

4 Diskussion

4.1 Phänotypische Analyse der Parentaltiere F344 und SHRSP

Die Erforschung komplexer Erkrankungen gestaltet sich in humanen Populationen durch die genetische Vielfalt sowie durch die unterschiedlichen Lebensweisen der untersuchten Individuen äußerst schwierig. Tierexperimentelle Studien bieten im Gegensatz dazu die Möglichkeit kontrollierter und standardisierter Untersuchungsbedingungen. In diesem Zusammenhang stellen die Rattenstämme F344 und SHRSP aufgrund bestimmter Charakteristika ein lohnendes Tiermodell zur Untersuchung der kardiovaskulären Endorganschäden bei Hypertonie dar.

Die F344-Ratte zeichnet sich durch eines der niedrigsten Herzgewichte der zu Forschungszwecken verwendeten Rattenstämme aus, einer Resistenz gegenüber Salz sowie normotone Blutdruckwerte, während die SHRSP-Ratte hohe Herzgewichte, Salzsensitivität und eine spontane Hypertonie aufweist.

Kosegregationsuntersuchungen schaffen zusammen mit der gezielten Auswahl von Tieren mit bestimmten Merkmalen und der Angleichung von Umweltbedingungen für die untersuchten Kohorten ein potentes Werkzeug zur Aufdeckung bisher verborgener molekularbiologischer Zusammenhänge.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch eine Kosegregationsanalyse die Vererbbarkeit kardialer und vaskulärer Hypertrophie bestätigt werden und vor allem herausgefunden werden, welche Mechanismen im Einzelnen für die ursächlichen Prozesse verantwortlich sind. Vor der eigentlichen Kosegregationsanalyse wurden die Parentaltierstämme zunächst einer phänotypischen Untersuchung unterzogen, um deren in der Literatur beschriebene Charakteristika zu überprüfen.

Bei Ratten sind die physiologische Blutdruckhöhe und die mittleren Blutdruckschwankungen dem Menschen vergleichbar. In dieser Untersuchung zeigten SHRSP-Ratten im Alter von 14 Wochen nach achtwöchiger Salzbelastung erwartungsgemäß höhere Blutdruckwerte und schwerere Herzen als F344-Ratten. Tiere des SHRSP-Stammes entwickelten unter Salzbelastung eine schwere Hypertonie. Die gemessenen Werte betragen im Mittel $262,08 \pm 22,83$ mmHg, während F344-Ratten unter Salzbelastung insgesamt niedrigere, im normotensiven Bereich befindliche Blutdruckwerte aufzeigten. Hier betrug der mittlere Blutdruck

132,83 ± 7,55 mmHg. Zur Bestimmung des Blutdruckes wurde die nicht-invasive Tailcuff-Methode gewählt, deren Validität durch frühere Untersuchungen gesichert wurde (Pfeffer et al., 1971).

Der Vergleich der Blutdruckwerte salzbelasteter und salzunbelasteter SHRSP-Tiere verdeutlichte die Salzsensitivität des SHRSP-Rattenstammes. Ohne Salzbelastung lag der mittlere Blutdruck in dieser Kohorte bei 172 ± 13,19 mmHg, also rund 35% niedriger als unter Salzbelastung.

Einer Studie von Tanase et al. zufolge, beträgt bei F344-Tieren unter Nidrigsalzdiät der mittlere Blutdruck 131 ± 1,5 mmHg (Tanase et al., 1982). Diese Blutdruckhöhe entsprach etwa den von uns gemessenen Drücken bei salzbelasteten Tieren. Die nicht signifikante Differenz in der Ausprägung des mittleren Blutdruckes ist als Ausdruck der Salzresistenz dieses Stammes zu werten.

Die Gegenüberstellung der SHRSP-Gruppen zeigte, dass salzbelastete Tiere im Mittel um 25 % schwerere Herzen besaßen als salzunbelastete Tiere.

Beim F344-Stamm konnte dagegen bei differierender Diät kein signifikanter Unterschied der Herzgewichte festgestellt werden. Salzunbelastete F344-Tiere besitzen ein durchschnittliches relatives Herzgewicht von 2,56 ± 0,03 mg/g (Tanase et al., 1982), welches etwa mit den von uns ermittelten Werten für F344-Tiere unter Salzbelastung übereinstimmte.

Ohne Salzbelastung wogen die absoluten sowie die relativen Herzgewichte bei SHRSP-Ratten etwa 30 bis 40% mehr als beim Vergleichsstamm F344. Unter Salzbelastung waren die Herzen im Durchschnitt sogar 80% schwerer als bei salzunbelasteten und auch salzbelasteten F344-Tieren.

Damit wurde in dieser Untersuchung die unterschiedliche Salzempfindlichkeit der Parentaltierstämme deutlich. Die Ergebnisse bestätigen auf diese Weise die in der Literatur beschriebenen Blutdruckeigenschaften der verwendeten Stämme und unterstreichen die unterschiedliche Bedeutung von Salzzufuhr auf pathologische Veränderungen der Endorgane bei Hypertonie.

4.2 Analyse der F2-Population

Die Blutdruckanalyse der F2-Population zeigte ein unimodales, linksgipfeliges Verteilungsmuster. Der Mittelwert betrug 187 mmHg und lag damit im hypertensiven Bereich. Der Median, der bei 183 mmHg lag, verdeutlichte die große Anzahl hypertensiver Tiere. Die relativen Herzgewichte lagen zwischen 2,54 und 4,86 mg/g, während die Werte für den linken Ventrikel allein Gewichte zwischen 2,09 und 3,88 mg/g ergaben. Der Quotient aus Gewicht und Länge der Aorta betrug im Mittel $8,94 \pm 1,15$ mg/cm. Die Verteilungsmuster der Herzgewichte und der Werte der Aortenhypertrophie waren ebenfalls rechtsschief bzw. linksgipflig.

