

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Ein von der Firma Novartis zur Verfügung gestellter Versuchsaufbau mit 42 Tieren (siehe Tabelle 1) bildete die Grundlage unserer Studie. Dabei wurden die NGF- und NT-3-Konzentrationen in sieben ZNS-Regionen (Hippocampus, Bulbus olfactorius, Cerebellum, Striatum, frontaler Cortex, occipitaler Cortex, Septum), im Nervus ischiadicus und im Serum untersucht. Hierbei handelt es sich um eines der im internationalen Vergleich elaboriertesten transgenen Tiermodelle der AD, eine Generation der APP-23-Linie transgener Mäuse, die im Detail bereits mehrfach beschrieben wurden (Hellweg et al. 1989). Zusammengefasst wird die die schwedische Doppelmutation an den Positionen 670/671 (KM→NL) tragende menschliche APP751-cDNA eingesetzt, die mit Hilfe eines murinen Thy-1 Promotorelements in B6D2-Mäuse eingeschleust wird. In dieser Arbeit wurden je vierzehn hemizygoter APP23-Tiere jungen (4,9 Monate), mittleren (10,5 Monate) und hohen Alters (20,2 Monate) weiblichen Geschlechts eingesetzt, die mit gleichaltrigen Wildtypen als Kontrolle verglichen wurden. Die aufwendige Präparation erfolgte durch Prof. U. Otten in Basel. Die ZNS-Regionen wurden sofort bei -80°C eingefroren und zur Neurotrophinquantifizierung nach Berlin in das Neurochemische Labor von Prof. Dr. R. Hellweg transportiert. Zusätzlich erfolgte bei der Firma Novartis in Basel eine Amyloidquantifizierung mittels Western-Blot-Bestimmung durch Frau Dorothee Abramowski und Mitarbeiter. Die behördliche Genehmigung für die Tierversuche wurde am 11.11.1999 unter dem Aktenzeichen Nr. 1094 vom Kantonalen Veterinäramt in Basel erteilt.

Probe	Tier-Nr.	Geburtsdatum	Tötungsdatum	Alter (Monate)	Genotyp
1	28.408	04.09.99	01.02.00	4,9	wildtyp
2	28.414	04.09.99	01.02.00	4,9	hemizygot
3	28.409	04.09.99	01.02.00	4,9	wildtyp
4	28.421	04.09.99	01.02.00	4,9	hemizygot
5	28.410	04.09.99	01.02.00	4,9	wildtyp
6	28.424	04.09.99	01.02.00	4,9	hemizygot
7	28.411	04.09.99	01.02.00	4,9	wildtyp
8	28.432	04.09.99	01.02.00	4,9	hemizygot
9	28.412	04.09.99	01.02.00	4,9	wildtyp
10	28.426	04.09.99	01.02.00	4,9	hemizygot
11	28.415	04.09.99	01.02.00	4,9	wildtyp
12	28.427	04.09.99	01.02.00	4,9	hemizygot
13	28.416	04.09.99	01.02.00	4,9	wildtyp
14	28.407	03.09.99	01.02.00	4,9	hemizygot
15	23.739	25.03.99	08.02.00	10,5	wildtyp
16	23.747	25.03.99	08.02.00	10,5	hemizygot
17	23.737	25.03.99	08.02.00	10,5	hemizygot
18	23.746	25.03.99	08.02.00	10,5	hemizygot
19	23.736	25.03.99	08.02.00	10,5	wildtyp
20	23.740	25.03.99	08.02.00	10,5	hemizygot
21	23.735	25.03.99	08.02.00	10,5	wildtyp
22	23.738	25.03.99	08.02.00	10,5	wildtyp
23	23.733	25.03.99	08.02.00	10,5	wildtyp
24	23.734	25.03.99	08.02.00	10,5	hemizygot
25	23.715	24.03.99	08.02.00	10,5	wildtyp
26	23.717	24.03.99	08.02.00	10,5	hemizygot
27	23.714	24.03.99	08.02.00	10,5	wildtyp
28	23.713	24.03.99	08.02.00	10,5	hemizygot
29	11.002	24.06.98	21.02.00	20,4	wildtyp
30	11.060	25.06.98	21.02.00	20,3	hemizygot
31	11.003	24.06.98	21.02.00	20,4	wildtyp
32	11.267	29.06.98	21.02.00	20,2	hemizygot
33	11.059	25.06.98	21.02.00	20,3	wildtyp
34	11.270	29.06.98	21.02.00	20,2	hemizygot
35	11.268	29.06.98	21.02.00	20,2	wildtyp
36	11.275	29.06.98	21.02.00	20,2	hemizygot
37	11.269	29.06.98	21.02.00	20,2	wildtyp
38	11.278	29.06.98	21.02.00	20,2	hemizygot
39	11.276	29.06.98	21.02.00	20,2	wildtyp
40	11.295	29.06.98	21.02.00	20,2	hemizygot
41	11.277	29.06.98	21.02.00	20,2	wildtyp
42	11.296	29.06.98	21.02.00	20,2	hemizygot

