

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genetik der linksventrikulären Hypertrophie und Fibrose bei  
salzsensitiver experimenteller Hypertonie im Rattenmodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sibylle Rademacher

aus Tübingen

Gutachter :      1. Prof. Dr. med. R. Kreuz  
                         2. Prof. Dr. med. M. Tepel  
                         3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Beige

**Datum der Promotion:** 29.01.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Arterielle Hypertonie .....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Definition und Einteilung.....	7
1.1.2 Hypertonie: Prävalenz und kardiovaskuläres Risiko .....	7
1.1.3 Ätiopathogenese der primären Hypertonie .....	8
1.1.4 Salzsensitivität.....	9
1.1.5 Langzeitkomplikationen/Hypertensive Herzerkrankung .....	9
<b>1.2 Linksventrikuläre Hypertrophie .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Definiton und Einteilung.....	10
1.2.2 Ätiopathogenese und Pathophysiologie .....	10
1.2.3 Morphologie .....	12
<b>1.3 Kardiale Fibrose.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Definition .....	12
1.3.2 Pathophysiologie .....	13
1.3.4 Morphologie/Histologie .....	14
<b>1.4 Der Nutzen von Tiermodellen in der kardiovaskulären Forschung.....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Inzuchtstämme am Beispiel der Ratte.....	14
1.4.2 Übertragung Rattenmodell-Mensch .....	15
<b>1.5 Inzuchtrattenstämme SS/Jr, SR/Jr und SHR.....</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Kopplungsanalyse.....</b>	<b>17</b>
1.6.1 Kreuzung der ingezüchteten Rattenstämme .....	17
<b>1.7 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>21</b>
2.1.1. Chemikalien .....	21
2.1.2 Puffer .....	21
2.1.3 Enzyme.....	21
2.1.4 Geräte .....	22
2.1.5 Software .....	22
2.1.6 Andere Utensilien.....	22
<b>2.2 Studienaufbau.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Zucht und Haltung .....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Versuchstiere .....	23
2.3.2 Haltung .....	23
<b>2.4 Phänotypisierung.....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Systolische Blutdruckmessung mittels Tail-Cuff-Methode .....	24
2.4.2 Präparation .....	24
2.4.3 Histologie .....	25
2.4.4 Semiquantitative Morphometrie.....	25
<b>2.5 Genotypisierung .....</b>	<b>27</b>
2.5.1 Polymerasekettenreaktion .....	27

2.5.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	29
2.5.3 Statistische Analyse.....	30
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Phänotypisierung.....</b>	<b>31</b>
3.1.1 Parentaltiere.....	31
3.1.2 F2-Generation.....	32
3.1.2.1 Systolischer Blutdruck .....	33
3.1.2.2 Linksventrikuläre Hypertrophie .....	34
3.1.2.3 Interstitielle Fibrose.....	34
3.1.2.4 Perivaskuläre Fibrose .....	36
<b>3.2 Kosegregationsanalysen und Kopplungsanalyse.....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Korrelationsanalysen.....	38
3.2.2 Kopplungsanalyse .....	41
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Phänotypisierung.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Genotypisierung .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Linksventrikuläre Hypertrophie .....</b>	<b>46</b>
<b>4.4 Interstitielle und perivaskuläre Fibrose.....</b>	<b>48</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>51</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>53</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>59</b>
<b>7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
7.1.1 Abbildungsverzeichnis .....	59
7.1.2 Tabellenverzeichnis.....	59
<b>7.2 Publikationen.....</b>	<b>60</b>
7.2.1 Originalarbeiten.....	60
7.2.2 Abstracts.....	60
7.2.3 Poster.....	60
<b>7.3 Danksagung.....</b>	<b>61</b>
<b>7.4 Curriculum Vitae .....</b>	<b>62</b>
<b>7.5 Erklärung.....</b>	<b>63</b>

**Abkürzungen**

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AT-1	Angiotensin II-Subtyp 1
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cM	centiMorgan
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonucleinacid
et al.	et alteres
FEM/FU	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin an der FU Berlin
FU	freie Universität
HCL	Salzsäure
HDL	High density lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
LV	Linker Ventrikel
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
LVIF	linksventrikuläre interstitielle Fibrose
LVPF	linksventrikuläre perivaskuläre Fibrose
max.	maximal
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
N	molar
NaCl	Natriumchlorid
QTL	Quantitative Trait Loci
rel.	relativ
Rkb	von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. R. Kreutz stammende Kolonien

---

RLVG	relatives linksventrikuläres Gewicht
RV	rechter Ventrikel
RNO	Chromosom, auf die Ratte, <i>rattus norvegicus</i> bezogen
SBD	systolischer Blutdruck
SBP	systolischer Blutdruck
sec	Sekunde
SHR	Spontaneous-Hypertensive Rat
SR	Salzresistent (Salt-Resistant)
SiR	Sirius Red
SS	Salzsensitiv (Salt-Sensitive)
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
WKY	Wistar-Kyoto Rat

# 1. Einleitung

## 1.1 Arterielle Hypertonie

### 1.1.1 Definition und Einteilung

Definition der WHO:

Eine chronisch arterielle Hypertonie (Syn. Bluthochdruck, arterieller Hypertonus) beim Erwachsenen liegt vor, wenn Blutdruckwerte von mindestens 140 mmHg systolisch oder von mindestens 90 mmHg diastolisch mit der Methode nach Riva-Rocci und Korotkoff gemessen wurden (Chalmers *et al.*, 1999).

Ätiologisch lässt sich die Hypertonie in eine primäre (95% der Hypertonien) und eine sekundäre Form (5%) unterteilen. Bei der sehr viel seltener vorkommenden sekundären Hypertonie lässt sich eine Ursache für den erhöhten Blutdruck, häufig auf der renalen Ebene, finden. Auch gewisse Medikamente rufen eine sekundäre Hypertonie hervor. Des Weiteren werden noch die seltenen, monogenetischen bzw. dem Mendelschen Vererbungsmuster folgenden Hypertonien - z. B. das autosomal-dominant vererbte Liddle-Syndrom - den sekundären Hypertonien zugeordnet (Kreutz *et al.*, 2000; Hamet *et al.*, 1998).

Bei der primären Hypertonie (Syn. idiopathische oder essentielle Hypertonie) dagegen ist eine direkte Ursache für den Bluthochdruck nicht zu finden. Dieser Art des Bluthochdrucks liegt ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Faktoren zu Grunde: Der Blutdruck ist bei der essentiellen Hypertonie nicht nur abhängig von Umwelteinflüssen wie Diät (vor allem Umfang der Salzaufnahme), Bewegung, Lebensführung (Alkoholkonsum, Rauchen) und vom Alter und Geschlecht (Thamm, 1999), sondern auch von genetischen Faktoren (Hamet *et al.*, 1996). Studien haben den genetischen Einfluss bei der essentiellen Hypertonie durch Familien- und Zwillingsstudien unter Beweis gestellt (Lifton *et al.*, 2001).

Man spricht daher von der primären Hypertonie als einer multifaktoriellen, polygenetischen Erkrankung, die durch klinische Heterogenität und sehr verschiedene Phänotypen hervorsteicht.

### 1.1.2 Hypertonie: Prävalenz und kardiovaskuläres Risiko

Der Begriff *kardiovaskuläre Erkrankungen* umfasst als bedeutendsten Teil die Krankheiten koronare Herzkrankheit, chronische Herzinsuffizienz, periphere arterielle Verschlusskrankheit, chronische Niereninsuffizienz und Schlaganfall.

Diese Erkrankungen und die damit einhergehenden Komplikationen stellen die häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen dar. In Deutschland wurden 2002 sowohl bei

Männern als auch bei Frauen Krankheiten aus diesem Bereich als häufigste Todesursache registriert: 18,8 % der Bevölkerung verstarben allein an chronisch ischämischer Herzkrankheit und akutem Myokardinfarkt; auch bei der geschlechtsspezifischen Statistik war dies die häufigste Todesursache (Männern 18,9%, Frauen 20,9%) (Statistisches Bundesamt, 2004).

Als anerkannte und wissenschaftlich belegte Risikofaktoren der kardiovaskulären Erkrankungen gelten hohe Cholesterinwerte - vor allem in Zusammenhang mit niedrigem HDL-Cholesterin - , Hypertonus, Rauchen, Diabetes mellitus, Salzsensitivität und linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) (Levy, 2000).

Der häufigste und wichtigste zu beeinflussende Risikofaktor ist der Bluthochdruck. Kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität werden zum erheblichen Teil von der Höhe des Blutdruckes beeinflusst; mit der Blutdruckhöhe steigt proportional auch das kardiovaskuläre Risiko. Nach neuesten Studien beträgt die Prävalenz der Hypertonie in Europa ca. 44%, mit einer Prävalenz von 55% in Deutschland; bis zu 15 Millionen Deutsche leiden an einem Hypertonus. Mit zunehmenden Alter ist eine starke Zunahme der Prävalenz des Bluthochdrucks, vor allem des systolischen Bluthochdrucks, zu beobachten (Wolf-Maier *et al.*, 2003).

Bei einem nicht geringen Teil der Patienten, vor allem in der Gruppe der Älteren, hängt die Höhe des Blutdrucks von der Salzaufnahme ab. Diese Patienten werden als salzsensitiv bezeichnet, d.h. mit Höhe der Salzzufuhr steigt der Blutdruck signifikant an (Weinberger *et al.*, 1991).

### **1.1.3 Ätiopathogenese der primären Hypertonie**

Ätiologische und pathogenetische Faktoren lassen sich bei der Frage nach der Entstehung der essentiellen Hypertonie schwer trennen.

Die Blutdruckhöhe in der Bevölkerung ist nach Art einer Gausskurve verteilt, man spricht von Normalverteilung. Aus dieser Verteilung lässt sich ein polygenetisches Vererbungsmuster eines quantitativen Merkmals ableiten. Quantitative Merkmale sind Merkmale, an deren Entstehung viele verschiedene genetische Faktoren mitwirken. Weitere Beispiele für quantitative Merkmale sind Intelligenz, Körpergröße und Gewicht.

Diese Merkmale werden demnach durch das Zusammenwirken vieler Gene beeinflusst. Die Chromosomenabschnitte, die ein bestimmtes quantitatives Merkmal beeinflussen, werden Quantitative Trait Loci (QTL) genannt (Hamet *et al.*, 1998; Kreutz *et al.*, 2000).

Ein Ziel der derzeitigen Forschung ist es, die Chromosomenregionen und Gene, die das quantitative Merkmal mit beeinflussen, zu detektieren und zu identifizieren, um die genetischen Ursachen und Komponenten des Bluthochdrucks näher zu verstehen und zu entschlüsseln.



Auch umweltbedingte Faktoren, die an der Entstehung eines Hypertonus mitwirken, werden seit langem erforscht; dazu zählen psychische und soziale Faktoren, die Ernährung und vor allem der Kochsalzgehalt der Nahrung.

#### **1.1.4 Salzsensitivität**

Bei der Hälfte hypertensiver Patienten, aber auch bei einem Viertel der normotensiven Bevölkerung lässt sich eine Salzsensitivität feststellen (Weinberger *et al.*, 1994). Bei salzsensitiven Menschen verändert sich der Blutdruck mit der Menge an aufgenommenem Salz signifikant, während bei salzresistenten Menschen die Höhe des Blutdrucks unabhängig von der Salzaufnahme ist (Weinberger *et al.*, 2001).

Salzsensitivität gilt als eigener, unabhängig von anderen Faktoren bestehender Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Prävalenz der salzsensitiven Hypertonie steigt mit zunehmendem Alter. Diese Patienten neigen zu ausgeprägteren Endorganschäden, vor allem die Entwicklung einer LVH und linksventrikulären Dysfunktion so wie eine ausgeprägte kardiale Fibrose treten dort häufiger und gravierender auf (Siegel *et al.*, 2003; Bihorac *et al.*, 2000). Aber auch bei normotensiven, salzsensitiven Menschen gibt es einen vom Blutdruck unabhängigen Zusammenhang zwischen Salzsensitivität und Mortalität. Diese Gruppe entwickelt zudem im Alter eher einen Hypertonus als Salzresistente (Weinberger *et al.*, 1991 und 2001). Dass die Entwicklung einer salzsensitiven Hypertonie auch genetisch determiniert ist, konnte durch etliche Studien, die eine höhere Prävalenz in bestimmten Populationen und Familien zeigten, gezeigt werden (Weinberger *et al.*, 1986).

Auch Rattenmodelle, die salzsensitive Hypertonie mit gravierenden Endorganschäden weiter vererben, unterstützen diesen Ansatz (Rapp, 2000).

#### **1.1.5 Langzeitkomplikationen/Hypertensive Herzerkrankung**

Über lange Zeit erhöhter Blutdruck wirkt schädigend auf das Herz- und Gefäßsystem. Unter hypertensiver Herzerkrankung versteht man alle durch die Hypertonie bedingten kardialen Veränderungen.

Durch die dauerhafte Erhöhung des peripheren Widerstandes bildet sich eine diastolische Funktionsstörung aus, bei der vor allem die Relaxation des linken Ventrikels gestört wird. Die durch den Hypertonus hervorgerufene Mikroangiopathie führt am Herzen zu einer Einschränkung der Koronarreserve und einer chronisch-myokardialen Ischämie. Weiterhin bildet sich aufgrund der Druckbelastung reaktiv eine LVH aus. Im Rahmen dieser Hypertrophie kommt

es zu morphologischen Veränderungen am Herzen, einschließlich einer manifesten Fibrose, die wiederum die Herzarbeit und kardiale Funktion beeinträchtigen (Conrad *et al.*, 1995).

## **1.2 Linksventrikuläre Hypertrophie**

### **1.2.1 Definiton und Einteilung**

Definition: Zustand abnormen, pathologischen Wachstums des linken Ventrikels, der sowohl zu einer Zunahme des kardialen Gewichts und der Wandstärke desselben als auch zu funktionellen Störungen betreffend Kontraktilität, Elektrophysiologie und Koronardurchblutung führt (Sheridan, 2000).

Unterschieden wird zwischen einer so genannten physiologischen Hypertrophie, die unter anderem bei Sportlern, Anämie oder Hyperthyreose zu beobachten ist und einer pathologischen Form, wie sie zum Beispiel bei der Hypertonie zu sehen ist (Weber *et al.*, 2000). Außerdem findet sich eine LVH bei hypertrophen Kardiomyopathien, auf die hier nicht näher eingegangen wird (Sheridan, 2000). Die physiologische LVH beeinträchtigt im Gegensatz zur pathologischen die kardiale Funktion und homogene kardiale Struktur nicht und hinterlässt bei Regression eine normale, physiologische Ventrikelgeometrie, -struktur und -funktion.

Morphologisch lässt sich die LVH in eine konzentrische, in der Regel durch Druckbelastung hervorgerufene Form, und eine exzentrische Form unterteilen, die sich häufiger als Folge einer Volumenbelastung manifestiert; in der Praxis handelt es sich oft um Mischformen, die auch in der Gruppe der essentiellen Hypertoniker am häufigsten vorkommen (Messerli, 2000).

### **1.2.2 Ätiopathogenese und Pathophysiologie**

Die LVH gilt als wesentlicher, auch unabhängig von einer Hypertonie bestehender, Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (Innes *et al.*, 1998).

LVH, Bluthochdruck und das Risiko an einer Erkrankung aus dem kardiovaskulären Formenkreis zu leiden, sind eng miteinander verknüpft (Levy *et al.*, 2000). Risikofaktoren für das Auftreten einer solchen Hypertrophie sind neben Bluthochdruck auch Übergewicht und Alter (Lauer *et al.*, 1991).

LVH ist über die Entwicklung einer vor allem die Diastole betreffende Funktionseinschränkung in nicht unerheblichem Maße mit verantwortlich für ein terminales Herzversagen (Rothermund *et al.*, 2001b). Sie ist ein häufig anzutreffendes Merkmal, bei 23% der Männer und 33% der

Frauen über 60 Jahre der Framinghampopulation wurde eine LVH echokardiographisch beschrieben (Savage *et al.*, 1987).

Pathophysiologisch lässt sich eine LVH und ein damit einhergehendes höheres Herzgewicht durch verstärkte Arbeit des linken Ventrikels erklären, die durch zum Beispiel Umwelteinflüsse wie Stress oder durch hämodynamische Überlastung notwendig wird (Hamet *et al.*, 1996a). Bei einer Druckbelastung, wie sie der Hypertonus darstellt, gilt die LVH als Kompensationsmechanismus des Herzens, mit dem Ziel, die erhöhte Wandspannung zu kompensieren (Brilla *et al.*, 1996).

Die früh auftretende diastolische Dysfunktion resultiert aus einer Relaxationsstörung und einer später hinzukommenden reduzierten linksventrikulären Compliance, für die vor allem die vermehrten fibrotischen Ablagerungen verantwortlich sind (Sheridan, 2000). Weiterhin sind verschiedene biochemische Veränderungen wie zum Beispiel der gestörte diastolische Kalziumeinstrom bei der Entwicklung der diastolischen Dysfunktion im Rahmen der LVH beteiligt (Rothermund *et al.*, 2001b).

Desweiteren verschlechtert sich beim hypertrophen Herzen die linksventrikuläre Kontraktilität und somit die systolische Funktion, die Koronarreserve nimmt ab, ventrikuläre Ektopien nehmen zu, das Risiko eines plötzlichen Herztodes steigt. All diese Komponenten spielen eine Rolle bei der Entwicklung einer manifesten kardiovaskulären Erkrankung und ihren Komplikationen (Sheridan, 2000; Messerli, 2000).

Trotz der häufigen Konstellation von Hypertonus oder koronarer Herzerkrankung und LVH und trotz des unbestrittenen Zusammenhangs von Bluthochdruck und hoher Prävalenz einer LVH (Mancia *et al.*, 2000) entwickeln nicht alle Hypertoniker eine LVH. Ebenso wenig lässt sich bei einer erheblichen Anzahl von Patienten mit LVH keine pathophysiologisch begründete Ursache finden (Innes *et al.*, 1998; Tingleff *et al.*, 1996). Schon früh begann die Suche nach anderen Faktoren, die die LVH mit beeinflussen. Übergewicht und Diabetes mellitus spielen bei der Ausprägung einer LVH als prädisponierende Faktoren ebenso eine Rolle wie genetische Disposition (Schunkert, 2000). Wachstumsfaktoren, Angiotensin II, Katecholamine, Insulin und andere humorale Faktoren beeinflussen eine LVH unabhängig von hämodynamischen Effekten (Mancia *et al.*, 2000).

Bei der Entstehung einer LVH spielen also sowohl familiäre, reaktive als auch genetische Komponenten eine Rolle (Cicila *et al.*, 1999; Innes *et al.*, 1998). Die LVH unterliegt damit ebenfalls dem polygenetischen Vererbungsmuster eines quantitativen Merkmals.

### 1.2.3 Morphologie

Das morphologische Korrelat der LVH als kardialen Kompensationsversuch auf die chronische Druckerhöhung bezeichnet man als Remodeling, eine pathologische Umgestaltung von Myozyten und interstitiellen Kompartimenten des Herzens, bei der die Homogenität des kardialen Gewebes aufgehoben wird (Weber, 2001). Es dominiert ein disproportionales Myozytenwachstum (Myozytenhypertrophie) und eine gesteigerte, abnorm hohe Kollagenbildung. Myozytenverluste werden durch interstitielle Kollagenbildung als Narben wieder aufgefüllt (Brilla *et al.*, 1996), Fibroblasten induzieren eine perivaskuläre Fibrose, die sich dann auch in Richtung Interstitium ausweitet (Weber, 2001). Dies alles führt zu einem Ungleichgewicht des physiologischen Verhältnisses der Kompartimente Myozyten/Nicht-Myozyten, was wiederum zu verminderter Dehnbarkeit führt (Weber *et al.*, 1991). Studien haben gezeigt, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) für das Remodeling mit verantwortlich zu sein scheint (Schmieder *et al.*, 1996; Brilla *et al.*, 1991b). Bei der physiologischen Hypertrophie, bei der das RAAS nicht stimuliert ist, wie es zum Beispiel bei Sportlern der Fall ist, bleibt die Homogenität des kardialen Gewebes erhalten. Wird das RAAS wie bei der essentiellen Hypertonie stimuliert, kommt es zu einem Ungleichgewicht von Stimulation und Inhibition von Zell- und Kollagenwachstum zugunsten der Stimulation, was zum unerwünschten Remodeling von vor allem interstitiellen Kompartimenten führt (Weber, 2001).

