

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen

3.1.1 Darstellung der phänotypischen Merkmale der Parentaltierstämme SHRSP und F344

Für die vorliegende Studie war der Einfluss der oralen Salzzufuhr auf das kardiovaskuläre System von besonderem Interesse. Um eine Vergleichsbasis für die Untersuchung der gezüchteten F2-Population zu erhalten, wurden zunächst die zu Grunde liegenden Parentaltierstämme F344 und SHRSP einer phänotypischen Charakterisierung unterzogen. Dabei sind zwei Gruppen aus Tieren eines jeden Stammes gebildet worden, wobei jeweils eine dieser Gruppen eine Nidrigsalzdiät mit 0,2%-NaCl im Futter bekam, während die zweite eine achtwöchige Hochsalzdiät mit 4%-NaCl ab der 6. Lebenswoche erhielt.

3.1.1.1 Blutdruck

In der F344-Gruppe wurde unter Salzbelastung ein mittlerer Druck von $132,83 \pm 7,55$ mmHg gemessen. Die sechs Tiere dieser Gruppe zeigten Blutdrücke zwischen 125 und 145 mmHg.

Bei allen acht untersuchten SHRSP-Tieren, die eine Nidrigsalzdiät mit 0,2%-NaCl im Futter erhielten, sind bei der Phänotypisierung im Alter von 14 Lebenswochen deutlich höhere Blutdruckwerte gemessen worden. Dabei lagen die Werte in einem Bereich von 159 bis 184 mmHg. Der Mittelwert betrug $172 \text{ mmHg} \pm 13,19 \text{ mmHg}$.

Noch höhere Werte kamen bei der SHRSP-Tiergruppe zur Ausprägung, die 4% NaCl-haltiges Futter erhielt. Hier wiesen die Tiere Blutdruckwerte von 225 bis 290 mmHg auf. Der Mittelwert der sechs Tiere umfassenden Gruppe betrug $262,08 \pm 22,83 \text{ mmHg}$. Es lag demnach ein signifikanter Anstieg gegenüber der Nidrigsalzgruppe vor ($p < 0,0001$ SHRSP-4% vs. SHRSP-0,2%). Ebenso existierte ein signifikanter Unterschied zwischen F344 und beiden SHRSP-Vergleichsgruppen ($p < 0,0001$ SHRSP-4%, -0,2% vs. F344-4%, Abb. 6).

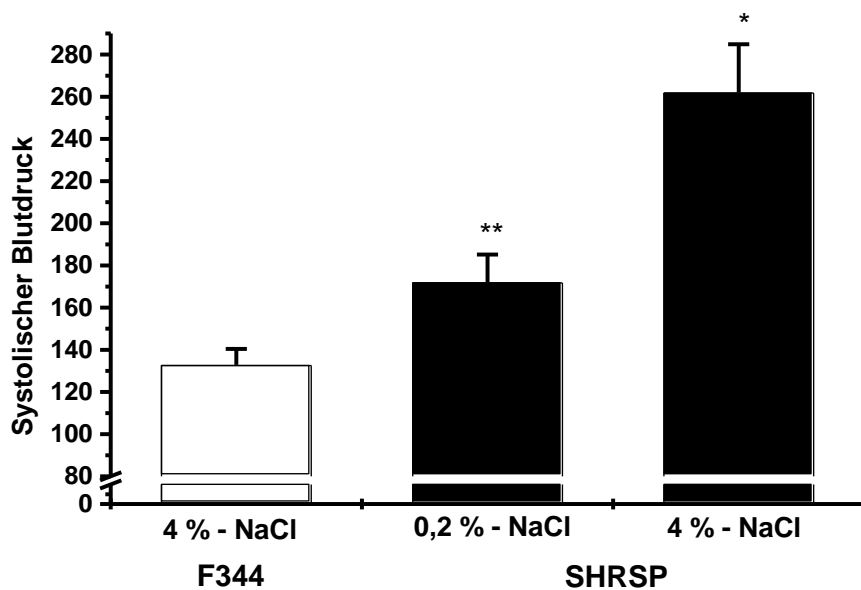


Abb. 6: Mittels Tailcuff-Methode am Ende der 14. Lebenswoche ermittelter systolischer Blutdruck von F344- und SHRSP-Tieren unter 0,2 % - Nidrigsalzdiät sowie nach achtwöchiger 4%-NaCl-Hochsalzdiät.

* $p < 0,0001$ vs. SHRSP-0,2% und vs. F344-4%; ** $p < 0,0001$ vs. F344 4%.

3.1.1.2 Endorganschäden

Zur Beurteilung des Einflusses von Salz auf die Endorgane wurden die absoluten sowie relativen Herzgewichte nach Nidrigsalz- und achtwöchiger Hochsalzdiät ermittelt.

Mit und ohne Salzbelastung entwickelten SHRSP-Tiere schwerere Herzen als F344-Ratten. Das Herzgewicht bzw. Linksherzgewicht der SHRSP-Ratten betrug ohne Salzbelastung $0,82 \pm 0,090$ g bzw. $0,694 \pm 0,083$ g.

Nach achtwöchiger Salzbelastung wogen die Herzen 14 Wochen alter SHRSP-Tiere $1,035 \pm 0,169$ g, die von F344-Tieren gleichen Alters und unter gleicher Diät $0,757 \pm 0,048$ g ($p = 0,001$ SHRSP-4% vs. F344-4%). Das Gewicht der linken Ventrikel betrug bei SHRSP-Tieren $0,901 \pm 0,143$ g und bei F344-Ratten $0,638 \pm 0,045$ g ($p = 0,001$ SHRSP-4% vs. F344-4%). Beide Herzparameterwerte waren demnach bei SHRSP-Tieren um etwa 30 bis 40% gegenüber salzbelasteten F344-Tieren erhöht. Aber auch die Herzgewichte beider SHRSP-Gruppen wiesen untereinander eine signifikante Differenz der Herzgewichte bei unterschiedlicher Salzbelastung auf ($p < 0,01$ SHRSP-4% vs. SHRSP-0,2%).

Bei SHRSP-Ratten betrug das relative Herzgewicht bzw. das relative Linksherzgewicht ohne Salzbelastung $3,57 \pm 0,18$ mg/g bzw. $3,02 \pm 0,20$ mg/g. Wie auch bei den absoluten Gewichten konnten unter Salzbelastung mit $4,89 \pm 0,62$ bzw. $4,27 \pm 0,55$ mg/g deutlich höhere Werte gemessen werden ($p < 0,0001$ SHRSP-4% vs. SHRSP-0,2%). Für salzbelastete F344-Tiere wurden Werte für das relative Herzgewicht bzw. das relative Linksherzgewicht von $2,64 \pm 0,16$ bzw. $2,23 \pm 0,15$ mg/g ermittelt. Der Vergleich der relativen Herzgewichte und Linksherzgewichte zeigte, dass diese bei SHRSP-Ratten unter erhöhter Salzzufuhr um 85 bis 90% größer waren als bei salzbelasteten F344-Ratten ($p < 0,0001$ SHRSP-4% vs. F344-4%, Abb. 7 und 8).

Das Gewicht der Aorta wurde in Bezug zur Länge des gewogenen Stückes gesetzt. Für salzunbelastete SHRSP-Tiere ergaben sich relative aortale Gewichte von $9,88 \pm 0,88$ mg/cm und für salzbelastete von $10,2 \pm 1,73$ mg/cm. Es lag demnach kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,65$ SHRSP-4% vs. SHRSP-0,2%).

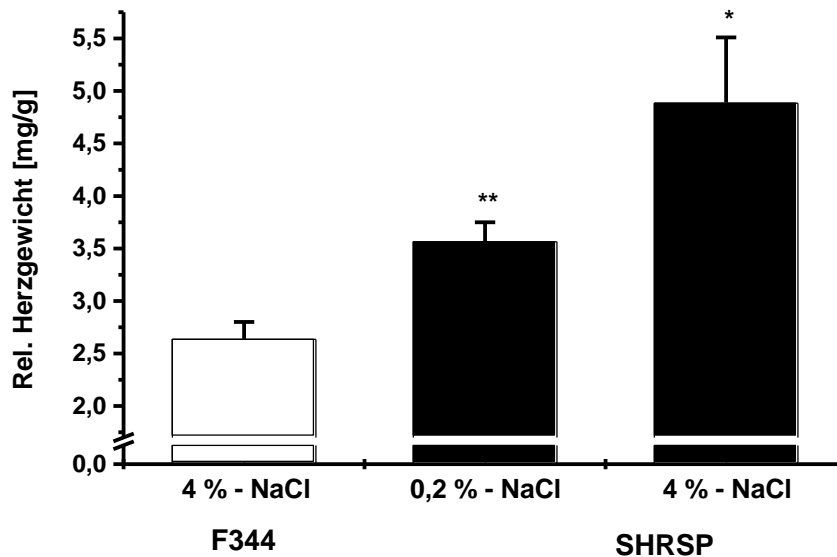


Abb. 7: Relatives Herzgewicht am Ende der 14. Lebenswoche des Parentaltierstammes F344 nach achtwöchiger 4%-NaCl-Hochsalzdiät sowie relatives Herzgewicht des SHRSP-Stammes unter 0,2 %-Niedrigsalz- sowie nach achtwöchiger 4%-NaCl-Hochsalzdiät. * $p < 0,0001$ vs. SHRSP-0,2%, $p < 0,0001$ vs. F344-4%; ** $p < 0,0001$ vs. F344-4%.

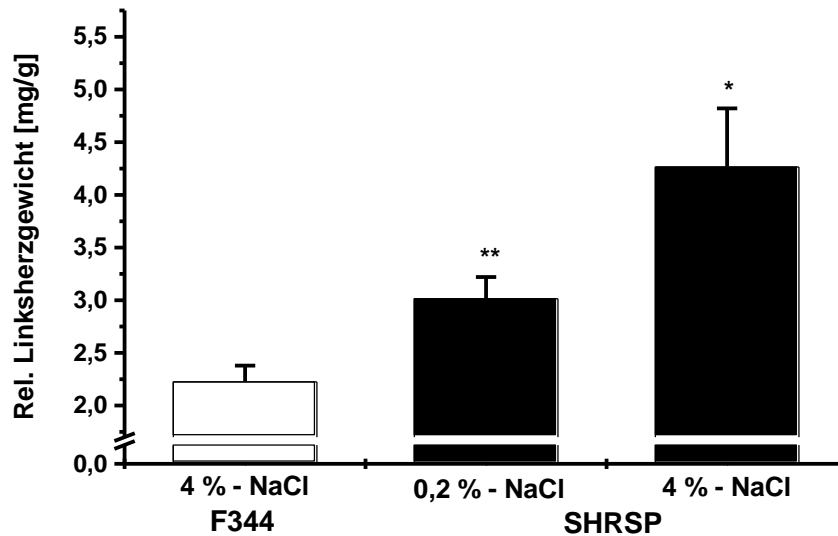


Abb. 8: Relatives Linksherzgewicht am Ende der 14. Lebenswoche des Parentaltierstammes F344 nach achtwöchiger 4%-NaCl-Hochsalzdiät sowie relatives Linksherzgewicht des SHRSP-Stammes unter 0,2 %-Niedrigsalz- sowie nach achtwöchiger 4%-NaCl-Hochsalzdiät.

* $p < 0,0001$ vs. SHRSP-0,2%, $p < 0,0001$ vs. F344-4%; ** $p < 0,0001$ vs. F344-4%.

Tab. 1: Zusammenfassung der kardiovaskulären Phänotypen der Parentaltierstämme F344 und SHRSP bei unterschiedlichem Salzgehalt in der Diät. SBD = systolischer Blutdruck, HW = absolutes Herzgewicht, LHW = absolutes Linksherzgewicht, Rel. HW = relatives Herzgewicht, Rel. LHW = relatives Linksherzgewicht, AOH = relatives Aortengewicht.

