

Aus der Augenklinik des
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. H. Foerster

**Immunhistochemische Befunde zum Einfluß immunsuppressiver Therapie
nach perforierender Keratoplastik am Rattenauge**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Anne-Christine Karow
aus Berlin

INHALT

EINLEITUNG	6
1. HORNHAUTTRANSPLANTATION	6
1.1 Kurzer geschichtlicher Überblick	6
1.2 Hornhauttransplantation heute	7
1.2.1 Indikationen zur Keratoplastik	7
1.2.2 Risikofaktoren - Hochrisikokeratoplastik	7
2. DIE PATHOGENESE DER ABSTOßUNGSREAKTION	8
2.1 Grundlegendes	8
2.1.1 Der Major Histocompatibility Complex (MHC)	8
2.1.2 Antigen-präsentierende Zellen (APC)	10
2.1.3 Minore Histokompatibilitätsantigene	11
2.1.4 Effektormechanismen der Abstoßungsreaktion	11
2.2 Das okuläre Immunsystem - Besonderheiten der Immunologie des Auges	12
2.2.1 Immunkompetente Zellen in der Hornhaut	12
2.2.2 Histokompatibilitätsantigene in der Hornhaut	13
2.2.3 Das Immunprivileg des Auges - ACAID	15
3. MAKROPATHOLOGIE UND HISTOLOGIE DER TRANSPLANTATABSTOßUNG	16
4. PRÄVENTION UND BEHANDLUNG DER ABSTOßUNG IN DER KLINIK	17
5. TIERMODELLE – KANINCHEN, RATTE, MAUS	18
6. EXPERIMENTELLE THERAPIEFORMEN	20
6.1 Verschiedene Prinzipien der Immunsuppression	21
6.2 Kleinmolekulare Immunsuppressiva	22
6.2.1 Cyclosporin A	22
6.2.2 Tacrolimus (FK 506), Sirolimus (Rapamycin)	24
6.2.3 Leflunomid	24
6.3 Monoklonale Antikörper	26
6.3.1 Allgemeines zu Wirkung und Anwendung	26
6.3.2 Anti-CD4-Antikörper	27
7. FRAGESTELLUNG	28

MATERIAL UND METHODEN	29
1. TIERE	29
2. MEDIKAMENTE	29
3. OPERATIONS-METHODE	29
4. EINTEILUNG DER BEHANDLUNGSGRUPPEN	30
5. POSTOPERATIVE UNTERSUCHUNG DER AUGEN	31
6. ERSTELLUNG EINER KINETIK DER ALLOGRAFTREAKTION	32
7. AUFARBEITUNG DER AUGEN	32
8. APAAP UND ANDERE IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN	33
9. DARSTELLUNG DER DAS TRANSPLANTAT INFILTRIERENDEN ZELLPOPULATIONEN MIT DER APAAP-METHODE	35
10. KONTROLLEN	36
11. AUSWERTUNG DER GEWEBSSCHNITTE	36
ERGEBNISSE	38
1. AUS DER STUDIE AUSGESCHLOSSENE TIERE	38
2. NORMALE (NICHT OPERIERTE) RATTENAUGEN	38
3. HORNHAUTTRANSPLANTIERTE AUGEN	38
3.1 Allgemeine Beobachtungen	38
3.2 Syngene Transplantation	39
3.3 Allogene Transplantation	41
3.3.1 Unbehandelte Tiere	41
3.3.2 Allogene Transplantation - Behandlung mit Cyclosporin A	44
3.3.3 Allogene Transplantation - Behandlung mit Leflunomid	46
3.3.4 Allogene Transplantation - Behandlung mit RIB 5/2 + Cyclosporin A	49
DISKUSSION	54
ZUSAMMENFASSUNG	71
LITERATURVERZEICHNIS	72

MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere

Wir verwendeten weibliche 15 bis 20 Wochen alte Ratten vom Møllegaard Breeding Center, Lille/Skensved, Dänemark. Bei den Transplantationen dienten stets Lewis/Brown Norway-Ratten (I-A-Allel RT1^{lxn}) als Spender und Lewis-Ratten (RT1^l) als Empfänger. Diese beiden Stämme unterscheiden sich vollständig hinsichtlich der Gene des Major Histocompatibility Complex (MHC) und unbehandelt kommt es bei dieser Spender-Empfänger-Kombination immer zur Transplantatabstoßung.

