

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Präparation

Die verwendeten BDNF-defizienten Mäuse wurden mit Hilfe von heterozygoten Mutanten (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) mit einem gemischten genetischen Hintergrund (129Sv, BALB / c, C57Bl / 6) gezüchtet (Ernfors et al., 1994). Diese *bdnf* *-/-* -Mäuse sind kleiner als ihre *bdnf* *+/+* -Geschwister und sterben in der dritten bis vierten Woche *post partum*. Sie zeigen den gleichen Phänotyp wie die von Korte und Kollegen (1995) erzeugten Tiere mit Ataxie, myoklonischen Krampfanfällen und Episoden von Hyperaktivität. Bei ihnen ist keine BDNF-mRNA nachweisbar. Heterozygote Tiere zeigen keine offensichtlichen Defizite, sind fertil und wurden für die Zucht verwendet. Vor jedem Experiment wurde der Genotyp der jeweiligen Maus bestimmt (siehe 2.2).

Der Tag der Konzeption wird als embryonaler Tag (E) 0 bezeichnet. Er wird durch das Erscheinen eines vaginalen Pfropfs erkannt. Die Schwangerschaft dauert üblicherweise 19 Tage. Der Tag der Geburt wurde als postnataler Tag (P) 0 definiert. Die Experimente wurden am Tag E 19, sowie den Altersstufen P0 – P10 durchgeführt.

Horizontale Schnitte aus dem visuellen *Colliculus superior* (CS) wurden aus embryonalen und neugeborenen Mäusen des BDNF-defizienten Genotyps und des Wildtyps gewonnen.

Insgesamt wurden für die hier vorgestellten Versuche 56 Tiere verwendet, wobei von jeder Maus 2 - 3 Hirnschnitte gewonnen wurden. Alle Experimente wurden entsprechend der Richtlinien des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, durchgeführt (T0407/98).

Jeweils zu Versuchsbeginn wurde eine Maus mittels Äther tief narkotisiert und dekapitiert. Nach Entfernen der Kopfhaut wurde der Schädel beidseitig lateral entlang der Schädelbasis aufgetrennt und rostral der *Sutura lamdoidea* mit einem Frontalschnitt geöffnet. Der hintere Teil des Schädeldaches wurde mit Hilfe einer feinen Präparierschere und Pinzette abgelöst und das Gesamthirn in eiskalte, artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) überführt, um metabolische Prozesse zu inhibieren und dem Gewebeblock eine erhöhte Festigkeit zu verleihen.

Die Großhirnhemisphären, Kleinhirn und Hirnstamm wurden abgetrennt und die Vierhügelplatte durch einen Rostrokaudalschnitt vom Rest des Mesencephalon getrennt. Der Gewebekblock wurde mit der so entstandenen Schnittfläche mit Cyanmethacrylatkleber (Uhu Sekunden Alleskleber, Bühl, BRD) auf dem Schneideblock des benutzten Vibratome (Vibratome Series 1000, Technical Products International, St. Louis, MO, USA) befestigt. Nach Anbringen der Vibratome Klinge wurde die Schneidewanne mit eiskalter ACSF gefüllt und ein bis maximal zwei 150 µm dicke Horizontalschnitte durch das *Stratum griseum superficiale* (SGS) oder *Stratum opticum* (SO) der *Colluculi superiores* angefertigt (siehe Abb.). Nach der Präparation wurden die Schnitte in mit Karbogengas (5% CO₂ / 95% O₂) begaster Badlösung bis zu 6 Stunden bei Raumtemperatur (22-25°C) aufbewahrt.

2.2 Genotypisierung

Eine Zucht mit homozygoten *bdnf* *-/-*-Mäusen ist nicht möglich, weil sie innerhalb der ersten vier Wochen nach der Geburt sterben. Die Erhaltungszucht muß demnach mit heterozygoten Tieren erfolgen. Will man Experimente mit definierten Genotypen durchführen, muß eine konsequente Genotypisierung aller Würfe erfolgen.

