

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Im Folgenden werden die für die zellkulturellen, biochemischen und analytischen Versuche verwendeten Substanzen mit Angabe der Herstellerfirma und derer Herkunft aufgeführt.

HEPES (Sigma, Steinheim, Deutschland), EGTA (SIGMA St. Louis, USA)

Glukose (Sigma, Steinheim, Deutschland), Pentobarbital Natrium (Synopharm, Barsbüttel, Deutschland), Liquemin N 25 000 (Roche, Deutschland), 0.9% NaCl (Braun, Melsungen, Deutschland), Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt, Deutschland), PBS Dulbecco's (GIBCO, UK), Methanol ( J.T.Baker, Deventer, USA), Wallac Optisafe 'HiSafe'3 (PerkinElmer, Turku, Finnland), Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland,) Glycerol (SIGMA, Steinheim, Deutschland),

KCL, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, Deutschland),

DMEM -Dulbecco's mod eagle medium- (GIBCO, UK), EARLE'S MEM (PAA, Linz, Austria),

Non- essential Amino Acids (Gibco BRL, Paisley, Scotland),FCS (GIBCO, UK),

1,2-dipalmitoyl-L-3-phosphatidyl-N-[methyl-<sup>3</sup>H]cholin, 1,46 nCi/μg Lipid (Amersham, Freiburg, Deutschland),

PC ( Phosphatidylcholin), PG ( Phosphatidylglycerol), Cholesterol (Sigma, Steinheim, Deutschland),

Rat purified Immunglobulin (ICN), Elastase (Roche, Schweiz), Trypanblau, Kristallviolett, Papanicolaou-Farbstoff (Serva Feinbiochemica GmbH & CO, Deutschland)

An technischen Geräten fanden zur Aufreinigung, Trennung, Zellkultur und Analytik sowie zur Datenverarbeitung folgende Geräte Verwendung:

WALLAC 1410 Liquid Scintillation Counter

Zentrifuge MR 18 22 (Jouan)

Waage Analytic AC 120 S (Sartorius , Göttingen, Deutschland)

Photometer UV-160A (SHIMADZU)

Bandeline Sonopuls HD 60 (Bandeline, Berlin Deutschland)

Tischzentrifuge (Köttermann Labortechnik, Deutschland)

Inkubator Heraeus T 10 A, (Heraeus instruments, Deutschland) (+co2)

Inkubator (WTB Binder, Deutschland)

Software: Excel, ANOVA, Microsoft Word

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Anzucht von *C. pneumoniae* in HEP-2-Zellkultur**

*Chlamydomphila pneumoniae* als obligat intrazellulärer Keim kann aufgrund seiner Stoffwechselbesonderheiten nicht auf herkömmlichen Nährmedien wachsen, daher bedient man sich zum Anlegen eines Stockes geeigneter Zell-Linien. Wir setzten HEP-2-Zellen ein [70].

Verwendete Medien:

Anzuchtmedium für HEP-2-Zellen

500 ml Minimal Essential Medium

50 ml FCS

200 ml Glutamin

5 ml Non Essential Amino Acids

500 µl Gentamycin

1 ml Amphotericin B

Zusätze steril filtriert zum Medium zugefüllt und durchmischt.

Infektionsmedium:

500 ml Minimal Essential Medium

200 ml Glutamin

5 ml Non Essential Medium

500µl Gentamycin

1 ml Amphotericin B

500 µl Cyclohexamid

Zusätze steril filtriert zum Medium zugefüllt und durchmischt.