		F344 4%	SHRSP 0,2%	SHRSP 4%
SBD	[mmHg]	132 ± 8	172 ± 14	262 ± 23
HW	[g]	0,757 ± 0,048	0,82 ± 0,090	1,035 ± 0,169
Rel. HW	[mg/g]	2,64 ± 0,16	3,57 ± 0,18	4,89 ± 0,62
LHW	[g]	0,638 ± 0,045	0,694 ± 0,083	0,904 ± 0,143
Rel. LHW	[mg/g]	2,23 ± 0,15	3,02 ± 0,20	4,27 ± 0,55
AOH	[mg/cm]	-	9,88 ± 0,88	10,2 ± 1,73

3.1.2 Darstellung der phänotypischen Merkmale der F2-Population SHRSPxF344

Aus den Parentaltierlinien F344 und SHRSP wurde eine F2-Population herangezüchtet. 232 männliche Tiere dieser Population erhielten von der 6. bis 14. Lebenswoche eine Hochsalzdiät mit 4% NaCl im Futter. Am Ende der 14. Lebenswoche erfolgte die phänotypische Untersuchung.

3.1.2.1 Blutdruckverteilung in der F2-Population

Die mit der Tailcuffmethode ermittelten systolischen Blutdrücke der F2-Population lagen zwischen 139 und 284 mmHg. Der Mittelwert betrug 187 ± 26 mmHg, der Median 183 mmHg. Bei der graphischen Auftragung der Blutdruckwerte zeigte sich eine linksgipflige, unimodale Verteilung (Abb.9).

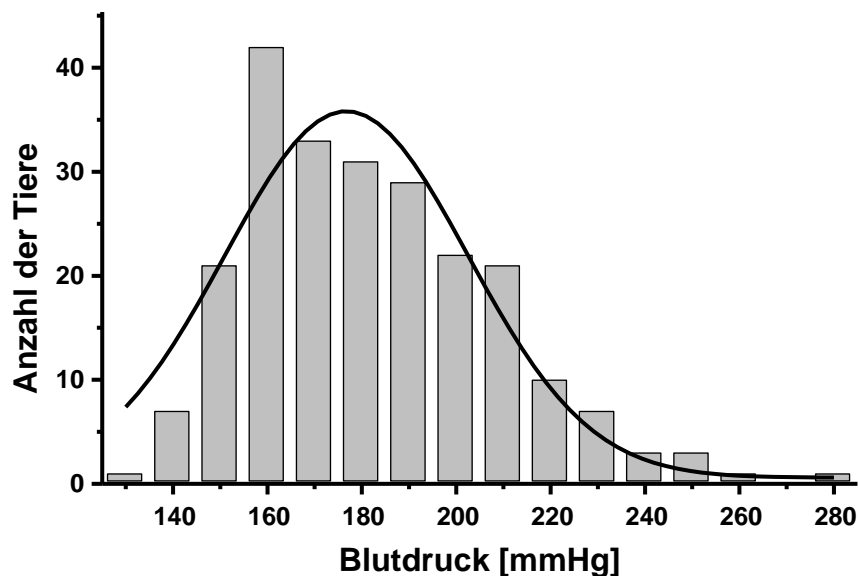


Abb. 9: Verteilung der Blutdruckwerte in der F2-Population SHRSP x F344 (n = 232) am Ende der 14. Lebenswoche.

3.1.2.2 Endorganschäden

3.1.2.2.1 Absolutes und relatives Herz- und Linksherzgewicht

Die Werte der gemessenen Gesamtherzgewichte bewegten sich zwischen 0,61 und 1,2 g, der Mittelwert betrug $0,89 \pm 0,10$ g, der Median 0,88 g. Bei den linken Herzen verteilten sich die Werte zwischen 0,53 und 1,09 g, der Mittelwert lag hier bei $0,75 \pm 0,09$ g, der Median betrug 0,75 g.

Bei Relativierung der Daten zum Körpergewicht ergaben sich für das relative Gesamtherzgewicht Werte in einem Bereich von 2,54 bis 4,86 mg/g (Mittelwert = $3,13 \pm 0,34$ mg/g; Median = 3,06 mg/g) und für das relative Linksherzgewicht von 2,09 bis 3,88 mg/g (Mittelwert = $2,63 \pm 0,31$ mg/g; Median = 2,58 mg/g). Die Verteilungsmuster der absoluten und relativen Herzgewichte waren unimodal und linksgipflig bzw. rechtsschief. Es befanden sich Ausreißer vor allem im oberen Bereich der Skala (Abb. 10).

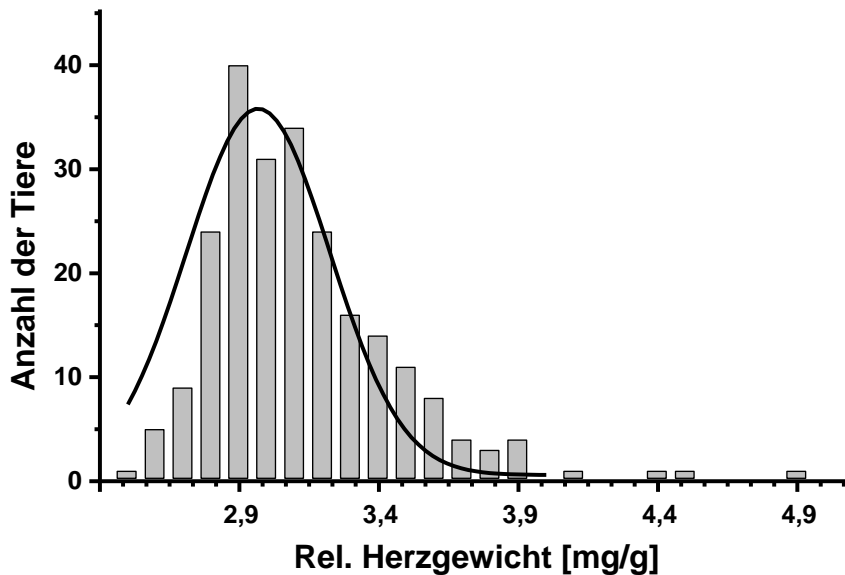


Abb. 10: Verteilung des relativen Herzgewichtes in der F2-Population SHRSP x F344 (n = 232) am Ende der 14. Lebenswoche.

3.1.2.2 Absolutes und relatives Aortengewicht

Um ein Maß für die Hypertrophie der Aorta zu erhalten, wurde der Quotient aus Gewicht und Länge der Aorta errechnet. Dabei ergaben sich Werte zwischen 6,0 und 12,33 mg/cm mit einem Mittelwert von $8,94 \pm 1,15$ mg/cm und einem Median von 8,8 mg/cm. Wurden die Einzelwerte graphisch aufgetragen, zeigte sich eine rechtschiefe, unimodale Verteilung (Abb. 11).

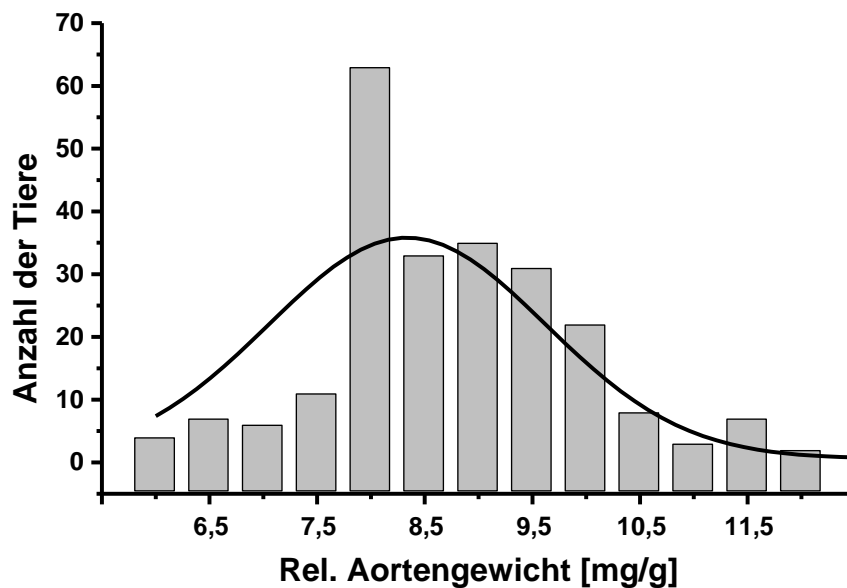


Abb. 11: Verteilung des relativen Aortengewichtes in der F2-Population SHRSP x F344 (n = 232) am Ende der 14. Lebenswoche.

3.1.2.3 Korrelationsanalysen

Da es sich bei den Merkmalen um quantitative Merkmale handelte, ließ sich der Korrelationskoeffizient nach Pearson errechnen. Die Regressionsanalyse ergab dabei nur schwache Korrelationen zwischen dem systolischen Blutdruck und dem relativen Gesamtherz- und Linksherzgewicht. So zeigte sich für das relative Herzgewicht mit einem r -Wert von 0,255 und einem p -Wert von 0,0001 ein signifikanter, jedoch nur schwacher gerichteter Zusammenhang. Das Bestimmtheitsmaß errechnete sich mit $r^2 = 0,065$. Demnach konnten etwa 6,5% der Gesamtvarianz des Herzgewichts dem Blutdruck zugeordnet werden (Abb. 12).

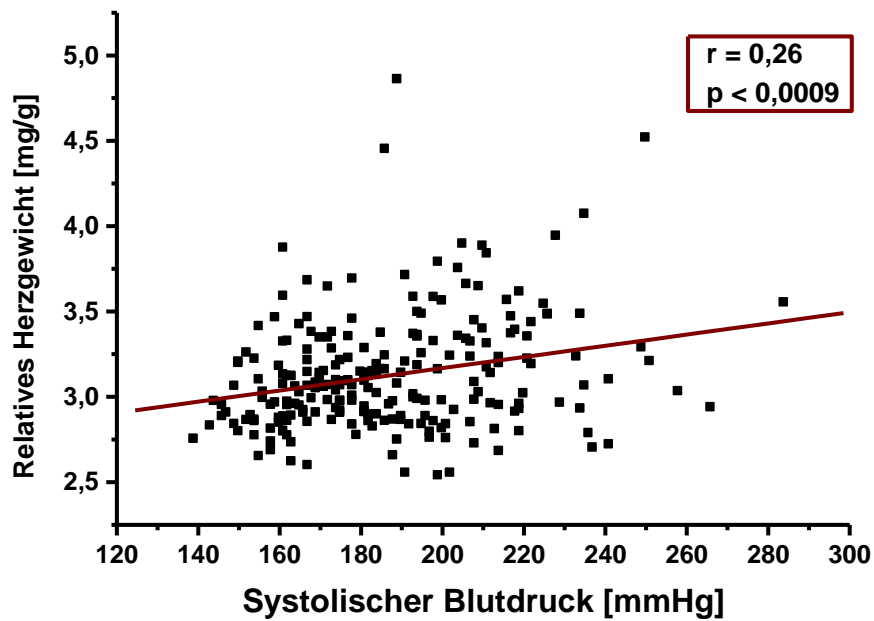


Abb. 12: Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und relativem Herzgewicht in der F2-Population SHRSP x F344 (n = 232) am Ende der 14. Lebenswoche.

Ein ähnliches Ergebnis offenbarte die Regressionsanalyse zwischen Blutdruck und relativem Linksherzgewicht. Der Korrelationskoeffizient r betrug hier 0,249 und das Bestimmtheitsmaß r^2 0,062. Ein p -Wert von 0,0001 zeigte auch hier Signifikanz an. Es konnten hiernach jedoch nur 6,2 % der Gesamtvarianz des relativen Linksherzgewichtes dem Blutdruck zugeschrieben werden (Abb. 13).

