

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C. Speer

**Frequenzanalyse und Subtypisierung lambda3r-positiver CD19-positiver
B-Zellen bei Magenkarzinompatienten**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Martin Albers
aus Würzburg

Würzburg, Mai 2009

Referent: Prof. Dr. H. Girschick

Koreferent: Prof. Dr. W. Scheppach

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.08.2009

Der Promovend ist Arzt

Für meinen Großvater

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Träger des angeborenen Immunsystems	2
1.1.2 Träger des erworbenen Immunsystems	3
1.2 B-Zellentwicklung und Immunglobulinrepertoire	4
1.2.1 Antikörpervielfalt und Affinitätsreifung	5
1.2.1.1 V (D) J-Rekombination	5
1.2.1.2 Antikörperklassen	8
1.2.1.3 Antikörper in Therapie und Diagnostik	9
1.2.2 Der monoklonale Antikörper SC-1	11
1.2.3 Prävalenz von B-Zellen im peripheren Blut	13
1.2.3.1 B-Zellsubtypisierung	13
1.3 Fragestellung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Kollektive	19
2.2 Blutproben	20
2.3 Probenaufbereitung	20
2.4 Durchflusszytometrie	21
2.4.1 Einzelzellsortierung	23
2.4.2 Die FACS-Färbung	24
2.4.3 Geräteeinstellung	26
2.4.4 Verstärkungsspannung	26
2.4.5 Kompensation	27
2.4.6 Gates	28
2.4.7 Akquisition der Zellen	29
2.4.8 Einfluss unterschiedlicher Antikörper und Farbstoffe	30
2.4.9 Analyse der Daten	31
2.5 Statistik	32
2.5.1 Statistische Tests	32
2.5.2 Altersnormierte Darstellung	33
2.5.3 Multivariate Verfahren	34
2.5.4 Signifikanzen	34
2.6 Materialien	35
2.6.1 Antikörper	35
2.6.2 Isotypen	35
2.6.3 Materialien und Geräte	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Gesunde Probanden und Erkrankte	37
3.2 Demographie	37
3.2.1 Demographie	38
3.3 Blutbild	39
3.3.1 Blutbild	40
3.3.2 Demographie und Blutbild	43
3.4 B-Zellen	45
3.4.1 B-Zellen	46
3.4.2 Demographie der CD19+ B-Zellen	48
3.4.3 Blutbild und B-Zellen	49

3.5 Marker	50
3.5.1 IgD	50
3.5.1.1 Verteilung der IgD-positiven CD19+ B-Zellen	50
3.5.1.2 Demographie und IgD-positive, CD19+ B-Zellen	53
3.5.2 CD5	54
3.5.2.1 Verteilung der CD5-positiven CD19+ B-Zellen	54
3.5.2.2 Demographie und CD5-positive CD19+ B-Zellen	57
3.5.3 CD27	58
3.5.3.1 Verteilung der CD27-positiven CD19+ B-Zellen	58
3.5.3.2 Demographie und CD27 positive B-Zellen	61
3.5.4 λ 3r	63
3.5.4.1 Verteilung der λ 3r-positiven CD19+ B-Zellen	63
3.5.4.2 Demographie und λ 3r-positive B-Zellen	65
3.5.4.3 Untergruppe der λ 3r-positiven, CD19+B-Zellen	67
3.6 Altersnormierung und verwendete Marker	73
3.7 Marker-Paare	74
3.7.1 Expressionsfrequenz der Marker-Paare in % der CD19+ B-Zellen	76
3.7.2 Demographie und Marker-Paare	81
3.7.3 IgD-negative und λ 3r-positive, CD19+ B-Zellen prozentual	85
3.7.4 Demographie der IgD-negativen und λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen	87
3.8 Statistisch erwartete Expressionsfrequenz der Marker-Paare	88
3.8.1 Gruppen und Abweichung vom statistischen Erwartungswert der Expressionsfrequenz der Marker-Paare auf CD19+B-Zellen	96
3.9 Marker-Paare und Absolutwerte	97
3.9.1 Marker-Paare und absolute Zellzahlen der CD19+B-Zellen in den Gruppen	98
3.9.2 Demographie und Anzahl der Marker-Paar-pos., CD19+ B-Zellen / μ l Blut	103
3.10 Multivariate Diskriminanz der Ca-Patienten von den Gesunden	108
3.10.1 Multivariate Diskriminanz mit altersnormierten und relativen Werten	108
3.10.2 Multivariate Analyse mit dem Alter und den prozentualen B-Zellanteilen	111
3.11 IgG-positive CD19+ B-Zellen	112
3.11.1 Verteilung der IgG-positiven CD19+ B-Zellen	112
3.11.2 Streubreite der IgG-positiven B-Zellen	115
4 Diskussion	117
4.1 Frequenzanalyse CD19-pos. B-Zellen bei Probanden unterschiedlichen Alters	117
4.2 Unterschiede in der Frequenz der Lymphozyten und CD19-positiven B-Zellen bei Probanden und Magenkarzinompatienten	119
4.3 Die Bedeutung von lambda 3r beim Magenkarzinom	120
4.4 Verteilung und Häufigkeit der lambda 3r pos. B-Zellen in den Gruppen	121
4.5 Subtypisierung der lambda 3r-positiven CD19+B-Zellen bei Probanden und Magenkarzinompatienten	122
5 Zusammenfassung	124
6 Abkürzungen	125
7 Literaturverzeichnis	126
8 Abbildungsverzeichnis	130
8.1 Abbildungen	130
8.2 Tabellen	131

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein Schutzmechanismus, der sich im Laufe der Evolution gebildet und weiterentwickelt hat, um den Körper vor Angriffen zu schützen. Hierbei handelt es sich sowohl um Angriffe von außen, als auch um Attacken durch körpereigene Zellen. Diese können unter bestimmten Bedingungen zu einer Bedrohung für den Organismus werden, etwa wenn ein Virus Körperzellen infiltriert oder Zellen maligne entarten. Eine wichtige Voraussetzung für die Erfüllung dieser mannigfaltigen Aufgaben ist die Fähigkeit des Immunsystems, zwischen „Fremd“ und „Selbst“ unterscheiden zu können, um eine angemessene Reaktion auf die Bedrohung zu zeigen¹. Diese Fähigkeit wird durch unterschiedlichste Mechanismen gewährleistet.

Das Verteidigungssystem des Menschen kann in zwei Schenkel eingeteilt werden, das angeborene und das erworbene oder adaptive Immunsystem¹.

Beim phylogenetisch älteren angeborenen Immunsystem handelt es sich um ein genetisch determiniertes System, dessen Rezeptoren innerhalb einer Spezies hochkonserviert weitervererbt werden. Weiterhin findet es sich in einer Vielzahl von Spezies gleichermaßen. Auf diese Weise werden die Vertreter der verschiedenen Spezies gegen Infektionen geschützt, ohne jemals mit dem Erreger in Kontakt gekommen zu sein. Teil dieses Mechanismus sind Granulozyten, Makrophagen oder Mastzellen². Als Rezeptorensysteme fungieren Komplementrezeptoren, oder etwa Toll-like-Rezeptoren³⁻⁵. Die Erkennung von typischen, in der Zahl begrenzten Motiven auf Infektionserregern (pattern of recognition) steht im Vordergrund, da die Vererbung von interindividuell ähnlichen, funktionellen Genen ein begrenztes Repertoire von Rezeptoren nach sich zieht. Solche Motive werden „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPS), oder auch „danger signals“ genannt⁵.

Im Gegensatz hierzu zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch die Lernfähigkeit nach Antigenkontakt aus. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist es evolutions-

biologisch nicht so weit verbreitet, wenn man die unterschiedlichen Spezies miteinander vergleicht. Die Fähigkeit zur Adaptation erhält das System durch die Möglichkeit zur zufälligen Generierung von Rezeptoren, im Rahmen einer Rekombination auf genomischer Ebene. Die statistisch zufällige Kombination der Genabschnitte erzeugt dabei sowohl fremd- als auch autoreaktive Rezeptoren, die in weiteren Schritten sowohl selektioniert, als auch erneut rekombiniert werden können⁶. Dies sichert einerseits die Antigenspezifität, andererseits schützt es vor primär entstandenen autoreaktiven Rezeptoren⁷. Eine weitere Besonderheit ist die Fähigkeit des adaptiven Immunsystems, ein Gedächtnis auszubilden⁸.