Die Verteilungsmuster dieser Phänotypen ähneln der in der Natur häufig zu findenden Gauss'schen Normalverteilung und werden auch als quantitative Merkmale bezeichnet. Zum einen eignen sich Merkmale mit quantitativem Skalenniveau für Kosegregationsstudien, zum anderen ist es möglich, zur Bestimmung der Regression den Pearson-Test anzuwenden. Damit sollten Zusammenhänge sich bedingender Phänotypen aufgedeckt und quantifiziert werden. Die mit diesem Test durchgeführten Korrelationsanalysen ergaben jedoch nur eine schwache Verknüpfung zwischen Blutdruck und Herzgewicht. Gerade einmal 6,5% der Gesamtvarianz des Herzgewichtes konnten bei dieser Kreuzung durch den Blutdruck erklärt werden. Für die aortale Hypertrophie findet sich kein Anhalt für eine statistisch relevante Korrelation mit dem Blutdruck.

In diesem Modell scheint der Einfluss anderer Variablen auf die untersuchten Phänotypen größer zu sein als der des Blutdrucks. Es wäre aber auch denkbar, dass der Zeitpunkt der Phänotypisierung in einer zu frühen Lebensphase der Ratte stattfand, um Hypertonie bedingte Hypertrophieprozesse zu erfassen. Möglich wäre, dass bis mindestens zur 14. Lebenswoche die erblichen Faktoren größeren Einfluss auf das Herz- und Aortengewicht nehmen als hämodynamische. Es ist bekannt, dass bestimmte histologische Strukturparameter des Herzgewebes sich abhängig von der Dauer der hämodynamischen Belastung verändern. So ist beispielsweise die Konzentration von Hydroxyprolin, dem Hauptbestandteil von Kollagen, bei Goldblattratten erst nach 24 Wochen signifikant erhöht (Medugorac, 1977). Ferner kommt es bei hypertensiven SHR-Ratten erst in der 13. bis 90. Lebenswoche unter andauernder hämodynamischer Belastung zu einer maßgeblichen Zunahme des

Herzgewichtes (Vincent et al., 1996), dies könnte auch bei der SHRSPxF344-F2-Population eine Rolle spielen.

Bezüglich der aortalen Hypertrophie ist anzumerken, dass diese in der F2-Population mit etwa 12 mg/cm nur sehr gering ausprägt ist. Im Vergleich dazu kann dieser Index bei anderen in der Forschung verwendeten Rattenstämmen durchaus doppelt so hohe Werte annehmen (Hayakawa & Raij, 1997). Die schwache Ausbildung und geringe Variationsbreite der aortalen Hypertrophie verkompliziert die Identifizierung zu Grunde liegender genetischer Ursachen.

4.3 Einflussgrößen auf die untersuchten Phänotypen

Während die Hypertonie die wichtigste Ursache für die Entwicklung einer Hypertrophie des Herzens ist, scheint dagegen die Varianz der Merkmalsausprägung in erheblichem Umfang von anderen Faktoren beeinflusst zu werden. Die vorgenommenen phänotypischen Untersuchungen und Korrelationsanalysen lassen den Schluss zu, dass nicht allein die Hämodynamik für den Grad der Herzhypertrophieausprägung verantwortlich sein kann. Segregationsuntersuchungen mit verschiedenen Rattenstämmen sowie die Studien in Framingham und Tecumseh legten bereits die Vererbbarkeit der Herzhypertrophie nahe (Tanase et al., 1982; Kannel et al., 1987; Ganau et al., 1990). Diese Annahme wurde durch die Strong Heart Family Studie gestützt (North et al., 2002). Außerdem konnte aufgrund dieser Studienergebnisse der Anteil des genetischen Einflusses auf die Herzhypertrophievariation sogar auf 65 bis 75% geschätzt werden.

Ferner wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass eine Hypertrophie sogar gänzlich ohne das Vorliegen hämodynamischer Ursachen auftreten kann und auch einer Hypertonie vorausgehen kann (Kuroda et al., 1991; Tingleff et al., 1996; Swynghedauw, 1999; Palmieri et al., 1999). In diesem Zusammenhang stehen Untersuchungen an F344-Ratten, in denen beobachtet wurde, dass diese niedrigere Herzgewichte aufwiesen trotz höherer Blutdruckwerte im Vergleich zu den Kontrolltieren (Sebki et al., 1999, Masciotra et al., 1999).

Verantwortliche molekularbiologische Mechanismen konnten erst ansatzweise aufgedeckt werden. Hinweise auf ursächliche Prozesse ergeben sich beispielsweise aus Analysen von transgenen Mäusen, bei denen ein unterschiedlicher Expressionsgrad von Endothelin-1 zu einer veränderten Herzgröße führte (Yang et al., 2004). Ebenfalls bei transgenen Mäusen wurde beobachtet, dass durch eine

erblich bedingte Überexpression von bestimmten Transkriptionsfaktoren das Herzgewicht übermäßig zunimmt (Xiang et al., 2006). Beim Menschen konnte bei Vorliegen eines Polymorphismus des Angiotensin-II-Typ-2-Rezeptor-Gens eine signifikante Zunahme von Herzwanddicke und linksventrikulärer Masse beobachtet werden (Schmieder et al., 2001). Weiterhin konnten beim Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Gen verschiedene Polymorphismen identifiziert werden, wodurch die Wirkung von Angiotensin-Rezeptorblockern entscheidend beeinflusst wird. Bei einer antihypertensiven Therapie verändert sich durch die verschiedenen Polymorphismen der Therapieerfolg in Bezug auf die Reduktion der linksventrikulären Masse (Kurland et al., 2002).

Durch die bisherigen Forschungsergebnisse kann die Variation des Herzgewichtes erklärt werden. Vieles deutet aber daraufhin, dass eine Reihe weiterer bisher nicht identifizierter erblicher Faktoren existieren müssen, die die Merkmalsausprägung beeinflussen.

Wie bereits in der vorliegenden Arbeit beschrieben, wird bei salzsensitiven Individuen durch die Höhe der Salzzufuhr nicht nur die Höhe des Blutdruckes beeinflusst, sondern auch die Ausprägung von Endorganschäden. Eine Herzhypertrophie manifestiert sich früher und schwerer unter Salzbelastung (Schmieder et al., 1988; Piccirillo et al., 1999; Perry et al., 2000). Die Menge des mit der Nahrung aufgenommenen Salzes beeinflusst die Masse des Herzens dabei direkt (Lindpaintner & Sen, 1985; Schmieder et al., 1988; Messerli et al., 1997).

