

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation des *Cac8I*-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus in Exon 3 des Ratten-Kallistatin-Gens durch vergleichendes Sequenzieren in verschiedenen Rattenstämmen

Mit Hilfe von unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellter genomischer Sequenzinformation für das Exon 3 des Ratten-Kallistatin-Gens (Chai et al. 1991) und einiger inkompletter umgebender intronischer Sequenz synthetisierten wir intronische Primer zur Generierung eines PCR-Produktes von Exon 3 des Kallistatin-Gens und umgebender intronischer Sequenz als Ausgangsprodukt für das vergleichende Sequenzieren in verschiedenen Rattenstämmen. Nach Agarose-Gel-Separation dieses PCR-Produktes erhielten wir ein um etwa 100 Basenpaare längeres PCR-Produkt aus genomischer DNA von WKY₀-, SHRSP- und Sprague-Dawley-Ratten, als im Vergleich mit der bereitgestellten Ausgangssequenzinformation zu erwarten war.

Die vollständige Sequenzierung des Produkts in allen drei Rattenstämmen führte zur Entdeckung eines in der ursprünglich Sequenzinformation fehlenden, 82 Basenpaare langen DNA-Segments, das entscheidend für die Identifizierung und Generierung des RFLP durch die Basenmutation war. Die vergleichende Sequenzierung des PCR-Produktes in verschiedenen Rattenstämmen bestätigte außerdem die 912G→A, (R300H)-Mutation in den Sprague-Dawley Tieren, wie bereits zuvor gezeigt (Chai et al. 1997), und dokumentierte diese Mutation zusätzlich auch in den Tieren des SHRSP-Stammes. Der WKY-Stamm zeigte die Wildtypsequenz.

Im Vergleich der Restriktionsenzymchnittstellen der DNA-Sequenz des SHRSP-Stammes mit WKY- und Sprague-Dawley-Ratten zeigte sich bei SHRSP-Tieren wie bei den Sprague-Dawley-Ratten der Verlust einer *Cac8I*-Restriktionsstelle am A-Allel der Mutation 912G→A, wodurch ein 83 Basenpaare langes SHRSP-Allel gegenüber einem 61 Basenpaare langen WKY-Allel entsteht (Abb. 4).



Abbildung 4: Restriktionskarte der Sequenz des Exons 3 des Ratten-Kallistatin-Gens. Die Karte zeigt einen Ausschnitt von WKY-Ratten. In den WKY-Tieren schneidet die Restriktionsendonuklease den DNA-Doppelstrang an drei verschiedenen Stellen. Dadurch entstehen zwei Fragmente: von Schnittstelle 1 zu 2 ein 22 bp großes und von Schnittstelle 2 zu 3 ein 61 bp großes Stück. In den SHRSP-Tieren entfällt durch die Mutation die Schnittstelle 2, so dass ein einziges Fragment von 83 bp Länge resultiert.

Diese unterschiedliche Restriktionsfragmentlänge nach Verdau des PCR-Produkts mit *Cac8I* wurde dann mit Hilfe der Separation auf Agarose-Gelen sichtbar gemacht und zur Genotypisierung der F₂-Ratten verwandt (Abbildung 5).

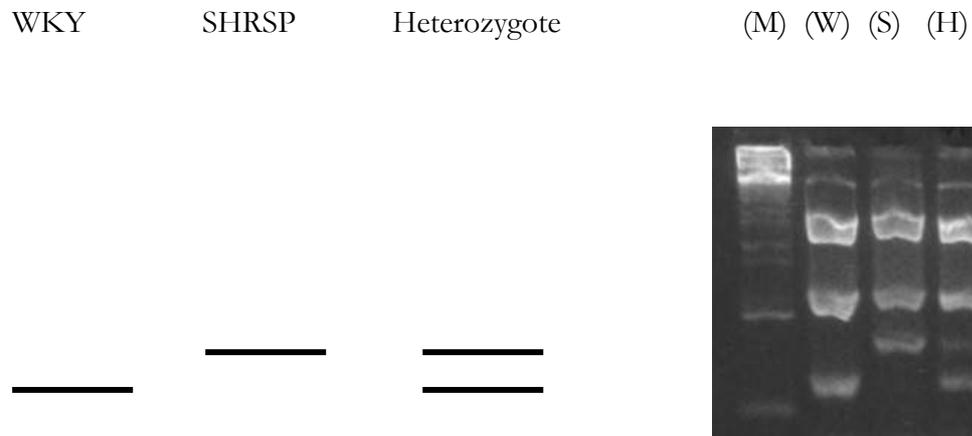


Abbildung 5: RFLP für das Exon 3 des Ratten-Kallistatin-Gens. Das Foto neben dem Schema der erwarteten Banden zeigt den Assay des Kallistatin-Gen-RFLP auf einem 2 %-Agarose-Gel nach 90 Minuten Elektrophorese. Neben dem Basenpaaren-Marker (M) erkennt man die 61 bp-Bande des homozygoten WKY-Allels (W) – die 22 bp-Bande ist unten im Bild aus dem Gel herausgelaufen – sowie die 83bp-Bande des homozygoten SHRSP-Allels (S) und das heterozygote Allel (H) mit beiden Banden.

3.2. QTL-Kartierung auf Chromosom 6 in Kohorte A

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden genotypisierten wir zunächst alle Tiere der Kohorte A (n=112) mit insgesamt elf als polymorph identifizierten Markern für das Rattenchromosom 6, die zu Beginn der Untersuchung in den öffentlichen Datenbanken zur Verfügung standen (Abbildung 6).

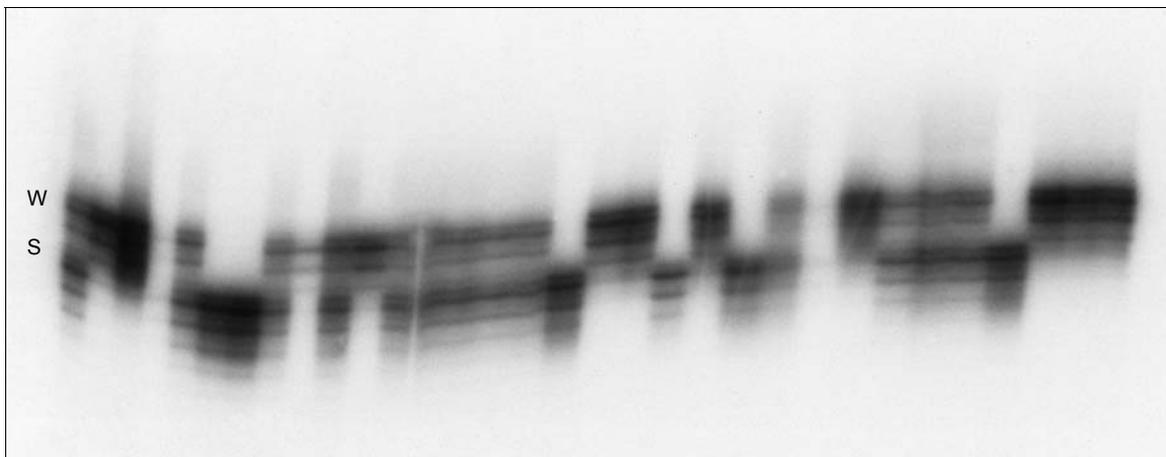


Abbildung 6: Genotypisierung der Marker auf einem 6 %-Polyacrylamid-Gel. Homozygote Tiere weisen die mit W und S bezeichnete WKY- oder SHRSP-Bande auf, heterozygote Tiere beide Banden. Weitere, schwächere Banden entstehen durch das Verrücken der DNA-Polymerase entlang der DNA-Matrize während der PCR.