## 1.3 Kardiale Fibrose

### 1.3.1 Definition

Definition Fibrose (Syn. Sklerose, Schwiele, Narbe, Induration): Vermehrung des Kollagenfasergehalt pro Gewebseinheit. Es kommt zur makroskopischen Gewebeverhärtung als Folge einer chronisch-entzündlichen, ischämischen oder degenerativen Gewebsschädigung (Riede *et al.*, 1993).

Ein gesundes Myokard besteht zu einem großen Teil aus myokardialen Zellen, die in ein Netz aus extrazellulärer Matrix eingebettet sind und vom Volumen her den größten Anteil des Myokards einnehmen. Die restlichen zwei Drittel werden aus nicht-myozytären Anteilen gebildet, welche sich aus glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und interstitiellen und perivaskulären Fibroblasten zusammensetzen (Weber, 2000).

Im Rahmen einer LVH kommt es zu gesteigerter Bindgewebsbildung, so dass der Kollagen-Volumen-Anteil zunimmt. Die Kollagen-Volumenfraktion beträgt beim Gesunden 2%, beim Hypertoniker 6% (Parsi *et al.*, 2001).

Gemeinhin werden zwei verschiedene Fibrosetypen unterschieden: Die reparative und die reaktive Fibrose (Swynghedauw, 1999). Die Entstehung reparativer Fibrose als Heilungsprozess nach Myokardverlust etwa durch einen Infarkt ist weitgehend verstanden, sie tritt vor allem interstitiell auf. Die Mechanismen bei der Entstehung reaktiver Fibrose hingegen sind multifaktoriell und noch nicht vollständig geklärt (Weber *et al.*, 1988). Als einflussnehmende Faktoren auf die reaktive Fibrose werden neben Alter, Hypoxie und inflammatorischen Prozessen auch genetische Ursachen diskutiert.

### 1.3.2 Pathophysiologie

Ein abnorm hoher Kollagenanteil im Herzen ist neben anderen Komponenten ein direkter Faktor, der über die oben erwähnte Verschiebung des Myozyten/Nicht-Myozytenverhältnisse zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion, vor allem auf diastolischer Ebene, beiträgt (Brilla *et al.*, 1991a). Folgende Komponenten spielen dabei eine wichtige Rolle: Die interstitielle Fibrose unterbricht die Myozytenkontinuität und beeinträchtigt damit deren elektrische Leitfähigkeit. Des Weiteren führen übermäßige Kollagenablagerungen zu Wandsteifigkeit des Ventrikels und einer damit einhergehenden verminderten Compliance desselben, welche wiederum zu diastolischer Dysfunktion führt (Sheridan DJ, 2000; Weber *et al.*, 1989). Kardiale Fibrose ist der wichtigste Faktor der diastolischen Wandsteifigkeit bei hypertensiver Herzkrankheit (Weber *et al.*, 1993). Des Weiteren wird durch Fibroblastenhyperplasie und interstitielle Fibrose das Nicht-Myozyten Kompartiment auf Kosten der Myozyten vergrößert. Da dieses Kompartiment nicht an der systolischen Herzkontraktion teilnimmt, wird diese Kontraktion resultierend von einem kleineren Anteil der kardialen Masse verrichtet, was zu einer systolischen Dysfunktion führt.

Diese Größenverschiebung scheint außerdem einen negativen Einfluss auf die Progredienz einer LVH zu haben (Schnee *et al.*, 2000).

Interstitielle Fibrose behindert die Versorgung des Myozyten mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen durch eine Verlängerung der Diffusionsstrecke (Sheridan DJ, 2000; Schnee *et al.*, 2000).

Obwohl Fibrose gemeinhin mit LVH und linksventrikulärer Dysfunktion in Verbindung gebracht wird, sind die Mechanismen und Stimuli, die für eine vermehrte linksventrikuläre Fibrose verantwortlich sind, nur unzulänglich geklärt. Fibrose ist nicht nur als reaktiver Teil einer

myozytären Hypertrophie anzusehen (Conrad *et al.*, 1995). Die Höhe des Blutdrucks scheint direkt Einfluss auf sie zu nehmen (Rothermund *et al.*, 2001b), auch das RAAS scheint eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Fibrose zu spielen (Funck *et al.*, 1997). Da sich aber nicht in jedem hypertrophen Herzen eine abnorme Kollagenakkumulation finden lässt, besteht die Vermutung, dass Myozyten- und Kollagenwachstum zum Teil unabhängig voneinander ablaufen (Weber *et al.*, 1991).

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die Regression von Fibrose eine wichtige, eigenständige Rolle bei der Verbesserung der diastolischen Funktion und der Abnahme der Wandsteifigkeit spielt (Weber, 2001).

Die kardiale Fibrose ist somit eine zum Teil unabhängige Erscheinung der LVH und der hypertensiven Herzkrankheit und spielt nicht nur als reaktiver Teil einer myozytären Hypertrophie eine entscheidende Rolle bei der Verschlechterung des linken Ventrikels (Conrad *et al.*, 1995). Sie ist neben Druckbelastung und myokardialen Gewebeverlust eine wichtige Determinante bei der Ausbildung eines Linksherzversagens bei chronischem Hypertonus.

#### **1.3.4 Morphologie/Histologie**

Sowohl in gesundem als auch durch LVH verändertem Myokard besteht der fibrotische Kollagenanteil vor allem aus Typ I Kollagen (Weber, 1989a). Dieser Kollagentyp zeichnet sich durch hohe Stabilität aus, welche Zugbelastung standhält und somit eine Verformung oder Ruptur des Gewebes verhindert. Es wird hauptsächlich von Fibroblasten synthetisiert und sezerniert, zu einem geringeren Teil auch von glatten Muskelzellen (Schiebler *et al.*, 1995; Swynghedauw, 1999). Eine Regression des Kollagenanteils ist nur durch biochemischen Abbau möglich, der im Myokard mittels Matrix Metallproteinase (MMPs) erfolgt. Offenbar kann eine Blutdrucksenkung allein den einmal aufgebauten Kollagenanteil nicht vermindern (Weber, 2001).

### **1.4 Der Nutzen von Tiermodellen in der kardiovaskulären Forschung**

#### **1.4.1 Inzuchtstämme am Beispiel der Ratte**

Tiermodelle sind ein wichtiges Instrument, um verschiedene Aspekte des Hypertonus und seiner Begleiterscheinungen zu untersuchen und herauszuarbeiten. Die Ratte hat sich als Versuchstier in der Hypertonieforschung über Jahrzehnte als Modell etabliert. Besonders die Entwicklung von Inzuchtstämmen, die Bluthochdruck als hereditäres Merkmal tragen, hat sich als

erfolgsversprechend erwiesen. Diese Stämme wurden über Bruder-Schwester Verpaarungen (Brother-Sister-Mating) entwickelt, indem Tiere mit sehr hohen Blutdrücken über mehr als zehn Generationen verpaart wurden. Es entwickelte sich durch Kombination der natürlich selektionierten Allele eine spontane Hypertonie mit genetischer Homogenität gleichgeschlechtlicher Tiere (Rapp, 1994).

Der Vorteil dieser Stämme liegt darin, dass aufgrund der genetischen Homogenität jeder einzelne Stamm als ein Subtyp der Hypertonie mit besonderer Ausprägung eines bestimmten Merkmals anzusehen ist. Die Summe dieser Inzuchtstämme ergeben nicht nur ein vollständigeres, detailliertes Bild der klinischen Hypertonie, man kann durch sie auch den Bluthochdruck besser in seine verschiedenen Aspekte zerlegen und diese dann einzeln und gezielt untersuchen (Kwitek-Black *et al.*, 2001).

Durch kurze Generationendauer, einfache, standardisierte Zuchtbedingungen und gute Einblicke in Organ- und Gewebestrukturen steht mit der Ratte auch bezüglich der praktischen Durchführung ein ideales Modell zur Verfügung.

#### **1.4.2 Übertragung Rattenmodell-Mensch**

Blutdruck als ein polygenetisches, quantitatives Merkmal und die essentielle Hypertonie als eine multifaktorielle Erkrankung stellen die Forschung weiterhin vor eine große Herausforderung. Durch klinische und genetische Heterogenität und den großen Einfluss von Umweltfaktoren auf den Hypertonus beim Menschen stellt sich die Ursachenforschung als schwierig dar. Sowohl die pathophysiologischen als auch ätiopathogenetischen Wege der Erkrankung sind nicht geklärt. Dass es neben Umwelt- und anderen Einflüssen auch genetische Komponenten bei der Entwicklung einer Hypertonie beim Menschen gibt, haben Zwillings- und Familienstudien gezeigt (Lifton *et al.*, 2001).

Die Detektion von Genorten, die für die Entwicklung einer Hypertonie mit verantwortlich sind, erweist sich beim Menschen aber aufgrund der natürlichen Heterogenität der Patienten und der Genvielfalt mit ihren komplexen Phänotypen weiterhin als schwierig. Eine erfolgsversprechende Methode, der Identifizierung spezifischer Loci näher zu kommen, ist die Entwicklung von Tiermodellen, die die oben genannten Vorteile mit sich bringen.

Durch das Auffinden blutdruckassoziierter Loci (QTLs) bei der Ratte ist es möglich, Kandidatengenregionen zu identifizieren, die dann durch vergleichende Genomuntersuchungen auf den Menschen übertragen werden und auf ihre Gültigkeit mittels Geschwisterpaaranalysen und Assoziationsstudien verifiziert werden können (Rapp, 2000; Stoll *et al.*, 2000).

## 1.5 Inzuchtrattenstämme SS/Jr, SR/Jr und SHR

### 1.5.1 Dahl salzsensitive und salzunempfindliche Ratten (SS/Jr und SR/Jr)

Bei den Dahl-Ratten handelt es sich um eine von Lewis Dahl in den 60er Jahren etablierte Zucht, die durch John Rapp zu Inzuchtstämmen (SS/Jr bzw. SR/Jr) weiterentwickelt wurde. SS/Jr Ratten zeichnen sich zum einem durch eine spontane Hypertonie aus, d.h. sie entwickeln unabhängig von Umwelteinflüssen einen Bluthochdruck (Rapp, 1994). Außerdem sind sie salzsensitiv, mit einem enorm steigenden Effekt salzreicher Diät (8% Natriumchlorid [NaCl] auf den Blutdruck, der zu ausgeprägten vaskulären Läsionen vor allem in Niere, Herz und Mesenterialbereich führt (Rapp *et al.*, 1985). SR/Jr Ratten sind dagegen salzunempfindlich, d.h. Unterschiede in der Diät bezüglich des Salzgehaltes hatten nur einen geringen Effekt auf den Blutdruck, der sich unabhängig von der Diät immer im niedrigen Bereich hält. Durch die Separation der Stämme bezüglich dieser Eigenschaft ist ein exzellentes Modell erschaffen worden, um Untersuchungen anzustellen bezüglich der Rolle, die Salz bei der Entwicklung eines Bluthochdruckes spielt. Des Weiteren zeigt dieses Modell sehr deutlich auf, wie die pathogenetische Wirkung von Umweltfaktoren (Salz) abhängig ist von dem genetischen Hintergrund (Rapp, 1994 und 2000).

### 1.5.2 Spontan-hypertensive Ratten (SHR)

Der Stamm der SHR wurde 1963 durch Okamoto und Aoki etabliert und stellt das am meisten benutzte Modell in der tierexperimentellen Hypertonieforschung dar. Zur ursprünglichen Züchtung wurden Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) benutzt. Dieser Inzuchtstamm zeichnet sich dadurch aus, dass sich ab der sechsten Lebenswoche ein Bluthochdruck, die sogenannte spontane Hypertonie, unabhängig von Umwelteinflüssen oder diätetischen Veränderungen entwickelt, die in der 14.-18. Woche eine Plateauphase erreicht. Selbst bei einseitig nephrektomierten SHR Ratten war kein Blutdruckanstieg unter salzreicher Diät zu beobachten (Rothermund *et al.*, 2001a).

Das vorherrschende pathophysiologische Korrelat ist der Anstieg des Gefäßwiderstandes, welcher anfangs im Zusammenhang mit einer erhöhten Sympathikusaktivität zu stehen scheint, später dann durch verschiedene kardiovaskuläre und renale Veränderungen zu erklären ist.

Die Komplikationen des Hypertonus, die bei diesen Tieren beobachtet wurden, sind vergleichbar mit denen, die auch beim Menschen zu beobachten sind (Rapp, 2000; Volpe *et al.*, 1994).

Des Weiteren entwickeln SHR Ratten schon während ihres normotensiven Stadiums eine LVH, die unabhängig von der Entwicklung eines Hypertonus entsteht. Die Hypertrophie ist wesentlich



ausgeprägter als die anderer Rattenmodelle mit ähnlich hohen Blutdruckwerten (Harrap *et al.*, 2002). Die hämodynamische Funktion bleibt dabei recht lange auf einem guten Niveau, bei älteren Tieren findet sich aber eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion bis hin zur Herzinsuffizienz und eine Vermehrung der kardialen Fibrose (Pfeffer *et al.*, 1979). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass bei SHR Ratten die Herzgröße von anderen genetischen Faktoren beeinflusst wird als der Hypertonus (Innes *et al.*, 1998).

## 1.6 Kopplungsanalyse

Bei einer Kopplungsanalyse wird mittels genetischer Marker nach chromosomalen Abschnitten gesucht, die mit einem bestimmten Phänotyp vererbt werden. Dies wird mit der sogenannten Intervallkartierung durchgeführt, bei der das gesamte Genom mit Hilfe der genannten Marker durch analysiert wird. Wird ein Marker, der für einen bestimmten Abschnitt auf dem Chromosom steht, bei allen Phänotypen gefunden, ist dies ein Hinweis auf einen den Phänotyp beeinflussenden Genort (QTL). Je geringer der Abstand zwischen den untersuchten Markern dabei ist, je genauer dadurch der Abschnitt also untersucht wurde und der Locus eingengt wurde, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Marker wirklich mit dem Genort gekoppelt ist und durch Rekombination nicht getrennt wird. Dieser Genort kann dann in weiterführenden Untersuchungen auf, den Pathomechanismus beeinflussende, Gene, zum Beispiel mittels DNA-Sequenzierung, untersucht werden.

### 1.6.1 Kreuzung der ingezüchteten Rattenstämme

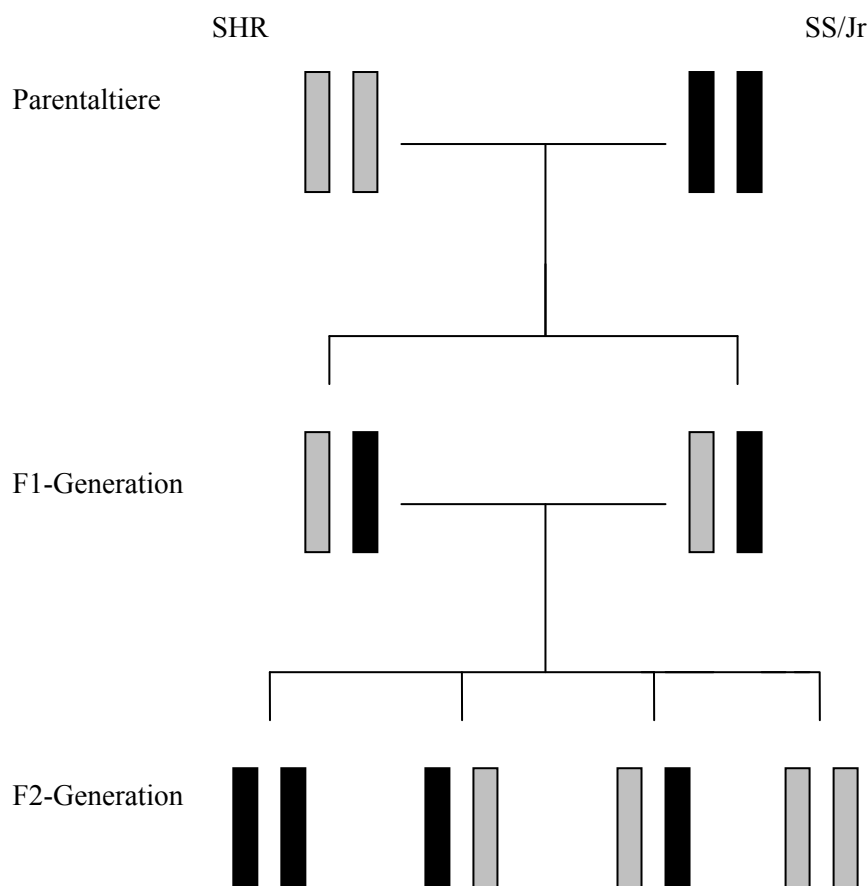
Die Inzuchtstämme SS/Jr als salzsensitives und SHR als salzresistentes Modell entwickeln beide primär eine spontane Hypertonie, die sich unter salzarmer Diät ähnlich entwickelt, unter salzreicher Diät dagegen zu sehr unterschiedlichen Ausprägung kommt.

Diese zwei ingezüchteten Stämme (Parentalstämme), die sich in dem Phänotyp Salzsensibilität unterscheiden, werden miteinander verpaart. Der jeweilige Parentalstamm ist dabei durch die über Generationen betriebene Inzucht in sich genetisch homogen. Aus dieser Verpaarung entsteht eine erste heterozygote Filialgeneration (F1-Generation), die genetisch und phänotypisch nahezu identisch ist. Tiere dieser Generation wurden wieder miteinander verpaart (Brother-Sister-Mating), woraus dann die F2-Generation hervorging. Dieser Generation wurde zufällig genetisch Material beider Ursprungsstämme weiter vererbt, ihre Chromosomen enthalten genetisches Material von sowohl Mutter als auch Vater, die Tiere sind also zu 50% genotypisch

heterozygot, zu 25% genotypisch homozygot für den SS-Stamm und zu 25% homozygot für den SHR-Stamm. (Abb. 3)

Durch die während der Meiose stattfindende Rekombination kommt es zum Austausch genetischen Materials zwischen homologen Chromosomen. Bei den Parentalstämmen ist dieser Aspekt zu vernachlässigen, da die homologen Chromosomen komplett homogen sind. Bei der Meiose der F1-Generation kommt es durch die Rekombination allerdings zu Neuordnung von Allelen, da die Tiere genetisches Material von heterogenen Tieren erhalten. Allele, die nah genug an chromosomalen Abschnitten liegen, die am Blutdruck beteiligt sind, werden dabei mit dem Phänotyp Blutdruck gekoppelt vererbt.

So kann man bei Tieren der F2-Generation, die den Phänotyp salzsensitiver Bluthochdruck tragen, nach chromosomalen Abschnitten suchen, die relevant für die Steuerung des Blutdrucks erscheinen.



**Abb 1:** Schema zur Verpaarung eines hypertensiven, salzresistenten (SHR) und eines hypertensiven, salzsensitiven (SS/Jr) Rattenstamm. Balken = Chromosom

## 1.7 Ziel der Arbeit

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weiterhin häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen. Hypertonie, LVH und Salzsensitivität gelten als wichtige Risikofaktoren für diese Erkrankungen. Eine LVH entwickelt sich häufig als Folge der Hypertonie. Besonders salzsensitive Hypertoniker haben ein höheres Risiko für das Auftreten einer LVH und die Entwicklung von Endorganschäden.

Die linksventrikuläre Fibrose ist einerseits als Begleiterscheinung einer LVH als auch als unabhängige Erscheinung ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion und einer kardialen Dekompensation im Rahmen einer hypertensiven Herzerkrankung.