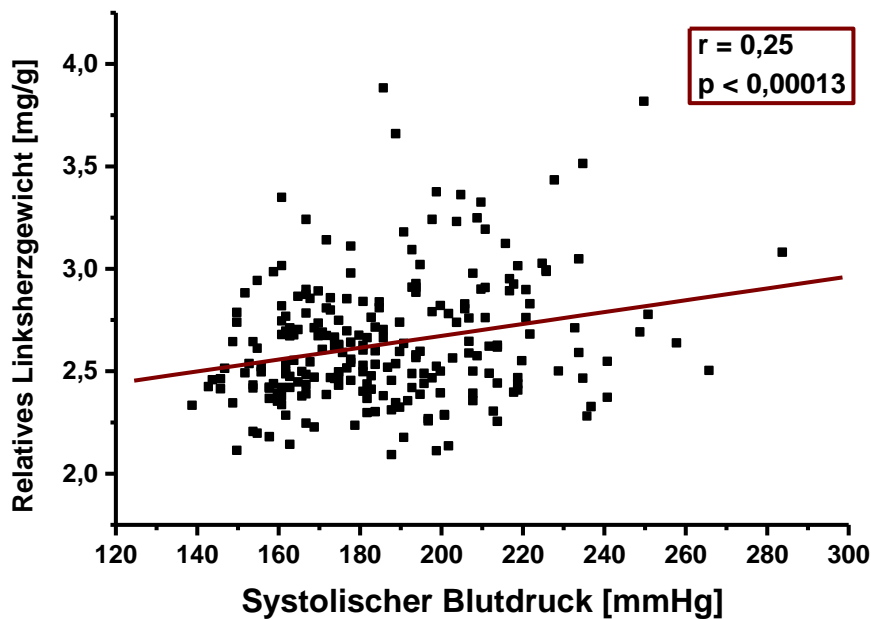


Abb. 13: Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und relativem Linksherzgewicht in der F2-Population SHRSP x F344 ($n = 232$) am Ende der 14. Lebenswoche.

Die Korrelationsanalyse von Blutdruck und aortaler Hypertrophie ergab einen Koeffizienten $r = 0,133$. Die Korrelation dieser Parameter war also sehr schwach. Nach dem Bestimmtheitsmaß zu urteilen, konnten nur 1,8% der Varianz durch den Blutdruck erklärt werden ($r^2 = 0,018$). Der p -Wert befand sich mit $p = 0,043$ am Rande der für die Korrelationsanalysen angenommenen Signifikanzschwelle von $p = 0,05$ (Abb. 14).

Hypertrophieprozesse des Herzens im Rahmen einer Hypertonie gehen häufig mit vaskulären Veränderungen einher. Bei einer durchgeführten Korrelationsanalyse zwischen relativem Herzgewicht und relativem Aortengewicht ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,31$, das Bestimmtheitsmaß war danach $r^2 = 0,096$ und der p -Wert $< 0,0001$ (Abb. 15).

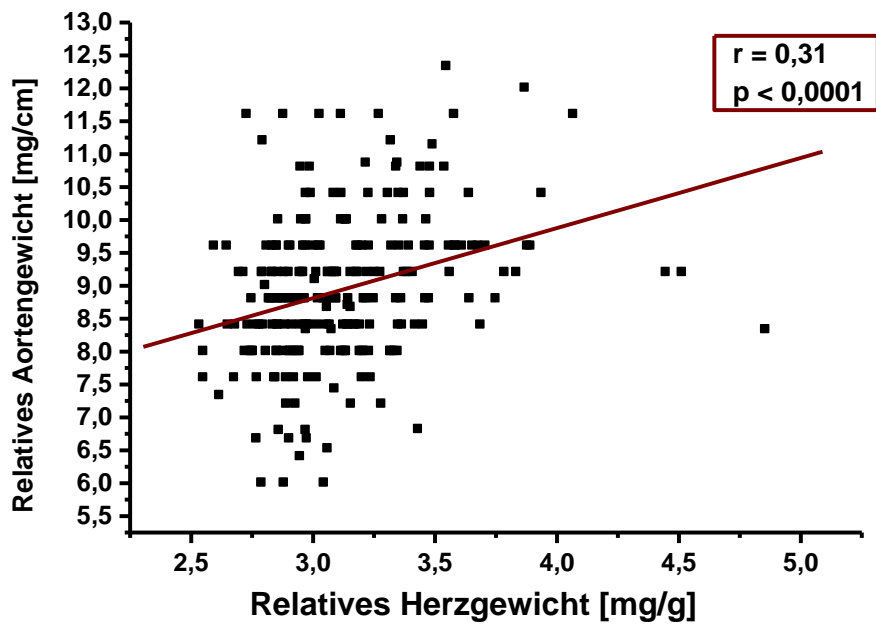


Abb. 14: Korrelationsanalyse zwischen relativem Herzgewicht und relativem Aortengewicht in der F2-Population SHRSP x F344 (n = 232) am Ende der 14. Lebenswoche.

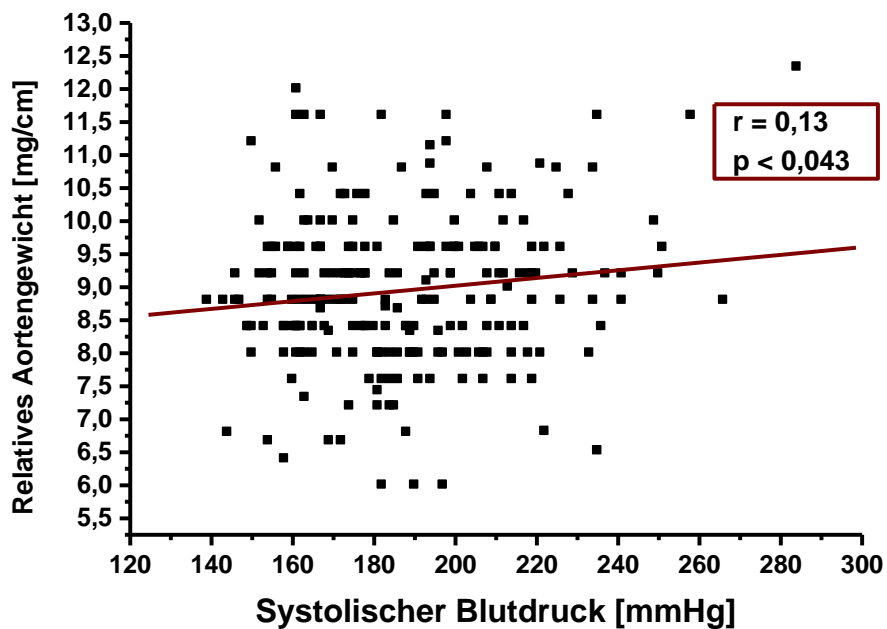


Abb. 15: Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und relativem Aortengewicht in der F2-Population SHRSP x F344 (n = 232) am Ende der 14. Lebenswoche.

Die stärkste Korrelation zwischen den verschiedenen Parametern fand sich zwischen dem Körpergewicht und dem Herzgewicht. Hier betrug der Korrelationskoeffizient r 0,53, das Bestimmtheitsmaß r^2 0,28 ($p = 4,9 * 10^{-16}$, Abb. 16).

Die Korrelationsanalyse ergab für das Linksherzgewicht einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,5$ und ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,25$ ($p = 10^{-17}$). Die Korrelation zwischen dem Körpergewicht und dem relativen Aortengewicht war ebenfalls signifikant aber schwächer, hier betrug $r = 0,32$ und r^2 demnach 0,1 ($p = 6,9 * 10^{-7}$, Abb.17).

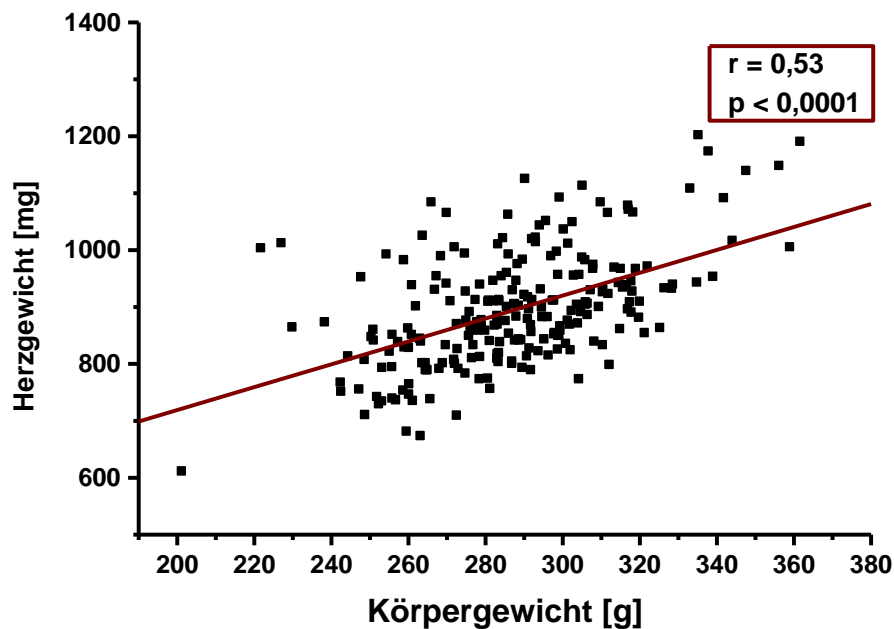


Abb. 16: Korrelationsanalyse zwischen Körpergewicht und absolutem Herzgewicht in der F2-Population SHRSP x F344 ($n = 232$) am Ende der 14. Lebenswoche.

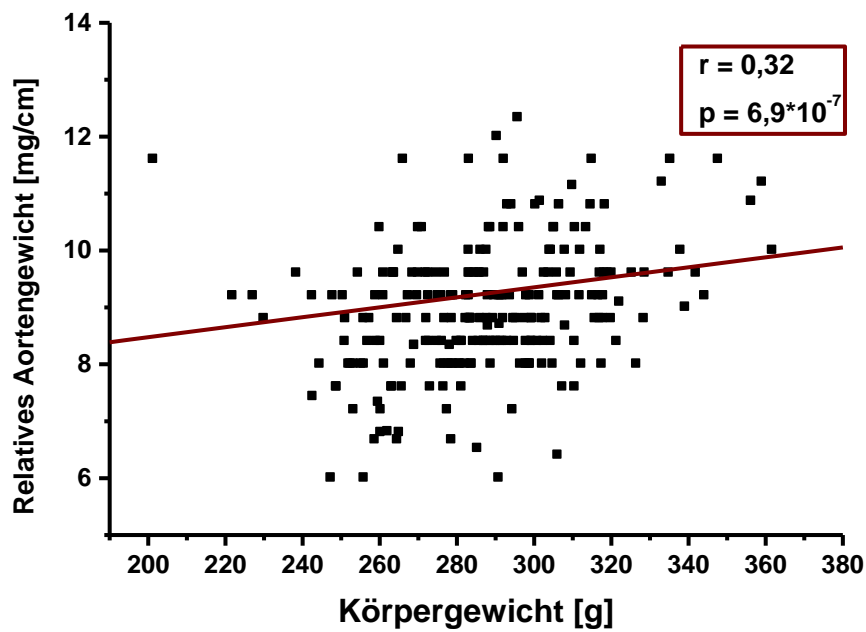


Abb. 17: Korrelationsanalyse zwischen Körpergewicht und relativem Aortengewicht in der F2-Population SHRSP x F344 (n = 232) am Ende der 14. Lebenswoche.

Tab. 2: Zusammenfassung der kardiovaskulären Phänotypen der F2-Population SHRSP x F344 (n = 232) am Ende der 14. Lebenswoche.

		Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung
Systolischer Blutdruck	[mmHg]	139	284	186,85	26,14
Herzgewicht	[g]	0,61	1,20	0,89	0,099
Linksherzgewicht	[mg/g]	0,53	1,09	0,75	0,093
Relatives Herzgewicht	[g]	2,54	4,86	3,13	0,34
Relatives Linksherzgewicht	[mg/g]	2,09	3,88	2,63	0,31
Relatives Aortengewicht	[mg/cm]	6,00	12,33	8,95	1,15

3.2 Ergebnisse der Genomuntersuchung

3.2.1 Analyse der Mikrosatellitenmarker für die Genomuntersuchung

Für eine Untersuchung des genetischen Hintergrundes in Kosegregationsstudien werden Mikrosatellitenmarker mit einem hohen Informationsgehalt benötigt. Dies bedeutet, dass die Marker in den verwendeten Parentaltierstämmen polymorph zueinander sein müssen. Um solche geeigneten Marker zu identifizieren, wurden vor der eigentlichen Genomuntersuchung zunächst die Mikrosatellitenmarker mittels PCR und Polyacrylamid-Elektrophorese auf Polymorphismen untersucht. Aus dieser Markeranalyse ergab sich eine durchschnittliche Polymorphismusrate von etwa 70% zwischen den Stämmen F344 und SHRSP. Dies entsprach auch den Ergebnissen größerer Online-Datenbanken wie der Rat Genome Database und dem Broad Institute.

