

## **2 Methoden**

### **2.1 Tierstämme**

Die Versuchstiere wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) und dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin in Übereinstimmung mit den Institutsvorschriften gehalten. Jeweils 4 Tiere wurden in einem Makrolon-Standardkäfig Typ IV (40 x 60 x 25 cm) mit Einstreu aus Weichholzgranulat gehalten. Dabei bestand unter Kunstlicht ein Tag-Nacht-Rhythmus mit einer zwölfstündigen Dunkelphase von 19.00 bis 7.00 Uhr. Die Raumtemperatur betrug 22 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 75 %. Leitungswasser und Futterpellets standen ad libitum zur Verfügung.

#### **2.1.1 Parentaltierstämme**

##### **Munich-Wistar-Frömter-Ratten (MWF)**

Die Munich-Wistar-Frömter-Ratten (MWF-Ratten) wurden 1996 am Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin durch Zucht etabliert (Kreutz *et al.*, 2000). Sie stammen von einer Kolonie MWF/Ztm aus dem Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover ab. Die genetische Homogenität der verwendeten MWF-Kolonie ist durch Genotypisierung bestätigt worden (Schulz *et al.*, 2002).

Beim MWF-Stamm handelt es sich ursprünglich um eine Sublinie des Ivanovas-Wistar-Stammes, der von Frömter und Mitarbeitern auf eine erhöhte Anzahl subkapsulärer Glomeruli hin gezüchtet worden war (Rittinghausen, 1985). Kennzeichnend für diesen Stamm ist daneben eine früh einsetzende Albuminurie mit nachfolgender Nephropathie bei hypertensiven Blutdruckwerten.

##### **Spontan-hypertensive Ratten (SHR)**

Die Zuchtlinie der spontan-hypertensiven Ratte (SHR) stammt ursprünglich von der Kyoto School of Medicine (Kyoto, Japan, Okamoto & Aoki (1963)), wurde dann an den National Institutes of Health (NIH, Bethesda, USA) weitergeführt und 1977 von der Firma M&B A/S (Ry, Dänemark) in Generation F39 übernommen. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere entstammen einer Zucht-

kolonie unserer Arbeitsgruppe. Charakteristisch für diesen Rattenstamm ist die sich spontan entwickelnde arterielle Hypertonie. Adulte Tiere dieses Stammes entwickeln im Lebensalter von 24 bis 32 Wochen keine signifikante Albuminurie oder renale interstitielle Fibrose.

### 2.1.2 MWF-SHR-Rückkreuzung

Für die genetische Kopplungsanalyse wurde eine (MWF  $\times$  SHR) F<sub>1</sub>  $\times$  MWF-Rückkreuzungspopulation gezüchtet (s. Abb. 1.1, Seite 12). Dabei wurden weibliche SHR-Tiere mit männlichen MWF-Tieren verpaart. Die aus dieser Zucht resultierenden weiblichen F<sub>1</sub>-Tiere wurden jeweils mit männlichen MWF-Tieren zurückgekreuzt. Diese Rückkreuzungspopulation umfasste insgesamt 215 männliche Tiere. Da bekannterweise die weiblichen MWF-Ratten eine geringere Ausprägung der Albuminurie zeigen (Fassi *et al.*, 1998; Rapp, 2000) und ein möglichst starker phänotypischer Effekt erwünscht war, wurden nur die männlichen Rückkreuzungstiere untersucht.

## 2.2 Phänotypisierung

### 2.2.1 Systolische Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck wurde an wachen Tieren im Alter von 14 Wochen durch eine computergestützte oszillometrische Messung mit einer nicht-invasiven Tailcuff-Methode (TSE, Bad Homburg) ermittelt (Kreutz *et al.*, 2000). Um die Tiere an diese Methode zu adaptieren, wurden zweitägige Trainingseinheiten durchgeführt. Die hierbei gemessenen Daten wurden nicht aufgezeichnet. Im Anschluss daran erfolgten dann die eigentlichen Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen. An jedem Messtag wurden drei Mal jeweils zwei Messungen durchgeführt, so dass der systolische Blutdruck eines jeden Tieres letztendlich als Mittelwert aus insgesamt 18 Messungen bestimmt wurde.

