4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

Chemikalien

Chloramin T	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
CHX-A''-DTPA (= Cyclohexyl-diethylentriaminpentaessigsäure)	(Ludwig Institute, Melbourne, Australien)
Ethanolamin	(Pharmacia Biosensor, Uppsala, Schweden)
EDTA (pH 7.0)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
fetales Kälberserum	(CSL Biosciences, Melbourne, Australien)
Ficoll 1,077 g/ml	(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
Glutamin	(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA)
HCl	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
HEPES	(Sigma, Deutschland)
Hydroxysuccinimide (NHS)	(Pharmacia Biosensor, Uppsala, Schweden)
Hypaque 1,119 g/ml	(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
Kalium-Phosphat	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natrium-Bikarbonat	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natrium-Chlorid	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natrium-Acetat	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl-carbodiimide (EDC),	(Pharmacia Biosensor, Uppsala, Schweden)
Natrium-Hydroxid	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natrium-Metabisulphid	(BDH Chemicals, Victoria 3137, Australien)
PBS	(Ludwig Institute, Melbourne, Australien)
Penicillin-Streptomycin	(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA)
RPMI 1640 Nährmedium	(Ludwig Institute, Melbourne, Australien)
Trichloressigsäure	(Merck, Darmstadt, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien

Carboxymethyldextran Sensor Chip CM5	(Pharmacia Biosensor, Uppsala, Schweden)
Chelex 100 Säule	(Bio-Rad, Australien)
Dialysetasche Cut-off von 10.000 kD (Novex, Sydney, Australien)	
Micro-Spin Chromatography Column (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)	
Polyacrylamid-Gel (P-6 DG)	(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)
Silica Gel Glass Fiber Sheets	(Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, USA)

Superdex 200 HR10/30 Säule (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Superose 12 HR 3.2/30 size-exclusion Säule
(Pharmacia Biosensor, Uppsala, Schweden)

Puffer

HBS:

10mM HEPES; 3,4mM EDTA; 150mM NaCl; pH 7,4

Kaliumphosphat Puffer:

0,5 M KPO_4 ; pH 7,2

Natrium-Bikarbonat Puffer:

50 mM Natrium-Bikarbonat; pH 8,6

Natrium-Acetat Puffer:

20 mM Natrium-Acetat Puffer; 0,15 M NaCl; pH 6,3

Nuklide

125 I (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA)

131 I (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA)

111 In (Dupont, Life Science Products, Boston, USA)

4.1.2 Geräte

mikropräparativer HPLC (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
SMART μ HPLC system (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
BIAcore 2000 TM Biosensor (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Schweden)
Dual Chamber
Gamma Scintillation Counter (Modell: Cobra II, Model 5002, Auto-gamma,
Packard Instruments, Canberra, Australien)
Packard Radiomatic Flow One (Packard Instruments, Canberra, Australien)
Mikrowaage (Sartorius Basic Balance, Deutschland)
Beckman System Gold Detector (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)

4.1.3 Software

SigmaPlot Vers. 3.0 (SigmaPlot for Windows, Jandel Scientific,
San Rafael, CA, USA)
BIAevaluation Version 3.0 Software
(Pharmacia Biosensor, Uppsala, Schweden)

4.1.4 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

L540CY	(Onkologisches Labor, Homburg, Deutschland)
SW1222	(Ludwig Institute, New York, USA)

Die L540CY-Zelllinie ist eine CD30-positive und A33-negative humane Hodgkin-Tumor-Zelllinie. Die L540CY-Zellen wurden bereits früher ausführlich beschrieben und charakterisiert [DIEHL V et al. 1990]. Die Zellen wurden vom Onkologischen Labor der Universitätskliniken des Saarlandes, Innere Medizin I, Homburg, Deutschland, bereitgestellt.

Die SW1222-Zelllinie ist eine CD30-negative und A33-positive humane Kolonkarzinom-Zelllinie. Eine Beschreibung der SW1222-Zellen findet sich bei Heath und Mitarbeitern [HEATH JK et al. 1997]. Die SW1222-Zellen wurden vom Ludwig Institute in New York bereitgestellt. Diese Zellen dienten als Negativkontrolle.

4.1.5 Antikörper und Antigene

In dieser Arbeit wurden folgende Antikörper und Antigene verwendet:

A33-Antikörper	(Ludwig Institute, Melbourne, Australien)
A9; anti-CD16-Antikörper	(Onkolog. Labor, Homburg, Deutschland)
HRS-3; anti-CD30-Antikörper	(Onkolog. Labor, Homburg, Deutschland)
BimAb; anti-CD16/CD30-Antikörper	(Onkolog. Labor, Homburg, Deutschland)
Rabbit anti-Maus IgG-FITC	(Dako, Glostrup, Dänemark)
CD30-Antigen	(Onkolog. Labor, Homburg, Deutschland)
CD16-Antigen	(Institut Curie, Paris, Frankreich)

4.1.5.1 anti-CD16-Antikörper: A9

Hierbei handelt es sich um einen murinen monoklonalen Antikörper, der mit seinen beiden F(ab)-Fragmenten an das CD16-Antigen bindet. Der Antikörper wurde bereits bei Hombach und Hartmann ausführlich beschrieben [HARTMANN F et al. 1997, Hombach A et al. 1993]. Dieser Antikörper wurde freundlicherweise vom Onkologischen Labor der Innere Medizin I der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg bereitgestellt.

4.1.5.2 anti-CD30-Antikörper: HRS-3

Hierbei handelt es sich um einen murinen monoklonalen Antikörper, der mit beiden F(ab)-Fragmenten an das CD30-Antigen bindet. Der Antikörper wurde bereits bei Hartmann und Hombach ausführlich beschrieben [Hartmann et al. 1997, Hombach et al. 1993]. Dieser Antikörper wurde freundlicherweise vom Onkologischen Labor der Innere Medizin I der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg bereitgestellt.