Wie auch in den Untersuchungen der Parentaltiere gesehen, kommt es bei SHRSP-Ratten unter Salzbelastung zur Ausbildung von vergrößerten Herzen. Daneben war ein deutlicher Anstieg des Blutdruckes zu verzeichnen. Es ist dabei schwierig, zwischen direkten Auswirkungen von Salz auf das Wachstum des Herzens und Effekten von Salz auf den Blutdruck und damit nur sekundär auf eine Hypertrophie, zu differenzieren.

In den Gefäßen kommt es wie im Herzen zu druckbedingten Strukturveränderungen. Durch pathologisch erhöhten Blutdruck nehmen Dicke und Festigkeit der Gefäßwand übermäßig zu (Roman et al., 1992). Daneben konnte durch tierexperimentelle und klinische Studien gezeigt werden, dass analog zum feingeweblichen Umbau im Herzen bei Hypertrophie die vaskuläre Struktur nicht nur durch mechanische Stimuli im Sinne eines hohen intraluminalen Druckes modifiziert wird, sondern dass teilweise

die spezifischen Veränderungen des feingeweblichen Aufbaus der Gefäßwand, welche letztendlich zu einer verminderten Compliance der Gefäße führen, auf eine erhöhte Salzlast zurückgeführt werden können (Safar et al., 2000).

Unabhängig von den indirekten Effekten, die über eine salzbedingte Erhöhung des Blutdrucks vermittelt sind, konnten auch direkte Effekte von Salz auf die Gefäße nachgewiesen werden. So nehmen unter erhöhtem Salzgehalt in der Nahrung beispielsweise Häufigkeit und Ausmaß aortaler Intimaläsionen zu (Limas et al., 1980). Zusätzlich wurde bei transgenen salzsensitiven Mäusen mit übermäßig aktiviertem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beobachtet, dass es unter Salzbelastung vermehrt zu thorakalen und abdominellen Aortenaneurysmen kommt (Nishijo et al., 1998).

Trotz dieser Fortschritte gestaltet sich die Erforschung der Hypertrophie von Herz und Gefäßen durch das Zusammenspiel der Wirkungen von Blutdruck, Salz und weiteren, zum Teil noch unbekanntem Faktoren, schwierig. In Anbetracht dessen könnte die schwache Korrelation, die in der phänotypischen Untersuchung zwischen Blutdruck und den von uns untersuchten Strukturparametern sogar vorteilhaft sein. Effekte, die unabhängig oder zumindest nur gering abhängig von der Höhe des Blutdruckes zur Wirkung kommen, könnten so leichter in der im Anschluss durchgeführten Intervallkartierung erfasst werden.

4.4 Selektive Genotypisierung und Populationsgröße

Kopplungsanalysen und Intervallkartierungen konnten bereits in früheren Untersuchungen helfen, erbliche Ursachen von Krankheiten zu detektieren. Erfolgreich war diese Methode bei der Erforschung von Krankheiten, die mendelschen Vererbungsmustern folgen, beispielsweise bei der zystischen Fibrose, der Neurofibromatose oder bei Chorea Huntington (Kerem et al., 1989; Rommens et al., 1989; Wallace et al., 1991 ; Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Page et al., 2003). Aber auch bei der Aufklärung von genetischen Ursachen komplexer Erkrankungen, wie bei Morbus Crohn und der Psoriasis, war diese Methode von essentieller Bedeutung (Hugot et al., 1996; Veal et al., 2002).

Um erbliche Faktoren der kardialen und vaskulären Hypertrophie zu identifizieren, wurde auch eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Dazu wurden im analytischen Teil

dieser Arbeit zunächst die 46 Extremtiere genotypisiert, also die jeweils 23 Tiere mit den höchsten sowie niedrigsten Blutdruckwerten.

Die Größe der untersuchten Kohorte ist ein wichtiger Faktor für die Beurteilung der Signifikanz von LOD-Werten (Darvasi & Soller, 1992). Über die Auswahl einer geeigneten Populationsgröße existieren experimentell-statistische Studien, die als Grundlage für die Auswahl der Tierpopulationsgröße dieser Arbeit dienen (Lander & Botstein, 1989; Darvasi et al., 1993; Darvasi, 1997). Nach Soller *et al.* werden sehr große Populationen benötigt, um auch kleine QTL zu detektieren (1976). Andererseits bedingt eine hohe Anzahl von Tieren einen erheblichen Kosten- und Zeitaufwand. Einen Kompromiss stellt die in dieser Arbeit zunächst angewandte Methode des selektiven Genotypisierens dar, bei der zunächst nur die Tiere mit den Maximal- bzw. Minimalausprägungen eines relevanten Phänotyps untersucht werden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass durch dieses Vorgehen die benötigte Populationsgröße deutlich gesenkt werden kann (Lebowitz et al., 1978; Lander & Botstein, 1989; Ronin et al., 2003). Ein Nachteil dieser Methode kommt jedoch zum Tragen, wenn mehr als für einen Phänotyp eine Extremtiergruppe gebildet wird. Dann wird es meist doch nötig, die gesamte Population zu untersuchen. Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen kardiovaskuläre Erkrankungen im Rahmen salzsensitiver Hypertonie. Es erschien daher sinnvoll, nur den Blutdruck als Kriterium für die Auswahl von Extremtieren zur selektiven Genotypisierung zu wählen. Demnach konnte also die Populationsgröße zunächst gering gehalten werden, ohne einen Verlust statistischer Aussagekraft hinnehmen zu müssen.

Zusätzlich kann durch die im Vorfeld getroffene rationale Auswahl geeigneter, d.h. sich in den zu untersuchenden Phänotypen besonders kontrastierender Rattenstämme die benötigte Tieranzahl weiter gemindert werden. Dieses Verfahren ist durch ebenfalls durch experimentelle Untersuchungen bereits bestätigt worden (Lander & Botstein, 1989).