### 2.2.2 Albuminurie

Die Bestimmung der Albuminurie erfolgte in einem 24 h-Sammelurin jeweils im Alter von 8, 14 und 24 Wochen. Dazu wurden die Tiere in einen Stoffwechselkäfig gesetzt und in den ersten 24 Stunden an die Umgebung gewöhnt. In den dann folgenden 24 Stunden wurde der Urin gesammelt und darin die Albuminkonzentration durch einen sensitiven und rattenspezifischen ELISA unter Verwendung eines rattenspezifischen Antikörpers (ICN Biomedicals, Eschwege) im Institut für Klinische Chemie der Charité – Campus Benjamin Franklin bestimmt (Schulz *et al.*, 2002).

### 2.2.3 Plasmaglukose und Serumkreatinin

Die Bestimmung von Plasmaglukose und Serumkreatinin erfolgte mit Standardmethoden im Institut für Klinische Chemie der Charité – Campus Benjamin Franklin.

### 2.2.4 Präparation und Aufbereitung

#### Präparation

Die Tiere wurden im Alter von 24 Wochen getötet und gewogen. Nach Eröffnung des Abdomens und Sternotomie wurden Herz, Milz und Nieren entnommen und das Gesamtgewicht beider Nieren bestimmt. Die Milz und die rechte Niere wurden in 2-ml-Eppendorfgefäße überführt und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Organe bei -80 °C gelagert.

#### Aufbereitung

Für die histologische Phänotypisierung wurde die linke Niere mit einem Querschnitt in Höhe des Nierenhilus geteilt und anschließend in Dubosq-Brasil-Lösung (1 g Pikrinsäure, 15 ml 100 % Essigsäure, 60 ml 37 % Formaldehyd, 150 ml 80 % Ethanol) 24 Stunden fixiert und weitere 24 Stunden in 80 % Ethanol gelagert. Nach Entwässerung in einem Gewebeeinbettautomaten (Histokinette, British American Optical Co. Ltd., London, UK) in Kassetten (Histosette II, Simport, Beloeil, Canada) mittels aufsteigender Alkoholreihe (2 Stunden 90 % Ethanol, 4 Stunden 100 % Ethanol und 2 Stunden Isopropanol) erfolgte anschließend zur Paraffindurchdringung der Organe eine 6-stündige Lagerung in Intermedium (Vulcite M2, Total Fina, Düsseldorf) und 3 Stunden in einem Gemisch aus Intermedium und Paraffin (Paraplast Plus, Sherwood Medical Co, Norfolk, Nebraska) sowie anschließender Lagerung in reinem Paraffin für 24 Stunden. Dann erfolgte die Paraffineinbettung in einer Einbettvorrichtung (Bavimed, Buseck). Von jedem Rückkreuzungstier wurden jeweils 3 Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) mit jeweils ca. 8 Schnitten angefertigt. Die Schnittdicke betrug 3 µm, geschnitten wurde an einem Rotationsmikrotom (HM 355, Microm, Walldorf). Für die lichtmikroskopischen Auswertungen wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Übersichtsfärbung und die Sirius-Rot-Färbung (Sirius-Rot F3BA, Chroma, Münster) zur Darstellung von Bindegewebe gewählt. Desweiteren wurde die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (Schiffsches Reagenz, Merck, Darmstadt) angewendet. Die Färbungen wurden in einem Färbeautomaten (Robet-Strainer HM760, Microm) nach Angaben der Hersteller der Färbelösungen durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden mittels Gewebekleber (Histacryl-Gewebekleber, Braun, Melsungen) mit einem Deckplättchen (Menzel-Gläser) eingedeckelt.