1.1.1 Träger des angeborenen Immunsystems

Die Träger des angeborenen Immunsystems sind Phagozyten und natürliche Killerzellen, die beispielsweise durch das Toll-like-Rezeptor (TLR) System des menschlichen Organismus aktiviert werden. Die verschiedenen Unterarten dieser Rezeptoren unterscheiden sich durch die Erkennung spezifischer, aber universeller Motive, wie etwa Membranbestandteile von Bakterien (TLR 1, 2, 6) oder freier Doppelstrang-DNA (TLR 3). In der Folge wird dann eine Reaktionskaskade ausgelöst, welche zur Elimination des eindringenden Agens führen kann.

Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung des humoralen Komplementsystems, eines Systems aus frei im Blut verfügbaren Proteinen, das ebenfalls durch Erkennung und Bindung an bestimmte Bestandteile aktiviert werden kann. Im klassischen Fall liegt die Aktivierung durch einen Antigen-Antikörper-Komplex vor, welche zu mehreren Effekten führt. Hier ist der direkt proteolytische Effekt der Komplementenzyme zu nennen, aber auch die Vernetzung mit dem erworbenen Immunsystem über die Markierung von Antigenen (Opsonisierung) und die nachfolgende Aktivierung der lernfähigen Immunzellen¹.

Eine weitere Anzahl von zellulären und azellulären Komponenten des Immunsystems werden zur angeborenen Immunität gezählt.

1.1.2 Träger des erworbenen Immunsystems

Das erworbene Immunsystem wird von Lymphozyten gestellt, einem komplexen System aus „lernfähigen“ Zellen mit zufällig auf genetischer Ebene rekombinierten Oberflächenrezeptoren⁹. Man unterscheidet hierbei zwei Hauptgruppen von Zellen, T- und B-Zellen. Hauptmerkmal der B-Zellen ist die Fähigkeit zur Produktion von erregerspezifischen Antikörpern gegen extrazelluläre oder membrangebundene Antigene.

T-Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur allerdings „indirekten“ Erkennung intrazellulärer Erreger wie beispielsweise Viren oder einiger Bakterien aus.

Die Vernetzung des phylogenetisch jüngeren adaptiven Immunsystems mit dem älteren angeborenen System ist unverzichtbarer Bestandteil für die Effektivität und Funktionsweise des humanen Abwehrsystems, hier kann man etwa die Aktivierung und Stimulation von T-Zellen durch Makrophagen nennen.

Des Weiteren gibt es Zellen, die vermeintlich eine Zwischenrolle einnehmen zwischen angeborener und erworbener Immunität. Hier sind im Besonderen die bei der Maus gut charakterisierten B1-B-Zellen zu nennen, sie könnten eine Sonderrolle einnehmen, da es Hinweise gibt, dass sie nicht wie normale B-Zellen (B2-B-Zellen) im Knochenmark gebildet werden, sondern vermutlich im Peritoneum oder der Pleurahöhle entstehen^{10, 11}. Weiterhin finden sich in den variablen Immunglobulingenen der B1-B-Zellen genetisch wenig von der Keimbahnkonstellation abweichende Mutationen. Bei der Maus sind diese Zellen durch die Expression des Oberflächenmarkers CD5, IgM-high und IgD-low, sowie CD43 gekennzeichnet. Auch sind sie durch die Eigenschaft, Antikörper der Klasse IgM zu exprimieren und zu sezernieren, charakterisiert^{11, 12}. Einige dieser Epitope sind dabei auch autoreaktiver Natur^{10, 11, 13}.

Es gibt jedoch in letzter Zeit auch vermehrt Zweifel an der simplen Übertragbarkeit der Entstehungshypothese beim Menschen und der analogen Übertragbarkeit des Mausmodells auf den Menschen. So gibt es etwa eine Hypothese, die besagt, dass B1-B-Zellen nur einen Funktionszustand widerspiegeln und es eine Entstehung aus einer gemeinsamen B0-B-Zelle gibt, welche dann zwei oder mehr Funktionszustände einnehmen kann (B1- und B2-B-Zellen)¹¹. Zu Grunde liegt die Beobachtung, dass es gelang aus B2-B-Zellen mittels Stimulation durch anti-IgM-Antikörper und Interleukin-6 B-Zellen zu erzeugen, die das oben genannte Markerprofil von B1-B-Zellen exprimierten.

Eine abschließende Beurteilung der Richtigkeit einer oder beider Hypothesen ist in der gegenwärtigen Situation an Hand der Literatur noch nicht möglich.

1.2 B-Zellentwicklung und Immunglobulinrepertoire

Die Entwicklung der B-Lymphozyten ist eng an die Rekombination und Expression der Immunglobulingene in Form des B-Zellrezeptors gebunden. Der B-Zellrezeptor besteht aus einem membrangebundenen Immunglobulin, wobei je nach Reifungsstufe und Subgruppe der B-Zellen ein oder mehrere Isotypen Verwendung finden¹⁴.

Ein sezerniertes Immunglobulin besteht aus drei Proteinketten (Polypeptidketten), die in charakteristischer Weise y-förmig angeordnet sind und deren Abschnitte (variable Region und konstante Region) jeweils andere Aufgaben erfüllen¹.

Die beiden Arme des „Y“ stellen dabei in der Tertiärstruktur die Antigenbindungsstelle dar und bestehen aus jeweils einer leichten und einer schweren Kette, die durch Disulfidbrückenbindungen zusammengehalten werden und mittels zufälliger Rekombination der Immunglobulingene entstehen. Hierbei entsteht eine hypervariable, zum Antigen komplementäre Bindungsstelle, die als „complementary determining region“ (CDR 1-3) bezeichnet wird¹.

Der Rumpf des „Y“ wird konstante Region genannt und erfüllt die Effektorfunktion des Antikörpers. Man unterscheidet fünf Isotypen (mu, delta, gamma, alpha und epsilon), die trotz Varianz einen hohen Konservierungsgrad innerhalb der Gruppen zeigen¹.

Die Antikörper werden in membrangebundener Form durch Assoziation mit dem Iga/Igβ Heterodimer zum B-Zellrezeptor, welcher maßgeblich an der Signaltransduktion, Differenzierung und Proliferation der Zelle beteiligt ist¹.

Je nach Reifungsstadium exprimieren B-Zellen unterschiedliche Immnglobulin-Isotypen auf der Oberfläche der Zellmembran. Im Umkehrschluss ist es möglich, über den Nachweis verschiedener Isotypen mittels markierter anti-Isotyp-Ak auf die Reifungsstufe der B-Zellen zu schließen¹⁴.

Die Entwicklung reicht dabei von der pluripotenten Stammzelle über die pro-B-Zelle (Stadium der Rekombination der schweren Kette, ohne Oberflächenexpression von Immunglobulin), weiter über das Stadium der pre-B-Zelle, deren pre-B-Zellrezeptor aus einem rekombinierten VH-Anteil (schwere Kette plus einer „Ersatzleichtkette“-Vpre B-), jedoch noch nicht rearrangiertem VL-Anteil (leichte Kette) besteht, bis hin zur unreifen (naiven) B-Zelle, die ein vollständiges Immunglobulin der Isotypklasse IgM auf der Oberfläche exprimiert^{1,9}.

Eine weitere Stimulation der B-Zellen führt zur Stufe der reifen B-Zelle, welche IgM und IgD gleichzeitig auf der Zellmembran exprimiert^{9, 14, 15}.

Eine noch genauere Differenzierung der B-Zellsubtypen ist durch den Nachweis von Co-Rezeptoren und anderen Oberflächenmolekülen möglich.