**Tabelle 1:** Versuchstiere (alle Tiere waren weiblich und trugen die Genmutation APP23. Tier 23.737 war ehemals wildtyp, Tier 23.738 war ehemals hemizygot.)

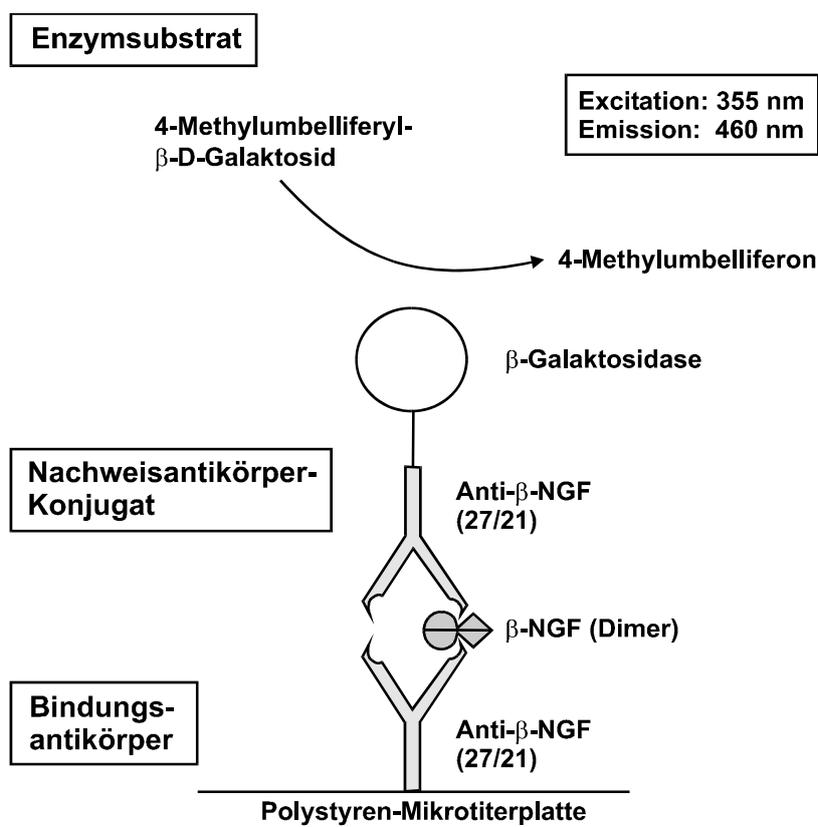
### **3.2 Homogenisation der Gewebeproben**

Die verschiedenen Gewebeproben der Mäusegehirne wurden nach Auftauen in 1,2 ml Homogenisierpuffer (N. ischiadicus in 1 ml Homogenisierpuffer) eingewogen. Anschließend wurde im Verhältnis 1:100 eine Proteaseninhibitormischung (Hellweg et al. 1989) hinzugegeben. In einem wassergekühlten Ultraschall-Zerkleinerer (Titan-Becherresonator Sonifier B 12, Branson Sonic Power Co.) wurden die Gewebe 5-10 Minuten mit voller Kraft beschallt, bis keine Gewebestücke mehr sichtbar waren. Diese Aufbereitungsmethode erhöht bei kleinen Geweben die NGF-Ausbeute (Korsching und Thoenen 1987). Die Homogenate wurden anschließend wieder bei -70°C eingefroren.

