,9 %      |
| Raucher                                | 32,8 %     |
| Niereninsuffizienz                     | 10,3 %     |
| Euroscore                              | 5,5 ± 0,6  |
| CCS-Stadium                            |            |
| 0                                      | 50,9 %     |
| 1                                      | 10,3 %     |
| 2                                      | 26,7 %     |
| 3                                      | 9,5 %      |
| 4                                      | 1,7 %      |
| NYHA-Stadium                           |            |
| 0                                      | 17,2 %     |
| 1                                      | 9,5 %      |
| 2                                      | 40,5 %     |
| 3                                      | 31,9 %     |
| 4                                      | 0,9 %      |
| Ejektionsfraktion in %                 | 58,7 ± 0,9 |
| Aortenklappenvitium                    | 42,2%      |
| Mitralklappenvitium                    | 38,8%      |
| Trikuspidalklappenvitium               | 17,2%      |
| Pulmonalklappenvitium                  | 2,6%       |
| KHK                                    | 45,7%      |

| Operation                                 | relative Häufigkeit |
|---|---------------------|
| arteriokoronarer Bypass                   | 37,1%               |
| Aortenklappenersatz                       | 30,2%               |
| mit Aorta ascendens Ersatz                | 12,9%               |
| Trikuspidalklappenrekonstruktion/ -ersatz | 12,1%               |
| Mitralklappenrekonstruktion/ -ersatz      | 36,2%               |
| Pulmonalklappenersatz                     | 1,7%                |
| Re-Operation                              | 4,3%                |
| Implantation einer intraaortalen          | 2,6%                |
| Ballonpumpe                               |                     |

**Tabelle 3.1** Patientencharakteristik

### 3.2 Verteilung der Polymorphismen im Patientenkollektiv

Die FRET ermöglicht die Polymorphismen des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors und der Catechol-O-Methyltransferase zu verifizieren.

In der kaukasischen Bevölkerung ist das 145A (Ser49) des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus am häufigsten vertreten (Maqbool et al. 1999). Das 145G (Gly49) ist in einem homozygoten Chromosomensatz mit 0,3% sehr selten vorhanden (Ulucan et al. 2008). Dies hat sich auch in unserem Patientenkollektiv wider gespiegelt. 84,5% der Probanden haben das 145A (Ser49) getragen. Es lag entweder in der homozygoten Form (84,5%) oder in der heterozygoten Form (15,5%) vor. Demzufolge ist kein homozygoter Träger für 145GG (Gly49Gly) nachweisbar gewesen. Dies ist unter anderem in Tabelle 3.2 zusammen gefasst.

47,4% der Studienprobanden trugen das rezessiv vererbte 1165G (Gly389) des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus. Es waren jedoch nur 9,5% der Patienten homozygot für dieses. Die häufigste Allel-Form in diesem herzchirurgischen Kollektiv war das 1165C (Arg389). Sie lag zu 52,6% homozygot und zu 37,9% heterozygot vor.

Die Substitution der Aminosäure Valin an der 158sten Position der Catechol-O-Methyltransferase durch Methionin geht mit einer differentiellen Enzymaktivität einher (Lotta et al. 1995). In der kaukasischen Bevölkerung ist die Verteilung des 472G (Val158) und 472A (Met158) mit jeweils 50% ausgeglichen (Kunugi et al. 1994, Palmatier et al. 1999). In der Studie zeigte sich folgende Verteilung auf das Erbgut: 31,9% waren homozygote 472GG (Val158Val) Träger, 36,2% heterozygote und 31,9% waren homozygote 472A- (Met158) Träger.

In den weiteren Ausführungen der Ergebnisse wurden die homozygoten 145AA (Ser49Ser), 1165CC (Arg389Arg) und 472GG (Val158Val)-Träger zu den mutierten Allel-Trägern dargestellt. Die Ursache hierfür war das Fehlen der homozygoten 145GG (Gly49Gly) Trägern in der Studienpopulation, so dass zur deutlicheren statistischen Darstellung zu den mutierten Allel-Trägern sowohl die homozygoten (145GG/Gly49Gly, 1165GG/Gly389Gly und 472AA/Met158Met) als auch die heterozygoten Varianten (145AG/Ser49Gly, 1165CG/Arg389Gly und 472GA/Val158Met) gezählt wurden. Sie wurden dementsprechend als 145G/X (Gly49/X), 1165G/X (Gly389/X) und 472A/X (Met158/X) beschrieben. Das X stand für die SNP-Variante.

| Genprodukt   | homozygot für das dominante/Wildtyp-Allel | heterozygot                | homozygot für das rezessive/mutierte Allel |
|--|---|----------------------------|--|
| 145A>G<br>(Ser49Gly) $\beta_1$ -<br>Adrenorezeptor   | 145AA/ Ser49Ser<br>84,5 %                 | 145AG/ Ser49Gly<br>15,5 %  | 145GG/ Gly49Gly<br>0 %                     |
| 1165G>C<br>(Arg389Gly) $\beta_1$ -<br>Adrenorezeptor | 1165CC/Arg389Arg<br>52,6 %                | 1165CG/Arg389Gly<br>37,9 % | 1165GG/Gly389Gly<br>9,5 %                  |
| 472G>A<br>(Val158Met) COMT                           | 472GG/ Val158Val<br>31,9 %                | 472GA/ Val158Met<br>36,2 % | 472AA/ Met158Met<br>31,9 %                 |

**Tabelle 3.2** Verteilung der Patienten auf die drei Polymorphismen

| Genprodukt   | Allelfrequenz für das dominante/Wildtyp-Allel | Allelfrequenz für das rezessive/mutierte Allel | p-Wert |
|--|---|--|--------|
| 145A>G<br>(Ser49Gly) $\beta_1$ -<br>Adrenorezeptor   | 145 Adenin<br>0,923                           | 145 Guanin<br>0,077                            | 1,0    |
| 1165G>C<br>(Arg389Gly) $\beta_1$ -<br>Adrenorezeptor | 1165 Cytosin<br>0,714                         | 1165 Guanin<br>0,286                           | 0,65   |
| 472G>A<br>(Val158Met)<br>COMT                        | 472 Guanin<br>0,509                           | 472 Adenin<br>0,491                            | 0,003  |

**Tabelle 3.3** Die Verteilung der Allelfrequenzen für die SNP unter Berücksichtigung des Hardy Weinberg Equilibriums. Bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  war mittels Chi<sup>2</sup>-Test bei dem 472G>A (Val158Met) Polymorphismus ein signifikanter Unterschied zwischen der Allgemeinbevölkerung und dem Studienkollektiv zu verzeichnen ( $p=0,003$ ). Die Verteilung der Allele des 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus im Studienkollektiv unterschied sich nicht signifikant von der Allgemeinbevölkerung ( $p>0,05$ ).

Nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, welches die genetische Variabilität einer Population von Generation zu Generation als konstant beschreibt (Hardy 2003), waren keine signifikanten Abweichungen der Allelfrequenzverteilungen der beiden  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen zwischen der Allgemeinbevölkerung und dem

Patientenkollektiv nachweisbar (145A>G  $p = 1,0$  und 1165G>C  $p = 0,65$ ; Vergleich Tabelle 3.3). Ausnahme bildete der Val158Met-Genotyp. Er war in dem Patientenkollektiv deutlich unterrepräsentiert (36,2% Patienten, 50% Allgemeinbevölkerung (Kunugi et al. 1997, Palmatier et al. 1999), nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht  $p = 0,003$ ).

Die Tabelle 3.4 fasst die Patientencharakteristik auf die Polymorphismusvarianten aufgeschlüsselt zusammen. Es ist erkennbar, dass die Verteilung des Alters, des Körpergewichtes, der Körpergröße, der Hypertonie, der Niereninsuffizienz, des EuroSCOREs und der Ejektionsfraktion auf die Polymorphismusvarianten nahezu gleich ist. Auffällig war, dass es eine statistisch signifikante Abhängigkeit zwischen der Erkrankungshäufigkeit des Diabetes mellitus mit den Polymorphismen gab. Die Patienten mit dem 472GG (Val158Val), dem 472G/X (Gly49/X) waren signifikant weniger von dem Diabetes betroffen ( $p < 0,05$ ).

Es zeigte sich außerdem eine statistische Signifikanz in der Indikation eines arteriocoronaren Bypasses und den Polymorphismen ( $p < 0,05$ ). Vor allem Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) wurden signifikant am häufigsten operiert.

| Parameter                                  | alle    | Ser49Ser | Gly49/X  | Arg389<br>Arg | Gly389/X | Val158Val | Met158/X | p-Wert |
|--|---------|----------|----------|---------------|----------|-----------|----------|--------|
| N  | 116     | 98       | 18       | 61            | 55       | 38        | 78       |        |
| Alter (Jahre)                              | 63±1,2  | 62,3±1,3 | 66,1±2,5 | 61,9±1,6      | 64±1,8   | 64,4±1,8  | 62,2±1,5 | 0,462  |
| weiblich (%)                               | 35      | 38       | 17       | 38            | 31       | 40        | 32       | 0,208  |
| Gewicht (kg)                               | 80±1    | 80,2±1,5 | 79,3±3,2 | 80,8±1,8      | 79,3±1,9 | 77,5±2,3  | 81,3±1,6 | 0,533  |
| Größe (cm)                                 | 171±1   | 171±1    | 171±2    | 170±1         | 171±1    | 169±1     | 171±1    | 0,766  |
| Diabetes mellitus (%)                      | 25      | 28       | 11       | 30            | 20       | 8         | 33       | 0,003* |
| Hypertonie (%)                             | 70      | 69       | 72       | 69            | 71       | 66        | 72       | 0,905  |
| absolute Arrhythmie (%)                    | 22      | 25       | 11       | 21            | 24       | 29        | 19       | 0,322  |
| chronisch obstruktive Lungenerkrankung (%) | 7       | 6        | 11       | 10            | 4        | 8         | 6        | 0,462  |
| koronare Herzkrankheit (%)                 | 46      | 43       | 61       | 53            | 38       | 37        | 50       | 0,073  |
| Kardiomyopathie (%)                        | 7       | 6        | 11       | 10            | 4        | 5         | 8        | 0,422  |
| Raucher (%)                                | 33      | 31       | 44       | 30            | 36       | 24        | 37       | 0,241  |
| Niereninsuffizienz (%)                     | 10      | 10       | 11       | 10            | 11       | 8         | 12       | 0,933  |
| EuroSCORE                                  | 5,5±0,5 | 5,1±0,6  | 7,4±1,9  | 5,5±0,8       | 5,5±0,7  | 5,3±0,6   | 5,6±0,8  | 0,521  |
| β-Blocker (%)                              | 53      | 54       | 44       | 57            | 47       | 40        | 59       | 0,088  |

|   |       |       |        |       |        |        |       |        |
|---|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|
| Ejektionsfraktion (%)   | 59±1  | 59±1  | 56±2   | 57±1  | 60±1   | 56±2   | 59±1  | 0,13   |
| arteriocroronarer Bypass (%)                                      | 37    | 31    | 61     | 39    | 33     | 29     | 40    | 0,045* |
| Aortenklappenersatz /-rekonstruktion (%)                          | 30    | 26    | 44     | 20    | 39     | 34     | 26    | 0,055  |
| Aortenklappenersatz /-rekonstruktion mit Aorta ascendens Ersatz % | 13    | 14    | 6      | 4     | 9      | 11     | 9     | 0,161  |
| Trikuspidalklappenersatz/-rekonstruktion (%)                      | 12    | 13    | 11     | 17    | 8      | 13     | 12    | 0,521  |
| Mitralklappenersatz/-rekonstruktion (%)                           | 36    | 37    | 39     | 42    | 31     | 42     | 34    | 0,502  |
| Pulmonalklappenersatz/-rekonstruktion (%)                         | 2     | 2     | 0      | 3     | 0      | 3      | 1     | 0,334  |
| Operationsdauer in Minuten  | 200±7 | 193±8 | 236±12 | 201±9 | 200±12 | 203±12 | 199±9 | 0,203  |

**Tabelle 3.4** Die Patientencharakteristik auf die Polymorphismusvarianten aufgelistet. Es zeigten sich signifikante Abhängigkeiten zwischen der Häufigkeit des Auftretens des Diabetes mellitus und der Operationsindikation des arteriocroronaren Bypasses ( $p < 0,05$ ). Die Verteilung des Alters, der Körpergröße, des Körpergewichtes, der Niereninsuffizienz, des EuroSCOREs und der Ejektionsfraktion war zwischen den Allelvarianten ausgeglichen.

### 3.3 Liegezeiten der Patienten

#### 3.3.1 Das gesamte Studienkollektiv

Nach der Operation wurde der Patient entweder auf die Intensivstation (ITS) oder in den Aufwachraum verlegt. Diese Entscheidung war sowohl von der Schwere und dem Verlauf der Operation, als auch von dem Risikoprofil des Patienten abhängig.

Wir zählten die Zeiten im Aufwachraum zu den Liegezeiten auf der Intensivstation, da die Versorgung und Überwachung der Patienten im Aufwachraum ähnlich der auf der Intensivstation waren. Die Patienten wurden anschließend vom Aufwachraum auf die Intensivstation oder auf die Intermediate Care (IC) Station verlegt.

Nach der intensivmedizinischen Überwachungsphase wurden die Patienten entweder auf die Intermediate Care Station oder auf die Normalstation verteilt.

Insgesamt waren 94% der Patienten auf der IC Station.

Während des Aufenthaltes auf der Intensivstation oder Intermediate Care Station wurde unter anderem stündlich der mittlere arterielle Druck bestimmt. Es ergab sich ein Mittelwert von  $82,3 \pm 0,7$  mmHg. Im weiteren postoperativen Verlauf haben 4,3% der Patienten ein Nierenversagen und 0,9% ein Lungenversagen erlitten.

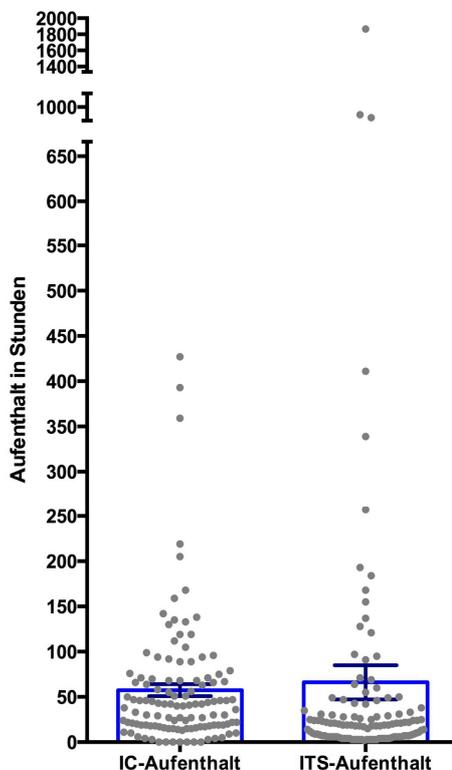
Die Liegezeiten in der intensivmedizinischen Abteilung differierten stark, was auch in Abbildung 3.1 zu erkennen ist. Die kürzeste Aufenthaltsdauer sind zwei Stunden gewesen und die Längste hat sich auf 1866 Stunden belaufen. Die Ursache für

diesen Unterschied konnte verschieden sein. Sie war unter anderem von der Schwere und dem Verlauf des operativen Eingriffs, von dem Operateur und dem individuellen Risiko abhängig. Im Durchschnitt haben die Patienten jedoch  $66,1 \pm 19$  Stunden in dieser Abteilung verbracht.

Die Abbildung 3.1 stellt außerdem den Aufenthalt auf der Intermediate Care Station dar. Es ist erkennbar, dass die Patienten 427 Stunden maximal und  $57,6 \pm 6,5$  Stunden im Mittel auf der Station verbracht haben. Die durchschnittlichen Verweildauern der Überwachungsstationen unterschieden sich kaum.

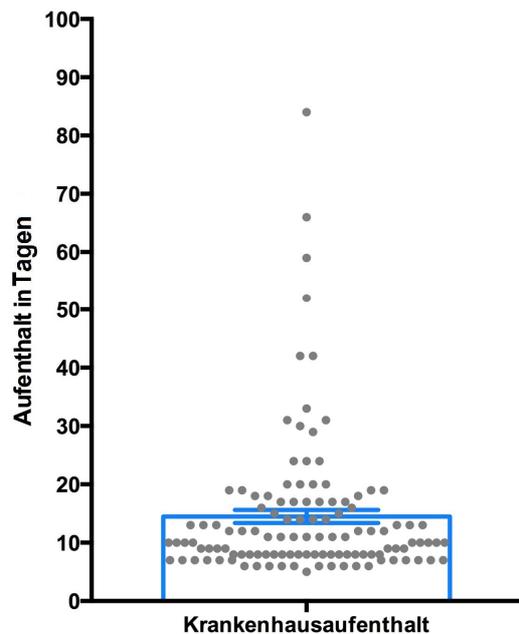
Der Patient wurde auf die Normalstationstation verlegt, sobald er kreislaufstabil und nicht mehr überwachungspflichtig war. Der weitere Aufenthalt war sowohl von medizinischen als auch sozialen Faktoren abhängig. Die Dauer des Krankenhausaufenthaltes haben wir von dem Ende der Operation bis zu der Entlassung bestimmt. Daraus hat sich ein Mittelwert von  $14,5 \pm 1,1$  Tagen ergeben, dies ist in der Abbildung 3.2 erkennbar. Des Weiteren waren keine großen Schwankungen, wie bei den anderen Stationen abgebildet, vorhanden. Nach der Hospitalisation hat sich die Anschlussheilbehandlung angeschlossen.

**Liegezeiten auf den Überwachungsstationen**



**Abbildung 3.1** Die Verteilung der Liegezeiten des gesamten Studienkollektivs auf den Intensiv- und IC-Stationen. Die mittleren Aufenthaltsdauern unterscheiden sich kaum. Die Intensivstation zeigt größere Ausreißer als die IC-Station. Zudem ist der SEM-Wert deutlich höher.

**Aufenthalt im Krankenhaus**



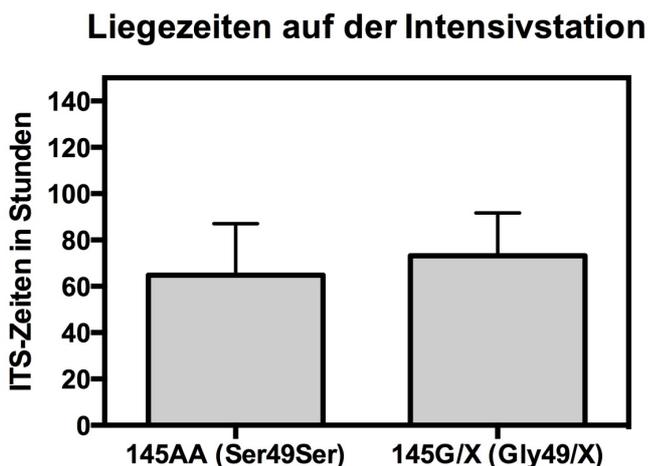
**Abbildung 3.2** Die Verteilung des Krankenhausaufenthalts in Tagen. Durchschnittlich verbrachten die Probanden 14 Tage im Haus. Es sind jedoch große Unterschiede erkennbar. Der längste Aufenthalt war 84 Tage, der kürzeste 5 Tage.

### 3.3.2 Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf die Liegezeiten

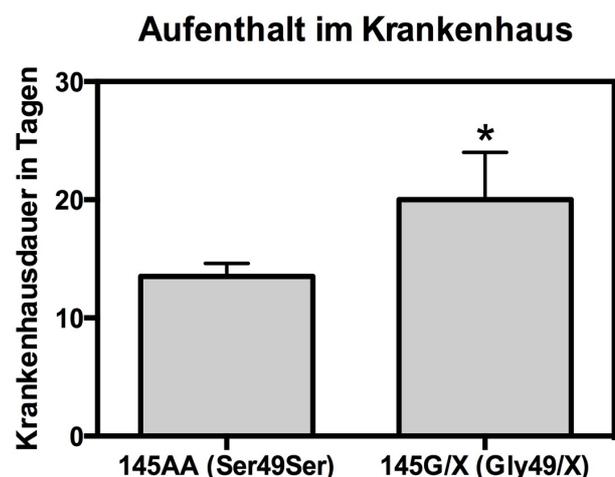
84,6% der Patienten trugen das 145A (Ser49) in einem homozygoten Chromosomensatz. Sie haben auf der Intermediate Care Station durchschnittlich  $56,2 \pm 6,9$  Stunden und auf der Intensivstation  $64,8 \pm 22,2$  Stunden verweilt. Dies entsprach nahezu dem Patientendurchschnitt. Die Abbildungen 3.3 und 3.12 spiegeln das unter anderem wider. Die Träger des 145G/X (Gly49/X) waren im Mittel  $73,2 \pm 18,5$  Stunden in der intensivmedizinischen Abteilung gewesen. Es bestand ein nicht signifikanter Unterschied von 17 Stunden zwischen dem 145AA (Ser49Ser) und dem 145G/X (Gly49/X). Die Liegezeiten auf der Intermediate Care Station unterschieden sich um 8,6 Stunden zwischen dem 145AA (Ser49Ser) und dem 145G/X (Gly49/X) zu verzeichnen.

Die Abbildung 3.10 stellt den Euroscore dar. Sie zeigt, dass sich die Risikopunkte der beiden Varianten geringfügig unterschieden. Das präoperative Risikoprofil war bei den Trägern des 145AA (Ser49Ser) geringer ( $5,1 \pm 0,6$ ) als bei den des 145G/X (Gly49/X) ( $7,4 \pm 1,9$ ) (n.s.). Ob dies eine Erklärung für den Unterschied der zuvor erwähnten 17 Stunden sein könnte, ist fraglich.

Die Dauer der Hospitalisation, welche in Abbildung 3.4 dargestellt ist, zeigte eine deutliche Differenz von einer Woche. Die Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) waren signifikant länger im Krankenhaus.



**Abbildung 3.3** Verteilung der Liegezeiten auf der Intensivstation bezogen auf den 145A>G (Ser49Gly)  $\beta$ 1-AR-Polymorphismus. Es ist ein nicht signifikanter Unterschied von 17 Stunden erkennbar. Die Patienten mit dem 145AA lagen  $64,8 \pm 22,2$  Stunden und die Patienten mit dem 145G/X  $73,2 \pm 18,5$  Stunden auf der Station.

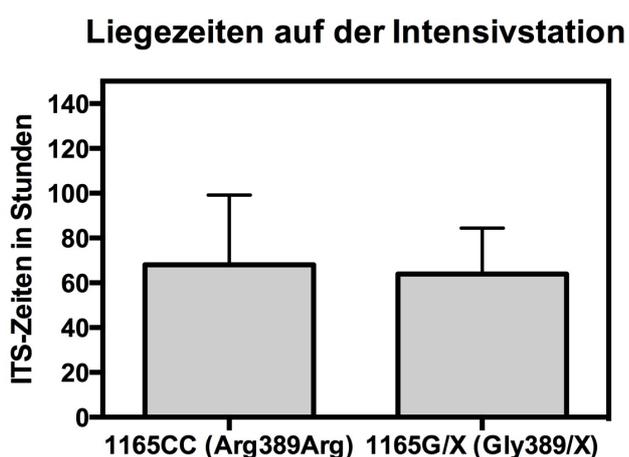


**Abbildung 3.4** Die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus bezüglich des 145A>G (Ser49Gly)  $\beta$ 1-AR-Polymorphismus. Die Patienten mit dem 145AA waren signifikant länger im Krankenhaus (145AA  $13,5 \pm 1,1$  Tage, 145G/X  $20 \pm 4$  Tage). \* $p < 0,05$  (Vgl. Tbl. 3.6 und 3.7).

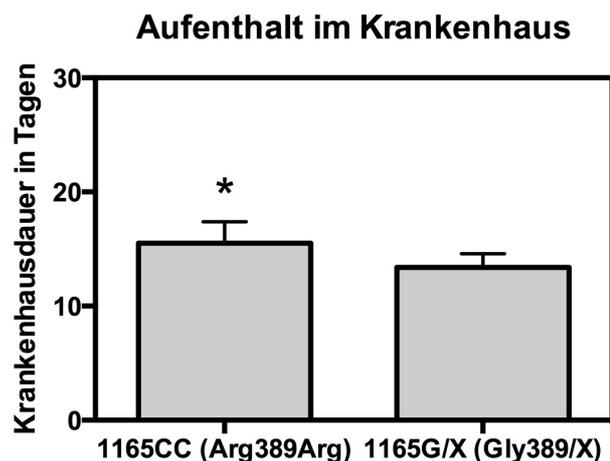
### 3.3.3 Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Liegezeiten

61 Patienten trugen das 1165CC (Arg389Arg). Sie zeigten Differenzen zu den 55 Patienten, welche das homozygote und heterozygote 1165G (Gly389) trugen. Die Abbildung 3.16 gibt das wider. Es zeigte, dass die Patienten mit dem 1165CC (Arg389Arg) im Durchschnitt  $48,3 \pm 5,7$  Stunden und die mit dem 1165G/X (Gly389/X) im Mittel  $67,9 \pm 12,2$  Stunden auf der Intermediate Care – Station verbracht haben. Es war ein Unterschied von 19,6 Stunden auffällig. Die Ursache hierfür lag nicht an einem durchschnittlich erhöhten Risikoprofil, wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist. Die Euroscores waren nämlich zu dem damaligen Zeitpunkt für beide Probandengruppen identisch ( $5,5 \pm 0,8$  1165CC (Arg389Arg),  $5,5 \pm 0,7$  1165G/X (Gly389/X)).

Liegezeiten auf der Intensivstation variierten nur gering. Die Abbildung 3.5 lässt erkennen, dass die Patienten mit dem 1165CC (Arg389Arg)  $68,1 \pm 31,1$  Stunden und die mit dem 1165G/X (Gly389/X)  $63,9 \pm 20,5$  Stunden auf der Station verbracht haben. Es war keine signifikante Beeinflussung des Polymorphismus nachweisbar. Wir haben jedoch eine Differenz in der Hospitalisationsdauer feststellen können. Das bildet das Diagramm 3.6 ab. Die Träger des 1165CC (Arg389Arg) waren zwei Tage länger im Herzzentrum Leipzig als die Träger des 1165G/X (Gly389/X) ( $15,5 \pm 1,9$  Tage 1165CC (Arg389Arg),  $13,4 \pm 1,2$  Tage 1165G/X (Gly389/X)).