### **Anzucht und Verarbeitung der HEP-2-Zellen**

Die HEP-2-Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und für 2 Tage im Brutschrank bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> belassen. Nach mikroskopischer Kontrolle auf Homogenität des Zellrasens erfolgte die Ablösung der Zellen mit 4 ml Trypsin. Bei sichtbarem Ablösen der Zellen wurde die Zellsuspension mit 7 ml Anzuchtmedium gespült und in ein 50 ml blue-cap-Röhrchen überführt. Nach kurzer Zentrifugation bei 4000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 25 ml Anzuchtmedium resuspendiert und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Dem erneuten Verwerfen des Überstandes und der wiederholten Resuspension in einer dem Aufteilungsschlüssel entsprechenden Menge Aufzuchtmedium schloss sich die Aufteilung der Zellen in die Zellkulturflaschen nach dem Schlüssel 1x T75 und 6x T25 an. Das an 5 ml / T25 Zellkulturflasche fehlende Volumen wurde nachpipettiert. Parallel beimpfte 6-Loch-Platten mit eingelegten sterilen Deckgläschen dienten der mikroskopischen Kontrolle auf mögliche Kontamination [64].

## **Infektion der HEP-2-Zellen**

Von den, wie oben beschriebenen, aufgezogenen HEP-2-Zellen wurde das Anzuchtmedium steril abgesaugt, und durch Infektionssuspension, bestehend aus Infektionsmedium und errechneten Anteilen von Lysatsuspension infizierter HEP-2-Zellen, ersetzt. Die infizierten Zellen, Monolayer mit aufgeschäumten Zellen, wurden mittels Schaber vom Boden der T25-Zellkulturflaschen entfernt. Die abgesaugte Suspension wurde mit den Suspensionen der sechs weiteren T25-Zellkulturflaschen vereinigt und nach Zugabe von ca 15 ml Glasbeats für 90 sec gevortext. Das gewonnene Lysat wurde mit vorgewärmten Infektionsmedium aufgefüllt. Nicht infizierte HEP-2-Zellen der T25 Zellkulturflasche wurden mit je 3 ml der infektiösen Suspension versetzt und für 40 min bei 3500 rpm zentrifugiert, anschließend für 3-4 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zeitgleich erfolgte eine Kontrollinfektion der HEP-2-Zellen auf den Deckgläschen der 6-Loch-Platten. Nicht aufgebrauchte Zell-Lysate der gewonnenen infizierten HEP-2-Zellen wurden aliquotiert und mit gleichen Volumina Sucrose-Phosphat-Glutamat-Puffer mit 10% FCS und bei 80°C bis zur Aufreinigung eingefroren.

## **Isolierung der Elementarkörper**

Die Aufreinigung der infizierten Zellkulturen erfolgte im Anschluss an die mechanische Zerstörung der Kulturzellen mittels Glaspearls. Die Überreste der Kulturzellen wurden durch Zentrifugation über 10 min bei 170 x g abgetrennt, eine Konzentration der Chlamydien Elementarkörper wurde durch Zentrifugation des Überstandes über 1 h bei 30.000 x g erreicht. Nach Aufreinigung der Elementarkörperchen über einem Urografen-Sukrose-Gradienten, zweimaliger Waschung in 0,1 mol/l PBS (pH 7,2) mit jeweiliger Zentrifugation (30.000 x g, für

1 Stunde) und Resuspension des Zentrifugates wurde der Titer in den Laboren der Medizinischen Klinik m.S. Infektiologie, Campus Virchow Klinikum, mittels der modifizierten Methode nach Maass bestimmt [71]. Die *C. pneumoniae* Konzentration wurde als inclusion forming units (IFU/ml) angegeben.

### **2.2.2 Isolierung von Typ-II-Pneumozyten aus Rattenlungen**

Die Isolierung der bei den Versuchen verwendeten Typ-II-Pneumozyten erfolgte aus Lungen von männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 120 - 140 Gramm nach einer modifizierten Präparationsmethodik nach Dobbs et al [72].

### **Reagenzien für die Lungenpräparation und Zellisolierung**

“With Puffer”:

300 ml 0,9% NaCl (steril)

12ml KCl (0,15 M)

3 ml CaCl<sub>2</sub> (0,11 M)

3 ml MgSO<sub>4</sub> (0,15 M)

9 ml Na<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> (0,1 M) (pH=7,4 bei 22° C, bestehend aus 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

18 ml Hepes (0,1 M) (pH=7,4 bei 22° C)

345 mg Glukose wurden kurz vor Beginn der Präparation dem With-Puffer zugemischt und auf 37°C erwärmt.