Die kausalen Zusammenhänge und Interaktionen sind weiterhin unzureichend geklärt. Dass genetische Komponenten neben Lebensweise und Umwelteinflüssen aber eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Hypertonie und der LVH wie auch bei der Ausbildung der kardialen Fibrose und dem Merkmal der Salzsensibilität spielen, gilt als gesichert.

Durch genauere Erforschung des Zusammenspiels der einzelnen Faktoren und vor allem durch besseres Verständnis der genetischen Komponenten ließe sich ein umfassenderes Verständnis der Pathogenese und Pathophysiologie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen erreichen und somit eine Grundlage schaffen, auf der individuell optimierte Strategien für Prävention und Therapie entwickelt werden können.

Mit dem Ziel, neue Genloci zu identifizieren, die an der Progression von Endorganschäden bei salzsensitiver Hypertonie mitwirken, wurde mittels Kopplungsanalyse und voraus gegangener Genomanalyse der Tiere mittels Intervallkartierung eine von zwei Inzuchttrattenstämmen stammende F2-Generation (SHRxSS/Jr) untersucht. Die beiden Stämme zeigten eine vergleichbare spontane Hypertonie, die sich unter Salzbelastung aber gegensätzlich verhielt; der Stamm SS/Jr galt dabei als salzsensitiv, der Stamm SHR als salzresistent.

Das Ziel dieser Arbeit war, Genloci (QTLs) für linksventrikuläre Fibrose und LVH bei salzsensitiver Hypertonie zu identifizieren und deren Bedeutung bei der Manifestation einer LVH und linksventrikulären Fibrose zu untersuchen.

Zunächst wurde die F2-Generation hinsichtlich salzsensitiver spontaner Hypertonie, linksventrikulärer Fibrose und LVH phänotypisiert. Nach Messung des Blutdrucks und postmortaler Bestimmung des Herz- und linksventrikulären Gewichts wurden histologische Präparate des Herzens angefertigt. Nach Färbung dieser mit den für Bindegewebe spezifischen

Färbungen Sirius-Red (SiR) und Hämatoxylin-Eosin (HE), wurde der perivaskuläre und interstitielle Fibrosegehalt eines jeden Tieres mittels Morphometrie ermittelt.

Die im Anschluss an die Phänotypisierung durchgeführte Kopplungsanalyse sollte mögliche Assoziationen der Phänotypen linksventrikuläre Fibrose und LVH mit bestimmten Genloci aufzeigen. Sollten Assoziationen an bestimmten Genorten gefunden werden, war für diese Orte eventuell eine noch genauere Intervallkartierung vorzunehmen, um diese zu verifizieren.

Durch die histologische Untersuchung konnte das quantitative Ausmaß der kardialen strukturellen Veränderungen bei diesem Stamm objektiviert werden und damit die Bedeutung der Veränderungen bei diesem bestimmten Tiermodell verifiziert werden.

Mittels der Kopplungsanalyse konnten dann direkte Assoziation der Phänotypen mit bestimmten Genloci aufgedeckt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Substanz	Firma
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]dATP (1mCi, 3000Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Aceton	Baker
Acrylease	Stratagene
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck
dNTPs (2,5 mM)	Promega, Rapidozym
Ethanol	Baker
Harnstoff	Roth
Magnesiumchlorid (25mM)	Promega, Rapidozym
Rotiphorese (40% Acrylamid)	Roth
Temed (N, N, N', N'-.Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Xylen Cyanol	Sigma

#### 2.1.2 Puffer

Puffer	Bestandteil	Konzentration
10x Kinase Puffer	Tris-HCl (pH 7,6)	700 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	DTT	50 mM
10x PCR-Puffer	Promega, Rapidozym	10x PCR-Puffer
Formamid-Laufpuffer	Bromphenolblau	1% (w/v)
	Xylen Cyanol FF	1% (w/v)
	Formamid	10%(v/v)
	Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	0,5 M

#### 2.1.3 Enzyme

	Enzym	Aktivität	Firma
Polymerasen	Taq-Polymerase	5 U/ $\mu$ l	Promega, Rapidozym
Kinasen	T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	5 U/ $\mu$ l	Promega

### 2.1.4 Geräte

Gerät	Firma
Agarosegelkammer	Bio Rad
Computer für Morphometrie (Power Macintosh 8200/120)	Macintosh
Mikrotom Mikrom HM 355	Microm Laborgeräte
Mikroskop Axiophot	Zeiss
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
PCR-Maschine	MJ Research
Robot Stainer Microm HMS 760	Microm Laborgeräte
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
Videokamera MC-3255	Sony
Videokontrollsystem	AVT-Horn GmbH

### 2.1.5 Software

Programm	Hersteller
MAPMAKER/EXP 3.0, MAPMAKER/QTL 1.1	Whitehead Institute for Biomedical Research, USA
Scion image 1.62 a	Scion Co., USA
SPSS 8.0 für Windows	SPSS

### 2.1.6 Andere Utensilien

Artikel	Firma
BioMax Röntgenfilme	Kodak
Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schuell
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Kämme, Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Mehrkanalspritze (8 Kanäle)	Hamilton
Micro Amp Reaction Tube with Cap	Perkin Elmer GeneAmp
Röntgenkassetten	Amersham
Standardpipetten (10-100, 50-250, 100-1000)	Eppendorf
Thermo-Fast96-Mikrotiterplatten	ABgene

## 2.2 Studienaufbau

Diese Studie hatte die Aufgabe, linksventrikuläre Fibrose und LVH unter Salzbelastung zu determinieren und auf genetische Aspekte zu untersuchen.

Um die Entwicklung einer spontanen Hypertonie unter Normalkost bei den zu untersuchenden Stämmen mit SS/Jr als salzsensitiv und SHR als salzresistent zu verifizieren, wurden die Parentaltiere einer salzarmen Diät ausgesetzt und ihre Blutdruckwerte mit denen normotensiver WKY-Ratten verglichen.

Nach der Erfassung dieser Daten wurden die Parentaltiere einer salzreichen Kost ausgesetzt und unter dieser das Blutdruckverhalten beobachtet. Auch die F2-Generation erhielt zu Anfang salzarme Kost, nach sechs Wochen begann die Salzbelastung, unter der der Blutdruck gemessen wurde. Neben der Phänotypisierung durch unter anderem histologische Untersuchungen wurden die Tiere der Genomanalyse unterzogen. Es wurde eine genomweite Untersuchung mittels 210 polymorpher Mikrosatellitenmarker aller Chromosomen, außer des Y-Chromosoms, im durchschnittlich 10 cM Abstand vorgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte als sowohl phäno-genotypische als auch phäno-phänotypische Korrelationsanalyse mittels Faktorenanalyse (ANOVA) und Regressionsanalysen.

## **2.3 Zucht und Haltung**

### **2.3.1 Versuchstiere**

SS<sub>Rkb</sub> Rattenkolonien sind seit 1997 am Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin etabliert. Ursprünglich wurden die Ratten von der Kolonie des Inzuchtstammes SS/JR von Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, Ind.) bezogen. SHR<sub>Rkb</sub> Ratten sind ebenfalls seit 1997 an obiger Stelle etabliert. Die Haltung der verwendeten Rattenstämme erfolgte in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM / FU; aml. Registriernummer G 0368/97).

Für die Kopplungsanalyse wurde eine F2-cross Population (SS<sub>Rkb</sub> x SHR<sub>Rkb</sub>) generiert; es wurden 230 männliche Tiere untersucht.

### **2.3.2 Haltung**

Die Tiere wurden im Institut für klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, an der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM/FU) nach Institutsvorschriften gehalten. Maximal vier Tiere wurden in einem Makrolonstandardkäfig Typ IV gehalten und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Ein zwölfstündiger Tag-Nacht-

Rhythmus mit Dunkelphase von 19-7 Uhr wurde über automatisierte Lichtschalter aufrecht erhalten.

Um zu zeigen, dass beide Stämme unter salzarmer Diät einen vergleichbaren spontanen Hypertonus entwickeln, erhielten die Parentaltiere eine normale Kost, deren Gewicht zu 0,2% aus NaCl bestand.

Die Tiere der F2-Generation wurden über die ersten sechs Wochen ebenfalls mit dieser Kost gefüttert. Am ersten Tag der siebten Woche begann dann für die F2-Generation und die männlichen Parentaltiere die Salzbelastung mittels einer salzreichen Kost, die zu 4% des Gewichts aus NaCl bestand. Diese wurde über acht Wochen gefüttert.

## **2.4 Phänotypisierung**

### **2.4.1 Systolische Blutdruckmessung mittels Tail-Cuff-Methode**

Bei den Tieren der F2-Generation wurde ab der 14. Woche der systolische Blutdruck mittels der nicht-invasiven „Tail-cuff“-Methode, die analog zur Messung nach Riva-Rocci funktioniert, gemessen.

Über einen Pulsaufnehmer wurde so der systolische Blutdruck (SBD) der Schwanzarterie mit einer computergestützten, automatisierten, oszillatorischen Technik (TSE, Bad Homburg) registriert. Um die Ratten für die Zeit der Messung ruhig zu stellen, wurden sie in einen „Restrainer“ gesetzt; sie wurden über zwei Tage durch jeweils zwei „Trainingseinheiten“ an diese Methode gewöhnt, die Resultate der darauf folgenden drei Tage wurden dann für die Studie verwendet. Es wurden pro Messdurchgang jeweils zwei Blutdruckmessungen vorgenommen, so dass maximal 18 Messwerte pro Tier zur Verfügung standen. Der aus allen Messungen errechnete Mittelwert wurde dann für die Studie verwendet.

### **2.4.2 Präparation**

Mit 15 Wochen wurden die Ratten in eine tiefe Äthernarkose versetzt. Ihr Körpergewicht wurde bestimmt und nach medianer Eröffnung des Abdomens und des Thorax und einer Blutentnahme aus der Aorta abdominalis wurden Herz, Milz und Aorta vorsichtig heraus präpariert.

Das Herz wurde durch Spülung mit 1mol/L KCL in der Diastole angehalten, dann trocken getupft. Die Aorta wurde vorsichtig weggeschnitten, der rechte Ventrikel (RV) vom Linken und dem Septum (LV) abpräpariert. Beide Ventrikel wurden gewogen, als Phänotyp LVH wurde das relative linksventrikuläre Gewicht (RLVW) gewählt, welches sich aus dem Verhältnis des



linksventrikulären Gewichtes zum Körpergewicht errechnen lässt. Für die histologische Untersuchung wurde ein zwei bis drei Millimeter dicker transverser Schnitt aus dem mittleren Drittel zwischen Apex und Basis des linken Ventrikels gewählt, der in Dubosq-Brasil Lösung, einer wässrigen Lösung aus 53% Ethanol, 12% Formaldehyd, 7% Acetat und 0,5% Pikrinsäure fixiert und danach in Paraffin eingebettet wurde. Das restliche ventrikuläre Gewebe wurde in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.4.3 Histologie**

Die in Paraffin eingebetteten Schnitte des linken Ventrikels wurden für 2 Minuten in flüssigem Stickstoff gefroren und dann an einem Mikrotom (Microm HM 355, Microm Laborgeräte, Walldorf)  $3\mu\text{m}$  breite Schnitte angefertigt. Pro Präparat wurden 16 Schnitte angefertigt, von denen jeweils acht auf einen entfetteten Glasobjektträger gebracht wurden. Die Objektträger wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Ein Objektträger wurde nach HE, der andere nach SR als für Bindegewebe spezifische Färbungen automatisiert mittels eines Färberoboters (Robot Stainer, Microm HMS 760, Microm Laborgeräte, Walldorf) gefärbt. Mittels der SiR-Färbung, bei der Bindegewebe rot und Muskelmasse gelb erscheint, wurde die Morphometrie durch die sehr gute Unterscheidungsmöglichkeit der beiden Gewebe vereinfacht.

### **2.4.4 Semiquantitative Morphometrie**

Sowohl die Quantität der kardialen interstitiellen und perivaskulären Fibrose als auch die Kerngrößen der Myozyten wurden mittels der semiquantitativen Morphometrie ermittelt. Dabei war eine Videokamera zusammen mit einem Video Kontrollsystem (Sony MC-3255, AVT-Horn GmbH, Aalen) an ein Zeiss Axiophot Mikroskop adaptiert (Zeiss, Oberkochen).

Alle mikroskopischen Bilder wurden mit einem 10x Objektiv erstellt, ausgewertet wurden longitudinale Schnitte. Die Analyse der so gewonnenen Bilder wurde an einem Power Macintosh Computer (Power Macintosh 8200/120) mit frei erwerblicher Software (Scion image 1.62 a, Scion Co., Maryland, USA) durchgeführt.

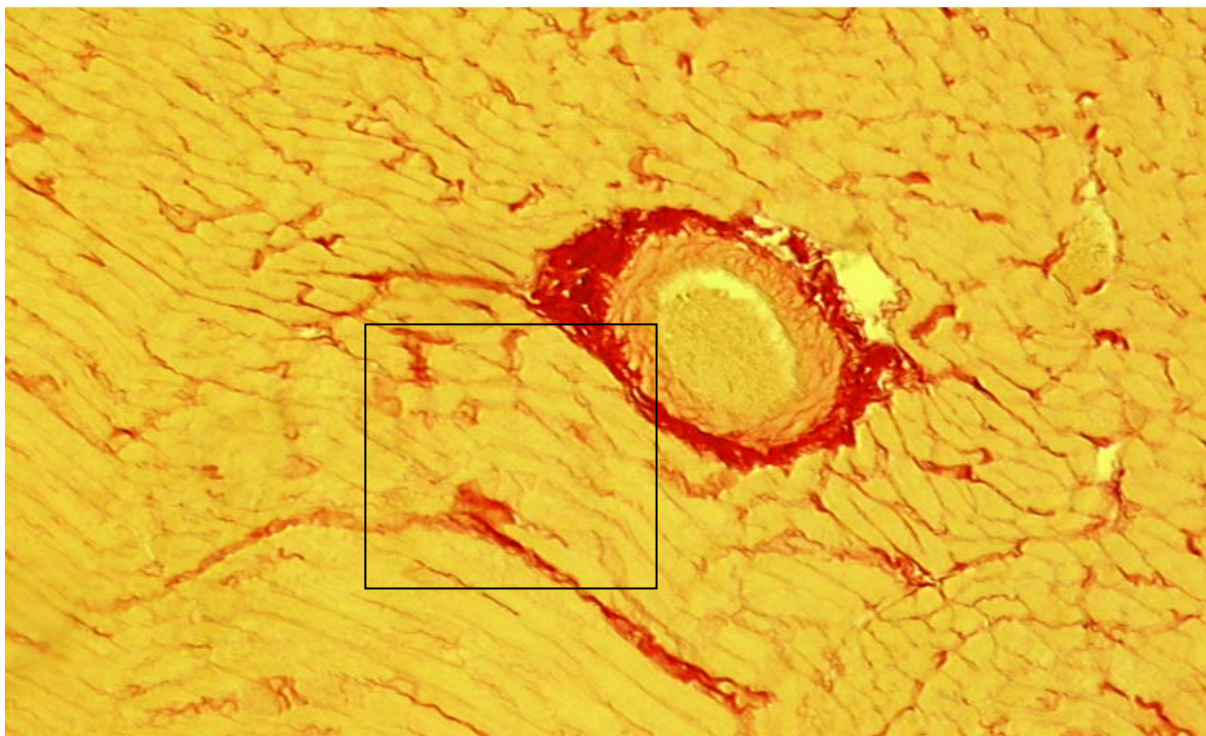
Um die perivaskuläre Fibrose quantitativ zu bestimmen, wurden pro Tier drei verschiedene Areale des Herzens, die repräsentativ für den optisch erfassten Fibrosegehalt dieses Tieres waren, analysiert; jedes Areal musste ein Gefäß enthalten, dass sich von der Größe nur wenig von den Gefäßen der beiden anderen Areale unterscheiden sollte. Nach der Digitalisierung des Bildes mit einer Fläche von  $301146,95\mu\text{m}^2$  wurde ein quadratischer Fensterausschnitt von  $20848,31\mu\text{m}^2$  in dieses Bild gelegt, wobei eine Ecke des Quadrats an der Grenze Intima-Lumen des Gefäßes anlag (s.Abb.2).

Nach Transformation des Bildes in ein binäres, schwarz-weißes Bild wurden die fibrotischen Anteile über eine Schwellenwerteneinstellung (Threshold) detektiert. Die Fibrose stellte sich hierbei schwarz dar, der Hintergrund, also das restliche Gewebe weiß. Die schwarzen Anteile konnten dann als prozentualer Anteil des Fensterausschnittes gemessen werden. Dieses wurde bei allen drei Gefäßarealen wiederholt, die Daten in einen Computer übertragen und ein Mittelwerte pro Tier bestimmt.

Analog zu dem oben beschriebenen Ablauf wurde auch die interstitielle Fibrose bestimmt.

Es wurden dafür nach der Digitalisierung des Bildes mit der Fläche von  $301146,95\mu\text{m}^2$  ein quadratischer Fensterausschnitt von  $20848,31\mu\text{m}^2$  in das Bild gelegt, in dem keine Gefäße liegen durften (s. Abb. 3). Insgesamt wurden pro Tier zehn solcher Fensterausschnitte gewählt und ausgemessen.

Dieses Bild wurde ebenfalls in ein binäres, schwarz-weißes Bild transformiert, und dann die fibrotischen Anteile über eine Schwellenwerteneinstellung (Threshold) detektiert. Die Fibrose stellte sich wieder schwarz dar, der Hintergrund, also das restliche Gewebe weiß. Die schwarzen Anteile konnten dann als prozentualer Anteil des Fensterausschnittes gemessen werden. Dieses wurde mit allen zehn Fensterausschnitten wiederholt, die Daten in einen Computer übertragen und ein Mittelwerte pro Tier bestimmt.