## 2.2.5 Subkapsuläre Glomeruli und Glomeruli mit Kapselkontakt

### Gesamtzahl subkapsulärer Glomeruli

An jeweils 3 Schnitten pro Tier wurde die Gesamtzahl subkapsulärer Glomeruli pro Schnitt ausgezählt, die keinen direkten Kontakt zur Nierenkapsel hatten. Definitionsgemäß liegt ein subkapsuläres Glomerulum in der subkapsulären Zone, im sogenannten Cortex corticis (Hackbarth, 1983). Die Breite dieser Zone entspricht ungefähr dem Durchmesser eines Glomerulum.

### Glomeruli mit Kapselkontakt

Ebenfalls an jeweils 3 Schnitten pro Tier wurde die Gesamtzahl der Glomeruli pro Schnitt bestimmt, die einen direkten Kontakt mit der Nierenkapsel hatten.

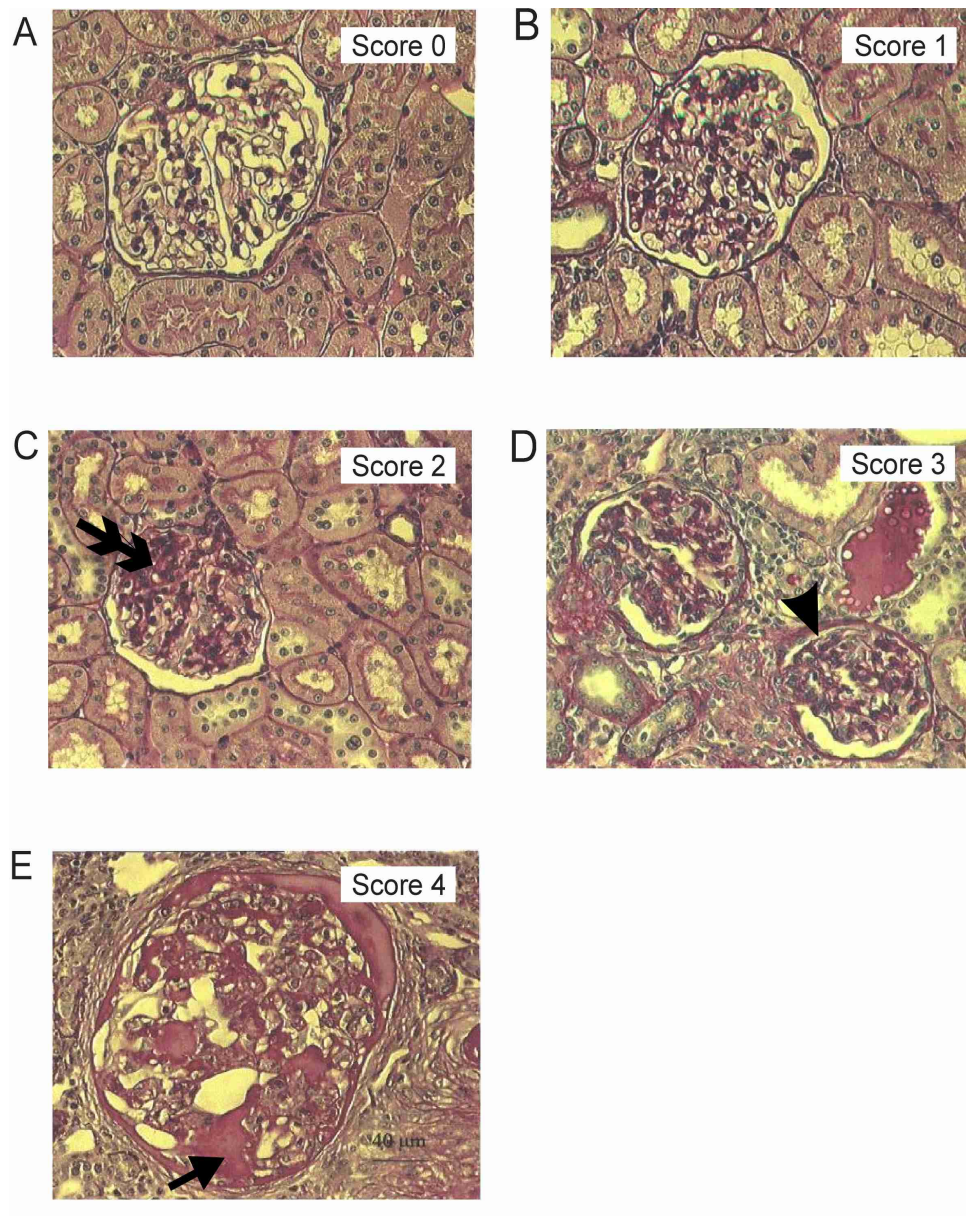
## 2.2.6 Glomeruloskleroseindex

Die Bestimmung des Glomeruloskleroseindex erfolgte mit Hilfe eines semiquantitativen Score-Systems anhand von PAS-gefärbten Paraffinschnitten. Benutzt wurde ein Fotomikroskop (Axio-phot, Carl Zeiss, Oberkochen). Alle Präparate wurden hierbei mit der gleichen Einstellung am Mikroskop gesichtet. Zur Beurteilung wurde der technisch beste Schnitt herangezogen, an dem insgesamt 40 superfizielle und juxtamedulläre Glomeruli in 200facher Vergrößerung nach einem Score von 0 bis 4 bewertet wurden (Raij *et al.*, 1984). Bewertet wurde der Grad der Schädigung des Glomerulums, wobei ein Score von 0 keine Schädigungen am Glomerulum und ein Score von 4 eine maximale Schädigung des Glomerulums bedeutet. Die genaue Einteilung zeigt Tab. 2.1.

**Tabelle 2.1:** Glomerulosklerose-Score nach Raij *et al.*, 1984

Score	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Veränderungen (%)	0	≤12	12–25	25–37	37–50	50–62	62–75	75–90	>90