In der selektiven Genotypisierung wurde auf RNO1 ein signifikanter Bereich bei Marker *D1Rat34* für das relative Gesamt- bzw. Linksherzgewicht ermittelt. Die höchsten LOD-Werte konnten mit 5,01 ($p = 0,00005$) bzw. 4,52 ($p = 0,0002$) angegeben werden. Ein zweiter Gipfel für die relativen Herzgewichte zeigte bei *D1Rat287* eine wahrscheinliche Kopplung an.

Auch auf RNO3 und 7 fanden sich bei dieser Untersuchung für das absolute Herz- und Linksherzgewicht mehrere Regionen, die sich als relevant für einen Teil der

Variation dieser Phänotypen erweisen könnten. Die ermittelten LOD-Werte zeigten jedoch nur beim Linksherzgewicht mit 2,81 ($p = 0,003$) bei Marker *D7Rat138* eine wahrscheinliche Kopplung an. Auf RNO3 wurden zwar ebenfalls LOD-Werte von mehr als zwei für Gesamt- und Linksherzgewicht erreicht, jedoch wurden auf diesem Chromosom keine Werte oberhalb der von uns verwendeten Signifikanzkriterien gemessen.

Die oben genannten Ergebnisse der selektiven Genotypisierung wurden aufgrund der kleinen Kohorte nur als vorläufig und bedingt gültig betrachtet. Sie sollten vor allem als Orientierung für eine zweite, mit vergrößerter Tieranzahl durchgeführte Genomuntersuchung dienen.

4.5 Diskussion der Signifikanzkriterien

Prinzipiell wird in einer Kopplungsanalyse untersucht, ob eine gemeinsame Vererbung von Marker und dem Allel, welches den untersuchten Phänotypen beeinflusst, vorliegt. Der LOD-Wert ist der Quotient aus der Wahrscheinlichkeit einer gemeinsamen Vererbung von Marker und Allel und der Wahrscheinlichkeit keiner gemeinsamen Vererbung, also der Nullhypothese. Dieser Quotient ergibt nach Logarithmierung den *logarithm of the odds*- (LOD-)Wert. Für die Beurteilung der Signifikanz der aus Intervallkartierungen erhaltenen Daten bzw. LOD-Werte sind festgelegte Kriterien nötig. Nur dadurch kann statistische Aussagekraft und Vergleichbarkeit erhalten werden. Ist die Signifikanzschwelle zu niedrig gewählt, ergeben sich viele falsch positive Befunde. Auf der anderen Seite würden jedoch bei zu hoch gewählten Schwellenwerten genetische Loci der Identifizierung entgehen.

1989 wurde von Lander und Botstein als Kriterium der Signifikanz ein LOD-Wert von mindestens 3,0 vorausgesetzt. Weiterführende Untersuchungen ergaben jedoch, dass selbst bei LOD-Werten von 3,6 noch mit etwa 5% falsch positiven Ergebnissen gerechnet werden musste (Lander & Kruglyak, 1995). Dies führte zu einer Revision des zunächst angenommen Grenzwertes. Die im Jahr 1995 neuen postulierten Werte von Lander und Kruglyak unterteilten für F₂-Populationen dabei in wahrscheinliche Kopplung ab einem LOD-Wert von 2,8 und in signifikante Kopplung ab einem Wert von 4,3. Der p-Wert für signifikante Kopplung wurde mit 0,000052 angegeben. Es ist davon auszugehen, dass bei einer durchgeführten Intervallkartierung ein LOD-Wert von 2,8 nur einmal durch Zufall auftritt, während statistisch gesehen eine angezeigte

signifikante Kopplung nur 0,05-mal in einer Genomuntersuchung durch Zufall bedingt ist (Lander & Kruglyak, 1995).

Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Signifikanzkriterien nicht nur Zuspruch finden. Witte *et al.* bemängeln, dass solche willkürlich festgelegten Schwellenwerte in der Realität nicht existieren und durch diese nur scheinbar Objektivität gewonnen werde. Durch die Verwendung solcher Grenzwerte könnten tatsächlich existierende Loci schon dann übersehen werden, sobald die LOD-Werte nur knapp unterhalb der gewählten Signifikanzschwelle liegen. Es sei daher sinnvoller, die p-Werte sämtlicher Markerpositionen zu ermitteln und diese dann direkt miteinander zu vergleichen und zu interpretieren (Witte *et al.*, 1996).

Chromosomale Regionen, die in einer kompletten Genomuntersuchung als signifikant mit einem p-Wert von 0,05 angezeigt werden, treten statistisch gesehen etwa zwanzig Mal auch durch Zufall bedingt auf (Lander & Kruglyak, 1995). Daher zeigt erst ein p-Wert von 0,0016 zuverlässiger eine wahrscheinliche Kopplung an. Für signifikante Kopplung muss der p-Wert jedoch unter 0,000052 liegen (Lander & Kruglyak, 1995).

4.6 Hochsignifikante QTL für die Herzgewichte

Die zweite Untersuchung wurde mit der gesamten F2-Population (n=232) durchgeführt. Um dem Kritikpunkt von Witte zu begegnen und keine relevanten chromosomalen Abschnitte zu übersehen, wurden auch Regionen, die in der selektiven Genomuntersuchung geringfügig unterhalb der Signifikanzschwelle liegende LOD-Werte aufwiesen, miteinbezogen und zusätzlich sämtliche p-Werte ermittelt und verglichen. Die Genomuntersuchung wurde daher für RNO1, RNO3 und RNO7 wiederholt. Auf den anderen Chromosomen bot sich kein Anhalt für QTL, die die relevanten Phänotypen beeinflussen.

Bei der Auswertung der aus dieser Untersuchung gewonnenen Daten ergaben sich auf Grund der vergrößerten Kohorte erwartungsgemäß Veränderungen der LOD-Werte gegenüber den zuvor in der Extremtiergruppe erhobenen Daten.