4.1.5.3 Bispezifischer anti-CD16/anti-CD30-Antikörper: BimAb

Hierbei handelt es sich einen monoklonalen murinen IgG1 Antikörper, der mit einem F(ab)-Fragment an das CD16-Antigen und mit dem anderen F(ab)-Fragment an das CD30-Antigen bindet. Der BimAb wurde ebenfalls bei Hartmann und Hombach ausführlich beschrieben [Hartmann F et al. 1997, Hombach A et al. 1993]. Der Antikörper wurde durch Tetradomzell-Technik gewonnen. Die Herstellung dieses Antikörpers erfolgt durch Biotest Pharma GmbH (Biotest, Dreieich, Deutschland) und wurde freundlicherweise vom Onkologischen Labor der Innere Medizin I der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg bereitgestellt.

4.1.5.4 A33-Antikörper

Der Antikörper A33 ist ein monoklonaler muriner IgG2a Antikörper. Er ist gegen ein Antigen gerichtet, das in 95% aller kolorektalen Karzinome gefunden wird. Der A33-Antikörper diente als Kontrollantikörper. Dieser Antikörper wurde freundlicherweise vom Ludwig Institute in Melbourne, Australien, bereitgestellt. Die Charakteristika dieses Antikörpers sind bei Welt, King und Catimel beschrieben [WELT S et al. 1990, King DJ et al. 1995, CATIMEL B et al. 1996].

4.1.5.5 FACS-Antikörper

Als sekundärer Antikörper zur FACS-Analyse diente der Rabbit-anti-Maus IgG-FITC (Dako, Dänemark). Dieser Antikörper bindet an die Fc-Fragmente der Antikörper A33, HRS-3, A9 und BimAb.

4.1.6 Antigene

4.1.6.1 CD30-Antigen

Das rekombinante CD30-Antigen wurde im Onkologischen Labor der Innere Medizin I der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dieses Antigen wurde bereits in der Literatur ausführlich beschrieben [RENNER C et al. 1995].

4.1.6.2 CD16-Antigen

Das rekombinante CD16-Antigen wurde freundlicherweise von Dr. C. Sautes, Institut Curie, Paris, Frankreich, bereitgestellt.

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen in einem RPMI 1640 Nährmedium (Ludwig Institute, Melbourne, Australien) mit einem Zusatz von 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (CSL Biosciences, Melbourne, Australien) gehalten. Das Serum wurde durch Hitze inaktiviert. Diesem Medium wurden 2 mM Glutamin und 50 units/ml Penicillin-Streptomycin (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) zugesetzt. Der Austausch des Nährmediums erfolgte in Abhängigkeit des Zellwachstums. Zur Erzeugung der notwendigen atmosphärischen Bedingungen diente ein wasserdampfgesättigter Inkubator mit 5 %-iger CO₂-Begasung und einer Temperatur von 37 °C. Die Vitalität der Zellen wurde mittels der Trypan-Blau-Methode bestimmt. Sie betrug für alle Experimente über 90%.

4.2.2 Separation peripherer Granulozyten

Zur Bestimmung der anti-CD16 Bindungseigenschaften der einzelnen Antikörper wurden CD16-exprimierende Granulozyten aus menschlichem Vollblut gewonnen. Die Granulozyten wurden aus EDTA-Blut (0,1% EDTA) gesunder Spender mittels Dichtezentrifugation isoliert. In 15 ml-Falcon-Röhrchen wurden 3 ml Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) mit 3 ml Ficoll (Sigma Chemical Co., St. Louis,

USA) und dann mit 5 ml EDTA-Blut überschichtet und 60 min bei 1200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich zwischen Serum und Ficoll eine Zellschicht mit peripheren Blutmonozyten (PBMC) und unterhalb der Ficoll-Schicht eine Granulozytenphase. Diese Granulozytenphase wurde mit einer Pipette abgezogen, 3 mal in PBS (Ludwig Institute, Melbourne, Australien) gewaschen und bei 4°C gelagert [KALMAR J R et al. 1988]. Aufgrund der Limitation der Granulozyten konnten nur die FACS-Analysen durchgeführt werden.

4.2.3 FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescent activated cell sorting (FACS)) lassen sich Antigene, gebundene Antikörper und Antikörperfragmente auf vitalen Zellen nachweisen. Hierfür werden spezifische fluoreszenz-markierte Antikörper eingesetzt. Die Farbstoffe werden im Durchflusszytometer durch einen Lichtstrahl mit der Wellenlänge 488 nm zur Lichtemission angeregt. Photodetektoren registrieren selektiv die von den unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Wellenlängen. Das Prinzip beruht darauf, dass das emittierte Licht durch Spiegel weitergeleitet und an Photomesszellen gemessen wird. Diese Messzellen befinden sich hinter spezifischen Filtern, die jeweils nur eine bestimmte Wellenlänge passieren lassen. Die charakteristischen Emissionsbereiche liegen für Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bei 530 nm, für Phycoerythrin (PE) bei 585 nm und für Propidiumjodid (PI) bei 650 nm. Das aufgefangene Emissionssignal wird verstärkt und als Zählimpuls registriert [PARKS DR et al. 1984].

Durch die spezifische Bindung der markierten Antikörper lassen sich unterschiedliche Antigene nachweisen. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines markierten Antikörpers als sekundärer Antikörper. Somit lässt sich die Bindung eines primären Antikörpers nachweisen. Zu diesem Zweck wurde die FACS-Analyse in dieser Arbeit eingesetzt.

Zur FACS-Analyse wurden jeweils 1 Mio. Zellen (Granulozyten, L540CY- oder SW1222-Zellen) verwendet. Die Zellsuspension wurde 10 min zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl (Konzentration 10 µg/ml) des primären Antikörpers (HRS-3, A9, BimAb, A33) für 30 min bei 4°C (zur Vermeidung der Internalisierung der gebundenen Antikörper) inkubiert. Diese Suspension wurde zweimal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Es erfolgte die Inkubation über 30 min bei 4°C mit 100 µl (1:40 verdünnt) sekundärem FITC-markierten Antikörper. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS und die Analyse im Durchflusszytometer.