**Abbildung 3.5** Die Liegezeiten der Patienten auf der Intensivstation bezogen auf den 1165 G>C (Arg389Gly)  $\beta$ 1-AR-Polymorphismus zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die Patienten war mit einer längeren Aufenthaltsdauer als mit dem 1165CC waren  $68,1 \pm 31,1$  Stunden und die mit dem 1165G/X  $63,9 \pm 20,5$  Stunden auf der ITS.



**Abbildung 3.6** Die Dauer des Krankenhausaufenthalts unterschied sich signifikant zwischen den Genotypen. Das 1165CC war mit einer längeren Aufenthaltsdauer als das 1165G/X assoziiert (1165CC  $15,5 \pm 1,9$  Tagen, 1165G/X  $13,4 \pm 1,2$  Tagen). \* $p < 0,05$  (Vgl. Tbl. 3.6 und 3.7).

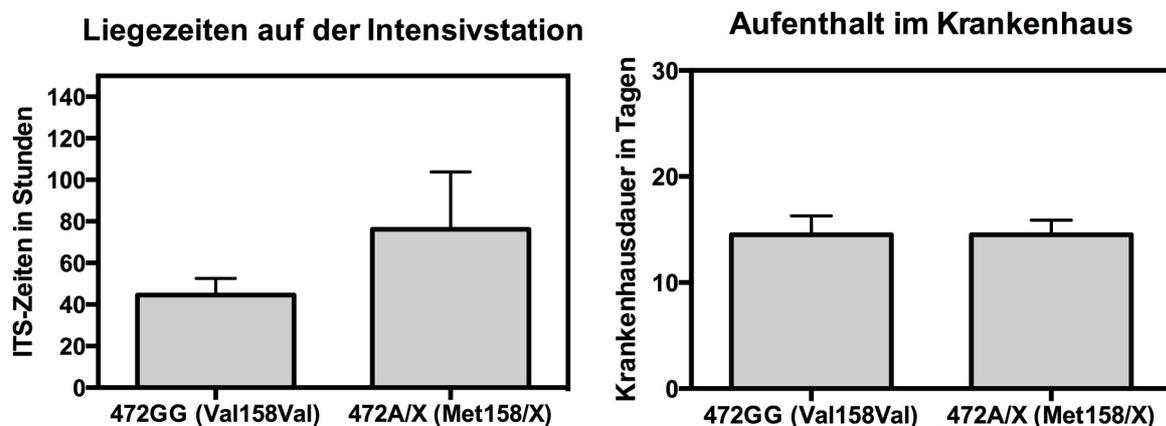
### 3.3.4 Einfluss des COMT-Polymorphismus auf die Liegezeiten

Bezüglich der COMT ließen sich die Patienten in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe trug die schnell metabolisierende Variante der Catecholamin-O-Methyltransferase. Die 472GG (Val158Val) tragenden Studienteilnehmer haben durchschnittliche  $68 \pm 14,4$  Stunden in der IC-Abteilung gelegen, wie in der Abbildung 3.20 abgebildet. Die Patienten der anderen Gruppe, welche die langsamer metabolisierende Catechol-O-Methyltransferase, in den Diagrammen als 472A/X (Met/X158) bezeichnet, enthielten, waren  $52,7 \pm 6,8$  Stunden auf der Station gewesen. Es bestand ein Unterschied von 15 Stunden.

Die Abbildung 3.7 stellt die Verweildauer in der intensivmedizinischen Abteilung dar. Sie zeigt, dass die Patienten mit dem 472GG (Val158Val) durchschnittlich  $44,6 \pm 7,9$  Stunden und die Patienten mit der 472A/X (Met158/X) Variante im Mittel  $76,2 \pm 27,6$  Stunden auf der Intensivstation gelegen haben. Dementsprechend ist eine nicht signifikante Differenz von 31,6 Stunden erkennbar.

Zudem waren die Risikoprofile nahezu identisch. Die Darstellung 3.18 bildet den Euroscore mit einem durchschnittlichen Punktwert von  $5,1 \pm 0,6$  für das 472GG (Val158Val) ab. Die 472A/X (Met/X158) COMT ist mit einem mittleren Punktwert von  $5,7 \pm 0,8$  gekennzeichnet. Demnach liegt ein Unterschied von lediglich 0,6 Punkten vor.

Die durchschnittliche Aufenthaltsdauer im Krankenhaus sind zwei Wochen (472GG (Val158Val)  $15,5 \pm 2$  Tage, 472A/X (Met158/X)  $14 \pm 1,4$  Tage) gewesen. Die Verteilungen der Liegezeiten sind in der Abbildung 3.8 zusammengefasst. Es ist keine große Diskrepanz zu sehen.



**Abbildung 3.7** Die Liegezeiten der Patienten auf der Intensivstation bezogen auf den 472 G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $472GG$   $44,6 \pm 7,9$  Stunden und  $472A/X$   $76,2 \pm 27,6$  Stunden).

**Abbildung 3.8** Der Krankenhausaufenthalt wurde nicht von dem 472 G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus beeinflusst ( $472GG$   $15,5 \pm 2$  Tage und  $472A/X$   $14 \pm 1,4$  Tage).

### **3.3.5 Einfluss des Euroscores auf die Liegezeiten und den Catecholaminverbrauch**

Der Euroscore fasst das individuelle Risikoprofil eines Patienten in einen Punktwert zusammen. Er stellt somit ein objektives Maß dar. Dementsprechend müsste eine Abhängigkeit zwischen dem Wert des Euroscores und dem postoperativen Verlauf nachweisbar sein.

Charakteristisch für den postoperativen Verlauf der Patienten waren eine Catecholaminpflichtigkeit, die Liegezeiten auf den Überwachungsstationen sowie der gesamte stationäre Aufenthalt. Mittels linearer Regression konnte eine partielle Abhängigkeit zwischen den genannten Parametern und dem Euroscore festgestellt werden.

Hat eine größere Kreislaufinstabilität bestanden, musste eine höhere Dosis an Catecholaminen verabreicht werden. Diese Kreislaufinstabilität wurde zum Teil von dem entsprechenden individuellen Risikoprofil des Patienten beeinflusst. Demzufolge konnte eine Korrelation zwischen dem Euroscore und der gesamten Catecholamingabe mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$  festgestellt werden. Das ist in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Es ist in der linearen Regression zwischen der Noradrenalingabe und dem Euroscore ebenfalls eine grenzwertige Signifikanz von  $p = 0,038$  erkennbar gewesen.

Ist eine weitere umfassende Überwachung nach dem operativen Eingriff nötig gewesen, wurden die Patienten auf die Intensivstation gelegt. Es wurde zu Beginn von allen Patienten, welche von 2007 bis 2011 im Herzzentrum operiert wurden, eine mittlere Aufenthaltsdauer bestimmt. Diese hat eine enge Korrelation mit dem Euroscore gezeigt ( $p = 0,001$ ). Wir konnten jedoch keine Korrelation der Liegezeiten unserer Studienpatienten mit dem Risikofaktor feststellen ( $p = 0,333$ ). Demnach sind wahrscheinlich auch die Komplexität der Operation, unvorhersehbare intraoperative Komplikationen, der Operateur und womöglich die Genpolymorphismen von entscheidendem Belang.

Die Patienten wurden schließlich von der Intensivstation oder von dem Aufwachraum auf die Intermediate Care Station zur weiteren Kreislaufüberwachung verlegt. Es ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Aufenthaltsdauer dieser Station und dem Euroscore nachweisen ( $p = 0,005$ ). Demnach haben das Alter, das Geschlecht und die zusätzlichen Erkrankungen der betroffenen Probanden einen Einfluss auf deren Liegezeiten gehabt. Ebenso ist eine gegenseitige Beeinflussung zwischen dem

Euroscore und der durchschnittlichen IC-Verweildauer belegbar gewesen ( $p < 0,001$ ). Das individuelle Risiko stellt somit einen starken Einflussfaktor auf die Dauer der Liegezeiten dar und musste demnach als Kovariate in der Analyse der Effekte der Genpolymorphismen einbezogen werden.

Die Zeitspanne von dem Ende der Operation bis zu der Entlassung haben wir als Aufenthaltsdauer im Krankenhaus definiert. Wir konnten keine Korrelation zwischen dem Euroscore und der durchschnittlichen Krankenhausaufenthaltsdauer unserer Patienten feststellen ( $p = 0,255$ ). Ebenso war keine Korrelation zwischen dem Risikofaktor und dem mittleren stationären Aufenthalt der Patienten des Zeitraums von 2007 bis 2011 ( $p = 0,078$ ).

| abhängige Variable                               | p-Werte      |
|--|--------------|
| gesamte Catecholamingabe                         | <0,001       |
| Noradrenalingabe                                 | 0,038        |
| mittlerer ITS-Aufenthalt (von 2007-2011)         | 0,001        |
| ITS-Aufenthalt der Studienpatienten              | 0,333 / n.s. |
| mittlerer IC-Aufenthalt (von 2007-2011)          | < 0,001      |
| IC-Aufenthalt der Studienpatienten               | 0,005        |
| mittlerer stationärer Aufenthalt (von 2007-2011) | 0,078 / n.s. |
| stationärer Aufenthalt der Studienpatienten      | 0,255 / n.s. |

**Tabelle 3.5** Einfluss des Euroscores auf die aufgeführten Variablen. Die mittleren Aufenthaltsdauern auf der IC-, ITS-Stationen und im Haus beziehen sich auf den Zeitraum von 2007 bis 2011. Mit einem erhöhten Euroscore waren signifikant eine erhöhte Catecholamingabe ( $p < 0,001$  u  $p < 0,038$ ), ein längerer mittlerer ITS-Aufenthalt der Patienten von 2007 bis 2011 ( $p = 0,001$ ), ein längerer mittlerer IC-Aufenthalt der Patienten von 2007 bis 2011 ( $p < 0,001$ ), ein längerer Aufenthalt der Studienpatienten auf der IC-Station ( $p = 0,005$ ) nachweisbar. Es waren keine Abhängigkeiten des ITS-Aufenthalts der Studienpatienten, des mittleren stationären Aufenthaltes sowohl der Patienten im Zeitraum von 2007 bis 2011 als auch der Studienpatienten nachweisbar. n.s. = nicht signifikant

Es wurde deutlich, dass der Euroscore grenzwertig beziehungsweise partiell mit dem Catecholaminverbrauch und den Liegezeiten korrelierte. Demzufolge mussten weitere Einflussfaktoren in Betracht gezogen werden. Dieser Aspekt wurde in der Covarianzanalyse berücksichtigt und untersucht.

### 3.3.5.1 Einfluss der Polymorphismen auf die Liegezeiten unter Berücksichtigung des Euroscores

Die Liegezeiten auf der Intermediate Care Station unterschieden sich bezüglich der verschiedenen Polymorphismen. Jeder Patient litt allerdings unter weiteren Erkrankungen, die das operative Ergebnis und den weiteren stationären Verlauf beeinflussen konnten. Der Euroscore fasste das in einem entsprechenden Punktwert zusammen. Der Punktwert wurde mittels Covarianzanalyse verrechnet und floss als Covariate in die Polymorphismusanalyse hinein.

Unter der Verwendung eines Signifikanzniveaus von  $\alpha = 0,05$  waren keine signifikanten Beeinflussungen der Polymorphismen auf die Aufenthaltsdauer auf der Intermediate Care Station oder der Intensivstation nachweisbar ( $p > 0,05$ ) (siehe Tabelle 3.6).

Anders verhielt es sich mit der Verweildauer im Krankenhaus. Es stellte sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus dar ( $p = 0,01$ ). Die Patienten mit dem 145AA (Ser49Ser) waren durchschnittlich eine Woche kürzer im Krankenhaus als die Träger des 145G/X (Gly49/X). Ebenso ließ sich eine signifikante Beeinflussung mit dem 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus nachweisen ( $p = 0,018$ ). Die Patienten mit dem 1165CC (Arg389Arg) waren zwei Tage länger im Herzzentrum als die 1165G/X (Gly389/X) Träger (siehe Tabelle 3.6).

| unabhängige Variable              | Liegezeiten auf der IC-Station | Aufenthalt im Krankenhaus |
|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 145A>G (Ser49Gly) $\beta_1$ -AR   | $p = 0,701$                    | $p = 0,01^*$              |
| 1165G>C (Arg389Gly) $\beta_1$ -AR | $p = 0,237$                    | $p = 0,018^*$             |
| 472G>A (Val158Met) COMT           | $p = 0,103$                    | $p = 0,342$               |
| Euroscore                         | $p = 0,189$                    | $p = 0,903$               |

**Tabelle 3.6** Ergebnisse (p-Werte) der Interaktionen des 145A>G (Ser49Gly), 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus und des COMT-Polymorphismus unter der Covariate Euroscore. Signifikanz bei  $p < 0,05^*$ . Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) und dem 1165CC (Arg389Arg) waren signifikant länger im Krankenhaus.

### **3.3.5.2 Einfluss der Polymorphismen auf die Liegezeiten unter Berücksichtigung des hausinternen Risikomarkers**

Die Polymorphismen schienen die Liegezeiten der Patienten oder den Catecholaminverbrauch zu beeinflussen. Eine entscheidende Bedeutung haben jedoch auch die Schwere und der Verlauf der Operation, sowie der Operateur und die weitere Behandlung des Patienten auf der Überwachungsstation gehabt. Aus diesem Grund wurden die mittleren Liegezeiten auf der Intensivstation von allen Patienten im Zeitraum von 2007 bis 2011 bestimmt. Diese mittlere Aufenthaltsdauer stellt einen hausinternen Marker dar. Sinn war es diesen als Covariate zu verwenden um Abweichungen der Patienten vom durchschnittlichen Fall besser erkennen zu können. Er fasst somit die herzzentrumspezifischen Einflüsse zusammen. Des Weiteren war eine lineare Abhängigkeit zwischen dem objektiven Maß des Euroscores und dem hausinternen Marker nachweisbar ( $p = 0,001$ ).

Die Liegezeiten auf der Intermediate Care Station wurde nicht von den drei Polymorphismen beeinflusst ( $p > 0,05$ ), wenn der hausinterne Marker berücksichtigt wurde.

Es wurden die Liegezeiten auf der Intermediate Care Station für das Patientenkollektiv mit den mittleren Intermediate Care-Liegezeiten der Patienten in dem Zeitraum von 2007 bis 2011 verglichen. Es stellten sich auch unter diesen Voraussetzungen keine signifikanten Beeinflussungen der Polymorphismen ein ( $p > 0,05$ ). Die Aufenthaltsdauer in der intensivmedizinischen Abteilung unterlag keiner Beeinflussung der drei Polymorphismen ( $p > 0,05$ ).

Der Krankenhausaufenthalt ist allerdings von den Polymorphismen abhängig gewesen, wenn sowohl die mittlere ITS-Dauer der Patienten von 2007 bis 2011 als auch der mittlere Krankenhausaufenthalt der Patienten von 2007 bis 2011 als Covariablen berücksichtigt wurden. Das 145G/X (Gly49/X) ging mit einer signifikant längeren Verweildauer einher ( $p = 0,014$  unter Berücksichtigung der Covariable mittlere ITS-Dauer 2007 – 2011 und  $p = 0,012$  unter Berücksichtigung der Covariable mittlerer Krankenhausaufenthalt 2007 – 2011). Eine signifikante Beeinflussung des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf den Aufenthalt im Krankenhaus war ebenfalls nachweisbar ( $p = 0,017$  unter Berücksichtigung der Covariablen mittlere ITS-Dauer und  $p = 0,01$  bezüglich des mittleren Krankenhausaufenthalts 2007 – 2011). Patienten mit dem 1165CC (Arg389Arg) waren signifikant länger im Krankenhaus. Dies wird in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

| unabhängige Variable              | Aufenthalt im Krankenhaus                                   |  |
|-----------------------------------|---|--|
|                                   | Covariablen: mittlere ITS-Dauer der Patienten von 2007-2011 | Covariablen: mittlerer Krankenhausaufenthalt der Patienten von 2007-2011 |
| 145A>G (Ser49Gly) $\beta_1$ -AR   | p = 0,014*  | p = 0,012*   |
| 1165G>C (Arg389Gly) $\beta_1$ -AR | p = 0,017*  | p = 0,01*  |
| 472G>A (Val158Met) COMT           | p = 0,295   | p = 0,304  |

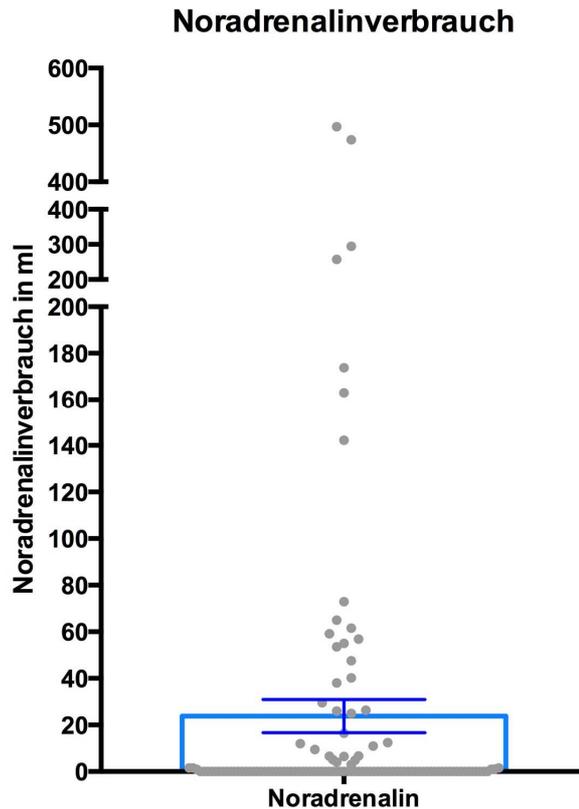
**Tabelle 3.7** Ergebnisse (p-Werte) der Interaktionen der  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und des COMT-Polymorphismus unter Berücksichtigung der Covariablen mittlere ITS-Dauer und mittlerer Krankenhausaufenthalt der Patienten von 2007 bis 2011. Signifikanz  $p < 0,05^*$ . Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X), 1165CC (Arg389Arg) waren signifikant länger im Krankenhaus.

### 3.4 Der postoperative Noradrenalinverbrauch

#### 3.4.1 Das gesamte Studienkollektiv

Nach der Operation ist oftmals zur Unterstützung der Kreislauffunktion die Gabe von Catecholaminen nötig. Der Blutdruck kann unter anderem durch die Wirkung der Narkotika zu stark vermindert sein, so dass Noradrenalin gegeben werden muss. Das Herz ist durch die Operation geschwächt, so dass Dobutamin appliziert werden musste. Der Patient hat einen Herz-Kreislauf-Stillstand auf der Intensivstation entwickelt, somit ist die Gabe von Adrenalin unter Umständen lebensrettend.

Das studienrelevante Catecholamin ist Noradrenalin, da dieses vorrangig eingesetzt wurde und es das Substrat für die COMT ist. 43,6% der Patienten haben es bei der entsprechenden Indikation erhalten. Die Angaben sind in Milliliter, die Dosierung betrug in einem Perfusor 3mg/50ml. Der mittlere Noradrenalinverbrauch war  $23,9 \pm 7,1$  ml. Er ist in der Abbildung 3.9 dargestellt. Es ist zudem erkennbar, dass die Noradrenalinpflichtigkeit stark variierte. Es wurden maximal 497 ml verabreicht. 66,4% der Patienten haben Noradrenalin zu der Kreislaufunterstützung nicht benötigt.

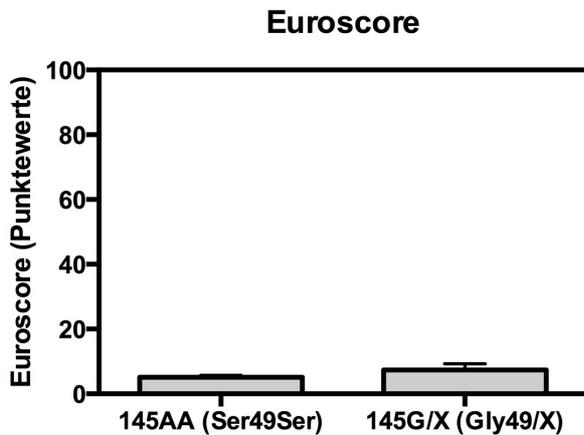


**Abbildung 3.9** Der Noradrenalinverbrauch in ml zeigte deutliche Schwankungen in der Verteilung auf das Patientenkollektiv. Im Mittel wurden  $23,9 \pm 7,1$  ml verabreicht. 56,4% der Patienten erhielten kein Noradrenalin. Der maximale Bedarf lag bei 497 ml.

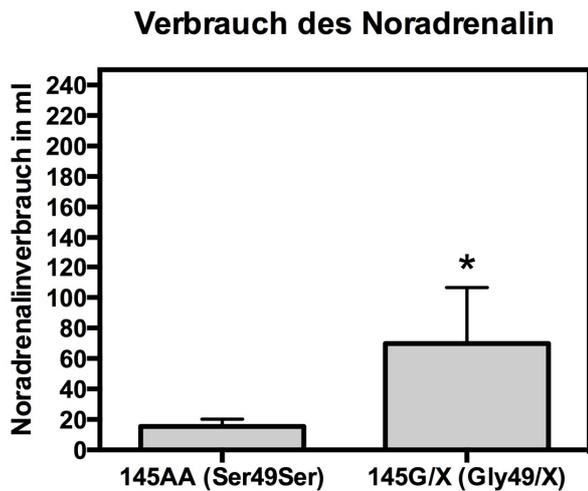
### 3.4.2 Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch

Trägt der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor Glycin an der 49sten Position, ist er affiner für Noradrenalin. Es ist außerdem eine stärkere Aktivierung der Adenylatcyclase nachweisbar (Levin et al. 2002).

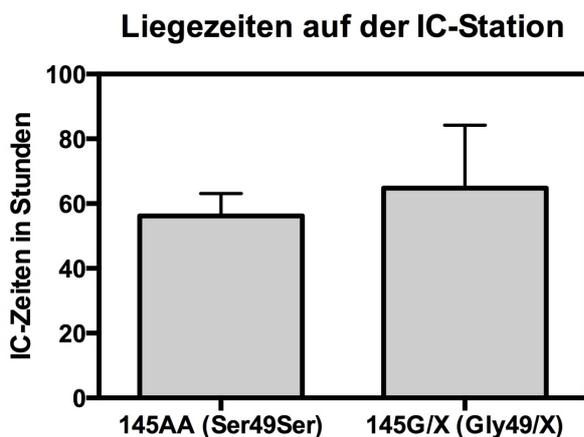
Die Patienten mit dem 145AA (Ser49Ser) haben im Mittel  $15,4 \pm 4,8$  ml an Noradrenalin während der intensivmedizinischen Überwachung erhalten. Dies ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) benötigten  $69,9 \pm 36,6$  ml. Die Ursache hierfür ist möglicherweise der unterschiedliche Euroscore gewesen ( $5,1 \pm 0,6$  für 145AA (Ser49Ser),  $7,4 \pm 1,9$  für 145G/X (Gly49/X)). Es hätte aber auch der Polymorphismus eine Auswirkung haben können.



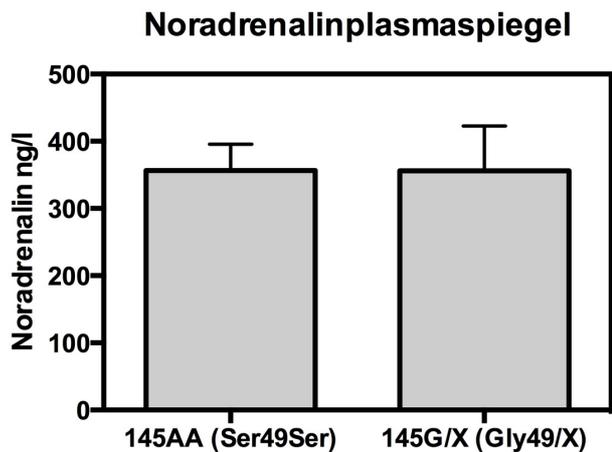
**Abbildung 3.10** Der Euroscore unterschied sich gering in den Genotypen. Die Patienten mit dem 145AA (Ser49Ser) wiesen ein präoperatives Risiko von  $5,1 \pm 0,6$  und die Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X)  $7,4 \pm 1,9$ .



**Abbildung 3.11** Der Noradrenalinverbrauch wurde signifikant vom dem 145 A>G (Ser49Gly)  $\beta$ 1-AR-Polymorphismus beeinflusst. \* $p < 0,05$  (Vgl. Tbl. 3.8 und 3.9). Die Patienten mit dem 145AA (Ser49Ser) verbrauchten im Mittel  $15,4 \pm 4,8$  ml und die Träger des 145G/X(Gly49/X)  $69,9 \pm 36,6$ ml.



**Abbildung 3.12** Die Liegezeiten auf der IC-Station unterschieden sich nicht signifikant in den 145A>G (Ser49Gly)  $\beta$ 1-AR-Polymorphismus-

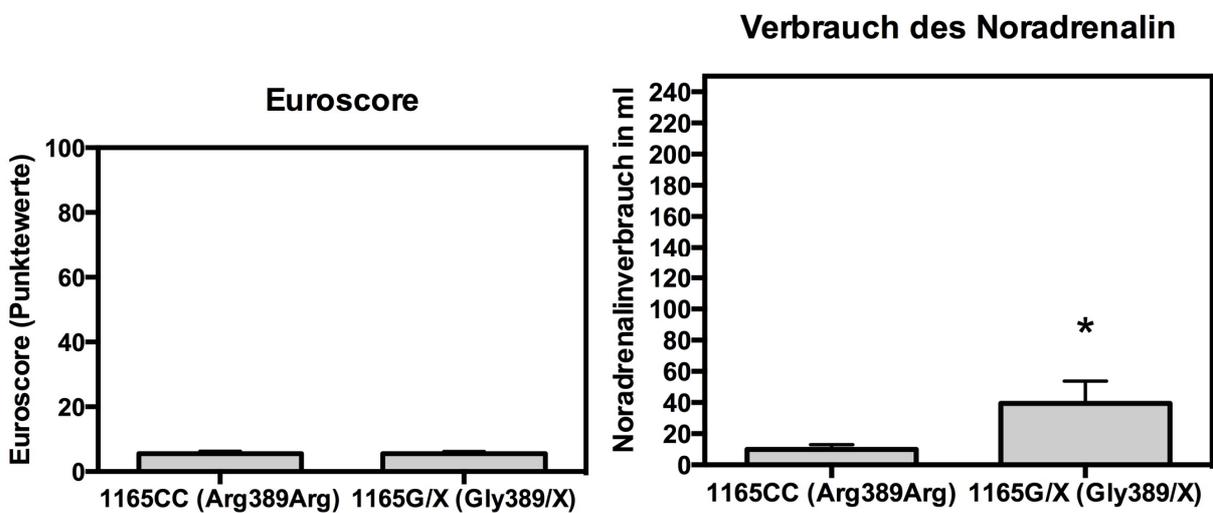


**Abbildung 3.13** Der präoperative Noradrenalinplasmaspiegel wurde nicht signifikant von dem 145A>G (Ser49Gly)  $\beta$ 1-AR-Polymorphismus beeinflusst.