Die Tiere wurden behandelt gemäß den von der Association for Research in Vision and Ophthalmology erarbeiteten Bestimmungen über die Verwendung von Tieren in der Forschung (The Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research).

2. Medikamente

Der monoklonale Anti-CD4-Antikörper RIB 5/2 wurde uns von Herrn PD Dr. Manfred Lehmann vom Fachbereich Biochemie an der Universität Rostock zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich um einen monoklonalen Maus-anti-Ratte-Antikörper (Isotyp IgG 2a). Für die Herstellung des Antikörpers wurde die Myelomzelllinie X64-Ag8.653 aus der Maus mit Splenozyten fusioniert und mit Concavalin-A-aktivierten Lymphozyten von BDIX-Ratten immunisiert [Lehmann, M. et al. (1992)].

RIB 5/2 bindet an ein 53 KD-Polypeptid auf Thymozyten und Milzzellen der Ratte, das durch andere monoklonale Antikörper (W3/25, OX 35) als das CD4-Molekül identifiziert werden kann. RIB 5/2 bindet jedoch am CD4-Molekül an ein anderes Epitop als W3/25 und OX 35.

RIB 5/2 gehört zu den nichtdepletierenden Antikörpern, d.h. die Zielzellen werden durch die Bindung des Antikörpers nicht zerstört.

Cyclosporin A (CyA) ist ein Präparat der Firma Sandoz (Basel, Schweiz).

Leflunomid (LF) erhielten wir von der Firma Hoechst (Kalle-Albert, Wiesbaden).

3. Operationsmethode

Als Narkose erhielten die zu operierenden Tiere ein Gemisch aus 2 mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazinhydrochlorid (Rompun®, Bayer) und 25 mg/kg KG Ketamin-HCl (Ketanest®,

Parke-Davis), das intraperitoneal (i.p.) verabreicht wurde. 20 Minuten vor der Operation wurden zusätzlich 0.5 mg/kg KG Atropin (Eifelfango) subkutan und Phenylephrinhydrochlorid-Augentropfen (Neosynephrine-POS, 5%, Ursapharm) gegeben, um die Iris zu dilatieren.

Operiert wurde unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Operationsmikroskops.

Mit einem 3,5 mm-Trepan und einer gebogenen Castroviejo-Schere wurde aus beiden Augen des Spendertieres zentral ein kreisrundes Stück Hornhaut entnommen. Anschließend wurde das Spendertier durch Etherinhalation getötet. Vom linken Auge des Empfängertieres wurde mit einem 3 mm-Trepan ebenfalls die zentrale Hornhaut entfernt. Um ein Ausreißen der Nähte oder die Bildung von Synechien auf Grund zu hoher Spannung und einer zu sehr eingegengten Vorderkammer zu verhindern, wurde der Durchmesser des Transplantats etwas kleiner gewählt als der des am Empfängerauge entnommenen Gewebstücks.

Anschließend wurde das Transplantat auf einem Tropfen steriler Methylcellulose (1%) mit zehn 11-0-Nyloneinzelnähten (Ethicon) in die Empfängerhornhaut eingenäht. Die Vorderkammer wurde nach der Operation nicht wiederhergestellt, um eine Verletzung der Augenlinse durch diese Prozedur zu vermeiden.

Nach der Operation wurden die Lider des operierten Auges mit drei 7-0-Nyloneinzelnähten (Ethicon) verschlossen. Vorher wurde Polyspectran®-Augensalbe (Alcon Thilo) unter die Lider gebracht.

4. Einteilung der Behandlungsgruppen

Die operierten Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip den folgenden Behandlungsgruppen zugeordnet:

- I unbehandelt;
- II tgl. 10 mg/kg Cyclosporin A (CyA) i.m. bis zur Allograftreaktion
- III tgl. 10 mg/kg Leflunomid (LF) p.o. bis zur Allograftreaktion
- IV 4 mg/kg RIB 5/2 i.p. an zehn Tagen + 1,5mg/kg CyA i.m. täglich bis Tag 36
post operationem (s.u.)