“Without- Puffer”:

200 ml 0,9% NaCl (steril)

8 ml KCl (0,15 M)

6 ml Na<sub>3</sub> PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (0,1 M) (pH=7,4 bei 22° C)

12 ml Hepes (0,1M) (pH=7,4 bei 22°C)

Vor Präparationsbeginn wurden 226 mg Glukose und 17,2 mg EGTA dem Without- Puffer zugegeben, der anschließend auf 37°C erwärmt wurde.

Weitere Reagenzien:

4 mg DNase

11,4 mg Elastase gelöst in 40 ml With- Puffer

80 mg Pentobarbital gelöst in 2 ml Liquemin N25000

8 ml FCS

2 x 400 µl Kristallviolett

Trypanblau

Zellkulturmedium DMEM

1% Glutamin

0,1% Gentamycin

IgG Platten:

Die IgG-Platten (25 mg IgG wurden in 50 ml 50 mM Tris-HCL, pH 9,5, gelöst und in Plastik-Petrischalen verteilt) werden genutzt, um die isolierten Zellen aus Rattenlungen von zum Beispiel IgG-bindenden Makrophagen, zu trennen. Typ-II-Pneumozyten besitzen keine IgG-Rezeptoren. Somit gelingt eine Trennung zwischen Typ-II-Pneumozyten und IgG bindenden Fremdzellen.

## **Präparation der Rattenlungen**

Je Ratte erfolgte eine s.c. Injektion von 40 mg Pentobarbital, gelöst in 1 ml Liquemin N 25000. Nach völliger Areflexie, mehrmals geprüft über Schmerzreize an den Füßen, wurden die Peritonealhöhle eröffnet, die Aorta abdominalis durchtrennt und das Zwerchfell eröffnet. Nach Freipräparation der Trachea, wurde selbige mit einer Kanüle kanuliert und mit chirurgischem Nahtmaterial gesichert.

Der Eröffnung des Thorax folgte die Freipräparation des Herzens und der Lunge, die Entfernung des linken Vorhofes und das Einführen einer Kanüle in den rechten Ventrikel. Die anschließende Spülung der Lunge wurde mit 30-50 ml With- Puffer bei einem Druck von ca. 20 cm H<sub>2</sub>O durchgeführt. Während der Spülungen wurde die Lunge mit einer 10 ml Einwegspritze über die Trachealkanüle acht- bis zehnmal leicht aufgebläht. Nachdem die Lunge blutfrei war, wurde die Lunge aus dem Thorax herauspräpariert und in 37°C vorgewärmte Kochsalzlösung verbracht.

## **Zellgewinnung aus Rattenlungen**

Die isolierten Lungen wurden achtmal über eine Trachealkanüle mit je 6 ml Without- Puffer gespült. Die dabei gewonnene Lavage wurde zur Abtrennung des Zellmaterials für 10 min bei 900 rpm (4° C) zentrifugiert und für weitere Experimente bei -80° C eingefroren. Der sich anschließenden zweimaligen Spülung der Lunge mit With- Puffer (2x je 6 ml) folgte die Auffüllung der Lunge mit 7 ml Elastaselösung über einen auf der Trachealkanüle installierten Dreiweghahn für 12 min bei 37° C. Dieser Elastase "Verdau" wiederholte sich anschließend noch zweimal für je 10 min. Die vom Herz befreite Lunge wurde in eine DNase-Lösung (4 mg in 4 ml With- Puffer) in kleinstmögliche Stücke geschnitten. Die DNase sollte bewirken, dass die durch Zell-Lyse anfallende DNA zersetzt wird. Die entstandene Suspension wurde im Anschluss in einen Plastik-Erlenmeyerkolben, der mit 50 ml With- Puffer und 4 ml FCS gefüllt