### 3.4.3 Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch

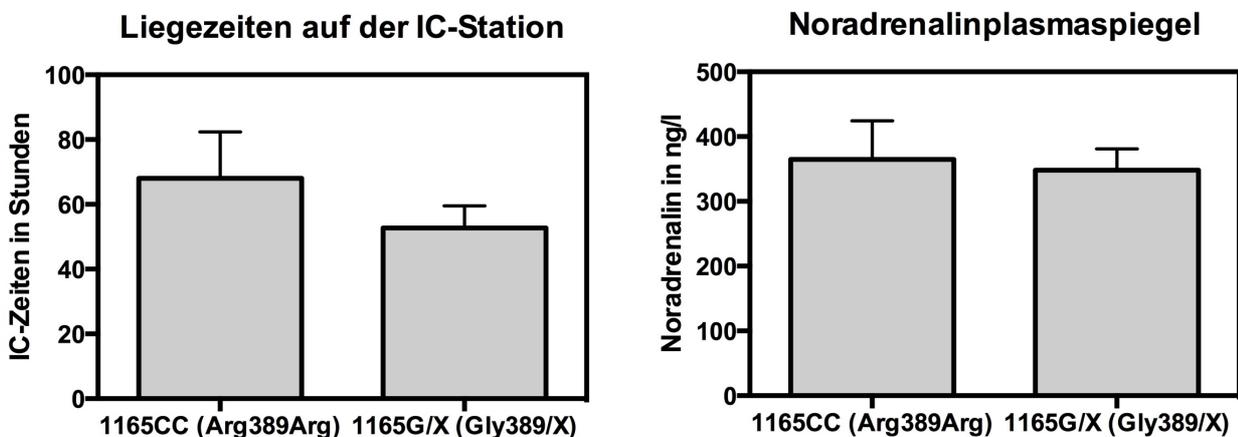
Der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus verursacht unterschiedliche Antworten auf eine agonistenbedingte Aktivierung. Bindet Noradrenalin an dem Arg389- $\beta$ 1-Adrenorezeptor, ist die Aktivität der Adenylylcyclase stärker als bei der Gly389-Variante (Mason et al. 1999). Daraus ergibt sich eine höhere Herzfrequenz und stärkere Zunahme des Blutdruckes (Humma et al. 2001).

Dieser Aspekt ist eine Erklärung für den Unterschied des Noradrenalinverbrauchs des Studienkollektivs. Die Abbildung 3.15 zeigt, dass das 1165CC (Arg389Arg) mit einer geringeren Noradrenalingabe von  $9,9 \pm 3,1$  ml assoziiert war und der Verbrauch des 1165G/X (Gly389/X) um das Vierfache erhöht war. Diesen Patienten wurden im Mittel  $39,4 \pm 14,3$  ml Noradrenalin verabreicht. Anders als bei dem 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus waren die individuellen Risiken bei 1165CC (Arg389Arg) und 1165G/X (Gly389/X) gleich (Euroscore von  $5,5 \pm 0,8$  für 1165CC (Arg389Arg), von  $5,5 \pm 0,7$  für 1165G/X (Gly389/X)). Demzufolge war eine 1165G>C (Arg389Gly) Beeinflussung wahrscheinlich.



**Abbildung 3.14** Der Euroscore war fast identisch. Die Patienten mit dem 1165CC (Arg389Arg) hatten ein operatives Risiko von  $5,5 \pm 0,8$  und die Patienten mit dem 1165G/X (Gly389/X)  $5,5 \pm 0,7$ .

**Abbildung 3.15** Der Noradrenalinverbrauch wurde signifikant von dem 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta$ 1-AR-Polymorphismus beeinflusst. \* $p < 0,05$ . Vgl Tbl. 3.8 und 3.9). Die Patienten mit dem 1165G/X (Gly389/X) verbrauchten mit  $39,4 \pm 14,3$  ml signifikant mehr Noradrenalin als die 1165CC (Arg389Arg) Träger mit  $9,9 \pm 3,1$  ml.



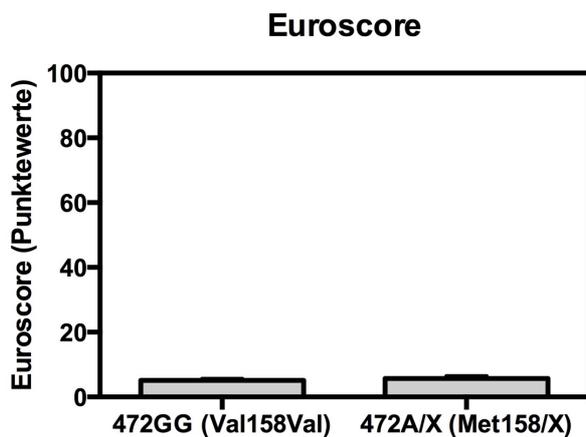
**Abbildung 3.16** Der 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta$ 1-AR-Polymorphismus beeinflusste nicht die Liegezeiten auf der IC-Station.

**Abbildung 3.17** Die präoperative Noradrenalinplasmakonzentration unterschied sich nicht in den Polymorphismusvarianten.

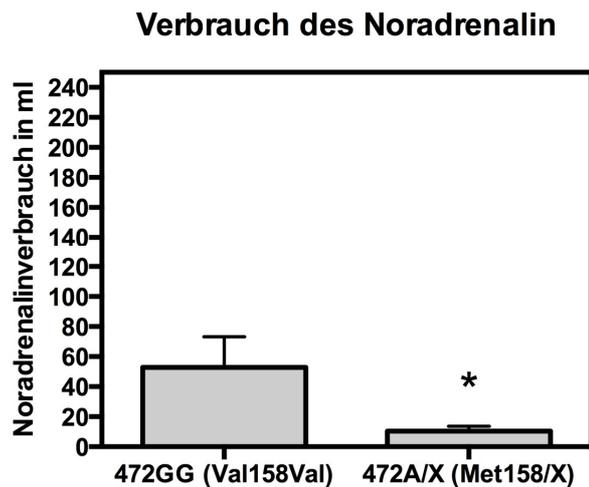
### 3.4.4 Einfluss des COMT-Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch

Die Aminosäure Valin wird durch die Aminosäure Methionin an der 158sten Position des Enzymproteins substituiert. Daraus resultiert eine drei- bis vierfach höhere Aktivität der Wildtypvariante (Lotta et al. 1995). Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in der Studie wider.

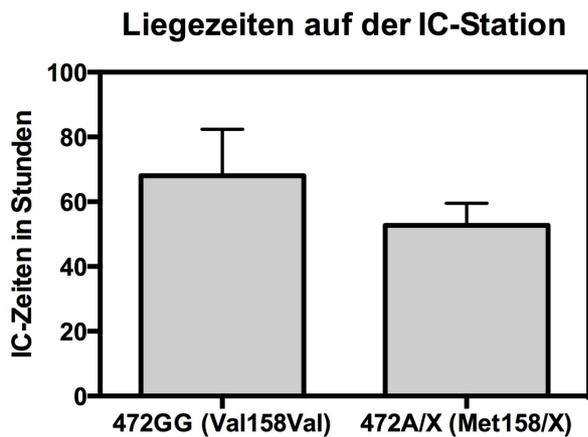
Die Patienten mit dem schnell metabolisierenden Enzym haben einen höheren Noradrenalinverbrauch als die Patienten mit der langsam metabolisierenden Variante gehabt. Dies wird in der Abbildung 3.19 dargestellt. Es ist erkennbar, dass das 472GG (Val158Val) mit einer Noradrenalingabe von  $52,9 \pm 20,4$  ml assoziiert war und der Verbrauch des 472A/X (Met158/X)  $10,3 \pm 3,4$  ml war. Das objektive Risiko der Patienten unterschied sich kaum. Der Euroscore betrug für die Träger des 472GG (Val158Val)  $5,1 \pm 0,6$  und für die Träger des 472A/X (Met158/X)  $5,7 \pm 0,8$ .



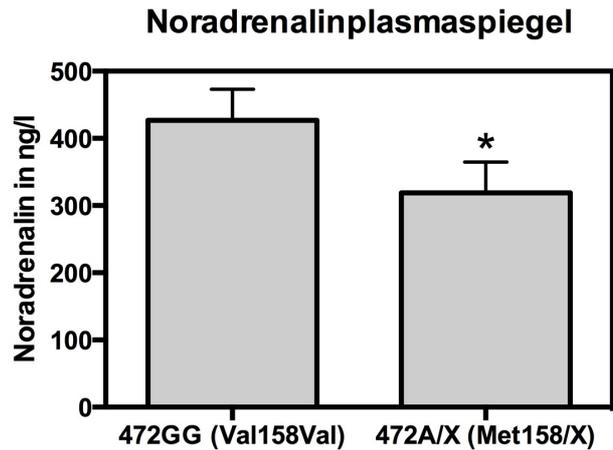
**Abbildung 3.18** Der Euroscore unterschied sich nicht zwischen dem 472GG (Val158Val) mit  $5,1 \pm 0,6$  und dem 472A/X (Met158/X) mit  $5,7 \pm 0,8$ .



**Abbildung 3.19** Der COMT-Polymorphismus beeinflusste signifikant den Verbrauch des Noradrenalin. \* $p < 0,05$  (Vgl. Tbl. 3.8 und 3.9). Die Patienten mit dem 472GG (Val158Val) benötigten  $52,9 \pm 20,4$  ml mehr als die Patienten mit dem 472A/X (Met158/X) ( $10,3 \pm 3,4$  ml).



**Abbildung 3.20** Die Liegezeiten auf der IC-Station wurden nicht von dem COMT-Polymorphismus beeinflusst.



**Abbildung 3.21** Der Noradrenalinplasmaspiegel präoperativ wurde signifikant von dem COMT-Polymorphismus beeinflusst. \* $p < 0,05$ . Das 472A/X (Met158/X) war mit einem geringeren Plasmaspiegel von  $280 \pm 24,6$  ng/l im Vergleich zu dem 472GG (Val158Val) mit  $412,2 \pm 44,9$  ng/l assoziiert.

### 3.4.5 Einfluss der Polymorphismen auf den Noradrenalinverbrauch unter Berücksichtigung des Euroscores

Der 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus beeinflusste signifikant den Verbrauch des Noradrenalins der Patienten. Mit einer Signifikanz von  $p = 0,001$  war ein deutlich höherer Noradrenalinbedarf bei Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) nachweisbar. Das 145AA (Ser49Ser) war demnach mit einem geringeren Noradrenalinbedarf von  $15,4 \pm 4,8$  ml verbunden. Das Vierfache haben somit die Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) erhalten.

Die Patienten, welche homozygot für 1165CC (Arg389Arg) waren, haben signifikant mehr Noradrenalin verabreicht bekommen als die Patienten mit dem 1165G/X (Gly389/X). Dieser Effekt stellte sich mit einer Signifikanz von  $p = 0,002$  dar.

Die Catechol-O-Methyltransferase, die homozygot für das 472GG (Val158Val) war, baute das verabreichte Catecholamin schnell ab, so dass sie mit einem signifikant höheren Noradrenalinbedarf assoziiert war ( $p < 0,001$ ). Es wurden im Mittel  $52,9 \pm 20,4$  ml bei Vorhanden sein der Val158Val-COMT verabreicht. Die Met158/X-enthaltene Catechol-O-Methyltransferase ging mit einem fünffach niedrigerem Noradrenalinverbrauch einher. Das ist in der Tabelle 3.8 zusammengefasst.

| unabhängige Variable              | Noradrenalinverbrauch |
|-----------------------------------|-----------------------|
| 145A>G (Ser49Gly) $\beta_1$ -AR   | $p = 0,001^*$         |
| 1165G>C (Arg389Gly) $\beta_1$ -AR | $p = 0,002^*$         |
| 472G>A (Val158Met) COMT           | $p < 0,001^*$         |

**Tabelle 3.8** Ergebnisse (p-Werte) der Interaktionen der  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und des COMT-Polymorphismus unter Berücksichtigung der Covariable Euroscore. Signifikanz  $p < 0,05^*$ . Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X), 1165G/X (Gly389/X) und dem 472GG (Val158Val) hatten einen signifikant erhöhten Noradrenalinverbrauch.

### 3.4.6 Einfluss der Polymorphismen auf den Noradrenalinverbrauch unter Berücksichtigung des hausinternen Risikomarkers

Unter Verwendung des hausinternen Risikomarkers als Covariate waren signifikante Zusammenhänge der drei Polymorphismen auf den Noradrenalinbedarf nachweisbar. Der 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus beeinflusste den Verbrauch des Noradrenalin mit einer Signifikanz von  $p = 0,005$ . Demzufolge wurde den 18 145G/X (Gly49/X) tragenden Patienten signifikant mehr Noradrenalin verabreicht als den 98 homozygoten 145AA (Ser49Ser) tragenden Patienten.

Trugen zudem die Patienten das 1165G/X (Gly389/X), so war ein signifikant geringerer Noradrenalinbedarf nachweislich ( $p = 0,001$ ). Der COMT-Polymorphismus beeinflusste in gleicher Weise den Verbrauch. Das 472GG (Val158Val) ging mit einem signifikant erhöhten Bedarf einher ( $p < 0,001$ ). Dies ist in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

| unabhängige Variable              | Noradrenalinverbrauch |
|-----------------------------------|-----------------------|
| 145A>G (Ser49Gly) $\beta_1$ -AR   | $p = 0,005^*$         |
| 1165G>C (Arg389Gly) $\beta_1$ -AR | $p = 0,001^*$         |
| 472G>A (Val158Met) COMT           | $p < 0,001^*$         |

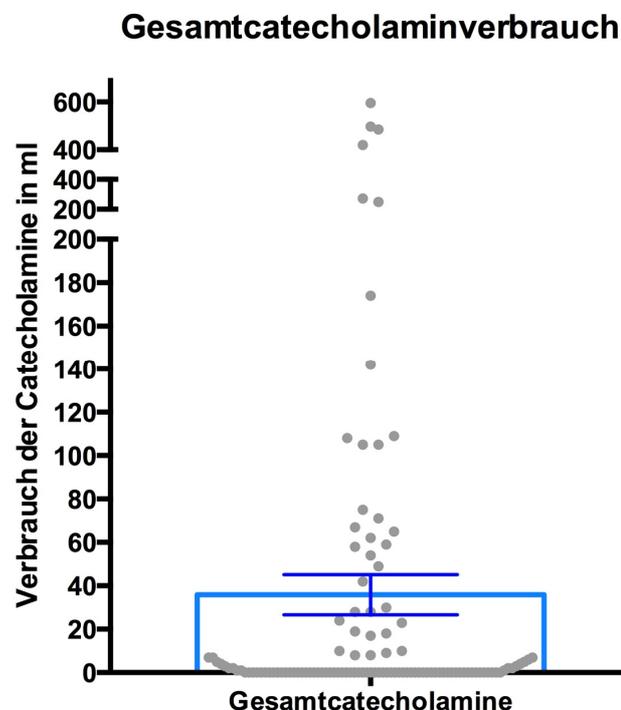
**Tabelle 3.9** Ergebnisse (p-Werte) der Interaktionen der  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und des COMT-Polymorphismus unter Berücksichtigung der Covariable mittlere ITS-Dauer der Patienten von 2007 bis 2011. Signifikanz  $p < 0,05^*$ . Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X), 1165G/X (Gly389/X) und dem 472GG (Val158Val) hatten einen signifikant erhöhten Bedarf an Noradrenalin.

### 3.5 Der postoperative Verbrauch von Catecholaminen

#### 3.5.1 Das gesamte Studienkollektiv

Nach dem operativen Eingriff ist die Kreislaufsituation oftmals instabil gewesen, so dass die Gabe von Catecholaminen nötig war. Eine wichtige Indikation hierfür ist zum Beispiel der zu starke Abfall des Blutdruckes gewesen. Es wurde Noradrenalin über einen Perfusor verabreicht. Hatte sich keine Besserung eingestellt, hat der Patient zusätzlich Dobutamin oder Adrenalin erhalten.

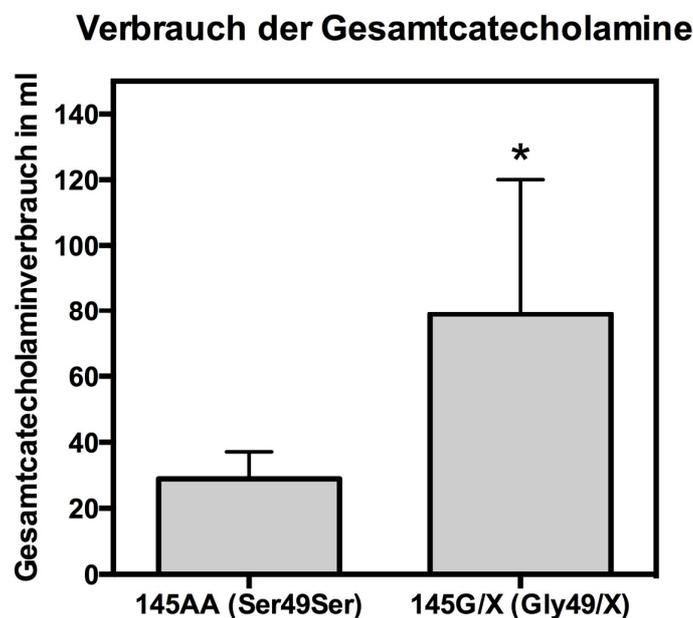
44,8% der Patienten bekamen die Catecholamine Noradrenalin und/ oder Adrenalin infundiert. Darunter sind vier Probanden gewesen, welche zusätzlich Dopamin oder Dobutamin verabreicht bekamen. Der Catecholaminverbrauch ist in Milliliter angegeben, welche in einem Perfusor mit der Konzentration von 3mg/50ml beziehungsweise das Dobutamin mit 5mg/ml und das Dopamin mit 250mg/50ml appliziert wurden. Das Diagramm 3.22 bildet die stark variable Catecholaminpflichtigkeit des Studienkollektivs ab. 55,2% der Studienteilnehmer haben diese medikamentöse Unterstützung des Kreislaufs nicht benötigt. Es wurden maximal 596 ml und im Durchschnitt  $36,6 \pm 9,4$  ml verabreicht.



**Abbildung 3.22** Die Catecholaminpflichtigkeit variierte in dem Studienkollektiv. Es war ein mittlerer Verbrauch von  $36,6 \pm 9,4$  ml erkennbar, die maximale Gabe erstreckte sich bis auf 596 ml. 55,2 % erhielten keine kreislaufunterstützende Medikation

### 3.5.2 Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf den gesamten Catecholaminbedarf

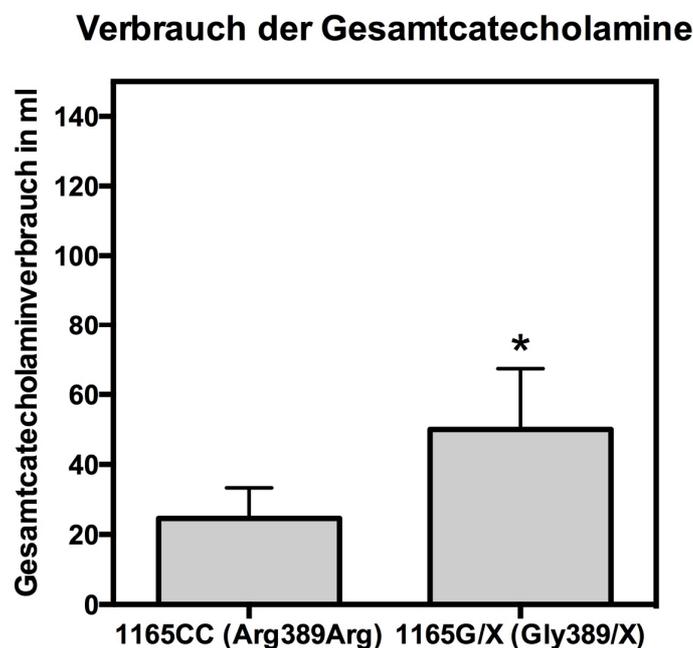
Während der postoperativen Überwachung haben die Patienten neben Noradrenalin weitere Catecholamine erhalten. Unter Berücksichtigung des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus war ein Unterschied zwischen den Allel-Varianten erkennbar. Die Patienten, welche das 145AA (Ser49Ser) besaßen, haben einen geringeren Gesamtcatecholaminverbrauch als die Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) gehabt. So ist es auch in der Abbildung 3.23 dargestellt. Der mittlere Bedarf der homozygoten serintragenden (145AA) Probanden lag bei  $28,9 \pm 8,2$  ml und der der glycintragenden Probanden (145G/X) bei  $78,9 \pm 41,2$  ml. Demzufolge war eine Differenz von 50 ml zwischen den beiden Probandengruppen zu verzeichnen. Jedoch war zu berücksichtigen, dass der Euroscore zwischen den Allel-Varianten leicht schwankte. Die Patienten mit dem 145AA (Ser49Ser) haben einen geringeren Risikofaktor ( $5,1 \pm 0,6$ ) als die Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) ( $7,4 \pm 1,9$ ) gehabt. Dies konnte eine Ursache für die Differenz des Verbrauchs gewesen sein.



**Abbildung 3.23** Es ist eine Differenz der Gesamtcatecholamingabe erkennbar. Das 145AA (Ser49Ser) ist mit einem signifikant niedrigeren Verbrauch von  $28,9 \pm 8,2$  ml dargestellt. Das 145G/X (Gly49/X) ging mit einem höheren Bedarf von  $78,9 \pm 41,2$  ml einher. \* $p < 0,05$  (Vgl. Tbl. 3.10).

### 3.5.3 Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf den gesamten Catecholaminbedarf

Der gesamte Catecholaminbedarf unterschied sich zwischen den homozygoten 1165CC (Arg389Arg) und den 1165G/X (Gly389/X) tragenden Patienten. Das 1165G/X (Gly389/X) ging mit einem signifikant höheren Verbrauch einher. Außerdem war das Risikoprofil nahezu gleich. Wie in der Abbildung 3.24 veranschaulicht, ist der mittlere Bedarf der 1165CC (Arg389Arg) Patienten  $24,6 \pm 8,7$  ml gewesen. Die Träger des 1165G/X (Gly389/X) benötigten durchschnittlich  $50 \pm 17,4$  ml.

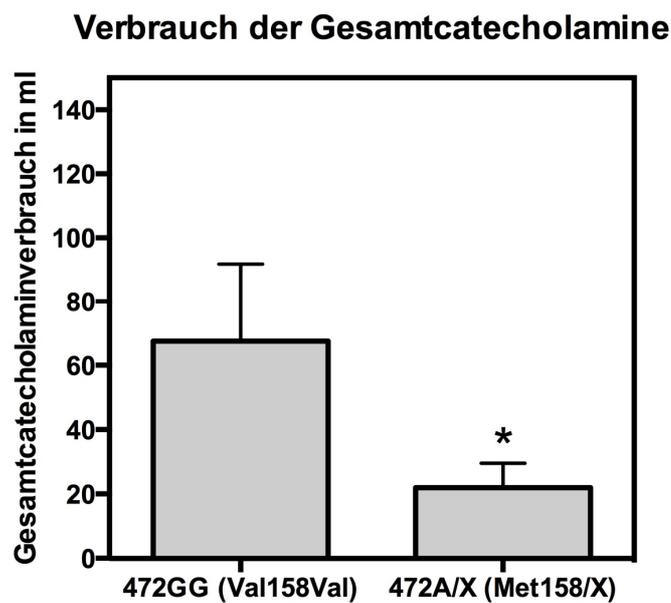


**Abbildung 3.24** Der summierte Catecholaminverbrauch unterschied sich in dem 1165CC (Arg389Arg) und dem 1165G/X (Gly389/X) signifikant. Das 1165CC (Arg389Arg) war mit einem Bedarf von  $24,6 \pm 8,7$  ml und das 1165G/X (Gly389/X) mit einem Verbrauch von  $50 \pm 17,4$  ml verbunden. \* $p < 0,05$  (Vgl. Tbl. 3.10 und 3.11)

### 3.5.4 Einfluss des COMT-Polymorphismus auf den gesamten Catecholaminbedarf

Eine Abhängigkeit des COMT-Polymorphismus auf den Noradrenalinabbau war signifikant nachweisbar. Die Studienteilnehmer haben allerdings zusätzlich Adrenalin, Dopamin und Dobutamin erhalten. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Enzymaktivitäten ist ein Unterschied von 45 ml in der Abbildung 3.25 erkennbar. Die

Patienten mit der schnell metabolisierenden 472GG (Val158Val) Catechol-O-Methyltransferase haben einen mittleren Catecholaminbedarf von  $67,6 \pm 24,3$  ml gehabt. Das Met158/X(472A/X)-enthaltene Enzym ist mit einem geringeren Verbrauch von  $22,1 \pm 7,6$  ml assoziiert gewesen. Der Euroscore unterschied sich lediglich um 0,6 Punkte. Die 472GG (Val158Val) COMT ist mit einem Risikofaktor von  $5,1 \pm 0,6$  verbunden gewesen und die 472A/X (Met158/X) COMT mit einem Faktor von  $5,7 \pm 0,8$ .



**Abbildung 3.25** Es ist eine signifikante Differenz zwischen den COMT-Varianten erkennbar. Der gesamte Catecholaminbedarf war  $67,6 \pm 24,3$  ml für das 472GG (Val158Val) und  $22,1 \pm 7,6$  ml für das 472A/X (Met158/X). \* $p < 0,05$  (Vgl. Tbl. 3.10 und 3.11).