In den Gruppen II und III erfolgte die Behandlung ab dem ersten Tag post operationem.

LF wurde über eine Magensonde in einer einprozentigen, sterilen Carboxymethylzellulosesuspension verabreicht, die jeden Tag frisch angesetzt wurde.

Die Tiere in Gruppe IV erhielten RIB 5/2 erstmals 24 Stunden vor der Operation, dann am Tag der Operation, am ersten Tag post operationem und anschließend jeden zweiten Tag, bis

sie insgesamt zehn Dosen erhalten hatten, was am 15. Tag post operationem der Fall war. CyA wurde in dieser Gruppe vom Tag vor der Operation an täglich bis zur Tötung des Tieres oder bis zum 36. Tag post operationem gegeben. Die Dauer der Behandlung der Tiere dieser Gruppe bis zum 36. Tag post operationem wurde ausgewählt, weil dies etwa dreimal dem Abstoßungszeitraum bei unbehandelten Tieren entspricht, so daß jedenfalls ein signifikanter Unterschied der Beobachtungsdauer gewährleistet ist.

Der Grund für die Kombination von Anti-CD4-Antikörpern (RIB 5/2) mit einer an sich subtherapeutischen Dosis CyA liegt in der Annahme ihrer synergistischen Wirkung auf Grund unterschiedlicher Wirkorte [Lehmann, M., persönliche Kommunikation; Lácha, J. et al. (1994)]. CyA wirkt wie Anti-CD4-Antikörper hauptsächlich auf T-Helferzellen, allerdings unterbindet es die Aktivierung der Zellen später. Die Antikörper stören die Signalerkennung, also den ersten Schritt der Aktivierung. CyA verhindert die Transkription des Interleukin-2 (IL-2)-Gens und anderer Zytokingene, wodurch Proliferation und Aktivierung der T-Helferzellen und damit auch anderer an der Abstoßung beteiligter Zellen unterbleiben (s. Einleitung). In vorhergehenden Untersuchungen führte die hier verwendete Dosis CyA allein zu keinerlei Verzögerung der Abstoßung. Die Kombination RIB 5/2 + CyA hat sich dagegen als wirksamer als RIB 5/2 allein herausgestellt. Bei Behandlung mit RIB 5/2 allein entwickelten 50% der Tiere eine Toleranz gegenüber dem Transplantat, bei der Kombination mit CyA waren es 70% [Coupland, S.E. et al. (1995)].

5. Postoperative Untersuchung der Augen

Die Lider der operierten Augen wurden 48 Stunden nach der Operation geöffnet. Unmittelbar anschließend erfolgte in Ethernarkose die erste Untersuchung der transplantierten Hornhaut an der Spaltlampe. Diese Beurteilung erfolgte danach alle zwei bis drei Tage.

Es wurden untersucht die Trübung, das Ödem und die Vaskularisation des Transplantats [Holland, E.J. et al. (1991)]. Für jedes Kriterium wurden Punkte von 0 bis 4 vergeben, wobei eine Gesamtpunktzahl von > 6 das Erreichen der Abstoßung bedeutete.

Diese Untersuchungen dienten der klinischen Beurteilung der Transplantate zur Erfassung einer unerwartet frühen Abstoßung, einer Infektion oder ähnlichem, die zum Ausschluß des tieres aus der Studie geführt hätten. Dieses Bewertungssystem ist vorher in den klinischen Studien zur Unterdrückung der Allograftreaktion durch die verschiedenen Immunsuppressiva eingesetzt worden [Coupland et al. (1994); Coupland et al. (1995)].

6. Erstellung einer Kinetik der Allograftreaktion

Um in der Immunhistologie der Verlauf der Allograftreaktion über die Zeit verfolgen zu können, wurden die Tiere an verschiedenen, definierten Tagen postoperativ getötet.