war, pipettiert und für 2 min in einem auf 37° C vorgewärmten Wasserbad kräftig geschüttelt. FCS stoppt die Elastasewirkung. Die nachfolgende Filtration erfolgte in mit With- Puffer angefeuchteten Filtern verschiedener, absteigender Porengröße (2 Lagen Mull, 4 Lagen Mull, 150 µM, 15 µM, 7 µM). Die gewonnene Zellsuspension wurde für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde unter einer sterilen Werkbank in 10 ml DMEM resuspendiert und auf zwei IgG-Platten aufgebracht, um durch Differentialadhärenz der Zellen eine gute Reinheit der Typ II Zellen zu erreichen. Die Inkubation erfolgte für ca 30-50 min im Brutschrank (bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>). Die von den IgG-Platten abgenommene Zellsuspension (Überstand) wurde in 50 ml blue-cap-Röhrchen überführt. Eine Entnahme von Zellsuspension erfolgte zur Zellzählung, Vitalitätsbestimmung und Reinheitsbestimmung. Die verbliebene Zellsuspension wurde bei 900 rpm (4° C) für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet je nach Versuchsaufbau in entsprechende Kulturmedien verteilt.

### **Zellzählung, Vitalitäts- und Reinheitsbestimmung an isolierten Zellen aus Lungen**

Nach Abnahme von Zellsuspension und Zugabe von Kristallviolett bzw. Trypanblau wurden mittels Zählkammer die Zellzahl und Vitalität bestimmt. Die Vitalität der Zellen betrug  $98 \pm 0.1\%$  (n=20). Die Reinheitsbestimmung der Zellen erfolgte nach einer Papanicolaou-Färbung und betrug  $87 \pm 0.2\%$  Typ II Zellen (n=20).

### **2.2.3 Kultur der Typ II Pneumozyten**

Alle beschriebenen Experimente wurden mit den wie oben beschrieben isolierten Typ-II-Pneumozyten durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$ /Loch in je 1 ml DMEM/6% FCS auf 6-Loch- Gewebekulturplatten aufgebracht und für 3 Stunden bei 37°C in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte eine dreimalige Waschung der



adhärenten Zellen mit je 1 ml MEM ohne FCS. 1 ml MEM je Ansatz wurden im Anschluss auf den Zellen belassen. An diesen Ansätzen erfolgten die Surfactant-Aufnahme- und -Resekretionsversuche.

#### **2.2.4 Inkubation der Typ-II-Pneumozyten mit *C. pneumoniae***

Zu  $2 \times 10^6$  Zellen/Ansatz in je 1 ml MEM wurde eine *C. pneumoniae* (strain TW 183) Konzentration von  $4 \times 10^6$  IFU gegeben. Die mit *C. pneumoniae* versetzten Zellen bzw. parallel dazu mitgeführte Kontrollenzellen ohne *C. pneumoniae* wurden für 3, 6 bzw. 12 Stunden in einem CO<sub>2</sub>-freien Brutschrank bei 37° C inkubiert.

Einige Versuche erfolgten an mit Paclitaxel (5 µM) und mit Phalloidin (10 µg/ml) präinkubierten Typ II Zellen für 30 min bei 37°C mit anschließender *C. pneumoniae* Inkubation für 3 Stunden bei 37°C.

#### **2.2.5 Durchführung der Surfactantlipidaufnahme- und -Resekretionsversuche**

##### **Herstellung von Liposomen**

Kleine unilamelläre Liposomen wurden nach einer modifizierten Methode von Chander et al. [73] mithilfe einer Bandeline-Ultraschallsonde hergestellt. Die Liposomen enthielten je 5,5 mg DPPC, 1 mg PG, 2,5 mg PC und 1 mg Cholesterol entsprechend eines volumenprozentualen Verhältnisses von 55% DPPC, 10% PG, 25% PC und 10% Cholesterol. Zu den in 400 µl Chloroform aufgenommenen und gemischten Bestandteilen kamen 14,6 µl 1,2-dipalmitoyl-L-3-phosphatidyl-N-[methyl-<sup>3</sup>H]cholin ([<sup>3</sup>H]DPPC; 1,46 nCi/µg Lipid).