1.2.1 Antikörpervielfalt und Affinitätsreifung

Die Vielfalt der Antikörper entsteht bei B-Lymphozyten auf Genebene durch willkürliche Rekombination mehrerer Gensegmente (V (D) J-Rekombination), die für das entsprechende Immunglobulin kodieren. Weiterhin ist es möglich, dass an den Verbindungsstellen der Gensegmente einzelne Nukleotide ergänzt oder entfernt werden (Addition und Deletion von n-Nukleotiden). Auch in ausgereiften Zellen ist es durch die Ansammlung von Punktmutationen möglich, eine „Erweiterung“ des Immunglobulinrepertoires, das heißt der potentiell erkennbaren Antigene, zu erreichen^{1, 16}.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass es zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal eine Reaktivierung der Rekombinationsenzyme (RAG-Enzyme, RAG 1 und RAG2) geben kann, die etwa eine autoreaktive B-Zelle noch umformen können, sodass sie kein auto-aggressives Potential mehr besitzt^{6, 7, 17}.

1.2.1.1 V (D) J-Rekombination

Die Rekombination der Immunglobulingene läuft nach einem relativ festen Schema ab. Sie beginnt im Stadium der frühen pro-B-Zelle mit der Verbindung der Gensegmente D und J auf beiden Chromosomen und wird fortgesetzt im Stadium der späten pro-B-Zelle durch die Rekombination der schwere Ketten-Gene „V“ mit dem Abschnitt „DJ“ auf einem Chromosom der B-Zelle. Ab eben diesem Stadium werden die Verbindungen jeweils nur auf einem Chromosom durchgeführt (allelic exclusion), es sei denn, durch die Verbindung ist ein nicht funktionelles Gen, etwa durch die Verschiebung des Leserasters entstanden. In diesem Fall kann die Rekombination mit den Gensegmenten des zweiten Chromosoms fortgesetzt werden, sodass ein Zelluntergang vorerst vermieden wird¹.

Nach erfolgreicher Verbindung der schwere Ketten-Gene wird das Produkt bereits als pre-B-Zellrezeptor auf der Zelloberfläche zusammen mit den Proteinen $\lambda 5$ und Vpre B exprimiert. Dieser Rezeptor ermöglicht das weitere Überleben der Zelle und die weitere Reifung zur naiven B-Zelle, welche nach der Rekombination der Leichtkettengene abgeschlossen ist¹.

Bei diesem letzten Schritt in der B-Zellrezeptorrekombination werden die V- und J-Gensegmente der leichten Kette miteinander verbunden. Beim Menschen findet in den meisten Fällen der κ -locus des Immunglobulins Verwendung. Wenn die Verbindung zwischen zwei κ -Gensegmenten nicht produktiv ist, kann nach erneuter Kombination weiter außen liegender κ -loci auch auf den λ -locus zurückgegriffen werden (65%:35%, κ : λ -Anteil). Hierbei gilt ähnlich wie bei der Rekombination der schweren Kette eine isotypische Exclusion, mit der singulären Verwendung eines Genlocus von κ oder λ (isotypic exclusion)^{1, 16}.

B-Zellen, in denen es nicht zu einer erfolgreichen Rekombination der Immunglobulingene gekommen ist, werden durch Apoptose eliminiert.

Bei erfolgreicher Rekombination der Gensegmente liegt eine naive B-Zelle mit einem vollständigen B-Zellrezeptor in Form eines membranständigen Antikörpers der Klasse IgM vor, der zusammen mit den Proteinen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ wichtige Überlebenssignale an die Zelle vermittelt¹⁸.

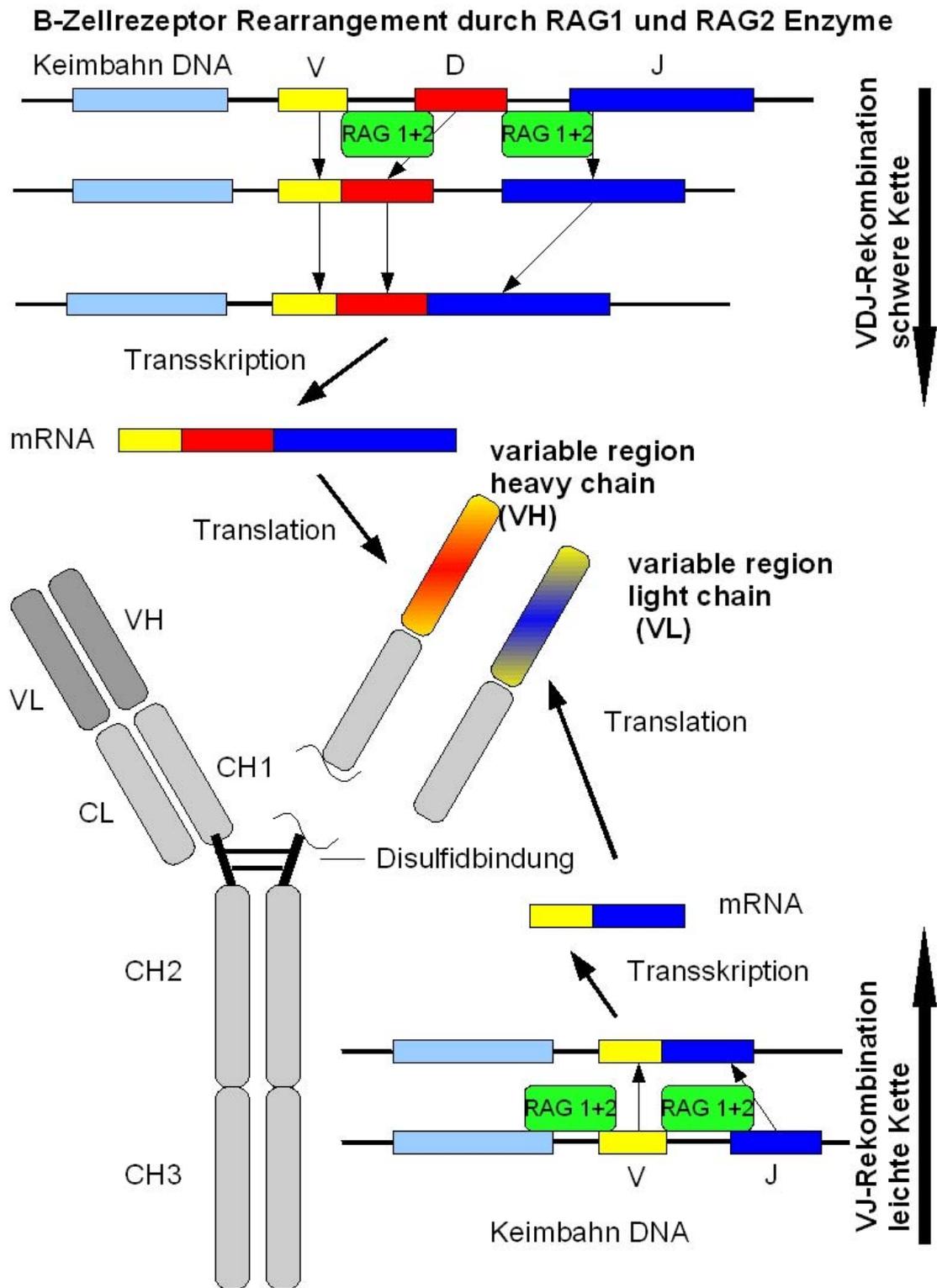


Abbildung 1 Entstehung eines Antikörpers, Rekombination der Immunglobulingene

Abbildung 1 beschreibt die Rekombination der Immunglobulingene für die leichte und schwere Kette eines Antikörpers von der Keimbahnkonfiguration ausgehend. Bei der variablen Region der schweren Kette (VH) werden insgesamt drei Segmente, V, D und J ver-

bunden. Im Falle der leichten Kette (VL) werden nur zwei Segmente V und J miteinander verbunden. Nach erfolgreicher Rekombination werden die Abschnitte in mRNA transkribiert und durch Translation an den Ribosomen in Proteinstrukturen verwandelt. Die konstante Region des Antikörpers besteht aus drei Teilen, die zur schweren Kette gehören (CH1-3) und einem Teil, der zur leichten Kette gehört (CL). Aus der Verbindung aller Proteinbausteine entsteht dann durch Disulfidbrückenbindung ein vollständiges Immunglobulin mit quartärer Struktur. Modifiziert nach Janeway et al.¹.

1.2.1.2 Antikörperklassen

Neben der variablen Region der Antikörper, welche über die Antigenbindung und damit über die Spezifität des Antikörpers entscheidet, ist die konstante Region wichtig für die Effektorfunktion des Immunglobulins¹.