In früheren Untersuchungen war die Abstoßung bei unbehandelten Tieren am zwölften oder 13. Tag erfolgt, bei den mit LF bzw. CyA behandelten um den 16. Tag. 70% der mit RIB 5/2 und CyA Tiere erreichten eine Immuntoleranz, wobei die Behandlung bis zum 36. Tag erfolgte (s.o.) und die Beobachtungszeit postoperativ 160 Tage betrug [Coupland et al. (1994); Coupland et al. (1995)].

In dieser Arbeit wurden Tiere an den Tagen 3-5, 8/9 und 12/13 post operationem (post op) getötet. In den Gruppen II (CyA) und III (LF) erfolgte dies zusätzlich am Tag 16 und in der Gruppe IV (RIB 5/2+CyA) an den Tagen 25 und 38. Die gewählten Abstände scheinen auf Grund der klinischen Daten über den Zeitpunkt der Abstoßung unter den verschiedenen Therapien sinnvoll. Auf diese Weise ist in regelmäßigen Abständen ein Einblick in den Verlauf der Allograftreaktion möglich. In der Gruppe I wurde zusätzlich am Tag 11 getötet, um in der relativ kurzen Zeit bis zur Abstoßung des Transplantats besser den Verlauf dokumentieren zu können (s. Tab.1).

Tab.1: Anzahl der Tiere in den einzelnen Untergruppen

	syngen	unbehandelt	CyA 10mg	LF 10mg	RIB 5/2 4mg + CyA 1,5mg
3.-5. Tag		n = 2	n = 2	n = 3	n = 5
8./9. Tag	n = 5	n = 6	n = 4	n = 3	n = 5
12./13. Tag	n = 4	n = 4	n = 5	n = 3	n = 5
16. Tag			n = 2	n = 2	n = 6
25. Tag					n = 5
38. Tag					n = 3

7. Aufarbeitung der Augen

Zur Entnahme der Augen wurden die Tiere durch Etherinhalation getötet. Die Augen wurden sofort eingefroren, um die Antigenizität des Gewebes für die Immunhistochemie möglichst voll zu erhalten. Zum Einfrieren wurden die Augen in Einbettmedium® (Mikrom,

Heidelberg) eingebettet. Sodann wurden sie in 2-Methylbutan eingefroren, das in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, und anschließend bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden von den eingefrorenen Augen Serienschnitte von $10\ \mu\text{m}$ Dicke an einem Kryostaten (Mikrom, Heidelberg) angefertigt. Die Schnitte wurden bis zur Färbung bei -20°C gelagert. Vor dem Färben wurden sie bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet, jedoch nicht auf eine andere Weise fixiert.

8. APAAP und andere immunhistochemische Verfahren

Mit immunhistochemischen Färbeverfahren wie der in dieser Arbeit verwendeten APAAP-Methode können Gewebsantigene angefärbt werden, die von monoklonalen Antikörpern erkannt und dann durch ein angekoppeltes, chromogenumsetzendes Enzym sichtbar gemacht werden.

Mehrere Verfahren beruhen auf diesem Prinzip der Antigendarstellung.

Die einfachste Möglichkeit ist, das Enzym direkt an den monoklonalen Antikörper zu binden, der das Gewebsantigen erkennt. Bei dieser Technik können Zwischenschritte eingebaut werden, um das erhaltene Signal noch zu verstärken. Dies geschieht, indem das farbgebende Enzym an einen zweiten Antikörper gebunden wird, der den ersten erkennt. Hier kann noch mehr Verstärkung erreicht werden, indem das gleiche Enzym noch an einen dritten, den zweiten erkennenden Antikörper gebunden wird. Auf Grund der nicht sehr schonenden kovalenten Bindung an den Antikörper verlieren die Enzyme allerdings z.T. ihre Aktivität, was die Sensitivität ungünstig beeinflusst. Wegen der begrenzten Sensitivität der Methode wird außerdem eine relativ hohe Antikörperkonzentration benötigt, die unerwünschte Hintergrundfärbung begünstigt.

Bessere Ergebnisse lassen sich durch eine schonendere Ankopplung des Enzyms an den Antikörper erzielen, wie es bei der Avidin-Biotin-Methode geschieht. Hier wird hohe Affinität der Moleküle von Avidin und Biotin zueinander ausgenutzt, um das Enzym an den Antikörper zu binden. Dieses ist auf Grund der hohen Anzahl von Enzymmolekülen pro Gewebsantigen eine sehr sensitive Methode.