Bei den Phänotypen Herz- und Linksherzgewicht konnten die in der Extremtiergruppe wahrscheinlich signifikanten LOD-Werte auf RNO7 nicht bestätigt werden. Ebenso nahmen die LOD-Werte auf dem vormals bedeutsamen Abschnitt auf RNO3 ab. Es offenbarte sich jedoch ein wahrscheinlich signifikanter Abschnitt für die absoluten Herzgewichte bei Marker *D3Rat57*, welcher im Randbereich von RNO3 liegt.

Bemerkenswert ist, dass bei *D1Rat34* der vormals signifikante Abschnitt für die relativen Herzgewichte in der erneuten Untersuchung nur noch wahrscheinlich signifikant ist. Dafür ergab sich für diese Parameter etwa 30 cM davon entfernt bei *D1Rat287* ein zuvor nicht entdeckter hochsignifikanter Bereich. Hier ist das Ergebnis der Genomuntersuchung der F₂-Population ein QTL für das relative Herzgewicht mit einem maximalen LOD-Wert von 10,51 ($p = 1,3 \cdot 10^{-10}$). Dort befindet sich mit 8,38 auch der höchste LOD-Wert für das relative Linksherzgewicht ($p = 1,7 \cdot 10^{-8}$). Diese QTL erklären ungefähr 25 bzw. 19% der Gesamtvarianz der Herzhypertrophieausprägung unter Bluthochdruck.

4.7 Einfluss des Markerabstandes auf die Genauigkeit der Lokalisation der QTL-Position

Die Lokalisierung und Identifizierung eines Gens, welches sich hinter einem QTL verbirgt, wird entscheidend durch den Abstand der verwendeten Marker beeinflusst. Um zunächst ein QTL zu identifizieren, müssen die Marker gleichmäßig und in einem nicht zu großen Abstand voneinander entfernt liegen. Ist dies nicht der Fall, können entweder QTL der Identifizierung entgehen oder aber nicht existierende Signifikanzen vorgetäuscht werden. Zusätzlich ist die genaue Lokalisierung des mit dem QTL assoziierten Gens bei zu weit auseinander liegenden Markerabständen äußerst aufwendig. Durch eine höhere Markerdichte kann die Bildauflösung bei einer Kartierung des Erbgutes verbessert werden. So ist es von Vorteil, Marker vorzugsweise in einem Abstand von etwa 10 cM anzuordnen. Eine weitere Verdichtung ist nur bedingt von Nutzen. Überraschenderweise nimmt nämlich ab diesem Markerabstand bei weiter zunehmender Markerdichte der Gewinn nur unterproportional zu. Die Auflösung einer QTL-Karte ist also nur bis zu einem bestimmten Grad zu verbessern, selbst bei maximierter Markeranzahl (Darvasi, 1997; Darvasi & Soller, 1997).

In der vorliegenden Studie wurde dies berücksichtigt und ein durchschnittlicher Markerabstand von möglichst 10 cM gewahrt. Die gefundenen QTL geben also eine gute Vorstellung über die tatsächliche Position der durch den QTL angezeigten Gene. Dennoch gestaltet es sich wegen der Größe der in dieser Studie gefundenen QTL für die relativen Herzgewichte dennoch schwierig, das angezeigte Gen genau zu lokalisieren.

Der Bereich der signifikanten Kopplung für das relative Herzgewicht umfasst mit etwa 60 cM etwas mehr als ein Drittel der Gesamtlänge von RNO1. Diese Region beinhaltet etwa 1400 Gene der 3250 vermuteten Gene auf jenem Chromosom. Inklusiv des wahrscheinlich signifikanten Abschnittes handelt es sich sogar um einen Bereich der fast halb so groß ist wie das gesamte Chromosom.

Aufgrund der beschriebenen Größe ist es möglich, dass sich hinter diesem QTL mehrere Gene verbergen, die zusammen Einfluss auf den Phänotypen *Herzgewicht* nehmen. Es ist nicht unbedingt anhand des Aussehens des LOD-Wert-Graphen erkennbar, wie viele Gene sich hinter einem einzelnen QTL verstecken. Erst bei weit auseinander liegenden Genen, beispielsweise bei mehr als 80 cM Abstand, ist davon auszugehen, dass mehrere Gipfel bei der graphischen Darstellung der LOD-Werte sichtbar werden (Lander & Botstein, 1989). Liegen die Gene dichter beieinander kann nur ein einzelner Gipfel oder ein breites Plateau abbildet werden. Durch gegenläufig agierende Wirkung zweier Gene kann deren Wirkung gänzlich gegeneinander aufgehoben werden und ein QTL komplett unerkannt bleiben (Rapp, 2000). Bei einem QTL mit einem Einfluss von 5 oder 10% auf den Phänotypen lässt sich die chromosomale Region auf 40 bzw. 20 cM genau bestimmen. Bei ausgeprägterem Effekt lässt sich dieser Bereich weiter eingrenzen (Van Ooijen, 1992), dennoch handelt es sich dabei weiterhin um recht große chromosomale Regionen. Genauer ist das 1-LOD-Intervall, welches mit einer Sicherheit von etwa 95% das durch den QTL angezeigte Gen anzeigt. Bei geringen Effekten eines QTL wird durch das 2-LOD-Intervall eine höhere Sicherheit geboten (Rapp, 2000).

Eine präzise Voraussage über die Genanzahl oder über die genaue Lokalisation innerhalb des 1-LOD- oder 2-LOD-Intervalls lässt sich anhand des LOD-Wert-Graphen jedoch nicht treffen. Mittels der 1-LOD- und 2-LOD-Intervalle kann aber die Anzahl der Kandidatengene erheblich reduziert werden. Innerhalb des 1-LOD-Intervalls des QTL für das Herzgewicht befinden sich ungefähr 160 Gene, im 2-LOD-Intervall etwa 250 Gene.