Die Genotypisierung erfolgt in zwei Schritten: 1.) Isolierung der genomischen DNA und 2.) Amplifizierung der interessierenden Sequenz mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Für die Durchführung wurde das Protokoll nach Henneberger et al. (2000) benutzt. Als Ausgangsmaterial zur Isolierung der genomischen DNA diente ein 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze. Diese Proben wurden zunächst für mindestens 15 Minuten auf -80°C gekühlt und anschließend in 500 µl Lysispuffer (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,2 mg / ml Ribonuclease A; 1 mg / ml Proteinase K) verdaut. Die Lyse wurde bei 56°C und wiederholtem Mischen nach 2 Stunden abgeschlossen. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Rückstände zu entfernen. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol zum Überstand wurde die DNA präzipitiert und anschließend in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die genomische DNA wurde dann in 50 µl eines 5 mM Tris-HCl Puffers (pH 8.5) durch Inkubation bei 65 °C für 5 min wieder gelöst. Die Qualität der Probe und die Konzentration der DNA wurde photometrisch (Spectrophotometer, Beckman, Fullerton, USA) bestimmt. Die

Konzentration der DNA wurde auf 250 ng / μ l eingestellt. Im Anschluß wurde unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgeführten Primer die PCR durchgeführt. Der PCR-Mix (50 μ l) enthielt 0.2 mM dNTP, 1.1 mM MgCl₂, eines der Primersets und 1.25 RedTaq DNA-Polymerase in 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl (pH 8.3). 1 μ l der DNA-Probe wurde jedem der beiden Ansätze (Nachweis des BDNF-Gens und der Ersatz-Sequenz) zugesetzt und amplifiziert. Als *Thermocycler* diente ein PCR Sprint (Hybaid Ltd., Ashford, Middlesex, UK). Es wurden 30 der folgenden Reaktionsschritte durchgeführt: 1.) Denaturierung, 94 °C für 30 sec; 2.) *Annealing*, 58 °C für 30 sec; 3.) Synthese, 72°C für 60 sec. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese (2% Agarose in TAE-Puffer) bei 80 Volt aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (500 μ g/l) sichtbar gemacht und fotografiert.

2.3 Chemikalien und Lösungen

Die ACSF-Lösungen hatten die Zusammensetzung (in mM/l):

120 NaCl, 5 KCl, 10 Glucose, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, and 0.5 MgCl₂; pH 7.3, eingestellt mit NaOH bei 4°C (Präparationslösung).

125 NaCl, 5 KCl, 10 Glucose, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂; TTX (1 μ M, Alomone, Jerusalem, Israel) pH 7.3, O₂ 95%, CO₂ 5% (Superfusion).

Für Ganzzelleableitungen enthielt die Pipettenlösung in mM: 120 KCl, 10 EGTA, 10 Glucose, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂; pH 7,3 eingestellt mit KOH.

Für *perforated patch* -Ableitungen enthielt die Pipettenlösung in mM: 120 CsCl, 14 CsOH, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 10 Glucose; pH 7,3 eingestellt mit CsOH. Pharmaka (GABA, Sigma; Gabazine, Sigma, St. Louis, MO, USA; Cadmium; BDNF, Alomone, Jerusalem, Israel) wurden benutzt wie im Ergebnisteil aufgeführt.