### 3.5.5 Abhängigkeit des Catecholaminverbrauchs von den Polymorphismen unter Berücksichtigung des Euroscores

Eine signifikante Abhängigkeit der gegenseitigen Beeinflussung der Polymorphismen auf den Noradrenalinverbrauch konnte mittels Covarianzanalyse festgestellt werden. Ebenso verhielt sich mit dem gesamten Catecholaminverbrauch. Es waren für die drei Polymorphismen signifikante Beeinflussungen nachweisbar ( $p < 0,05$ ). Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X), dem 1165G/X (Gly389/X) oder dem 472GG (Val158Val) verbrauchten mehr Catecholamine als Patienten mit dem 145AA (Ser49Ser), 1165CC (Arg389Arg) oder dem 472A/X (Met158/X). Die Signifikanzen sind in der Tabelle 3.10 dargestellt.

| unabhängige Variable              | gesamter Catecholaminverbrauch |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 145A>G (Ser49Gly) $\beta_1$ -AR   | p = 0,03*                      |
| 1165G>C (Arg389Gly) $\beta_1$ -AR | p = 0,015*                     |
| 472G>A (Val158Met) COMT           | p < 0,001*                     |

**Tabelle 3.10** Ergebnisse (p-Werte) der Interaktionen der  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und des COMT-Polymorphismus unter Berücksichtigung der Covariable Euroscore. Signifikanz p < 0,05\*. Es stellten sich signifikante Einflüsse der drei Polymorphismen auf den Gesamtcatecholaminverbrauch ein.

### 3.5.6 Abhängigkeit des Catecholaminverbrauchs von den Polymorphismen unter Berücksichtigung des hausinternen Risikomarkers

Unter Verwendung des hausinternen Risikomarkers als Covariate waren ebenfalls signifikante Abhängigkeiten des 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptor- und des 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismen nachweisbar. Die Signifikanzen sind in der Tabelle 3.11 dargestellt.

Es war keine signifikante Beeinflussung des 145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus auf den gesamten Catecholaminbedarf nachweisbar.

Mit einer Signifikanz von p = 0,011 war der Gesamtcatecholaminbedarf der 1165G/X (Gly389/X) tragenden Patienten höher als der 1165CC (Arg389Arg) tragenden Patienten.

Die 472GG (Val158Val) enthaltene COMT ging mit einem signifikant höheren Bedarf als die 472A/X (Met158/X) enthaltene COMT (p < 0,001).

| unabhängige Variable              | gesamter Catecholaminverbrauch |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 145A>G (Ser49Gly) $\beta_1$ -AR   | p = 0,138                      |
| 1165G>C (Arg389Gly) $\beta_1$ -AR | p = 0,011*                     |
| 472G>A (Val158Met) COMT           | p < 0,001*                     |

**Tabelle 3.11** Ergebnisse (p-Werte) der Interaktionen der  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und des COMT-Polymorphismus unter Berücksichtigung der Covariable mittlere ITS-Dauer der Patienten von 2007 bis 2011. Signifikanz p < 0,05\*. Patienten mit dem 1165G/X (Gly389/X) oder dem 472GG (Val158Val) verbrauchten mehr Gesamtcatecholamine. Der 145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus hatte keinen Einfluss.

### **3.6 Die Konzentrationen des Adrenalins und Noradrenalins im Patientenplasma**

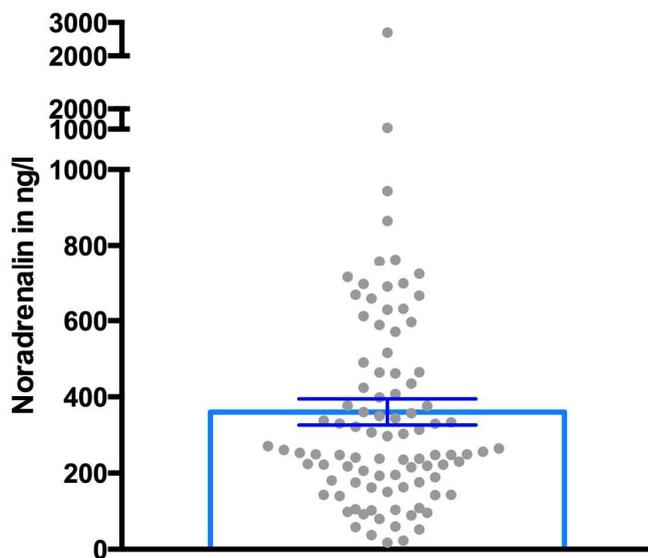
#### **3.6.1 Das gesamte Studienkollektiv**

Alle Studienteilnehmer haben eine grundlegende Herzerkrankung gehabt, wobei 32,8% der Patienten an einer Herzinsuffizienz Grad 3 bis 4 nach NYHA gelitten haben. Es besteht eine stärkere sympathische Innervation bei Vorliegen einer chronischen Herzinsuffizienz (Francis und Cohn 1986). Der Noradrenalinplasmaspiegel kann auf Werte bis zu 1300 ng/l ansteigen (Cohn et al. 1984).

Die Bestimmung des Noradrenalinpiegels ist mit der HPLC erfolgt, allerdings sind 22 Patientenplasmen aufgrund von Hämolyse nicht auswertbar gewesen. Die verbleibenden Proben haben eine mittlere Plasmakonzentration von  $350 \pm 33,7$  ng/l ergeben. Der Referenzbereich des Noradrenalins liegt jedoch zwischen 185 bis 275 ng/l (L.Thomas, 1988). Demzufolge war eine deutliche Erhöhung erkennbar. 44 Patienten haben einen über dem Referenzbereich liegenden Plasmaspiegel gehabt. Die Abbildung 3.26 stellt die Verteilung auf das Patientenkollektiv dar. Es ist erkennbar, dass sich das Maximum bis auf 2695 ng/l erstreckt. Für diesen Wert ließ sich allerdings eine präoperative Catecholamingabe der Anästhesisten nicht völlig ausschließen.

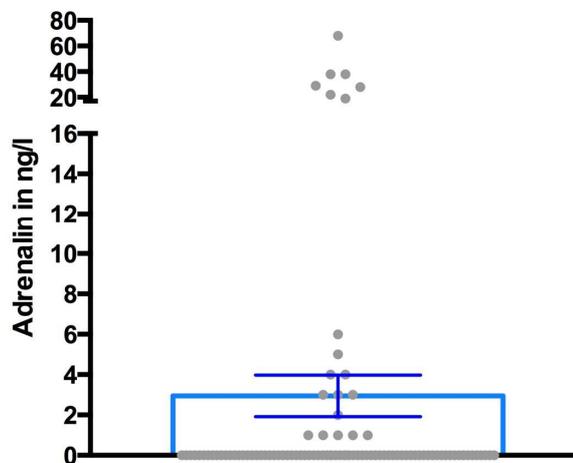
Die Messung des Adrenalinspiegels wurde ebenfalls mit der HPLC durchgeführt. Eine eindeutige Adrenalinbestimmung ist lediglich in 13 Proben möglich gewesen. Die Verteilung des Plasmaspiegels wird in Abbildung 3.27 wiedergegeben. Die ausgewerteten Konzentrationen haben sich von 1 bis 68 ng/l erstreckt. Der Referenzbereich wird zwischen 30 bis 85 ng/l (L. Thomas, 1988) angegeben. Demzufolge war die mittlere Adrenalinkonzentration von  $3,2 \pm 1$  ng/l unter dem Grenzbereich einzuordnen.

### Noradrenalinplasmaspiegel



**Abbildung 3.26** Der Noradrenalinpiegel variierte im Patientenkollektiv. Es wurde ein mittlerer Spiegel von  $350 \pm 33,7$  ng/l ermittelt. Die höchste Konzentration betrug 2695 ng/l.

### Adrenalinplasmaspiegel



**Abbildung 3.27** Die Verteilung des Adrenalinpiegels differiert in dem Patientenkollektiv. Die durchschnittliche Konzentration lag bei  $3,2 \pm 1$  ng/l, die Maximale bei 68 ng/l.

### 3.6.2 Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf die Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel

Es ist kein Unterschied zwischen den Allel-Varianten in der Adrenalin- und Noradrenalinplasmakonzentration in den Abbildungen 3.13 und 3.28 zu erkennen. Die Patienten mit dem 145AA (Ser49Ser) haben eine mittlere Konzentration von  $323,1 \pm 24,8$  ng/l und die mit dem 145G/X (Gly49/X) eine durchschnittliche Konzentration von  $356,1 \pm 66,8$  ng/l gehabt. Die Adrenalinplasmaspiegel zeigten eine mittlere Konzentration von  $3,1 \pm 1,2$  ng/l bei dem 145AA (Ser49Ser) und  $4,1 \pm 2,7$  ng/l bei dem 145G/X (Gly49/X).

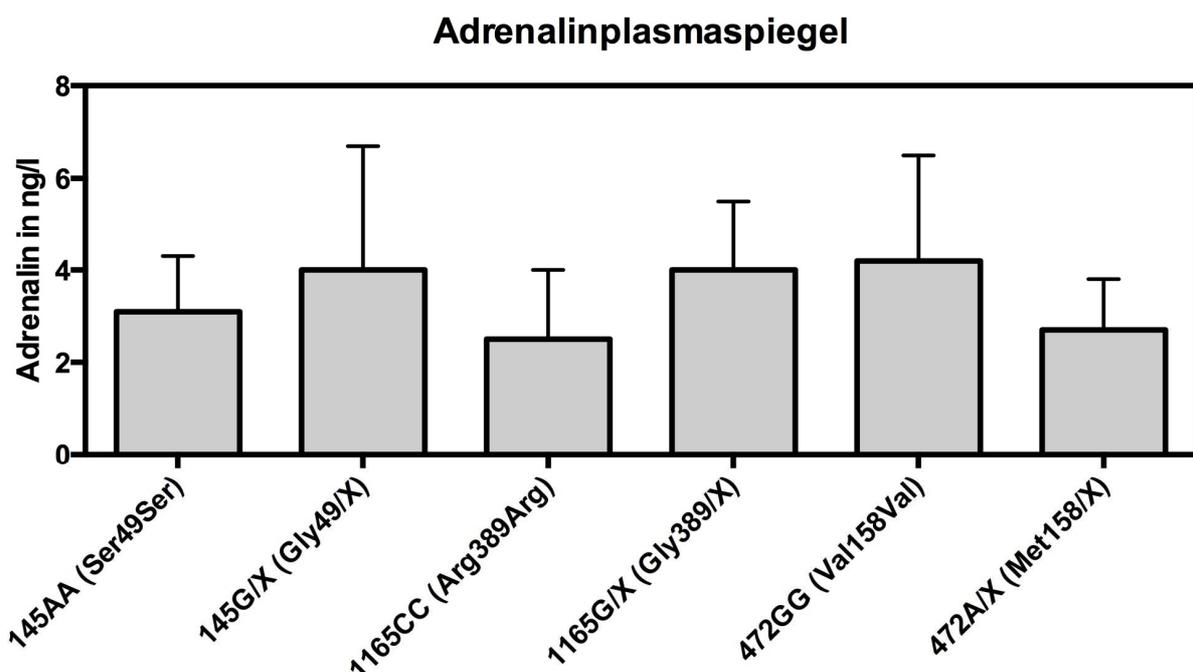
### 3.6.3 Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel

Es war keine eindeutige Diskrepanz des Noradrenalinplasmaspiegels zwischen dem 1165CC (Arg389Arg) und dem 1165G/X (Gly389/X) nachweisbar. Anders verhielt es sich mit der AdrenalinKonzentration. Die Abbildungen 3.17 und 3.28 stellen die

Zusammenhänge der beiden Catecholamine dar. Die Patienten, welche das 1165CC (Arg389Arg) enthielten, haben eine mittlere Konzentration von  $2,5 \pm 1,5$  ng/l gehabt. Die 1165G/X (Gly389/X) war mit einer durchschnittlichen Konzentration von  $4 \pm 1,5$  ng/l verbunden. Zudem war kein Unterschied zwischen den Risikofaktoren nachweisbar. Eine statistische Signifikanz lag jedoch nicht vor ( $p > 0,05$ ).

### 3.6.4 Einfluss des COMT-Polymorphismus auf die Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel

Der Polymorphismus der Catechol-O-Methyltransferase schien die Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel, wie in den Abbildungen 3.21 und 3.28 dargestellt, zu beeinflussen. Es war auffällig, dass die schnell metabolisierende COMT mit einem signifikant höheren Noradrenalinplasmaspiegel von  $412,2 \pm 44,9$  ng/l assoziiert war. Die weniger aktive Enzymvariante ging mit einer niedrigeren mittleren Konzentration von  $280 \pm 24,6$  ng/l einher. Dieser Einfluss war mit  $p = 0,005$  signifikant. Der Euroscore unterschied sich lediglich um 0,3 Punktwerte. Der präoperative Adrenalinplasmaspiegel der 472GG (Val158Val) COMT betrug im Mittel  $4 \pm 2,2$  ng/l. Er war nicht signifikant höher als bei der 472A/X (Met158/X) COMT mit einer mittleren Konzentration von  $2,8 \pm 1,1$  ng/l.



**Abbildung 3.28** Der mittlere Adrenalinplasmaspiegel unterschied sich nicht signifikant zwischen den drei Polymorphismen.

### **3.6.5 Abhängigkeiten der Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel von den Polymorphismen unter Berücksichtigung des Euroscores**

Es hat sich kein signifikanter Zusammenhang der  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen mit den Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel nachweisen lassen ( $p > 0,05$ ). Allein der COMT-Polymorphismus beeinflusste den präoperativen Noradrenalinplasmaspiegel signifikant ( $p = 0,003$ ). Das 472GG (Val158Val) war mit einer signifikant höheren Konzentration assoziiert.

### **3.6.6 Abhängigkeiten der Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel von den Polymorphismen unter Berücksichtigung des hausinternen Risikomarkers**

Unter Verwendung des hausinternen Risikomarkers als Covariable sind keine signifikanten Abhängigkeiten zwischen den  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und den Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegeln erkennbar gewesen ( $p > 0,05$ ). Der COMT-Polymorphismus ging mit einer signifikanten Abhängigkeit auf den Noradrenalinplasmaspiegel einher. Demzufolge war die mittlere Konzentration des 472GG (Val158Val) signifikant höher ( $p = 0,002$ ).

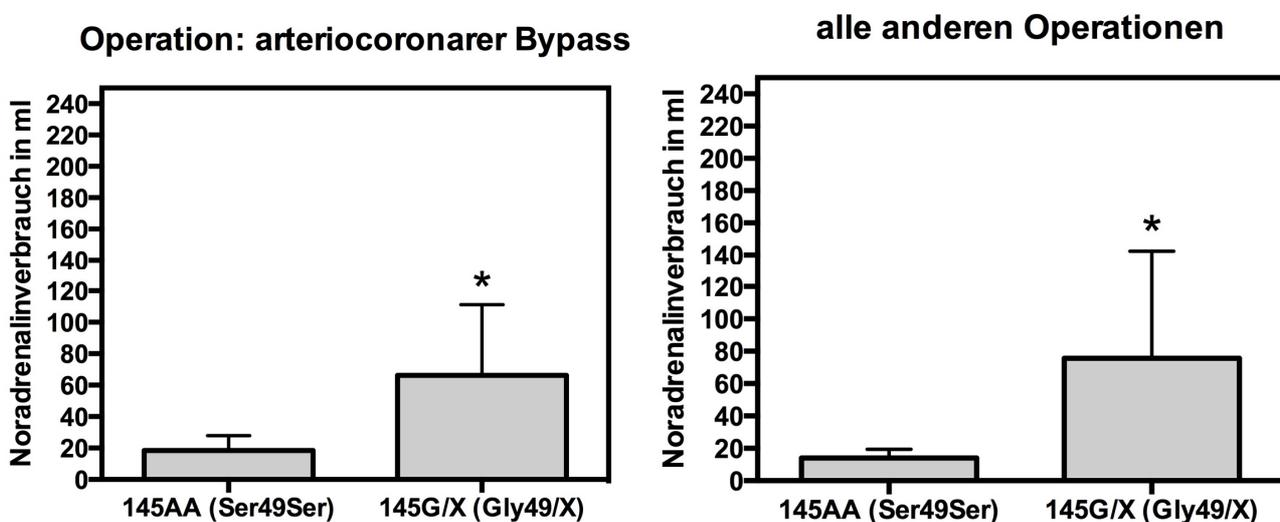
### **3.7 Einfluss anderer Faktoren auf die Polymorphismusabhängigkeiten**

Es konnten signifikante Abhängigkeiten der 3 Polymorphismen mit dem Noradrenalinverbrauch, Gesamtcatecholaminverbrauch, dem Aufenthalt im Krankenhaus und dem Noradrenalinplasmaspiegel nachgewiesen werden. Jedoch war es wichtig andere Faktoren, die die Ergebnisse der Studie beeinflussen könnten, nicht zu vernachlässigen. Zu diesen Faktoren zählten die Operationsart (siehe Tabelle 3.4) und auch die präoperative Gabe von  $\beta$ -Blockern. Um eine derartige Beeinflussung auszuschließen wurden die Patienten, welche sich einem arteriocroronaren Bypass unterzogen ( $n = 43$ ), von den Patienten, die eine andere Operation als den Bypass erhielten ( $n = 73$ ) differenziert. Die beiden Patientengruppen unterschieden sich jedoch nicht in dem Verbrauch des Noradrenalin, der Gesamtcatecholamine, dem Noradrenalinplasmaspiegel oder dem EuroSCORE.

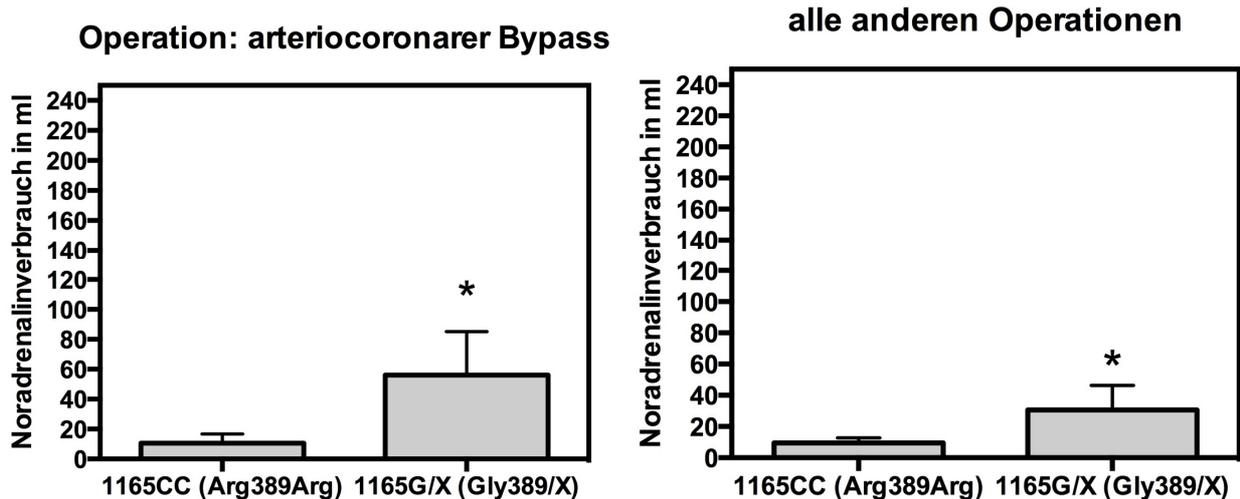
Die Abhängigkeiten der Polymorphismusvarianten auf den Noradrenalinverbrauch waren auch in der Gruppe des arteriocroronaren Bypasses und in der Gruppe aller

anderen Operationen präsent. Die Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) benötigten signifikant mehr Noradrenalin zur Aufrechterhaltung der Herz-Kreislauf-Funktion als die Träger mit dem 145AA (Ser49Ser) (siehe Abbildung 3.29). Dieser Effekt war sowohl bei den Patienten, welche einen arteri coronaren Bypass erhielten, nachweisbar als auch bei den Patienten, die sich einer anderen Operation als den Bypass unterzogen.

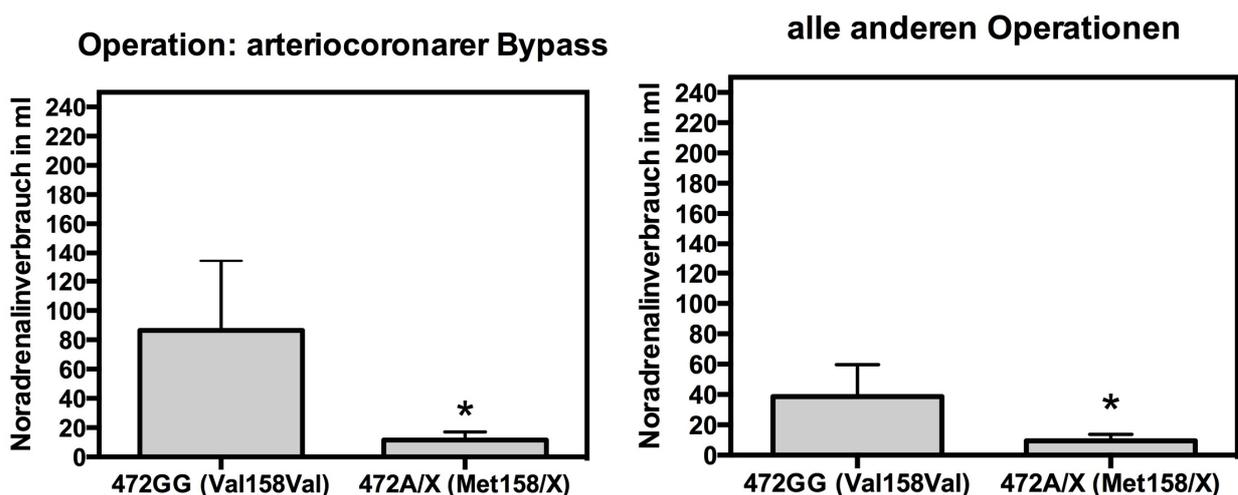
Ebenso verhielt es sich bei den Trägern des 1165CC (Arg389Arg) und des 1165G/X (Gly389/X) (Vergleich Abbildung 3.30). Der Noradrenalinverbrauch des 1165G/X (Gly389/X) war signifikant höher sowohl bei den Bypassoperationen als auch bei allen anderen Eingriffen. Es konnte ebenfalls der Effekt des COMT-Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch in den beiden Operationsgruppen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.31). Die Patienten mit dem 472A/X (Met158/X) benötigten signifikant weniger Noradrenalin als die 472GG (Val158Val) Träger.



**Abbildung 3.29** Der Noradrenalinverbrauch wurde signifikant von dem 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus beeinflusst. Die Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) benötigten mehr Noradrenalin als die 145AA (Ser49Ser) Träger. Dieser Effekt lag sowohl bei den Patienten, die einen arteri coronaren Bypass erhielten, als auch bei den Patienten, die sich einer anderen Operation unterzogen, vor (\*p < 0,05).



**Abbildung 3.30** Der Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch lag sowohl bei den Patienten mit dem arteriocroronaren Bypass als auch bei den Patienten, die eine andere Operation erhielten, vor. Die Patienten mit dem 1165G/X (Gly389/X) benötigten signifikant mehr Noradrenalin als die Träger mit dem 1165CC (Arg389Arg) (\*p < 0,05).



**Abbildung 3.31** Der COMT-Polymorphiseinfluss auf die Gabe von Noradrenalin lag sowohl bei den Patienten mit einem Bypass als auch bei den Patienten mit einer anderen Operation vor. Die Träger des 472A/X (Met158/X) verbrauchten weniger Noradrenalin als die des 472GG (Val158Val) (\*p < 0,05).

Die Antagonisierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren könnte ebenfalls ein wichtiger Einflussfaktor unserer Studienergebnisse sein. Aus diesem Grund unterschieden wir die Patienten, die präoperativ eine  $\beta$ -Blockertherapie erhielten (n = 61), von denen, die keine  $\beta$ -Blocker einnahmen (n = 55). Es konnte jedoch kein Unterschied im Noradrenalinverbrauch, der IC-Verweildauer und des EuroSCOREs zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die meisten Patienten nahmen vor der Operation Metoprolol in einer Tagesdosis von 47,5 mg ein.

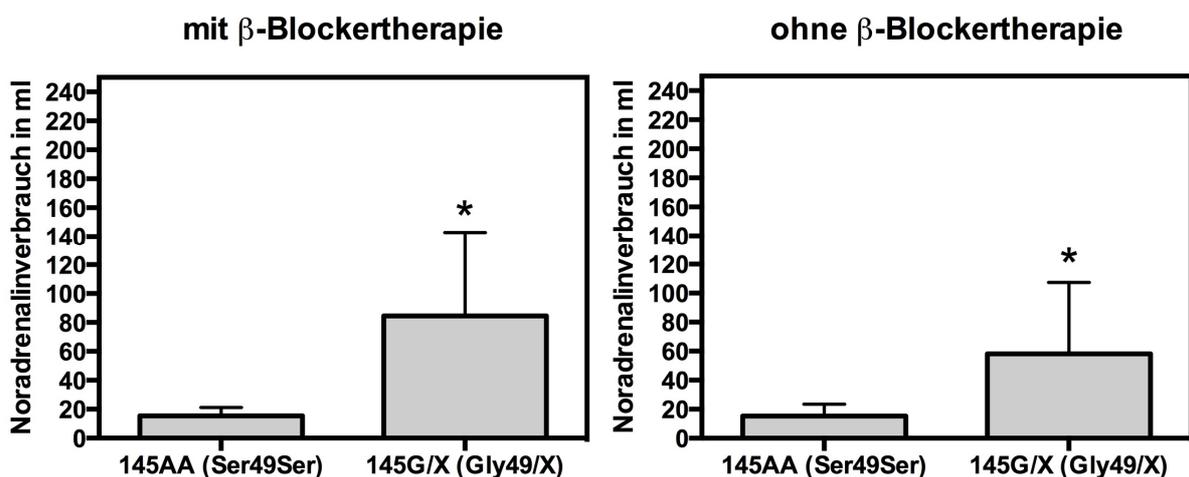
Die Effekte der  $\beta_1$ -Arenorezeptorpolymorphismen und des COMT-Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch waren sowohl bei den Patienten, die  $\beta$ -Blocker

einnahmen, als auch bei den Patienten, die keine  $\beta$ -Blocker erhielten, nachweisbar. Demzufolge zeigte sich bei Vorhanden sein des 145G/X (Gly49/X) ein signifikant höherer Noradrenalinverbrauch bei Patienten sowohl mit  $\beta$ -Blockade als auch bei Patienten ohne  $\beta$ -Blockade. Dies ist in der Abbildung 3.32 dargestellt.