4.8 Einfluss von Blutdruck und Körpergewicht auf die identifizierten QTL

Bemerkenswerterweise ist an der Stelle, an der die maximalen LOD-Werte für die relativen Herzgewichte ermittelt wurden, kein signifikanter oder wahrscheinlich signifikanter Bereich für den Blutdruck gefunden worden. Der höchste LOD-Wert für den Blutdruck in dem Bereich um *D1Rat287* auf RNO1 beträgt nur 1,48 und ist damit

nicht signifikant. Der Effekt dieses QTL auf das Herzgewicht wird hiernach zu urteilen nicht über den Blutdruck vermittelt, sondern kommt unabhängig davon zum Tragen. Ebenfalls unauffällig sind die LOD-Werte für die aortale Hypertrophie, die in diesem Bereich nicht über 1,76 liegen. Auch die p-Werte an diesen Markerpositionen sind nicht signifikant.

Dieser Befund geht einher mit dem Ergebnis der durchgeführten Regressionsanalyse. Auch dort konnte nur eine sehr schwache Korrelation zwischen Blutdruck und Herzhypertrophie entdeckt werden. Diese Untersuchung offenbart also ein QTL, welches vornehmlich auf die Masse des Herzens Einfluss nimmt, ohne zugleich den Blutdruck in nachweisbarer Form zu beeinflussen. Auswirkungen, die durch den Blutdruck bedingt sind und damit nur sekundär auf das Herzgewicht wirken, sind bei diesem QTL also eher unwahrscheinlich.

Für das Körpergewicht wurde an dieser Position ein LOD-Wert von 2,66 gefunden und darüber hinaus in etwa 20 cM Entfernung mit einem LOD-Wert von 3,01 ein wahrscheinlich signifikanter Bereich.

Bereits durch die Korrelationsanalysen wurde ein Zusammenhang zwischen Körper- und Herzgewicht aufgezeigt. Es ist möglich, dass einerseits ein paralleler Effekt durch einen einzelnen Locus verursacht wird und dieser die beiden Phänotypen beeinflusst oder andererseits sich in diesem Bereich zwei Loci befinden, die diese Phänotypen unabhängig voneinander beeinflussen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine Differenzierung jedoch nicht möglich.

4.9 QTL für aortale Hypertrophie auf RNO3

Für die Aortenhypertrophie konnte ein zuvor nicht entdeckter Locus auf RNO3 gefunden werden. Für diesen konnte jedoch nur wahrscheinliche Signifikanz behauptet werden, da der maximale LOD-Wert mit 4,19 unter der Signifikanzschwelle von 4,3 lag. Der Marker *D3Rat47* kam dem maximalen LOD-Wert am nächsten. Auch der p-Wert von 0,0005 lag unterhalb der Signifikanzgrenze, die bei 0,000052 festgelegt worden war. Benachbart zu jenem Locus mit einem Abstand von etwa 10 cM konnte ein Blutdruck QTL mit einem maximalen LOD-Wert von 3,2 gefunden werden, bei welchem ebenfalls wahrscheinliche Signifikanz vorlag. Eine sichere Aussage über die mögliche Assoziation zwischen den beiden Phänotypen ist jedoch nicht zu treffen, weiterführende Untersuchungen sind nötig, um die Signifikanz zu bestätigen oder zu negieren.

4.10 Vererbungsmuster der identifizierten QTL

Der Vergleich der Genotypen an den betreffenden Markerpositionen mit den Phänotypen in einer Ein-Weg-Varianzanalyse ergab, dass Tiere, die homozygot für F344 waren, niedrigere absolute Herzgewichte aufwiesen als Tiere die homozygote SHRSP-Allele besaßen. Bei heterozygoten Tieren konnte kein signifikanter Unterschied gegenüber an dieser Markerposition homozygoten SHRSP-Tieren festgestellt werden.

Wurden die Herzgewichte in Bezug zum Körpergewicht gesetzt, so fanden sich die niedrigsten relativen Herzgewichte erwartungsgemäß bei den Tieren, die an dieser Stelle homozygot für F344 waren. Relatives Gesamtherzgewicht sowie relatives Linksherzgewicht nahmen bei Vorliegen eines SHRSP-Allels um etwa 6,5 % zu. Bei Vorhandensein von zwei SHRSP-Allelen lagen die Werte der relativen Herzgewichte im Durchschnitt ca. 13 % über denen homozygoter F344-Tiere. Dies scheint daraufhin zu deuten, dass ein schädigendes SHRSP-Allel auf rezessivem Wege vererbt wird. Andererseits wäre auch möglich, dass ein ebenfalls rezessives Allel des F344-Stammes eine protektive Wirkung ausübt und mit Verlust desselben die Hypertrophie zunimmt. Weiterhin wären auch additive kodominante Effekte denkbar. Dies würde bedeuten, dass über unterschiedliche Mechanismen wirkende protektive und schädigende Gene zur vollen Merkmalsausprägung kommen, die entgegengerichteten Effekte sich aber in ihrer Wirkung abschwächen.

Der Aortenhypertrophie-Locus wird in vergleichbarer Weise vererbt. Auch hier stieg mit zunehmender SHRSP-Allelzahl das relative Aortengewicht. Es nahm bei Vorliegen von einem SHRSP-Allel um 5% von 8,51 auf 8,96 mg/cm und bei Vorliegen von zwei Allelen um weitere 4% auf 9,30 mg/cm zu. Hier lässt sich bezüglich der Dominanz-Rezessiv-Frage genauso wie bei den Herzgewichten keine klare Aussage treffen, da auch hier jeweils eine rezessive oder dominante Vererbung eines Genes des jeweils anderen Stammes angenommen werden kann. Welcher Mechanismus letztendlich zum Tragen kommt, lässt sich in beiden Fällen erst mit der endgültigen Identifizierung des Genproduktes sicher behaupten.