Anschließend wurden die verwendeten Marker durch das Softwareprogramm MapmakerEXP kartiert und unter Verwendung der uns zur Verfügung stehenden phänotypischen Daten mit Hilfe von MapmakerQTL einer Kopplungsanalyse unterzogen. Die Abbildung 8 zeigt die genetische Karte der Kohorte A (n=112). Dargestellt sind Marker, deren Anordnung sich mit einem LOD-Wert von über 3 festlegen ließ.

Die QTL-Kopplungsanalyse in dieser Kohorte in Abbildung 9 zeigt, dass der systolische Blutdruck mit einem LOD-Wert von 2,4 an den Marker *D6MGH10* gekoppelt war. Der basale, salzunabhängige Pulsdruck war mit einem grenzwertigen LOD-Wert von 2,9 an *D6MGH10* gekoppelt. Dieser Phänotyp zeigt außerdem Kopplung mit einem LOD-Wert von 1,4 an den 44,2 Centimorgan entfernt kartierten Kalistatin-Gen-RFLP und mit einem LOD-Wert von 1,5 an

den weitere 3,3 Centimorgan entfernten Marker des Bradykininrezeptors B2. Nochmals 3,3 Centimorgan entfernt, am Marker *D6Rat79*, der mit 50,6 cM Distanz von *D6MGH10* kartiert wurde, erreichte die Kopplung des Pulsdrucks einen LOD-Wert von 2,2 und somit eine zweite Spitze.

Ferner zeigte sich in dieser Kohorte eine Kopplung der Herzfrequenz bei erneuter Messung nach zwölf tägiger Salzbelastung mit einem LOD-Wert von 2,5 an den Marker *D6MGH10*. Einen kosegregationsbedingten, allelespezifischen signifikanten Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdrucks oder der Herzfrequenz bei erneuter Messung nach zwölf tägiger Salzbelastung konnten wir nicht zeigen.

Der Kallistatin-Gen-RFLP (Abbildung 7) und der Marker *D6MGH10* wurden in dieser Kohorte mit einer relativen Distanz von circa 44 cM zueinander kartiert. Die zwischen diesen beiden Markern kartierten Marker *D6MGH3*, *D6Rat9* und *D6Wox5* zeigen keine signifikante Kopplung an einen der untersuchten Phänotypen. Das gleiche gilt für *D6MIT2*, der 35,6 cM telomerisch von *D6MGH10* kartiert wurde und für *D6Rat90*, der 56,1 cM centromerisch von Kallistatin kartiert wurde.

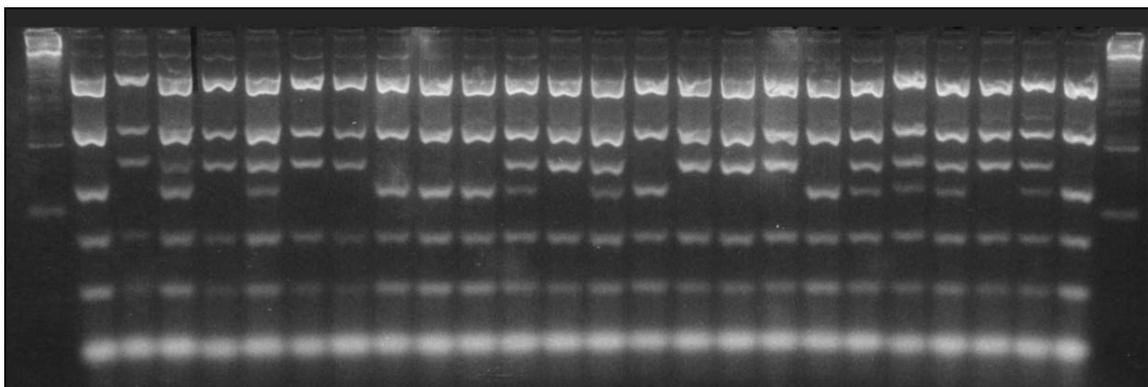


Abbildung 7: Genotypisierung des Kallistatin-RFLPs auf einem Agarose-Gel. Die Elektrophorese lief nach den gleichen Bedingungen wie die in Abbildung 5 gezeigte. Unten im Bild sind weitere kleine, unspezifische Verdauungsprodukte zu erkennen.

Chromosom 6: Genetische Kopplungskartierung Kohorte A (112 Tiere)