### **3.3 Prinzip der ELISA-Methode**

Die Antigenbestimmung erfolgte über einen fluorimetrischen, im „Sandwich-Prinzip“ durchgeführten ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay). Bei diesem zweiseitigen ELISA wird zunächst die feste Oberfläche der Mikrotiterplatten im Überschuss mit einem Antikörper beschichtet, der gegen das zu messende Antigen gerichtet ist. Im nächsten Schritt werden die Gewebeproben dazugegeben, um das darin enthaltene Antigen an den Antikörper zu binden. Anschließend wird ein weiterer spezifisch gegen das Antigen gerichteter Antikörper hinzugegeben, der kovalent an ein Enzym gebunden ist. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung eines geeigneten Substrats zu einem fluoreszierenden Produkt, das dann mit Hilfe fluorimetrischer Messung quantitativ bestimmt werden kann. Durch gleichzeitige Messung der Emission bekannter Antigen-Konzentrationen und einer daraus erstellten Standardkurve kann dann die Antigen-Konzentration bestimmt werden.

Bedingung für diese „Sandwich-Technik“, bei der das Antigen von beiden Seiten mit einem Antikörper besetzt sein soll, ist, dass die zu untersuchende Substanz mehr als eine Bindungsstelle für die Antikörper bereithält. Beim hier vorgestellten Versuch ist diese Voraussetzung dadurch erfüllt, dass NGF und NT-3 dimere Proteine sind und die Bindungsstellen für den ersten und zweiten Antikörper sich nicht sterisch behindern (Korsching und Thoenen 1983; 1987).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines ELISA. Prinzip des verbesserten „two-site“ NGF-ELISA, wie er für die dargestellte Untersuchung eingesetzt wurde. Schwarze Mikrotiterplatten werden mit dem ersten monoklonalen anti-NGF-Antikörper 27/21 beschichtet. Durch den Bindungsantikörper immobilisierter NGF wird durch den zweiten monoklonalen anti-NGF-Antikörper 27/21 nachgewiesen, der kovalent an das Enzym β-D-Galaktosidase gekoppelt ist. Die Intensität des fluorigenen enzymatischen Reaktionsproduktes 4-Methylumbelliferon ist direkt proportional der immobilisierten NGF-Menge (nach Hellweg et al. 1989, 1994).

Die Konzentrationen von NGF und NT-3 in den Gewebeproben wurden in getrennt voneinander ablaufenden, für das jeweilige Neurotrophin optimierten Assays gemessen. Der Ablauf des ELISA zur Bestimmung der Konzentrationen von NGF und NT-3 ist vom Prinzip her gleich, weist im Detail jedoch einige Unterschiede auf. Zum einen wurden teilweise andere Antikörper und Reagenzien benutzt, zum anderen waren die Inkubationszeiten zwischen den einzelnen Arbeitsschritten unterschiedlich lang.

### 3.4 Geräte und Chemikalien

#### 3.4.1 Geräte

- Sonicator (Branson W 250 Titan-Becher-Resonator, Branson Sonic Power Company),
- Fluorometer Fluoroscan II (Flow Laboratories, Merlin Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostika, Bornheim, Deutschland),
- Kühlzentrifuge (Cryofuge 6-6, Heraeus-Christ)
- Waschautomat (Accuwash 2, Microplate Prozessor, Tri-Continent Scientific Inc., Grass Valley, Kalifornien, USA)
- Schwarze 96-Lochmikrotiterplatten (MicroFluor-B-Plates, Dynartech Laboratories Inc., Alexandria, Virginia, USA)
- 1,5-ml-Eppendorfgeläße, ausklaviert (Bestellnummer: 3180)
- 4-ml-Polyesterol-Reagenzröhrchen (Greiner Labortechnik)

#### 3.4.2 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden allgemeine Laborchemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, und Reagenzien von der Firma Sigma Chemical Co., Deisenhofen, bezogen. Puffer wurden grundsätzlich in Reinst-Wasser (Millipore-QUF Plus-Anlage) erstellt.