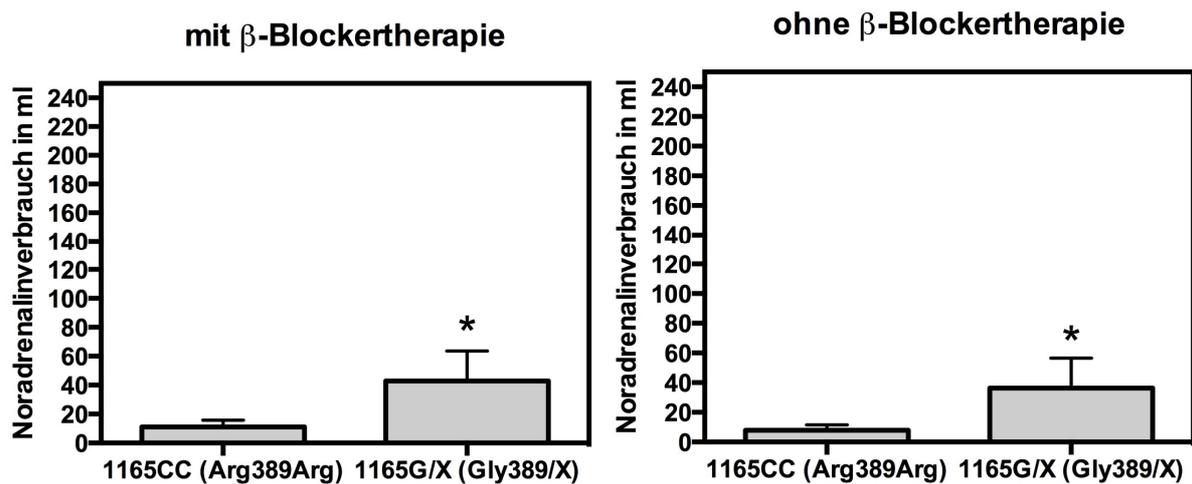
Der Effekt des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Noradrenalingabe unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Patienten mit  $\beta$ -Blockertherapie und den Patienten ohne  $\beta$ -Blockereinnahme (Vergleich Abbildung 3.33). Lag das 1165G>C (Gly389/X) vor, so war die Verabreichung von Noradrenalin signifikant höher.

Der 472G>A (Val158Met) Polymorphismus behielt ebenfalls seinen Einfluss auf den Noradrenalinverbrauch (siehe Abbildung 3.34). Die Anwesenheit des 472A/X (Met158/X) ging mit einer signifikant niedrigeren Noradrenalingabe einher sowohl bei den Patienten unter präoperativer  $\beta$ -Blockergabe als auch bei Patienten ohne  $\beta$ -Blockade.

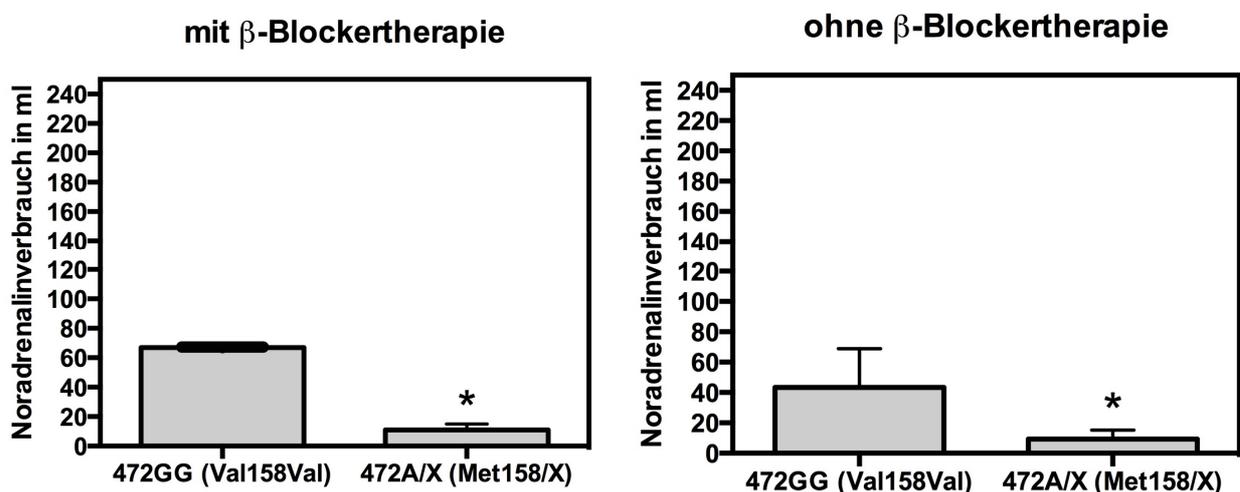
Betrachtete man den präoperativen Noradrenalinplasmaspiegel, so konnte bei den Patienten mit  $\beta$ -Blockade ein niedrigerer, jedoch nicht signifikanter, Plasmaspiegel festgestellt werden ( $p = 0,124$ ).



**Abbildung 3.32** Der Einfluss des 145A>G (Ser49Gly) Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch war sowohl bei den Patienten mit  $\beta$ -Blockertherapie als auch bei den Patienten ohne  $\beta$ -Blockade nachweisbar (\* $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3.33** Der 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus beeinflusste signifikant den Noradrenalinverbrauch der Patienten, dieser Effekt war bei den Patienten mit  $\beta$ -Blockade und ohne  $\beta$ -Blockertherapie nachweisbar (\* $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3.34** Es zeigte sich kein Unterschied in der Gabe von  $\beta$ -Blockern oder der fehlenden Verabreichung des Medikamentes, was den Einfluss des COMT-Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch betraf (\* $p < 0,05$ ).

### 3.8 Einflüsse der SNP-Kombinationen auf den postoperativen Verlauf

Zuvor wurden die Einflüsse der drei Polymorphismen auf den postoperativen Verlauf im Einzelnen betrachtet. Es zeigten sich bezüglich der Liegezeiten, des postoperativen Noradrenalinverbrauchs, des postoperativen Gesamtcatecholaminbedarfs und des präoperativen Noradrenalinplasmaspiegels signifikante Abhängigkeiten. Im menschlichen Organismus liegen die drei Polymorphismen jedoch in Wechselwirkung zueinander beziehungsweise gemeinsam vor. Aus diesem Grund ist die Betrachtung der Auswirkung der Kombinationen der Polymorphismusvarianten zueinander wichtig.

Es wurden 12 Kombinationsvarianten berücksichtigt. Aufgrund des Fehlens des homozygoten 145AA (Gly49Gly) wurde wieder das Gly49/X, sowohl für den homozygoten 145AA (Gly49Gly) als auch für den heterozygoten 145AG (Ser49Gly) Genotypen verwendet. Dementsprechend wählten wir auch wieder das Gly389/X zusammenfassend für den homozygoten 1165GG (Gly389Gly) und für den heterozygoten 1165CG (Arg389Gly) Genotypen. Anders verhielt es sich mit dem 472GA (Val158Met) COMT-Polymorphismus. Aufgrund der unterschiedlichen Enzymaktivitäten des 472GG (Val158Val), des 472GA (Val158Met) und des 472 AA (Met158Met) und der differenten Verteilung in unserem Patientenkollektiv im Vergleich zur Normalbevölkerung unterschieden wir diese voneinander in der Kombinationsbetrachtung.

### **3.8.1 Einfluss der SNP-Kombinationen auf die Liegezeiten**

Die Liegezeiten der Patienten auf der Intensivstation unterschieden sich kaum in den SNP-Kombinationen. Wie in der Abbildung 3.35 erkennbar, waren die meisten Patienten weniger als 200 Stunden auf dieser Station. Ausnahmen waren Patienten mit den folgenden SNP-Kombinationen

145AA1165CC472GA (Ser49SerArg389ArgVal158Met),  
145AA1165G/X472GA (Ser49SerGly389/XVal158Met),  
145AA1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) und  
145AA1165G/X472AA (Ser49SerGly389/XMet158Met).

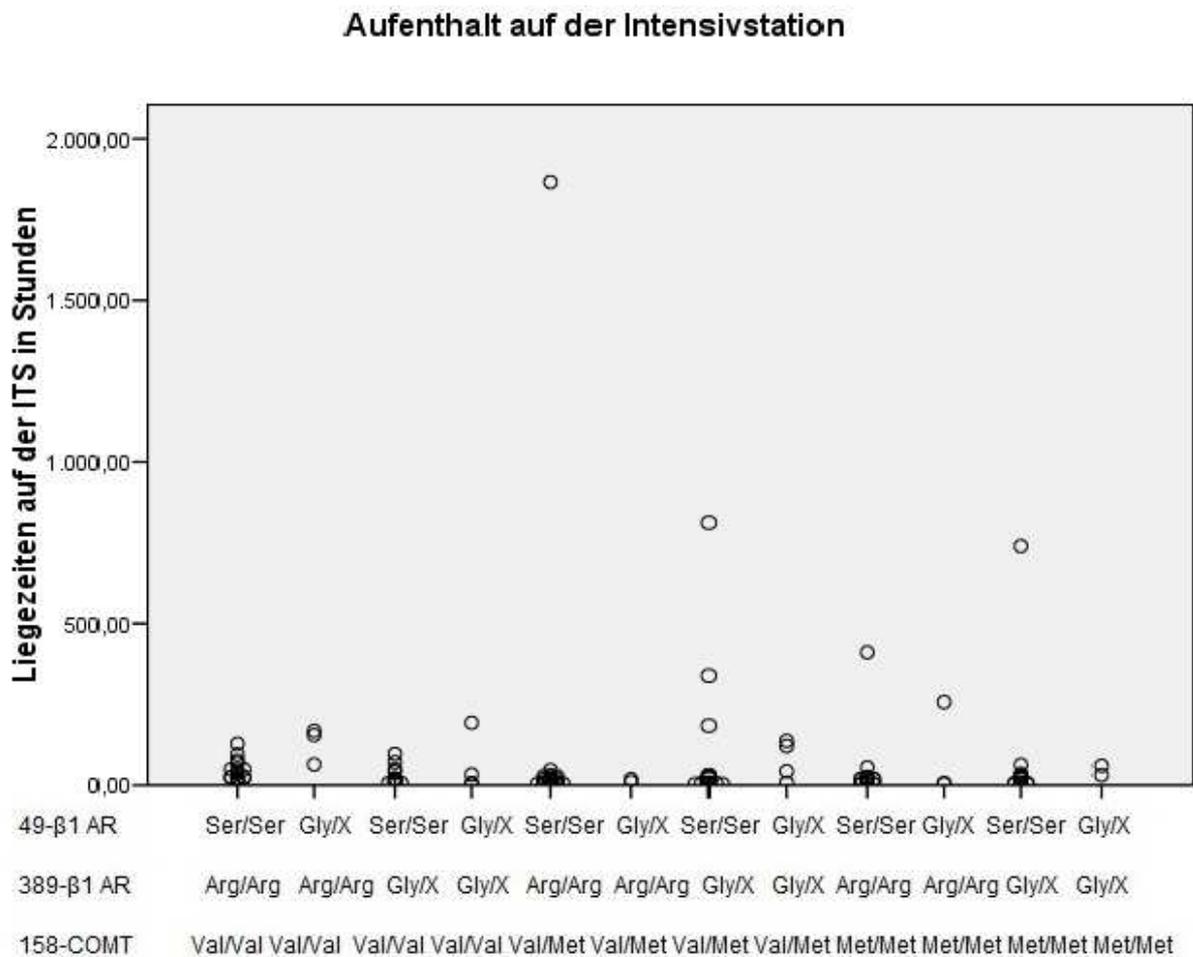
Ebenso verhielt es sich mit der IC-Station, die meisten Patienten waren weniger als 200 Stunden auf der Überwachungsstation. In der Abbildung 3.36 sind fünf Patienten erkennbar, die sich deutlich in der Verweildauer der anderen Patienten unterschieden. Diese „Ausreißer“ trugen die

145AA1165G/X472GG (Ser49SerGly389/XVal158Val),  
145G/X1165G/X472GG (Gly49/XGly389/XVal158Val) und  
145AA1165G/X472GA (Ser49SerGly389/XVal158Met) SNP-Kombinationen.

Der gesamte Aufenthalt im Krankenhaus zeigte wenig Unterschiede in der Verteilung, wie in der Abbildung 3.37 dargestellt. Fünf Patienten waren ebenfalls deutlich länger im Herzzentrum als die Übrigen. Dies betraf die 145G/X1165CC472GG (Gly49/XArg389ArgVal158Val), die 145AA1165CC472GA (Ser49SerArg389ArgVal158Met), die 145AA1165G/X472GA (Ser49SerGly389/XVal158Met), die 145AA1165CC472AA

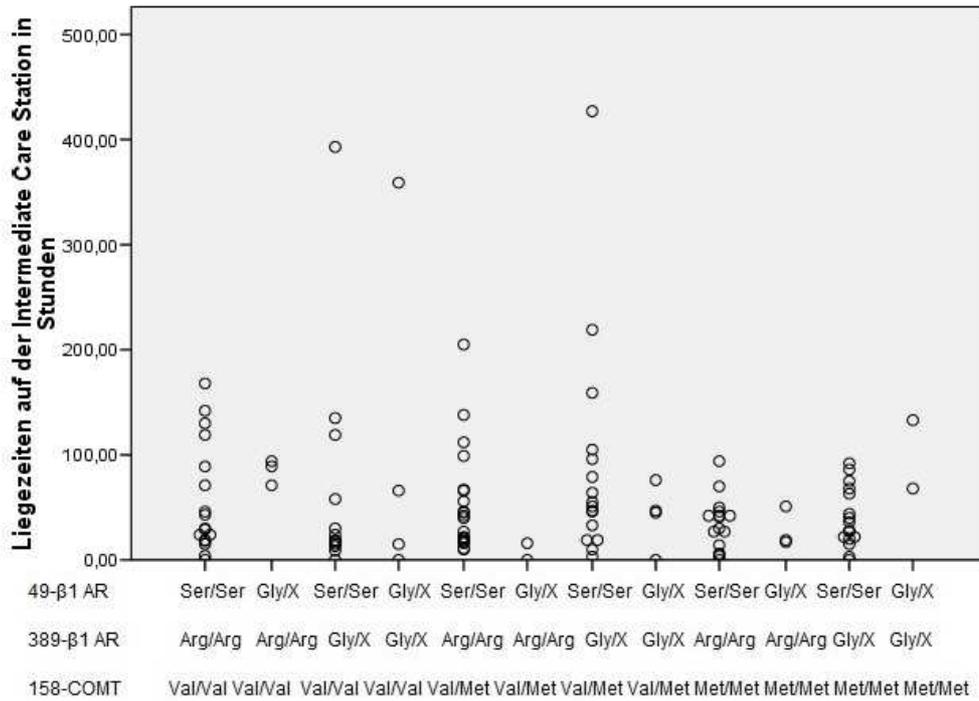
(Ser49SerArg389ArgMet158Met) und die 145G/X1165CC472AA (Gly49/XArg389ArgMet158Met) SNP-Kombinationen.

In den Verteilungen der Verweildauern auf den Überwachungsstationen und im Krankenhaus war keine häufig vorkommende SNP-Kombination auffällig, die mit einer deutlich erhöhten oder deutlich verminderten Aufenthaltsdauer assoziiert war.



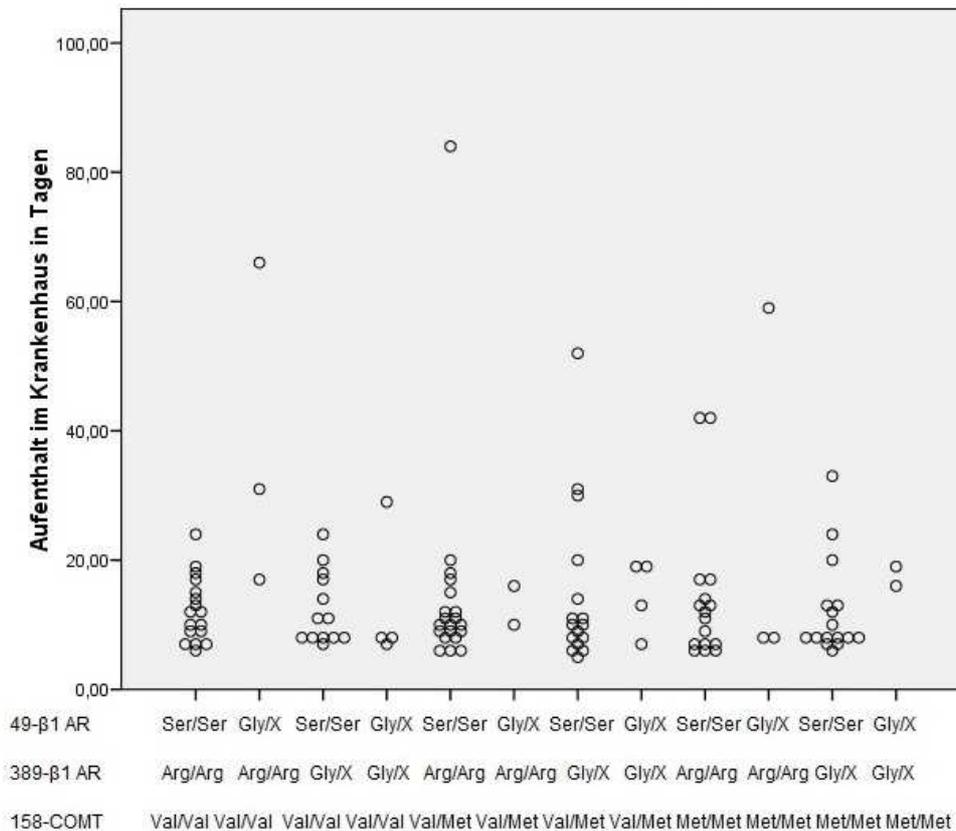
**Abbildung 3.35** Die Verteilung der Liegezeiten auf der Intensivstation unterschied sich bis auf wenige Ausnahmen (145AA1165CC472GA (Ser49SerArg389ArgVal158Met), 145AA1165G/X472GA (Ser49SerGly389/XVal158Met), 145AA1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) und 145AA1165G/X472AA (Ser49SerGly389/XMet158Met) nicht zwischen den SNP-Kombinationen.

### Aufenthalt auf der Intermediate Care Station



**Abbildung 3.36** Die Verweildauern auf der IC-Station zeigten bis auf wenige Streuungen (145AA1165G/X472GG (Ser49SerGly389/XVal158Val), 145G/X1165G/X472GG (Gly49/XGly389/XVal158Val) und 145AA1165G/X472GA (Ser49SerGly389/XVal158Met)) keine deutlichen Differenzen zwischen den SNP-Kombinationen.

### Aufenthalt im Krankenhaus



**Abbildung 3.37** Der Aufenthalt im Krankenhaus zeigte Streuungen in den SNP-Kombinationen. Die meisten Patienten waren weniger als 20 Tage im Herzzentrum.

### **3.8.2 Einfluss der SNP-Kombinationen auf den postoperativen Noradrenalinverbrauch**

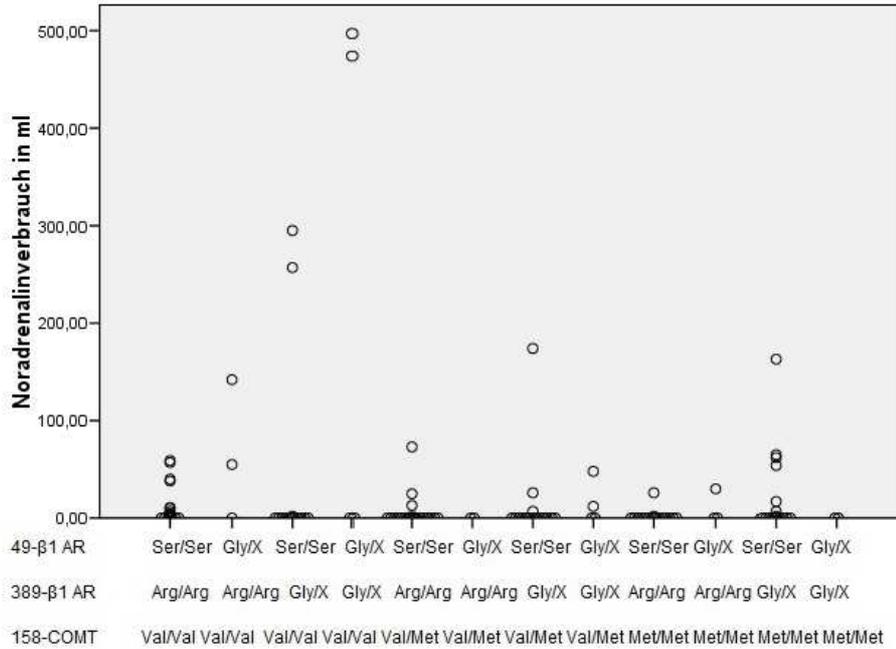
Es stellte sich eine deutliche Streuung des Noradrenalinverbrauchs in dem Patientenkollektiv dar (Vergleich Abbildung 3.38). Die Verteilung des Noradrenalinverbrauchs basierte jedoch nur auf den Bedarf von 39 Patienten. Hierbei war der exorbitante Bedarf von zwei Patienten des 145G/X1165G/X472GG (Gly49/XGly389/XVal158Val) Genotyps auffällig. Es ergab sich jedoch kein Hinweis für eine SNP-Kombination, die mit einem deutlich erhöhten oder verminderten Bedarf einher ging und zudem gehäuft vorlag.

77 Patienten benötigten kein kreislaufunterstützendes Noradrenalin. Unter ihnen waren alle 12 SNP-Kombinationen nachweisbar. Demzufolge gab es Patienten mit dem oben genannten Genotyp, denen kein Noradrenalin verabreicht wurde.

Demgegenüber gestellt ist der EuroSCORE in Abbildung 3.39.

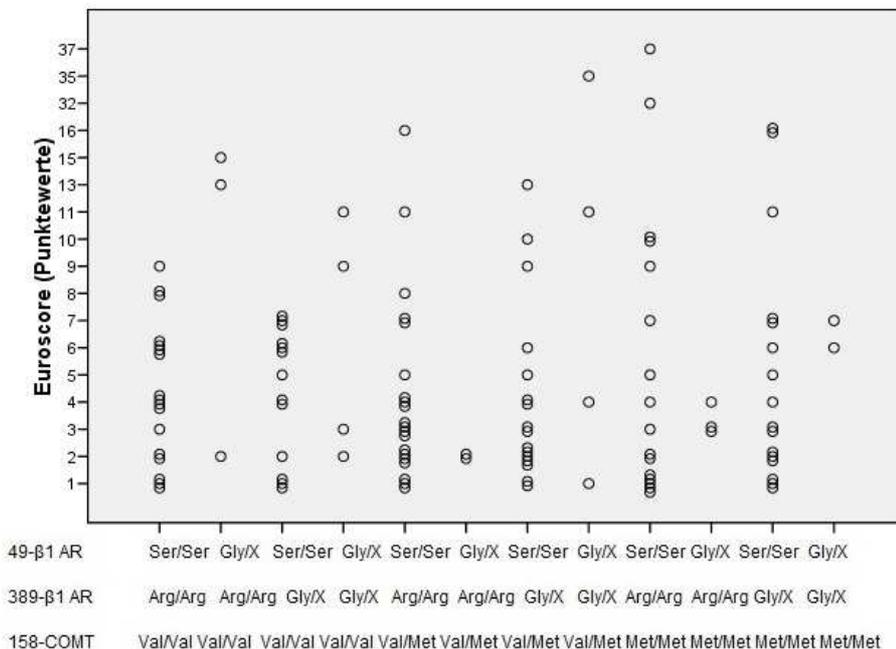
Die Verteilung des Punktwertes war nahezu ausgeglichen. Es zeigte sich ein insgesamt niedriges Risikoprofil mit weniger als 20 Punkten bei maximal 100 Punktwerten. Drei Patienten, mit den 145G/X1165G/X472GA (Gly49/XGly389/XVal158Met) und den 145AA1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) Genotypen, wiesen ein deutlich höheres präoperatives Risiko zwischen 30 und 40 Punktwerten auf.

### Noradrenalinverbrauch



**Abbildung 3.38** Die Verteilung des Noradrenalinverbrauchs der 39 Patienten aufgeführt für die 12 SNP-Kombinationen. Diese war nahezu ausgeglichen, es konnte keine SNP-Kombination nachgewiesen werden, die mit einem auffällig höheren oder niedrigeren Verbrauch einher ging. 77 Patienten erhielten kein Noradrenalin zur Kreislaufunterstützung. Unter diesen waren alle 12 SNP-Kombinationen vertreten.

### Euroscore



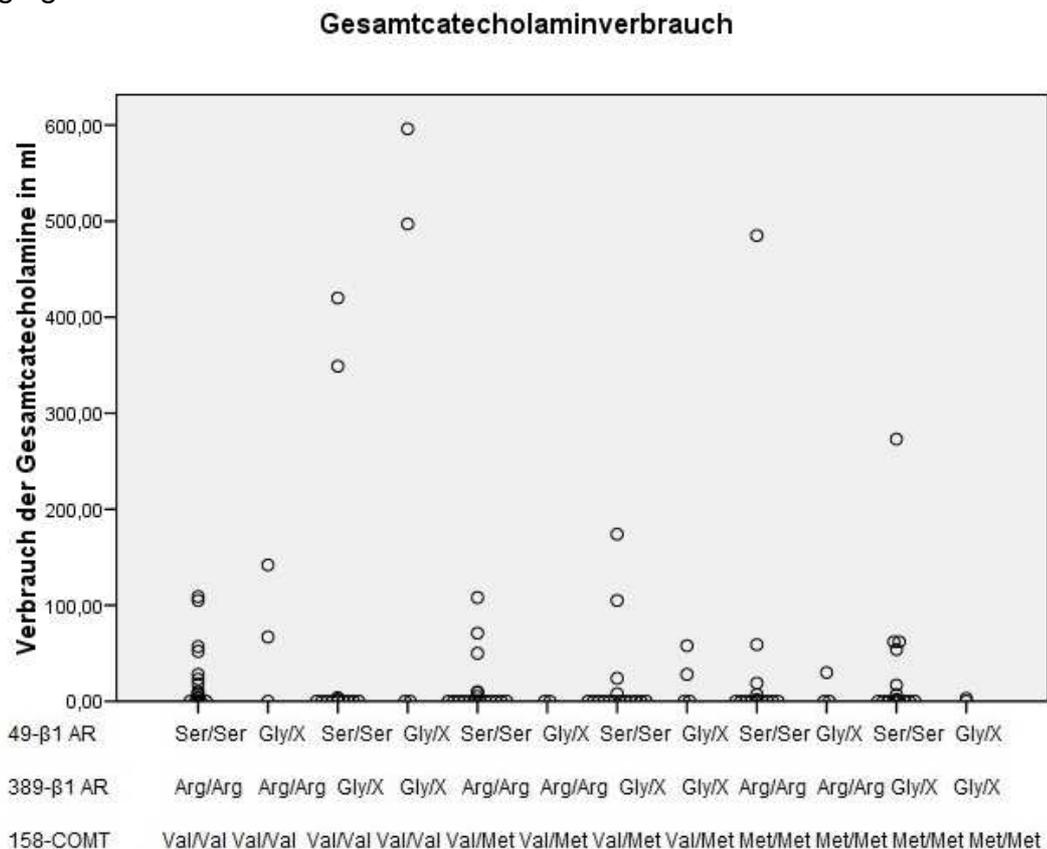
**Abbildung 3.39** Darstellung des präoperativen Risikoprofils mittels Euroscore verteilt auf die 12 SNP-Kombinationen. Das Risiko ist insgesamt als niedrig einzustufen. Die meisten Patienten hatten einen Punktwert unter 20, bis auf drei Ausnahmen mit dem 145G/X1165G/X472GA (Gly49/XGly389/XVal158Met) und dem 145AA1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met).