4.2.4 Plasmon Resonance analysis (BIAcore)

Prinzip: Mit dem BIAcore-Verfahren können die Affinitäten definierter Moleküle bestimmt werden. Zur Bestimmung der Affinität einzelner Antikörper wird das entsprechende Antigen auf einen Sensorchip aufgebracht und chemisch gebunden. Anschließend wird der zu messende Antikörper in verschiedenen Konzentrationen an diesem Chip vorbeigeleitet und durch einen Spülvorgang wieder entfernt. Der Sensorchip befindet sich in einer optischen Zelle und wird mit polarisiertem Licht bestrahlt. Dieses Licht wird durch den Chip und das auf diesem Chip gebundene Antigen reflektiert. Das reflektierte Licht wird detektiert und gemessen. Nach Zugabe des entsprechenden Antikörpers kommt es zu einer Antigen-Antikörper-Bindung und damit zu einer Änderung des reflektierten polarisierten Lichts. Diese Änderung wird gemessen und dient der Beschreibung des Bindungsverhaltens.

Gemessen wird die optische Reflexion zu Beginn und während des Vorbeiströmens einer konstanten Antikörpermenge sowie die Änderungen während des Ablösevorgangs durch die Spülung mit Pufferlösung. Die Messungen wurden jeweils mit steigenden Antikörperkonzentrationen durchgeführt. Aus diesen Daten lassen sich die Affinitätskonstanten ermitteln.

Für die Analysen wurde der BIAcore 2000 TM Biosensor (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Schweden) [NICE EC et al. 1999] verwendet. Der mit Carboxymethyldextran beschichtete Sensorchip CM5 und die Bindungsreagenzien N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl-carbodiimide (EDC), Hydroxysuccinimide (NHS) und Ethanolamin wurden von Pharmacia Biosensor bezogen.

Die CD30- und CD16-Antigene und die dazugehörigen monoklonalen Antikörper wurden direkt vor dem Gebrauch aufgereinigt. Hierzu diente eine mikropreparative HPLC-Anlage mit einer Superose 12 HR 3.2/30 Size-Exclusion-Säule (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Diese wurde in HBS-Puffer (10mM HEPES (pH 7.4), 3.4mM EDTA, 150mM NaCl) equilibriert, um die notwendige Homogenität zu gewährleisten. Die Säule wurde mit einem SMART μ HPLC System (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verbunden und mit einem Fluss von 100 μ l/min eluiert. Die verschiedenen Konzentrationen der monoklonalen Antikörper wurden durch die Absorption von ultra-violettem Licht bei 280 nm bestimmt (Beckman System Gold Detector, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

Die CD16- und CD30-Antigene wurden mit Hilfe der Bindungsreagenzien NHS und EDC auf der Oberfläche des Sensorchips gemäss Standardprotokoll fixiert. Die aufgereinigten Antikörper wurden kurz vor der Untersuchung mit HBS-Puffer auf 1 mg/ml verdünnt. Die fertigen Antikörperlösungen wurden in einem Volumen von 30 μ l mit einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert und über die Sensor-Oberfläche geleitet. Nach Abschluss der Injektionsphase wurde die Dissoziation unter Verwendung von

HBS-Puffer für 360 Sekunden mit der gleichen Flussrate beobachtet. Der restliche gebundene Antikörper wurde abgelöst und die Oberfläche zwischen den Injektionen mit 30 µl 10 mM NaOH regeneriert. Äquivalente Messsignale nach Re-Injektionen von Antikörperproben zeigten, dass die Sensoroberfläche nicht durch diese Behandlung denaturiert wurde.

Die Bindungsdaten wurden während des Vorbeiströmens verschiedener Antikörperkonzentrationen (20, 40, 60, 80 und 100 nM) an fixiertem CD16- bzw. CD30-Antigen erstellt. Für die Antikörper A9, HRS-3 und BimAb, die eine monovalente Bindung zeigen sollte, wurden die Affinitätskonstanten mit Hilfe der BIAevaluation Software Version 3.0 berechnet.

Die Präparation, Messung und Auswertung der BIAcore-Daten wurde freundlicherweise von Herrn B. Catimel, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

4.2.5 Radioaktive Markierung und Reinigung der Antikörper

4.2.5.1 Allgemeine Einführung

Die Antikörper wurden nach den unten beschriebenen Verfahren entweder mit ^{125}I , ^{131}I oder ^{111}In radioaktiv markiert. Nach der Markierung wurde das überschüssige, nicht gebundene Nuklid durch einen Reinigungsschritt entfernt. In weiteren Tests wurde die Funktionalität und die Affinität der Antikörper nach der radioaktiven Markierung überprüft. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mit den entsprechenden Programmen des Gamma-Counters.

4.2.5.2 Gamma-Counter

Zur Analyse diente ein Dual-Gamma-Scintillation-Counter (Modell: Cobra II, Model 5002, Packard Instruments, Australien). Zur Auswertung der Analysen wurden die Messprogramme des Gamma-Counters abhängig vom Isotop und dem Messvolumen nach Angaben des Herstellers verwendet. So fanden beispielsweise für die ITLC-Messung Programm Nr. 3 für ^{125}I 0,2 – 0,5 ml, für die Inhibitionsversuche Programm Nr. 30 für ^{125}I und ^{131}I bis 0,2 ml und zum Messen der Gewebeproben Programm Nr. 32 für ^{125}I und ^{131}I 0,5 und 1,5 ml Verwendung.