Hier unterscheidet man 5 Klassen, IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, die sich durch unterschiedliche schwere Ketten auszeichnen und in der Raumstruktur verschieden sein können. IgM-Ak beispielsweise, kommen in löslicher Form häufig als Pentamere vor, IgA-Ak als Dimere und IgG-Ak als Monomere. Dies hat natürlich Auswirkungen auf die Effektorfunktion der Immunglobulinklassen, so binden IgM-Ak beispielsweise Antigene mit geringerer Spezifität, dafür aber höherer Affinität durch die hohe Anzahl der Bindungsstellen, IgG hingegen bindet spezifisch aber mit weniger Affinität zum Antigen. Einen Sonderfall stellt das IgA dar, da es durch ein sekretorisches Protein verbunden als Dimer vorkommt und so Schleimhautbarrieren leicht überwinden kann, ja sogar aktiv hinüber transportiert wird¹.

Eine weitere Eigenschaft der unterschiedlichen Antikörperklassen ist das zeitliche Auftreten im Verlauf einer Infektion oder Abwehrreaktion des Körpers. An der initialen Immunreaktion sind IgM-Antikörper beteiligt^{1, 19}, die von naiven B-Zellen, kurz nach der Genrekombination im Knochenmark, produziert werden. Mit einiger Latenz werden dann nach Antigenkontakt und Keimzentrumsreaktionen mit Affinitätsreifung in den sekundären Lymphorganen (Lymphknoten und Milz) Antikörper der Klasse IgG produziert, die von spezialisierten B-Zellen, den Plasmazellen, sezerniert werden^{1, 20}. Molekularbiologisch unterscheiden sich diese Zellen von den naiven B-Zellen durch einen viel höheren Anteil an somatischen Mutationen und durch die Expression anderer Oberflächenantigene und Rezeptoren^{8, 21-23}.

Diese Tatsache kann man experimentell durch Markierung einzelner Oberflächenstrukturen nutzen, um eine genaue Charakterisierung der B-Zellen mit Zuordnung der einzelnen Zellen zu den jeweiligen Reifungsstadien vorzunehmen.

Einige Immunglobulinklassen scheinen darüber hinaus eine gewisse Erregerspezifität zu besitzen, so werden beispielsweise bei allergischen Reaktionen und Infektionen mit Eukaryonten vermehrt Antikörper der Klasse IgE beobachtet²⁴.

Die genaue Funktion der IgD-Antikörper ist noch nicht vollständig geklärt, wahrscheinlich handelt es sich um zellständige Antigenrezeptoren von naiven B-Zellen, sie können aber für die Subtypisierung von B-Zellen herangezogen werden, da sie nur in bestimmten Entwicklungsphasen der B-Zellen auf der Oberfläche vorhanden sind^{9, 23, 25}.

1.2.1.3 Antikörper in Therapie und Diagnostik

In den Anfängen der Antikörpertherapie war es der Humoralimmunologe Emil Adolph von Behring, der am Beispiel der Diphtherieerkrankung den Nutzen und das Vorhandensein einer humoralen Immunität im Blutserum von Pferden zeigen konnte, indem er die Toxininaktivierung durch Antikörper des Pferdeserums bei erkrankten Menschen nutzte und die Erkrankung abmildern konnte²⁶.

Früh entbrannte ein Streit zwischen Vertretern der Humoralimmunologie, wie etwa von Behring und den Vertretern der Zellularimmunologie (Metschnikow), die für die Infektabwehr eher die weißen Blutzellen verantwortlich machten, um die Bedeutung des jeweiligen Abwehrsystems. Im Laufe der Zeit sollte sich dann der enge Zusammenhang zwischen den von diesen beiden Gruppen postulierten Systemen darstellen lassen.

In der modernen Medizin gibt es durch die Möglichkeit der *in vitro* Herstellung von Antikörpern ein breites Anwendungsfeld für monoklonale und polyklonale Antikörper in der Therapie des Menschen.

Neben den klassischen Anwendungen zur Substitution bei Antikörpermangelsyndromen, oder zur Bekämpfung von akuten Infektionen wie etwa der Diphtherie, werden Antikörper heute vor Allem zur Immunmodulation eingesetzt.

Die Unterdrückung und Blockierung einzelner Aktivierungswege des Immunsystems stehen dabei im Vordergrund. Beispiele hierfür sind etwa die in der Rheumatologie einge-

setzten TNF- α blockierenden Antikörper, oder die in der Tumorthherapie eingesetzten anti-VEGF-Ak (Avastin®) zur Blockierung der Endothelzellaktivierung²⁷.

Weiterhin ist es möglich, Zellen und hier vor allem Lymphozyten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (Rituximab®) zu markieren und damit zum Abwehrziel für das eigene Immunsystem zu machen, auf diese Weise eliminiert man etwa in der Tumorthherapie des B-non-Hodgkin-Lymphoms die bösartigen, aber auch gutartigen CD20-positiven B-Zellen des Körpers im Sinne einer weitestgehenden B-Zelldepletion^{28, 29}.

In den letzten Jahren sind so immer mehr Zielstrukturen auf Zellen definiert worden, die mittels Antikörperbindung erkannt werden können. Ein Meilenstein in der Entwicklung therapeutischer Antikörper war dabei die Möglichkeit zur Herstellung humaner Antikörper mittels Hybridoma-Technik. Hier werden zwei Zelllinien, in diesem Fall Antikörperproduzierende Plasmazellen und Myelomzellen, miteinander verschmolzen, um die Eigenschaften beider Zellarten nutzen zu können. Durch die Fusion entsteht eine unendlich Antikörper-produzierende Zelllinie, da Myelomzellen nicht spontan apoptotisch werden³⁰⁻³².

Der Vorteil eines vollständig humanen Antikörpers gegenüber Xeno-Antikörpern oder chimären Antikörpern ist das weitaus geringere antigene und allergisierende Potential und die damit verbundene geringere Wirkungsabschwächung bei therapeutischer Anwendung. Ein bedeutender Nachteil ist jedoch die deutlich schwierigere Gewinnung von humanen, hochaffinen Antikörpern und deren Plasmazellklonen im Vergleich zur Gewinnung etwa von murinen Plasmazellen.

Eine weitere Domäne von Antikörpern ist die diagnostische Anwendung mit dem Nachweis bestimmter Zellen oder Oberflächenantigene *in vivo* und *in vitro*. Ein klassisches Beispiel ist der Nachweis von Tumorantigenen, welche sowohl zur Verlaufsbeobachtung, als auch zum Screening Verwendung finden³³.

1.2.2 Der monoklonale Antikörper SC-1

Der humane monoklonale Antikörper SC-1 (Pathologisches Institut der Universität Würzburg, Deutschland), wurde aus Milz-B-Zellen eines Patienten mit diffusem Magenkarzinom isoliert³², um die Reaktion des menschlichen Immunsystems auf einen vorliegenden Tumor zu erforschen. Mittels Hybridoma-Technologie durch Verschmelzung einer SC-1-produzierenden Plasmazelle des Patienten mit einer Myelomzelle (SPM4-0) konnte ein humaner monoklonaler Antikörper produziert und isoliert werden. In den nachfolgenden Untersuchungen zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die starke Apoptose induzierende Aktivität dieses Antikörpers, welche spezifisch gegen Magenkarzinomzellen gerichtet war^{32, 34}. Es konnte eine Apoptoseinduktionsrate von 70% der Tumorzellen bei diffusem Magenkarzinom und 25% bei intestinalem Typ (nach Lauren) durch Applikation des IgM-Antikörpers SC-1 nachgewiesen werden. Dies ließ sich in Gewebeschnitten sowohl nach *in vitro* Applikation, als auch an postoperativen Präparaten nach intravenöser Gabe des Antikörpers bei Studienpatienten *in vivo* nachweisen. Als Bindungsmolekül auf den Tumorzellen wurde ein besonderer, 82 kd Isotyp des Moleküls CD55 identifiziert. CD55 gehört zur Gruppe der „decay accelerating factors“, „DAF“ und schützt menschliche Zellen im Normalfalle vor einer Opsonisierung und Bindung durch körpereigenes Komplement^{31, 32, 34-38}. In den Bindungsexperimenten mit dem SC-1-Antikörper konnte eine selektive anti-Tumoraktivität beobachtet werden, eine strukturelle Bindung oder funktionelle Erkennung von gesunder Magenschleimhaut mit konsekutiver Apoptoseinduktion durch den Antikörper SC-1 konnte nicht beobachtet werden³².