### 3.8.3 Einfluss der SNP-Kombinationen auf den postoperativen Gesamtcatecholaminverbrauch

Der gesamte Catecholaminbedarf zeigte ein ähnliches Streuverhalten wie der Noradrenalinverbrauch, wie in der Abbildung 3.40 zu erkennen ist. 64 Patienten erhielten kein Catecholamin. 52 Patienten wurde mindestens eines der Catecholamine, Adrenalin, Noradrelain, Dopamin oder/und Dobutamin, infundiert. Die folgenden SNP-Kombinationen

145AA1165G/X472GG (Ser49SerGly389/XVal158Val),  
 145G/X1165G/X472GG (Gly49/XGly389/XVal158Val),  
 145AA 1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) und  
 145AA1165G/X472AA (Ser49SerGly389/XMet158Met)

waren mit den höchsten Bedarf assoziiert. Es war keine SNP-Kombination nachweislich, die mit einem stark erhöhten Bedarf und einem gehäuftem Auftreten einher ging.

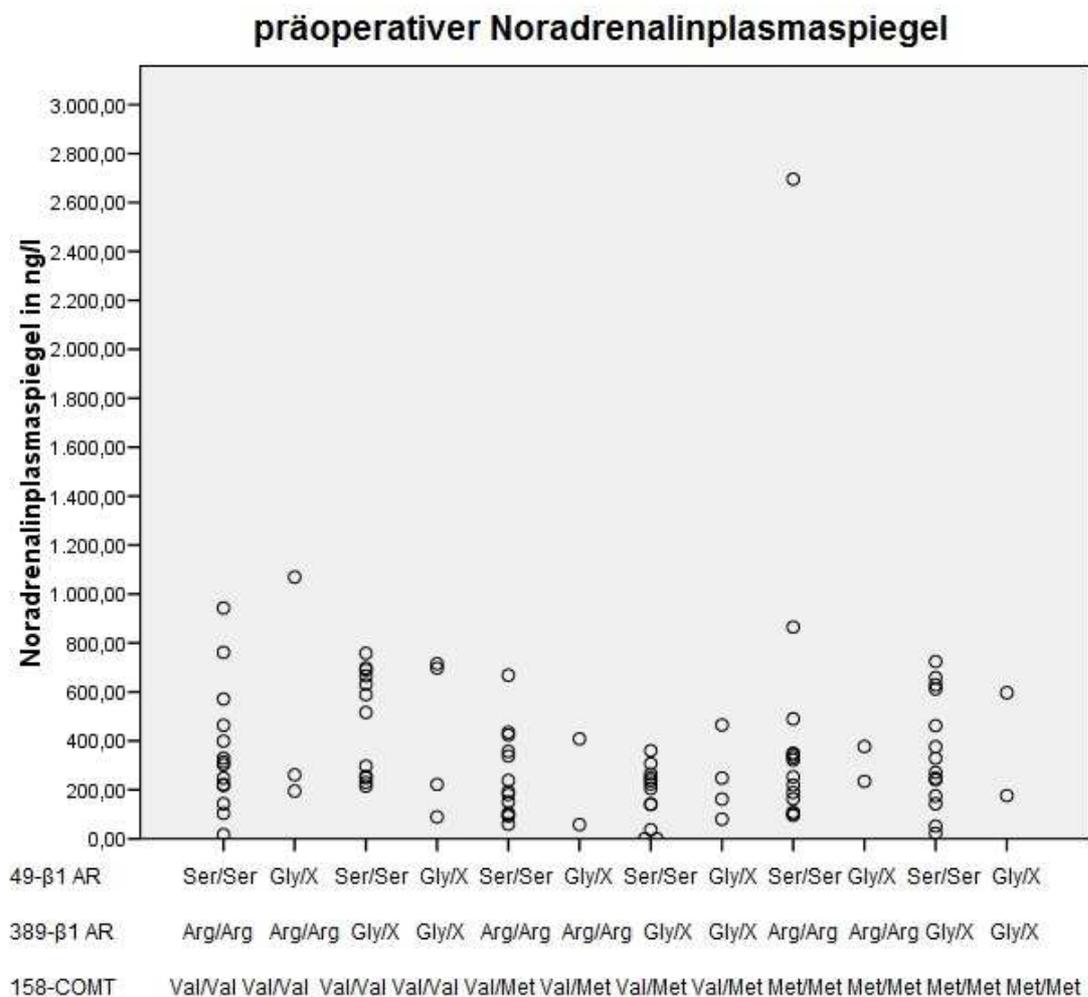


**Abbildung 3.40** Die Verteilung des postoperativen Gesamtcatecholaminbedarfs in ml auf die 12 SNP-Kombinationen. Die SNP-Kombination 145AA1165G/X472GG (Ser49SerGly389/XVal158Val), 145G/X1165G/X472GG (Gly49/XGly389/XVal158Val), 145AA 1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) und 145AA1165G/X472AA (Ser49SerGly389/XMet158Met) waren mit dem maximalen Bedarf assoziiert. Es zeigte sich jedoch keine SNP-Kombination, die gehäuft mit einem erhöhten Bedarf einherging.

### 3.8.4 Einfluss der SNP-Kombinationen auf die präoperativen Adrenalin- und Noradrenalinplasmaspiegel

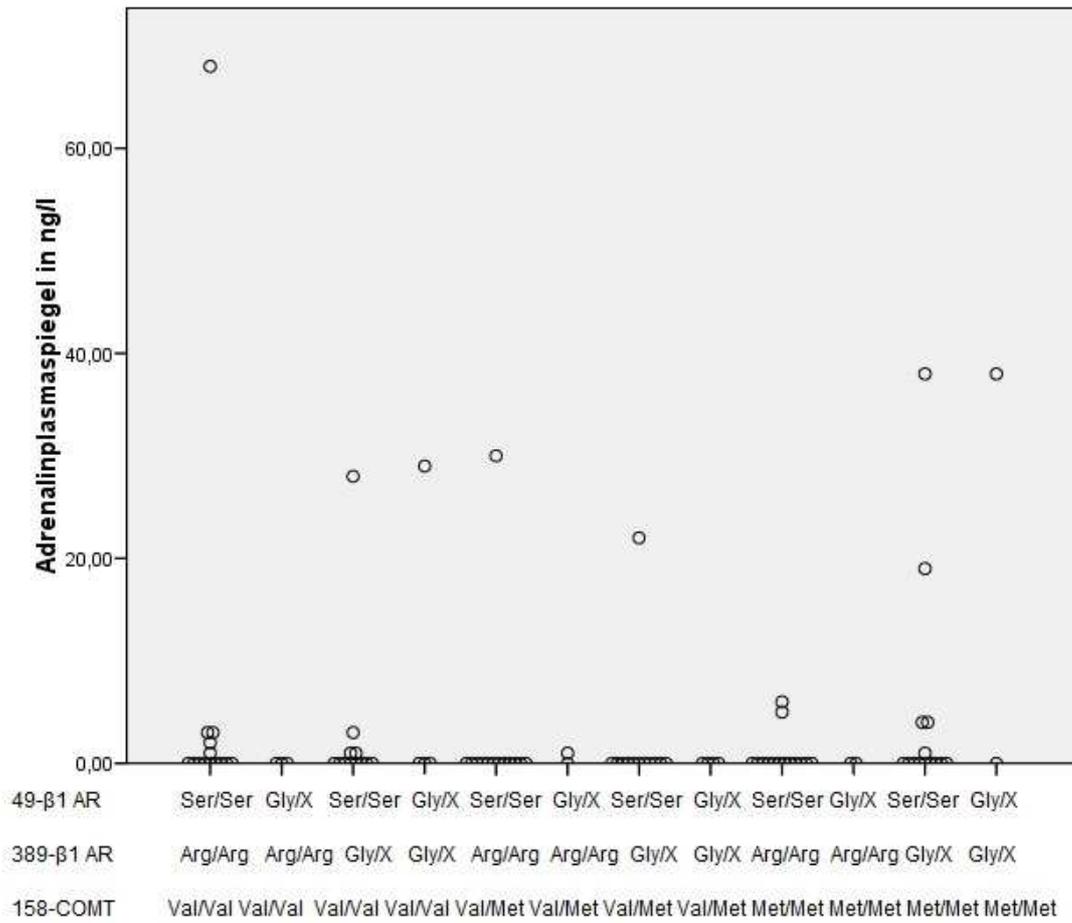
Die Verteilung des präoperativen Noradrenalinspiegels war nahezu ausgeglichen (Vergleich Abbildung 3.41). Es zeigte sich keine SNP-Kombination mit einem deutlich erhöhten Plasmaspiegel und einem gehäuften Auftreten. Ein Patient mit dem 145AA1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) wies eine exorbitant erhöhte Plasmakonzentration von 2695 ng/l auf. Hier war eine Noradrenalinapplikation nach Einleitung der Narkose durch den Anästhesisten nicht auszuschließen.

Der Adrenalinplasmaspiegel war nur bei 13 Patientenproben bestimmbar. Es ist demzufolge als nicht repräsentativ einzustufen. Die Abbildung 3.42 stellt die Verteilung der Adrenalinplasmakonzentrationen der 13 Proben dar.



**Abbildung 3.41** Der präoperative Noradrenalinplasmaspiegel in ng/l zeigte eine ausgeglichene Verteilung. Ein Patient mit der 145AA1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) SNP-Kombination wies eine exorbitant erhöhte Konzentration von 2695 ng/l auf. Eine externe Noradrenalinapplikation nach Narkoseeinleitung war nicht auszuschließen.

### präoperativer Adrenalinplasmaspiegel



**Abbildung 3.42** Es waren nur 13 Patientenproben bezüglich der Adrenalinplasmakonzentration bestimmbar. Es ließ sich demzufolge keine repräsentative SNP-Kombinationsverteilung darstellen.

#### 4 Diskussion

Ein wichtige Limitation der Studie war die mit vielen Störungen überlagerte Analyse des 145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus. Eine Verifikation durch die Sequenzierung war nicht möglich. Aktuell bietet keine Firma den Ser49Gly- $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismustest auf dem Markt an. Demnach müssen die Ergebnisse bezüglich dieses Polymorphismus mit Vorsicht bewertet werden.

In zahlreichen Studien wurde die Verteilung der drei Polymorphismen in der kaukasischen Bevölkerung beschrieben. Das 145AA (Ser49Ser) des 145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus tritt mit einer Häufigkeit von 85% in der chinesischen und kaukasischen Bevölkerung auf. Lediglich 15% der Menschen tragen das 145AG (Ser49Gly) in einem heterozygoten Chromosomensatz (Moore et al. 1999), 0,3% sind homozygote Träger des 145GG (Gly49Gly) (Ulucan et al. 2008). Das rezessiv vererbte 1165G (Gly389) des 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus ist mit 27% in der kaukasischen Bevölkerung vertreten. 73% weisen demzufolge das 1165CC (Arg389Arg) auf (Moore et al. 1999). Nach dem Hardy Weinberg Equilibrium waren keine Unterschiede in der Polymorphismusverteilung zwischen der kaukasischen Bevölkerung und dem Studienkollektiv feststellbar (145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus mit  $p = 1,0$ , 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus mit  $p = 0,65$ ) (Vergleich Tabelle 3.3). Demnach sind die beiden  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen für kardiale Erkrankungen nicht prädisponierend.

Anders verhielt es sich mit dem 472G>A (Val158Met) COMT Polymorphismus. Die Studienpatienten repräsentierten nicht die von Palmatier et al. oder Weinshilboum et al. beschriebene ausgeglichene Verteilung der beiden Allele in der kaukasischen Bevölkerung (Palmatier et al. 1999, Weinshilboum et al. 1984 und 1999). McLeod et al. beschrieben ein Allelverhältnis von 23% für das 472GG (Val158Val) zu 50% für das 472GA (Val158Met) zu 27% für das 472AA (Met158Met) für die weiße Bevölkerung (McLeod et al. 1994). Unter Berücksichtigung des Hardy Weinberg Equilibriums war eine signifikante Abweichung zwischen dem Studienkollektiv und der Allgemeinbevölkerung nachweisbar ( $p = 0,003$ ) (siehe Tabelle 3.2 und 3.3). Sowohl Eriksson et al. als auch Hagen et al. konnten in der nordeuropäischen Bevölkerung keinen derartigen signifikanten Unterschied nach dem Hardy Weinberg Equilibrium nachweisen (Eriksson et al 2004, Hagen et al. 2007). Ob dem COMT

Polymorphismus eine erhöhte Prädisposition für kardiale Erkrankungen oder ein erhöhtes postoperatives Risiko zu geschrieben werden kann, ist allerdings nicht abschätzbar. In der Literatur sind außerdem keine einheitlichen Unterteilungen in der Polymorphismusverteilung zu finden und deutliche regionale Unterschiede in der Allelfrequenz zu verzeichnen (McLeod et al. 1994, Palmatier et al. 1999).

Ziel der Studie war es Einflüsse der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor- und COMT-Polymorphismen auf den postoperativen Verlauf herzchirurgischer Patienten aufzudecken. Unter Betrachtung eines einzelnen Polymorphismus schienen sich Effekte auf den postoperativen Noradrenalinverbrauch, Gesamtcatecholaminverbrauch und der gesamten Aufenthaltsdauer im Krankenhaus zu suggerieren.

Ausgangspunkt war unter anderem der präoperative Gesundheitszustand der Patienten. Er wurde sowohl von der kardialen Beeinträchtigung als auch von den bestehenden Comorbiditäten geprägt. Ein gutes objektives Maß zur Einschätzung des Gesundheitszustands war der logistische Euroscore. Er betrug im Mittel  $5,5 \pm 0,5$ . Es waren keine Unterschiede in der Verteilung des Euroscores auf die Polymorphismen nachweisbar (siehe Abbildungen 3.10, 3.14, 3.18). Demnach war das präoperative Risikoprofil der Patienten gleich niedrig. Die Effekte der Polymorphismen waren als unabhängig von dem Euroscore zu beschreiben.

Es konnte zudem keine Korrelation zwischen dem Euroscore und den Liegezeiten der Studienpatienten auf der ITS festgestellt werden ( $p = 0,333$ , Vergleich Tabelle 3.5). Allerdings bestand eine enge Korrelation zwischen dem mittleren ITS-Aufenthalt von 2007 bis 2011 und dem Risikofaktor ( $p = 0,001$ ). Die Ursache für die unterschiedlichen Korrelationen war wahrscheinlich der Risikofaktor selbst. Die Patienten der Studie hatten alle ein relativ niedriges präoperatives Risiko (siehe oben), anders als die Patienten, die in dem Zeitraum von 2007 bis 2011 berücksichtigt wurden. Diese lagen nicht nur zur intensiveren postoperativen Überwachung auf der ITS, sondern aufgrund zahlreicher anderer kardiopulmonaler Erkrankungen. Demzufolge waren deutlich höhere Euroscorewerte zu erwarten.

Zielparameter unserer Untersuchungen war der Noradrenalinverbrauch. Es zeigte sich ein signifikant erhöhter Bedarf unter den Trägern des 145G/X (Gly49/X), 1165G/X (Gly389/X) und 472G/X (Val158/X) (siehe Abbildungen 3.11, 3.15, 3.19, Tabellen 3.8, 3.9). Sowohl die Dichte als auch die Aktivität des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors

wird von dem 145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus beeinflusst. So ist das 145G (Gly49) mit einer stärkeren Herunterregulation und einer höheren Adenylylcyclaseaktivität des Rezeptors assoziiert (Levin et al. 2002, Rathz et al. 2002, Sandilands et al. 2004). Dies ist unter anderem in der Tabelle 4.1 dargestellt. Der erhöhte Noradrenalinverbrauch der Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) könnte demnach durch den verminderten Rezeptorbesatz der Herzmuskelzelle bedingt zu sein.

Der erhöhte Verbrauch des Noradrenalin der 1165G/X (Gly389/X) tragenden Patienten könnte durch die unterschiedliche  $\beta_1$ -Adrenorezeptoraktivität beeinflusst von dem 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus bedingt sein. Das 1165G (Gly389) unterdrückt die agonistenbedingte Stimulation der Adenylylcyclase. Diese ist um das zwei- bis dreifach vermindert (Mason et al. 1999, Xie et al. 2001, Small et al. 2003, Liggett et al. 2006). Demnach bestände ein höherer Bedarf des Noradrenalins um die weniger aktiven Gly389-enthaltenen  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren zu aktivieren. Dies wäre eine Erklärung für den in unserer Studie signifikant auffälligen erhöhten Verbrauch. Dieser Effekt konnte bereits 2007 von Leineweber et al. bezüglich des Adrenalins nachgewiesen werden. Sie schrieben dem 1165C (Arg389) einen geringeren Adrenalinbedarf der Patienten nach einem arteriovenösen Bypass zu (Leineweber et al. 2007). Molenaar konnte allerdings 2002 keine Abhängigkeiten zwischen dem Noradrenalineffekt auf die Myokardzelle und den 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen in vitro feststellen. Diese werden möglicherweise erst markant, wenn pathologische Veränderungen am Herzen vorhanden sind (Molenaar et al. 2002). Wird Noradrenalin direkt auf intraoperativ entnommenes Myokard gegeben, so schreiben Sandilands et al. dem 1165CC (Arg389Arg) eine stärkere Antwort als dem 1165GG (Gly389Gly) zu (Sandilands et al. 2003). Die Tabelle 4.1 stellt den Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus auf den  $\beta_1$ -Adrenorezeptor dar, so ist auch der Effekt auf die Rezeptordichte dargestellt. Rathz et al. beschrieben eine verminderte Herunterregulation der Gly389Gly-enthaltenen Rezeptoren (Rathz et al. 2003). Dieser Einfluss konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden, da Untersuchungen und Messungen des Rezeptorbesatzes auf den Myokardzellen nicht durchgeführt wurden.

Diese Effekte ließen sich auch auf den gesamten Catecholaminbedarf übertragen, da das Noradrenalin als bevorzugtes Catecholamin einen Hauptanteil der Gesamtcatecholamine ausmachte.

| Rezeptoraktivität | Herunterregulation des Rezeptors | $\beta_1$ -AR-Polymorphismus |
|-------------------|----------------------------------|------------------------------|
| ↓                 | ↑                                | 145AA (Ser49Ser)             |
| ↑                 | ↑↑                               | 145AG (Ser49Gly)             |
| ↑↑                | ↑↑↑                              | 145GG (Gly49Gly)             |
| ↑↑↑               | ↑↑                               | 1165CC (Arg389Arg)           |
| ↑↑                | ↑                                | 1165CG (Arg389Gly)           |
| ↓                 | ↓                                | 1165GG (Gly389Gly)           |

**Tabelle 4.1** Auswirkungen des 145A>G (Ser49Gly) und des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Aktivität und Regulation des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors

Der 472G>A (Val158Met) COMT-Polymorphismus wirkt sich auf die Aktivität des Enzyms aus. Liegt das 472AA (Met158Met) vor, so wird dem Enzym eine drei- bis vierfach niedrigere Aktivität zugeschrieben (Weinshilboum und Raymond 1977, Scanlon et al. 1979, Lotta et al. 1995, Lachman et al. 1996, Hagen et al. 2007). Der Noradrenalinabbau über die 472GG (Val158Val) COMT ist demnach deutlich schneller, so dass in diesem Zusammenhang ein höherer Noradrenalinverbrauch des Enzyms und somit ein höherer Bedarf des Patienten bestehen müsste. Dies ließ sich in unserer Studie nachvollziehen. Patienten mit dem 472GG (Val158Val) benötigten signifikant mehr Noradrenalin postoperativ als die Patienten mit der langsam metabolisierenden 472A/X (Met158/X) (siehe Abbildung 3.19). Dieser Effekt ließ sich ebenso im präoperativen Noradrenalinplasmaspiegel erkennen. Die Patienten mit dem 472GG (Val158Val) wiesen einen signifikant höheren Plasmaspiegel des Noradrenalin auf als die 472A/X (Met158/X) tragenden Patienten (siehe Abbildung 3.21).

Es konnten neben dem Einfluss der beiden  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-Polymorphismen und des COMT-Polymorphismus auf den Noradrenalinverbrauch auch Effekte auf den gesamten Aufenthaltszeitraum im Krankenhaus nachgewiesen werden. Vergleicht man die Zeiträume auf dieser Station zwischen den Polymorphismen, so liegen sie jedoch alle in einer Bandbreite.

Die Liegezeiten auf der ITS und der IC-Station waren unabhängig von den Polymorphismen, da die Belegung der Station von den logistischen Gegebenheiten bestimmt wurde. Demnach wurden die Patienten unserer Studie aufgrund extern eingelieferter Notfälle schneller auf die IC-Station verlegt. Ebenso erfolgte die Verlegung der Patienten von der IC-Station auf die Normalstation nicht allein aus medizinischen Gründen. Organisatorische Einflüsse waren nicht auszuschließen. Eine weitere Beeinflussung der 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen bestand in der gesamten Aufenthaltsdauer im Krankenhaus. Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) und dem 1165CC (Arg389Arg) waren signifikant länger im Krankenhaus (siehe Abbildungen 3.4 und 3.6).

Die Operationsarten waren zwischen den Polymorphismen nahezu gleich verteilt, außer der arteriocroronare Bypass (siehe Tabelle 3.4). Es zeigte sich bezüglich der Bypass-Operation eine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen den Polymorphismen. Aus diesem Grund differenzierten wir die Patienten mit einem arteriocroronaren Bypass von denen, die sich eine der anderen Operationen (Aortenklappenersatz mit oder ohne Aorta ascendens Ersatz, Mitral-, Trikuspidal- oder Pulmonalklappenersatz oder –rekonstruktion) unterzogen. Die signifikanten Effekte der drei Polymorphismen auf den Noradrenalinverbrauch waren in den beiden Gruppen nachweisbar (siehe Abbildungen 3.29, 3.30 und 3.31). Demzufolge beeinflusste die Art der Operation nicht unsere Ergebnisse.

52,6% der Patienten erhielten präoperativ eine  $\beta$ -Blockerdauermedikation. Wichtige Effekte der  $\beta$ -Blockade sind unter anderem die Reduktion der Herzfrequenz, die Verlängerung der diastolischen Füllphase, die Abnahme des kardialen Sauerstoffverbrauchs und die Hochregulation der kardialen  $\beta$ -Adrenorezeptoren (López-Sendón et al. 2004). Wir schlossen eine Beeinflussung dieser Therapie auf die Polymorphismuseffekte aus, indem wir die Patienten mit einer  $\beta$ -Blockerdauertherapie von den Patienten ohne diese Medikation unterschieden. Die Abhängigkeit des Noradrenalinverbrauchs von den drei Polymorphismen war in beiden Gruppen signifikant. Die präoperative  $\beta$ -Blockerdauermedikation beeinflusste somit nicht unsere Statistik (siehe Abbildungen 3.32, 3.33 und 3.34).

Es existieren bereits einige Studien, die sich mit dem Einfluss der  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen auf dem Adrenalin- und Noradrenalinverbrauch beschäftigten. Es konnte kein Einfluss des 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismus auf die Effekte des

Adrenalin und Noradrenalin junger gesunder Erwachsener festgestellt werden (Büscher et al. 2001, Xie et al. 2001, Snapir et al. 2003). Ebenso konnten Molenaar et al., wie oben beschrieben, keinen 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly) Polymorphismuseinfluss auf den Noradrenalineffekt feststellen (Molenaar et al. 2002). Aus diesem Grund berücksichtigen wir in unserer Studie nicht nur die  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-Polymorphismen, sondern auch den COMT-Polymorphismus. Der mit dem COMT-Polymorphismus verbundene unterschiedliche Noradrenalinabbau könnte die Effekte der beiden  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen aufdecken.

Die drei Polymorphismen waren in dem Studienklientel als genetisch unabhängig voneinander zu betrachten. Mittels Fisher's exact test konnten keine Assoziationen zwischen den Allelen der 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen ( $p = 0,478$ ) festgestellt werden. Ebenso verhielt es sich mit den Allelen der 1165G>C (Arg389Gly) und 472G>A (Val158Met) Polymorphismen ( $p = 0,695$ ) und den Allelen der 145A>G (Ser49Gly) und 472G>A (Val158Met) Polymorphismen ( $p = 0,587$ ).

Den beiden  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen wird ein Kopplungsungleichgewicht zugeschrieben, so dass zum Beispiel Träger des Gly49 häufiger mit dem Arg389Arg als mit dem Gly389Gly assoziiert sind. Die Gly49Gly389 Kombination ist sehr selten vertreten (Johnson et al. 2003, Magnusson et al. 2005). Als vollständig unabhängig können die beiden  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen allerdings nicht betrachtet werden, weil ihnen unter anderem nach Sandilands et al. ein funktioneller Zusammenhang zugeschrieben wird (Sandilands et al. 2004). Aus diesem Grund ist es sinnvoll nicht die SNPs in Studien zu berücksichtigen, sondern die Haplotypen (Brodde et al. 2006).