4.2.5.3 Nuklide

Der anti-CD30-Antikörper HRS-3 und der bispezifische anti-CD16/anti-CD30-Antikörper BimAb wurden sowohl mit ^{125}I -, ^{131}I - als auch mit ^{111}In -Isotope markiert. Das Radiolabeling wurde entweder am Tag der Experimente oder vor Injektion in die Versuchstiere durchgeführt.

Die Nuklide zeigten folgende Charakteristika:

^{125}I : Halbwertszeit: 59,41 Tage, Gamma-Strahler

^{131}I : Halbwertszeit: 8,02 Tage, Beta- u. Gamma-Strahler

^{111}In : Halbwertszeit: 2,61 Tage, Gamma-Strahler [Karlsruher Nuklidkarte]

4.2.5.4 Markierung mit Jod

Die Radiojodination wurde mit einer modifizierten und früher veröffentlichten Chloramin-T-Reaktion von Bolton und Hunter durchgeführt [HUNTER WM et al. 1962]. Hierbei wird Jod an die Aminosäure Tyrosine oxidativ gebunden. Zuvor wurden Versuchsreihen mit unterschiedlichen Chloraminkonzentrationen durchgeführt, um das beste Verhältnis zwischen Antikörper, Chloramin T und Jod zu ermitteln. Ziel war eine ausreichende Aktivität bei niedriger Chloraminkonzentration. Aus diesen Vorversuchen ergaben sich folgende Reaktionsbedingungen, um eine optimale Antikörper-Markierung zu erreichen:

Chloramin T (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde mit Kaliumphosphat-Puffer (0,5 M KPO_4 , pH 7,2) auf die Konzentration 0,12 mg/ml eingestellt. Natrium-Metabisulphid (BDH Chemicals, Victoria 3137, Australien) wurde mit Kaliumphosphat-Puffer (0,5 M KPO_4 , pH 7,2) auf die Konzentration 0,6 mg/ml eingestellt. Der Antikörper wurde ebenfalls in Kaliumphosphat-Puffer (0,5 M KPO_4 , pH 7,2) gelöst. Zu 50 μl Antikörper (1,3 mg/ml) wurden 6 μl ^{125}I (= 320 μCi) und 2,5 μl Chloramin T-Lösung zugeben. Chloramin T wurde somit im 2,5-fachen Überschuss zugegeben. Die Reaktion wurde nach 2 Minuten durch Zugabe von 1,3 μl Natrium-Metabisulphid-Lösung unterbrochen und für weitere 2 Minuten ruhen gelassen. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über eine vorbereitete Reinigungs-Säule gereinigt. Mit dieser Methode wurde sowohl ^{125}I als auch ^{131}I an die jeweiligen Antikörper gebunden.

Die Trennung des nicht gebundenen Nuklids vom radioaktiv markierten Antikörper erfolgte über eine mit Gel gefüllte Säule. Das Nuklid verblieb in der Säule, der radioaktiv markierte Antikörper wanderte durch die Säule und erschien im Eluat. In eine Micro-Spin Chromatography Säule (Bio-Rad, Australien) wurden 900 μl Polyacrylamid-Gel (P-6 DG, Bio-Rad, Australien) eingefüllt und 1 Minute bei 140 g zentrifugiert. Die Säule wurde dreimal mit 600 μl PBS gewaschen und eine Minute

zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 60 µl PBS gefüllt, drei Minuten mit 140 g zentrifugiert, erneut mit 60 µl PBS befüllt und weitere drei Minuten bei 380 g zentrifugiert. Die radioaktiv markierte Antikörperlösung wurde auf die Oberfläche der Säule aufgebracht und drei Minuten bei 380 g zentrifugiert. Das Eluat, das den aufgereinigten und markierten Antikörper enthielt, wurde in einem 1,5 ml großen Eppendorf-Röhrchen aufgefangen.

4.2.5.5 Markierung mit Indium

Prinzip: Indium wird im Gegensatz zu Jod nicht direkt an den Antikörper gebunden, sondern über einen Chelat-Komplex gekoppelt. Die Kopplung des Indiums an den Antikörper besteht aus zwei Reaktionen. Die erste Reaktion ist die kovalente Bindung des Chelators an den Antikörper und die zweite Reaktion ist die Chelatierung des Indiums. CHX-A''-DTPA (Cyclohexyl-diethylentriaminpentaessigsäure) hat sich für die Chelatierung von Nukliden wie ^{111}In oder ^{90}Y bewährt. Die Antikörpermarkierung mit ^{111}In wurde unter Verwendung von CHX-A''-DTPA nach einer modifizierten Methode von Wu und Nikula durchgeführt [NIKULA TK et al. 1995, WU C et al. 1997]. Das bifunktionelle Chelat CHX-A''-DTPA verfügt über eine freie Thioharnstoffgruppe, die mit den freien NH_2 -Gruppen der Lysinketten des Antikörpers eine stabile Schwefelbrückenbindung eingeht. Bei der Herstellung des Antikörper-Chelat-Konjugates wurden metallfreie Chemikalien und Gefäße verwendet. Bei allen Lösungen wurden eventuelle Metallverunreinigungen mittels einer Chelex 100-Säule (Bio Rad, Australien) entfernt. Alle Reaktionen wurden in metallfreien Kunststoffgefäßen durchgeführt.

Zu Beginn wurde eine Konzentration von 5 mg/ml Antikörperlösung hergestellt. Ein aus einer Membran bestehender Dialysebeutel mit einer Porengröße von 10.000 kD (Novex, Sydney, Australien) wurde mit 10 mM Natrium-Bikarbonat (NaHCO_3) gespült und mit deionisiertem Wasser und EDTA-Lösung (1 mM EDTA, pH 7.0) durchnässt um Schwermetalle zu entfernen. Die Antikörperlösung wurde gegen Natrium-Bikarbonat Puffer (50 mM NaHCO_3 , 0,15 M NaCl, pH 8.6) für sechs Stunden dialysiert. Das Verhältnis zwischen der Antikörperlösung und dem Natrium-Bikarbonat-Puffer betrug 1:200. Die Lösung wurde während der Dialyse einmal gewechselt.