*Abb. 2: Beispiel für die Bestimmung der Quantität der perivaskulären Fibrose (nicht massstabsgetreu)*

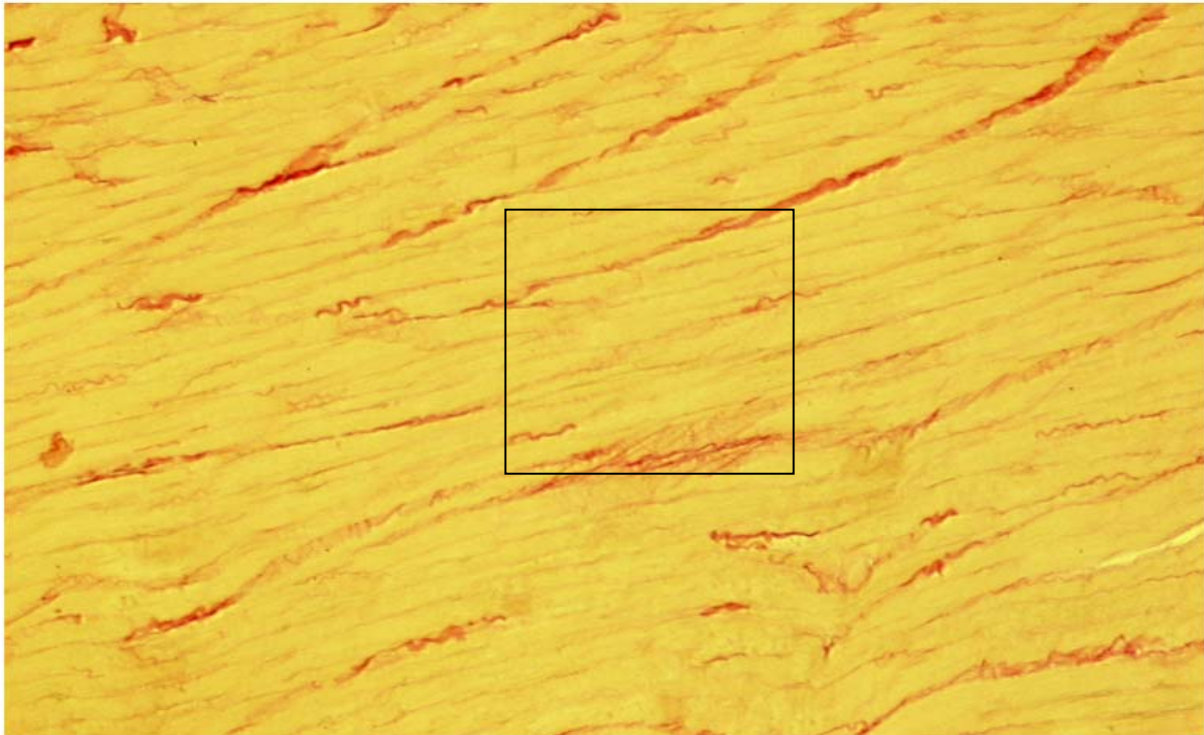


Abb. 3: Beispiel für die Bestimmung der Quantität der interstitiellen Fibrose (nicht massstabsgetreu)

## 2.5 Genotypisierung

### 2.5.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist durch ihre einfache Durchführung zu der am meisten benutzten Standardmethode in der Molekularbiologie geworden. Durch sie lassen sich Nukleinsäurefragmente *in vitro* amplifizieren. Die grundsätzliche, sich mehrfach wiederholende Reaktion besteht aus drei Schritten:

- Denaturierung
- Anheften der Oligonucleotid (Hybridisierung, Annealing)
- Extension zu neuen Doppelsträngen (Synthese)

Den durch die Denaturierung entstehenden Einzelsträngen werden zwei in der Regel aus 18-24 Basen bestehende Oligonukleotide zugesetzt, die komplementär zu der Sequenz der 5'-Enden der Einzelstränge sind. Diese rahmen den zu amplifizierenden Abschnitt ein und dienen als Primer für die Amplifikation. Durch Zugabe einer DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge dann zu jeweiligen Doppelsträngen komplementiert. Die Polymerase stammt heutzutage meistens aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* und wird als Taq-

Polymerase bezeichnet. Die daraus entstandenen Doppelstränge werden im nächsten Zyklus wieder denaturiert und stehen dann zur erneuten Extension zur Verfügung. Die DNA-Fragmente werden somit exponentiell vervielfältigt, weswegen z.B. 20 Reaktionszyklen schon  $2^{20}$  Amplifikate ergeben (Löffler *et al.*, 1997), (Abb.2).

### 2.5.1.1 Primerkinasierung

Um an das 5'-Ende der DNA radioaktiv markiertes Phosphat (in  $\gamma$ -Stellung) anhängen zu können, wurden 0,22  $\mu$ l 6 $\mu$ M Primerlösung (Endkonzentration 4 $\mu$ M) 0,11  $\mu$ l Kinasemix zugesetzt. Der Kinasemix wurde vorher aus 0,04  $\mu$ l 10x Kinasepuffer, 0,017  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase (10U/ $\mu$ l) und 0,0583  $\mu$ l [ $\gamma$ - $^{32}$ P]dATP (3000Ci/mM) zusammengemischt. Der Ansatz aus Primer und Kinasemix wurde dann bei 37° C für 45 Minuten und bei 65° C für 10 Minuten inkubiert, die Probenaufbewahrung erfolgte bei 4° C.

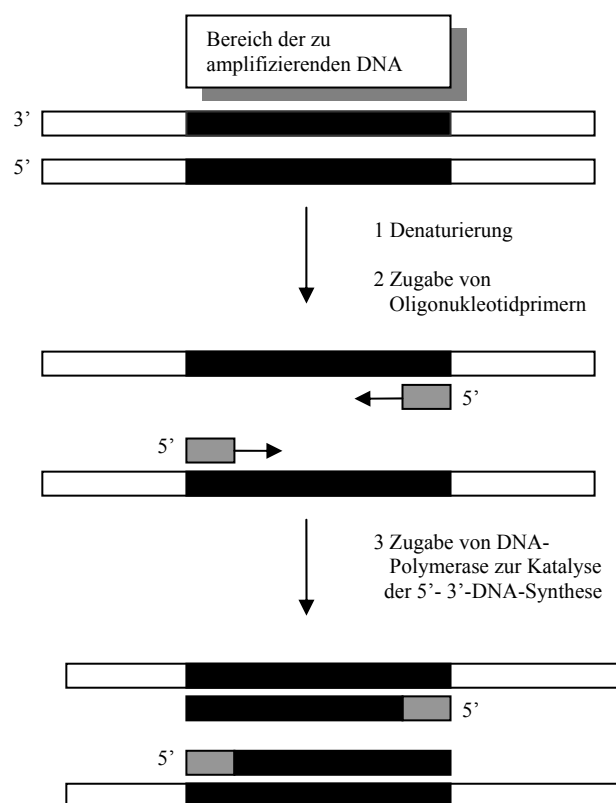


Abb. 4: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerasekettenreaktion

### 2.5.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zu einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l wurden folgende Substanzen vermischt: 50ng genomische DNA, 1,3  $\mu$ l 10x PCR-Puffer, 0,78 $\mu$ l 25 mM Magnesiumchlorid, 1,1  $\mu$ l 2,5 mM dNTPs, 0,22  $\mu$ l

6µM antisense-Primer, die Kinasierung, 0,07 µl Taq-Polymerase und Aqua bidest. In dem PCR Cycler wird initial bei 92° C für 2 min denaturiert, dann schliessen sich 30 Zyklen mit folgendem Verlauf an: 15 sec bei 92° C, 1 min bei Primer-spezifischer Annealing-Temperatur, 1 Min bei 72° C. Am Ende schliesst sich für 7 min bei 72° C eine letzte Extension an, daraufhin eine Abkühlung auf 4° C für 5min. Zum Erhalt deutlicher Amplifikate werden manche Primer einem sogenannten „Touchdown-Programm“ unterzogen, wodurch es zur Reduzierung unspezifischer Produkte kommt; am Beispiel eines „Touchdowns“ von 65° C auf 60° C wird der Ablauf hier beschrieben: 94° C für 3 min, 65° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 64° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 63° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 62° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 61° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 30 Zyklen bei 60° C für 45 sec, bei 72° C für 45 sec, bei 94° C für 30 sec und eine 72° C Inkubation für 5 min.

Nach der PCR wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung mittels Gelelektrophorese bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **2.5.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Mittels der Gelelektrophorese lassen sich PCR-Produkte nach ihrer Größe auftrennen und dadurch besser beurteilen. Die PCR-Produkte werden dazu in ein elektrisches Feld gebracht, in dem die negativ geladenen DNA-Fragmente zum positiven Pol wandern. Durch die netzartige Struktur des Gels werden die Fragmente entsprechend ihrer Größe relativ zur Porengröße des Netzes aufgetrennt. Durch die während der Kinasierung stattgefundenen radioaktiven Markierung sind die DNA-Banden anschließend röntgenologisch darstellbar.

Die Auftrennung der PCR-Produkte mittels dieser Methode musste wegen der 14tägigen Halbwertszeit des [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP innerhalb dieses Zeitraums geschehen.

Dazu wurde der Ansatz für das Polyacrylamidgel aus 31,5g Harnstoff zur Denaturierung der DNA, 7ml 10xTBE, 10,5ml Rotiphorese und Aqua bidest. zu 70ml Gesamtvolumen hergestellt.

Es wurde eine 45cm lange und 35cm breite Glasplatte mit Ethanol und Aceton gesäubert, eine kleinere Platte nur mit Ethanol gesäubert und mit Acrylease beschriftet. Die Platten wurden, durch 0,4mm dicke Spacer getrennt, längsseitig übereinander gelegt und mit Klammern fixiert. Dem vorbereiteten Gelansatz (70ml pro Elektrophorese) wurden zum Auspolymerisieren 40µl TEMED zur Quervernetzung und 400µl APS-Lösung (100mg/ml) zum Starten der Reaktion zugeführt.

Dieser Gelmix wurde sofort luftblasenfrei zwischen die beiden Platten gegossen, der Kamm mit der glatten Seite an der nicht geklammerten Seite circa 5mm in das Gel hineingeschoben. Nach

anderthalb Stunden war das Gel bei Raumtemperatur auspolymerisiert, der Kamm wurde herausgezogen und mit der Zinkenseite 2mm in das Gel wieder hineingeschoben.

Nachdem die Proben mit 10µl Formamid-Laufpuffer versetzt und bei 94° C fünf Minuten denaturiert wurden, wurden 3µl einer Probe mit einer Mehrkanalspritze auf das in die Gelelektrophoresekammer eingespannte Gel aufgetragen. Die genannte Kammer war mit 1x TBE-Puffer gefüllt. Die Laufzeit des Gels betrug bei 60-70 Watt ca. 2 ½ Stunden.

Danach wurde die Gelmatrix von der Glasplatte abgelöst, das Gel auf Gel-Blottingpapier gelegt, in Verpackungsfolie eingewickelt und auf Biomax Röntgenfilme in eine Röntgenkassette gelegt. Die Expositionszeit betrug bei -20°C zwischen 12 und 24 Stunden.

Nach der Entwicklung des so belichteten Films wurden die Banden durch zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet und der Genotyp eines jeden Markers bestimmt.

### **2.5.3 Statistische Analyse**

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Korrelationsanalysen Geno-Phänotyp wurden mit dem genetischen Marker, der am nächsten zu einem QTL Gipfel lag, über eine Varianzanalyse (ANOVA; analysis of variance) und dem Kruskal-Wallis Test mittels des Computerprogramms SPSS für Windows ermittelt. Außerdem wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, um Phäno-Phänotypkorrelationen zu ermitteln. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant anerkannt.

Die Kopplungsanalysen, die zur endgültigen Lokalisation des QTLs hinführen, wurden mit dem Computerprogramm MAPMAKER/QTL durchgeführt. Phänotypen, die normal verteilt waren, wurden der parametrische Kopplungsanalyse unterzogen; im Anschluss daran wurde bei allen Phänotypen, normal verteilt oder nicht, eine nichtparametrische Kopplungsanalyse mit MAPMAKER/QTL (Version 1.9b) durchgeführt. Der Schwellenwert für eine signifikante Kopplung lag bei einem LOD-Score von 4.3, für eine wahrscheinliche Kopplung wurde ein LOD-Score von 2.8 festgelegt (Lander *et al.*, 1987 und 1995). Die Normalverteilung der Phänotypen in der F2-Population für die jeweiligen Eigenschaften wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Phänotypisierung

#### 3.1.1 Parentaltiere

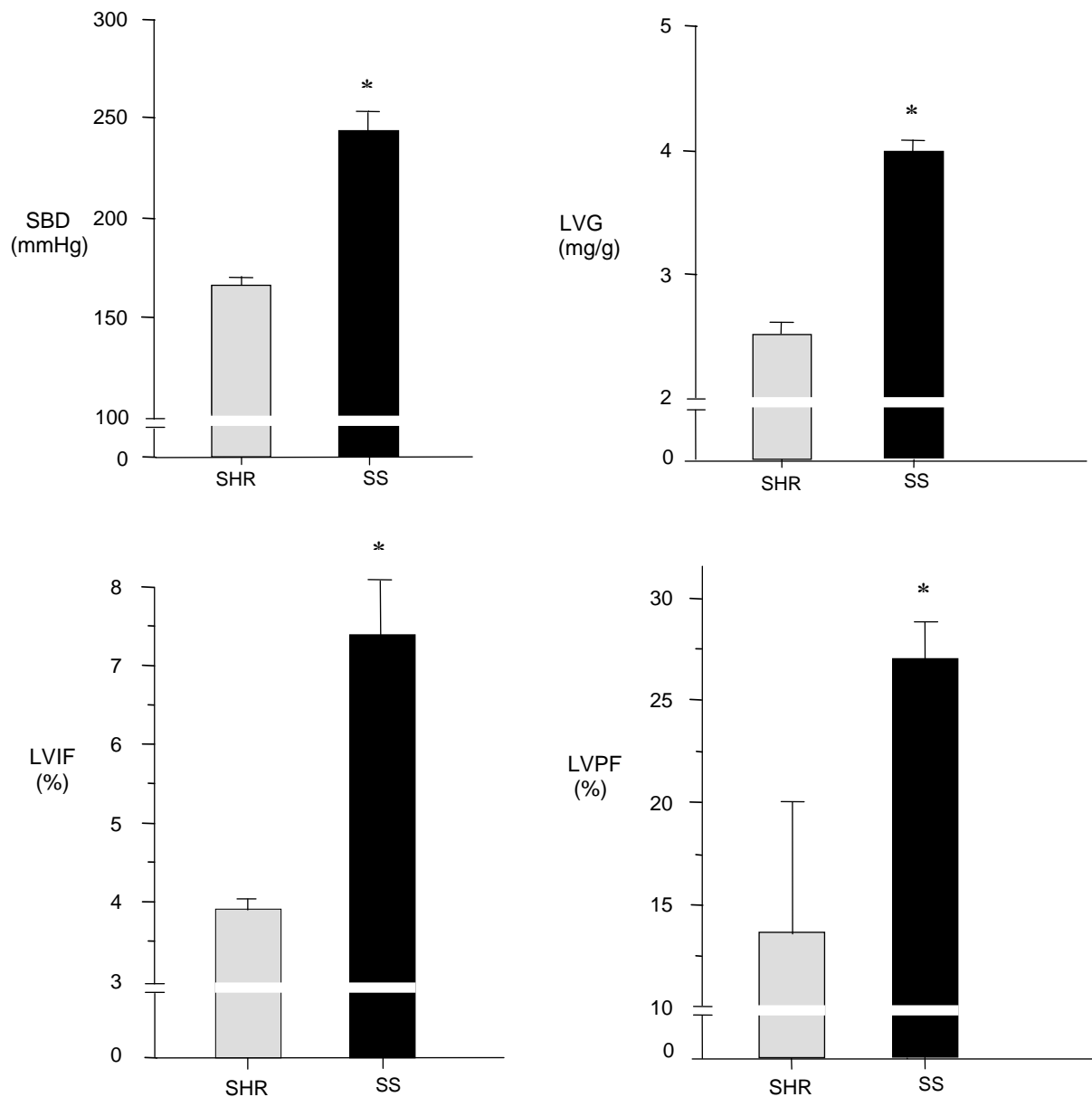
Unter salzarmer Diät entwickelten die SS- und SHR-Stämme einen vergleichbaren spontanen Hypertonus: Bei dem SS-Stamm wurden durchschnittliche systolische Blutdruckwerte von  $171,4 \pm 5,9$  mmHg gemessen, bei dem SHR-Stamm lag der durchschnittliche systolische Blutdruck bei  $161,6 \pm 12,1$  mmHg.

Unter Salzbelastung kam es zu einem signifikanten Blutdruckanstieg bei den Tieren des SS-Stammes, die gemessenen systolischen Blutdruckwerte lagen bei durchschnittlich  $243,3 \pm 11,9$  mmHg ( $p < 0,0001$ ). Bei den SHR-Tieren hingegen kam es unter salzreicher Diät zu keinem signifikanten Blutdruckanstieg, die Werte lagen durchschnittlich bei  $168,9 \pm 16,2$  mmHg.

Bei den salzsensitiven SS-Tieren war neben dem unterschiedlichen Blutdruckverhalten unter Salzbelastung auch zu beobachten, dass das Auftreten kardiovaskulärer Schäden, die sich in erhöhtem relativem linksventrikulärem Gewicht (RLVG) äußern, unter salzarmer Diät wesentlich geringer war als unter Salzbelastung: Das RLVG stieg unter Salzbelastung von  $2,54 \pm 0,16$  mg/g signifikant auf  $3,9 \pm 0,32$  mg/g an ( $p < 0,0001$ ). Die analog ermittelten Gewichte bei den SHR-Tieren unter Salzbelastung unterschieden sich dagegen kaum von denen unter salzarmer Diät: Das RLVG blieb mit einem unter salzarmer Diät ermittelten Durchschnittswert von  $2,58 \pm 0,08$  mg/g und einem Durchschnittswert von  $2,56 \pm 0,1$  mg/g unter salzreicher Diät nahezu gleich.

Hinsichtlich der linksventrikulären interstitiellen und perivaskulären Fibrose (LVIF und LVPF) ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede in deren Ausprägung: Bei den salzsensitiven SS-Tieren erhöhte sich der Anteil der LVIF unter Salzbelastung signifikant und lag bei 7,4% ( $p < 0,0001$ ), wohingegen die salzresistenten SHR-Tiere unter Salzbelastung einen interstitiellen Fibroseanteil von lediglich 3,8% aufwiesen.

Bei der Ausprägung der LVPF zeigten sich ähnliche Ergebnisse: Bei den SHR-Tieren betrug der perivaskuläre Fibroseanteil unter salzreicher Diät lediglich 13,5%, bei den SS-Tieren kam es zu einer signifikanten Steigerung auf durchschnittlich 27% ( $p < 0,0001$ ). Abb. 5 stellt die oben beschriebenen Ergebnisse unter Salzbelastung graphisch dar.



**Abb. 5:** Entwicklung von Blutdruck und kardiovaskulären Endorganschäden unter salzreicher Diät (4%NaCl/Gewicht) bei SHR and SS Parentaltieren.

*SBD*=systolischer Blutdruck; *LVG*=linksventrikuläres Gewicht; *LVIF*=linksventrikuläre interstitielle Fibrose; *LVPF*=linksventrikuläre perivaskuläre Fibrose.

### 3.1.2 F2-Generation

Für die Kopplungsuntersuchung wurde eine F2 (SS<sub>Rkb</sub> × SHR<sub>Rkb</sub>)-Population generiert. Es wurden 230 männliche Tiere dieser Kohorte untersucht. Da in dieser Studie Blutdruckverhalten und kardiale Endorganschäden unter Salzbelastung untersucht wurden, werden ausschließlich die gemessenen Blutdruckwerte nach der oben beschriebenen Salzbelastung der F2-Population, welche nach sechs Wochen begann, betrachtet.



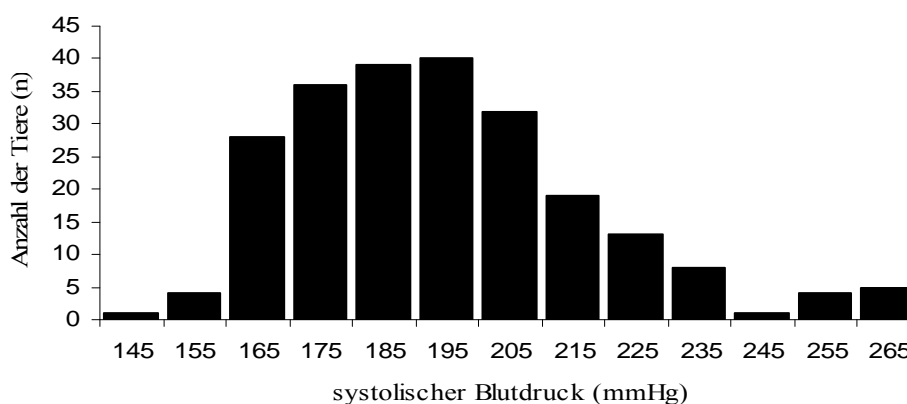
		Mittelwert	±SD	Minimum	Maximum
<b>SBD</b>	(mmHg)	193,8	23,5	149,5	267,7
<b>KG</b>	(g)	361,9	30,2	225	465
<b>LVG</b>	(g)	0,95	0,12	0,67	1,4
<b>RLVG</b>	(mg/g)	2,62	0,36	2,13	5,09
<b>LVIF</b>	(%)	3,4	3	1,1	36
<b>LVPF</b>	(%)	7,8	4,8	2,1	35,4

*Tab. 1: Übersicht über die für die F2-Generation ermittelten phänotypischen Daten.*

*SBD=systolischer Blutdruck; KG= Körpergewicht; LVG= linksventrikuläres Gewicht; RLVG=relatives linksventrikuläres Gewicht; LVPF=linksventrikuläre perivaskuläre Fibrose; LVIF=linksventrikuläre interstitielle Fibrose.*

### 3.1.2.1 Systolischer Blutdruck

Bei den Tieren der F2-Generation waren die ermittelten Blutdruckwerte unter Salzbelastung über einen großen Bereich verteilt, wie bei der Verpaarung zwei solcher Stämme erwartet wurde (Abb.6) .