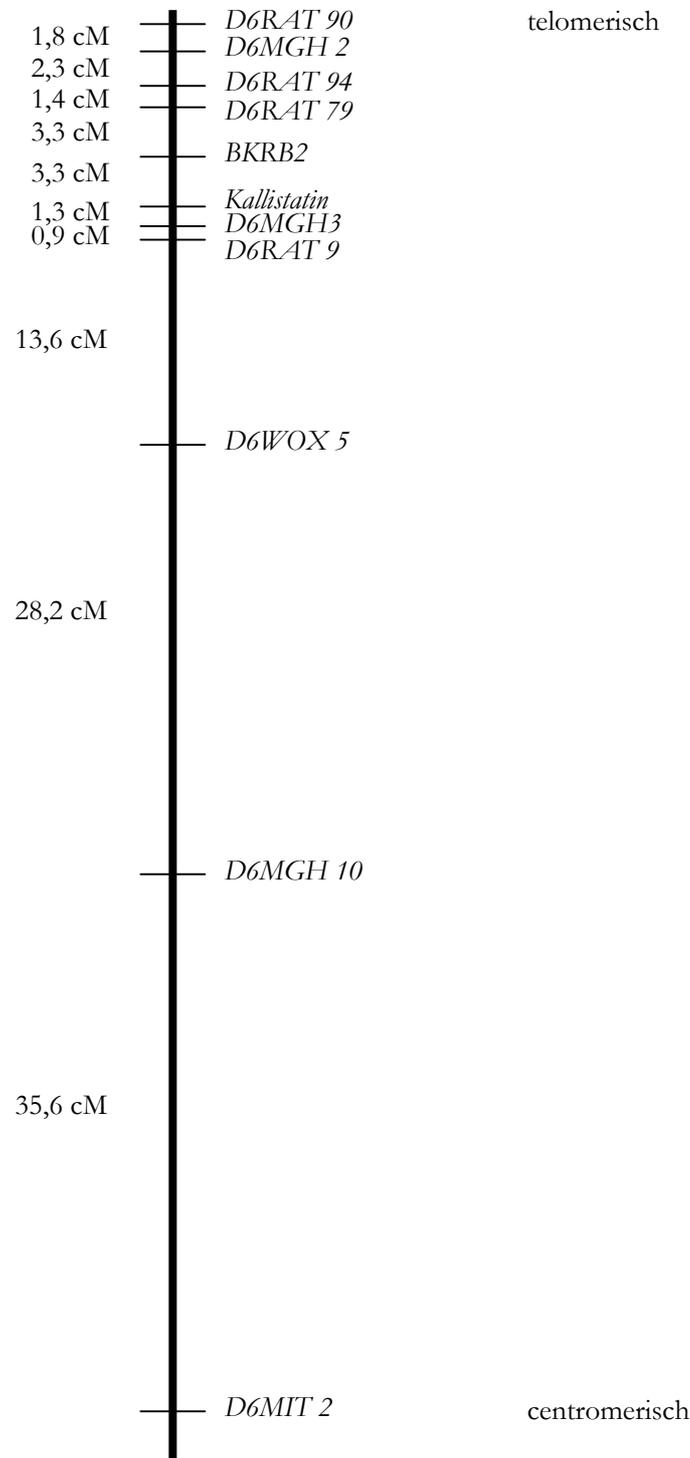


Abbildung 8: Die genetische Kartierung der QTL-Region auf Rattenchromosom 6 für Kohorte A. Dargestellt sind elf Marker (Markername auf der rechten Seite) und ihre Rekombinationsdistanzen (Einheit: cM [centimorgan]), basierend auf den Genotypisierungsdaten der ursprünglichen Kohorte (112 Tiere) und den Berechnungen in MapmakerEXP.

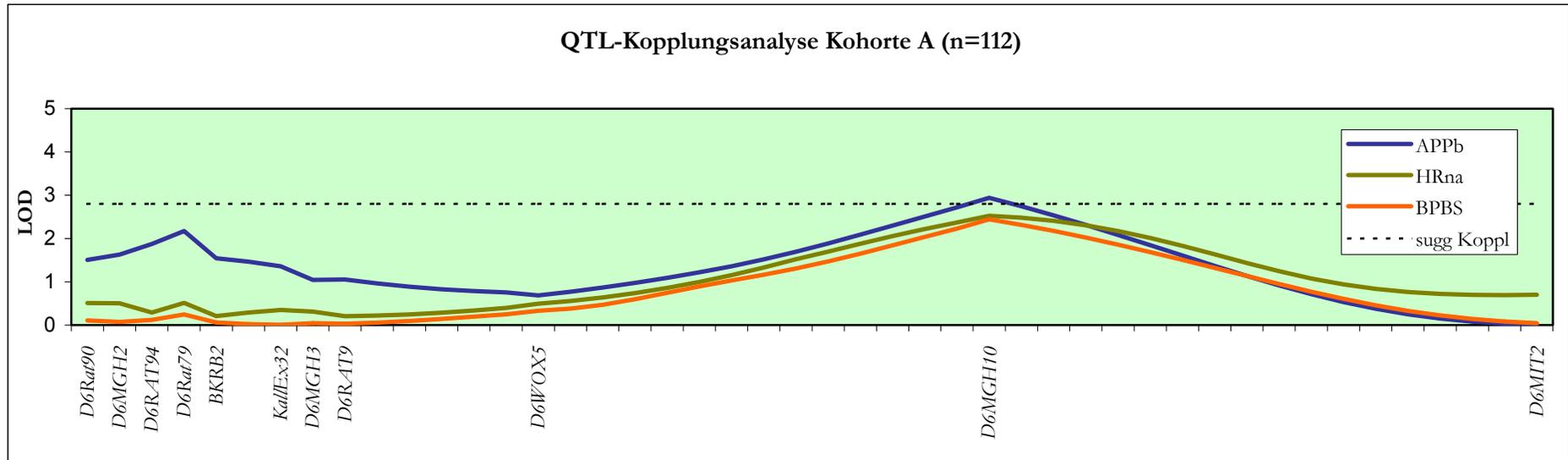


Abbildung 9: Kopplungsanalyse der Phänotypen für die zuvor kartierten Marker. Mit Hilfe des Programms MapmakerQTL errechneten wir die Kopplung der einzelnen Phänotypen mit den untersuchten genetischen Markern in der Kohorte A (n=112 Tiere). Die Abbildung zeigt die Phänotypen mit den höchsten erzielten LOD-Werten (BPBS= basaler systolischer Blutdruck, APPb= basaler arterieller Pulsdruck; HRna= Herzfrequenz nach Salzbelastung). Wiedergegeben ist die Verteilung der LOD-Werte auf die einzelnen Marker. Die Gerade markiert den LOD-Schwellenwert von 2,8 für suggestive Kopplung.

3.3. Phänotypenanalyse in Kohorte A

Zur Analyse der Phänotypen in Kohorte A wurden die genotypisierten Tiere nach Allelstatus in Gruppen aufgeteilt und die Mittelwerte dieser Gruppen mit ihren Standardabweichungen errechnet (Tabelle C).

Phänotyp	<i>D6MGH10</i>		
	Allel 1 (n=16 Tiere)	Allel 2 (n=54 Tiere)	Allel 3 (n=42 Tiere)
BPBS in mmHg	143,8 ± 10,3	156,6 ± 14	151,5 ± 14,4
APPb in mmHg	45,3 ± 7,7	51,3 ± 5,9	48 ± 5,9
HRna in bpm	365,9 ± 37,3	385,7 ± 44,5	357,3 ± 36,1
	<i>D6Rat79</i>		
Phänotyp	Allel 1 (n=25 Tiere)	Allel 2 (n=32 Tiere)	Allel 3 (n=55 Tiere)
APPb in mmHg	45,9 ± 7,1	51,2 ± 5,1	49,6 ± 6,6
	<i>BKRB2</i>		
Phänotyp	Allel 1 (n=28 Tiere)	Allel 2 (n=32 Tiere)	Allel 3 (n=52 Tiere)
APPb in mmHg	47 ± 7,6	51,5 ± 5,2	49 ± 6,3
	Kallistatin-RFLP		
Phänotyp	Allel 1 (n=27 Tiere)	Allel 2 (n=29 Tiere)	Allel 3 (n=55 Tiere)
APPb in mmHg	47,1 ± 7,6	51,4 ± 5,4	49,1 ± 6,2

Tabelle C: Phänotypenanalyse in der Kohorte A. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen der gemessenen Phänotypen in der Kohorte A, aufgeteilt nach Genotypen (1 = homozygot WKY, 2 = homozygot SHRSP, 3 = heterozygot WKY/SHRSP), für die beiden Marker mit signifikanten LOD-Werten der Kohorte A.