CHX-A''-DTPA wurde in einem molaren Überschuss im Verhältnis 5:1 zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur und geschützt vor Licht inkubiert. Der Überschuss an ungebundenem Chelat wurde durch eine acht Stunden dauernde Dialyse mit Natrium-Acetat-Puffer (20 mM Natrium-Acetat, 0,15 M NaCl, pH 6,3) entfernt.

Das ^{111}In wurde in einem zweiten Schritt an das CHX-A''-DTPA-Antikörper-Konjugat gebunden. Hierzu wurde die Lösung mit 1 M HCl leicht angesäuert (pH 5,5)

und für 20 Minuten ruhen gelassen. Dann wurde der pH-Wert durch die Zugabe kleiner Mengen an 2,0 M Natrium-Acetat auf 7,0 angehoben. Anschließend wurden 10 mM EDTA zugegeben, um ungebundenes ^{111}In zu binden. Zur Entfernung überschüssiger Nuklide und zur Umpufferung wurde das radioaktiv markierte Gemisch durch Zentrifugieren mit einer Sephadex-G50-Säule (Sigma Chemical Co, St Louis, USA) gereinigt. Die Säule wurde zuvor mit PBS äquilibriert.

Die Chelatierung und Markierung mit Indium wurde freundlicherweise von Herrn F.T. Lee, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne durchgeführt.

4.2.5.6 Instant Thin Layer Chromatography (ITLC)

Vor der Verwendung der markierten Antikörper wurde der Gehalt nicht gebundener Radionuklide mittels Dünnschichtchromatographie (ITLC = instant thin layer chromatography) [NIKULA TK et al. 1995, SHIH LB et al. 1994] ermittelt. Dabei wurde auf einen mit Silikon-Gel imprägnierten Papier-Streifen (Silica Gel Impregnated Glass Fiber Sheets, Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, USA) 2 μl radioaktiv markierter Antikörper aufgetragen. Dieser Streifen wurde in einem 50 ml Röhrchen mit 900 μl 10%iger Trichloressigsäure (Sigma, Deutschland) gegeben und verschlossen. Nach drei Minuten wurde der Papierstreifen entnommen und halbiert. Die obere und untere Hälfte des Papierstreifens wurden getrennt und im Gamma-Counter (CobraTM II, Packard Instruments, Australien) einzeln gemessen. Freies Nuklid und nicht proteingebundene Chelatkomplexe liefen mit der Front des Lösungsmittels in die obere Hälfte des Streifens. Proteingebundene Nuklide verblieben in der unteren Hälfte [LINDMO T et al. 1984].

4.2.5.7 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die Integrität des Antikörpers nach dem Prozess der radioaktiven Markierung wurde mit einer *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) untersucht. Die Proben wurden an einer Superdex 200 HR10/30 Säule (Amersham Pharmacia) mit 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM Natrium-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,0) und einem Fluß von 0,5 ml/min eluiert. Eluierte radioaktiv-markierte Antikörper wurden durch UV-Absorption bei 280 nm an einem Beckman System Gold Detector (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) detektiert. Die Radioaktivität wurde am einem Beta-Detektor (Packard Radiomatic Flo-One, Packard Instruments, Australien) gemessen.

4.2.6 In-Vito-Bindungsuntersuchungen

Das Markieren der Antikörper mit Nukliden kann die Antikörper und deren Bindungseigenschaften negativ beeinflussen. Um die Bindungsfähigkeit der radioaktiv-markierten Produkte zu untersuchen, wurden verschiedene Bindungstests durchgeführt. Durch Scatchard-Analysen wurden die Bindungskonstanten (K_a) der markierten Antikörper ermittelt.

4.2.6.1 Einzelpunktmessung (single point assay)

Hierbei handelt es sich um einen einfachen Test zur Kontrolle der Bindungseigenschaften nach den chemischen Prozessen der radioaktiven Markierung. In einem Eppendorf-Röhrchen wurden 10^7 Zellen (Granulozyten oder L540-Zellen) entweder nur mit 20 ng radioaktiv-markiertem Antikörper oder mit 20 ng radioaktiv-markiertem Antikörper und 20 μ g unmarkiertem Antikörper inkubiert. Bei diesem Versuch handelt es sich um eine modifizierte Methode nach Nikula [NIKULA et al. 1999]. Die Zellsuspension wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotor inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Das abzentrifugierte Zellpellet wurde im Gamma-Counter gemessen. Zwei Suspensionen mit 20 ng markiertem Antikörper wurden gleichzeitig mit den Zellpellets als Standard gemessen. Die Bindung wurde als Prozentzahl in bezug auf den markierten Antikörper-Standard angegeben.

4.2.6.2 Lindmo-Assay

Der Test nach Lindmo ist ein Bindungstest für radioaktiv-markierte monoklonale Antikörper. Durch die chemischen Prozesse der radioaktiven Markierung können die Bindungseigenschaften der Antikörper geändert werden. Mit dem Test nach Lindmo wird die Menge der Antikörper bestimmt, die nach der radioaktiven Markierung weiter immunologisch aktiv ist. Die Fraktion wird durch die lineare Extrapolation unter Annahme eines unendlichen Antigenüberschusses bestimmt [LINDMO T et al. 1984]. Der Test basiert auf einer doppelt inversen Darstellung der Bindungsdaten, die als eine Modifikation des Lineweaver-Burk Plot bezeichnet werden könnte.