Aus dem untersuchten Markersatz wurden für das gesamte Genom auf diese Weise 227 polymorphe Mikrosatelliten ermittelt, die sich für die Genomuntersuchung eignen und sich in einem Abstand von ca. 10 cM über das gesamte Genom verteilen.

3.2.2 Kopplungsuntersuchung und QTL-Kartierung

Die Genom-Untersuchung der F₂-Population ergab eine Aufteilung der Genotypen an den getesteten Markerpositionen in homozygot für das SHRSP-Allel, homozygot für das F344-Allel sowie heterozygot. Das Verhältnis der einzelnen Genotypen an den untersuchten Markerpositionen betrug hierbei durchschnittlich 1 zu 2 zu 1, wie es gemäß den Mendelschen Vererbungsregeln zu erwarten war (Abb.18).

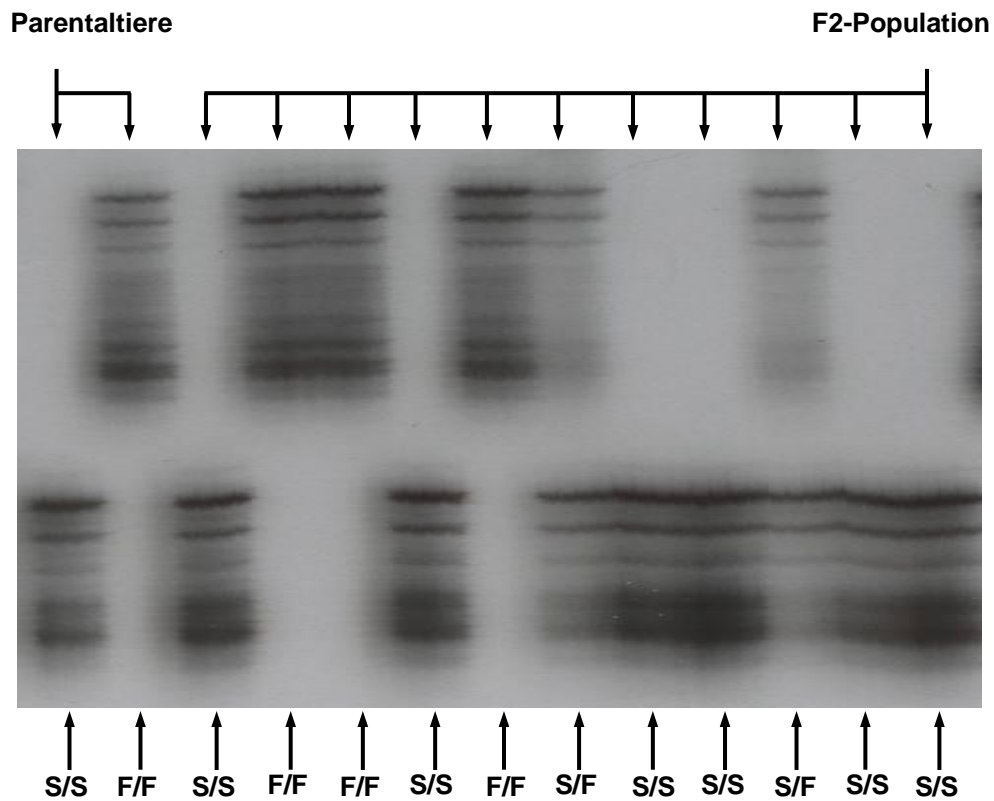


Abb.18: Exemplarische Darstellung des Mikrosatellitenmarkers *D2Rat88* durch Autoradiographie nach Gel-Elektrophorese. Links präsentieren sich die Genotypen der Parentaltiere SHRSP (S/S) und F344 (F/F). Daneben stellen sich die Genotypen eines Teils der F2-Population SHRSPxF344 dar, dabei kommen die Genotypen S/S = homozygot für SHRSP, S/F = heterozygot und F/F = homozygot für F344 zur Abbildung.

3.2.2.1 Selektive Genotypisierung

Die zunächst durchgeführte selektive Genotypisierung der jeweils 23 Tiere mit den höchsten bzw. niedrigsten Blutdruckwerten (Extremtiere) ergab signifikante sowie wahrscheinlich signifikante Kopplungen für die absoluten und relativen Herzgewichte auf den Chromosomen 1 und 7 (RNO1 und 7) der SHRSPxF344 F2 Population. Auf den anderen Chromosomen konnten keine signifikanten Kopplungen für diese Parameter entdeckt werden.

Auf RNO1 fanden sich bei *D1Rat34* quantitative Merkmalsloci für die relativen Herzgewichte. Mit einem LOD-Wert von 5,01 ($p = 0,00005$) für das relative Herzgewicht und einem LOD-Wert von 4,52 ($p = 0,0002$) für das relative Linksherzgewicht lag hier in beiden Fällen eine signifikante Kopplung vor. Für das absolute Herzgewicht (LOD-Wert = 0,523, $p = 0,5$) ebenso wie für das absolute Linksherzgewicht (LOD-Wert = 0,628, $p = 0,5$) errechneten sich dort jedoch weder signifikante noch wahrscheinlich signifikante LOD-Werte (Abb. 19).

Dieser Bereich überschneidet sich mit einer weiteren Region wahrscheinlicher Kopplung für jeden dieser Parameter. Die maximalen LOD-Werte befanden sich von *D1Rat34* etwa 36 cM entfernt bei *D1Rat287*. Hier betragen die LOD-Werte 4,14 für das relative Herzgewicht ($p = 0,0001$) und 3,91 für das relative Linksherzgewicht ($p = 0,0002$). Für die absoluten Gewichte ergaben sich in diesem Bereich nicht signifikante Kopplungen mit LOD-Werten von maximal 1,4 ($p < 0,09$). Der höchste LOD-Wert auf RNO1 für den Blutdruck war mit 1,73 ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,2$).

In dem Bereich zwischen *D7Rat144* und *D7Rat21* auf RNO7 wurde mit einem LOD-Wert von 2,82 eine wahrscheinlich signifikante Kopplung für das absolute Linksherzgewicht ($p = 0,003$) entdeckt. Der Wert für das Gesamtherzgewicht war mit 2,65 unterhalb der Signifikanzschwelle ($p = 0,005$, Abb. 21).

Auf RNO3 wurden in dem Bereich um *D3Rat101* LOD-Werte von 2,31 ($p = 0,007$) für das Herzgewicht und 2,50 ($p = 0,005$) für das Linksherzgewicht errechnet (Abb.20). Beides sind nicht signifikante Kopplungen. Auch ergaben sich in dieser ersten Genomuntersuchung auf keinem Chromosom signifikante LOD-Werte für die aortale Hypertrophie.

Die Genomuntersuchung wurde im Anschluss an die selektive Genotypisierung für die Chromosomen 1,3 und 7 mit der gesamten F2-Population ($n = 232$) wiederholt. Obwohl die Kopplungen auf RNO3 und 7 nicht signifikant waren, wurden diese

Chromosomen auf Grund der dort zu findenden nur geringfügig unterhalb der Signifikanzgrenze befindlichen LOD-Werte, miteinbezogen.

RNO1

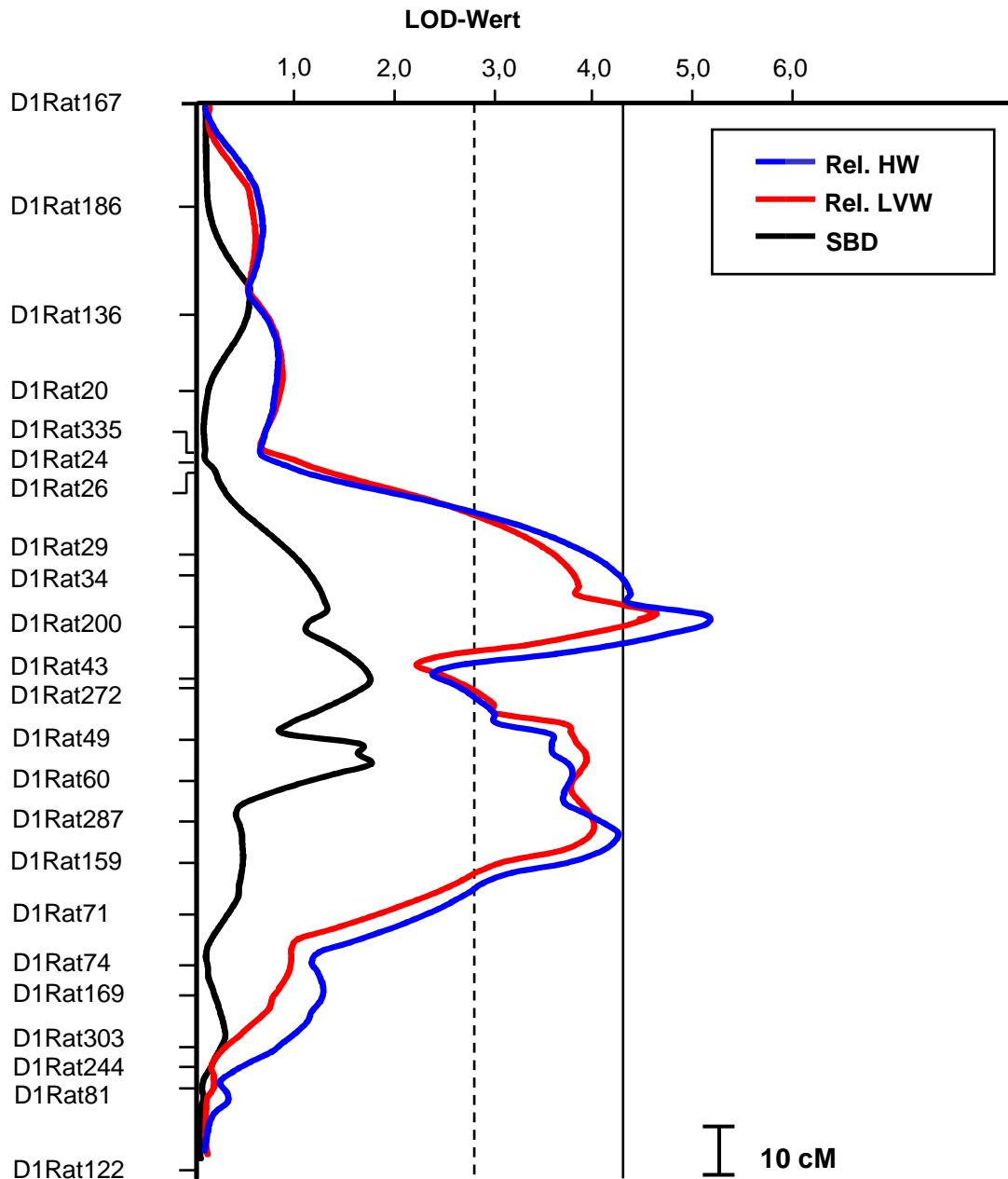


Abb. 19: **Selektive QTL-Kartierung bei 46 F2-Tieren**

LOD-Plot für RNO1 für das relative Herzgewicht (Rel. HW, maximaler LOD-Wert = 5,01), das relative Linksherzgewicht (Rel. LVW, maximaler LOD-Wert = 4,52) und den systolischen Blutdruck (SBD, maximaler LOD-Wert = 1,73).

Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze für wahrscheinliche Kopplung an (LOD-Wert = 2,8), während die durchgezogene Linie die Grenze für signifikante Kopplung angibt (LOD-Wert = 4,3).