BPBS: basaler systolischer Blutdruck; APPb: basaler Pulsdruck; HRna: Herzfrequenz nach Salzbelastung; bpm: Schläge pro Minute

Mit Hilfe der Varianzanalyse der Phänotypen mit suggestiven LOD-Werten untersuchten wir, inwieweit Phänotypunterschiede zwischen den nach Allelen aufgeteilten Gruppen signifikant durch den Allelstatus beeinflusst wurden. Beim paarweisen Gruppenvergleich wurde zur Angleichung des α -Levels die Bonferroni-Adjustierung angewandt (Tabelle D).

Die ANOVA der Phänotypen der Kohorte A zeigte für den anonymen Marker *D6MGH10* signifikant unterschiedliche Mittelwerte des Pulsdrucks der nach Genotypen aufgeteilten Gruppen

(Tabelle D). Die Mittelwerte der homozygoten WKY (Allel 1) unterschieden sich signifikant von denen der homozygoten SHRSP (Allel 2). Die homozygote SHRSP-Gruppe (Allel 2) ihrerseits unterschied sich signifikant von der heterozygoten Gruppe (Allel 3).

Der systolische Blutdruck unterschied sich beim *D6MGH10* nur in den Mittelwerten der homozygoten WKY (Allel 1) und der homozygoten SHRSP (Allel 2); die homozygote SHRSP-Gruppe (Allel 2) unterschied sich nicht signifikant von der heterozygoten Gruppe (Allel 3). Die Herzfrequenz nach Salzbelastung unterschied sich beim *D6MGH10* nicht in den Mittelwerten der homozygoten WKY (Allel 1) und der homozygoten SHRSP (Allel 2); wohl unterschied sich aber die homozygote SHRSP-Gruppe (Allel 2) von der heterozygoten Gruppe (Allel 3).

Marker	Abhängige Variable	LOD-Wert	P-Wert	F-Wert	Paarweiser Gruppen-Vergleich (Bonferroni-adjustiert)	
<i>D6MGH10</i>	BPBS	2,4	0,0378	3,4	1<2 p=0,0002	2>3 p>0,05
	APPb	2,9	0,0105	4,8	1<2 p=0,0006	2>3 p=0,0132
	HRna	2,5	0,0064	5,3	1<2 p>0,05	2>3 p=0,0019
<i>D6Rat79</i>	APPb	2,2	0,0012	7,2	1<2 p=0,0015	2>3 p>0,05
<i>BKRB2</i>	APPb	1,5	0,0078	5,1	1<2 p=0,0099	2>3 p>0,05
<i>Kallistatin</i>	APPb	1,4	0,0072	5,2	1<2 p=0,0152	2>3 p>0,05

Tabelle D: ANOVA der Kohorte A. Die Tabelle gibt einen Überblick über signifikante Ergebnisse (p-Werte) der Varianzanalyse für die nach Genotypen (1 = homozygot WKY, 2 = homozygot SHRSP, 3 = heterozygot WKY/SHRSP) geordneten Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Phänotypen in der Kohorte A. BPBS: basaler systolischer Blutdruck; APPb: basaler Pulsdruck; HRna: Herzfrequenz nach Salzbelastung

Für die weiteren Marker (*D6Rat79*, *BKRB2*, Kallistatin-RFLP) unterschieden sich die Mittelwerte des Pulsdrucks nur in der Gruppe der homozygoten WKY (Allel 1) und der homozygoten SHRSP (Allel 2); die homozygote SHRSP-Gruppe (Allel 2) unterschied sich nicht signifikant von der heterozygoten Gruppe (Allel 3).

Die homozygote WKY-Gruppe (Allel 1) unterschied sich bei keinem der untersuchten Phänotypen signifikant von der heterozygoten Gruppe (Allel 3).

3.4. Erweiterung der Kohorte um 102 Tiere und Verwendung weiterer Marker

In einer *In-Silico*-Suche nach weiteren informativen Markern in öffentlich zugänglichen Datenbanken zeigte sich, dass mittlerweile eine Reihe weiterer Marker in der relevanten Region auf Chromosom 6 um den Marker *D6MGH10* verfügbar geworden waren. Bereits anhand der veröffentlichten Informationen konnten wir zahlreiche neuentwickelte Marker als nicht polymorph zwischen den WKY- und SHRSP-Stämmen für unsere weitere Verwendung ausschließen.

Mit Hilfe der Daten der Ratten-Genom-Datenbanken (NIH, RGD) ordneten wir die für unsere Genotypisierung der erweiterten Rattenkohorte in Frage kommenden genetischen Marker zunächst auf einer physischen Karte an. Dazu nutzten wir die Funktion „*Align two sequences*“ des Programmes „BLAST“ (NIH). So verglichen wir die Sequenzen der Marker mit den durch die Sequenzierung des Rattengenoms gewonnenen Sequenzen der *contiguous regions (contigs)*, die zusammengesetzt das Rattenchromosom 6 repräsentieren. Eine Übersicht über die physikalische Anordnung der Marker ist in Abbildung 11 gezeigt.