Das Gleichgewicht zwischen Antikörper und Antigen ist bei idealen Reaktionsbedingungen durch das Massengesetz bestimmt:

$$[1] \quad [B_{ak}] = K_A [F_{ag}] [T_{ak}-B_{ak}]$$

$[B_{ak}]$ = gebundener Antikörper, $[T_{ak}]$ = Gesamtmenge des Antikörpers,
 $[T_{ak}-B_{ak}]$ = ungebundener Antikörper, K_A = Assoziationskonstante,
 $[F_{ag}]$ = freies Antigen

Unter der Voraussetzung, dass nicht die gesamte eingesetzte Antikörpermenge bindet, sondern nur noch der Anteil, der nach der radioaktiven Markierung immunologisch aktiv ist, ändert sich die Gleichung wie folgt:

$$[2] \quad [B_{ak}] = K_A [F_{ag}] [rT_{ak}-B_{ak}]$$

$[r]$ steht für die Fraktion des markierten Antikörpers, der noch immunologisch reaktiv ist.

Diese Gleichung kann folgendermaßen umgeformt werden:

$$[3] \quad [T_{ak}]/[B_{ak}] = (1/r) + (1/r K_A [F_{ag}])$$

$[T_{ak}]/[B_{ak}]$ als Funktion von $1/[F_{ag}]$ ergibt eine Gerade. Der Ursprung der Abszisse repräsentiert unendlichen Antigenüberschuss und entspricht dem Wert $1/r$.

Nach Auftragen der Daten laut der umgeformten Gleichung [3] und Extrapolation der Geraden, ergibt der Schnitt mit der Ordinaten den inversen Wert der immunologisch aktiven Fraktion r . Dieser Wert wird als Immunoreaktivität (IR) des markierten Antikörpers bezeichnet. Er ist eine wichtige Grundlage zur Berechnung der Assoziationskonstanten durch die Scatchard-Methode [LINDMO T et al. 1986, CLARKE K et al. 2000].

4.2.6.3 Praktische Durchführung des Lindmo-Assay

Verschiedene Zellkonzentrationen wurden mit einer konstanten Menge an markierten Antikörpern inkubiert. Dafür wurden mehrere Zellsuspensionen in unterschiedlichen Konzentrationen mit jeweils 10; 7,5; 5; 2,5; 1,87 und 1,25 Millionen Zellen in jeweils 1 ml Medium angelegt. Alle Suspensionen wurden dreifach angelegt und das Ergebnis als Mittelwert angegeben. Jede Probe wurde mit 20 ng radioaktiv-markiertem Antikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotor inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 290 g für zwei Minuten zentrifugiert und dreimal mit Nährmedium gewaschen. Die Radioaktivität der Zellpellets wurde mit dem

Gamma-Counter (Cobra™ II, Model 5002, Auto-gamma, Packard Instruments, Canberra, Australien) gemessen. Als Standardreferenzwert diente wie zuvor eine Lösung mit 20 ng markiertem Antikörper.

Die Radioaktivität der an den L540CY-Zellen gebundenen Antikörpern wurde als Prozentangabe bezogen auf den Standardreferenzwert angegeben. Diese gemessene Prozentzahl wurde gegen die L540CY-Zellkonzentration aufgetragen. Die Zellkonzentration und die Bindung in Prozent wurden graphisch invers aufgetragen, so dass auf der Abszisse die Werte $1/\text{Zellkonzentration}$ und auf der Ordinate die Werte $1/\text{Bindung}$ in Prozent des markierten Antikörpers aufgetragen wurden. Anschließend wurde eine Regressionsgerade durchgelegt. Die Regressionsgerade wurde mit dem Programm SigmaPlot Vers. 3.0 (SigmaPlot for Windows, Jandel Scientific, USA) berechnet und graphisch dargestellt. Der Y-Achsenabschnitt dieses Schaubildes entspricht laut Lindmo der Immunoreaktivität (IR) des markierten Antikörpers.

Zur Bestimmung der Hintergrundstrahlung wurden Zellpellets gemessen, zu denen vor der Zugabe des markierten Antikörpers unmarkierter Antikörper im 100-fachen Überschuss zugegeben wurde. Die Messergebnisse zeigten, dass die Hintergrundstrahlung vernachlässigt werden konnte.

4.2.6.4 Inhibitionsversuche

Um die Affinität der radioaktiv markierten Antikörper vergleichen zu können, wurden direkte Inhibitionsversuche durchgeführt. Zu einer konstanten Zellzahl wurde zu einer steigenden Menge an nicht-markierten Antikörpern eine konstante Menge an markierten Antikörpern zugegeben. Die Menge an unmarkierten Antikörpern lag deutlich über der Menge des markierten Antikörpers. Die geeignete Zellzahl für eine optimale Bindung wurde aus den zuvor durchgeführten Lindmo-Versuchen bestimmt. Die ideale Zellzahl lag für den HRS-3 bei einer Million Zellen und für den BimAb bei 1,6 Millionen Zellen.

Pro Versuchsansatz wurden nicht-markierte Antikörper (HRS-3, BimAb oder A9) in der Konzentration von 0,1 ng; 1 ng; 10 ng; 100 ng; 1 µg; 5 µg und 10 µg sowie jeweils 20 ng des radioaktiv markierten Antikörpers (HRS-3 oder BimAb) zugegeben. Die Suspension wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur und langsam rotierend inkubiert, anschließend bei 290 g für 2 Minuten zentrifugiert und dreimal mit Medium gewaschen. Die Radioaktivität der Zellpellets wurde mit dem Gamma-Counter (Cobra™ II, Model 5002, Auto-gamma, Packard Instruments, Canberra, Australien) gemessen. Auch hier wurde für jede Probe ein dreifacher Ansatz angelegt und die Werte als Mittelwert angegeben.

4.2.6.5 Scatchard-Analyse

Zur Berechnung der Assoziationskonstanten (K_A) radioaktiv-markierter Antikörper wurden Scatchard-Analysen durchgeführt. Die Grundlage dieser Analyse bildet die unten aufgeführten Beziehungen zwischen Liganden und Rezeptoren, beziehungsweise zwischen Antikörpern und Rezeptoren. Die Interaktion zwischen Antikörper und Rezeptor kann durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) bestimmt werden. Sie stellt ein Maß für die Affinität des Antikörpers zum Rezeptor dar.