Das APAAP-Verfahren gehört in eine dritte Gruppe, die mit löslichen Antikörper-Enzym-Komplexen arbeitet. Diese Methode ist nicht ganz so sensitiv wie die Avidin-Biotin-Methode, jedoch sensitiver als die zuerst genannten Verfahren und für die Zwecke meiner Arbeit voll ausreichend.

Ich möchte dieses in meiner Arbeit angewendete Verfahren im folgenden genauer beschreiben:

Im Unterschied zu den bisher genannten Methoden wird in diesem Fall das Enzym nicht an den Fc-Teil eines Antikörpers gebunden, sondern wird durch Antikörper komplexiert, die seine antigene Struktur erkennen. Die Arbeit des aktiven Zentrums wird durch diese Bindung jedoch nicht behindert. Verschiedene Enzyme können auf diese Weise gebunden werden, z.B. Meerrettich-Peroxidase (PAP für „Peroxidase-Anti Peroxidase“, ein sehr gebräuchliches Verfahren), Glucoseoxidase oder im Falle von APAAP Alkalische Phosphatase. Die Immunkomplexe bestehen je nach Enzym aus unterschiedlich vielen Antikörper- und Enzymmolekülen, im Falle von APAAP bindet ein Antikörper zwei Enzymmoleküle, es werden also wie bei der Avidin-Biotin-Methode mehrere Enzymmoleküle an ein Gewebsantigen gekoppelt.

Die Alkalische Phosphatase ist besonders geeignet, um Leukozytenantigene darzustellen. Leukozyten enthalten sehr viel endogene Peroxidase und sind deswegen für die PAP-Methode nicht gut geeignet. Eventuell vorhandene endogene Alkalische Phosphatase läßt sich leicht durch Zugabe von Levamisol blocken, während die Blockade der endogenen Peroxidase die Antigenizität des Gewebes zerstören würde.

Wie bei den o.g. Verfahren wird auch diesmal das Gewebsantigen primär durch einen monoklonalen Antikörper erkannt, der in einer anderen Tierspezies gegen das gewünschte Antigen hergestellt wird. In dieser Arbeit wurden z.B. Maus-Antikörper gegen Rattenantigene benutzt.

Im nächsten Schritt wird dann ein sog. Brückenantikörper auf das Gewebe aufgebracht, der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet und in einer dritten Spezies hergestellt ist, in diesem konkreten Fall ein gegen Mausimmunglobulin gerichteter Antikörper aus dem Kaninchen.

Der Brückenantikörper soll den primären Antikörper mit dem APAAP-Komplex (oder auch mit anderen Antikörper-Enzym-Komplexen) verbinden. Der Antikörper des APAAP-Komplexes muß also in derselben Spezies hergestellt sein wie der primäre Antikörper, gegen die ja der Brückenantikörper gerichtet ist. Außerdem muß der Brückenantikörper im Überschuß vorhanden sein, damit möglichst oft nur eine seiner zwei Bindungsstellen am primären AK bindet und die andere für den APAAP-Komplex freibleibt.

Im letzten Schritt wird also der APAAP-Komplex aufgebracht, der an die freigebliebene Bindungsstelle des Brückenantikörpers bindet.

Zum Schluß wird das Chromogen zugesetzt, das vom Enzym Alkalische Phosphatase in einen Farbstoff umgewandelt wird und damit die Gewebsantigene letztlich sichtbar macht, z.B. das in dieser Arbeit verwendete Naphtol-AS-BI-Phosphat.

Bei Verwendung der APAAP-Methode kann Signalverstärkung dadurch erreicht werden, daß der zweite und dritte Schritt wiederholt werden, also nochmals Brückenantikörper und APAAP auf das Gewebe gegeben werden.