In Abb. 2.1 werden typische Glomeruli, die anhand des Score-Systems bewertet wurden, dargestellt. Als Schädigungsparameter wurden Ablagerungen von PAS-positivem Material im Mesangium und um Kapillarschlingen herum (Pfeil) sowie eine Hyperzellularität (Doppelpfeil), eine Verdickung der Bowmanschen Kapsel (Pfeilspitze) und eine Vergrößerung des Glomerulums herangezogen.



**Abbildung 2.1:** Glomeruloskleroseindex: Dargestellt sind jeweils typische Bilder von Glomeruli, die anhand von PAS-gefärbten Paraffinschnitten in ein semiquantitatives Score-System von 0 bis 4 eingestuft wurden. Die Bedeutung der verschiedenen Pfeile ist im Haupttext beschrieben.

### 2.2.7 Renale interstitielle Fibrose

Die Bewertung der interstitiellen Fibrose erfolgte computergestützt anhand der Sirius-Rot gefärbten Schnitte. In der Sirius-Rot-Färbung stellt sich Kollagen rot dar. Sie kann das Ausmaß eines fibrotischen Umbaus des Parenchyms und somit der renalen interstitiellen Fibrose veranschaulichen. Für die computergestützte Auswertung wurde ein Bereich zwischen Nierencortex und innerem Nierenmark gewählt. In diesem Bereich befinden sich die proximalen Tubuli, Glomeruli sind hier nicht vorhanden. Es wurden im Durchlicht 10 Bildausschnitte dieser Region bei 100-facher Vergrößerung mittels des Fotomikroskops und einem angeschlossenen Videosystem (Farb-Videokamera mit drei 1/2"-CCD-Chips, externes Kamerasteuerungsgerät, Frame Grabber; alles von AVT-Horn, Aalen) aufgenommen und im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert.

Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm Scion Image 1.62a (Scion Co., Sandringham, Auckland). Ziel war, an jedem Bild den prozentualen Anteil des Sirius-Rot gefärbten Kollagens und somit des fibrotisch veränderten Interstitiums zu bestimmen. Für die Messung dieser Bildflächen wurde die Bildanalyseeinheit zunächst mit einem Objektmikrometer auf metrische Einheiten kalibriert. Auf der Grundlage von Pixel-Intensitäten eines aus der Originalaufnahme generierten Graustufenbildes wandelte die Software das Bild in schwarze und weiße Areale um. Die schwarzen Bereiche entsprachen dem Sirius-Rot gefärbten, fibrotischem Gewebe. Der Schwellenwert für das Anzeigen der fibrotischen Areale wurde zunächst automatisch festgelegt und in einem zweiten Schritt im Vergleich zum Originalbild angepasst. Die renale interstitielle Fibrose wurde dann berechnet als prozentualer Anteil der schwarzen Bereiche am Gesamtbild.

### 2.3 Genotypisierung und Intervallkartierung

Im Anschluss an die Phänotypisierung erfolgte eine genomweite Kopplungsanalyse und QTL-Kartierung. Dazu wurden DNA-Marker (*simple sequence length polymorphisms*, SSLP) verwendet, die zwischen den Parentalstämmen MWF und SHR polymorph waren, d. h. an einem bestimmten Abschnitt des Rattengenoms jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Cytosin-Adenin-Repeats aufwiesen. Die Marker wurden mit radioaktiv markierten Primern in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Aufgrund des Längenpolymorphismus zeigte sich nach Autoradiographie bei homozygoten Tieren eine Bande, bei heterozygoten Tieren zwei. So konnte die Herkunft des Genabschnitts dem jeweiligen Rattenstamm (MWF oder SHR) zugeordnet werden.

Mit Hilfe statistischer Verfahren können dann Genorte, die mit bestimmten Phänotypen assoziiert sind, als sogenannte quantitative trait loci (QTL) identifiziert werden.

### 2.3.1 Mikrosatellitenmarker

In der Rückkreuzungspopulation wurde eine genomweite Analyse aller Autosomen sowie der X-Chromosomen mit polymorphen Markern durchgeführt. Das Intervall zwischen den Markern betrug jeweils ca. 10 cM. Die Informationen sowie Primersequenzen wurden der „Rat Genome Database“ des Medical College of Wisconsin (<http://www.rgd.mcw.edu/>) sowie des Massachusetts Institute of Technology (<http://www-genome.wi.mit.edu/rat/public/>) entnommen.

### 2.3.2 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurde ca. 50 mg Milzgewebe verwendet, das in 700 µl Lysepuffer (10 ml 1M Tris-Puffer, 10 ml 2 M NaCl, 40 ml 0,5 M EDTA, 120 ml Aqua bidest., 20 ml 10 % SDS) in einem 2-ml-Eppendorfgefäß aufgenommen wurde. Anschließend wurden 40 µl Proteinase K (10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Die Röhren wurden überkopf rotierend in einem Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen) für 24-72 Stunden bei 55 °C inkubiert. Es erfolgte zunächst die Zugabe von 300 µl einer 6 M Natriumchloridlösung und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 14000 Upm und 4 °C in einer Kühlzentrifuge (5402, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) zentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Gefäß dekantiert. Die Lösung wurde mit 1 ml Isopropanol versetzt und vorsichtig gemischt, es folgte eine 30–50-minütige Inkubation auf Eis. Die in diesem Schritt ausgefällte DNA wurde 15 min bei 14000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der verbleibende Überstand über dem DNA-Pellet wurde dekantiert, die präzipitierte DNA in 500 µl 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bei Raumtemperatur ca. 10 min getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 200 µl Aqua bidest. aufgenommen.

Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde durch Messung der Extinktion der 1:20 mit Aqua bidest. verdünnten Probe im Photometer (UV-1202, Shimadzu, Berlin) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt; der Reinheitsgrad der DNA-Präparation wurde durch den Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm ( $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ ) ermittelt, der bei einer ausreichend reinen Präparation >1,8 betragen sollte.

Alle DNA-Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 2.3.3 Anlegen von DNA-Vorrats- und Arbeitsplatten

Um ein rationelles Arbeiten mit vielen DNA-Proben und unterschiedlichen Markern zu gewährleisten, wurden DNA-Vorrats- und Arbeitsplatten in 96-Vertiefungs-Mikrotiterplatten (Abgene,

Hamburg) angelegt. Die Anlage der Vorratsplatte erfolgte durch Pipettieren der DNA-Proben in einem festgelegten Arbeitsschema, wobei jeweils 200 µl der zu untersuchenden DNA-Lösungen in einer Konzentration von 10 ng/µl in 0,2-ml-Eppendorfgefäße überführt wurden. Die Anordnung der Proben auf der Vorratsplatte entsprach der späteren Verteilung auf der Arbeitsplatte. Aus der Vorratsplatte wurden jeweils 5 µl DNA-Lösung in die Arbeitsplatte überführt. Die Arbeitsplatten wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.3.4 Radioaktive Markierung der Primer

Die T4-Polynukleotidkinase katalysiert die Bindung von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP an das 5'-Ende dephosphorylierter DNA. Für die Markierung des 5'-Endes der Primer wurden 0,04 µl 10x Kinasepuffer, 0,0583 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, wässrige Lsg., Amersham, Buckinghamshire, England) und 0,017 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl, Promega, Mannheim) gemischt (Kinase-Mastermix). Von diesem Ansatz wurden pro zu testenden Primer (alle von Life Technologies, TIB, Eggenstein) 0,11 µl entnommen und mit 0,22 µl 6 µM Sense-Primer gemischt und bei 37 °C für 45 Minuten und anschließend bei 65 °C für 10 Minuten im PCR-Thermocycler inkubiert. Die so phosphorylierten Primer wurden bei 4 °C gelagert.

### 2.3.5 Polymerasekettenreaktion

50 ng genomische DNA wurden mit 1,3 µl 10 × PCR-Puffer, 0,78 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM Endkonzentration), 1,1 µl 2,5 mM dNTP (0,2 mM Endkonzentration), 0,22 µl 6 µM Antisense-Primer, dem kinasierten Sense-Primer, 0,07 µl Taq-Polymerase (0,4 U/µl Endkonzentration) und Aqua bi-dest. zu einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Die zuvor angelegten DNA-Arbeitsplatten dienten als Reaktionsgefäße, die vor Beginn der PCR nach Zusammenfügen aller Reagenzien mit einer Schweißfolie (Genetix, Montpellier, Frankreich) verschlossen wurde.

In einem PCR-Thermocycler wurde nach einer initialen Denaturierung bei 92 °C für 2 min eine PCR mit insgesamt 30 Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus beinhaltete 15 s bei 92 °C, 60 s bei der jeweiligen Primer-spezifischen Annealing-Temperatur und 60 s bei 72 °C. Abschließend folgten 7 Minuten bei 72 °C, die Lagerung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C.

### 2.3.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Für die Herstellung des 0,4 mm dicken Gels wurden zwei 35 × 45 cm große Glasplatten zunächst mit Ethanol gereinigt. Eine Scheibe wurde zur besseren Haftung mit Aceton, die andere mit wasserabweisender



## 2 Methoden

Acrylease behandelt. Beide Vorgänge ermöglichten ein Ablösen von der einen und das Haften des Gels an der anderen Glasplatte bei nachfolgenden Arbeitsschritten. Auf eine der Glasplatten wurden seitlich zwei 0,4 mm dicke Kunststoffstreifen und die zweite Glasplatte darüber angebracht, so dass zwischen beiden Platten ein schmaler Raum für das Gel entstand. Beide Glasplatten wurden seitlich mit Klammern fixiert und an drei Seiten mit Klebeband abgedichtet.