RNO3

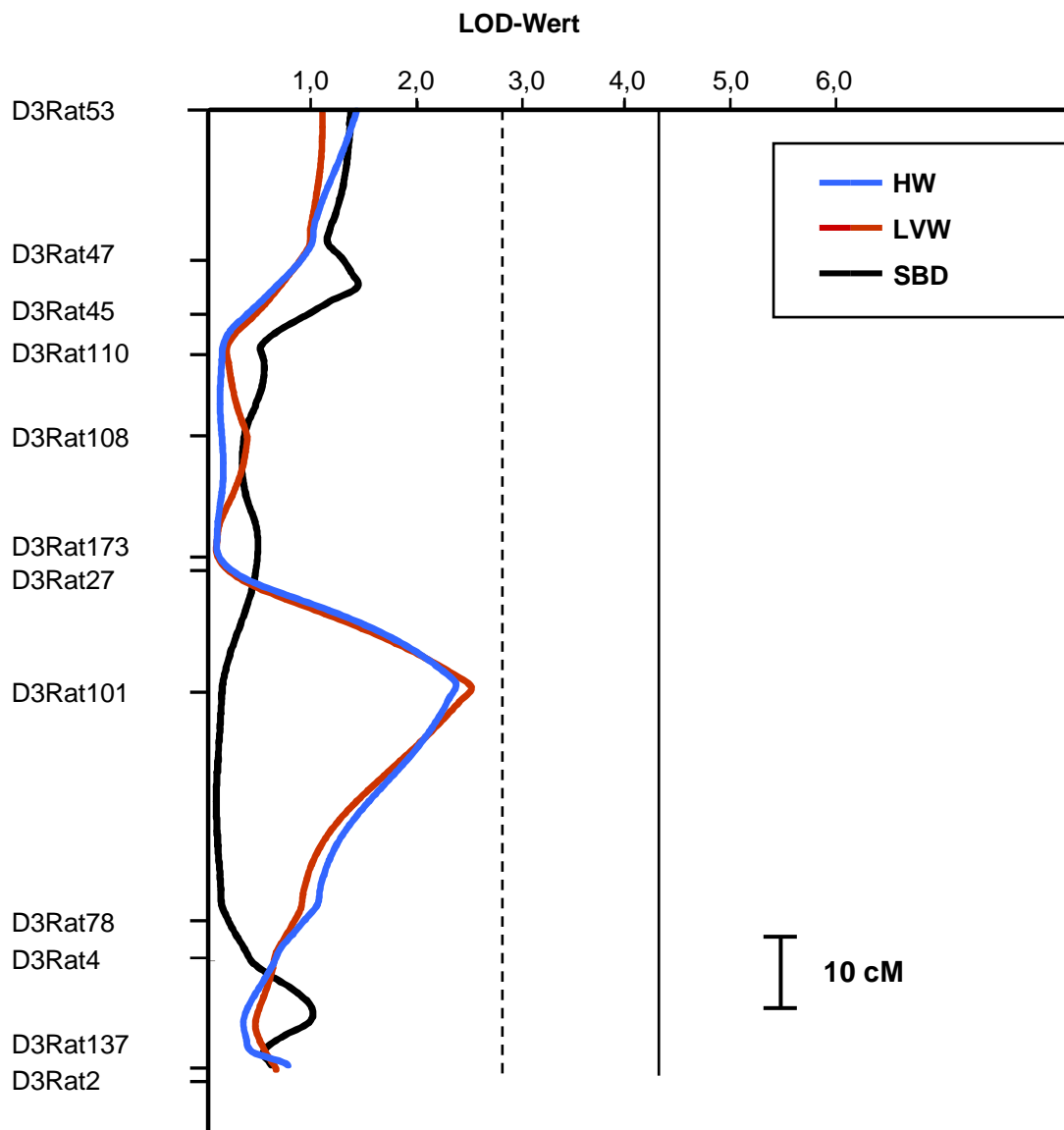


Abb. 20: **Selektive QTL-Kartierung bei 46 F2-Tieren**

LOD-Plot für das absolute Herzgewicht (HW, maximaler LOD- Wert = 2,31), das absolute Linksherzgewicht (LVW, maximaler LOD-Wert = 2,50) und den systolischen Blutdruck (SBD, maximaler LOD-Wert = 1,15) auf RNO3.

Signifikanzgrenzen gelten wie in Abbildung 19 (Seite 53) beschrieben.

RNO7

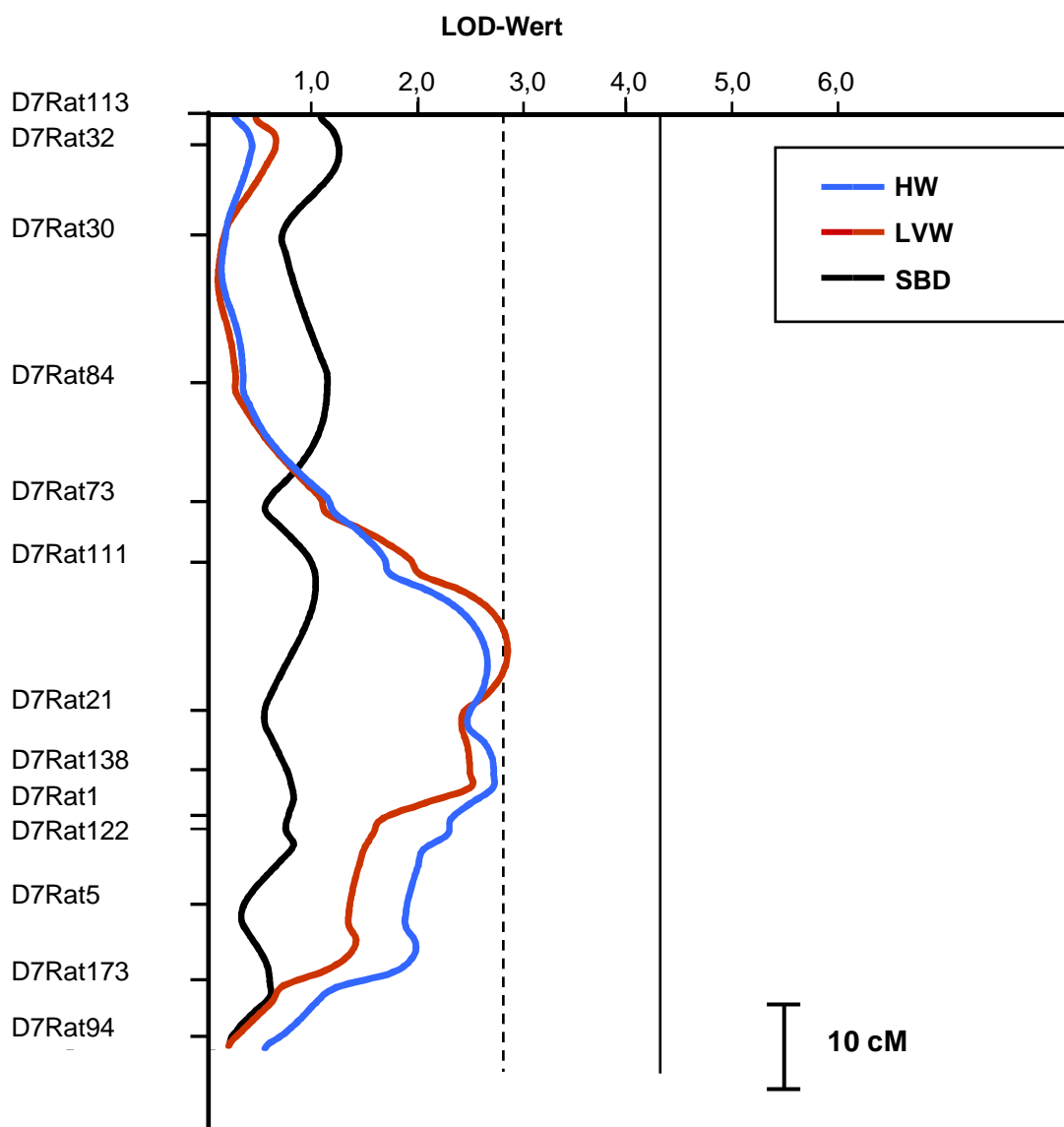


Abb. 21: **Selektive QTL-Kartierung bei 46 F2-Tieren**

LOD-Plot für das absolute Herzgewicht (HW, maximaler LOD-Wert = 2,82), das absolute Linksherzgewicht (LVW, maximaler LOD-Wert = 2,65) und den systolischen Blutdruck (SBD, maximaler LOD-Wert = 1,11) auf RNO7.

Signifikanzgrenzen gelten wie in Abbildung 19 (Seite 53) beschrieben.

3.2.2.2 Genotypisierung der gesamten SHRSPxF344 F2-Population

3.2.2.2.1 QTL für die absoluten Herzgewichte

Die zweite Untersuchung des Genoms hat für die absoluten und relativen Gesamtherz- und Linksherzgewichte mehrere signifikante Kopplungen auf RNO1 ergeben. Erwartungsgemäß kam es dabei jedoch zu Veränderungen der zuvor in der selektiven Genotypisierung erhobenen LOD-Werte.

Die Gesamtlänge von RNO1 wurde mit dem MapMaker-Programm bei dieser Kreuzung mit 167,5 cM errechnet. Auf diesem Chromosom ergab die Intervallkartierung für das absolute Herzgewicht bei Marker *D1Rat287* einen maximalen LOD-Wert von 4,75 ($p = 2 \cdot 10^{-5}$). Die Größe des 1-LOD-Intervalls betrug etwa 15 cM, während das 2-LOD-Intervall etwa 36 cM umfasste. Dieser Genlocus beeinflusst etwa 11,3% der Gesamtvarianz des absoluten Herzgewichtes (Abb. 22).

3.2.2.2.2 QTL für die relativen Herzgewichte

Die signifikante Region für das relative Herzgewicht maß ca. 53 cM. Innerhalb des QTL konnten zwei Gipfel mit maximalen LOD-Werten detektiert werden. Der Hauptbefund war bei Marker *D1Rat287* lokalisiert. Dort wurde eine hochsignifikante Kopplung sowohl für das relative Gesamtherzgewicht als auch für das relative Linksherzgewicht angezeigt. Das 1-LOD-Intervall für das relative Herzgewicht war etwa 10 cM groß, das 2-LOD-Intervall etwa 13 cM (Abb. 23).

Bei diesem Marker erbrachte die Analyse mittels MapMaker einen maximalen LOD-Wert für das relative Herzgewicht von 10,51 ($p = 1,3 \cdot 10^{-10}$). Durch diesen Befund konnte ein Anteil von 25,2 % der Gesamtvarianz des Parameters *Relatives Herzgewicht* erklärt werden. Als Nebenbefund wurde in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem bereits erwähnten QTL ein weiterer für diesen Phänotyp identifiziert werden, welcher sich in ca. 12 cM Entfernung bei Marker *D1Rat60* befand. Hier wies der maximale LOD-Wert von 8,15 ($p = 8 \cdot 10^{-8}$) auf die ebenfalls hohe Signifikanz dieses QTL hin. Der Anteil an der Gesamtvarianz betrug etwa 17,6%.

Die LOD-Wert-Kurve für das relative Linksherzgewicht lief nahezu parallel zu der des relativen Herzgewichtes. Geringfügige Unterschiede ergaben sich in der Höhe der LOD-Werte. Der maximale Wert betrug bei *D1Rat287* für das relative Linksherzgewicht 8,38 ($p = 1,7 \cdot 10^{-8}$). Der Bereich der wahrscheinlichen Kopplung war mit ungefähr 83 cM etwa so groß wie beim relativen Herzgewicht. Der

signifikante Abschnitt fiel mit etwa 45 cM Länge im Vergleich jedoch etwas kleiner aus. Ungefähr 19,3% der Varianz betrifft der Anteil diesen QTL an der Gesamtvarianz des relativen Linksherzgewichtes.

Auch für das relative Linksherzgewicht fand sich bei Marker *D1Rat60* ein zweiter LOD-Wert-Gipfel. Der höchste LOD-Wert betrug dabei 6,13 ($p = 2 \cdot 10^{-6}$), der Gesamtvarianzanteil 13,9%.

Ein dritter Anstieg der LOD-Werte konnte in etwa 40 cM Entfernung von *D1Rat60* bei *D1Rat29* für das relative Linksherzgewicht beobachtet werden. Hier lagen die LOD-Werte jedoch unterhalb der Signifikanzgrenze von 4,3. Der höchste LOD-Wert betrug 4,08 ($p = 0,0008$) und war damit wahrscheinlich signifikant. Der errechnete Anteil dieses QTL an der Gesamtvarianz machte etwa 5,75% aus.

Die in der selektiven Genotypisierung ermittelten signifikanten LOD-Werte in dem Bereich um Marker *D1Rat34* waren in dieser Untersuchung nur noch wahrscheinlich signifikant. So sank der maximale LOD-Wert für das relative Herzgewicht von zuvor 5,01 ($p = 0,00005$) auf 3,72 ($p = 0,0002$), der Wert für das relative Linksherzgewicht von 4,52 auf 4,08, der p-Wert wurde in beiden Fällen mit 0,0002 angegeben. Die in der Untersuchung gefundenen LOD-Werte auf RNO3 und 7 für die verschiedenen Herzgewichte konnten in dieser zweiten Untersuchung nicht bestätigt werden. Es fanden sich dort nun weder signifikante noch wahrscheinlich signifikante LOD-Werte.