##### **Antikörper:**

**NGF:** Anti- $\beta$ -NGF-Antikörper (Klon 27/21) (Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 1008218), Anti- $\beta$ -NGF-Antikörper (Klon 27/21)- $\beta$ -Galaktosidase-Konjugat (Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 1008234), Maus- $\beta$ -NGF-Antikörper (Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 1530631), Maus-IgG<sub>1</sub>-Antikörper aus MOPC 21 (Sigma, Bestell-Nr. M 9269), Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktosid (Sigma, Bestell-Nr M 9269) (MUG)

**NT-3:** Anti-NT-3-monoklonaler Antikörper (Anti-NT-3-mAb) (Promega), Anti-NT-3-polyklonaler Antikörper (Anti-NT-3-pAb) (Promega), Chicken-IgG-Antikörper, Goat Mouse IgG- $\beta$ -Galaktosidase-Konjugat (Goat Mouse IgG BGAL)

##### **Puffer:**

Coating-Puffer (0,05 M Carbonatpuffer pH 9,6): Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (MG 105,99) 5,3 g/l; NaHCO<sub>3</sub> (MG 84,01) 4,2 g/l; Mischung beider Lösungen (0,6:1), so dass pH 9,6 erzielt wird; 0,1 % Azid hinzugefügt

Substrat-Puffer NT-3 (pH 8,7): 0,1 M Tris-HCl ; 1 mM MgCl<sub>2</sub>

Substrat-Puffer NGF (pH 7,3): 0,1 M Natriumphosphat; 1mM MgCl<sub>2</sub>

Standard-/Conjugatpuffer (S/C-Puffer): 0,05 M Tris-HCl (pH 7,0); 0,2 M NaCl; 0,1% Nonidet P-40; 1% bovines Serumalbumin (BSA); 0,05% NaN<sub>3</sub> (Azid)

Waschpuffer: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 M NaCl; 0,75% Gelatine (Typ A, 60 bloom, Sigma); 0,1% Nonidet P-40; 0,05% NaN<sub>3</sub> (Azid)

Homogenisierpuffer: 0,1 M Tris-HCl und 0,4 M NaCl (auf pH 7,0 ); 0,1 % NaN<sub>3</sub> (Acid).

Proteaseninhibitor (PI): 4000 KU Aprotinin-ML; 20 mM Benzetoniumchlorid; 200 mM Benzamidin; 400 mM EDTA (PI wird kurz vor dessen Gebrauch im Verhältnis 1:100 zum Homogenisierpuffer hinzugegeben)

Äquilibrierpuffer: 0,2 % Nonidet P-40 (Sigma, Best.-Nr.: N6507).

Stopp-Puffer: 0,15 M-Glyzin, pH 10,5 mit NaOH-Plätzchen einstellen

### **3.5 Durchführung des ELISA**

Zur Bestimmung von NGF-Konzentrationen in Geweben wurde ein Enzymimmunoassay durchgeführt (Hellweg et al. 1989; Hellweg et al. 1996b; Hellweg et al. 1998a), der von Hellweg et al. modifiziert wurde (Korsching und Thoenen 1987; Rohrer et al. 1988; Hellweg et al. 1989; Lorigados et al. 1992). Die NT-3-Konzentrationen wurde mit einem von uns auf Basis des Kits zur NT-3-Quantifizierung der Firma Promega (NT-3 E<sub>max</sub><sup>TM</sup> ImmunoAssay System) optimierten Assay bestimmt. Für jeden Assay musste mit sechs Proben definierter NGF-/NT-3-Konzentrationen eine Eichkurve erstellt werden, der sog. „Standard“. Anhand dieser Vergleichskurve wurde eine Funktion errechnet, die aus den fluorimetrisch erhobenen Messwerten die NGF/NT-3-Konzentration der Gewebeproben errechnete. Bei jeder einzelnen Gewebeprobe wurde zur Vermeidung von Messfehlern die Wiederfindungsrate („Recovery“) bestimmt. Es handelt sich hierbei um ein Maß für NGF-/NT-3-Verluste während des Assays, beispielsweise durch Bindung von NGF-/NT-3-Proteinen an noch vorhandene NGF-/NT-3-Rezeptoren oder Serumproteine im Gewebehomogenat. Hierzu wird eine bekannte Menge von exogenem NGF/NT-3 dem Homogenat zugesetzt und deren Wiederfindungsrate bei der Auswertung der anderen Proben relativierend einberechnet. Zusätzlich wurde die