9. Darstellung der das Transplantat infiltrierenden Zellpopulationen mit der APAAP-Methode

In dieser Arbeit wurden mit der oben beschriebenen APAAP-Methode die transplantierten Hornhäute auf den Gehalt an CD4- und CD8-positiven Lymphozyten, an CD11-positiven Zellen, im wesentlichen Makrophagen, aber auch Granulozyten, sowie an RT1B-positiven Zellen, d.h. Zellen, die MHC II-Antigene der Ratte exprimieren, untersucht.

Wir verfahren hierbei nach dem Standardrezept von Cordell und Mitarbeitern [Cordell et al. (1984)].

Die monoklonalen Primärantikörper stammten aus der Maus (für die verwendeten Klone und die Spezifität der Antikörper s. Tab. 2). Sie wurden in folgenden Verdünnungen verwendet: Anti-CD4 1:200; Anti-CD8 1:150; Anti-CD11 1:200; Anti-RT1B 1:400.

Als Brücken-Antikörper wurden gegen den Fc-Teil der Maus-Immunglobuline gerichtete Kaninchen-Antikörper verwendet (Immunglobulin-Fraktion aus Kaninchenserum), die Antikörper des APAAP-Komplexes stammten wiederum aus der Maus (monoklonale Maus-anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörper).

Auch in meiner Arbeit wurden Brückenantikörper und APAAP-Komplex jeweils zweimal aufgebracht. Als Chromogen diente Naphtol-AS-BI-Phosphat.

Die Herstellerangaben zu den verwendeten Substanzen und eine Kurzfassung des Verfahrens finden sich im Anhang.

Anschließend erfolgt noch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, und schließlich wurden die Schnitte mit Glycerylgelatine eingedeckt.

Tab. 2: verwendete Antikörper, produzierender Zellklon und Spezifität

Monoklonaler Antikörper	Spezifität
OX-38, Maus-Anti-Ratten-CD4	CD4-Antigen auf T-Helferzellen, Thymozyten, Makrophagen [Jefferies et al. (1985)]
OX-8, Maus-Anti-Ratten-CD8	CD8-Antigen auf Thymozyten, T-Suppressor- u. zytotoxischen T-Zellen, auf den meisten NK-Zellen [Brideau et al. (1980)]
OX-42, Maus-Anti-Ratten-CD11b/c	gemeinsames Epitop von CD11b und CD11c (das dem C3bi-Rezeptor homologe Molekül bei der Ratte) auf Monozyten, Makrophagen, Granulozyten [Robinson et al. (1986)]
OX-6, Maus-Anti-Ratten-RT1B	nicht polymorphes MHC-Klasse II-Antigen der Ratte (äquivalent zu I-A), MHC II konstitutiv auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, induzierbar u.a. auf Keratozyten, Hornhautendothel [Fukumoto et al. (1982)]

10. Kontrollen

Als Positivkontrollen, d.h. Gewebe, bei dem auf Grund des bekannten Gehaltes an gesuchten Zellen die ordnungsgemäß durchgeführte Färbung jedenfalls positiv ausfallen muß, wurden Schnitte von Leber-, Nieren- und Milzgewebe der Ratten bei jeder Färbung eingeschlossen.

Als Negativkontrollen, also Gewebe, in dem keine oder kaum gesuchte Zellen zu erwarten sind, sowie Färbungen, bei denen gezielt entscheidende Schritte ausgelassen wurden, dienten zum einen Schnitte nicht operierter Rattenaugen und von Augen, die syngene Transplantate erhalten hatten (Augen vom 8. und 13. Tag post op). Zum anderen wurde der Primärantikörper bei der APAAP-Färbung durch TBS-Puffer oder durch nicht immunes Schafserum ersetzt.

11. Auswertung der Gewebsschnitte

Die angefärbten Zellen wurden an einem Lichtmikroskop (Olympus) bei 40facher Objektivvergrößerung mittels eines Zählgitters ausgezählt. Der Auswertenden war die Gruppenzugehörigkeit des entsprechenden Tieres nicht bekannt. Anschließend wurde diese Zahl in Zellen/mm² umgerechnet.

Auf Grund der z.T. sehr kleinen Fallzahlen ist eine statistische Auswertung der Daten nicht sinnvoll. Die erstellten Diagramme geben Auskunft über die Verteilung der Einzelwerte und veranschaulichen die vorhandenen Trends.