Diese Lösungsansätze wurden im Speed Vac komplett unter Zuhilfenahme des Gaseinlasses getrocknet. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml 10 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4) aufgenommen. Bei 50° C wurde die Lipidlösung mit der Bandelin Ultraschallsonde für 3 min bei 40% Power geschallt. Die Liposomen wurden bei 3° C gelagert und vor der Verarbeitung auf Zimmertemperatur erwärmt und für 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert.

### **SP-A Gewinnung**

Sämtliches in den Experimenten verwendetes SP-A wurde nach der Methode von Hawgood et al. [74] durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe gewonnen. Verwendet wurden dazu schlachtfrische unversehrte Schafslungen brandenburgischer Schäfereien. Das SP-A wurde aus Lavagen isoliert und aufgereinigt und anschließend in Aliquots zu je 50 µl bei -80° C eingefroren. Die Qualitätskontrolle des gewonnenen Proteins erfolgte über Funktionstest, wie die SP-A vermittelte Lipidaufnahme und die Hemmung der Lipidsekretion. Zusätzlich wurde die Reinheit des SP-A in der SDS- Elektrophorese mit anschließendem Westernblot überprüft und der Anteil von Endotoxin im SP-A identifiziert. Der Endotoxinanteil im SP-A betrug 0,002 pg/µg SP-A.

### **Proteinbestimmung**

Sämtliche quantitativen Proteinbestimmungen wurden nach der Methode nach Bradford [75] in einem geeigneten Messbereich von 1-20 µg Protein mit einem Photometer bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Die Angabe des Proteingehalts erfolgte in der Einheit µg.

## Aufnahmeversuche

Type II Zellen (wie unter 2.2.3 beschrieben) wurden mit und ohne *C. pneumoniae* für 3, 6 und 12 Stunden (wie unter 2.2.4. beschrieben) inkubiert. Desweiteren erfolgte an mit Paclitaxel präinkubierten Typ II Zellen die Inkubation mit und ohne *C. pneumoniae* für 3 Stunden. Danach wurden die Zellen je 3 x mit je 2 ml MEM ohne FCS gewaschen. In jeden Ansatz wurden 1 ml MEM/0,2% BSA, 150 µg [<sup>3</sup>H] DPPC-markierte Liposomen und 10 µg SPA bzw. kein SP-A pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37°C erfolgte die Abnahme des Überstandes, der mittels Zentrifugation (10 min bei 900 U/ min bei 4°C) zellfrei für weitere Analysen bei -80°C eingefroren wurde.

Die adhärenen Zellen wurden nun dreimal mit je 1 ml DMEM mit Zusätzen von 5% BSA und 10 mM EGTA für jeweils 5 min auf Eis gewaschen. Danach folgte eine dreimalige Waschung mit je 1 ml DMEM ohne Zusätze, um das anhaftende Surfactantlipid und SP-A an den Zellmembranen zu entfernen.

Anschließend wurden die adhärenen Zellen mit 300 µl/well Aqua destillata mit einem Plastikspatel abgeschabt und nach mehrmaliger Resuspension in Eppendorfgefäße überführt. Jede Zellsuspension wurde mit der Bandelin-Ultraschallsonde für 20 sec bei 40% Power geschallt. Aus jedem Ansatz erfolgte die Entnahme von 2 x 10 µl Zellsuspension zur Proteinbestimmung. Die verbliebene Zellsuspension von 280 µl wurde in ein Szintillationsröhrchen pipettiert und mit je 300 µl Methanol und 4 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt. Nach einer Stunde Aufbewahrung bei Zimmertemperatur erfolgte die Messung der Radioaktivität im Liquid-Scintillation-Counter. Die counts (dpm) wurden ins Verhältnis zu den gemessenen Proteinwerten gesetzt und als nmol DPPC/10<sup>6</sup> Zellen berechnet.