unspezifische Bindung bestimmt, d.h. es wurde der NGF-/NT-3-Anteil quantifiziert, der sich aufgrund unspezifischen Bindungsverhaltens bindet. Beispielsweise können sich wegen ihrer basischen Struktur NGF-/NT-3-Proteine an die Polystyrolbeschichtung der Mikrotiterplatten binden. Zur Bestimmung dieser unspezifischen Bindung wurde in den dafür vorgesehenen Probenlöchern die Polystyroloberfläche statt mit dem 27/21-anti-NGF-Antikörper mit einem für die NGF-Bindung irrelevanten IgG-Antikörper beschichtet.

Um darüber hinaus das „Hintergrundrauschen“ in den Probenlöchern („Wells“) der Mikrotiterplatten zu berücksichtigen, wurden ein „spezifischer“ (mit Antikörpern gegen NGF/NT-3) und ein auf Ig-Antikörper „unspezifischer“ Leerwert („Blank“) bestimmt. Hierbei wurde jeweils nur Homogenisierungspuffer ohne NGF/NT-3 als Probe verwendet, so dass das gemessene Signal nicht durch NGF/NT-3 verursacht sein konnte. Somit konnte dieses Hintergrundsignal in der Auswertung von den Werten der NGF/NT-3 enthaltenden Proben abgezogen werden.

Als spezifischer Antikörper für NGF wurde der sog. 27/21-Antikörper benutzt, ein hochaffiner monoklonaler Maus-Antikörper, der sowohl Geflügel- und Nager- als auch human-NGF mit sehr hoher Spezifität bindet (Korsching und Thoenen 1983; 1987; Hellweg et al. 1989; Hock 1991; Hellweg et al. 1992; Hartung 1993; Hellweg et al. 1996a).

Für NT-3 wurde monoklonaler NT-3 Antikörper der Firma Promega benutzt, der NT-3 mit sehr hoher Spezifität bindet.

Bei allen Assays wurden neben dem Standard somit für jedes Gewebe die spezifische Bindung, die unspezifische Bindung, die Wiederfindungsrate („Recovery“), der spezifische und der unspezifische Leerwert („Blank“) bestimmt. Zum Ausgleich der vorhandenen Streuung wurden für alle Werte vier Wells gemessen (Quadruplikate). Die „Blanks“ wurden sechsfach bestimmt.

Das genaue experimentelle Protokoll dieses gut etablierten ELISA ist für NGF auch in der Literatur mehrfach und ausführlich beschrieben (Korsching und Thoenen 1987; Hellweg et al. 1989).

### 3.5.1 NGF-Assay

Am ersten Tag fand die Antikörper-Beschichtung und Inkubation des Homogenates statt.

Zu Beginn jedes Assays wurde zur Immobilisation der Antikörper auf der festen Phase der Mikrotiterplatten („Coating“) je 50 µl der Anti-NGF-27/21-Antikörper (spezifische Bindung, 1:800 verdünnt) bzw. der IgG<sub>1</sub>-Antikörper (unspezifische Bindung, 1:2000 verdünnt) in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend inkubierten die Platten für zwei Stunden bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Um ungebundenes Material zu beseitigen, wurde anschließend dreimal mit je 200 µl Waschpuffer/Well mit Hilfe eines Waschautomaten gewaschen. Die eingefrorenen Homogenate der Gewebeproben wurden aufgetaut und abpipettierte 400 µl für 10 Minuten bei 6000 U/min und 10°C zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu trennen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von exogen zugefügtem NGF wurde eine definierte Menge (250 pg) NGF in einem zweiten Gefäß je 200 µl jedes Homogenats zugesetzt und mitzentrifugiert. Diese Recovery-Proben wurden im weiteren Verlauf analog zu den Proben zur Bestimmung der endogenen NGF-Konzentrationen behandelt. Nach dem Zentrifugieren wurden 220 µl des Überstandes der Homogenate und 110 µl der Recovery-Proben abpipettiert und im Verhältnis 1:1 mit Äquibrierpuffer vermischt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde in jedem Assay ein NGF-Standard mit Konzentrationen von 1 ng bis 0,24 pg NGF/ml angesetzt. Anschließend wurden jeweils 50 µl des mit Äquibrierpuffer versetzten Überstandes sowie die Standards nach einem festen Schema in die einzelnen Wells der Mikrotiterplatten gegeben, nachdem zuvor der Waschpuffer aus den Wells entfernt worden war. Die darauf folgende Inkubation bei 4°C und Dunkelheit dauerte 15-20 Stunden.