Die Messgröße Rezeptor-Antikörper-Komplex [RAK] kann bei konstanter Rezeptorkonzentration [R] als Funktion der Antikörperkonzentration [Ak] ermittelt werden. Die Interaktion eines Antikörpers mit seiner Bindungsstelle kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$[4] \quad [R] + [Ak] = [RAK]$$

Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Dissoziationskonstante (K_D) folgendermaßen definiert:

$$[5] \quad K_D = [R] * [Ak] / [RAK]$$

Die totale Rezeptorkonzentration [R_T] ergibt sich hierbei aus der freien Rezeptorkonzentration [R] und der Konzentration der im Komplex gebundenen Rezeptoren [RAK].

Hieraus folgt:

$$[6] \quad [R_T] = [R] + [RAK]$$

Aus den Gleichungen [4], [5] und [6] lässt sich die folgende Gleichung [7] herleiten:

$$[7] \quad [RAK] = [R_T] * [Ak] / (K_D + [Ak])$$

Zur Ermittlung von K_D und [RAK] durch die Darstellung einer Regressionsgeraden muss die entstehende Bindungskurve in eine lineare Form gebracht werden. Die Linearisierung der Bindungsdaten basiert hierbei auf den Verfahren von Scatchard [SCATCHARD G 1949, BOVEN E et al. 1986] für die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen.

Die Scatchard-Gleichung lässt sich aus der Gleichung [7] ableiten:

$$[8] \quad [RAK] / [AK] = - 1 / K_D * [RAK] + 1 / K_D * [R_T]$$

$[R_T]$ = Gesamtkonzentration der Rezeptoren

$[AK]$ = Konzentration des freien, nicht gebundenen Antikörpers

$[RAK]$ = Konzentration des Rezeptor-Antikörper-Komplexes

$[K_D]$ = Dissoziationskonstante

In der Literatur hat sich folgende Nomenklatur etabliert:

$[RAK]$ = Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplex $[RL]$

= B (*bound* oder *specific bound*)

$[AK]$ = Konzentration an freiem Radioliganden $[L]$

= F (*free* oder *reactive free*)

$[R_T]$ = B_{max} (*maximal number of binding sites*)

Somit ergibt sich

$$[9] \quad B / F = - 1 / K_D * B + 1 / K_D * B_{max}$$

Der Scatchard-Plot lässt sich durch graphisches Auftragen der Konzentration des gebundenen Liganden (B) gegen den Quotienten aus gebundenen und freien Liganden (B/F) erstellen. Die Steigung der Geraden ergibt den negativ reziproken Wert der Dissoziationskonstanten K_D . Der Schnittpunkt mit der Abszisse ergibt die Menge der Bindungsstellen (B_{max}). Der reziproke Wert von K_D entspricht der Assoziationskonstanten K_A .

4.2.6.6 Durchführung und Darstellung der Scatchard-Analysen

Die Versuchsanordnung wurde nach der bei Collert und Clarke beschriebenen Methode durchgeführt [COLLET B et al. 1993, CLARKE K et al. 2000]. Jeder Versuchsansatz wurde als Triplett angelegt und die Ergebnisse als Mittelwert angegeben. In 1 ml Volumen wurden verschiedene Mengen nicht-markierter Antikörper und jeweils 20 ng markierter Antikörper gemischt. Die verwendeten Mengen des nicht-markierten Antikörpers waren: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 μg . Diese Antikörperlösungen wurde zu L540CY-Zellen zugegeben. Als geeignete Zellzahl wurde die Menge an Zellen verwendet, bei der 50 % der maximal möglichen Lindmo-Sättigung erreicht wurde. Diese betrug für den HRS-3 Antikörper eine Millionen und für den BimAb 1,6 Millionen L540CY-Zellen.

Die Suspension wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem langsam rotierenden Rotor inkubiert anschließend bei 290 g für 2 Minuten zentrifugiert und

dreimal mit RPMI-Medium gewaschen. Die Radioaktivität der Zellpellets wurde mit dem Gamma-Counter (Cobra™ II, Packard Instruments) gemessen. Auch hier dienten 20 ng des markierten Antikörpers als Referenzstandardwert. Die gemessene Aktivität im Zellpellet wurde als Verhältnis der Aktivität bezogen auf diesen Referenzstandardwert angegeben. Sie ist somit ein Maß für die gebundene Antikörpermenge.

Die Werte **B** und **F** der Gleichung [9] werden im weiteren Verlauf in Anlehnung an die Literatur als

SPEZIFISCH GEBUNDEN für **B** (= *specific bound*) und als
REAKTIV FREI für **F** (= *reactive free*) angegeben.

SPEZIFISCH GEBUNDEN berechnet sich aus dem Verhältnis des gebundenen Anteils im Vergleich zum Standardreferenzwert multipliziert mit der eingesetzten Antikörpergesamtmenge in nM.

FREI REAKTIV berechnet sich als Differenz der Antikörpergesamtmenge und dem SPEZIFISCH GEBUNDENEN Anteil multipliziert mit IR. IR ist der Anteil der nach radioaktiver Markierung immunologisch reaktiven Fraktion. Dieser Wert wurde zuvor aus der Versuchsanordnung nach Lindmo bestimmt.

Zur Darstellung werden auf der Abszisse die Werte SPEZIFISCH GEBUNDEN und auf der Ordinate die Werte SPEZIFISCH GEBUNDEN / REAKTIV FREI gegeneinander aufgetragen. Im Anschluss wird eine Regressionsgerade durch die abgebildeten Punkte gefällt. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dem negativ reziproken Wert der Gleichgewichtskonstanten.