Chromosom 6: Physikalische Kartierung

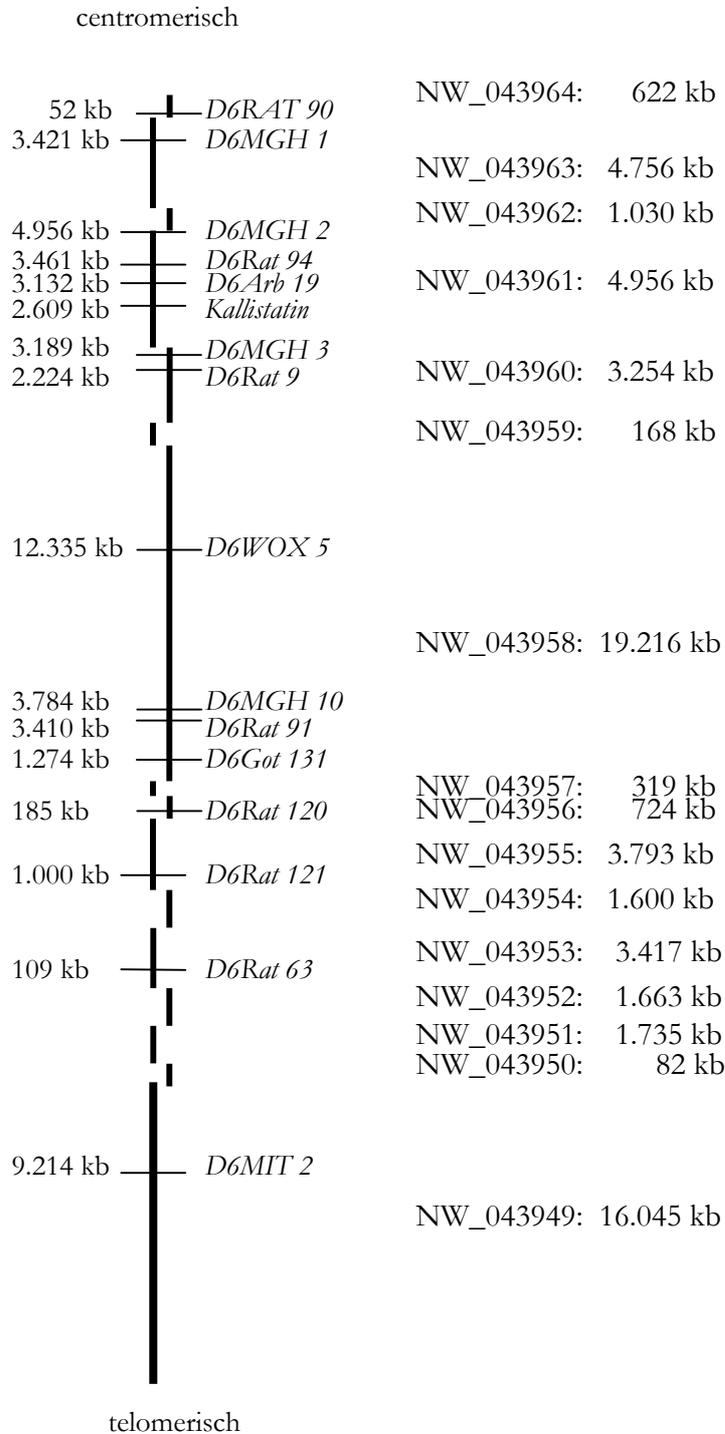


Abbildung 11: Die physikalische Karte der QTL-Region auf Rattenchromosom 6. Sie zeigt die Anordnung der genetischen Marker, wie sie öffentlichen Datenbanken (NIH) entnommen wurden. Die einzelnen *contigs* werden durch die vertikalen Balken repräsentiert, deren Bezeichnung und Größe sich ganz rechts in der Darstellung finden. Die Markernamen finden sich direkt rechts von ihrer durch kleine horizontale Striche markierten Position, die Position der Marker innerhalb des jeweiligen *contigs* links davon.

3.5. Testung der in Datenbanken neu gefundenen SSLP-Marker auf Polymorphismen zwischen WKY und SHRSP

Entsprechend der in Kapitel 2 „Material und Methoden“ dargestellten Vorgehensweise testeten wir die in Tabelle E genannten 18 weiteren SSLPs auf Polymorphismus zwischen WKY und SHRSP. Diese Marker waren in den öffentlich zugänglichen Datenbanken in die unmittelbare Nähe des Markers *D6MGH10* kartiert worden. Wir fanden insgesamt fünf neue Marker, die jetzt in der Gesamtkohorte von 214 Tieren genotypisiert wurden.

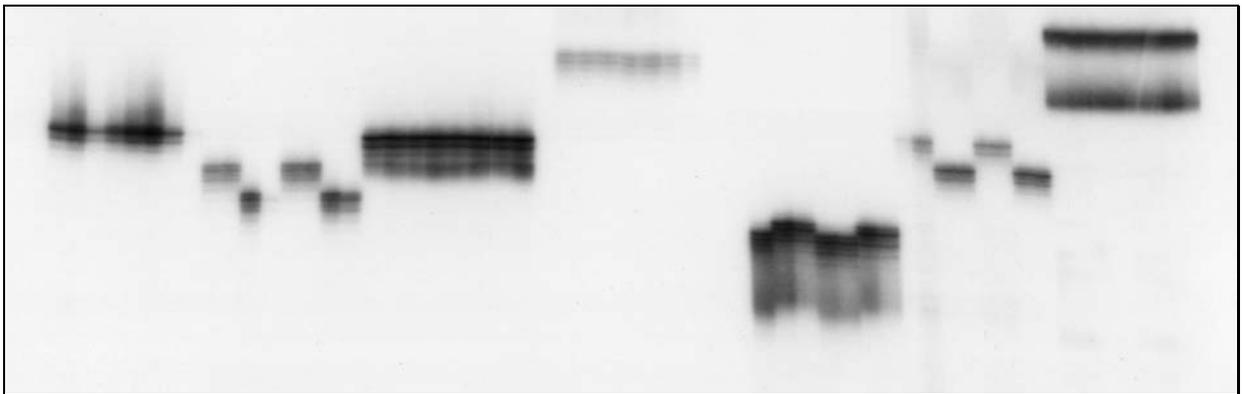


Abbildung 10: Testung der Marker auf Polymorphismus zwischen SHRSP und WKY. Die Abbildung zeigt ein 6 %-Polyacrylamid-Gel verschiedener Marker mit jeweils 2 WKY und 2 SHRSP sowie jeweils weiteren 2 WKY und 2 SHRSP pro Marker.

Abgesehen von diesen neuen Markern wurden sämtliche in Kohorte A bereits genotypisierten Marker in den zusätzlichen 102 Tieren genotypisiert, so dass zur Neuberechnung der Markerkartierung für eine mögliche QTL-Region auf Chromosom 6 für insgesamt 17 als polymorph identifizierte Marker jeweils 214 Genotypen vorlagen.

Rattenmarker	Polymorphismus WKY/SHRSP
<i>D6GOT159-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Got138-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Got140-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Rat118-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Rat187-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Got142-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Got146-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Got143-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Rat66-2</i>	nicht polymorph
<i>D6MGH10</i>	bereits genotypisiert
<i>D6Rat91-2</i>	polymorph
<i>D6Got131</i>	polymorph
<i>D6Rat120</i>	polymorph
<i>D6Rat121</i>	polymorph
<i>D6Rat63</i>	polymorph
<i>D6Got136-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Got133-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Got132-2</i>	nicht polymorph
<i>D6Got131-2</i>	nicht polymorph

Tabelle E: Testung auf Polymorphismen. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse für 18 weitere von uns in Bezug auf Polymorphismen zwischen den Stämmen WKY und SHRSP getestete Marker. Sie beginnt mit dem physikalisch am weitesten telomerisch kartierten und endet mit dem am weitesten centromerisch gelegenen Marker.

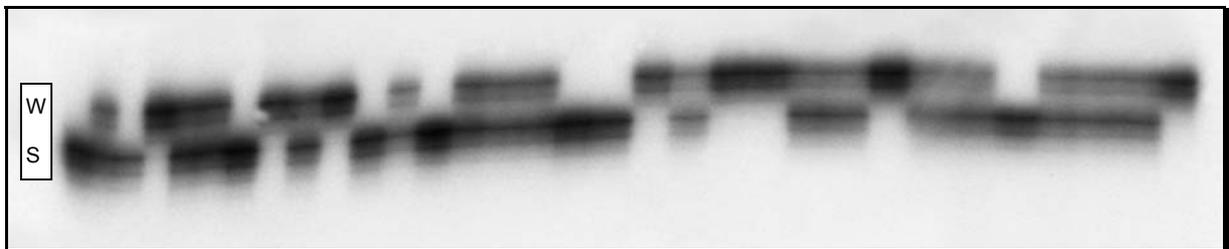


Abbildung 12: Autoradiographie der Genotypisierung eines Markers auf einem 6 %-Polyacrylamid-Gel. Homozygote Tiere weisen die mit W und S bezeichnete WKY- oder SHRSP-Bande auf, heterozygote Tiere beide Banden.