Am zweiten Tag (Konjugatinkubation und Stopp der Enzymreaktion) wurde nach dreimaligem Waschen 50 µl des Anti-β-NGF-Galaktosidase-Konjugates in jedes Well gegeben. Nach zwei bis drei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurde erneut dreimal mit Waschpuffer und anschließend zweimal mit jeweils 150 µl Substratpuffer pro Probe gewaschen. Nun wurde das für das Enzym spezifische in Substratpuffer gelöste Substrat (0,2 mM Methyl-Umbelliferyl-β-D-Galaktosid) hinzugegeben, d.h. dem Antikörper-NGF-Antikörper-Enzym-Komplex wurde ein spezifisches Substrat

angeboten. Dieses Gemisch wurde für 15-20 Stunden bei 4° C in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit inkubiert.

Nach Angleichung an die Raumtemperatur beendete die Zugabe des Stopp-Puffers (200 µl/well) am dritten Tag des Assays die Enzymreaktion. Da das Fluoreszenzoptimum der Messreaktion im alkalischen Bereich liegt, wurde der Stopp-Puffer auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt (Hellweg et al. 1989; Hellweg und Hartung 1990).

### **3.5.2 NT-3-Assay**

Der NT-3-Assay lief nach einem dem NGF-Assay ähnlichen Prinzip ab (s.o.).

Am ersten Tag fand das so genannte „Coating“ statt. Dazu wurde der spezifische NT-3-Antikörper (Anti-NT-3-pAb) mit dem Coating-Puffer auf 1:1000 verdünnt, der unspezifische Chicken-IgG-Antikörper auf 1:80000. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten nach dem vom NGF-Assay bekannten Schema mit je 50 µl/Well gefüllt. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatten im Kühlschrank.

Am zweiten Tag wurden die Proben und der Standard aufgetragen.

Dazu wurden die Homogenate aufgetaut und zur Bestimmung der Wiederfindungsrate je 200 µl mit 10 µl einer Recovery-Lösung in Eppendorfgläsern vermischt. Außerdem wurden je 400 µl der Homogenate in weitere Eppendorfgläser gefüllt und die Lösungen für 25 Minuten bei 6000 U/min und 10°C zentrifugiert. 220 µl Überstand der Homogenate und 110 µl der Recovery-Lösungen wurden vorsichtig abpipettiert und mit der gleichen Menge an Äquilibrierpuffer vermischt.

Unterdessen wurden die Mikrotiterplatten aus dem Kühlschrank genommen, um sie auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nach viermaligem Waschen der Mikrotiterplatten mit dem Waschautomaten wurden je 50 µl der Homogenate bzw. Recovery-Lösungen nach dem bekannten Schema in die Wells gefüllt, außerdem wurden die „Blanks“ mit 50 µl S/C-Puffer gefüllt und Standards mit NT-3-Konzentrationen von 600 pg/ml bis 0,82 pg/ml zur Bestimmung der Eichkurve aufgetragen.

Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 4 Stunden, nach viermaligen Waschen wurden die Mikrotiterplatten mit 50 µl/Well des zweiten Antikörpers (NT-3-mAb, 1:6000 verdünnt) beschichtet und zur Inkubation über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

Am dritten Tag erfolgte die Zugabe des 3. Antikörpers (Goat Mouse IgG BGAL) und des Methylumbelliferyl-β-D-Galaktosid (MUG).