RNO1

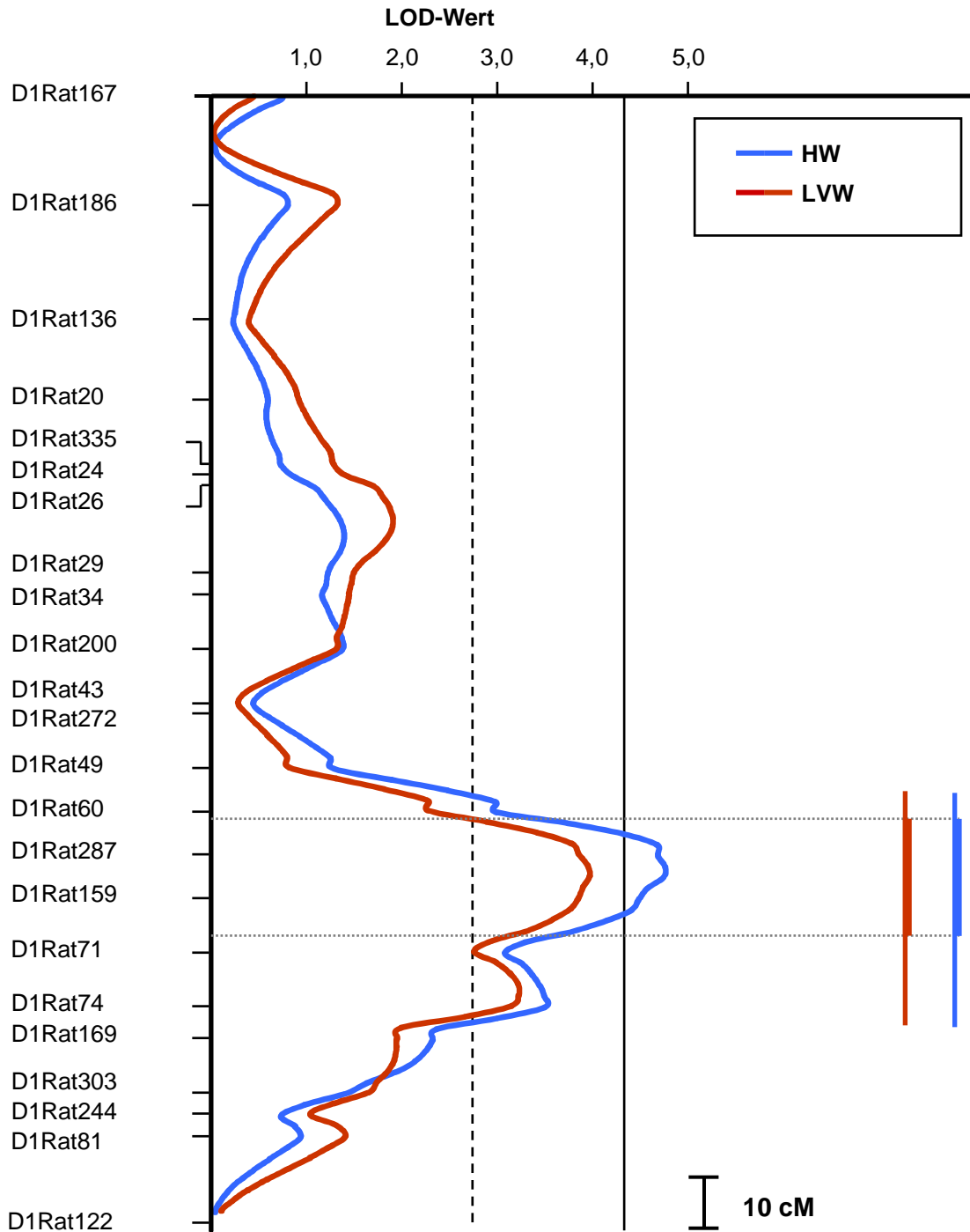


Abb. 22: Genomuntersuchung in der Gesamtpopulation (n=232 Tiere)

LOD-Plot für das absolute Herzgewicht (HW, maximaler LOD-Wert = 4,75), das absolute Linksherzgewicht (LVW, maximaler LOD-Wert = 3,96) und den systolischen Blutdruck (SBD, maximaler LOD-Wert = 2,66) auf RNO1.

Die vertikalen Balken geben die 1-LOD-Intervalle (dicker Balken) bzw. 2-LOD-Intervalle (dünner Balken) an.

Signifikanzgrenzen gelten wie in Abbildung 19 (Seite 53) beschrieben.

RNO1

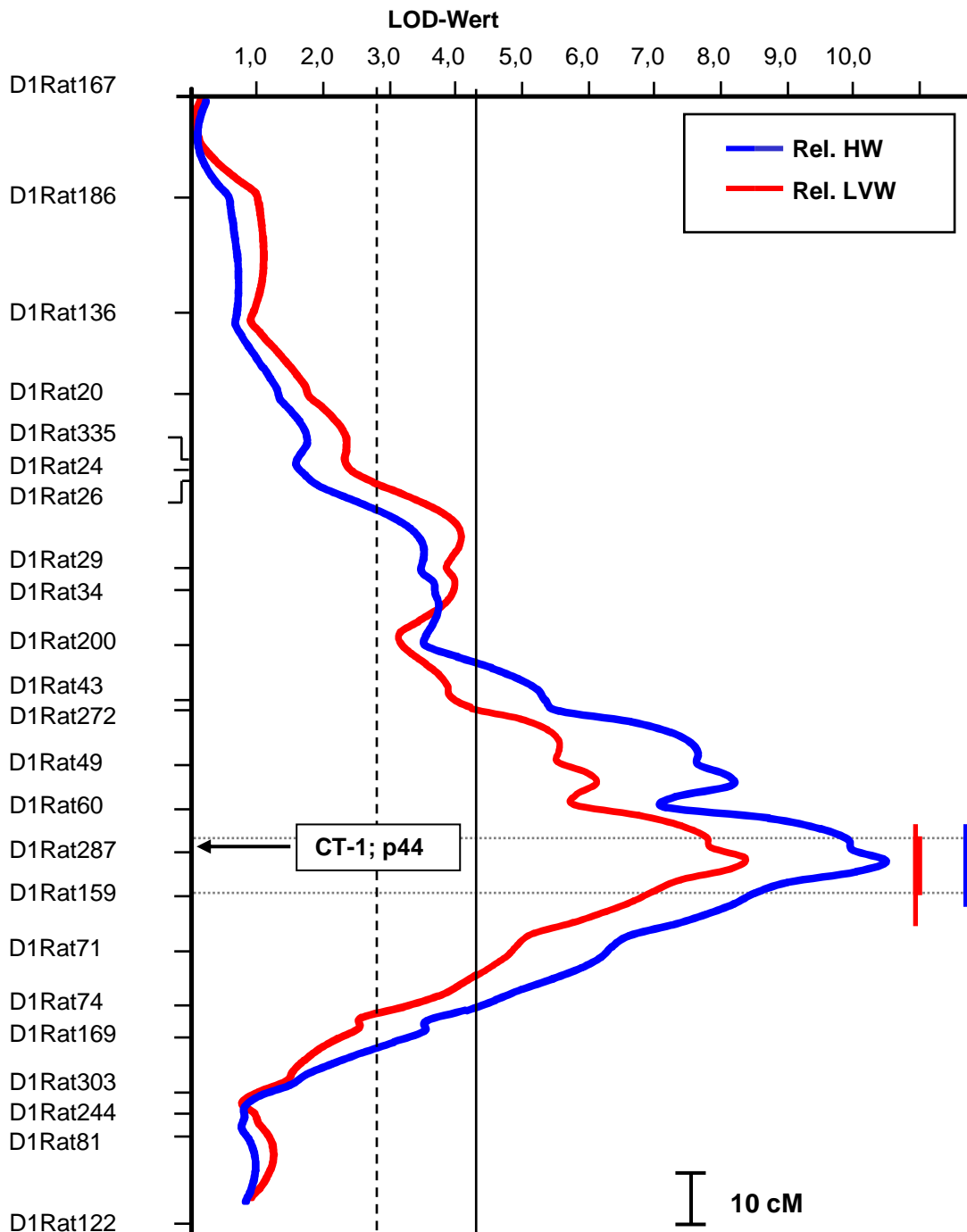


Abb. 23: Genomuntersuchung in der Gesamtpopulation (n=232 Tiere)

LOD-Plot für das relative Herzgewicht (Rel. HW, maximaler LOD-Wert = 10,51) und das relative Linksherzgewicht (Rel. LVW, maximaler LOD-Wert = 8,38) auf RNO1. Die vertikalen Balken geben die 1-LOD-Intervalle (dicker Balken) bzw. 2-LOD-Intervalle (dünner Balken) an.

CT-1 = Cardiotrophin-1-Locus; p44 = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-3-Locus. Signifikanzgrenzen gelten wie in Abbildung 19 (Seite 53) beschrieben.

3.2.3 Varianzanalyse der Herzgewichte

3.2.3.1 Absolute Herzgewichte

Der Mittelwertvergleich der Herzgewichte nach Aufteilung der F2-Population gemäß der Genotypen bei Marker *D1Rat287* zeigte bei den absoluten Herzgewichten, dass kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung des Phänotypen zwischen Tieren mit einem oder zwei Allelen des SHRSP-Stammes vorlag ($p = 0,4$ bei S/S vs. F/S). Signifikant hingegen war jedoch der Unterschied des absoluten Gesamtherzgewichtes bei Vorliegen von einem ($0,91 \pm 0,097$ g) bzw. zwei SHRSP-Allelen ($0,92 \pm 0,093$ g) gegenüber zwei F344-Allelen ($0,84 \pm 0,092$ g; $p < 0,0001$). Ähnliches galt für das absolute Linksherzgewicht. Hier wogen die Herzen bei ein bzw. zwei SHRSP-Allelen im Mittel $0,77 \pm 0,087$ g bzw. $0,77 \pm 0,093$ g gegenüber den Tieren mit zwei F344-Allelen, welche ein durchschnittliches Herzgewicht von $0,71 \pm 0,084$ g aufwiesen ($p < 0,001$; Abb. 24).

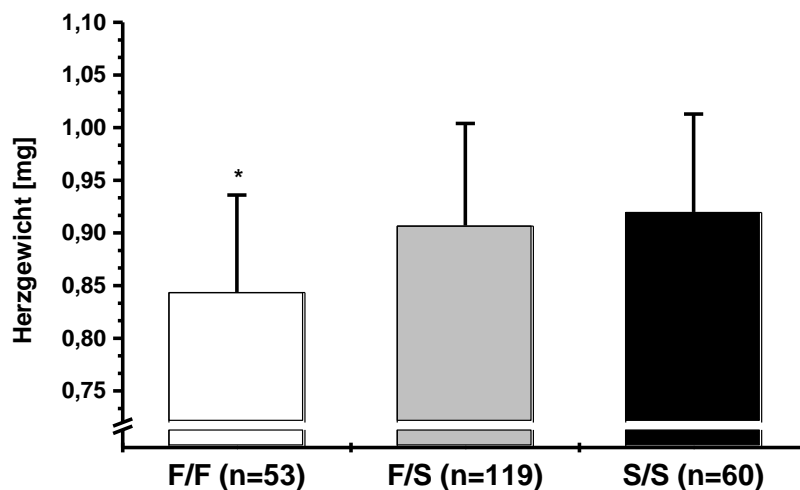


Abb. 24: Vergleich der Mittelwerte des absoluten Herzgewichtes gemäß den Genotypen am Marker *D1Rat287* durch eine Varianzanalyse. (F/F = homozygot F344, F/S = heterozygote, S/S = homozygote SHRSP).

* $p < 0,0001$ bei S/S und F/S vs. F/F

3.2.3.2 Relative Herzgewichte

Durch die Relativierung des Herzgewichtes zum Körpergewicht ergab sich bemerkenswerterweise eine andere Verteilung. Lagen zwei SHRSP-Allele vor, betrug das relative Gesamtherz- bzw. Linksherzgewicht $3,34 \pm 0,40$ mg/g bzw. $2,81 \pm 0,33$ mg/g. Lag nur eines vor, betrug das Gewicht $3,12 \pm 0,29$ mg/g bzw.