2.4 Elektrophysiologie

Für die Patch-Clamp-Messungen wurde eine Meßapparatur bestehend aus einem aufrechten Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, BRD), und einem Patch-Clamp-Verstärker (EPC 7) (List, Darmstadt, BRD) aufgebaut. Für die elektrophysiologischen Ableitungen wurden die akuten Schnitte in eine auf den Mikroskop-Kreuztisch montierte Plexiglaskammer transferiert, mit einem platingestützten Nylonnetz fixiert und

kontinuierlich mit begaster ACSF-Lösung superfundiert (Durchflußrate ca. 1 ml/min). Über die Badperfusion wurden auch Blocker, Transmitter und andere Substanzen appliziert. Als Elektroden wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Die Referenzelektrode befand sich in der mit Badlösung durchspülten Meßkammer, die Meßelektrode in der mit Pipettenlösung gefüllten Meßpipette. Die Elektroden wurden aus Borosilikatglas (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,9 mm, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) mit einem horizontalen Elektrodenziehgerät (Modell P87, Sutter Instruments, Novato, USA) gezogen. Die Pipettenwiderstände lagen zwischen 4 und 8 M Ω .

Die Zellen wurden gewählt und die Meßpipette mit Hilfe des Mikromanipulators auf die Zellmembran aufgesetzt. Es wurde nicht versucht, die verschiedenen Neuronenpopulationen durch histologische Aufbereitung der verwendeten Schnitte zu unterscheiden. Jedoch zeigten die mit *Lucifer Yellow* (LY, Kaliumsalz), (0.025% Endkonzentration in der Pipettenlösung) gefüllten Neurone für gewöhnlich ein Dendritenfeld mit einem Durchmesser von mehr als 200 μ m und einem Somadurchmesser von mehr als 12 μ m, so dass zu vermuten ist, dass es sich hierbei um Vertikalzellen mit weitem Dendritenfeld (sogenannte *wide field neurons*) handelt (Jüttner et al., 2001). Jedoch wurden alle Daten ohne Rücksicht auf die Morphologie der postsynaptischen Zelle zusammengefasst.

Durch leichtes Ansaugen wurde dann eine stabile Glas-Membran-Verbindung im G Ω -Bereich (3-10 G Ω) hergestellt. Patch-Clamp-Untersuchungen wurden sowohl im Ganzzellmodus als auch im *perforated patch*-Modus (Rhee et al., 1994; Kyrozis und Reichling, 1995) durchgeführt. Gramacidin D (Sigma, St. Louis, MO, USA) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany) gelöst und der Pipettenlösung in der Endkonzentration 1 μ g / ml zugesetzt. Die Pipettenspitze wurde mit gramicidinfreier Pipettenlösung gefüllt. Die Membran unter der Pipettenspitze wurde etwa 7–15 min nach Sealbildung elektrisch leitend, was sich mittels Testpuls an der zunehmenden Kapazität beobachten ließ. Nach Stabilisierung des Serienwiderstands (10–20 min nach Sealbildung) wurde mit den Messungen begonnen. Der Pipettenlösung ebenfalls zugesetztes *Lucifer yellow* ermöglichte ein versehentliches Ausreißen des perforierten Membranflecks zu entdecken. Zellen, die nach der Messung eine Füllung mit LY zeigten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Am Ende der Messung wurde der perforierte Membranfleck durch leichten Unterdruck ausgerissen, um eine

Ganzzelleableitung zu erhalten. Die Zellen färbten sich mit LY an und ihre Morphologie wurde unter Fluoreszenzlicht sichtbar.

Die Membranströme der Zellen wurden mit einem EPC-7 Verstärker (List, Darmstadt, BRD) aufgenommen, mit 10 kHz unter Verwendung eines 12 Bit AD – Konverters und der Software WinTida 4.11 (HEKA Elektronik, Lambrecht, BRD) digitalisiert, mit einem 3 kHz Tiefpass-Filter gefiltert, und auf der Festplatte eines IBM-kompatiblen Computers gespeichert. Da die Kapazität der Zellmembran Spannungsänderungen durch Umladeströme entgegenwirkt und damit eine zeitliche Verzögerung bewirkt, wurde eine automatische Kapazitätskompensation durchgeführt.

Die Aufnahme und Auswertung der Daten sowie die Ansteuerung des Verstärkers und des Mikromanipulators erfolgte mit dem Programm WinTida.