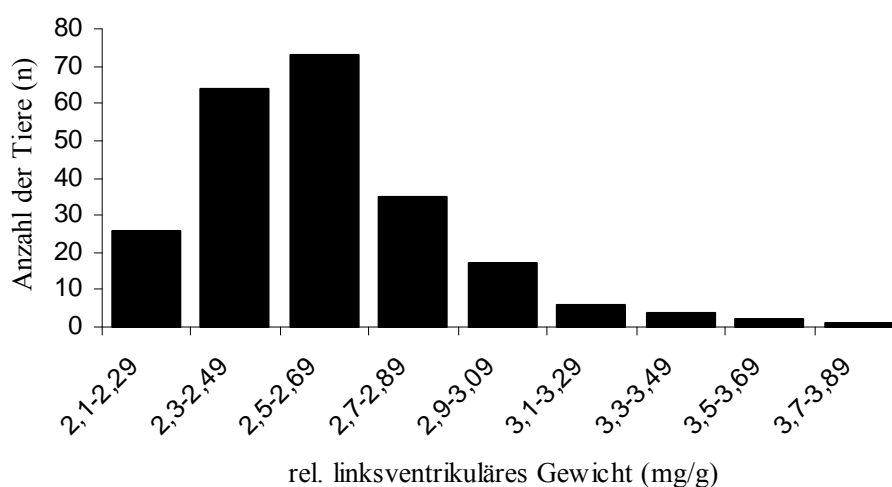


*Abb. 6: Verteilung der Blutdruckwerte unter Salzbelastung bei den Tieren der F2-Generation. Die Ordinate zeigt die Anzahl der Tiere (n), die Abszisse die entsprechenden Blutdruckwerte (mmHg).*

Der niedrigste gemessene Wert zählte dabei *per definitionem* schon zum Bereich der erhöhten Blutdruckwerte. Eine Übersicht über die phänotypischen Ergebnisse der F2-Generation ist in Tab. 1 zusammengestellt.

### 3.1.2.2 Linksventrikuläre Hypertrophie

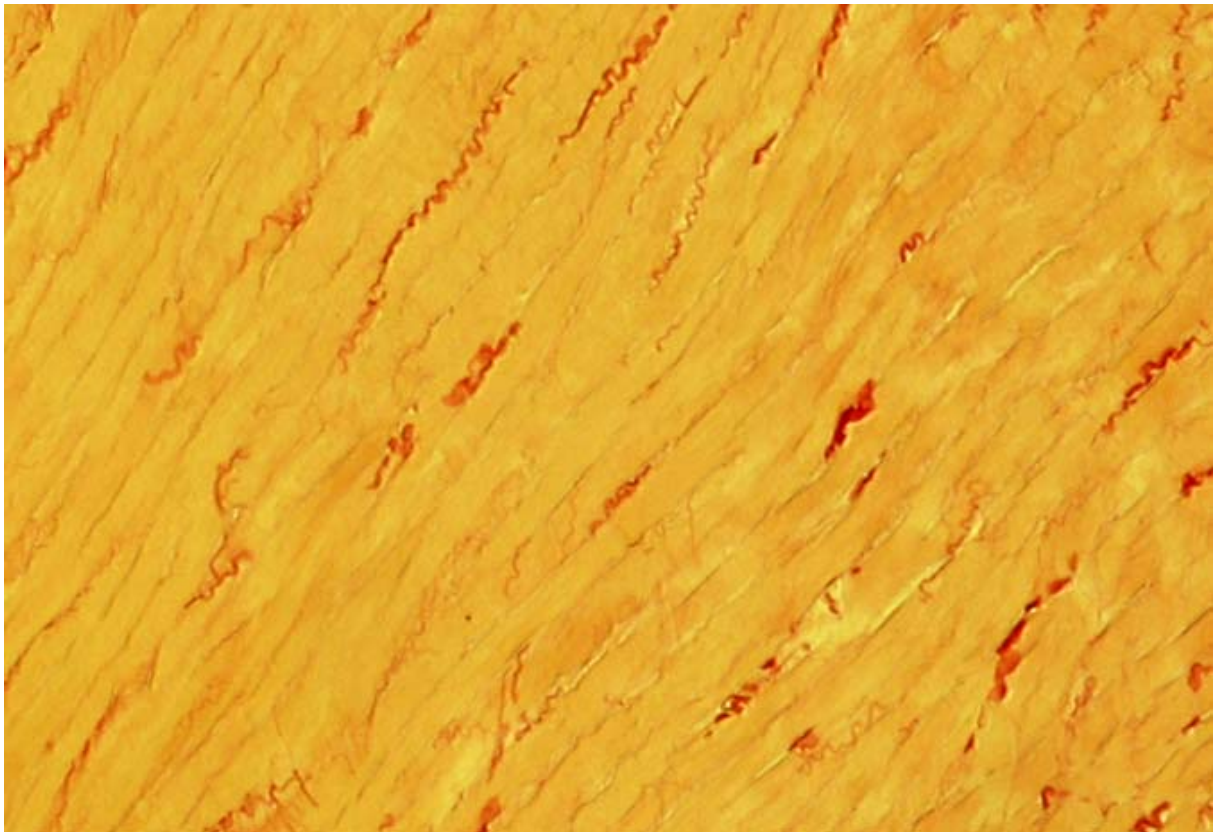
Als Maß für die Beurteilung der LVH bei der F2-Generation wurde das RLVG gewählt. Die Werte sind in der Übersicht der Tab. 1 zu entnehmen. In der die Verteilung der Werte aufzeigenden Graphik in Abb.7 ist der Maximalwert von 5,1 mg/g, der bei einem Tier gefunden wurde, nicht dargestellt (Abb.7).



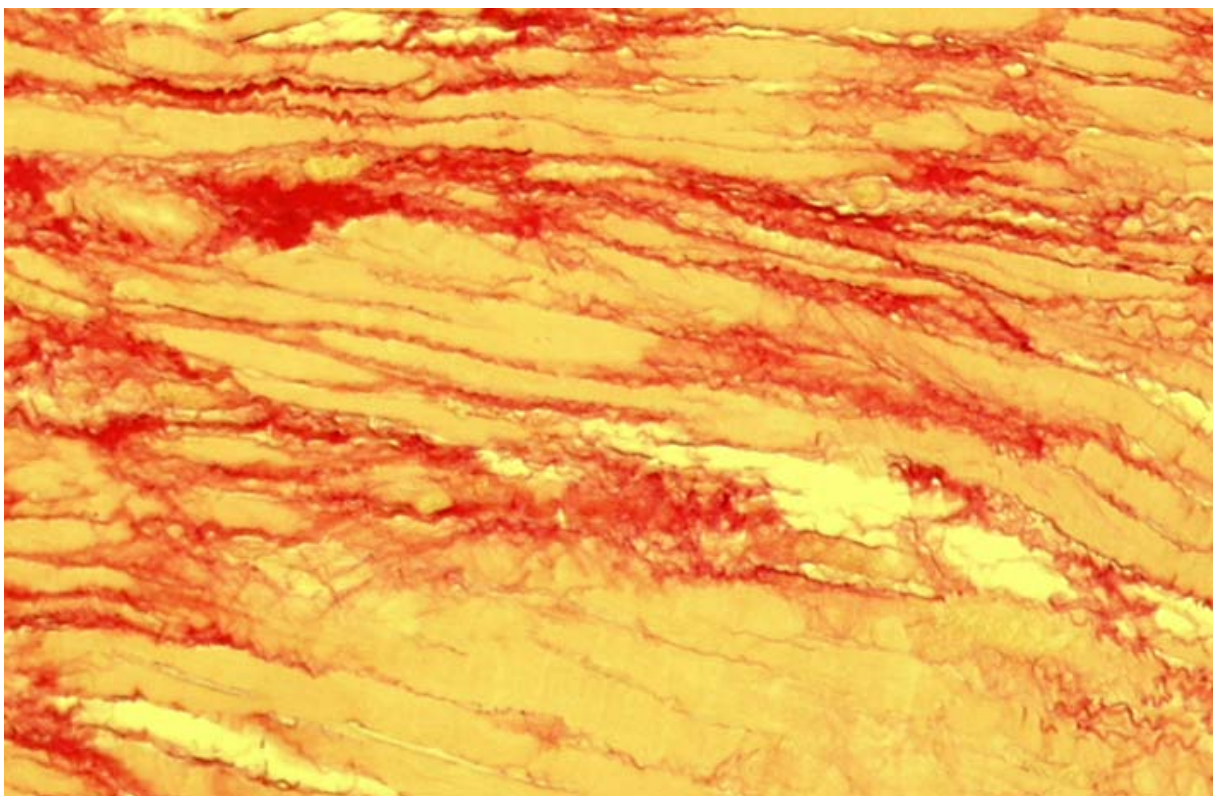
**Abb. 7:** Verteilung der kardialen Hypertrophie, gemessen als relatives, linksventrikuläres Gewicht nach Salzbelastung bei den Tieren der F2-Generation.

### 3.1.2.3 Interstitielle Fibrose

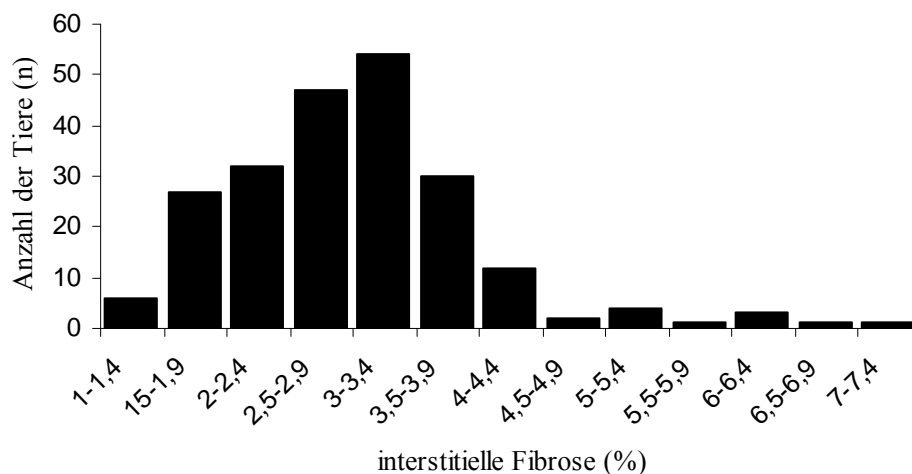
Bei den hier dargestellten, mittels Morphometrie ermittelten, Fibrosewerten handelt es sich um Mittelwerte der gemessenen Fibroseanteile pro Tier. Die Werte sind in Prozent angegeben und entsprechen dem fibrotischen Anteil der jeweiligen Ausschnitte. Die Spannweite der erfassten Werte ist sehr groß, mit dem kleinsten gemessenen Wert von 1,1% im physiologischen Bereich bis hin zu wenigen Tieren mit Werten im hochpathologischen Bereich, bei denen sich analog im histologischen Präparat größere Fibroseareale nachweisen ließen ( Abb. 8 und Abb. 9); aufgrund der besseren graphischen Darstellbarkeit wurden die Extremwerte im Diagramm vernachlässigt. Die Werte sind in der Übersicht in Tab. 1 dargestellt (Abb. 10).



*Abb. 8: Histologischer Schnitt (Sirius-Red Färbung) des Myokards eines Tieres der F2-Generation mit wenig bis mässigem Fibroseanteil*



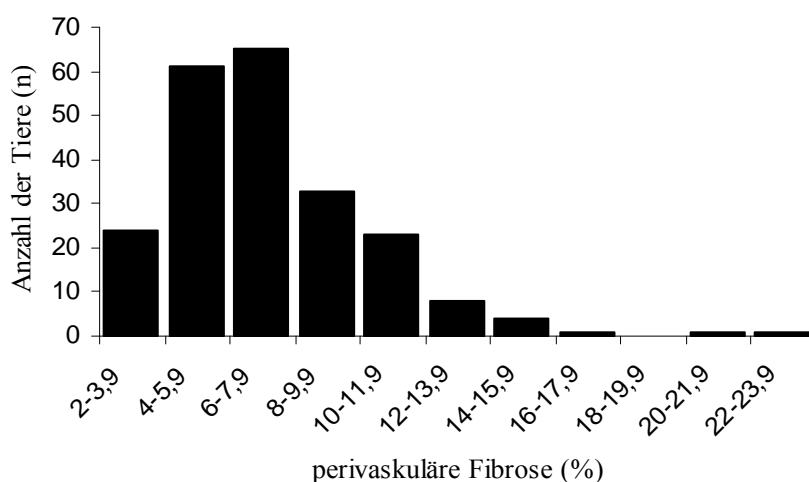
*Abb. 9: Histologischer Schnitt (Sirius-Red Färbung) des Myokards eines Tieres der F2-Generation mit erhöhtem Anteil interstitieller Fibrose.*



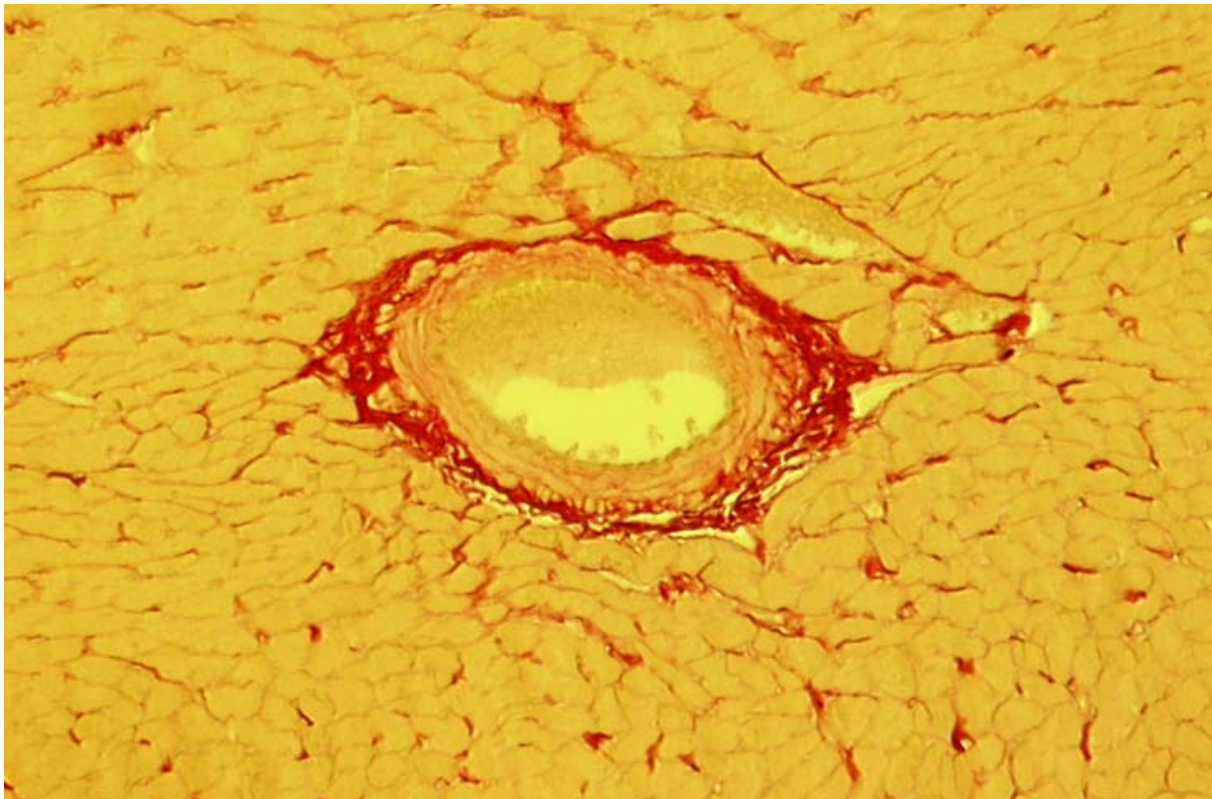
**Abb. 10:** Verteilung der interstitiellen Fibrose bei der F2-Generation. Die Ordinate zeigt die Anzahl der Tiere, die Abszisse den prozentualen Anteil der interstitiellen Fibrose.

### 3.1.2.4 Perivaskuläre Fibrose

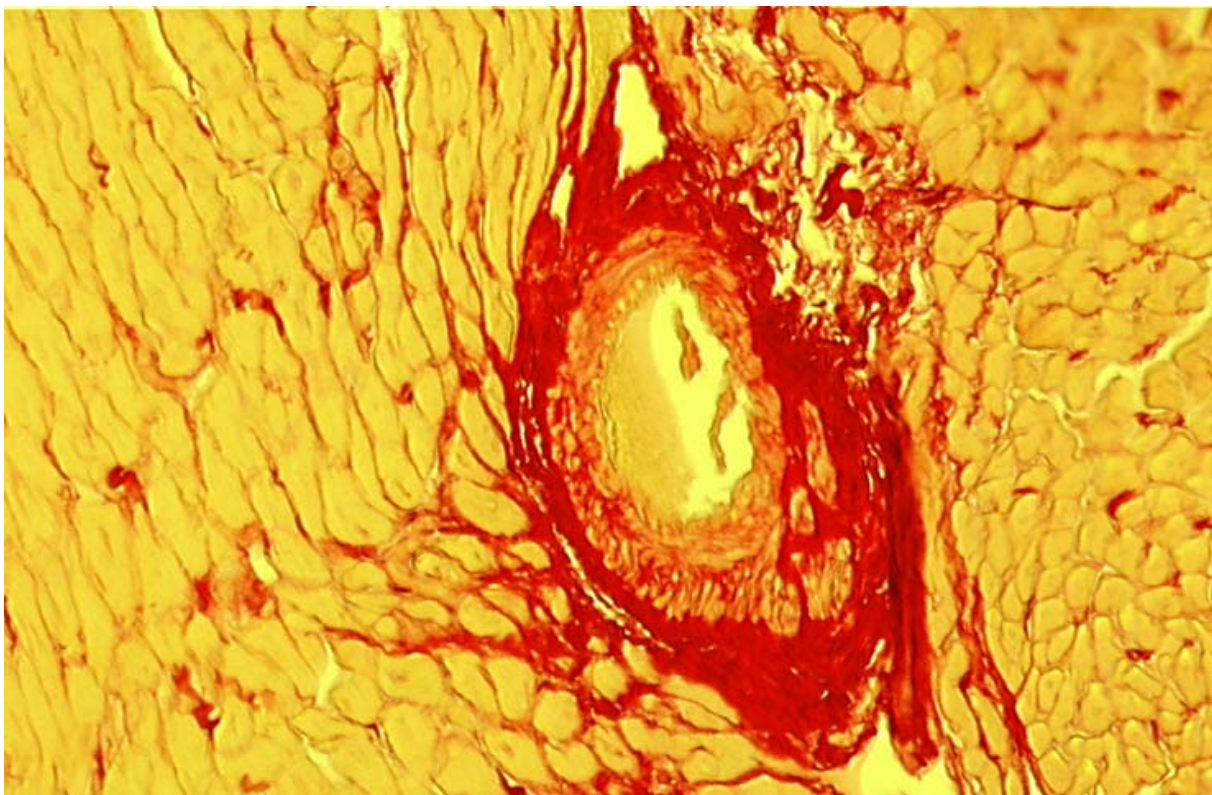
Die perivaskuläre Fibrose wurde bei jedem Tier anhand dreier Fensterausschnitte, in denen jeweils ein Gefässausschnitt enthalten sein musste, ermittelt; angegeben sind die Werte in Prozent als der Anteil des jeweiligen Ausschnittes, der von der Fibrose eingenommen wurde. Die so erhaltenen drei Werte pro Tier wurde gemittelt und dieser Wert in die Studie mit aufgenommen. Generell sind die Werte höher als bei der interstitiellen Fibrose, da die Gefässe schon physiologisch in ein Bindegewebbett eingebettet sind. Auch hier waren die Werte über eine grosse Breite verteilt, eine Übersicht ist in Tab. 3 dargestellt. Aus Gründen der graphischen Darstellung wurden vereinzelt Tiere mit sehr hohen prozentualen Fibrosewerten von 25-35,4% in der Graphik nicht dargestellt (Abb. 11).