In Gewebsschnittuntersuchungen wurden erste Erkenntnisse zur Herkunft der SC-1-produzierenden B-Zellen gesammelt. Es fand sich unter anderem die Expression von CD5 und CD19, was als Hinweis auf die Abstammung von B1-B-Zellen¹¹ gedeutet wurde. Mittels Durchflusszytometrie sollte nun die genauere Charakterisierung und Frequenzanalyse von B-Zellen, welche „SC-1“ vergleichbare Epitope auf der Oberfläche tragen in Patientenproben sowie in gesunden Individuen, erfolgen³⁹.

Mittels Immunisierung von Mäusen durch Injektion von humanem monoklonalen SC-1 IgM-Antikörper konnte im Vorfeld ein anti-SC-1-Antikörper erzeugt und isoliert werden. Dieser diente in der vorliegenden Arbeit als durchflusszytometrisches Untersuchungswerkzeug zur Markierung von B-Zellen (SC-1-Epitop tragende B-Zellen) im peripheren Blut.

Parallel zur vorliegenden Arbeit konnte auf Grund von molekulargenetischen Untersuchungen in einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe die Bindungsstelle des „anti-SC-1“-Antikörpers näher als die Leichtkettenregion lambda 3r des B-Zellrezeptors auf den erkannten B-Zellen charakterisiert werden⁴⁰. Sowohl im Kollektiv der gesunden Probanden als auch bei den karzinomerkrankten Patienten wurden mittels Einzelzellsortierung SC-1-Epitop positive CD19+B-Zellen isoliert, welche sehr spezifisch die leichte lambda-Kette 3r trugen (bis zu 88 %, im Mittel 80%). In den SC-1-Epitop negativen Kontrollzellpopulationen wurde dagegen ein weit verteiltes Immunglobulinrepertoire nachgewiesen, insbesondere das Gen 3r wurde nicht vermehrt verwendet (siehe **Abbildung 2**). Die weitere genetische Analyse zeigte eine Selektion hin zu relativ gesehen kurzen CDRIII-Regionen (27 bp) der leichten Kette lambda 3r in den SC-1-Epitop positiven CD19+B-Zellen.

Leichtkettengenverteilung

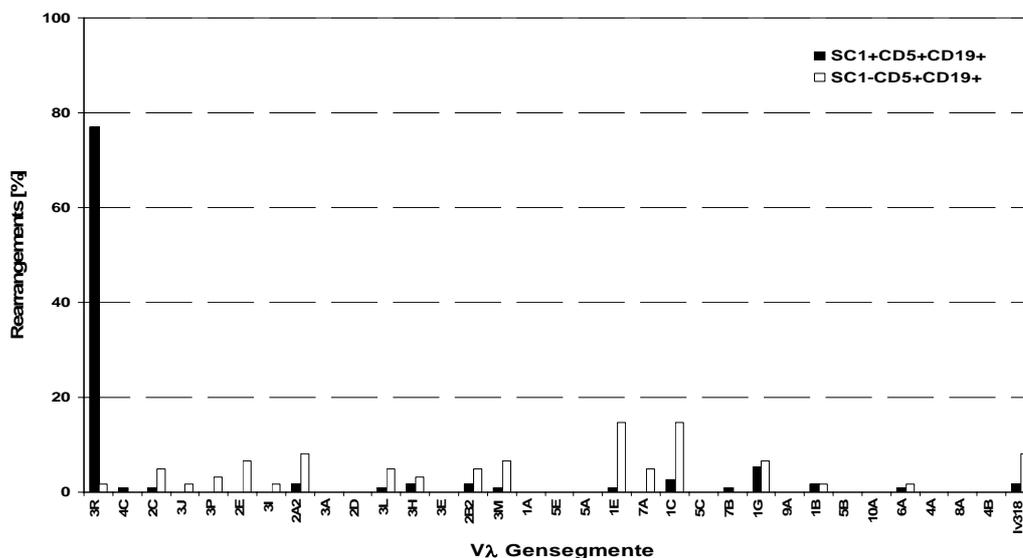


Abbildung 2 Schwarz markiert dargestellt ist die Leichtkettengenverteilung (V lambda) bei Karzinompatienten in SC-1-Epitop positiven, CD5+ und CD19-positiven B-Zellen und weiß markiert in SC-1-Epitop negativen, CD5+ und CD19-positiven B-Zellen. Kumulative Einzelzellsortierung und Sequenzierung der Immunglobulingene von 4 Karzinompatienten, Graphik nach Richl

Im Folgenden wird daher der Untersuchungsantikörper „anti-lambda 3r“ statt „anti-SC-1“ genannt werden, da streng genommen keine isotypische Bindung an der Antigenbindungsstelle des SC-1-Antikörpers oder der SC-1-B-Zelle, vorliegt, sondern eine hochspezifische Bindung an der leichten Kette V lambda. Die erkannten B-Zellen des peripheren Blutes werden daher im Folgenden als „lambda 3r-positive CD19-positiven B-Zellen“ bezeichnet werden.

1.2.3 Prävalenz von B-Zellen im peripheren Blut

Das Vorhandensein von B-Lymphozyten im peripheren Blut ist altersabhängig und wird von Kofaktoren, wie dem Auftreten von Infektionen und chronischen Erkrankungen mitgesteuert^{9, 41, 42}.

Die relative und absolute Anzahl der B-Lymphozyten im Blut gesunder Menschen (und auch anderer Spezies, wie etwa von Schafen und Mäusen) variiert im Laufe des Lebens erheblich, sodass man verallgemeinernd von einer altersabhängigen Prävalenz sprechen kann⁴¹.

Die höchste Anzahl an B-Zellen findet man bei jungen Individuen, die geringste Anzahl bei älteren Menschen. Die genauen Gründe hierfür sind derzeit noch nicht vollständig geklärt, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass es sich weniger um einen primären Mangel, einen Defekt der B-Zellvorstufen, oder um eine Knochenmarksinsuffizienz handelt, als vielmehr um eine physiologische und multimodale, eventuell hormonell mitverursachte Veränderung⁴¹⁻⁴³.

Auffällig ist eine Minderreaktivität auf Infektionen (Zunahme der Pneumonien im hohen Lebensalter, etc.) und ein begrenzteres Repertoire (Abnahme etwa von „naiven“, IgD-positiven B-Zellen) von B-Zellen im peripheren Blut von „älteren“ Menschen, ohne dass es in der Literatur quantitative Werte zu den verschiedenen B-Zellsubtypen und deren Alterskorrelation gibt⁴².

1.2.3.1 B-Zellsubtypisierung

B-Zellen lassen sich *in vitro* nach Separation aus dem Vollblut mit Hilfe mono- und polyklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene auf den Zellen bestimmten Untergruppen zuordnen⁴⁴.

Der wichtigste Marker zur Abgrenzung von B-Zellen gegenüber anderen Lymphozyten ist das Oberflächenantigen CD19, welches schon auf sehr frühen Stadien (pro-B-Zelle) der B-Zellentwicklung exprimiert wird (**Abbildung 3**). Man nennt diesen Marker daher auch „pan-B-Zellmarker“, der in seiner Funktion an der Signalübertragung, besonders an der Übertragung von Überlebenssignalen und Differenzierungssignalen in der B-Zellreifung, an die Zelle beteiligt ist.

Zusätzliche Oberflächenantigene ermöglichen die weitere Unterteilung, so ist die alleinige zusätzliche Expression von IgM (IgM+) charakteristisch für „Pre-B-Zellen“, naive Knochenmarks B-Zellen, denen noch keine Expression der Leichtkettengene kappa oder lambda zueigen ist. Die gleichzeitige Expression von IgM und IgD (IgM+, IgD+ B-Zellen) kennzeichnet B-Zellen, die sich im Stadium der „naiven und reifen B-Zelle“ des peripheren Blutes mit vollständig rearrangiertem B-Zellrezeptor befinden (**Abbildung 3**).