Für die Herstellung des Polyacrylamid (PAA)-Gels wurden 70 ml PAA-Lösung (31,5 g 8 M Harnstoff, 7,0 ml 90 mM Tris-Borat, 10,5 ml 40 % Acrylamid, 27,0 ml Aqua bidest.) mit 400 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS) sowie 40 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt und vermischt. Das noch flüssige Gel wurde sofort luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Um am oberen offenen Rand eine glatte Geloberfläche zu erhalten, wurde ein Kunststoffkamm zunächst mit der glatten Seite zum Gel zeigend eingesetzt. Das Polymerisieren des Gels erfolgte bei Raumtemperatur über 1,5–2 Stunden. Anschließend wurden Klammern und Klebeband entfernt und der Kunststoffkamm gedreht, so dass nun die Zinken 1–2 mm in das Gel hineinragten und somit Taschen für das Auftragen der Proben entstanden. Die Gelplatten wurden in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Apparatur mit 1 × TBE-Puffer gefüllt.

Vor dem Beladen der Gele wurden 10 µl der PCR-Amplifikate mit jeweils 10 µl 2 × Formamid-Gelladepuffer (100 mg Bromphenolblau, 100 mg Xylen Cyanol FF, 10 ml Formamid, 200 µl 0,5 M Di-Natrium-EDTA-Dihydrat) versetzt und anschließend bei 92 °C für 5 Minuten denaturiert. Von jeder Probe wurden 3 µl in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese gestartet. Die Auftrennung erfolgte bei 70 Watt über 2-3 Stunden.

Nach der Elektrophorese wurden die Gelplatten aus der Kammer entfernt und die mit Acrylease beschichtete Glasplatte vom Gel abgehoben. Das Gel wurde auf ein zugeschnittenes Gel-Blotting-Papier aufgezogen und anschließend luftblasen- und faltenfrei in eine dünne Plastikfolie eingeschlagen. Die Gele wurden in eine Röntgenkassette mit einem Biomax Film transferiert, der nach einer Expositionszeit von ca. 18 Stunden bei -20 °C entwickelt wurde.

Von den entwickelten Röntgenfilmen wurden die DNA-Banden abgelesen und die Genotypen für jeden Marker bestimmt.

### 2.4 Statistische Analyse

Um die Einflüsse der Tierstämme auf die Phänotypen beurteilen zu können, erfolgte die statistische Auswertung über eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 11.5. Die Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, eine Signifikanzschwelle wurde bei  $p < 0,05$  definiert.

## 2 Methoden

Die Korrelationsanalysen wurden bei normalverteilten Populationen nach Pearson und bei nicht normal verteilten Populationen nach Spearman durchgeführt und das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  angegeben. Die Phänotyp-Phänotyp-Korrelationen wurden durch lineare Regresionsanalysen mit dem Programm SigmaPlot 8.0 untersucht. Die Signifikanzschwelle wurde definiert bei einem  $p < 0,05$ .

Für die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation der QTL und die Bestimmung des Lod-Scores wurden die Computerprogramme MAPMAKER/EXP und MAPMAKER/QTL 3.0b verwendet. Es lag eine signifikante Kopplung in der Rückkreuzungspopulation bei einem Lod-Score  $\geq 3,3$  ( $p < 0,0001$ ) und eine wahrscheinliche Kopplung bei einem Lod-Score  $\geq 1,9$  ( $p < 0,0034$ ) vor (Lander *et al.*, 1987; Lander & Botstein, 1989).

### 2.5 Sonstige Materialien

Aceton, Ethanol, Isopropanol, Formaldehyd wurden von der Firma J.T. Baker, Griesheim, bezogen; Natriumchlorid von der Firma Merck; das PCR-Testkit von Promega, Mannheim; HistoClear von Shandon, Frankfurt a. M.; alle übrigen Chemikalien von Sigma.