2,64 ± 0,28 mg/g. Ein p-Wert < 0,0001 zeigte die Signifikanz des unterschiedlichen Mittelwertes an. Bei den Tieren, die an den Markerpositionen mit den maximalen LOD-Werten kein SHRSP-Allel besaßen, sondern zwei F344-Allele, betrug das relative Gewicht des Herzens bzw. des linken Herzens nur noch 2,93 ± 0,24 mg/g bzw. 2,47 ± 0,23 mg/g, welches eine signifikante Veränderung gegenüber den Genotypen S/S ($p < 10^{-8}$ bzw. $p < 10^{-7}$) und F/S ($p < 0,0001$) bedeutete. Im Gegensatz zu den absoluten Herzgewichten ist der Unterschied zwischen den

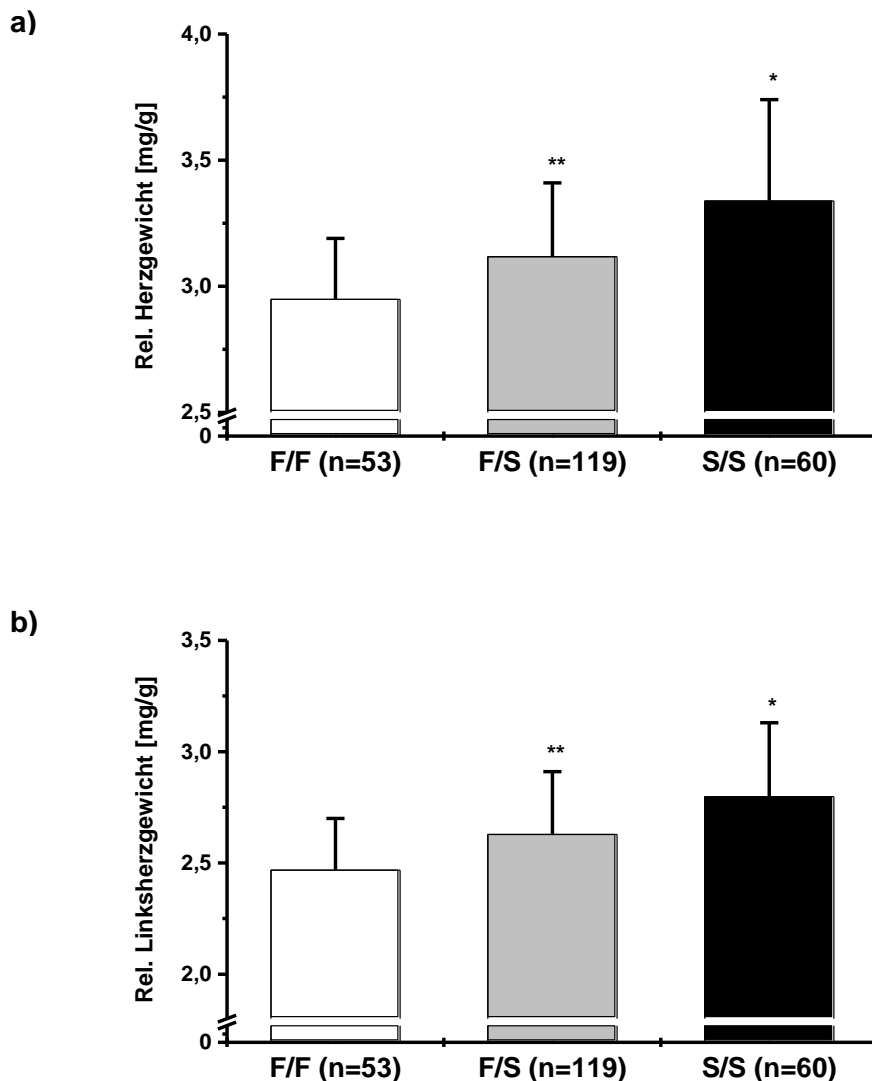


Abb. 25 a), 25 b): Vergleich der Mittelwerte des relativen Herzgewichtes (a) sowie relativen Linksherzgewichtes (b) gemäß den Genotypen am Marker *D1Rat287* durch eine Varianzanalyse. (F/F = homozygot F344, F/S = heterozygote, S/S = homozygote SHRSP).

- a) * $p < 0,0001$ bei S/S vs. F/S, $p < 10^{-8}$ bei S/S vs. F/F, ** $p < 0,0001$ bei F/S vs. F/F
 b) * $p < 0,001$ bei S/S vs. F/S, $p < 10^{-7}$ bei S/S vs. F/F, ** $p < 0,0001$ bei F/S vs. F/F

Tiergruppen, die ein SHRSP-Allel aufweisen gegenüber den mit zwei SHRSP-Allelen bei den relativen Herzgewichten signifikant ($p < 0,05$, Abb. 25 a/b).

3.2.4 QTL für aortale Hypertrophie und Varianzanalyse

Obwohl sich in der selektiven Genotypisierung kein Anhalt für einen QTL für aortale Hypertrophie auf RNO3 bot, konnte als weiteres Ergebnis der erweiterten Genomuntersuchung eine wahrscheinliche Kopplung des relativen Aortengewichtes auf diesem Chromosom vermerkt werden. Hier lag der maximale LOD-Wert bei Marker *D3Rat47* bei 4,19 ($p = 0,0005$). Die Gesamtgröße von RNO3 betrug gemäß dem MapMaker-Programm 108,5 cM. Der QTL besaß eine ungefähre Größe von 40 cM und konnte ungefähr 7,9 % der Gesamtvarianz des Aortengewichtes erklären (Abb.26).

RNO3

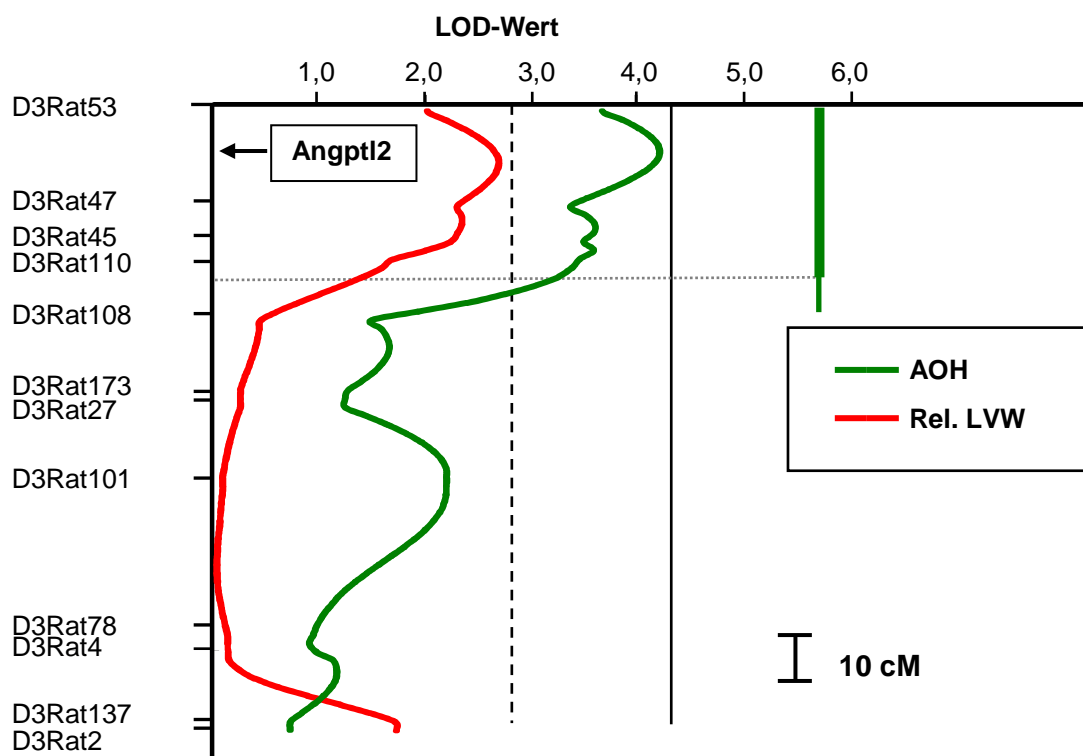


Abb. 26: Genomuntersuchung in der Gesamtpopulation (n=232 Tiere)

LOD-Plot für das relative Aortengewicht (AOH, maximaler LOD-Wert = 4,19) und das relative Linksherzgewicht im Vergleich (Rel. LVW, maximaler LOD-Wert = 2,68) auf RNO3. Die vertikalen Balken geben das 1-LOD-Intervall (dicker Balken) bzw. 2-LOD-Intervall (dünner Balken) an.

Angptl2 = Angiotensin-like-2-precursor-Locus.

Signifikanzgrenzen gelten wie in Abbildung 19 (Seite 53) beschrieben.

Die Varianzanalyse ergab, dass Tiere mit zwei SHRSP-Allelen bzw. einem SHRSP- und einem F344-Allel ein relatives Aortengewicht von ca. $9,30 \pm 1,20$ mg/cm bzw. $8,98 \pm 1,14$ mg/cm besaßen, welches ein nicht signifikanter Unterschied war ($p = 0,07$). Tiere mit zwei F344-Allelen wiesen ein relatives Aortengewicht von ca. $8,51 \pm 0,97$ mg/cm auf (Abb.27). Dies stellte eine signifikante Differenz dar ($p < 0,0001$ S/S vs. F/S bzw. $p = 0,01$ F/S vs. F/F).

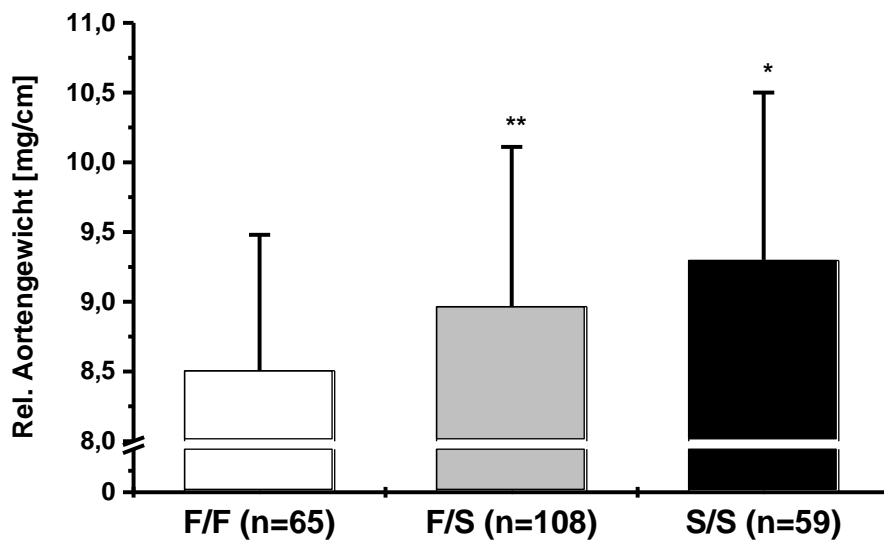


Abb. 27: Vergleich der Mittelwerte des relativen Aortengewichtes den Genotypen am Marker *D3Rat47* durch eine Varianzanalyse. (F/F = homozygot F344, F/S = heterozygote, S/S = homozygote SHRSP).

* $p = 0,07$ bei S/S vs. F/S, $p < 0,0001$ bei S/S vs. F/F, ** $p = 0,001$ bei F/S vs. F/F

3.2.5 LOD-Werte für Blutdruck und Körpergewicht auf RNO1 und 3

Interessant ist auch der Vergleich der LOD-Werte der Herzgewichte und dem relativen Aortengewicht mit den LOD-Werten des Blutdrucks und dem Körpergewicht. Auf RNO1 konnte kein QTL für den Blutdruck gefunden werden. Bei Marker *D1Rat287* errechnete sich ein maximaler LOD-Wert für den Blutdruck von 1,50 ($p = 0,061$). Für das Körpergewicht betrug der LOD-Wert an dieser Position 2,33 ($p = 0,005$). Etwa 20 cM davon entfernt fand sich ein wahrscheinlich signifikanter Bereich bei *D1Rat272* mit einem maximalen LOD-Wert von 3,01 ($p = 0,016$) für den Blutdruck (Abb. 28).