**Abb. 11:** Verteilung der perivaskulären Fibrose bei der F2-Generation. Die Ordinate zeigt die Anzahl der Tiere, die Abszisse den prozentualen Anteil der perivaskulären Fibrose.



**Abb. 12:** *Histologischer Schnitt (Sirius-Red Färbung) des Myokards eines Tieres der F2-Generation mit physiologischem perivaskulären Fibroseanteil.*



**Abb. 13:** *Histologischer Schnitt (Sirius-Red Färbung) des Myokards eines Tieres der F2-Generation mit stark erhöhtem perivaskulären Fibroseanteil.*

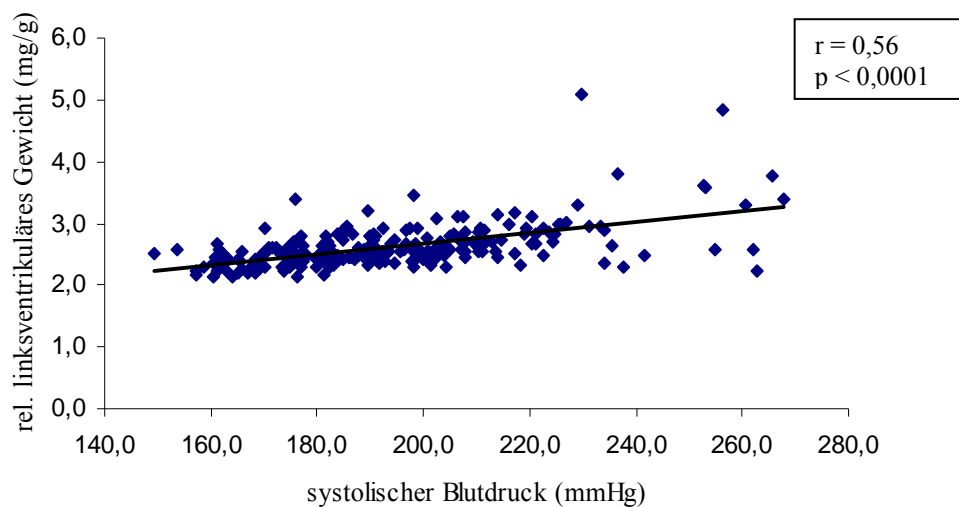
## 3.2 Kosegregationsanalysen und Kopplungsanalyse

Nach Abschluss der phänotypischen Charakterisierungen wurden mittels der Korrelationsanalyse die Beziehung zwischen Blutdruck und LVH bzw. Blutdruck und linksventrikulärer Fibrose untersucht. Weiterhin wurde die LVH mit linksventrikulärer interstitieller und perivaskulärer Fibrose korreliert. Liegt eine Korrelation vor, kann durch die genotypische Analyse differenziert werden, inwieweit sich die Korrelation als Reaktion auf den anderen Parameter erklären lässt und inwieweit sie genetisch bedingt ist.

### 3.2.1 Korrelationsanalysen

#### 3.2.1.1 Korrelation zwischen systolischem Blutdruck und linksventrikulärer Hypertrophie

Die Korrelationsanalyse zwischen den Phänotypen SBD und RLVG als Maß der LVH zeigte mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,56$  und einem  $p$ -Wert  $< 0,0001$  eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern (Abb. 14).

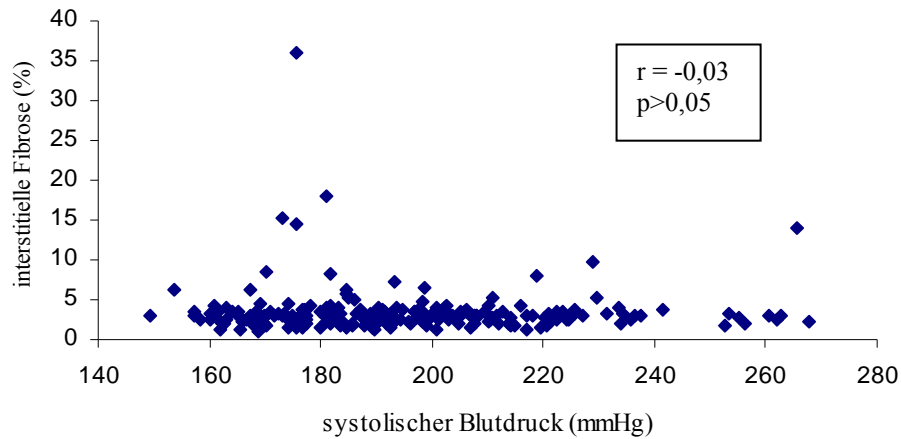


**Abb. 14:** Korrelationsanalyse zwischen relativem linksventrikulärem Gewicht und systolischem Blutdruck.

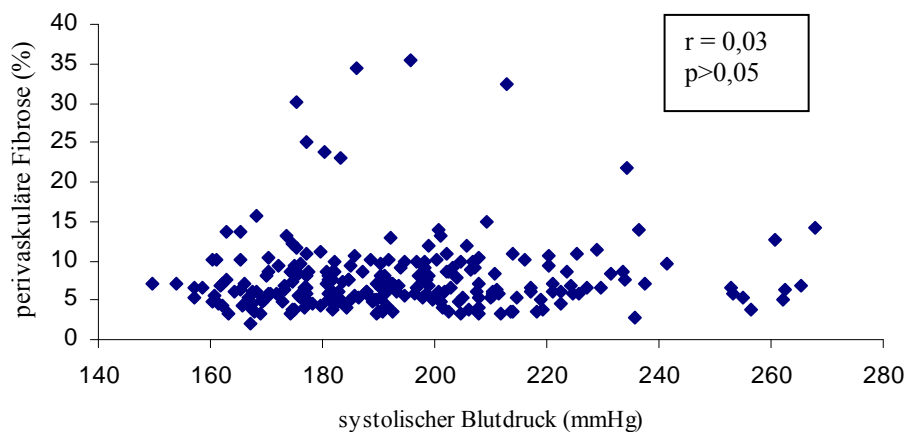
Hieraus ergibt sich, dass 28,1% der Varianz des RLVG und somit der LVH durch den systolischen Blutdruck erklärt werden können.

### 3.2.1.2 Korrelation zwischen SBD und linksventrikulärer interstitielle Fibrose/ Korrelation zwischen SBD und linksventrikulärer perivaskuläre Fibrose

Eine Korrelationsanalyse zwischen den Parametern SBD und LVIF ergab keine signifikante Korrelation ( $r=-0,03$ ;  $p>0,05$ ; Abb.15) und die Analyse zwischen SBD und LVPF zeigte ebenfalls keine Korrelation auf ( $r=0,03$ ;  $p>0,05$ ; Abb. 16).



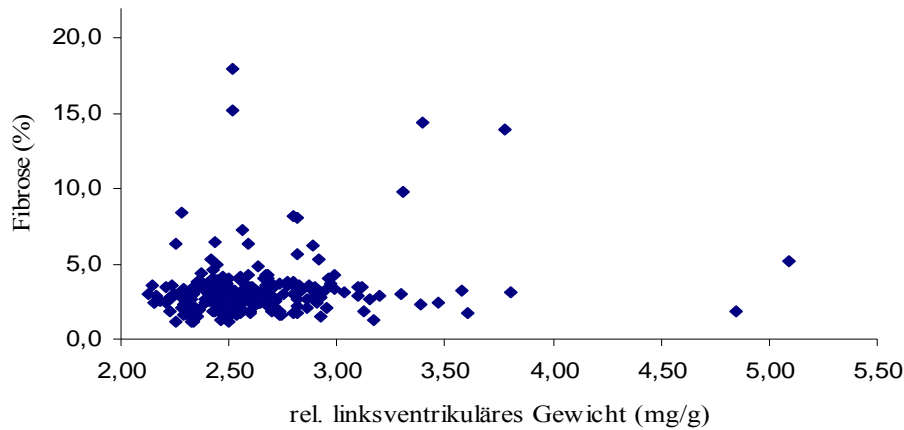
*Abb. 15: Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und linksventrikulärer interstitieller Fibrose.*



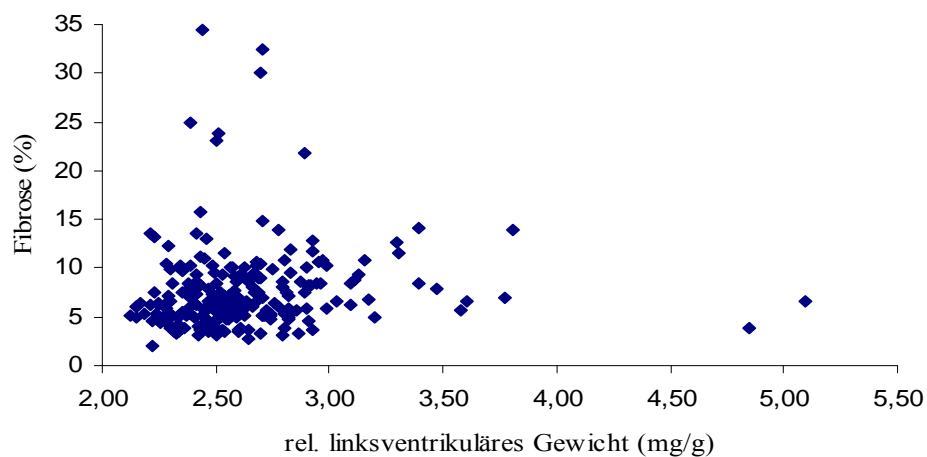
*Abb. 16: Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und linksventrikulärer perivaskulärer Fibrose.*

### 3.2.1.3 Korrelation zwischen LVH und linksventrikulärer interstitieller Fibrose/ Korrelation zwischen LVH und linksventrikulärer perivaskulärer Fibrose

Auch zwischen LVH und LVIF sowie LVH und LVPF ließ sich ebenfalls keine signifikante Korrelation finden (Abb. 17; Abb. 18).



*Abb. 17: Korrelationsanalyse zwischen linksventrikulärer Hypertrophie, dargestellt als relatives linksventrikuläres Gewicht, und linksventrikulärer interstitieller Fibrose.*



*Abb. 18: Korrelationsanalyse zwischen linksventrikulärer Hypertrophie, dargestellt als relatives linksventrikuläres Gewicht, und linksventrikulärer perivaskulärer Fibrose.*



### 3.2.2 Kopplungsanalyse

Nach Durchführung der Genomanalyse konnte eine, wie schon bei Mendel beschriebene und für diese Studie erwartete, Genotypenaufspaltung von 1:2:1 beobachtet werden; dies bedeutet, dass 25% der Tiere der F2-Generation homozygot (SS) für das SS-Allel waren, 25% homozygot (RR) für das SHR-Allel und die restlichen 50% heterozygot (SR), das heisst diese Tiere tragen ein SS- und ein SHR-Allel.

Nach der Phäno- und Genotypisierung wurden die Daten dahingehend statistisch ausgewertet, ob QTLs mit der LVH und linksventrikulärer interstitieller und perivaskulärer Fibrose gekoppelt sind.

	Phänotyp	Locus	Phänotypen				Statistik, ANOVA,P	Max. LOD-Wert		
			SS	(n)	SR	(n)			RR	(n)
RNO1	SBD	D1Rat20	185,5±16,6	(50)	198,7±25,8	(116)	191,3±2,1	(62)	0,0064	<b>2,94</b>
	RLVG	D1Rat73	2,77±0,56	(55)	2,59±0,29	(112)	2,55±0,19	(59)	0,0036	<b>2,94</b>
	LVIF	D1Rat20	3,43±2,04	(50)	3,56±3,61	(116)	3,17±2,23	(62)	0,714	0,2
		D1Rat73	4,06± 5,06	(55)	3,21±1,76	(112)	3,24±2,07	(59)	0,19	0,76
	LVPF	D1Rat20	7,8±4,1	(50)	8,35±5,82	(116)	6,77±2,54	(62)	0,111	0,95
D1Rat73		7,25±4,68	(55)	8,01±5,15	(112)	7,97±4,35	(59)	0,609	0,33	
RNO3	SBD	D3Rat47	190,2±18,9	(61)	191,4±23,8	(120)	202,7±24,4	(47)	0,0016	<b>2,8</b>
		D3Rat53	189,4±21,6	(60)	191,6±23,0	(121)	204,6±25,2	(46)	0,004	<b>2,88</b>
	RLVG	D3Mgh9	2,54±0,21	(58)	2,57±0,28	(117)	2,87±0,55	(46)	<0,0001	<b>7,34</b>
	LVIF	D3Rat47	3,45±1,9	(61)	3,40±3,61	(120)	3,5±2,29	(47)	0,983	0,04
		D3Rat53	3,07±1,07	(60)	3,59±3,82	(121)	3,46±2,02	(46)	0,532	0,27
		D3Mgh7	3,31±1,98	(60)	3,46±3,63	(118)	3,49±2,18	(51)	0,935	0,03
		D3Mgh9	3,12±1,09	(58)	3,59±3,88	(117)	3,35±1,93	(46)	0,613	0,24
		D3Rat47	8,1±5,01	(61)	7,5±4,57	(120)	8,07±5,05	(47)	0,658	0,71
	LVPF	D3Rat53	7,89±5,39	(60)	7,34±4,16	(121)	8,9±5,5	(46)	0,171	0,8
D3Mgh7		7,2±2,53	(60)	7,92±5,53	(118)	8,21±4,97	(51)	0,502	0,3	
D3Mgh9		7,62±5,48	(58)	7,48±4,2	(117)	8,83±5,45	(46)	0,263	0,69	
RNO9	SBD	D9Rat10	206,7±26,3	(55)	191,5±22,4	(120)	185,8±17,3	(55)	<0,0001	<b>5,97</b>
		D9Rat12	2,75±0,46	(61)	2,61±0,34	(116)	2,50±0,20	(53)	0,00089	<b>3,1</b>
	LVIF	D9Rat10	3,08±1,82	(55)	3,39±2,04	(120)	3,85±4,98	(55)	0,391	0,8
		D9Rat125	3,3±1,87	(61)	3,28±2,15	(116)	3,9±4,92	(53)	0,428	0,4
	LVPF	D9Rat10	7,97±4,87	(55)	7,75±4,99	(120)	7,69±4,26	(55)	0,948	0,06
D9Rat125	8,02±5,16	(61)	7,88±5,22	(116)	7,31±3,05	(53)	0,694	0,3		
RNO19	RLVG	D19Rat18	2,78±0,52	(34)	2,65±0,37	(125)	2,50±0,19	(71)	0,00054	<b>3,33</b>
	LVIF	D19Rat18	3,26 ±1,46	(34)	3,78±3,87	(125)	2,89±0,86	(71)	0,116	0,98
	LVPF	D19Rat18	8,45±5,95	(34)	7,93±4,91	(125)	7,12±3,83	(71)	0,395	0,4

Tab. 2: Resultate der Kopplungsanalyse für SBD, RLVG, LVIF und LVPF. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. SS= homozygot für das SS-Allel; SR=heterozygot; RR= homozygot für das SHR-Allel; n= Anzahl der Tiere.

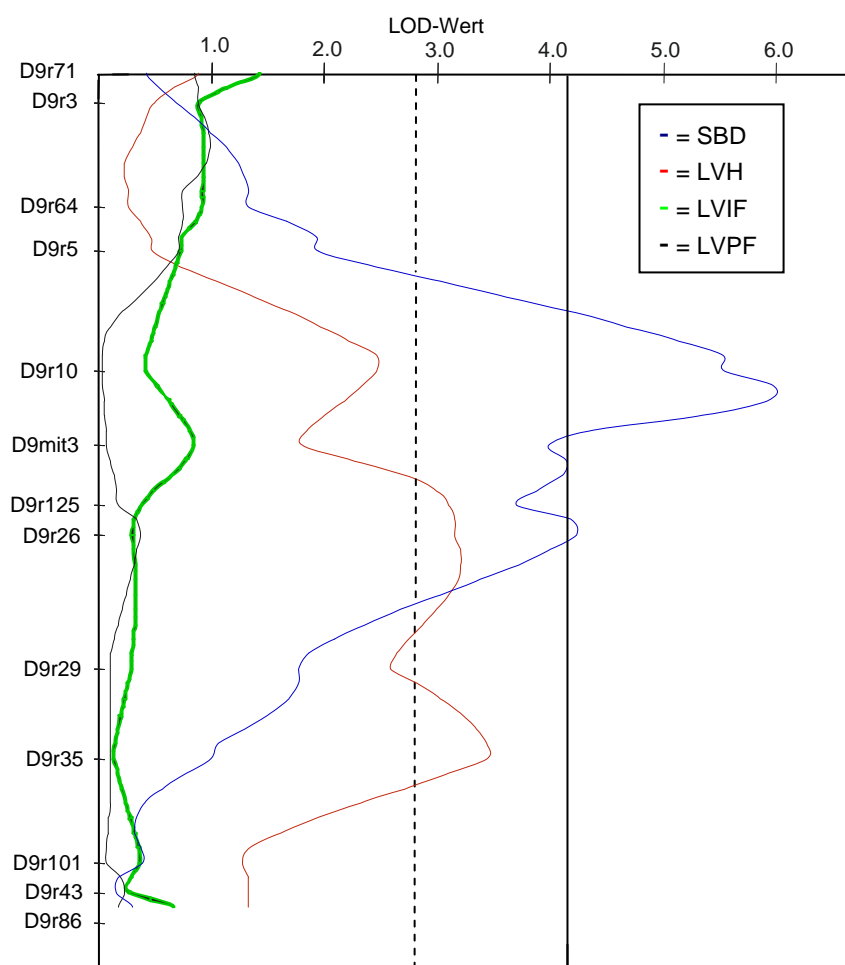
Fettgedruckte LOD-Werte → wahrscheinliche Kopplung (2,8-4,3)

Fettgedruckte und unterstrichene LOD-Werte → signifikante Kopplung (>4,3) .

Mittels der Kopplungsanalyse konnte für die LVH ein signifikantes QTL auf Chromosom 3 mit einer LOD-Wert Spitze von 7,34 identifiziert werden; außerdem wurden drei wahrscheinliche QTLs auf den Chromosomen 1, 9 und 19 entdeckt (Tab. 2, Abb. 19).

Für den systolischen Blutdruck fand sich eine signifikante Kopplung auf Chromosom 9 und eine wahrscheinliche Kopplung auf Chromosom 1 und 3. Auf Chromosom 3 und 9 kolokalisierten die identifizierten QTLs für die LVH mit QTLs für den Blutdruck; auf Chromosom 19 konnte kein Marker gefunden werden, die mit dem Blutdruck assoziiert waren.

Die vier entdeckten QTLs für die LVH sind zu 40% für die Streuung der Werte der LVH in der F<sub>2</sub>-Generation verantwortlich.



**Abb. 19: LOD-Score-Plot-Darstellung von RNO 9 für SBD, LVH, LVIF und LVPF.**  
**Gestrichelte Linie bei LOD-Score von 2,8 → statistisch wahrscheinlich signifikant Kopplung**  
**Durchgezogene Linie bei LOD-Score von 4,3 → statistisch signifikante Kopplung**  
**Maximaler LOD-Score: 5,97 (SBD)**

Für die linksventrikuläre interstitielle und perivaskuläre Fibrose konnten dagegen weder signifikante noch wahrscheinliche QTLs im Genom identifiziert werden. Die fehlende Kopplung der kardialen Fibroseparameter ist beispielhaft für Chromosom 9 in Abb. 19 dargestellt. Hier zeigt sich die signifikante Kopplung zum systolischen Blutdruck und die wahrscheinliche Kopplung zur LVH, während LVIF und LVPF eindeutig keine Kopplung aufweisen.