2.5 Fluoreszenzmessungen

In dieser Arbeit wurden Kalziumfluoreszenzsignale mit Hilfe eines photometrischen Systems der Firma Till photonics (München, BRD) gemessen. Die Horizontalschnitte des CS (siehe 2.1) wurden dazu in eine kleine Petrischale mit Badlösung (Superfusion) und 5 μM Oregon Green 488 BAPTA-1-AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) überführt und für 12 min bei Raumtemperatur inkubiert. Genotypabhängige Unterschiede in der Fähigkeit, Oregon Green 488 BAPTA-1-AM zu laden, wurden nicht beobachtet. Nach der Inkubation wurden die Hirnschnitte einmal in Badlösung gewaschen und für weitere 20 Minuten in ACSF (Superfusion) gegeben um eine vollständige Deesterifizierung zu ermöglichen. Nach Transferieren der Hirnschnitte in die Meßkammer wurden die Zellen mit einem Wasserimmersionsobjektiv (40x, numerische Apertur 0,75, Zeiss, Oberkochen, BRD) im aufrechten Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, BRD) observiert. Über zwei Aussparungen in der Messkammer wurden die Gehirnschnitte während der Experimente mit ACSF (22-24°C) perfundiert.

Die Anregung erfolgte mit einem Monochromator (Till Photonics, München, BRD) und die Fluoreszenzsignale wurden mit einer CCD Kamera (1280 x 1024 pixel, Till Photonics, München, BRD) aufgenommen und auf einem IBM-kompatiblen PC gespeichert.

Alle Messungen wurden mit einer Pixeladdition (*binning*) von 4 x 4 (1 pixel = 0,4 μm x 0,4 μm) durchgeführt. Die Akquisitionsrate für $[\text{Ca}^{2+}]$ -Messungen betrug ein Bild pro

Sekunde. Die Messungen wurden mit einer Wellenlänge von 480 nm gemacht. Das anregende und das emittierte Licht wurden durch einen dichroitischen Spiegel bei 510 nm getrennt. Als Emissionsfilter diente ein 590 nm Langpass-Filter. Die Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe des Programms Vision 3.06 (Till Photonics) ausgewertet. Die Hintergrundfluoreszenz (F_B) wurde in der unmittelbaren Nähe eines evaluierten Neurons bestimmt und vor der Normierung abgezogen. Kalziumsignale wurden als relative Fluoreszenzänderung im Vergleich zur Ruhefluoreszenz (F_0) ausgedrückt als das Verhältnis von $(\Delta F - \Delta F_B)/(F_0 - F_B)$.

Obwohl einige Gliazellen auch durch den Kalziumindikatorfarbstoff markiert waren, konnten Neurone durch ihre Größe, Form, und das Vorhandensein eines Neuriten erkannt werden.

Die Applikation von KCl (50 mM) induzierte einen etwa vierfachen Anstieg der Kalziumsignalintensität. Mindestens 95% aller Neurone zeigten auf diesen Stimulus einen Anstieg der Kalziumkonzentration. Nur diese Zellen wurden in den Experimenten mit exogenem GABA berücksichtigt. In den folgenden Experimenten wurde die GABA-Konzentration (50 μ M) benutzt, die eine halb-maximale Kalziumantwort auslöste. Diese Konzentration des Agonisten sicherte, dass die Kalziummessungen unter der Sättigungskonzentration des Oregon Green 488 BAPTA-1-AM erfolgten. Fluoreszenzsignale einzelner Neurone wurden normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die mittlere Anzahl der ausgewerteten Neurone pro Hirnschnitt betrug 104 ± 12 . Die gemittelten und normierten Kalziumsignale von allen ausgewerteten Neuronen in einem Schnitt wurden überlagert dargestellt.