Es konnten signifikante Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Polymorphismen und dem gesamten Krankenhausaufenthalt, dem Noradrenalinverbrauch, dem Gesamtcatecholaminverbrauch und dem präoperativen Noradrenalinplasmaspiegel unter Betrachtung der Mittelwerte festgestellt werden. Diese vermeintlichen Assoziationen ließen sich jedoch unter Berücksichtigung der SNP-Kombinationen bei tiefer Analyse nicht wiederfinden. Die Abbildungen 3.37, 3.38, 3.40 und 3.41 bilden die entsprechenden Variablen nach SNP-Kombinationen aufgelistet ab. Bezüglich des Noradrenalinverbrauchs stellte sich ein nahezu einheitliches Verteilungsmuster entsprechend der SNP-Kombinationen dar. Allerdings gab es zwei „Ausreißer“ mit

der Genotypenkombination 145G/X1165G/X472GG (Gly49/XGly389/XVal158Val). Sie disponierte einen erhöhten Noradrenalinverbrauch. Die anderen Patienten mit der gleichen Kombination wiesen einen Bedarf von 0 ml auf (Vergleich Abbildung 3.38).

Demzufolge lag keine SNP-Kombination in dem Studienkollektiv vor, welche mit einem deutlich erhöhten oder verminderten Bedarf gehäuft einher ging. Die zuvor festgestellten signifikanten Zusammenhänge von  $p < 0,001$  (Vergleich Tabellen 3.8 und 3.9) blieben somit nicht bestehen.

Der gleiche Sachverhalt traf auch für die anderen vermeintlichen Signifikanzen zu.

Der Gesamtcatecholaminverbrauch bezogen auf die SNP-Kombinationen wurde ebenso durch zwei „Ausreißer“ mit der Kombination 145G/X1165G/X472GG (Gly49/XGly389/XVal158Val) beeinflusst. Andere Patienten mit der gleichen Kombination benötigten keine medikamentöse Kreislaufunterstützung. Insgesamt war ein nahezu einheitliches Verteilungsmuster nachweisbar (Vergleich Abbildung 3.40).

Der vermeintlich erhöhte Gesamtcatecholaminbedarf wurde durch wenige Ausreißer in der Polymorphismuseinzelanalyse bestimmt (Vergleich Tabelle 3.10 und 3.11). Unter Berücksichtigung der SNP-Kombinationen war keine vorhanden, die mit einem deutlich erhöhten oder verminderten Bedarf einher ging.

Die Aufenthaltsdauer im Herzzentrum Leipzig war nahezu einheitlich zwei bis drei Wochen. Die festgestellten signifikanten Zusammenhänge zwischen den 145A>G (Ser49Gly) und 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen und dem Krankenhausaufenthalt (siehe Tabellen 3.6 und 3.7) wurden unter Betrachtung der SNP-Kombinationen aufgehoben. Fünf Patienten mit den Kombinationen 145G/X1165CC472GG (Gly49/XArg389ArgVal158Val), 145AA1165CC472GA (Ser49SerArg389ArgVal158Met), 145AA1165G/X472GA (Ser49SerGly389/XVal158Met), 145AA1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) und 145G/X1165CC472AA (Gly49/XArg389ArgMet158Met) waren mehr als 40 Tage im Herzzentrum Leipzig. Zum einen unterschieden sich die genannten fünf Patienten in ihren SNP-Kombinationen, zum anderen waren Patienten mit den gleichen Kombinationen in der Studie, die jedoch kürzer, unter 20 Tage, im Krankenhaus verweilten (siehe Abbildung 3.37).

Die Betrachtung der SNP-Kombinationen löste ebenso den signifikanten Einfluss des 472G>A (Val158Met) COMT Polymorphismus auf den präoperativen

Noradrenalinplasmaspiegel auf (Vergleich Abbildung 3.21). Die Verteilung der NoradrenalinKonzentration im Blutplasma war unter Berücksichtigung der SNP-Kombinationen nahezu einheitlich (siehe Abbildung 3.41). Es lag eine exorbitant erhöhte Konzentration bei der SNP-Kombination 145AA1165CC472AA (Ser49SerArg389ArgMet158Met) vor. Dieser hohe Wert war durch eine Noradrenalinapplikation nach Narkoseeinleitung durch den Anästhesisten sehr wahrscheinlich.

Die begrenzte Patientenzahl könnte als Limitation herangezogen werden.

Jedoch waren bei den 116 Patienten keine großen Unterschiede unter Berücksichtigung der SNP-Kombinationen erkennbar, so dass bei einer Patientenzahl von 1000 wahrscheinlich ebenso keine großen Unterschiede zu erwarten wären.

Wurden die Effekte der Polymorphismen getrennt voneinander untersucht, so wurde der Eindruck einer signifikanten Beeinflussung suggeriert. Bezog man die SNP-Kombinationen jedoch in die Analyse hinein, so hoben sich die Einflüsse auf die Liegezeiten, dem Noradrenalinverbrauch und dem Gesamtcatecholaminverbrauch auf.

Das ist ein häufiges Problem zahlreicher Studien, die die beiden  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen einzeln untersuchten (Börjesson et al. 2000, Podlowski et al. 2000, Bengtsson et al. 2001, Humma et al. 2001, Levin et al. 2002, Liu et al. 2003, Sandilands et al. 2003, La Rosée et al. 2004, Terra et al. 2005, Leineweber et al. 2007), allerdings die SNP-Kombinationen nicht in ihre Auswertung einbezogen.

Wie bereits Brodde et al. und Hoehe et al. bemerkten, ist vor allem die Analyse der Polymorphismuseffekte entsprechend der Haplotypen (eine Kombination von Allelen auf einem Chromosom oder einem Teil eines Chromosoms (International HapMap Consortium 2003)) sinnvoll und nicht alleine nach den SNPs (Hoehe et al. 2002, Brodde et al. 2006). Eine Haplotypenanalyse wurde nicht im Rahmen dieser Studie durchgeführt, da bereits die Betrachtung der SNP-Kombinationen eine Auflösung der Effekte aufzeigte.

Ein genetisches Risiko wird unter Berücksichtigung der SNP-Kombinationen und wahrscheinlich auch der Haplotypen besser identifizierbar sein und es werden Fehlinterpretationen in Datensätze vermieden.

## 5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med

### **Untersuchungen der Assoziationen der $\beta_1$ -Adrenorezeptor- und Catechol-O-Methyltransferase-Polymorphismen auf den postoperativen Verlauf kardiochirurgischer Patienten**

eingereicht von:

Julia Tews

angefertigt an der Universität Leipzig, in der Klinik für Herzchirurgie des Herzzentrum Leipzig

betreut von:

Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Oktober 2014

Die Herzmuskelzellen sind mit zwei  $\beta$ -Rezeptorsubtypen ausgestattet, wobei der  $\beta_1$ -adernerge Rezeptor mit 80% deutlich dominiert (La Rosée et al. 2004). Das Verhältnis der beiden Subtypen liegt in den Vorhöfen bei 70:30 und in den Ventrikeln bei 80:20 (Brodde und Michel 1999).

Es wurden zwei funktionsrelevante Polymorphismen in dem  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor nachgewiesen. Die erste Mutation ist an der 49. Position der Aminosäuresequenz lokalisiert. Die Aminosäure Serin wird durch eine Punktmutation in der DNA ausgetauscht durch Glycin (Maqbool et al. 1999). Der 145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus befindet sich am extrazellulären aminoterminalen Abschnitt des Proteins. Er ist wichtig für die Lokalisation und das Falten des Rezeptors in der Zellmembran (Moore et al. 1999, Dixon et al. 1987a). Die 389. Aminosäure des Rezeptors ist das Arginin. Es wird ebenfalls durch eine Punktmutation in der DNA ausgetauscht durch das Glycin. Diese Region ist im

proximalen Abschnitt des Carboxyterminus situiert. Sie ist für die Kopplung des G-Proteins von Bedeutung (Maqbool et al. 1999, Moore et al. 1999, Tesson et al. 1999, Johnson et al. 2003, Small et al. 2003). Das Glycin bewirkt eine Unterbrechung der  $\alpha$ -Helixstruktur, was folglich zu einer Unterdrückung der agonistenbedingten Stimulation des Adenylylcyclase führt (Small et al. 2003).

Der 145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Rezeptorbesatzes auf der Herzmuskelzelle und beeinflusst die Aktivität der Adenylylcyclase. Liegt die Glycin-Variante vor, so ist eine deutlich stärkere Herunterregulation der  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren nachweislich. Außerdem ist eine höhere Aktivität der Adenylylcyclase unter Agonistenstimulation auffällig (Levin et al. 2002).

Das Glycin an der 389. Position verursacht eine Entkopplung des G-Proteins. Das führt zu einer verminderten cAMP-Bildung der Adenylylcyclase (Xie et al. 2001, Small et al. 2003). Das hat eine Verminderung der Chronotropie und Inotropie zur Folge (Bengtsson et al. 2001, Humma et al. 2001, La Rosee et al. 2004, Bruck et al. 2005). Die genannten Einflüsse der beiden Polymorphismen werden unter Noradrenalinstimulation auffällig. Das Hormon ist ein wichtiger Transmitter des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors und wird hauptsächlich über die Catechol-O-Methyltransferase abgebaut. Aus diesem Grund ist verständlich, dass verschiedene Enzymaktivitäten die Wirkung des Noradrenalins beeinflussen können. Die 158. Aminosäure ist entweder Valin oder Methionin. Liegt das Valin in homozygoter Form vor, so ist eine hohe Aktivität des Enzyms messbar. Das homozygote Methionin geht mit einem drei- bis vierfach niedrigeren Substratumsatz einher (Lotta et al. 1995, Lachman et al. 1996).

Um die Auswirkungen der Polymorphismen sicher nachweisen zu können wurde ein spezielles Patientenklientel ausgewählt. Alle Probanden waren fortgeschritten herzkrank, weshalb sie operiert werden mussten. 82,8% der Patienten wiesen zudem eine Herzinsuffizienz auf. Aufgrund des umfassenden operativen Eingriffes, der darauffolgenden intensiven Überwachungssituation und den vielen Comorbiditäten standen die Patienten unter einem sehr starken Stress. Diese Bedingungen sollten es ermöglichen verschiedene Polymorphismuseinflüsse auf den postoperativen Verlauf nachweisen zu können. Insbesondere der Catecholaminverbrauch, die

Liegezeiten auf den Überwachungsstationen und der Aufenthalt im Krankenhaus waren wichtige Einflussparameter.

An der Studie nahmen 116 Patienten teil. Sie wurden entweder aufgrund schwerer Herzklappenvitien oder wegen einer fortgeschrittenen koronaren Herzkrankheit operiert. Die durchschnittlich 63-jährigen Patienten litten an verschiedenen Comorbiditäten, zum Beispiel an einem Diabetes mellitus (25%), einer Hypertonie (69,8%), einer absoluten Arrhythmie (22,4%), einer Kardiomyopathie (7,8%) und einer Niereninsuffizienz (10,3%).

Präoperativ wurden die Blutproben entnommen. Dies erfolgte entweder in 20-minütiger Ruhelage des Probanden oder unmittelbar vor der Operation in Narkose. Unter diesen Bedingungen konnten sowohl äußere als auch innere Stressoren ausgeschaltet werden. Aus dem gewonnenen Blut wurde zum einen die DNA isoliert und zum anderen die Catecholaminplasmakonzentration mittels HPLC bestimmt. Die Bestimmung der Polymorphismen gelang über die Schmelzkurvenanalyse mittels FRET.

Es wurde anschließend der genaue postoperative Verlauf aufgezeichnet und ausgewertet. Nach der Operation wurden die Patienten entweder in den Aufwachraum oder auf die Intensivstation verlegt. Blieben die Patienten weiterhin überwachungspflichtig, wurden sie auf der Intermediate Care Station verlegt. Waren sie ausreichend stabil, gelangten sie auf die Normalstation. Während der intensiven medizinischen Versorgungsphase wurden oftmals kreislauf- und herzstabilisierende Catecholamine verabreicht, insbesondere Noradrenalin.

Die genannten Parameter wurden auf Einflüsse der 145A>G (Ser49Gly), 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptor- und 472G>A (Val158Met) COMT Polymorphismen untersucht.

Die Verteilung des 145A>G (Ser49Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus im Patientenkollektiv war wie folgt, 84,5% der Probanden waren homozygot für das 145AA (Ser49Ser) und 15,5% heterozygot. Es waren keine homozygoten 145GG (Gly49Gly) Träger nachweisbar. Das Arg389-Allel lag mit 52,6% am häufigsten in der homozygoten 1165CC Form vor. Heterozygot waren 37,9% und lediglich 9,5% waren homozygot für das 1165GG. Beide  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismen unterlagen

dem Hardy Weinberg Equilibrium. Die Verteilung des COMT-Polymorphismus war ausgeglichen. 31,9% waren homozygote 472GG (Val158Val) Träger und wiesen somit die hochaktive Enzyform auf. 36,2% waren heterozygot und 31,9% homozygot für Methionin (472AA). Es zeigte sich außerdem eine Abweichung des Verteilungsmusters des Studienkollektivs von der Allgemeinbevölkerung nach Hardy Weinberg ( $p = 0,003$ ).

Es konnten Zusammenhänge der drei Polymorphismen mit dem Noradrenalinverbrauch und dem Gesamtcatecholaminverbrauch festgestellt werden. Patienten mit dem 1165G/X (Gly389/X) benötigten mehr Noradrenalin beziehungsweise Gesamtcatecholamine zur Kreislaufstabilisierung als die Träger des 1165CC (Arg389Arg) ( $p = 0,001$  beziehungsweise  $p = 0,011$ ). Ebenso bestand ein geringerer Bedarf bei den 145AA (Ser49Ser) Trägern als bei den Patienten mit dem 145G/X (Gly49/X) ( $p = 0,001$  und  $p = 0,03$ ). Die methioninenthaltene COMT ist die langsam metabolisierende Enzymform. Demzufolge wurde diesen Probanden weniger unter anderem Noradrenalin verabreicht als den schnellen Metabolisierern ( $p < 0,001$ ).

Die Liegezeiten auf der Intermediate Care Station und der Intensivstation wurden nicht von den Polymorphismen beeinflusst. Wahrscheinlich waren die Schwere und der Verlauf der Operation, der Operateur und die logistischen Bedingungen vordergründig.

Der gesamte Krankenhausaufenthalt war möglicherweise von dem 1165G>C (Arg389Gly)  $\beta_1$ -Adrenorezeptorpolymorphismus abhängig. Patienten mit dem 1165CC (Arg389Arg) lagen länger im Herzzentrum als die 1165G/X (Gly389Gly) Träger ( $p = 0,01$ ). Ebenso war signifikant nachweisbar, dass das 145G/X (Gly49/X) mit einem längeren Aufenthalt verbunden war als das 145AA (Ser49Ser) ( $p = 0,01$ ). Die verschiedenen COMT-Aktivitäten hatten keine Einflüsse.

Die präoperative Adrenalinplasmakonzentration unterlag keiner Polymorphismusbeeinflussung. Der präoperative Noradrenalinplasmaspiegel schien von dem COMT-Polymorphismus beeinflusst zu werden. Patienten mit dem 472A/X (Met158/X) hatten eine signifikant niedriger NoradrenalinKonzentration im Plasma als die Träger des 472GG (Val158Val) ( $p = 0,002$ ).

Ein weiterer Teil der Analyse bestand darin, die genannten Einflussvariablen mit den SNP-Kombinationen zu vergleichen. Hierbei stellte sich heraus, dass sich unter Betrachtung der Kombinationen die zuvor berechneten Signifikanzen verloren. Es zeigte sich ein nahezu einheitliches Verteilungsmuster des Noradrenalinverbrauchs, des Gesamtcatecholaminverbrauchs, des Krankenhausaufenthalts und des präoperativen Noradrenalinplasmaspiegels. Vereinzelt exorbitant erhöhte Werte führten zunächst in den Analysen zu der Annahme einer signifikanten Polymorphismusbeeinflussung. Demzufolge hatten die Polymorphismen, anders als es der erste Eindruck vermittelte, keinen Einfluss auf die Liegezeiten, den Noradrenalinverbrauch, den Gesamtcatecholaminverbrauch und den Noradrenalinplasmaspiegel.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Betrachtung der SNP-Kombinationen oder der Haplotypen (eine bestimmte Kombination von Allelen auf einem Chromosom oder einem Teil eines Chromosoms (International HapMap Consortium 2003)), wie es Brodde et al und Hoehe et al. beschrieben, ein wichtiger Bestandteil von Polymorphismusanalysen sein sollte (wie es bereits Hoehe et al. 2002 und Brodde et al. 2006 beschrieben), um genetische Risiken korrekt zu interpretieren und keine Risiken in Datensätze hineinzuzinterpretieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- (1) Ahlquist RP. (1973) Adrenergic receptors: a personal and practical view. *Perspect Biol Med.* 17(1):119-22.
- (2) Alousi AA, Jasper JR, Insel PA, Motulsky HJ. (1991) Stoichiometry of receptor-Gs adenylate cyclase interactions. *FASEB J.* 5(9):2300-3.
- (3) Asshauer J, Ullner H. (1986) Quantitative Analyse. In: Meyer VR. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.* 8.Auflage. Frankfurt am Main, Aarau, Salzburg: Salle und Sauerländer. 217-220.
- (4) Axelrod J. (1957) O-Methylation of epinephrine and other catechols in vitro and in vivo. *Science.* 126(3270):400-1.
- (5) Axelrod J, Senoh S, Witkop B. O-Methylation of catechol amines in vivo. (1958) *J Biol Chem.* 233(3):697-701.
- (6) Axelrod J, Tomchick R. Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. (1958) *J Biol Chem.* 233(3):702-5.
- (7) Bauersfeld W, Ratge D, Knoll E, Wisser H. (1986) Determination of catecholamines in plasma by HPLC and amperometric detection. Comparison with a radioenzymatic method. *J Clin Chem Clin Biochem.* 24(3):185-8.
- (8) Benedict CR, Fillenz M, Stanford C. (1978) Changes in plasma noradrenaline concentration as a measure of release rate. *Br J Pharmacol.* 64(2):305-9.
- (9) Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Ranstam J, Råstam L, Groop L. (2001) Polymorphism in the beta(1)-adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation.* 104(2):187-90.
- (10) Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem.* 260(11):7094-101.
- (11) Börjesson M, Magnusson Y, Hjalmarsen A, Andersson B. (2000) A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J.* 21(22):1853-8.
- (12) Boudíková B, Szumlanski C, Maidak B, Weinshilboum R. (1990) Human liver catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther.* 48(4):381-9.

- (13) Bouloux PM, Perrett D. (1985) Interference of labetalol metabolites in the determination of plasma catecholamines by HPLC with electrochemical detection. *Clin Chim Acta.* 150(2):111-7.
- (14) Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S. (1986) Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res.* 59(3):297-309.
- (15) Bristow MR, Minobe WA, Raynolds MV, Port JD, Rasmussen R, Ray PE, Feldman AM. (1993) Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest.* 92(6):2737-45.
- (16) Brodde OE. (1988) The functional importance of beta 1 and beta 2 adrenoceptors in the human heart. *Am J Cardiol.* 62(5):24C-29C.
- (17) Brodde OE. (2008) Beta1- and beta2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. *Fundam Clin Pharmacol.* 22(2):107-25.
- (18) Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. (2006) Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci.* 100(5):323-37.
- (19) Brodde OE, Michel MC. (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev.* 51(4):651-90.
- (20) Brodde OE, Stein CM. (2003) The Gly389Arg beta1-adrenergic receptor polymorphism: a predictor of response to beta-blocker treatment? *Clin Pharmacol Ther.* 74(4):299-302.
- (21) Bruck H, Leineweber K, Temme T, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. (2005) The Arg389Gly beta1-adrenoceptor polymorphism and catecholamine effects on plasma-renin activity. *J Am Coll Cardiol.* 46(11):2111-5.
- (22) Büscher R, Belger H, Eilmes KJ, Tellkamp R, Radke J, Dhein S, Hoyer PF, Michel MC, Insel PA, Brodde OE. (2001) In-vivo studies do not support a major functional role for the Gly389Arg beta 1-adrenoceptor polymorphism in humans. *Pharmacogenetics.* 11(3):199-205.
- (23) Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U. (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46(2):121-36.
- (24) Cagliani R, Fumagalli M, Pozzoli U, Riva S, Comi GP, Torri F, Macchiardi F, Bresolin N, Sironi M. (2009) Diverse evolutionary histories for beta-adrenoreceptor genes in humans. *Am J Hum Genet.* 85(1):64-75.

- (25) Campbell NR, Dunnette JH, Mwaluko G, Van Loon J, Weinshilboum RM. (1984) Platelet phenol sulfotransferase and erythrocyte catechol-O-methyltransferase activities: correlation with methyl dopa metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 35(1):55-63.
- (26) Campeau Lucien. (1976) Grading of angina pectoris. *Circulation.* 54:5223
- (27) Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(23):8790-4.
- (28) Cassel D, Selinger Z. (1978) Mechanism of adenylate cyclase activation through the beta-adrenergic receptor: catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(9):4155-9.
- (29) [http://www.ccs.ca/download/position\\_statements/Grading%20of%20Angina.pdf](http://www.ccs.ca/download/position_statements/Grading%20of%20Angina.pdf)
- (30) Cerione RA, Strulovici B, Benovic JL, Strader CD, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1983) Reconstitution of beta-adrenergic receptors in lipid vesicles: affinity chromatography-purified receptors confer catecholamine responsiveness on a heterologous adenylate cyclase system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(16):4899-903.
- (31) Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR. (2004) Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet.* 75(5):807-21.
- (32) Chromsystems München 1999
- (33) Clapham DE, Neer EJ. (1993) New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature.* 365(6445):403-6.
- (34) ClinLab® Instruction Manual for the Digital Electrochemical Detector EC 3000. (2001) Chemicals und Instruments GmbH Labortechnik. München.
- (35) Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. (1984) Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl. J Med.* 311(13):819-23.
- (36) Cooke N. (1987) Affinitätschromatographie. In: Meyer. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.* 9. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. 226.
- (37) Corne SJ, Graham JD. (1957) The effect of inhibition of amine oxidase in vivo on administered adrenaline, noradrenaline, tyramine and serotonin. *J Physiol.* 135(2):339-49.

- (38) Davies MN, Secker A, Halling-Brown M, Moss DS, Freitas AA, Timmis J, Clark E, Flower DR. (2008) GPCRTree: online hierarchical classification of GPCR function. *BMC Res Notes*. 1:67.
- (39) Defoor J, Martens K, Zielinska D, Matthijs G, Van Nerum H, Schepers D, Fagard R, Vanhees L. (2006) The CAREGENE study: polymorphisms of the beta1-adrenoceptor gene and aerobic power in coronary artery disease. *Eur Heart J*. 27(7):808-16.
- (40) del Monte F, Kaumann AJ, Poole-Wilson PA, Wynne DG, Pepper J, Harding SE. (1993) Coexistence of functioning beta 1- and beta 2-adrenoceptors in single myocytes from human ventricle. *Circulation*. 88(3):854-63.
- (41) Dimsdale JE, Moss J. (1980) Plasma catecholamines in stress and exercise. *JAMA*. 243(4):340-2.
- (42) a) Dixon RA, Sigal IS, Candelore MR, Register RB, Scattergood W, Rands E, Strader CD. (1987) Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *EMBO J*. 6(11):3269-75.
- (43) b) Dixon RA, Sigal IS, Rands E, Register RB, Candelore MR, Blake AD, Strader CD. (1987) Ligand binding to the beta-adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature*. 326(6108):73-7.
- (44) Engelhardt S, Böhm M, Erdmann E, Lohse MJ. (1996) Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 27(1):146-54.
- (45) Eppert GJ. 1997. Flüssigchromatographie HPLC-Theorie und Praxis. 3. Auflage. Braunschweig, Wiesbaden: Vieweg Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1, 131.
- (46) Eriksson AL, Skrtic S, Niklason A, Hultén LM, Wiklund O, Hedner T, Ohlsson C. (2004) Association between the low activity genotype of catechol-O-methyltransferase and myocardial infarction in a hypertensive population. *Eur Heart J*. 25(5):386-91.
- (47) Esler M, Jennings G, Lambert G, Meredith I, Horne M, Eisenhofer G. (1990) Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiol Rev*. 70(4):963-85.
- (48) Euroscoreberechnung:  
<http://www.euroscore.org/calcold.html>
- (49) Folkow B, Svanborg A. (1993) Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev*. 73(4):725-64.
- (50) Forleo C, Resta N, Sorrentino S, Guida P, Manghisi A, De Luca V, Romito R, Iacoviello M, De Tommasi E, Troisi F, Rizzon B, Guanti G, Rizzon P, Pitzalis MV. (2004) Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and

- progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med.* 117(7):451-8.
- (51) Francis GS, Cohn JN. (1986) The autonomic nervous system in congestive heart failure. *Annu Rev Med.* 37:235-47
- (52) Freissmuth M, Casey PJ, Gilman AG. (1989) G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J.* 3(10):2125-31.
- (53) Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(22):7920-4.
- (54) Gibson UE, Heid CA, Williams PM. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6(10):995-1001.
- (55) Gilman AG. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 56:615-49.
- (56) Grossman MH, Emanuel BS, Budarf ML. (1992) Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1----q11.2. *Genomics.* 12(4):822-5.
- (57) Hagen K, Stovner LJ, Skorpen F, Pettersen E, Zwart JA. (2007) The impact of the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism on survival in the general population--the HUNT study. *BMC Med Genet.* 8:34.
- (58) Hanna C. (1965) Metabolism of catecholamines. *Invest Ophthalmol.* 4(6):1095-104.
- (59) Hardy GH. (2003) Mendelian proportions in a mixed population. 1908. *Yale J Biol Med.* 76(2):79-80.
- (60) Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI. (1986) Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation.* 73(4):615-21.
- (61) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10):986-94.
- (62) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 10(4):413-7.
- (63) Hill SJ. (2006) G-protein-coupled receptors: past, present und future. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1:S27-37.
- (64) Hoebeke J. (1996) Structural basis of autoimmunity against G protein coupled membrane receptors. *Int J Cardiol.* 54(2):103-11

- (65) Hoehe M, Timmermann B, Lehrach H. (2002) Haplotypen und die systematische Analyse genetischer Variationen: Krankheitsgene, „Drug Targets“ und Pharmakogenomik. *BIOspektrum*. Sonderausgabe. 8. Jahrgang: 487-485.
- (66) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(16):7276-80.
- (67) Humma LM, Puckett BJ, Richardson HE, Terra SG, Andrisin TE, Lejeune BL, Wallace MR, Lewis JF, McNamara DM, Picoult-Newberg L, Pepine CJ, Johnson JA. (2001) Effects of beta1-adrenoceptor genetic polymorphisms on resting hemodynamics in patients undergoing diagnostic testing for ischemia. *Am J Cardiol*. 88(9):1034-7.
- (68) Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(24):9436-40.
- (69) Insel PA. (1996) Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors--evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med*. 334(9):580-5.
- (70) International HapMap Consortium. (2003) The International HapMap Project. *Nature*. 426(6968):789-96.
- (71) Iversen LL. (1965) The uptake of adrenaline by the rat isolated heart. *Br J Pharmacol Chemother*. 24:387-94.
- (72) Iwai C, Akita H, Kanazawa K, Shiga N, Terashima M, Matsuda Y, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kajiya T, Hayashi T, Yokoyama M. (2003) Arg389Gly polymorphism of the human beta1-adrenergic receptor in patients with nonfatal acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 146(1):106-9.
- (73) Iwai C, Akita H, Shiga N, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kawai H, Takarada A, Kajiya T, Yokoyama M. (2002) Suppressive effect of the Gly389 allele of the beta1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J*. 66(8):723-8.
- (74) Jarrott B. (1970) Uptake and metabolism of catecholamines in the perfused hearts of different species. *Br J Pharmacol*. 38(4):810-21.
- (75) Johnson JA, Lima JJ. (2003) Drug receptor/effector polymorphisms and pharmacogenetics: current status and challenges. *Pharmacogenetics*. 13(9):525-34.
- (76) Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, McGorray SP, Yarandi HN, Pauly DF. (2003) Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther*. 74(1):44-52.