Ein weiterer Differenzierungsschritt umfasst dann den Verlust des Oberflächenmoleküls IgD, hin zu einer spezialisierten B-Zelle, etwa einer Plasmazelle.

Frühe B-Zellentwicklung

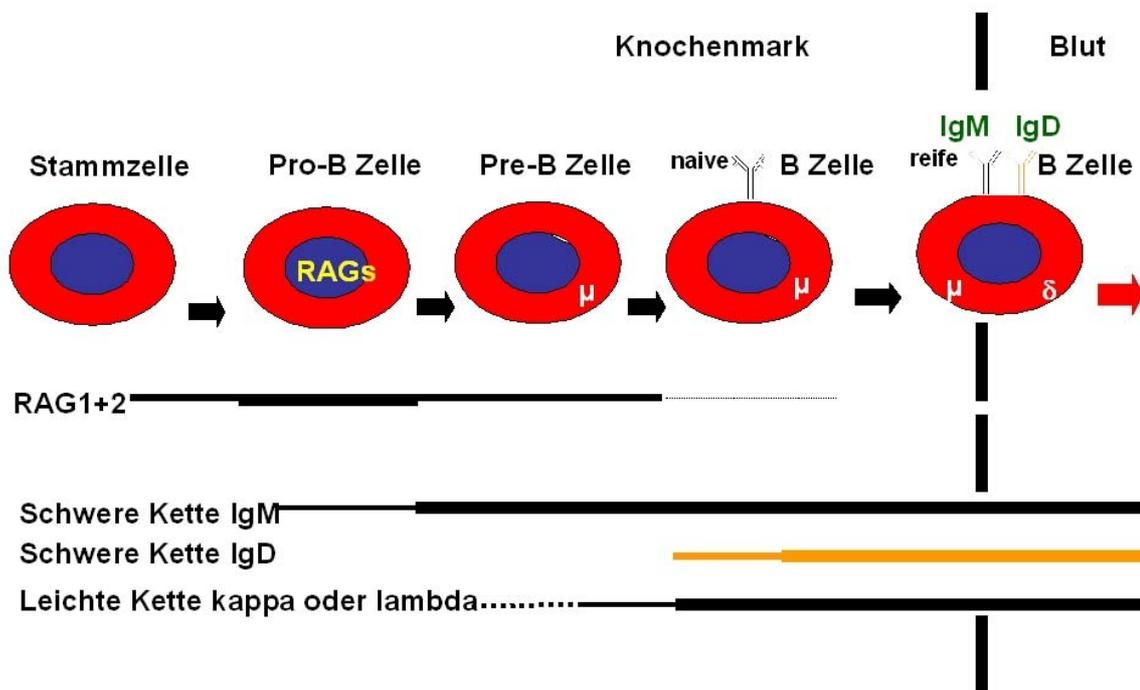


Abbildung 3 Frühe Entwicklungsstadien der B-Zelle im Knochenmark vor Übertritt ins periphere Blut. RAG-Enzyme (recombination activating gene) katalysieren die VD(J)-Rekombination des Immunglobulins der B-Zelle. Die auf der Oberfläche exprimierten Immunglobuline ermöglichen eine Zuordnung zu den einzelnen Entwicklungsstadien, besonders im peripheren Blut.

Das Oberflächenantigen CD5 (CD5⁺ B-Zellen) ist ein in der murinen B-Zellsubtypisierung gut definiertes Molekül, welches B1-Zellen charakterisiert, deren Ursprungsort das Peritoneum zu sein scheint und nicht das Knochenmark.

B1-Zellen stehen bei der Maus evolutionsmäßig zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem und sind durch wenige somatische Mutationen und die Sekretion unspezifisch bindender Antikörper der Klasse IgM charakterisiert¹⁰⁻¹³. Diese stellen eine Art „first line defence“, also eine Art erste, unspezifische Antwort auf pathogene Keime dar. Durchflusszytometrisch lassen sich die Oberflächenantigene IgM (high+), IgD (low+), CD43⁺ und CD5⁺ nachweisen. B-1 B-Zellen werden weiterhin mit autoreaktiven B-Zellen in Verbindung gebracht, da nach Autoantigenstimulation in transgenen Mausmodellen eine positive Selektion dieser Zellen zu beobachten ist¹¹. In der aktuellen Literatur ist die klassische Entstehungshypothese („lineage model“¹³), welche eine separate Vorläuferzelle von B1 und B2-Zellen postuliert, mehr und mehr in Frage gestellt worden, da neuere Ergebnisse zeigten, dass B1-B-Zellen auch durch Stimulation von klassischen B2-Zellen mit anti-IgM und IL-6 entstehen können. Derzeit sind beide Modelle noch nebeneinander bestehend, da es derzeit noch keine eindeutigen Beweise für die alleinige Richtigkeit eines der Modelle gibt¹³.

Weiterhin wird in der Literatur die Übertragbarkeit der Hypothesen zu Funktion und Expression des Oberflächenmoleküls CD5 bei Mäusen auf die des Menschen kontrovers diskutiert. Eine abschließende Beurteilung der Positionen ist derzeit ebenfalls noch nicht in Sicht¹⁰⁻¹². In dieser Arbeit wurde CD5 als Marker für B1-B-Zellen angesehen und in den durchflusszytometrischen Messungen dementsprechend bewertet.

Die Expression der Marker IgG und CD 27 (IgG⁺ CD27⁺) auf CD19⁺B-Zellen (B2-B-Zellen) ordnet die entsprechenden B-Zellen dem Kompartiment der „Memory-B-Zellen“ zu und steht für eine durch Antigenkontakt erfolgte Reifung mit somatischer Hypermutation des Immunglobulin-kodierenden Gens, sowie die erhöhte Sekretion von Antikörpern. Morphologisch (mikroskopisch) unterscheiden sich diese B-Zellen von den vorausgehenden Stadien durch einen breiteren Zytoplasmasaum und eine Größenzunahme insgesamt. Dies ist bedingt durch die Zunahme der Proteinsynthesefunktionseinheiten, wie zum Beispiel des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates, welche die Synthese der Immunglobuline und die Ausschüttung dieser in das periphere Blut erst ermöglichen⁸.

21-23, 25, 45

Durch den raschen Wissenszuwachs und die Entdeckung und Entwicklung immer neuer Subtypmarker ist die Möglichkeit, in Zukunft eine genauere Einteilung in die jeweiligen Entwicklungsstadien erlangen zu können, immer wahrscheinlicher geworden⁴⁴. Die derzeit aktuellste Einteilung der B-Zellen berücksichtigt die Expression von CD38, CD23 und CD77 als zusätzliche Marker zu den oben genannten „klassischen B-Zellmarkern“. Auch gewinnt die Fluoreszenzintensitätsmessung durch die Verwendung immer besser auflösender Geräte zunehmend an Bedeutung, eine Einteilung erfolgt daher beispielsweise in CD38- (negativ), CD38+ (low+) und CD38++ (high+).

Weitere Möglichkeiten zur Subtypisierung von B-Zellen ergeben sich aus den Methoden der modernen Molekularbiologie, die mit Hilfe von Einzel-Zell-PCR-Verfahren („single cell PCR“) einen Nachweis von mRNA und DNA und damit direkt von Funktionszuständen der Zellen ermöglicht^{16, 46, 47}. Darüber hinaus ist es möglich die Rekombinationsergebnisse zum Beispiel von Immunglobulinen mit Hilfe von Sequenzieretechniken direkt sichtbar zu machen und mit den Keimbahngenen zu vergleichen^{6, 7, 46, 48}.