2.6 Semiquantitative RT-PCR

Für die semiquantitative mRNA-Bestimmung wurden Schnitte des visuellen CS analog zu den elektrophysiologischen und Kalziumfluoreszenz-Messungen gewonnen. Die gesamte RNA wurde mit Hilfe von Trizol Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach Herstellervorschrift aus den Schnitten des visuellen CS extrahiert. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde photometrisch auf Reinheit untersucht und quantifiziert. Durch reverse Transkription (Reverse Transkriptase PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurden mit Hilfe des oligo(dT) Primers 2 μ g der Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) überführt (15 min bei 70 °C, 60 min bei 42 °C). Aliquots der cDNA wurden in

einem PCR *Thermocycler* (PCRSprint, Hybaid Ltd., Ashford, Middlesex, UK) unter Einsatz des entsprechenden Primerpaars (siehe Tabelle 1) amplifiziert. Ein Ansatz (25 µl) enthielt entsprechend den Herstellerangaben 0.2 mM dNTP, 1.1 mM MgCl₂ und 1.25 *RedTaq* DNA-Polymerase.

Es wurden 30 der folgenden Reaktionschritte durchgeführt: 1.) Denaturierung, 95°C für 45 sec, 2.) *Annealing*, 58°C für 45 sec, 3.) Synthese, 72°C für 1 min. Durch Titration der eingesetzten Menge cDNA wurde sichergestellt, dass die PCR im linearen Bereich der Amplifikation stattfand. Kreuzreaktionen der verwendeten Primer mit unerwünschten Sequenzen wurden durch die Ähnlichkeitssuche BLAST der NCBI-Datenbank ausgeschlossen.

Zur Quantifizierung wurde als Standard die Expression von β-Aktin gewählt und in allen Ansätzen mitamplifiziert. Die Expression von β-Aktin ist von BDNF unbeeinflusst (Thompson 1998). Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese (2% Agarose in TAE-Puffer) bei 80 Volt aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (500µg/l) sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Quantifizierung diente eine Standard-DNA-Leiter (100 bp)(Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

Primer	(5'→3')	(3'→5')
BDNF	ATA AGG ACG CGG ACT TGT ACA	GTG TCT ATC CTT ATG AAT CGC
GABA α1	ATC GTC TGA GAC CAG GCT TGG	CCC ATC TTC TGC CAC AAC CAC
GABA α2	AAT CGT CTT AGA CCA GGA CTG	GAG CCA CTG ACT TTT TCC CGT
GABA α3	TCA AGA CGA CAA GAA CCT GGG	TAT CAG TGT CTG ACA CAG GGC
GABA β2	CAG GTT CTT ATC CCA GAT TGT CC	GGT CCA TCT TGT TGA CAT CCA GG
GABA β3	CTT TTC GGC ATC TTC TCG GC	TCC ACG CCA GTA ACA GCC TTG
GABA γ2	CAA GGT CTC CTA TGT CAC AGC	AAG GCG GTA GGG AAG AAG ATC
KCC2	GCT GAT CCA TGA CCA GAG TG	GTC CAG TTG CTG AGT GAG G
NKCC1	CTA TGA CAC CCA CAC CAA CA	ATC TAA TAA AGA GCA TCA CAC C
β-Aktin	ACC AAG GTG TGA TGG TGG GAA	CGC TCG TTG CCA ATA GTG ATG

Tabelle 1: Aufstellung der für Genotypisierung und semiquantitative mRNA-Bestimmung verwendeten Primerpaare

Die Fotografien der PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) quantifiziert. Die relative Expression an mRNA wurde als das Verhältnis zwischen der nachzuweisenden mRNA und der Intensität von β -Aktin berechnet.

2.7 Immunhistochemie

Ausschließlich aus einem *Colliculus superior* bestehende Gewebelöcke wurden über Nacht bei 4 °C in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; 120 mM, pH 7.4) einschließlich 4% (w/v [Menge/Volumen]) Paraformaldehyd und 4% Saccharose fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C in PBS einschliesslich 30% Saccharose gelagert. Als nächster Arbeitsschritt wurde das Gewebe in PBS gespült und in TissueTek OCT Compound (Sakura Finetek, AT Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet.