In früheren Untersuchungen wurden bereits bei Ratten mehrere Loci identifiziert, die das Herzgewicht beeinflussen. Teilweise wird durch diese Loci auch die Blutdruckhöhe mitbestimmt. So wurden QTL auf RNO1 (Gu et al., 1996 ; Innes et al., 1998 ; Sivo et al., 2002), RNO8 (Kren et al., 1997) und RNO10 (Kato et al., 1999)

gefunden, die kardiale Masse und Blutdruck beeinflussen. Aber auch QTL, die nur auf das Herzgewicht wirken, wurden beschrieben. Diese lagen einerseits ebenfalls auf RNO1 (Garret et al., 2003, Siegel et al., 2003), RNO8 (Kren et al., 1997) und RNO10 (Hamet et al., 1996), aber darüber hinaus auch auf RNO2 (Innes et al., 1998), RNO3 (Sebkhi et al., 1999), RNO5 (Deschepper et al., 2002), RNO9 (Garret et al., 2003), RNO12 (Harris et al., 1995 ; Zhang et al., 1996), RNO17 (Pravenec et al., 1995) und RNO19 (Siegel et al., 2003). Außerdem konnten Wirkungen auf das Herzgewicht durch Loci, die sich auf den Geschlechtschromosomen befanden, beobachtet werden (Harris et al., 1995; Pravenec et al., 1995; Vincent et al., 1996; Zhang et al., 1996).

Auch für die Aortenhypertrophie und die vaskuläre Hypertrophie im Allgemeinen konnten mehrere QTL bei Kopplungsanalysen identifiziert werden. Bei einer Kreuzung von salzsensitiven Dahl-Ratten mit Lewis-Ratten wurden zwei QTL, die mit dem Blutdruck assoziiert sind, auf RNO10 gefunden, ein weiteres QTL befindet sich auf RNO16 (Moujahidine et al., 2002). In einer anderen Studie, ebenfalls mit Dahl-Ratten, wurden mehrere Loci auf RNO1, RNO3 und RNO9 entdeckt, die die aortale Hypertrophie - vermutlich nicht unabhängig vom Blutdruck - beeinflussen (Siegel et al., 2003). Loci, die einen Effekt unabhängig vom Blutdruck auf die vaskuläre Hypertrophie ausüben, konnten, wie auch durch die vorliegende Arbeit, bisher nicht identifiziert werden.

4.11 Kandidatengene

Cardiotrophin-1 (CT-1) und Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3 (p44)

Aufgrund ihrer biologischen Funktion sind auf RNO1 vor allem zwei Gene von Relevanz, welche sich im 1-LOD-Intervall in unmittelbarer Nähe zu *D1Rat287* befinden (Abb. 23). Es handelt sich um die kodierenden Informationen für die Proteine Cardiotrophin 1 sowie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3 (p44).

Cardiotrophin-1 (CT-1) ist ein Zytokin der Interleukin-6-Familie, welches von Pennica *et al.* 1995 in Herzmuskelzellen von neonatalen Mäusen identifiziert worden ist. Im sich entwickelnden Herzen ist es essentiell für die Ausbildung einer normalen Herzgewebestruktur. Bei Knock-out-Mäusen, denen der funktionierende CT-1-Rezeptor fehlte, bildeten sich hypoplastische Herzen aus, wodurch es zum Tod *in utero* kam (Yoshida et al., 1996).

Während der Entwicklung des Herzens befindet sich die Expression von CT-1 auf hohem Niveau, aber auch nach der Geburt kann eine ständige basale Expression dieses Faktors nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass CT-1 auch im adulten Organismus eine physiologische Funktion besitzt. Tatsächlich kam es bei Mäusen, bei denen nach der Geburt der CT-1-Rezeptor inaktiviert wurde und bei denen durch Abbinden der Aorta eine Druckbelastung des Herzens induziert wurde, zu vermehrtem kardialen Zelluntergang. Die Folge war eine Herzinsuffizienz, die letztlich zum Tode führte. Kontrolltiere zeigten im Gegensatz dazu eine kompensatorische Herzhypertrophie und überlebten (Hirota et al., 1999).

Eine heraufregulierte Expression konnte bei bestimmten pathologischen Prozessen nachgewiesen werden. Zwölf Wochen alte SHRSP-Ratten mit manifester Hypertonie weisen im Ventrikel einen erhöhten CT-1 mRNA-Gehalt auf (Ishikawa et al., 1996). Weiterhin kommt es zu einer vermehrten Expression nach myokardialer Infarzierung. Auch beim Übergang von einer linksventrikulären Hypertrophie zu einer Herzinsuffizienz wurde eine erhöhte CT-1-Expression gemessen (Aoyama et al., 2000; Takimoto et al., 2002).

Kürzlich konnte bei SHR-Ratten mit manifester Hypertonie zum ersten Mal CT-1 auch im Plasma nachgewiesen werden (Pemberton et al., 2005). Außerdem kommt es bei intraperitonealer Injektion von CT-1 bei Mäusen zur isolierten Zunahme des Herzgewichtes ohne dabei zusätzlich das Körpergewicht zu beeinflussen (Jin et al., 1996).

Dabei ähneln die feingeweblichen Veränderungen, die der Stimulation durch CT-1 folgen mehr den Veränderungen, welche unter Volumen-induzierter Hypertrophie auftreten als denen, die durch erhöhte Druckbelastung entstehen (Wollert et al., 1996). Dies könnte auf den Zusammenhang zwischen Salzzufuhr, Veränderungen des Plasmavolumens und Hypertrophie des Herzens hinweisen.

Die durch CT-1 ausgelöste Signalkaskade, vor allem die der protektiven Wirkung, wird über eine p44-Mitogen-aktivierte Proteinkinase vermittelt. Bemerkenswert ist, dass sich das kodierende Gen dieser Proteinkinase ebenfalls in unmittelbarer Nähe zu dem Marker *D1Rat287* befindet. Es ist denkbar, dass CT-1 und p44 für den QTL auf RNO1 gemeinsam verantwortlich sind. Darüber hinaus sei erwähnt, dass auch p44 als Mediator für andere Hormone mit hypertrophen Eigenschaften agieren könnte. So konnte in Zellkulturen beobachtet werden, dass Myozyten von Ratten,

die durch Angiotensin-II stimuliert wurden, eine gesteigerte Expression von p44 aufwiesen (Zhang et al., 2004).