4.2.7 Tiere

4.2.7.1 Tiermodell

Die Tierhaltung und Behandlung entsprachen den lokalen gesetzlichen Bestimmungen zu Tierversuchen. Die *In-vivo*-Gewebebiodistribution wurde in 5 – 6 Wochen alten weiblichen CB17-SCID Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden in der *SPF Facility* der Universität von Süd-Australien, gezüchtet. Eine Beschreibung der Eigenschaften findet sich bei Renner et al. [RENNER C et al. 1994].

Die Mäuse wurden in autoklavierten Micro-Isolatoren unter sterilen Bedingungen gehalten. Die Isolatoren befanden sich in einem Regalsystem mit einem geringen Überdruck (Thoren Caging Systems Inc., Hazelton, USA).

4.2.7.2 Zell-Antikörperapplikation

Zur Bildung eines Tumors aus CD30-positiven L540CY-Zellen wurden $2,5 \times 10^7$ L540CY-Zellen bis zu einem Gesamtvolumen von 400 μl in PBS suspendiert. Die Zellsuspension wurde subkutan in die linke inguinale Mammillarlinie injiziert. Als CD30-negativer Kontrolltumor wurden 5×10^6 SW1222-Zellen in die rechte inguinal Region jeder Maus injiziert.

Da die Wachstumsraten der beiden Tumore unterschiedlich waren, wurden die schneller wachsenden SW1222-Zellen 5 Tage nach den L540CY-Zellen injiziert, um Tumore vergleichbarer Größe zu erhalten. Beide Tumore hatten 16 Tage nach Injektion der L540CY-Zellen die geeignete Größe, um die Biodistribution durchzuführen. Das Tumolvolumen wurde mit der Formel $[(\text{Länge} \times \text{Breite}^2) / 2]$ bestimmt, wobei die Länge die längste Achse und die Breite im rechten Winkel zu dieser Länge gemessen wurde [SCHREIBER GJ et al. 1992].

25 Mäusen wurde jeweils 4 μg ^{125}I -BimAb und 4 μg ^{131}I -HRS-3 Antikörper über den reto-orbitalen Plexus intravenös injiziert. Die Antikörper wurden zuvor in 150 μl sterilem Medium suspendiert. 4 μg Antikörper entsprachen 10 μCi Radioaktivität. Durch die Markierung mit zwei verschiedenen Radiojodisotopen konnten zeitgleich zwei verschiedene Antikörper in einem Tier untersucht werden. Dieses Vorgehen war bei der Indium-Markierung nicht möglich. Am Tag der Injektion wurden die Standardreferenzproben wie bereits oben beschrieben angelegt. Die Referenzproben entsprachen der applizierten Antikörpermenge.

4.2.7.3 Biodistribution der Jod-markierten Antikörper

Zu den Zeitpunkten 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h nach Injektion wurden jeweils 5 Mäuse durch Inhalation von Enfluran betäubt und sofort durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden Blut, L540CY-Tumor, SW1222-Tumor, sowie Leber, Niere, Milz, Magen, Dünndarm, Lunge, Herz, Knochen, Muskel, Haut und Gehirn entnommen. Die Tumorgöße betrug im Mittel (+SD) 647 mg $\pm$ 252 mg. Blut wurde durch eine Herzpunktion gewonnen und in heparinisierten Röhrchen gesammelt.

Alle Gewebe wurden direkt entnommen, trockengetupft und gewogen (Sartorius Basic Balance, Germany). Die Proben wurden mit dem Dual Chamber Gamma-Scintillation-Counter (CobraTMII, Packard Instruments, Canberra, Australien) unter Benutzung der entsprechenden Dual Tracer Programme gemessen. Die verwendeten Messprogramme berücksichtigten die Isotope und die Messvolumina. Die Programme wurden nach Angabe des Herstellers angewandt.

Parallel zu den einzelnen Geweben wurden die zuvor angelegten Standardreferenzproben des jeweiligen injizierten Materials mit jeder Gewebeprobe gemessen. Die Referenzproben entsprachen der applizierten Antikörpermenge. So wurde eine korrekte Berechnung der Antikörperaufnahme unter Berücksichtigung des physikalischen Zerfalls der Isotope ermöglicht. Die Ergebnisse der Verteilung radioaktiv markierter Antikörper in den einzelnen Geweben über die Zeit wurden als % injizierte Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g : (cpm Gewebeprobe /cpm Standard) x 100 / Organgewicht in Gramm) angegeben. Ferner wird das Verhältnis zwischen der im Tumorgewebe aufgenommenen Antikörpermenge und der im Blut zirkulierenden Antikörpermenge als Tumor-Blut-Verhältnis angegeben.

4.2.7.4 Biodistribution der ¹¹¹In-markierten Antikörper

Nach den Ergebnissen der Versuchsreihe mit Iod-markierten Antikörpern wurden weitere 50 Tiere mit den beiden Tumorzelllinien L540CY und SW1222, wie unter 4.2.7.2 beschrieben, vorbereitet und behandelt. 25 Tieren wurde der Antikörper HRS-3 und 25 Tieren der BimAb injiziert. Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten 4, 24, 48, 72 und 144 Stunden. In der HRS-3 Gruppe wurden jeweils 4µg ¹¹¹In-HRS-3 und zur Kontrolle 4 µg ¹²⁵I-HRS-3 in 150 µl sterilem Medium suspendiert und über den retro-orbitalen Plexus injiziert. In der BimAb-Gruppe wurde ebenso 4µg ¹¹¹In-BimAb und 4 µg ¹²⁵I-BimAb verabreicht. Die Behandlung der Mäuse, die Entnahme und Bearbeitung der Organe sowie die Messung der Proben erfolgte nach dem unter 4.2.7.3 beschriebenen Vorgehen.

4.2.8 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Wilcoxon-Tests. Der Test wurde sowohl für die unterschiedlich behandelten Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten als auch zur Beurteilung signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben angewandt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde unter Verwendung von SigmaPlot Vers. 3.0 (SigmaPlot for Windows, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) erstellt.