RNO1

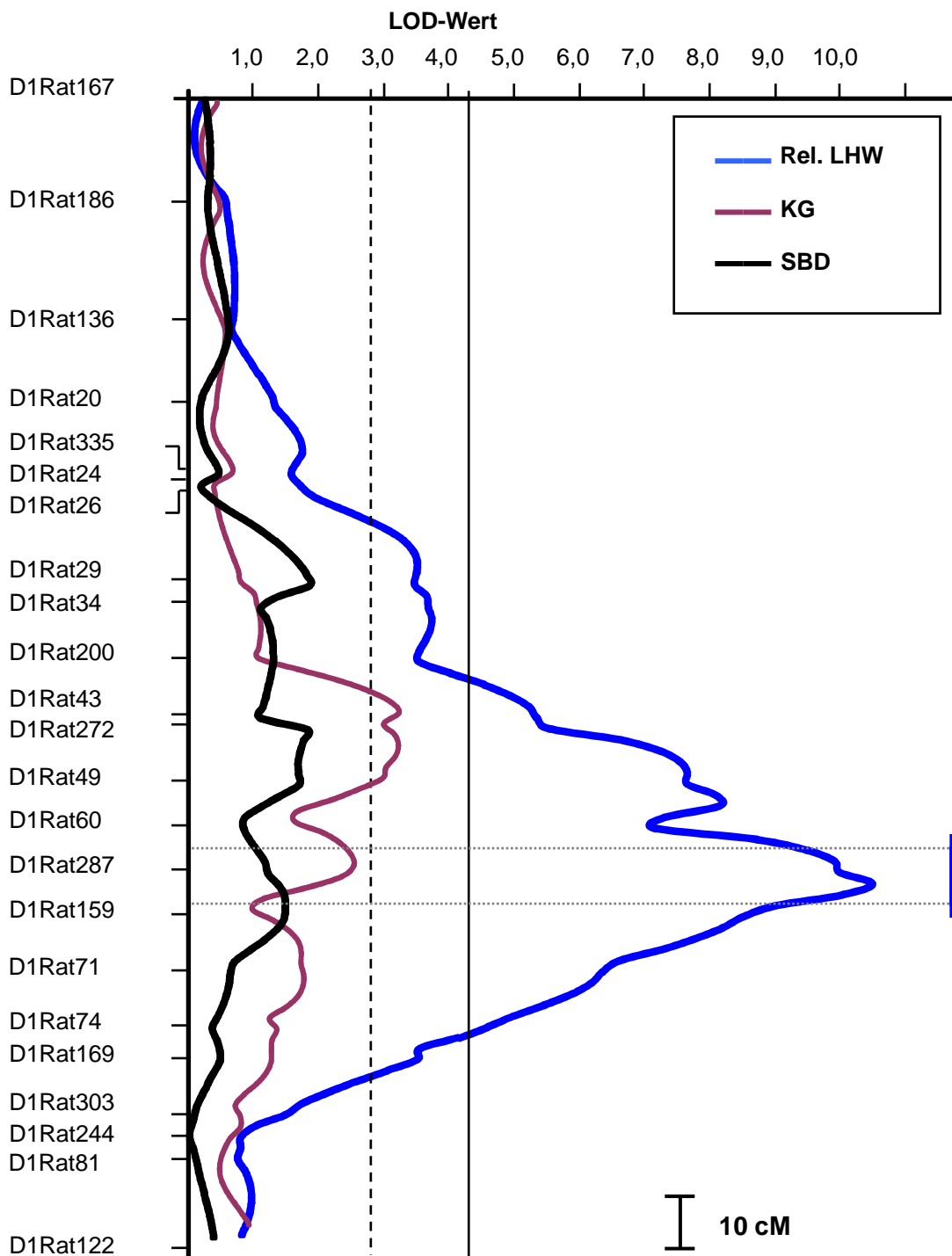


Abb. 28: Genomuntersuchung in der Gesamtpopulation (n=232 Tiere)

LOD-Plot für das relative Linksherzgewicht (Rel. LHW, max. LOD-Wert = 8,38), für das Körpergewicht (KG, max. LOD-Wert = 3,01) sowie den systolischen Blutdruck (SBD, max. LOD-Wert = 1,87) im Vergleich auf RNO1.

Signifikanzgrenzen gelten wie in Abbildung 19 (Seite 53) beschrieben.

In dem Abschnitt auf RNO3, in dem sich der QTL für die aortale Hypertrophie befand, konnten weder für den Blutdruck noch für das Körpergewicht signifikante LOD-Werte ermittelt werden. Der maximale LOD-Wert wurde mit 2,66 ($p = 0,005$) für den Blutdruck und 1,18 ($p = 0,05$) für das Körpergewicht errechnet. Etwa 12 cM entfernt bei *D3Rat45* betrug der höchste LOD-Wert für den Blutdruck 3,2 ($p = 0,0007$) und war damit wahrscheinlich gekoppelt. Während am anderen Ende des Chromosoms ein wahrscheinlich signifikanter QTL mit einem max. LOD-Wert von 4,24 ($p = 0,001$) für das Körpergewicht identifiziert werden konnte, betrug der max. LOD-Wert im Bereich des Aortenhypertrophie-QTL nicht signifikante 1,55 ($p = 0,064$, Abb.29).

RNO3

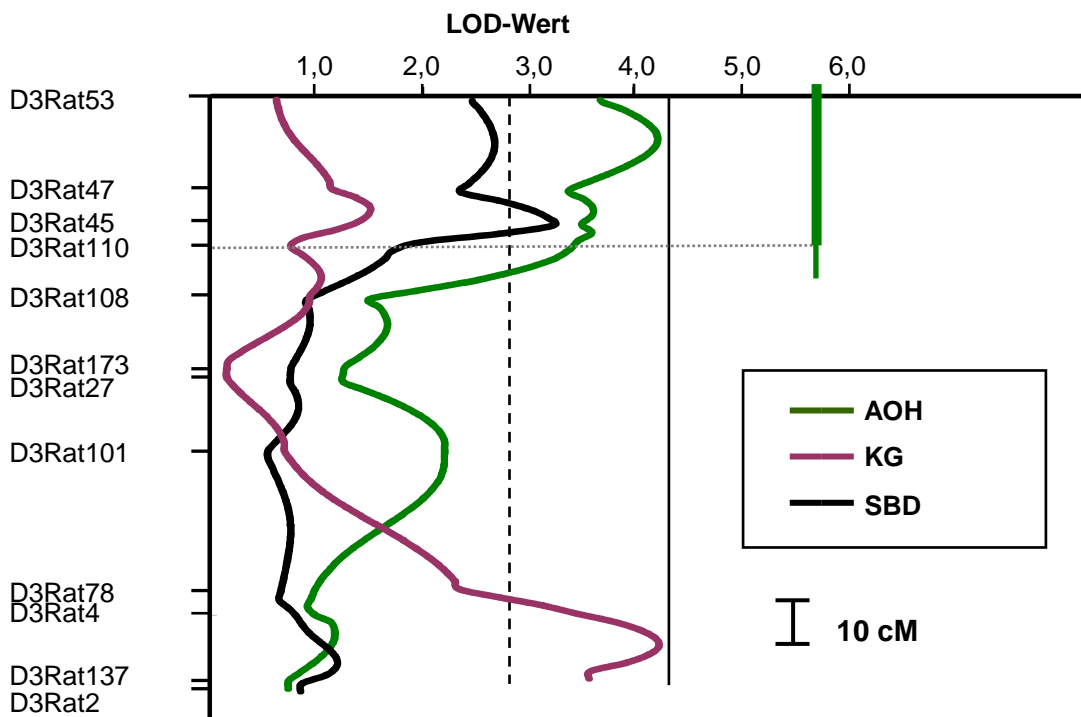


Abb. 29: **Genomuntersuchung in der Gesamtpopulation (n=232 Tiere)**

LOD-Plot für das relative Aortengewicht (AOH, max. LOD-Wert = 4,19) und für das Körpergewicht (KG, max. LOD-Wert = 1,55) sowie den systolischen Blutdruck (SBD, max. LOD-Wert = 3,2) auf RNO3 im Vergleich.

Signifikanzgrenzen gelten wie in Abbildung 19 (Seite 53) beschrieben.

3.2.6 Kandidatengene

Die Anzahl der Kandidatengene kann durch die Verwendung der 1-LOD- und 2-LOD-Intervalle reduziert werden. Im 1-LOD-Intervall um Marker *D1Rat287* befinden sich ungefähr 160 Gene, während im 2-LOD-Intervall etwa 250 Gene liegen.

In der Untersuchung der im 1-LOD-Intervall befindlichen 160 Gene auf Expression und biochemischen Kontext, finden sich als aussichtsreiche Kandidatengene das Cardiotrophin-1-Gen und das Gen für die *Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3*, synonym mit dem p44-Gen. Beide Gene befinden sich in unmittelbarer Nähe zu *D1Rat287* (Abb.23).

Das 1-LOD-Wert-Intervall des QTL für die aortale Hypertrophie auf RNO3 besitzt eine Größe von etwa 30 cM. In unmittelbarer Nähe zu dem höchsten LOD-Wert befindet sich das Gen, welches die Vorstufe von *Angiopoetin-like 2* (Angiopoietin-like 2 precursor) kodiert. (Abb. 26).

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Genomuntersuchung für RNO1. Die fettgedruckten LOD-Werte zeigen signifikante Kopplungen an.

	Locus	Maximaler LOD-Wert	p-Wert	Gesamtvarianz- anteil in %	Phänotypen		
					S/S	F/S	F/F
Herzgewicht	D1Rat287	4,75	$2 \cdot 10^{-5}$	11,26	0,92 ± 0,093 g	0,91 ± 0,097 g	0,84 ± 0,092 g
Rel. Herzgewicht Gipfel 1	D1Rat287	10,51	$1,3 \cdot 10^{-10}$	25,15	3,34 ± 0,40 mg/g	3,12 ± 0,29 mg/g	2,93 ± 0,24 mg/g
Rel. Herzgewicht Gipfel 2	D1Rat60	8,15	$8 \cdot 10^{-8}$	17,56	3,293 ± 0,34 mg/g	3,131 ± 0,34 mg/g	2,951 ± 0,26 mg/g
Linksherzgewicht	D1Rat287	3,96	0,002	9,12	0,77 ± 0,087 g	0,77 ± 0,093 g	0,71 ± 0,084 g
Rel. Linksherz- gewicht / Gipfel 1	D1Rat287	8,38	$1,7 \cdot 10^{-8}$	19,34	2,81 ± 0,33 mg/g	2,64 ± 0,28 mg/g	2,47 ± 0,23 mg/g
Rel. Linksherz- gewicht / Gipfel 2	D1Rat60	6,13	$2 \cdot 10^{-6}$	13,9	2,775 ± 0,30 mg/g	2,636 ± 0,31 mg/g	2,495 ± 0,23 mg/g
Rel. Linksherz- gewicht / Gipfel 3	D1Rat29	4,08	0,0008	5,75	2,761 ± 0,35 mg/g	2,635 ± 0,28 mg/g	2,537 ± 0,28 mg/g
Systolischer Blutdruck	D1Rat287	1,50	0,061	-	193 ± 28 mmHg	187 ± 26 mmHg	181 ± 25 mmHg
Körper- gewicht	D1Rat287	2,33	0,005	-	277,16 ± 27,93 g	291,05 ± 25,14 g	288,02 ± 24,69 g

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Genomuntersuchung für RNO3.

	Locus	Maximaler LOD-Wert	p-Wert	Gesamtvarianz- anteil in %	Phänotypen		
					S/S	F/S	F/F
Aortale Hypertrophie	D3Rat47	4,19	0,0005	7,87	9,30 ± 1,2 mg/cm	8,98 ± 1,1 mg/cm	8,51 ± 0,9 mg/cm
Systolischer Blutdruck	D3Rat47	2,66	0,005	-	194 ± 31 mmHg	187 ± 23 mmHg	179 ± 23 mmHg
Körper- gewicht	D3Rat47	1,55	0,064	-	284,21 ± 27,21 g	291,35 ± 24,71 g	282,47 ± 26,85 g