Dazu wurden die Mikrotiterplatten aus dem Kühlschrank genommen und auf Raumtemperatur gebracht, anschließend vier Mal gewaschen und mit dem Goat Mouse IgG BGAL (1:10000 verdünnt) mit 50 µl je Well beimpft. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden die Mikrotiterplatten fünf Mal gewaschen, zur Millieuangleichung wurde direkt im Anschluss zwei Mal mit dem NT-3-Substratpuffer mit je 150 µl/Well gewaschen. Nach dem Ausschütteln der Mikrotiterplatten erfolgte die Zugabe des für jeden Assay frisch angesetzten MUG (50 µl/Well).

Über Nacht erfolgte wieder eine Inkubation im Kühlschrank, bei der die Umsetzung des MUG an der Goat Mouse IgG BGAL zu 4-Methylumbelliferon erfolgte.

Am vierten Tag wurde die Reaktion mit Hilfe des Stopp-Puffers unterbrochen und die Konzentrationen des 4-Methylumbelliferon in den einzelnen Wells fluorimetrisch bestimmt.

Abschließend erfolgte die Auswertung am Computer analog zu den NGF-Assays.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Mit dem nichtparametrischen, d.h. verteilungsfreien (nicht eine Normalverteilung voraussetzenden) Kruskal-Wallis Test wurde überprüft, ob sich die Verteilungen der NGF-Konzentrationen zwischen den einzelnen Geweben signifikant unterscheiden, wobei Signifikanz bei  $p < ,05$  angenommen wurde. Diese Analyse wurde genotyp- und altersspezifisch durchgeführt. Unterschiede in der NGF-Konzentration zwischen den Altersgruppen wurden ebenfalls mit dem Kruskal-Wallis Test auf statistische Signifikanz überprüft. Der Test wurde gewebe- und genotypspezifisch durchgeführt. Im paarweisen Vergleich zwischen den Altersgruppen wurde noch der  $\alpha$ -Fehler für multiples Testen korrigiert, d.h. es fand eine Bonferroni-Korrektur statt, bei der Ergebnisse nur dann signifikant auf dem 5% Niveau waren, sofern sie eine unkorrigierte Irrtumswahrscheinlichkeit

von  $p < ,017$  aufwiesen. Unterschiede in der NGF-Konzentration zwischen den Genotypen wurden mit dem ebenfalls nichtparametrischen Wilcoxon Two-Sample Test auf statistische Signifikanz überprüft. Der Test wurde gewebe- und altersspezifisch durchgeführt. Schließlich wurde noch für die Gesamtstichprobe ( $n=336$ ) überprüft, ob die NGF-Konzentrationen als normalverteilt gelten können.

Mit dem nichtparametrischen, d.h. verteilungsfreien (nicht eine Normalverteilung voraussetzenden) Wilcoxon-k-Sample Test wurde überprüft, ob sich die Verteilungen der NT-3-Konzentrationen zwischen den Geweben (ohne Serum) signifikant unterscheiden. Diese Analyse wurde ebenfalls genotyp- und altersspezifisch durchgeführt. Unterschiede in der NT-3-Konzentration zwischen den Altersgruppen wurden ebenfalls mit dem Wilcoxon k-Sample Test auf statistische Signifikanz überprüft. Der Test wurde ebenfalls gewebe- und genotypspezifisch durchgeführt. Im paarweisen Vergleich zwischen den Altersgruppen wurde ebenfalls noch der  $\alpha$ -Fehler für multiples Testen korrigiert, d.h. es fand eine Bonferroni-Korrektur statt, bei der Ergebnisse nur dann signifikant auf dem 5% Niveau waren, sofern sie eine unkorrigierte Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < ,017$  aufwiesen. Unterschiede in der NT-3-Konzentration zwischen den Genotypen wurden mit dem ebenfalls nichtparametrischen Wilcoxon Two-Sample Test auf statistische Signifikanz überprüft. Der Test wurde ebenfalls gewebe- und altersspezifisch durchgeführt. Schließlich wurde noch für die Gesamtstichprobe ( $n=280$ ) überprüft, ob die NT-3-Konzentrationen als normalverteilt gelten können.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Daten als Mediane angegeben. Die NGF-/NT-3-Konzentrationen wurden zur Vermeidung einer Inter-Assay-Varianz im einzelnen Immunoassay auf die jeweilige Kontrollgruppe prozentnormiert (Hellweg et al. 1989; Hellweg et al. 1996b; Hellweg et al. 1998a).