3.6. QTL-Kartierung der Kohorte B

Analog der Kohorte A wurden die Marker für die um zusätzliche Tiere erweiterte Kohorte B (n=214) durch das Softwareprogramm MapmakerEXP kartiert und unter Verwendung der uns zur Verfügung stehenden phänotypischen Daten mit Hilfe von MapmakerQTL einer Kopplungsanalyse unterzogen. Die Abbildung 13 zeigt die genetische Karte für die Region auf Rattenchromosom 6 mit den Daten der Kohorte B für die polymorphen Marker.

Die QTL-Kopplungsanalyse, dargestellt in Abbildung 14, ergab in der nun auf 214 F₂-Tiere erweiterten Kohorte B eine signifikante Kopplung sowohl des basalen systolischen Blutdrucks mit einem Anstieg des LOD-Wertes von 2,4 auf 4,8 als auch des basalen Pulsdrucks mit einem LOD-Wert-Anstieg von 2,9 auf 4,4 an den Marker *D6MGH10*.

Grenzwertig signifikant an den Marker *D6MGH10* gekoppelt waren außerdem die absolute Herzfrequenz nach Salzaufnahme mit einem LOD-Wert von 3,8 (vorher LOD-Wert von 2,5 in Kohorte A) gekoppelt. Ferner waren der Herzfrequenzanstieg nach Salzaufnahme mit einem LOD-Wert von 2,6 (vorher LOD-Wert von 1,0 in Kohorte A), der systolische Blutdruck nach Salzaufnahme mit einem LOD-Wert von 2,7 (vorher LOD-Wert von 0,2 in Kohorte A) sowie der basale diastolische Blutdruck mit einem LOD-Wert von 2,2 (vorher LOD-Wert von 1,0 in Kohorte A) an diesen Marker gekoppelt.

Chromosom 6: Genetische Kopplungskartierung Kohorte B (214 Tiere)

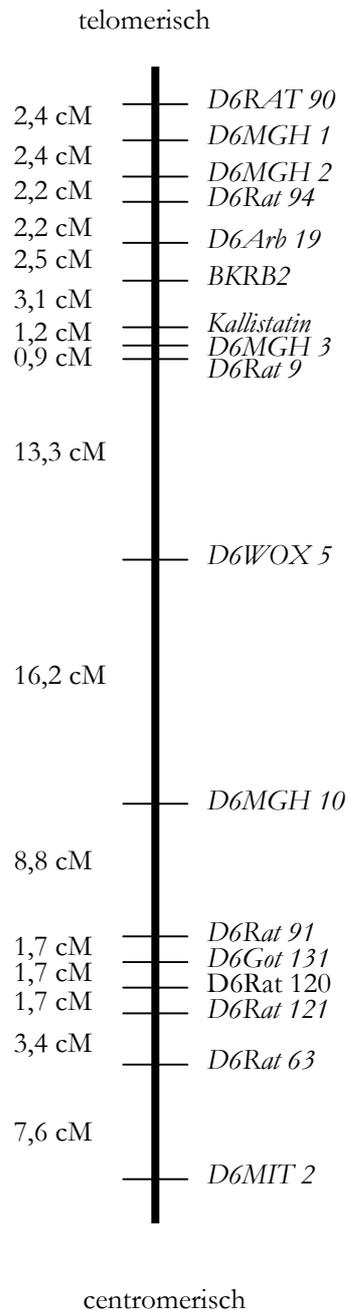


Abbildung 13: Genetische Kartierung der QTL-Region auf Rattenschromosom 6 für Kohorte B. Dargestellt sind 17 Marker (Markername auf der rechten Seite) und ihre Rekombinationsdistanzen (Einheit: cM [centimorgan]), basierend auf den Genotypisierungsdaten der Gesamtkohorte B (n=214 Tiere) und den Berechnungen in Mapmaker EXP.

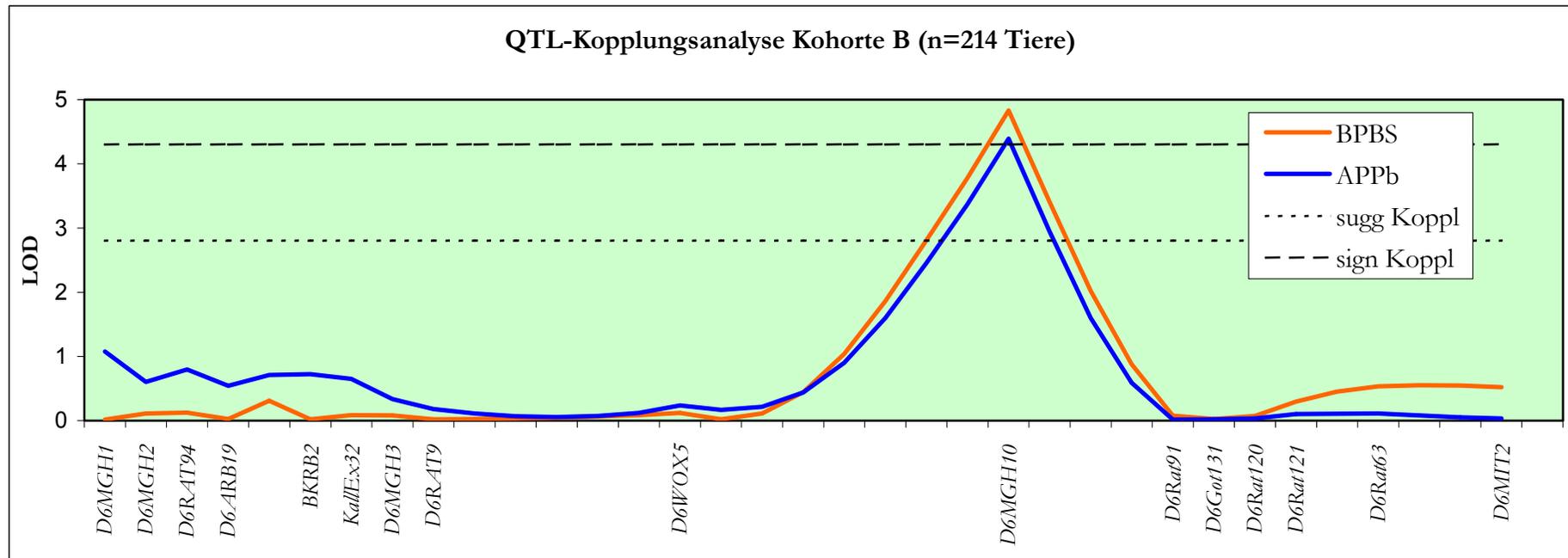


Abbildung 14: Kopplungsanalyse der Phänotypen für die zuvor kartierten Marker in Kohorte B. Die Abbildung zeigt die mit Hilfe des Programms MapmakerQTL errechnete Kopplung verschiedener Phänotypen mit den untersuchten genetischen Markern mit signifikanten LOD-Werten in der Kohorte B. Dargestellt ist die Verteilung der LOD-Werte für basalen systolischen Blutdruck (BPBS) und den basalen Pulsdruck (APPb) auf die genetischen Marker. Die Schwellenwerte für suggestive und signifikante Kopplungen sind als Geraden eingetragen.