- (77) Jones K. (1991) Affinitätschromatographie. In: Meyer. Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. 9. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. 226.
- (78) Kallal L, Gagnon AW, Penn RB, Benovic JL. (1998) Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 273(1):322-8.
- (79) Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Julkunen I, Panula P. (1994) Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues. *J Histochem Cytochem.* 42(8):1079-90.
- (80) Katz E. (1987) Quantitative Analyse. In: Meyer VR. Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. 8. Auflage. Frankfurt am Main, Aarau, Salzburg: Salle und Sauerländer. 217-220.
- (81) Kaumann AJ, Hall JA, Murray KJ, Wells FC, Brown MJ. (1989) A comparison of the effects of adrenaline and noradrenaline on human heart: the role of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the stimulation of adenylate cyclase and contractile force. *Eur Heart J.* 10 Suppl B:29-37.
- (82) Kaumann AJ, Molenaar P. (1997) Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 355(6):667-81.
- (83) Knauer. Advanced Scientific Instruments. Berlin.
- (84) Knauer. Clin Lab® Amperometric Detector Model EC3000. Berlin.
- (85) Koehl P, Levitt M. (1999) Structure-based conformational preferences of amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22):12524-9.
- (86) Kohout TA, Lefkowitz RJ. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol.* 63(1):9-18.
- (87) Kunugi H, Nanko S, Ueki A, Otsuka E, Hattori M, Hoda F, Vallada HP, Arranz MJ, Collier DA. (1997) High and low activity alleles of catechol-O-methyltransferase gene: ethnic difference and possible association with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 221(2-3):202-4.
- (88) LaBrosse EH, Axelrod J, Kety SS. (1958) O-Methylation, the principal route of metabolism of epinephrine in man. *Science.* 128(3324):593-4.
- (89) Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics.* 6(3):243-50.
- (90) Lakatta EG. (1993) Deficient neuroendocrine regulation of the cardiovascular system with advancing age in healthy humans. *Circulation.* 87(2):631-6.

- (91) La Rosée K, Huntgeburth M, Rosenkranz S, Böhm M, Schnabel P. (2004) The Arg389Gly beta1-adrenoceptor gene polymorphism determines contractile response to catecholamines. *Pharmacogenetics*. 14(11):711-6.
- (92) Lay MJ, Wittwer CT. (1997) Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem*. 43(12):2262-7.
- (93) Leenen FH, Davies RA, Fourney A. (1998) Catecholamines and heart function in heart transplant patients: effects of beta1- versus nonselective beta-blockade. *Clin Pharmacol Ther*. 64(5):522-35.
- (94) Lefkowitz RJ. (2007) Seven transmembrane receptors: a brief personal retrospective. *Biochim Biophys Acta*. 1768(4):748-55.
- (95) Lefkowitz RJ, Stadel JM, Caron MG. (1983) Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization. *Annu Rev Biochem*. 52:159-86.
- (96) Leineweber K, Bogedain P, Wolf C, Wagner S, Weber M, Jakob HG, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. (2007) In patients chronically treated with metoprolol, the demand of inotropic catecholamine support after coronary artery bypass grafting is determined by the Arg389Gly-beta 1-adrenoceptor polymorphism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 375(5):303-9.
- (97) Leineweber K, Bruck H, Temme T, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. (2006) The Arg389Gly beta1-adrenoceptor polymorphism does not affect cardiac effects of exercise after parasympathetic inhibition by atropine. *Pharmacogenet Genomics*. 16(1):9-13.
- (98) Leineweber K, Büscher R, Bruck H, Brodde OE. (2004) Beta-adrenoceptor polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 369(1):1-22.
- (99) Levin EY, Kaufman S. (1961) Studies on the enzyme catalyzing the conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J Biol Chem*. 236:2043-9.
- (100) Levin EY, Levenberg B, Kaufman S. (1960) The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J Biol Chem*. 235:2080-6.
- (101) Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B, Magnusson Y. (2002) The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem*. 277(34):30429-35.
- (102) Levine M. (1986) Ascorbic acid specifically enhances dopamine beta-monooxygenase activity in resting and stimulated chromaffin cells. *J Biol Chem*. 261(16):7347-56.

- (103) Levine M, Morita K, Heldman E, Pollard HB. (1985) Ascorbic acid regulation of norepinephrine biosynthesis in isolated chromaffin granules from bovine adrenal medulla. *J Biol Chem.* 260(29):15598-603.
- (104) Liggett SB. (2001) Beta-adrenergic receptors in the failing heart: the good, the bad, and the unknown. *J Clin Invest.* 107(8):947-8.
- (105) Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, Nelson B, Morrison J, Domanski MJ, Wagoner LE, Abraham WT, Anderson JL, Carlquist JF, Krause-Steinrauf HJ, Lazzeroni LC, Port JD, Lavori PW, Bristow MR. (2006) A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(30):11288-93.
- (106) Lightman SL, Iversen LL. (1969) The role of uptake<sub>2</sub> in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol.* 37(3):638-49.
- (107) Lindsay S. (1992) Quantitative Analyse. In: Meyer VR. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.* 8. Auflage. Frankfurt am Main, Aarau, Salzburg: Salle und Sauerländer. 217-220.
- (108) Liu J, Liu ZQ, Tan ZR, Chen XP, Wang LS, Zhou G, Zhou HH. (2003) Gly389Arg polymorphism of beta1-adrenergic receptor is associated with the cardiovascular response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther.* 74(4):372-9.
- (109) Liu J, Liu ZQ, Yu BN, Xu FH, Mo W, Zhou G, Liu YZ, Li Q, Zhou HH. (2006) beta1-Adrenergic receptor polymorphisms influence the response to metoprolol monotherapy in patients with essential hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 80(1):23-32.
- (110) Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4(6):357-62.
- (111) Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melén K, Julkunen I, Taskinen J. (1995) Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry.* 34(13):4202-10.
- (112) Löffler G, Petrides PE. 2003. *Biochemie und Pathobiochemie.* 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 854.
- (113) López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjekshus J, Lechat P, Torp-Pedersen C; Task Force On Beta-Blockers of the European Society of Cardiology. (2004) Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J.* 25(15):1341-62.

- (114) Lundström K, Salminen M, Jalanko A, Savolainen R, Ulmanen I. (1991) Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol.* 10(3):181-9.
- (115) Lundström K, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P, Ulmanen I. (1995) Cloning, expression and structure of catechol-O-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 1251(1):1-10.
- (116) Magnusson Y, Levin MC, Eggertsen R, Nyström E, Mobini R, Schaufelberger M, Andersson B. (2005) Ser49Gly of beta1-adrenergic receptor is associated with effective beta-blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 78(3):221-31.
- (117) Männistö PT, Kaakkola S. (1999) Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev.* 51(4):593-628.
- (118) Maqbool A, Hall AS, Ball SG, Balmforth AJ. (1999) Common polymorphisms of beta1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *Lancet.* 353(9156):897.
- (119) Martin AJP, Synge RLM. (1941) HPLC: Eine leistungsfähige Trennmethode. In: Meyer. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.* 9. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. 4.
- (120) Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. (1999) A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 274(18):12670-4.
- (121) McCaffery JM, Pogue-Geile MF, Ferrell RE, Petro N, Manuck SB. (2002) Variability within alpha- and beta-adrenoreceptor genes as a predictor of cardiovascular function at rest and in response to mental challenge. *J Hypertens.* 20(6):1105-14.
- (122) McDevitt DG. (1989) In vivo studies on the function of cardiac beta-adrenoceptors in man. *Eur Heart J.* 10 Suppl B:22-8.
- (123) McDowell DG, Burns NA, Parkes HC. (1998) Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* 26(14):3340-7.
- (124) McLeod HL, Fang L, Luo X, Scott EP, Evans WE. (1994) Ethnic differences in erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in black and white Americans. *J Pharmacol Exp Ther.* 270(1):26-9.
- (125) Meyer VR. 1999. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.* 8. Auflage. Frankfurt am Main, Aarau, Salzburg: Salle und Sauerländer. 13, 18-20, 76-77, 88, 130-144, 165.

- (126) Meyer VR. 2004. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 9. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 9, 22, 61, 77-78, 84-95, 108, 113-120, 148, 160, 184-196.
- (127) Mialet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, Hahn HS, Wagoner LE, Schwartz A, Dorn GW, Liggett SB. (2003) Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med.* 9(10):1300-5.
- (128) Middlekauff HR, Mark AL. (1998) The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. *Intern Med.* 37(2):112-22.
- (129) Molenaar P, Rabnott G, Yang I, Fong KM, Savarimuthu SM, Li L, West MJ, Russell FD. (2002) Conservation of the cardiostimulant effects of (-)-norepinephrine across Ser49Gly and Gly389Arg beta(1)-adrenergic receptor polymorphisms in human right atrium in vitro. *J Am Coll Cardiol.* 40(7):1275-82.
- (130) Molinoff PB. (1984) Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs.* 28 Suppl 2:1-15.
- (131) Moore JD, Mason DA, Green SA, Hsu J, Liggett SB. (1999) Racial differences in the frequencies of cardiac beta(1)-adrenergic receptor polymorphisms: analysis of c145A>G and c1165G>C. *Hum Mutat.* 14(3):271.
- (132) Mülhardt C. 2006. Der Experimentator Molekularbiologie/ Genomics. 5. Auflage. München: Spektrum Akademischer Verlag ein Inprint der Elsevier GmbH. 80-90.
- (133) Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. (1964) Tyrosine Hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem.* 239:2910-7.
- (134) Nawrocki J. (1997) Silicagel. In: Meyer. Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. 9. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. 116.
- (135) Nette AF, Abraham G, Ungemach FR, Oertel R, Kirch W, Leineweber K, Mohr FW, Dhein S. (2005) Interaction between simvastatin and metoprolol with respect to cardiac beta-adrenoceptor density, catecholamine levels and perioperative catecholamine requirements in cardiac surgery patients. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 372(2):115-24.
- (136) New York Heart Association (NYHA). 1994. [http://my.americanheart.org/professional/StatementsGuidelines/ByPublicationDate/PreviousYears/Classification-of-Functional-Capacity-and-Objective-Assessment\\_UCM\\_423811\\_Article.jsp](http://my.americanheart.org/professional/StatementsGuidelines/ByPublicationDate/PreviousYears/Classification-of-Functional-Capacity-and-Objective-Assessment_UCM_423811_Article.jsp)
- (137) Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P. (1991) Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res.* 68(6):1560-8.

- (138) O'Shaughnessy KM, Fu B, Dickerson C, Thurston D, Brown MJ. (2000) The gain-of-function G389R variant of the beta1-adrenoceptor does not influence blood pressure or heart rate response to beta-blockade in hypertensive subjects. *Clin Sci (Lond)*. 99(3):233-8.
- (139) Packer M. (1992) Pathophysiology of chronic heart failure. *Lancet*. 340(8811):88-92.
- (140) Palmatier MA, Kang AM, Kidd KK. (1999) Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol Psychiatry*. 46(4):557-67.
- (141) Pedersen SE, Ross EM. (1982) Functional reconstitution of beta-adrenergic receptors and the stimulatory GTP-binding protein of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79(23):7228-32.
- (142) Podlowski S, Wenzel K, Luther HP, Müller J, Bramlage P, Baumann G, Felix SB, Speer A, Hetzer R, Köpke K, Hoehe MR, Wallukat G. (2000) Beta1-adrenoceptor gene variations: a role in idiopathic dilated cardiomyopathy? *J Mol Med (Berl)*. 78(2):87-93.
- (143) Post SR, Hilal-Dandan R, Urasawa K, Brunton LL, Insel PA. (1995) Quantification of signalling components and amplification in the beta-adrenergic-receptor-adenylate cyclase pathway in isolated adult rat ventricular myocytes. *Biochem J*. 311 (Pt 1):75-80.
- (144) Raeymaekers L. (1995) A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Res*. 5(1):91-4.
- (145) Ranade K, Jorgenson E, Sheu WH, Pei D, Hsiung CA, Chiang FT, Chen YD, Pratt R, Olshen RA, Curb D, Cox DR, Botstein D, Risch N. (2002) A polymorphism in the beta1 adrenergic receptor is associated with resting heart rate. *Am J Hum Genet*. 70(4):935-42.
- (146) Ransnäs LA, Insel PA. (1988) Subunit dissociation is the mechanism for hormonal activation of the Gs protein in native membranes. *J Biol Chem*. 263(33):17239-42.
- (147) Rathz DA, Brown KM, Kramer LA, Liggett SB. (2002) Amino acid 49 polymorphisms of the human beta1-adrenergic receptor affect agonist-promoted trafficking. *J Cardiovasc Pharmacol*. 39(2):155-60.
- (148) Rathz DA, Gregory KN, Fang Y, Brown KM, Liggett SB. (2003) Hierarchy of polymorphic variation and desensitization permutations relative to beta 1- and beta 2-adrenergic receptor signaling. *J Biol Chem*. 278(12):10784-9.
- (149) Rodefeld MD, Beau SL, Schuessler RB, Boineau JP, Saffitz JE. (1996) Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 7(11):1039-49.

- (150) Sábato MF, Irani AM, Bukaveckas BL, Schwartz LB, Wilkinson DS, Ferreira-Gonzalez A. (2008) A simple and rapid genotyping assay for simultaneous detection of two ADRB2 allelic variants using fluorescence resonance energy transfer probes and melting curve analysis. *J Mol Diagn.* 10(3):258-64.
- (151) Sandilands AJ, O'Shaughnessy KM. (2005) The functional significance of genetic variation within the beta-adrenoceptor. *Br J Clin Pharmacol.* 60(3):235-43.
- (152) Sandilands AJ, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. (2003) Greater inotropic and cyclic AMP responses evoked by noradrenaline through Arg389 beta 1-adrenoceptors versus Gly389 beta 1-adrenoceptors in isolated human atrial myocardium. *Br J Pharmacol.* 138(2):386-92.
- (153) Sandilands A, Yeo G, Brown MJ, O'Shaughnessy KM. (2004) Functional responses of human beta1 adrenoceptors with defined haplotypes for the common 389R>G and 49S>G polymorphisms. *Pharmacogenetics.* 14(6):343-9.
- (154) Sauer M, Tews J, Schwarzer M, Seeburger J, Adams V, Falk V, Dhein S, Mohr FW. (2009) Rapid detection of the R389G polymorphism of ADRB1 by real time PCR using fluorescence resonance energy transfer. *Clin Lab.* 55(3-4):128-36.
- (155) Scanlon PD, Raymond FA, Weinshilboum RM. (1979) Catechol-O-methyltransferase: thermolabile enzyme in erythrocytes of subjects homozygous for allele for low activity. *Science.* 203(4375):63-5.
- (156) Schröder F, Herzig S. (1999) Effects of beta2-adrenergic stimulation on single-channel gating of rat cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Am J Physiol.* 276(3 Pt 2):H834-43.
- (157) Schultz E, Nissinen E. (1989) Inhibition of rat liver and duodenum soluble catechol-O-methyltransferase by a tight-binding inhibitor OR-462. *Biochem Pharmacol.* 38(22):3953-6.
- (158) Seals DR, Esler MD. (2000) Human ageing and the sympathoadrenal system. *J Physiol.* 528(Pt 3):407-17.
- (159) Seaver C, Sadek P. (1994) Auswahl der mobilen Phase. In: Meyer. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.* 9. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. 61.
- (160) Small KM, McGraw DW, Liggett SB. (2003) Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43:381-411.
- (161) Snapir A, Koskenvuo J, Toikka J, Orho-Melander M, Hinkka S, Saraste M, Hartiala J, Scheinin M. (2003) Effects of common polymorphisms in the

- alpha1A-, alpha2B-, beta1- and beta2-adrenoreceptors on haemodynamic responses to adrenaline. *Clin Sci (Lond)*. 104(5):509-20.
- (162) Sofowora GG, Dishy V, Muszkat M, Xie HG, Kim RB, Harris PA, Prasad HC, Byrne DW, Nair UB, Wood AJ, Stein CM. (2003) A common beta1-adrenergic receptor polymorphism (Arg389Gly) affects blood pressure response to beta-blockade. *Clin Pharmacol Ther*. 73(4):366-71.
- (163) Stanton T, Inglis GC, Padmanabhan S, Dominiczak AF, Jardine AG, Connell JM. (2002) Variation at the beta-1 adrenoceptor gene locus affects left ventricular mass in renal failure. *J Nephrol*. 15(5):512-8.
- (164) Steinberg SF. (1999) The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res*. 85(11):1101-11.
- (165) Stellwagen NC. (2009) Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis. Suppl 1*:S188-95., doi: 10.1002/elps.200900052.
- (166) Stellwagen NC, Stellwagen E. (2009) Effect of the matrix on DNA electrophoresis mobility. *J Chromatogr A*. 1216(10):1917-29, doi:10.1016/j.chroma. 2008.11.090.
- (167) Stiles GL, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1984) Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiol Rev*. 64(2):661-743.
- (168) Stryer L, Haugland RP. (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 58(2):719-26.
- (169) Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. (1990) Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation*. 82(5):1730-6.
- (170) Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. (1994) Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem*. 223(3):1049-59.
- (171) Terra SG, Hamilton KK, Pauly DF, Lee CR, Patterson JH, Adams KF, Schofield RS, Belgado BS, Hill JA, Aranda JM, Yarandi HN, Johnson JA. (2005) Beta1-adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling changes in response to beta-blocker therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 15(4):227-34.
- (172) Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, Poirier O, Desnos M, Jullières Y, Amouyel P, Roizès G, Dorent R, Schwartz K, Komajda M. (1999) Characterization of a unique genetic variant in the beta1-adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. CARDIGENE Group. *J Mol Cell Cardiol*. 31(5):1025-32.

- (173) Thomas L. (1988) Labor und Diagnose. 3. Auflage. Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg.
- (174) Ulmanen I, Lundström K. (1991) Cell-free synthesis of rat and human catechol O-methyltransferase. Insertion of the membrane-bound form into microsomal membranes in vitro. *Eur J Biochem.* 202(3):1013-20.
- (175) Ulmanen I, Peränen J, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P, Bernasconi L, Aubry JP, Lundström K. (1997) Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *Eur J Biochem.* 243(1-2):452-9.
- (176) Ulucan C, Cetintas V, Tetik A, Eroglu Z, Kayikcioglu M, Can LH, Payzin S, Aydin M, Hasdemir C. (2008) Beta1 and beta2-adrenergic receptor polymorphisms and idiopathic ventricular arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 19(10):1053-8.
- (177) Unger KK. (1979) Silicagel. In: Meyer. Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. 9. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. 116.
- (178) Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. (1993) Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation.* 87(2):454-63.
- (179) van Campen LC, Visser FC, Visser CA. (1998) Ejection fraction improvement by beta-blocker treatment in patients with heart failure: an analysis of studies published in the literature. *J Cardiovasc Pharmacol.* 32 Suppl 1:S31-5.
- (180) van der Hoorn FA, Boomsma F, Man in 't Veld AJ, Schalekamp MA. (1989) Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography: comparison between a new method with fluorescence detection and an established method with electrochemical detection. *J Chromatogr.* 487(1):17-28.
- (181) Vieira-Coelho MA, Soares-da-Silva P. (1996) Ontogenic aspects of liver and kidney catechol-O-methyltransferase sensitivity to tolcapone. *Br J Pharmacol.* 117(3):516-520.
- (182) Vidgren J, Svensson LA, Liljas A. (1994) Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature.* 368(6469):354-8.
- (183) Voutilainen S, Tuomainen TP, Korhonen M, Mursu J, Virtanen JK, Happonen P, Alfthan G, Erlund I, North KE, Mosher MJ, Kauhanen J, Tiihonen J, Kaplan GA, Salonen JT. (2007) Functional COMT Val158Met polymorphism, risk of acute coronary events and serum homocysteine: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *PLoS One.* 2(1):e181.

- (184) Wagoner LE, Craft LL, Zengel P, McGuire N, Rathz DA, Dorn GW 2nd, Liggett SB. (2002) Polymorphisms of the beta1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *Am Heart J.* 144(5):840-6.
- (185) Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 6(11):3543-57.
- (186) Wallukat G. (2002) The beta-adrenergic receptors. *Herz.* 27(7):683-90.
- (187) Walsh DA, Van Patten SM. (1994) Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J.* 8(15):1227-36.
- (188) Walters RR. (1985) Affinitätschromatographie. In: Meyer. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.* 9. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. 226.
- (189) Waltman S, Sears M. (1964) Catechol-O-methyl transferase and monoamine oxidase activity in the ocular tissues of albino rabbits. *Invest Ophthalmol.* 3:601-5.
- (190) Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, Schertler GF. (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 454(7203):486-91.
- (191) Weicker H, Feraudi M, Hägele H, Pluto R. (1984) Electrochemical detection of catecholamines in urine and plasma after separation with HPLC. *Clin Chim Acta.* 141(1):17-25.
- (192) Weinshilboum RM. (1984) Human pharmacogenetics of methyl conjugation. *Fed Proc.* 15;43(8):2303-7.
- (193) Weinshilboum RM, Dunnette J. (1981) Thermal stability and the biochemical genetics of erythrocyte catechol-O-methyl-transferase and plasma dopamine-beta-hydroxylase. *Clin Genet.* 19(5):426-37.
- (194) Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. (1999) Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39: 19-52.
- (195) Weinshilboum RM, Raymond FA. (1977) Inheritance of low erythrocyte catechol-o-methyltransferase activity in man. *Am J Hum Genet.* 29(2):125-35.
- (196) White HL, Maqbool A, McMahon AD, Yates L, Ball SG, Hall AS, Balmforth AJ. (2002) An evaluation of the beta-1 adrenergic receptor Arg389Gly polymorphism in individuals at risk of coronary events. A WOSCOPS substudy. *Eur Heart J.* 23(14):1087-92.

- (197) Wilfingseder D, Stoiber H. Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCRVerfahren.2002.www.antibiotikamonitor.at/12\_02/12\_02\_06.htm.
- (198) Winqvist R, Lundström K, Salminen M, Laatikainen M, Ulmanen I. (1992) The human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene maps to band q11.2 of chromosome 22 and shows a frequent RFLP with BglI. Cytogenet Cell Genet. 59(4):253-7.
- (199) Xie HG, Dishy V, Sofowora G, Kim RB, Landau R, Smiley RM, Zhou HH, Wood AJ, Harris P, Stein CM. (2001) Arg389Gly beta 1-adrenoceptor polymorphism varies in frequency among different ethnic groups but does not alter response in vivo. Pharmacogenetics. 11(3):191-7.

### **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Name: Julia Tews  
Geburtsdaten: 13.10.1986 in Schkeuditz  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## **beruflicher Werdegang**

seit Dez. 2012 Assistenzärztin für Neurochirurgie, Bergmannstrost  
Berufsgenossenschaftliche Kliniken Halle

## **universitäre Ausbildung**

2005 – 2012 Medizinstudium an der Universität Leipzig  
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 31. Mai 2012  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 07. September  
2007

## **berufliche Erfahrungen**

Sept. 2011 – Jan. 2012 Praktisches Jahr, Notaufnahme und Kardiologie, Helios  
Klinik Borna  
Juni 2011 – Sept. 2011 Praktisches Jahr, Anästhesie, Herzzentrum Leipzig  
Feb. 2011 – Juni 2011 Praktisches Jahr, Neurochirurgie und Thoraxchirurgie,  
Klinikum St. Georg gGmbH, Leipzig

## **schulische Ausbildung**

2003 – 2005 Gymnasium Delitzsch  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife am 01.07.2005  
1998 – 2003 Oskar-Reime-Gymnasium, Delitzsch/ Rackwitz  
1997 – 1998 Johann-Gottlob-Conrad, Mittelschule, Glesien  
1996 – 1997 Grundschule Wiedemar, Wiesenena  
1993 – 1996 Grundschule, Singen

## **Publikation**

Sauer M, **Tews J**, Schwarzer M, Seeburger J, Adams V, Falk V, Dhein S, Mohr FW.  
Rapid detection of the R389G polymorphism of ADRB1 by real time PCR using fluorescence  
resonance energy transfer. Clin Lab. 2009; 55(3-4):128-36.

## **Danksagung**

Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Stefan Dhein für die Möglichkeit der Auswahl dieses Themas und die Gelegenheit selbstständig wissenschaftlich zu arbeiten. Vielen Dank für die respektvolle und hilfreiche Unterstützung, für das Verständnis und den Beistand in allen Situationen. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Mohr für die Überlassung des damit verbundenen Arbeitsplatzes.

Vielen Dank an Herrn Dr. Matthias Sauer, der die Grundlagen für die Schmelzkurvenanalyse legte und mich gut in das Thema einarbeitete. Ich möchte mich auch für die Bereitstellung der benötigten Materialien und Abbildungen bedanken. Vielen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Meinhard Mende für die Unterstützung in der Auswertung und Interpretation der Patientendaten.

Zudem gilt mein Dank den Mitarbeitern des herzchirurgischen Forschungslabors des Herzzentrum Leipzigs, insbesondere Frau Krabbes-Kraube für die Unterstützung bei dem Vorbereiten und Auswerten der Proben.

Schließlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Anästhesie des Herzzentrums bedanken. Vielen Dank für die Zuarbeit und das Nichtvergessen der zahlreichen Blutentnahmen.

Ebenso gebührt meinen Eltern großer Dank für deren Beistand und Hilfe während meines Studiums und insbesondere während meiner Doktorandenzeit.