Diese Techniken ermöglichten es, die Reifungsstadien, etwa in einem Keimzentrum zu unterscheiden und einen zeitlichen Ablauf der Immunreaktion darzustellen. Das Keimzentrum ist die wichtigste Station einer rezirkulierenden B-Zelle des peripheren Blutes, da hier eine antigenabhängige Selektion, klonale Expansion, sowie Differenzierung erfolgt. Durch Kontakt mit Antigen entsteht im Lymphknoten aus einem primären Lymphfollikel ein Sekundärfollikel mit reaktiven Veränderungen im Sinne einer Keimzentrumsreaktion¹. Hieran sind verschiedene Zellarten beteiligt. Im Inneren des Follikels etwa findet man hauptsächlich Zentroblasten, B-Zellen, die einer massiven klonalen Expansion unterliegen und eine Rezeptorrevision durchmachen⁶. Hierbei handelt es sich sowohl um Klassenwechselvorgänge, als auch um eine erneute Expression der Rekombinationsenzyme RAG 1 und RAG 2, welchen eine Schlüsselrolle bei der sekundären antigengetriggerten VD(J)-Rekombination außerhalb des Knochenmarks zukommt⁶. Der gleichzeitige Nachweis von RAG 1 und 2 mRNA in „germinal center founder cells“ ist ein Beispiel für die Untersuchung von Funktionszuständen einzelner Zellen. Im peripheren Blut beispielsweise findet man kaum B-Zellen, die RAG mRNA enthalten⁶.

Nach der klonalen Expansion differenzieren die Zentroblasten zu nicht mehr teilungsfähigen Zentrozyten, welche in die Peripherie des Follikels auswandern, um dort von aktivierten T-Zellen und follikulär dendritischen Zellen Überlebenssignale zu erhalten. Weiterhin findet hier die Differenzierung in Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen statt. Plasmazellen wandern nach der Differenzierung über die Zwischenstufe der Plasmablasten ins

Knochenmark aus, um dort im Rahmen der Immunreaktion Antikörper zu produzieren und zu sezernieren. Die Überlebenszeit der Plasmazellen ist im Vergleich zu naiven B-Zellen sehr lang (ca. 1Jahr oder noch deutlich länger). Eine noch längere Überlebenszeit weisen Gedächtnis-B-Zellen auf, welche teilweise lebenslang persistieren und einen langanhaltenden Schutz vor Infektionen bieten¹. Diese Eigenschaft nutzt man seit Langem bei Impfungen, da bei einem erneuten Antigenkontakt (Infektion) eine sofortige, spezifische Immunreaktion, welche von sehr antigen-affinen Gedächtnis-B-Zellen getriggert wird, einsetzt. Mit Hilfe von Sequenziertechniken ist es sogar möglich, bei verschiedenen Individuen und Personengruppen unterschiedliche Immunglobulingenverteilungsmuster zu unterscheiden. Wenn man die Verteilung der einzelnen Genfamilien betrachtet, weisen etwa unterschiedliche Altersstufen ein signifikant verschiedenes Antikörperspektrum auf⁴⁹.

1.3 Fragestellung der Arbeit

Folgende Fragen sind in dieser Arbeit berücksichtigt und sollen näher beleuchtet werden:

- Wie sieht die prozentuale und absolute Verteilung normaler und einiger spezieller B-Zellsubpopulationen bei Menschen unterschiedlichen Alters aus?
- Gibt es dabei Unterschiede zu einem Kollektiv von Patienten mit Erkrankung an einem Magenkarzinom?
- Zur internen Kontrolle wurden SC-1-Epitop tragende B-Zellen einzeln sortiert und das Leichtkettenimmunglobulingenrepertoire sequenziert, liegt hier die spezifische Erkennung eines bestimmten Epitops durch den anti-Idiotyp-Antikörper vor?
- In den ersten Veröffentlichungen ist der Antikörper SC-1 als Produkt einer CD5+ CD19+B-Zelle der Milz beschrieben worden. Findet sich dies im peripheren Blut bestätigt und welchem Subtyp gehören CD19+B-Zellen an, die das spezielle B-Zell-Rezeptor-Epitop SC-1/lambda 3r auf der Oberfläche tragen?
- Sind lambda 3r-positive CD19-positive B-Zellen auch bei gesunden Individuen zu finden und gibt es dann Unterschiede in deren Frequenz oder Subtypisierung?

2 Material und Methoden

2.1 Kollektive

Ein Ziel der Arbeit ist es, das B-Zellrepertoire mit dem Schwerpunkt der anti-Tumoraktivität in verschiedenen Altersgruppen gesunder Probanden einerseits und andererseits bei Magen-Karzinompatienten zu untersuchen und zu vergleichen. Dazu wurden 6 Kollektive aus Probanden und Patienten gebildet (siehe **Tabelle 1**), denen Blutproben entnommen und untersucht wurden.

Patienten- und Probandengruppen	MW Alter	min	max	n
Nabelschnurblut	0	0,0	0,0	16
Kinder	11,0	5,1	18,7	13
30-jährige Probanden	29,0	20,1	45,2	15
50-jährige Probanden	55,3	48,2	65,2	14
70-jährige Probanden	69,3	64,8	79,3	14
Ca-Patienten	64,6	35,2	87,0	16

Tabelle 1. *Untersuchte Patienten- und Probandengruppen und deren Anzahl, min=niedrigstes Alter, max=höchstes Alter, MW=mittleres Alter in den Gruppen*

Insgesamt nahmen 88 Patienten und Probanden freiwillig nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis an der Studie teil. Die Proben stammen von Patienten der Universitätsklinik Würzburg und von freiwilligen Spendern, die mit einer Untersuchung ihrer Zellen einverstanden waren. Die Blutentnahme bei Kindern erfolgte nur im Rahmen von therapeutisch indizierten Eingriffen, eine Einverständniserklärung der Erziehungsberechtigten lag vor. Die Probensammlung und Untersuchung fand nach Prüfung durch die Ethikkommission der Universität Würzburg statt.

Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren das Vorhandensein von akuten Infektzeichen, Infektanamnese in den vorangegangenen 3 Wochen, chronischen Erkrankungen (besonders des rheumatischen Formenkreises) und das Vorliegen von Tumorerkrankungen (außer Gruppe Magenkarzinompatienten).

2.2 Blutproben

Die Teilnahme an der vorliegenden Forschungsarbeit war freiwillig, die Patienten wurden darüber informiert, dass eine Ablehnung keine Auswirkung auf ihre weitere Behandlung hat.

Für die Entnahme der Blutproben wurden standardmäßig Na⁺-Heparin-beschichtete Monovetten (7ml) der Firma Saerstedt, Deutschland verwendet.

Bei Kindern wurde die Blutentnahme nur durchgeführt, wenn zu diagnostischem Zweck eine Venenpunktion durchgeführt wurde. Eine Aufklärung über das Ziel der Studie, sowie den Umfang der Untersuchungen erfolgte bei allen teilnehmenden Personen oder deren Erziehungsberechtigten mündlich oder schriftlich.

2.3 Probenaufbereitung

Die Proben wurden nach Entnahme bis zur Aufbereitung (spätestens am Folgetag) bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Eine Menge von 500µl Vollblut wurde vom hämatologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik aliquotiert und ein standardisiertes, maschinelles Blutbild mit Differentialblutbild angefertigt. Hiermit war es möglich von der relativen Verteilung der B-Zellen auf deren absolute Zellzahl innerhalb der mononukleären Zellen zu schließen.

Die Isolation der Lymphozyten aus dem Vollblut wurde durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten mittels Ficoll-Paque-Zuckerlösung (FicoLiteH, Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland) realisiert. Das Vollblut wurde dabei im Verhältnis 1:1 mit 0,9% NaCl Lösung (Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland) versetzt und in einem 50ml Falcon Röhrchen auf eine Säule von 10ml Ficoll-Lösung aufgetragen. Ein langsames Auftragen des Gemisches und die Zentrifugation ohne Bremsung bei 1500*g über 25 min war erforderlich, um eine Abtrennung der lympho-, monozytären- Zellen zu erreichen.

Nach der Auftrennung verblieben die mononukleären Zellen zusammen mit dem Serum-NaCl-Gemisch direkt oberhalb des dichteren Ficoll-Mediums (FicoLiteH, Linaris) in einer Art „weißlich, trüber“ Schicht, welche mit einer Pasteurpipette abgesaugt werden konnte.

Zur Elimination der Ficollrückstände wurde die abgesaugte Zellsuspension zum Waschen in 45ml FACS-Puffer gegeben, nach 10min Zentrifugation bei 1500*g und 5°C konnte der Überstand entfernt werden. Das am Boden haftende Zellpellett wurde in 5ml FACS-Puffer gelöst, ein definiertes Volumen wurde abgetrennt, um nach Anfärbung mit Methylenblau die Gesamtzellzahl in der Neubauerzählkammer bestimmen zu können. Der verbliebene Teil der Zellen wurde in gleiche Teile zu je $5-6 \times 10^6$ Zellen aufgeteilt und weiterverarbeitet.