Eine Genlocus, der für die Ausprägung der kardialen Fibrose bei salzsensitiver Hypertonie verantwortlich ist, konnte damit nicht gefunden werden (Tab. 4, Abb. 19).

## 4. Diskussion

Die essentielle Hypertonie als quantitatives Merkmal stellt für die Wissenschaft hinsichtlich der Ursachenerforschung weiterhin eine Herausforderung dar.

Der Phänotyp Blutdruck wird durch ein Zusammenspiel vieler Faktoren individuell bestimmt, wobei Umwelteinflüsse, Lebensführung, Alter, Geschlecht und genetische Aspekte eine Rolle spielen. Unter den Umwelteinflüssen ist die Höhe der Kochsalzaufnahme von Bedeutung, wobei man salzsensitive von salzresistenten Patienten unterscheiden muss (Jones, 2004). Es wurde herausgearbeitet, dass diese Eigenschaft unter anderem von Genen für Salzempfindlichkeit mitbestimmt wird (Dahl *et al.*, 1962a; Weinberger, 1996). Salzempfindlichkeit ist nicht nur bedeutend für die Höhe des Bluthochdrucks, sondern führt auch zu gravierenderen Endorganschäden und zieht eine höhere kardiovaskuläre Mortalität nach sich (Bihorac *et al.*, 2000).

Linksventrikuläre Fibrose und LVH sind häufig als Endorganschäden bei salzsensitiver Hypertonie anzutreffen, ihr Auftreten lässt sich teilweise als reaktive Adaptation des Herzens auf hypertensive Blutdruckwerte erklären (Motz *et al.*, 1989). Du Cailar *et al.* konnte beim Menschen zeigen, dass die LVH unabhängig vom Blutdruck mit der Salzaufnahme korreliert (du Cailar *et al.*, 2002). Studien haben allerdings gezeigt, dass auch spezifische genetische Faktoren die Ausprägung der beiden Merkmale entscheidend mit beeinflussen (Urabe *et al.*, 1992).

Beim Menschen ist es aufgrund der komplexen multifaktoriellen Pathogenese der Hypertonie sehr schwierig, kontrollierte Bedingungen für genomische Untersuchungen zu schaffen; zudem muss die Dauer der Datenerhebung bei familiären Studien sehr lang sein (Siest *et al.*, 1998). Aufgrund dessen wurden Tiermodelle entwickelt, an denen sich unter standardisierten Bedingungen genomweite Analysen in überschaubarer Zeit durchführen lassen, mit dem Ziel, Gene zu identifizieren, die bei der Ausprägung einer salzsensiblen Hypertonie beteiligt sind.

Die Rattenstämme SHR und SS/Jr entwickeln beide unabhängig von Umwelteinflüssen eine spontane Hypertonie, die sich unter Salzbelastung bei den SS-Tieren als salzsensitives Modell verschlimmert, bei den SHR Tieren als salzresistentes Modell unbeeinflusst bleibt.

Durch Verpaarung dieser beiden, die Salzempfindlichkeit betreffend konträren, Stämme lässt sich ein ideales Modell schaffen, um die genetischen Aspekte der salzabhängigen kardiovaskulären Organschäden bei spontaner Hypertonie zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ausmaß der linksventrikulären Fibrose und LVH und die möglichen genetischen Einflüsse auf diese Merkmale bei salzsensitiver Hypertonie im oben genannten Modell untersucht.

#### **4.1 Phänotypisierung**

Um die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften (Rapp, 1994; Volpe *et al.*, 1994) der SHR- und SS-Tiere zu untermauern, wurde bei den Parentaltieren der jeweiligen Stämme Blutdruckverhalten, KG, LVG und RLVG unter normaler und salzreicher Diät bestimmt. Beide Stämme entwickelten unter salzarmer Diät einen vergleichbaren spontanen Hypertonus, womit die oben genannten Blutdruckeigenschaften beider Stämme bewiesen wurden.

Beim SHR-Stamm als salzresistenten Stamm fanden sich zwischen Normalsalzdiät und Hochsalzdiät nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich Blutdruck, KG, LVG und RLVG, womit die Salzresistenz dieses Stammes unter Beweis gestellt wurde.

Beim SS-Stamm dagegen zeigte sich bei allen Parametern deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Diät. Unter salzreicher Diät waren sowohl erhöhte Blutdruckwerte als auch gravierendere Endorganschäden zu finden; das niedrigere Körpergewicht erklärt sich dabei durch den reduzierten Allgemeinzustand dieser unter Salzbelastung schwerkranken Tiere.

Bei der Phänotypisierung der F2-Tiere wurden bei allen Parametern Werte über eine große Spannbreite gefunden mit Blutdruckwerten von 150 bis 268 mmHg, RLVG von 2,12 bis 5 mg/g, interstitieller Fibrose von 1,1% bis 18% und perivaskulärer Fibrose von 2,1 bis 35,4%. Diese Spannbreite steht in Übereinkunft mit dem genetischen Hintergrund des F2-Stammes und den gegensätzlichen Daten der beiden Parentalstämme und entsprechen den Erwartungen sowie der in der Literatur vorbeschriebenen Eigenschaften dieser Tiere.

#### **4.2 Genotypisierung**

Um die genetische Grundlage zu untersuchen, auf der die Progression von salzsensitiven kardiovaskulären Endorganschäden bei der essentiellen Hypertonie beruht, wurde eine genomweite Analyse der oben beschriebenen F2-Generation durchgeführt. Es wurden alle 21 Chromosomen bis auf das Y-Chromosom untersucht. Der Abstand zwischen den 210 benutzten polymorphen Mikrosatellitenmarker betrug durchschnittlich 10 cM.

Es wurden insgesamt vier QTLs gefunden, die mit vermehrter linksventrikulärer Hypertrophie unter Salzbelastung korrelieren, sie liegen auf den Chromosomen 1, 3, 9 und 19.

Für sowohl interstitielle als auch perivaskuläre Fibrose konnten keine QTL identifiziert werden. Im Folgenden wird auf die Merkmale LVH und Fibrose genauer eingegangen.

### 4.3 Linksventrikuläre Hypertrophie

Die LVH ist als häufige Begleiterscheinung bei Bluthochdruck zu finden. Pathophysiologisch lässt sich dies als dauerhaft erhöhte Druckbelastung des linken Ventrikels erklären, die zu einer Zunahme des Myozytenvolumens und damit zu Strukturveränderungen der Herzkammer führt (Susic *et al.*, 2000). Durch zahlreiche klinische Studien konnte diese Kausalkette auch insofern bewiesen werden, in dem gezeigt werden konnte, dass es durch Senkung des Blutdruckes auch zu einer Verminderung der LVH kam (Schmieder *et al.*, 1996; Fagard *et al.*, 1997).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Korrelationsanalysen ließ sich ebenfalls ein gewisser Zusammenhang zwischen Blutdruck und LVH feststellen. Der Blutdruck war dabei zu 28,1% als Ursache für die Variabilität der LVH-Parameter anzusehen. Somit hat diese Arbeit erneut unter Beweis gestellt, dass die Entwicklung einer LVH zum Teil als Reaktion auf Bluthochdruck anzusehen ist. Die auch klinisch beobachtete höhere Prävalenz der LVH bei Hypertoniepatienten (Lauer *et al.*, 1991a) ist damit experimentell erneut bestätigt worden.

Andererseits gilt die LVH als eigenständiger, vom Bluthochdruck unabhängiger, Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Levy *et al.*, 1990). Die Framinghamstudie konnte dies herausarbeiten (Kannel *et al.*, 1969). Klinische und experimentelle Studien haben zahlreiche Faktoren neben Bluthochdruck identifizieren können, die an der Entwicklung einer LVH beteiligt sind (Mancia *et al.*, 2000). Eine andere Studie hat den Einfluss des Blutdrucks auf die LVH sogar als eher gering eingeschätzt (Tingleff *et al.*, 1996). Auch die in dieser Arbeit erbrachten Resultate unterstützten diese Hypothesen, da der Blutdruck nur zu weniger als einem Drittel als Ursache für die LVH anzusehen war.

Das Ausmaß der Hypertrophie ist zum Teil genetisch determiniert, wie bereits in Studien mit Kreuzungen aus normotensiven und hypertensiven Ratten belegt worden ist (Pravenec *et al.*, 1995; Harrap *et al.*, 2002; Sebki *et al.*, 1999). Tanase *et al.* zeigten bei Untersuchungen an 23 Inzuchtstämmen, dass der Einfluss genetischer Faktoren auf die kardiale Masse größer ist als der des Blutdrucks (Tanase *et al.*, 1982). Auch klinische Studien haben den Einfluss genetischer Faktoren auf das Ausmaß einer LVH unabhängig vom Blutdruck mehrfach gezeigt (Harshfield *et al.*, 1990; Swan *et al.*, 2003).

Das Ausmaß genetischer Einflüsse auf die LVH wurde in dieser Arbeit durch eine genotypische Analyse mittels Kopplungsanalyse untersucht: Es konnten vier QTL für die LVH auf Chromosom 1, 3, 9 und 19 identifiziert werden. Diese vier Loci waren zu 40% für die Variabilität der LVH-Parameter verantwortlich.

Durch diese Zahlen ist nicht nur der genetische Einfluss erneut bewiesen, sondern auch dessen Ausmaß auf die Ausbildung einer LVH wurde noch einmal unterstrichen: Mit 40% war der genetische Einfluss auf die LVH deutlich höher als der des Blutdruckes (28,1%).

Diese Ergebnisse zeigen aber auch auf, dass nicht alle Einflüsse auf die LVH im vorliegenden Stamm erfasst wurden: Von den 70% der Einflüsse, die nicht dem Blutdruck zuzuordnen sind, konnten nur 40% durch die hier gefundenen QTLs erklärt werden.

Die Aktivität des sympathischen Nervensystems scheint Einfluss zu nehmen auf die Ausprägung einer LVH:

Ältere tierexperimentelle Untersuchungen konnten die Zunahme der ventrikulären Wanddicke mit einer Zunahme der Sympathikusaktivität in Verbindung bringen (Sen *et al.*, 1974; Frohlich, 1987). Kelm *et al.* konnten bei Patienten zeigen, dass das Ausmaß einer LVH gekoppelt war an die NoradrenalinKonzentration im Serum und dies unabhängig vom Blutdruck zu beobachten war (Kelm *et al.*, 1996).

Neben weiteren Umweltfaktoren und Lebensführung wird die LVH entscheidend durch das RAAS beeinflusst:

Einmal wird durch Angiotensin II direkt der Blutdruck durch vasokonstriktive, sympathomimetische und natriumretinierende Effekte erhöht. Angiotensin II hat zudem mitogene Aktivität und führt zu vermehrten Synthese myokardialer Proteine. Dieses führt zu Wachstum der Myozyten als auch der nicht-myozytären Anteile des Ventrikels (Mancia *et al.*, 2000). Unterschiedliche Genotypen des ACE Gens korrelierten mit der Ausprägung einer LVH (Iwai *et al.*, 1994).

Viele tierexperimentelle Untersuchungen konnten durch Blockade des RAAS mittels ACE-Hemmer diese Hypothese unterstützen: Brilla *et al.* zeigten, dass durch Gabe von Lisinopril die LVH zusammen mit dem Blutdruck zurückging (Brilla *et al.*, 1991b). Es gibt darüber hinaus viele Daten, die zeigen konnten, dass das RAAS unabhängig von der Blutdruckregulation auf die LVH wirkt: Gohlke konnte in einer an SHR-Ratten durchgeführten Studie zeigen, dass unter einer ACE-Hemmertherapie mit Ramipril die LVH unabhängig von einer Blutdrucksenkung zurück ging (Gohlke *et al.*, 1996). Auch Linz konnte einen blutdruckunabhängigen Effekt auf die LVH bei hypertensiven Ratten beschreiben (Linz *et al.*, 1995).

Auch in klinischen Studien konnte bereits der positive Einfluss der RAAS-Blockade auf die myokardiale Funktion unabhängig von der Blutdrucksenkung gezeigt werden: In der HOPE Studie konnte an einem großen Patientenkollektiv gezeigt werden, dass durch RAAS-Blockade mit Ramipril die kardiale Sterblichkeit blutdruckunabhängig gesenkt werden konnte. Des

Weiteren konnte eine Verminderung der LVH unabhängig vom Blutdruck in diesem Patientenkollektiv gezeigt werden (Mathew *et al.*, 2001).

Weiterhin nimmt das Endothelinsystem einen wichtigen Stellenwert bei der Pathogenese der LVH ein, durch Endothelin-Rezeptor-Blockade konnte die Entwicklung einer LVH im Rattenmodell verhindert werden (Rothermund *et al.*, 2000 und 2002a).

In dieser Arbeit konnte der genetische Einfluss auf die Ausprägung einer LVH bei spontan hypertensiven Ratten bewiesen werden; zudem wurde auch die Verknüpfung von Blutdruck und LVH erneut unterstrichen. Trotzdem ist die LVH im vorliegenden Stamm nicht im vollen Ausmaß erklärt.

Somit werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die Pathophysiologie der LVH mit ihrer Komplexität sowohl im Tiermodell als auch schliesslich beim Patienten besser verstehen und auch behandeln zu können.

#### **4.4 Interstitielle und perivaskuläre Fibrose**

Kardiale interstitielle und perivaskuläre Fibrose sind neben der LVH typische Begleiterscheinungen eines Bluthochdruckes. (Weber *et al.*, 1991). Die abnorme Ansammlung von fibrösem Kollagen ist die wichtigste Komponente bei der Entwicklung von myokardialer Wandsteifigkeit mit gravierenden Folgen auf die Funktionalität des Herzens (Sheridan, 2000). Diese Strukturveränderungen verschlechtern zudem die koronare Vasomotorik, welche wiederum das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wie Myokardischämie und ventrikuläre Dysfunktion fördert (Weber, 2000).

Das Auftreten und das Ausmaß einer kardialen Fibrose ist multifaktoriell bedingt und nicht allein vom Blutdruck abhängig (Weber *et al.*, 1988). Dabei ist die Beziehung zwischen Fibrose, Blutdruck und LVH und deren Zusammenspiel nicht umfassend geklärt: Rossi zeigte, dass der Anteil der interstitiellen Fibrose mit dem Grad der LVH zunimmt (Rossi, 1998). Andere Studien haben gezeigt, dass der disproportioniert erhöhte Anteil von Fibrose sich nicht als obligates Beiwerk einer Hypertrophie finden lässt (Funck *et al.*, 1997, Nicoletti *et al.*, 1999). Durch das unregelmäßige Auftreten von Fibrose in hypertrophierten Herzen lässt sich vermuten, dass das Wachstum von Myozyten und nicht-myozytären Anteilen im Herzen zum Teil unabhängig voneinander abläuft (Weber *et al.*, 1991). Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob es im untersuchten Rattenstamm einerseits Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von kardialer Fibrose, LVH und Bluthochdruck gibt. Weiterhin wurde untersucht, ob genetische Ursachen für



das Auftreten interstitieller und perivaskulärer Fibrose im vorliegenden Stamm eine Rolle spielen.

In dem hier untersuchten Rattenstamm zeigte sich, dass sowohl interstitielle als auch perivaskuläre Fibrose unabhängig von Hypertrophie und Bluthochdruck auftraten. Es konnte keine Korrelation dieser Merkmale herausgearbeitet. Dies unterstreicht die Ergebnisse von Weber, der ebenfalls keine alleinige Korrelation zwischen Ausmaß der Fibrose, Bluthochdruck und LVH fand (Weber et al., 1991).

Darüber hinaus konnte für diesen Rattenstamm gezeigt werden, dass das Ausmaß kardialer Fibrose nicht durch genetische Faktoren beeinflusst wird. Es fanden sich im Gegensatz zur LVH keine QTL für kardiale Fibrose.

Im Formenkreis der arteriellen, salzsensitiven Hypertonie spielt das RAAS bei der Ausprägung myokardialer Fibrose eine entscheidende Rolle. Die synthetische Aktivität kardialer Fibroblasten wird durch die Hormone des RAAS unabhängig von der Hämodynamik beeinflusst (Weber et al., 1991). Dies konnte vor allem durch die Arbeitsgruppe von Brilla, aber auch in anderen tierexperimentellen Studien gezeigt werden (Brilla *et al.*, 1990, 1994, 1996; Rothermund *et al.*, 2000;). Zudem konnten Brilla und Weber zeigen, dass eine direkte Korrelation zwischen Ausprägung einer myokardialen Fibrose und Mineralokortikoidkonzentrationen besteht (Brilla *et al.*, 1992). Erhöhte Aldosteronspiegel ziehen wichtige strukturelle Veränderungen am Herzen nach sich, unter anderem führen sie zur Produktion myokardialen Kollagens, Entstehung interstitieller Fibrose, und endothelialer Dysfunktion. Zudem induziert Aldosteron die Expression von Angiotensin-II-Subtyp-1-Rezeptoren (AT-1 Rezeptoren) (Delcayre *et al.*, 2002). Rothermund konnte an transgenen Ratten zeigen, dass die perivaskuläre Fibrose durch Blockade dieser Rezeptoren zurückging (Rothermund et al., 2001b). Dadurch konnte die zentrale Rolle des RAAS in der Regulation kardialer Fibrose erneut unterstrichen werden. In der Ratte konnte zudem die Produktion der RAAS-Hormone sowohl intrakardial als auch systemisch nachgewiesen werden. Stark abhängig scheint die Aldosteronproduktion zudem vom Salzgehalt der Nahrung zu sein (Brilla *et al.*, 1992).

In großen, klinischen Multicenterstudien (RALES- und EPHEBUS-Studie) konnte dieser Ansatz mittlerweile auch am Menschen bewiesen werden. Durch Gabe von Aldosteronrezeptorantagonisten zusätzlich zum ACE-Hemmer konnte die kardiale Sterblichkeit bei Patienten mit Herzinsuffizienz und nach Myokardinfarkt deutlich reduziert werden. Dies wurde vermutlich durch positive Beeinflussung des kardialen Remodelings und Verminderung der Fibrose durch die oben genannten Rezeptorantagonisten erreicht. (Nakano *et al.*, 2005).

Eng verknüpft mit dem RAAS bei der Entstehung kardialer Fibrose sind zudem Inflammationsprozesse und oxidativer Stress (Sun *et al.*, 2002). Nicoletti konnte im Rattenmodell zeigen, dass durch Druckerhöhung im Ventrikel inflammatorische Zellen in das Gewebe einwandern, die zytokinvermittelt die Fibrosesynthese stimulieren (Nicoletti *et al.*, 1999)

Kardiale Fibrose scheint somit vor allem durch neurohumorale Stimulation zu entstehen. Einen entscheidenden Anteil nimmt dabei Aldosteron ein. Hinsichtlich der Syntheseregulation und den verschiedenen Synthesorten werden weitere tierexperimentelle als auch klinische Untersuchungen nötig sein. Eine genetische Prädisposition scheint dabei keine entscheidende Rolle zu spielen (Siegel *et al.*, 2003).

## 5. Zusammenfassung

Erkrankungen aus dem kardiovaskulären Formenkreis stehen in der Todesursachenstatistik der Industrienationen weiter an erster Stelle. Als wichtige Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gelten unter anderem Hypertonie, LVH und Salzsensitivität. Salzsensitive Hypertoniker haben zudem ein höheres Risiko für die Entwicklung einer LVH und anderen kardialen Endorganschäden.

Als Begleiterscheinung einer LVH findet man regelmäßig eine vermehrte kardiale Fibrose, die aber auch unabhängig davon auftritt und eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer kardialen Dekompensation spielt.

Die kausalen Zusammenhänge und Interaktionen dieser Merkmale sind weiterhin unzureichend geklärt, es gilt aber als gesichert, dass genetische Komponenten neben Lebensweise und Umwelteinflüssen eine wichtige Rolle sowohl bei der Entwicklung einer Hypertonie und einer LVH als auch bei der Ausbildung einer Fibrose und dem Merkmal der Salzsensitivität spielen.