Stellt man die Veränderungen der LOD-Werte des Markers *D6MGH10* in Kohorte A und Kohorte B gegenüber (Tabelle F), zeigt sich für alle Parameter eine Steigerung.

Abhängige Variable	LOD-Wert in Kohorte A	LOD-Wert in Kohorte B
BPBS	2,4	4,8
APPb	2,9	4,4
HRna	2,5	3,8
BPBD	1	3
BPSna	0,2	2,7
Hrna(a)	1	2,6
BPDna	0,4	2,2

Tabelle F: Vergleich LOD-Werte des Markers *D6MGH10* für die Kohorten A und B: Gegenübergestellt sind die mit MapmakerQTL errechneten LOD-Werte des Markers *D6MGH10* für die ursprüngliche Kohorte A und die erweiterte Kohorte B.

BPBS: basaler systolischer Blutdruck; APPb: basaler Pulsdruck; HRna: Herzfrequenz nach Salzbelastung; BPBD: basaler diastolische Blutdruck; BPDna: diastolischer Blutdruck nach Salzbelastung; BPSna: systolischer Blutdruck nach Salzbelastung; HRna(a): Anstieg der Herzfrequenz nach Salzbelastung

Die Phänotypen, die in der Kohorte A an den Kallistatin-Gen-RFLP und den Marker *BKRB2* gekoppelt waren, zeigten in der Gesamtkohorte von 214 Tieren einen Verlust der Kopplung. Für beide Marker lag der LOD-Wert für Kopplung mit dem basalen arteriellen Pulsdruck bei nur noch 0,7. Auch für den systolischen Blutdruck ließ sich für beide Marker keine Kopplung nachweisen.

3.7. Poweranalyse der Kohorte B

Um das Ausmass der Effekte abzuschätzen, den die erweiterte Kohorte zu erfassen vermochte, führten wir eine Poweranalyse durch. Unser Experiment in den 214 F_2 -Tieren der Kohorte B vermochte, bei dem gegebenen $\alpha = 0.05$, mit einer statistischen Power von 80% einen Unterschied im basalen systolischen Blutdruck von 6.63 mmHg oder höher und im Pulsdruck von 2.06

mmHg oder höher zwischen den Genotypgruppen in Bezug auf den Allelstatus am Marker BKRB2 zu detektieren. In Bezug auf den Allelstatus am Kallistatinmarker konnte mit einer Power von 80% ein Unterschied im basalen systolischen Blutdruck von 6.64 mmHg oder höher und im Pulsdruck von 2.10 mmHg oder höher detektiert werden.

3.8. Phänotypenanalyse der Kohorte B

Wie zuvor für die Kohorte A wurden die genotypisierten Tiere nach Allelstatus in Gruppen aufgeteilt und die Mittelwerte dieser Gruppen mit ihren Standardabweichungen errechnet (Tabelle G). Um einen rezessiven Vererbungsmodus zu prüfen, fassten wir zusätzlich die Tiere mit homozygotem WKY-Allel und heterozygotem WKY/SHRSP-Allel in einer Gruppe zusammen, um sie mit den Mittelwerten der Tiere mit dem hypertensiven homozygoten SHRSP-Allel vergleichen zu können.

Phänotyp	Allel 1 (n=42)	Allel 2 (n=77)	Allel 3 (n=95)	Allel 1+3 (n=137)
BPBS in mmHg	140,3 (\pm 10)	151,1 (\pm 15,2)	142,5 (\pm 14,2)	141,8 (\pm 13)
APPb in mmHg	44,3 (\pm 5,8)	48,5 (\pm 7)	44,6 (\pm 5,8)	44,4 (\pm 5,7)
HRna in BPM	352 (\pm 33,7)	370,4 (\pm 45,5)	347 (\pm 29,3)	348,5 (\pm 30,7)
BPBD in mmHg	96 (\pm 7)	102,6 (\pm 11,4)	98 (\pm 10,6)	97,4 (\pm 9,6)
BPDna in mmHg	105 (\pm 11)	112,1 (\pm 13,9)	106,3 (\pm 14,3)	105,9 (\pm 13,3)
BPSna in mmHg	156,3 (\pm 17)	166,6 (\pm 17,9)	157,5 (\pm 19,8)	157,1 (\pm 18,9)
HRna(a) in bpm	6 (\pm 43)	28,1 (\pm 48,3)	6,6 (\pm 37,3)	6,4 (\pm 39)

Tabelle G: Phänotypenanalyse in der Kohorte B für den Marker *D6MGH10*. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen der gemessenen Phänotypen in der Kohorte B, aufgeteilt nach Genotypen (1 = homozygot WKY, 2 = homozygot SHRSP, 3 = heterozygot WKY/SHRSP), für den Marker *D6MGH10* mit signifikanten p-Werten der Kohorte B. Die Mittelwerte der homozygoten WKY-Allele und die heterozygoten WKY/SHRSP-Allele wurden in einer Gruppe zusammengefasst, um sie mit den Mittelwerten der hypertensiven homozygoten SHRSP-Allele vergleichen zu können.

BPBS: basaler systolischer Blutdruck; APPb: basaler arterieller Pulsdruck; HRna: Herzfrequenz nach Salzbelastung; BPBD: basaler diastolischer Blutdruck; BPDna: diastolischer Blutdruck nach Salzbelastung; BPSna: systolischer Blutdruck nach Salzbelastung; HRna(a): Anstieg der Herzfrequenz nach Salzbelastung; bpm: Schläge pro Minute

Analog zur Kohorte A rechneten wir die Varianzanalyse (ANOVA) in der erweiterten Kohorte B (Tabelle H). Beim paarweisen Gruppenvergleich wurde zur Angleichung des α -Levels die Bonferroni-Adjustierung angewandt.

Die ANOVA der Phänotypen der erweiterten Kohorte B zeigte ausschließlich für den anonymen Marker *D6MGH10* signifikant unterschiedliche Mittelwerte der nach Genotypen aufgeteilten Gruppen. Für alle Phänotypen mit suggestiven oder signifikanten LOD-Werten unterschieden sich die Mittelwerte der homozygoten WKY (Allel 1) und homozygoten SHRSP (Allel 2) voneinander. Die homozygote WKY-Gruppe (Allel 1) unterschied sich nicht signifikant von der heterozygoten Gruppe (Allel 3). Die homozygote SHRSP-Gruppe (Allel 2) unterschied sich jedoch signifikant von der heterozygoten Gruppe (Allel 3).

Um einen rezessiven Vererbungsmodus zu prüfen, fassten wir zusätzlich die Mittelwerte der Tiere mit homozygotem WKY-Allel und heterozygotem WKY/SHRSP-Allel in einer Gruppe zusammen, um sie mit den Mittelwerten der Tiere mit dem hypertensiven homozygoten SHRSP-Allel vergleichen zu können. Dabei unterschieden sich bei den nach Zygotität getrennten Gruppen für die einzelnen Phänotypen sowohl die Gruppe der Tiere mit homozygotem WKY-Allel von denen mit homozygotem SHRSP-Allel voneinander. Desweiteren unterschied sich die Gruppe der Tiere mit homozygotem SHRSP-Allel signifikant von der Gruppe der Tiere mit heterozygotem WKY/SHRSP-Allel.