Durch *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* (FISH) konnte beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 eine syntäne Region identifiziert werden, die sowohl CT-1 als auch p44 beherbergt (Charest et al., 1993; Pennica et al., 1996).

Beim Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Linksherzgewicht und dem CT-1-Spiegels beobachtet werden (Lopez et al., 2005). Darüber hinaus sinkt der CT-1-Spiegel bei behandelten Hypertonie-Patienten bei einer therapiebedingten Regression des Herzgewichtes (Gonzalez et al., 2005). Die Zusammenhänge zwischen CT-1, p44 und Herzhypertrophie beim Menschen sind jedoch noch nicht abschließend erforscht.

Vorstufe von Angiopoetin-like 2 (Angptl2)

Ein aussichtsreiches Kandidatengen auf RNO3 für die aortale Hypertrophie ist das Gen, welches die Vorstufe von Angiopoetin-like 2, Angptl2, kodiert. Dieses Gen, welches sich zwischen den Markern *D3Rat53* und *D3Rat47* befindet, ist ein Mitglied der vaskulären Endothel-Wachstums-Faktoren-Familie (Abb. 26). Angptl2 bindet an Endothelzellen und induziert eine Proliferation von Endothelzellen. Weiterhin hemmt es die Apoptose. Inwiefern ein Zusammenhang besteht mit salzsensitiver Hypertonie bleibt abzuwarten. Angptl2 konnte zwar beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 9 lokalisiert werden, die Funktion dieses Proteins ist jedoch erst unzureichend geklärt (Kim et al., 1999 ; Oike et al., 2004 ; Kubota et al., 2005).

4.12 Stand des Forschungsprojektes und Zukunftsperspektive

Genmutationen können zu Veränderungen des Expressionsgrades derselben Gene oder des Aktivitätsgrades und Funktionalität der resultierenden Produkte führen. Sie können auch indirekt die Transkription anderer Gene beeinflussen.

Durch den Kontext der genannten Genprodukte wäre es durchaus denkbar, dass auf Grund von Mutationen der zu Grunde liegenden Gene das Gewicht des Herzens beeinflusst wird, wie es in der vorliegenden Studie beobachtet wurde. Zum gegenwärtigen Stand dieses Forschungsprojektes ist es jedoch nicht möglich mit Bestimmtheit zu sagen, ob die vermuteten Gene wirklich ursächlich für die angezeigten QTL sind.

Die Abstände zwischen den Mikrosatellitenmarker sind für eine verlässliche Aussage über die Position eines genetischen Locus zu groß. Eine weitere Verringerung der Markerabstände würde aber wie beschrieben keinen weiteren Aufschluss über die Position eines oder mehrerer Kandidatengene geben, die Methode gelangt hier an ihre Grenzen. Für die Lokalisation der Gene muss daher eine weiterführende Methode eingesetzt werden.

Eine Möglichkeit besteht in der Züchtung von so genannten konsomen oder kongenen Stämmen, durch die die Position eines Gens auf etwa 0,5 cM genau bestimmt werden kann (Rapp, 2000). Dabei wird ein bestimmtes Chromosom (konsom) oder chromosomaler Abschnitt (kongen) eines gesunden Referenzstammes in einen kranken Stamm übertragen und der phänotypische Effekt auf diesen überprüft. Es ist auch möglich den chromosomalen Abschnitt von dem kranken Stamm in den gesunden Stamm einzubringen. Um mit der Feinkartierung der durch die QTL angezeigten Region zu beginnen und damit die chromosomale Kartierung und funktionelle Analyse zu ermöglichen, ist eine kongene Züchtung über mehrere Generationen erforderlich, in der sicher gestellt wird, dass nur die relevante Region übertragen wird.

Aufgrund der hohen Signifikanz des QTL für die Herzgewichte ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass sich an der angezeigten Position ein Gen oder mehrere Gene befinden, welche entscheidend für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie sind. Eine Aussage, welche Gene hier ursächlich sind, ist erst nach der Feinkartierung des Abschnittes möglich. Die dafür notwendige Züchtung ist bereits begonnen worden, abschließende Ergebnisse liegen jedoch noch nicht vor. Erst im Anschluss daran lassen sich vergleichende Untersuchungen mit dem Ziel durchführen, homologe Gene und Genprodukte beim Menschen zu identifizieren.

Diese Untersuchung sollte dazu beitragen das Verständnis der komplexen Zusammenhänge der kardialen Hypertrophie bei salzsensitiver Hypertonie zu erweitern und die angenommene Vererbbarkeit dieses Merkmals bestätigen. Durch den Fund eines hochsignifikanten Locus auf RNO1, welcher für die kardiale Hypertrophie bei der Ratte verantwortlich ist, konnte dies erreicht und zudem Hinweise auf die zu Grunde liegenden Ursachen gewonnen werden. Bei diesem QTL scheinen hämodynamische Parameter von untergeordneter Bedeutung für die Ausprägung der Hypertrophie zu sein.

Darüber hinaus konnte ein weiterer QTL auf RNO3 identifiziert werden, der die Gefäßhypertrophie, vermutlich blutdruckabhängig, moduliert. Durch diese Ergebnisse besteht die Hoffnung, in Zukunft Diagnostik und Therapie von Herz- und Gefäßhypertrophie beim Menschen zu verbessern, gefährdete Individuen zu identifizieren und eventuell sogar die Manifestation dieser Erkrankungen zu verhindern. Die Ergebnisse der erwähnten Untersuchungen von Kurland *et al.* am Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-Gen unterstreichen die Bedeutung der Pharmakogenetik für eine zukünftige sinnvolle und effektive Therapie polygenetisch beeinflusster Erkrankungen (2002).

Die gesundheitspolitische und ökonomische Relevanz dieses Projektes wird gerade vor dem Hintergrund der nicht nur in Deutschland stattfindenden demographischen Entwicklung deutlich. Durch den zunehmenden Altersdurchschnitt wird es in den kommenden Jahrzehnten zu einer Zunahme der untersuchten Erkrankungen kommen mit noch nicht abschätzbaren Folgen für die Lebensqualität der betroffenen Patienten und das Gesundheitssystem.