Agrund des komplexen Zusammenspiels all dieser Faktoren, die beim Menschen experimentell sehr schlecht standardisierbar sind, ist die Suche nach Genen, die für diese Merkmale verantwortlich sind, sehr schwierig. Deshalb wurden Tiermodelle entwickelt, bei denen sowohl äussere Faktoren durch Standardisierung von Zucht und Haltung kontrolliert werden können, als auch durch selektive Züchtung und Verpaarung homogene genetische Hintergründe geschaffen werden, an denen sich der genetische Einfluss auf einzelne Merkmale isolierter untersuchen lässt. Die Ratte hat sich als Tiermodell in der Hypertonieforschung über Jahre etabliert.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine F2-Generation aus der Kreuzung der Inzuchtstämme SHR $\times$ SS/Jr untersucht, mit dem SHR Stamm als salzresistenten und dem SS/Jr Stamm als salzsensitiven Stamm. Ziel der Arbeit war einerseits eine umfassende phänotypische Charakterisierung der salzsensitiven spontanen Hypertonie und der assoziierten kardialen Endorganschäden. Spezielle Aufmerksamkeit galt der Ausprägung der LVH sowie dem Ausmaß der linksventrikulären interstitiellen und peripheren Fibrose. Im Anschluss daran sollten Genloci für linksventrikuläre Fibrose und LVH bei salzsensitiver Hypertonie mittels genomweiter Kopplungsuntersuchung und Intervallkartierung identifizieren werden.

Untersucht wurden 230 männliche Tiere einer F2-Generation aus SHR und SS/Jr. Nach anfänglicher salzreicher Diät (0,2% NaCl) über sechs Wochen wurden die Tiere ab der siebten Woche für einen Zeitraum von acht Wochen mit salzreicher Diät (4%NaCl) gefüttert und darunter der Blutdruck gemessen. Nach insgesamt 15 Wochen wurden die Tiere narkotisiert, ihre Organe entnommen und Körper-, Herz- und linksventrikuläres Gewicht bestimmt.

Die Werte, die die histologischen Untersuchungen zur Erfassung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose mittels Morphometrie erbrachten, waren über eine grosse Spannweite verteilt.

Bei den durchgeführten Korrelationsanalysen ließ sich eine Korrelation zwischen Blutdruck und LVH finden, die Merkmale Blutdruck und Fibrose als auch LVH und Fibrose korrelierten nicht miteinander.

Die genomweite Kopplungsanalyse detektierte ein signifikantes QTL (LOD score >4.3) für LVH auf Chromosom 3 und wahrscheinliche QTLs (LOD score >2,8) auf den Chromosomen 1, 9 und 19. Die QTLs auf den Chromosomen 3 und 9 lagen im selben Bereich wie die für den Blutdruck identifizierte QTLs. Auf Chromosom 1 und 19 konnten keine für den Blutdruck kodierende QTLs gefunden werden, die Kopplung zur LVH war also unabhängig vom Blutdruck. Für interstitielle und perivaskuläre Fibrose konnten keine signifikanten QTLs identifiziert werden.

Die gefundene Korrelation zwischen Blutdruck und LVH sowie die detektierten QTLs zeigen das Zusammenspiel zwischen genetischen und Umweltfaktoren bei der Entwicklung einer LVH auf. In dieser Studie war zu 28% der Blutdruck und zu 40% genetische Faktoren verantwortlich für das Ausmaß der Hypertrophie. Hierauf kann ein Erklärungsansatz für die großen Schwankungen hinsichtlich der Hypertrophie bei der salzsensitiven Hypertonie abgeleitet werden.

Durch diese Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Quantität an interstitieller und perivaskulärer Fibrose bei der Dahl SS Ratte weder an den Blutdruck noch genetische Faktoren gekoppelt ist. Somit rücken hinsichtlich der Ursachenforschung für eine vermehrte Fibrose andere Faktoren der Stimulation, die primär nicht genetisch determiniert sind, mehr in den Vordergrund. In diesem Zusammenhang könnten Katecholamine, Mineralkortikoide, oxidativer Stress und das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem eine entscheidende pathophysiologische Bedeutung haben.

## 6. Literaturverzeichnis

**Bihorac A, Tezcan H, et al.:** Association between salt sensitivity and target organ damage in essential hypertension. *Am J Hypertension*. 2000;13:864-872.

**Brilla CG, Janicki JS, et al.:** Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res*. 1991a;69:107-115.

**Brilla CG, Janicki JS, et al.:** Cardioreparative effects of lisinopril in rats with genetic hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1991b;83:1771-1779.

**Brilla CG, Matsubara L, et al.:** Advanced Hypertensive Heart Disease in Spontaneously Hypertensive Rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. *J Hypertension*. 1996;28:269-275.

**Brilla CG, Pick R, et al.:** Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*. 1990;67:1355-64.

**Brilla CG, Weber KT:** Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med*. 1992;120:893-901.

**Brilla CG, Zhou G, et al.:** Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiology*. 1994;26:809-820.

**Cicila GT, Choi C, et al.:** Two blood pressure/cardiac mass quantitative trait loci on chromosome 3 in Dahl rats. *Mamm Genome*. 1999;10:112-116.

**Chalmers J, MacMahon S, et al.:** 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization. *Clin Exp Hypertens*. 1999;21:1009-1060.

**Conrad CH, Brooks WW, et al.:** Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. 1995;91:161-170.

**Dahl LK, Heine M, et al.:** Effects of chronic excess salt ingestion: Evidence that genetic factors play an important role in the susceptibility to experimental hypertension. *J Exp Med*. 1962a;115:1173-1190.

**Delcayre C, Swynghedauw B:** Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of Aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1577-1584

**Du Cailar G, Ribstein J, et al.:** Dietary sodium and target organ damage in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2002; 15:222-229.

**Fagard RH, Staessen JA, et al.:** Relationships between change in left ventricular mass and in clinic and ambulatory blood pressure in response to antihypertensive therapy. *J Hypertens*. 1997;15:1493-1502.

**Frohlich ED.** Physiologic considerations in left ventricular hypertrophy. In: Messerli FH, ed. *The Heart and Hypertension*. New York, NY: Yorke Medical Books; 1987;43-52

**Funck RC, Wilke A, et al.:** Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Med Biol*. 1997;432:35-44.

**Gohlke P, Linz W, et al.:** Vascular and cardiac protection by ramiprol in spontaneously hypertensive rats: prevention versus regression study. *Br J Clin Pract Suppl*. 1996;84:1-10.

**Hamet P:** Environmentally-regulated genes of hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 1996;18:267-278.

**Hamet P, Kaiser MA, et al.:** HSP27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension*. 1996a;28:1112-1117.

**Hamet P, Pausova Z, et al.:** Hypertension: Genes and environment. *J Hypertension*. 1998;16:397-418.

**Harrap SB, Danes VR, et al. :** The hypertrophic heart rat: a new normotensive model of genetic cardiac and cardiomyocyte hypertrophy. *Physiol Genomics*. 2002;9:43-48.

**Harshfield GA, Grim CE, et al.:** Genetic and environmental influences on echocardiographically determined left ventricular mass in black twins. *Am J Hypertens*. 1990;3:538-543.

**Innes BA, McLaughlin MG, et al.:** Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension*. 1998;31:741-746.

**Iwai N, Ohmichi N, et al.:** DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1994;90:2622-2628.

**Jones DW:** Dietary sodium and blood pressure. *Hypertension*. 2004;44:e12.

**Kannel WB, Gordon T, et al.:** Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram: prevalence, incidence and mortality in the Framingham Study. *Annals of Internal Medicine*. 1969;71: 99-105.

**Kelm M, Schäfer ST, et al.:** Left ventricular mass is linked to cardiac noradrenaline in normotensive and hypertensive patients. *J. Hypertens*. 1996;14:1358-1364.

**Kreutz R, Paul M, et al.:** Hypertonie, in Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H (Hrsg.): *Die innere Medizin*. Stuttgart, New York: Schattauer, 2000, Kap.6.10:377-399.

**Kwitek-Black AE, Jacob HJ:** The use of designer rats in the genetic dissection of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2001;3:12-18.

**Lander ES, Green P, et al.:** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*. 1987;1:174-181.

**Lander E, Kruglyak L:** Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet.* 1995;11:241-247.

**Lauer MS, Anderson KM, et al.:** The impact of obesity on left ventricular mass and geometry: the Framingham Heart Study. *JAMA.* 1991;266:231-236.

**Lauer MS, Anderson KM, et al.:** Influence of contemporary versus 30-year blood pressure levels on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 1991a;18:1287-1294.

**Levy D:** Left ventricular hypertrophy: from diagnosis to prognosis. In: *Medicographia.* Left Ventricular Hypertrophy. Vol 22, No.4, 2000;65:211-214.

**Levy D, Garrison RJ, et al.:** Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990;332:1561-1566.

**Lifton RP, Gharavi AG, et al.:** Molecular Mechanisms of Human Hypertension. *Cell.* 2001;104:545-556.

**Linz W, Wiemer G, et al.:** Angiotensin converting enzyme inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis. *Mol Cell Biochem.* 1995;147:89-97.

**Löffler G:** Nucleotide und Nucleinsäuren. In: Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1997, Kap.7:149-174.

**Mancia G, Grassi G:** Mechanical and humoral triggers of cardiac hypertrophy. *Medicographia.* Left Ventricular Hypertrophy. Vol 22, No.4 2000;65:225-230.

**Mathew J, Sleight P, et al.:** Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation.* 2001;104:1615-1621.

**Messerli FH:** Left ventricular hypertrophy and its reduction-the fog is slowly lifting. In: *Medicographia.* Left Ventricular Hypertrophy. Vol 22, No.4 2000;65:207-208.

**Motz W, Strauer BE:** Left ventricular function and collagen content after regression of hypertensive hypertrophy. *Hypertension.* 1989;13:43-50.

**Nakano S, Kobayashi N, et al.:** Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 2005;28:925-936.)

**Nicoletti A, Michel JB.** Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors. *Cardiovasc Res.* 1999;41:532-543.

**Parsi RA, Parsi E:** Arterielle Hypertonie. In: Parsi RA, Parsi E: *Kardiologie Angiologie.* München, 1. Auflage. München, Jena: Urban&Fischer Verlag 2001, Kap.13.4.2: S 488.

**Pfeffer JM, Pfeffer MA, et al.:** Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1979;237:461-468.

**Pravenec M, Gauguier D, et al.:** Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by chromosome scanning of recombinant inbred strains. *J Clin Invest.* 1995;96:1973-1978.

**Rapp JP, Dene H:** Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension.* 1985;7: 340-349.

**Rapp JP:** The genetics of hypertension in Dahl rats, in D. Ganten and W. De Jong (Editors): *Handbook of Hypertension. Experimental and Genetic Models of Hypertension.* New York: Elsevier Science, 1994, vol. 16

**Rapp JP:** Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev.* 2000;80:135-172.

**Riede UN, Schaefer HE, et al.:** Störungen der zellulären und extrazellulären Organisation. In: Riede U-N, Schaefer H-E (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pathologie.* Stuttgart, 3. Aufl., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag 1993, Kap. 2: S.8-76.

**Rossi MA:** Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J Hypertens.* 1998;16:1031-1041.

**Rothermund L, Pinto YM, et al.:** Cardiac endothelin system impairs left ventricular function in renin-dependent hypertension via decreased sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  uptake. *Circulation.* 2000;102:1582-1588.

**Rothermund L, Luckert S, et al.:** Renal endothelin ET(A)/ET(B) receptor imbalance differentiates salt-sensitive from salt-resistant spontaneous hypertension. *Hypertension.* 2001a;37:275-280.

**Rothermund L, Pinto YM, et al.:** Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens.* 2001b;19:1465-1472.

**Rothermund L, Kreutz R, et al.:** Early onset of chondroitin sulfate and osteopontin expression in angiotensin II-dependent left ventricular hypertrophy. *Am J Hypertens.* 2002;15:644-652.

**Rothermund L, Vetter R, et al.:** Endothelin-A receptor blockade prevents left ventricular hypertrophy and dysfunction in salt-sensitive experimental hypertension. *Circulation.* 2002a;106:2305-2308.

**Savage DD, Garrison RJ, et al.:** The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample: the Framingham Study. *Circulation.* 1987;75:126-33.

**Schiebler TH:** Histologie, Gewebelehre. In: Schiebeler TH, Schmidt W, Zilles K (Hrsg.): *Anatomie.* Berlin, 6. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1995, Kap. 3.4.3: S. 54-55.



- Schmieder RE, Martus P, et al.:** Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. A meta-analysis of randomized double-blind studies. *JAMA*. 1996;275:1507-1513.
- Schnee JM, Hsueh WA:** Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. Review. *Cardiovasc Research*. 2000;46:264-268.
- Schunkert H:** Morphological changes following cardiac hypertrophy regression. In: *Medicographia*. Left Ventricular Hypertrophy. Vol 22, No.4 2000;65:234-240.
- Sebkhani A, Zhao L, et al.:** Genetic determination of cardiac mass in normotensive Rats: Results from an F344xWKY cross. *Hypertension*. 1999;33:949-953.
- Sen S, Tarazi RC, et al.:** Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rat. *Circ. Res*. 1974;35:775-781.
- Sheridan DJ:** Pathophysiology of left ventricular hypertrophy. In: *Medicographia*. Left Ventricular Hypertrophy. Vol 22, No.4 2000;65:215-224.
- Siegel AK, Planert M, et al.:** Genetic loci contribute to the progression of vascular and cardiac hypertrophy in salt-sensitive spontaneous hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1211-1217.
- Siest G, Visvikis S, et al.:** Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36:35-42.
- Statistisches Bundesamt:** Zweigstelle Bonn, Todesursachenstatistik. © Statistisches Bundesamt Deutschland, Zweigstelle Bonn, 2004.
- Stoll M, Kwitek-Black AE, et al.:** New target regions for human hypertension via comparative genomics. *Genome Res*. 2000;10:473-482.
- Sun Y, Zhang J, et al.:** Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol*. 2002;161:1773-1781.
- Susic D, Frohlich ED:** Hypertension and the heart. *Curr Hypertens Rep*. 2000; 2:565-569.
- Swan L, Birnie DH, et al.:** The genetic determination of left ventricular mass in healthy adults. *Eur Heart J*. 2003;24: 577-582.
- Swynghedauw B:** Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiol Rev*. 1999;79: 215-262.
- Tanase H, Yamori Y, et al.:** Heart size in inbred strains of rats, part 1: genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension*. 1982;4:864-872.

**Thamm M:** Blutdruck in Deutschland-Zustandsbeschreibung und Trends. *Gesundheitswesen*. 1999;61:S90-93.

**Tingleff J, Munch M, et al.:** Prevalence of left ventricular hypertrophy in a hypertensive population. *Eur Heart J*. 1996;17:143-149.

**Urabe Y, Mann DL, et al.:** Cellular and ventricular contractile dysfunction in experimental canine mitral regurgitation. *Circ Res*. 1992;70:131-147.

**Volpe M, Rubattu S:** Pathophysiological aspects of genetically determined hypertension in rats, with special emphasis on stroke-prone spontaneously hypertensive rats. In: D. Ganten and W. De Jong (Editors): *Handbook of Hypertension. Experimental and Genetic Models of Hypertension*. New York: Elsevier Science, 1994, vol. 16

**Weber KT, Janicki JS, et al.:** Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ. Res*. 1988;62:757-765.

**Weber KT, Pick R, et al.:** Patterns of myocardial fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1989;21:121-131.

**Weber KT:** Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Card*. 1989a;13:1637-52.

**Weber KT, Brilla CG:** Pathological hypertrophy and cardiac Interstitium. Fibrosis and Renin-angiotensin-aldosteron system. *Circulation*. 1991;83:1849-1865.

**Weber KT, Brilla CG, et al.:** Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res*. 1993;27:341-348.

**Weber KT:** Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2000;15:264-272.

**Weber KT:** Cardioreparation in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2001;38:588-591.

**Weinberger MH, Miller JZ, et al.:** Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance. *Hypertension*. 1986;8:II 127-II134.

**Weinberger MH, Fineberg NS:** Sodium and volume sensitivity of blood pressure. Age and pressure change over time. *Hypertension*. 1991;18:67-71.

**Weinberger MH:** Salt sensitivity as a predictor of hypertension. *Am J Hypertens*. 1994;7: 515-519.

**Weinberger MH, Fineberg NS, et al.:** Salt Sensitivity, pulse pressure, and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension*. 2001;37:429-432.

**Wolf-Maier K, Cooper RS et al.:** Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA*. 2003;289:2363-2369.

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### 7.1.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Verpaarungsschema	18
Abb.2	Morphometrie	26
Abb.3	Morphometrie	27
Abb.4	PCR	28
Abb.5	Endorganschäden Parentaltiere	32
Abb.6	Blutdruckverteilung F2-Generation	33
Abb.7	Verteilung LVH F2-Generation	34
Abb.8	Histologisches Präparat interstitielle Fibrose I	35
Abb.9	Histologisches Präparat interstitielle Fibrose II	35
Abb.10	Verteilung interstitieller Fibrose	36
Abb.11	Verteilung perivaskulärer Fibrose	36
Abb.12	Histologisches Präparat perivaskuläre Fibrose I	37
Abb.13	Histologisches Präparat perivaskuläre Fibrose II	37
Abb.14	Korrelationsanalyse SBD/LVH	38
Abb.15	Korrelationsanalyse SBD/LIF	39
Abb.16	Korrelationsanalyse SBD/LPF	39
Abb.17	Korrelationsanalyse LVH/LIF	40
Abb.18	Korrelationsanalyse LVH/LPF	40
Abb.19	QTLs auf Chromosom 9	42

#### 7.1.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab.1</b>	Phänotypisierung F2-Generation	33
<b>Tab.2</b>	Kopplungsanalyse	41

## 7.2 Publikationen

### 7.2.1 Originalarbeiten

Siegel AK, Planert M, **Rademacher S**, Kreutz R: Genetic loci contribute to the progression of vascular and cardiac hypertrophy in salt-sensitive spontaneous hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1211-1217.

### 7.2.2 Abstracts

A.-K. Siegel, M. Planert, **S. Rademacher**, A. Poyan Mehr, P. Koßmehl, M. Wehland, M. Stoll, R. Kreutz. Genetic Loci Contribute to the Progression of left ventricular and vascular hypertrophy but not to left ventricular fibrosis in salt-sensitive spontaneous hypertension. 3<sup>rd</sup> International Heart Conference 2003, Abstract Volume S 14.

### 7.2.3 Poster

Siegel A.-K., Planert M., **Rademacher S.**, Poyan Mehr A., Koßmehl P., Wehland, Stoll M., Kreutz R. Genetic loci contribute to the progression of left ventricular and vascular hypertrophy but not to left ventricular fibrosis in salt-sensitive spontaneous hypertension. 3rd International Heart Failure Conference Göttingen June 26th – 28th 2003.

### **7.3 Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung, seine Geduld und Ratschläge sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Peter Kossmehl für die tägliche Betreuung, intensive Hilfe und Geduld bei sowohl technischen Fragen als auch Fragen der Auswertung bedanken.

Auch Anja-Kristin Siegel möchte ich hiermit meinen herzlichen Dank für die fortwährende Unterstützung und Hilfsbereitschaft aussprechen.

Für die sehr gute Arbeitsatmosphäre danke ich allen DoktorandInnen und MitarbeiterInnen der Abteilung, besonders bei Frau Stürje möchte ich mich für Ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Vielen Dank an Martin Mostler, Julie und Claudia Bernardy!

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich über die gesamte Zeit unterstützt und immer wieder motiviert haben.

## 7.4 Curriculum Vitae

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

## 7.5 Erklärung

„Ich, Sibylle Rademacher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Genetik der linksventrikulären Hypertrophie und Fibrose bei salzsensitiver experimenteller  
Hypertonie im Rattenmodell

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

1.12.2009  
Datum

S. Rademacher  
Unterschrift