Abhängige Variable	LOD-Wert	P-Wert	F-Wert	Paarweiser Gruppenvergleich		
				p-Wert für den Unterschied 1<2	p-Wert für den Unterschied 2>3	p-Wert für den Unterschied (1+3)<2
BPBS	4,8	0,0004	8,1	1<2 p=0.0000	2>3 p=0.0000	(1+3)<2 p=0.0002
APPb	4,4	0,0012	6,9	1<2 p=0.0006	2>3 p=0.0000	(1+3)<2 p=0.0004
Hrna	3,8	0,0000	10,9	1<2 p=0.0177	2>3 p=0.0000	(1+3)<2 p=0.0001
BPBD	3	0,0119	4,5	1<2 p=0.0005	2>3 p=0.0032	(1+3)<2 p=0.0071
BPDna	2,8	0,01	4,7	1<2 p=0.0161	2>3 p=0.0131	(1+3)<2 p=0.0028
BPSna	2,7	0,0043	5,6	1<2 p=0.0098	2>3 p=0.0037	(1+3)<2 p=0.0011
HRna(a)	2,6	0,0076	5	1<2 p=0.0242	2>3 p=0.0043	(1+3)<2 p=0.0018

Tabelle H: ANOVA der erweiterten Kohorte B für den Marker *D6MGH10*. Die Tabelle gibt einen Überblick über signifikante Ergebnisse (p-Werte) der Varianzanalyse für die nach Genotypen (1 = homozygot WKY, 2 = homozygot SHRSP, 3 = heterozygot WKY/SHRSP) geordneten Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Phänotypen der Kohorte B.

BPBS: basaler systolischer Blutdruck; APPb: basaler arterieller Pulsdruck; HRna: Herzfrequenz nach Salzbelastung; BPBD: basaler diastolischer Blutdruck; BPDna: diastolischer Blutdruck nach Salzbelastung; BPSna: systolischer Blutdruck nach Salzbelastung; HRna(a): Anstieg der Herzfrequenz nach Salzbelastung

3.9. Identifizierung möglicher Kandidatengene in der Region um *D6MGH10*

Wir nutzten öffentliche Datenbanken (ensembl), um bereits bekannte Gene im Intervall um *D6MGH10* zu identifizieren. Gene im fraglichen Intervall kommen als putative Kandidatengene in Betracht. Für die gezeigten Kopplungen des anonymen Markers *D6MGH10* an kardiovaskuläre Phänotypen fallen die LOD-Werte in den flankierenden Regionen von ungefähr 4 cM wieder unter die Signifikanzschwelle ab. Aufgrund der geringen Markerdichte um *D6MGH10* sind diese Schwellenwerte allerdings durch eine Gerade interpoliert. Daher bezogen wir alle im Intervall bis zu den flankierenden Markern *D6Wox5* (telomerisch) bzw. *D6Rat91* (centromerisch) enthaltenen Gene mit ein. Die Tabelle I gibt einen Überblick über diese bereits beschriebenen Gene.

Name des Gens	Position in MB	Genprodukt	Funktion
centromerisch			
<i>SFR5_Rat</i>	104.7	Splicing factor	Progression des Zellwachstums von G1 in S-Phase
<i>NTCP_Rat</i>	104.7	Sodium/bile acid cotransporter	hepatische Na-Galle-Aufnahme
<i>NAC3_Rat</i>	104.8	Sodium/Ca exchange precursor	Ca Transport bei Exzitation
<i>SJ2B_Rat</i>	105.4	Synaptojanin 2 binding protein	äußeres Protein der Mitochondrienmembran
<i>RGS6_Rat</i>	106.9	Regulator of G-protein signaling 6	erhöht GTPase und verhindert so Signaltransduktion
<i>PSN1_Rat</i>	107.7	Presenilin	katalysiert Spaltung des β -Amyloid-Precursor-Proteins
<i>Q8R5F5</i>	107.8	NUMB long isoform	physiologische Rolle unklar
<i>MTE1_Rat</i>	108.0	Mitoch AcylCoA Thioester Hydrolase	Rolle im Lipidmetabolismus
<i>CTE1_Rat</i>	108.5	Cytosol AcylCoA Thioester Hydrolase	Regulator von CoA-Liganden
<i>MMSA_Rat</i>	108.5	Methylmalonate-semialdehyd dehydrogenase	Rolle im Valin- und Pyrimidin-Metabolismus
<i>D6MGH10</i>	108.6		
<i>Q91XM0</i>	108.6	VSX2-like homeodomain protein fragment	Transkriptionsfaktor
<i>ODO2_Rat</i>	109.2	Dihydrolipoamide succinyltransferase comp	Teil der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
<i>ACYM_Rat</i>	109.2	Acylphosphatase, muscle type isozyme	physiologische Rolle unklar
<i>PLGF_Rat</i>	109.2	Placenta growth factor precursor PIGF	Wachstumsfaktor der Angiogenese und des endothelialen Zellwachstums
<i>E2BB_Rat</i>	109,2	Translation inintiation factor eIF-2B	katalysiert den Austausch von GDP gegen GPT
<i>TM21_Rat</i>	109.4	Transmembrane protein Tmp21 precursor	in Vesikeltransport involviert
<i>FOS_Rat</i>	109.5	Proto-oncogene protein c-fos	reguliert Zellen des Skeletts durch Bindung an Transkriptionsfaktor
<i>TGF3_Rat</i>	110,1	Transforming growth factor β 3 precursor	in Embryogenese und Zelldifferenzierung involviert
<i>ERR2_Rat</i>	110,5	Steroid hormone receptor ERR2	Östrogen-verwandter Rezeptor
<i>NGB_Rat</i>	111.2	Neuroglobin	O ₂ -Transport im Hirn
<i>PRF1_Rat</i>	114,3	Putative preoptic regulatory factor-1 precursor	Vorgänger eines GNRH-verwandten Dekapetids
<i>TSHR_Rat</i>	115,0	Thyrotropin receptor precursor	Rezeptor für Thyrotropin und Thyrostimulin; zentrale Rolle im Thyroid-Zell-Metabolismus
telomerisch			

Tabelle I: Kandidatengene in der Region um D6MGH10. Berücksichtigt wurden alle Gene um den Marker mit signifikantem Einfluss auf die Blutdruckregulation, *D6MGH10*, bis zu den flankierenden Markern *D6Wox5* (telomerisch) bzw. *D6Rat91* (centromerisch). Die Auflistung beginnt mit den am weitesten centromerisch gelegenen Genen und führt zu den am weitesten telomerisch gelegenen Genen hin. Die Position der Gene im Contig NW_043958 ist in MB angegeben.