Die anschließend angefertigten, 20 μ m dicken, frontalen Gefrierschnitte (Jung CM 1800, Leica, Bensheim, Germany) des visuellen CS wurden auf SuperFrost Plus Glasträger (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) aufgezogen. Diese wurden einmal in PBS und nachfolgend zweimal in 0.12% (w/v) Gelatine-PBS gewaschen, bevor sie über Nacht mit dem primären Antikörper in 0.12% (w/v) Triton X-100 in Gelatine-PBS bei 4°C inkubiert wurden. Nach mehrfachem Waschen in Gelatine-PBS, Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur und nochmaligem Waschen in Gelatine-PBS und PBS wurden die Schnitte mit Vectashield (Vector Laboratories, 23 Burlingame, CA, USA) überzogen und mit einem Glasplättchen abgedeckt. In Kontrollfärbungen wurde die Spezifität der Immunfärbung durch Weglassen der primären Antikörper überprüft.

In dieser Studie wurde anti-KCC2 als der primäre polyklonale Antikörper (Williams et al., 1999) (1:100, Upstate, Lake Placid, NY, USA) benutzt. Der sekundäre Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, USA) ist konjugiert mit carboxymethyl indocyanine-3 (Cy3).

Die Lokalisation von immunhistochemischen Fluoreszenzsignalen wurde mit einem inversen konfokalen Laserscanner-Mikroskop (Zeiss AG, BRD), das mit einem Argon/Kryptonlaser MRC-1024 (Bio-Rad, halbpochromatischen Objektiven) (Plan Fluotar, Leica, BRD) mit numerischen Aperturen von 0.3 (10x), 1.0 (40x) und 1.3 (100x)

und der Software Laser Sharp 2000 (Bio-Rad) ausgestattet war, dokumentiert. Die doppelt gefärbten und eingedeckten 20 μM Schnitte wurden gleichzeitig durch zwei Filter mit den exzitatorischen Wellenlängen 488 nm und 568 nm gescannt. Die Einstellungen der Detektionssysteme wurden mit Kontrollschnitten überprüft, um auszuschließen, dass die Emission der kurzwelligen Fluochrome auch im langwelligen Bereich detektiert wurden und *vice versa*. Dazu wurden einfach-markierte Gewebeschnitte mit beiden Anregungswellenlängen analysiert. Die Sensitivität der beiden Filter wurde so eingestellt, dass sie die Fluochrome selektiv einzeln detektieren.

Pro Tier wurden mindestens 20 Gesichtsfelder ausgewertet. Die digitalen Mikrofotografien wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes PMIS (GKRCC, Unterfoehring, Germany) analysiert. Für das Fluoreszenzprofil eines einzelnen Neurons, wurden die Fluoreszenzwerte über den maximalen Durchmesser der Zelle bestimmt. Die Strecke zwischen den beiden Maximalwerten wurde zur Auswertung herangezogen. Die Fluoreszenzwerte zwischen den beiden Maxima des Fluoreszenzprofils wurden normalisiert, integriert und als KCC2-Immunoreaktivitätsverteilungsmuster bewertet. Die Werte der beiden untersuchten Genotypen wurden gemittelt und zum Vergleich als Säulendiagramm dargestellt.

2.8 Statistik

Alle numerischen Daten sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler angegeben. Die Anzahl der in eine Statistik eingehenden Neurone ist als Variable n angegeben. Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Student t-Tests für unverbundene Stichproben auf statistische Signifikanz getestet. Der t-Test setzt eine Normalverteilung der Zielwerte voraus. Ein Vorliegen von normalverteilten Werten wurde mit dem Programm Origin (Microcal OriginLab, USA) geprüft.

Das jeweilige Signifikanzniveau ist mit * für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$ und *** für $p < 0.001$ gekennzeichnet. Auf Ausnahmen wird im Text hingewiesen.