## Resekretionsversuche

Drei Stunden adhärenente Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 3 und 12 Stunden mit *C. pneumoniae* bzw. nur in MEM inkubiert oder mit Paclitaxel für 30 min präinkubiert und danach für 3 Stunden mit und ohne *C. pneumoniae* inkubiert. Nach Waschung erfolgte die Zugabe von 1 ml MEM/0,1% BSA, 150  $\mu\text{g}$  [ $^3\text{H}$ ] DPPC-markierten Liposomen und 10  $\mu\text{g}$  SP-A bzw. es wurde kein SP-A zugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank wie unter Aufnahmeversuche beschrieben. Die Zellen wurden danach dreimal mit je 1 ml DMEM mit Zusätzen von 5% BSA und 10 mM EGTA für jeweils 5 min auf Eis gewaschen. Danach folgte eine dreimalige Waschung mit je 1 ml DMEM ohne Zusätze. Diese Zellansätze wurden jeweils geteilt.

Zur Bestimmung der Menge des aufgenommenen Surfactantlipid wurde eine Hälfte der gewaschenen Zellansätze (Kontrollen sowie mit *C. pneumoniae* inkubierte Zellen) abgenommen und mittels Liquid-Scintillation-Counter und Proteinanalyse ausgewertet. Die counts (dpm) wurden ins Verhältnis zu den gemessenen Proteinwerten gesetzt und als nmol DPPC/ $10^6$  Zellen berechnet.

Zur Bestimmung der Menge des ausgeschiedenen Surfactantlipid nach der „Surfactantresekretionsphase“ wurde die andere Hälfte der gewaschenen Surfactantlipidaufnahme Zellansätze (Kontrollen sowie mit *C. pneumoniae* inkubierte Zellen) für weitere 30 Minuten in 1 ml MEM/0,1% BSA ohne Liposomen und SP-A bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In den Zellen wurde das verbliebene Surfactantlipid gemessen. Die counts (dpm) wurden ins Verhältnis zu den gemessenen Proteinwerten gesetzt und als nmol DPPC/ $10^6$  Zellen berechnet.

Die Surfactantaufnahmedaten im Vergleich zu den Ergebnissen nach der „Resekretionsphase“ ergaben den Anteil des in den Zellen verbliebenen Surfactant.

### **2.2.6 Durchführung der Surfactantsekretionsversuche**

Zur Bestimmung der Surfactantsekretion wurden je  $0,5 \times 10^6$  Zellen/Well adhärenente Typ-II-Pneumozyten für 16 Stunden in DMEM/10% FCS mit je  $1 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]PC inkubiert. Nach dreimaliger Waschung der Zellen mit MEM ohne FCS erfolgten 30 Minuten Inkubationen sowohl ohne und mit Paclitaxel ( $5\mu\text{M}$ ) als auch ohne und mit Phalloidin ( $10 \mu\text{g/ml}$ ). Im Anschluss daran wurden die Zellen für 3 Stunden mit und ohne *C. pneumoniae* inkubiert. Es erfolgte die Abnahme der Überstände und das Abschaben der Zellen mit je  $300 \mu\text{l}$  Aqua destillata von den 6-well Platten. Wie unter 2.5.5 beschrieben wurden die Zellen mit der Baneline Ultraschallsonde geschallt und das Lysat nach Zugabe von je  $300 \mu\text{l}$  Methanol und je  $4 \text{ ml}$  Szintillationsflüssigkeit im Liquid-Szintillationcounter analysiert. Die Berechnung des sezernierten Surfactant erfolgte als % des sezernierten [ $^3\text{H}$ ]PC im Überstand geteilt durch die Summe im Medium und in den Zellen.

### **2.2.7 Statistik**

Analysen mehrerer Datensätze wurden mit der Varianzanalyse ANOVA mit nachfolgendem Fishers PLSD Test durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit  $P < 0,05$  festgelegt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  (standard error) SE dargestellt, zur Ermittlung wurden in der Regel drei Einzelwerte verwendet ( $n = 3$ ). Die Prüfung erfolgte auf Normalverteilung.