Das von uns regulär angewandte Vorgehen schließt das anschließende Einfrieren der PBMCs in 1ml Einfriermedium (0,1ml FCS (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 0,8ml RPMI-Medium (Gibco/Invitrogen), 0,1ml DMSO (Serva Feinchemie, Heidelberg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff mit ein, da dies eine Färbung und Auswertung zu einem nahezu beliebigen späteren Zeitpunkt ermöglicht. Die so gesammelten Proben ermöglichten es, eine Standardisierung der Färb- und Analysebedingungen durchzuführen. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Proben konnten mit geringem quantitativen und qualitativem Verlust jederzeit aufgetaut und untersucht werden.

Quantitativ ergab sich nach dem Auftauen ein Verlust von ca 50% der lympho-, monozytären Zellen (35%-60% tote Zellen) in der Methylenblau-Zählung. Der qualitative Verlust durch den Einfrier- und Auftauvorgang erschien in separat durchgeführten Färbungen vernachlässigbar. Ein signifikanter systematischer Fehler durch die Verluste kann jedoch keinesfalls ausgeschlossen werden.

2.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie im Folgenden auch als FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting -Analyse) bezeichnet, handelt es sich um ein auf Lasertechnik basierendes Verfahren, mit dem eine qualitativ hochwertige und ökonomische Analyse großer Zellzahlen und Probenzahlen möglich ist.

Im hier verwendeten Verfahren konnte die Expressionsstärke von bis zu vier intra- oder extrazellulären Molekülen gleichzeitig bestimmt werden. Die Epitope auf den Zellen wurden dazu mit Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelten Antikörpern in verschiedenen Färbeschritten markiert, um dann im Analysegerät die Fluoreszenzintensität als Maß der Bindungshäufigkeit messen zu können.

Die Zellsuspension wird im FACS-Gerät (FACS-Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durch Luftdruck in die Ansaugnadel und als Flüssigkeitsstrom in die Messküvette getrieben, wo sie von allen Seiten mit Trägerflüssigkeit umhüllt zu einem feinen Strahl mit laminarem Fluss, der einzelne Zellen enthält, ausgezogen wird. Dieser Strahl wird dann in der Mitte der Messküvette mit monochromatischem Licht eines Lasers beschossen, sodass der über Antikörper an die Zellen gebundene Farbstoff zur Emission von Licht angeregt wird, welches detektiert werden kann. Das Emissionsspektrum der Farbstoffe sollte dabei möglichst monochromatisch sein und sich von der Wellenlänge des anregenden Lasers und dem Wellenlängenspektrum der anderen Farbstoffe durch Filter abgrenzen lassen, sodass eine maximale Trennschärfe zwischen den einzelnen Epitopen gewährleistet ist. Um mehr als drei Farbstoffe und damit auch mehr als drei Oberflächenmoleküle bestimmen zu können, ist die Verwendung eines zweiten Lasers nötig, der monochromatisches Licht eines auf der Spektralskala weiter entfernten Bereiches erzeugt und in der Lage ist weitere Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen.

Die von den Farbstoffen emittierten Lichtquanten werden durch optische Filterung getrennt, von unterschiedlichen Detektoren erfasst und quantitativ ausgewertet. Die gemessene Fluoreszenzintensität wird dabei zeitlich einem Ereignis zugeordnet, welches einer vorbeifließenden Zelle entspricht. Die Intensität des gemessenen Lichtes ist proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper in oder auf der Zelle und lässt einen direkten Rückschluss auf die Expressionsstärke und auch Frequenz des Epitops zu.

Einem zeitlichen Ereignis (einer Zelle) werden durch das FACS-Gerät 6 Werte zugeordnet, jeweils die von den vier Farbsensoren erhobenen logarithmischen Intensitätswerte, sowie zwei von Streuungssensoren erhobene lineare Werte.

Die linearen Sensoren, in 90° Position (SSC, Side Scatter, Seitwärtsstreulicht) und in 180° Position (FSC, Forward Scatter, Forwärtsstreulicht) angebracht, ermitteln durch direkte Messung des von der Zelle vorwärts gestreuten Laserlichtes (FSC-Detektor) die Größe der Zelle und durch die Messung des an Binnenstrukturen seitlich abgelenkten Lichtes (SSC-Detektor) die Granularität einer Zelle. Die erhobenen Daten werden von einem Computer in digitaler Form gespeichert.

Die spätere Darstellung der Ereignisse (der Zellen) erfolgte mit Hilfe des FACS-Analyse-Programms Cellquest® Version 3.1 (Becton Dickinson, Heidelberg Deutschland) in ein-dimensionalen Histogrammen und zweidimensionalen Dotplots als Auftragung eines bzw. zweier der sechs Werte eines Ereignisses. Die Darstellung von mehr als zwei Werten erfordert die Erstellung eines Hintergrundgates, da die Graphik auf zwei Dimensionen begrenzt ist.

2.4.1 Einzelzellsortierung

Die Verwendung eines FACS-Gerätes mit Einzelzellsortiereinrichtung ermöglichte es, Zellen mit bestimmten Epitopen auf der Oberfläche nicht nur optisch, sondern auch real voneinander zu trennen. Sie wurden dabei als einzelne Zellen in je eine Vertiefung einer 96-well-PCR-Platte (Greiner bio-one, Frickenhausen) sortiert. In dieser Arbeit wurde ein FACS-Vantage Gerät der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) verwendet, das wie das vorher beschriebene FACS-Gerät (FACS-Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) funktioniert, jedoch darüber hinaus die Separation der Zellen ermöglicht. Im Gerät wurde dazu der dünn ausgezogene, laminare Probenstrahl nach der FACS-Messung am Ende der Messküvette in Schwingungen versetzt und so zu feinsten Tropfen mit je einer Zelle als Inhalt zerstäubt. In einem elektrischen Feld konnte nun durch selektive Aufladung der Tropfen, je nach Fluoreszenzeigenschaft der darin enthaltenen Zelle, eine Ablenkung erzielt werden und die Tropfen entweder in einen Abfallbehälter oder in die Vertiefungen der Platte abgelegt werden. Durch die beweglich gelagerte Platte konnten die einzelnen Vertiefungen computergesteuert einzeln beschickt werden, sodass letztendlich nur eine Zelle mit den vorher festgelegten Eigenschaften in einem well zu liegen kam. Durch Lyse der Zellen war anschließend eine genomische Untersuchung, als auch eine Genexpressionsanalyse (mRNA) auf Einzelzellebene möglich.

2.4.2 Die FACS-Färbung

Die Färbung der PBMCs führten wir in drei unterschiedlichen Ansätzen nach dem Auftauen und Waschen der eingefrorenen Zellen standardisiert und „auf Eis“ gekühlt durch (bei 4°C), um eine Zellaktivierung zu verringern.

Die Standardisierung bestand aus der Verwendung von 10^6 lebendigen Zellen pro Ansatz (Ansatz 1-3), den nachfolgend näher aufgeführten Inkubationszeiten für die einzelnen Färbeschritte und der Volumenstandardisierung bei allen Färbe- und Waschschritten.

Im Ansatz 1 wurden 10^6 Zellen gelöst in 100µl FACS-Puffer-Lösung im ersten Schritt mit 2µl des von der Arbeitsgruppe um Herrn Professor Vollmers aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg selbst hergestellten, nicht konjugierten anti-SC-1-anti-Idiotyp-Ak (mouse-anti-human SC-1) 20 min lang inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Zellsuspension durch Zugabe von 200µl FACS-Puffer-Lösung, anschließender Zentrifugation bei 1500*g für 2 min und folgender Entnahme des Überstandes von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpermolekülen befreit. Dieser Waschschriff wurde nach jeder weiteren Antikörperzugabe als Standardwaschvorgang ausgeführt und wird im Folgenden nur noch als Waschschriff bezeichnet werden.

Die Resuspendierung des Zellpelletts in 100µl frischer FACS-Puffer-Lösung leitet den zweiten Färbeschritt ein, in dem den Zellen 1µl eines sekundären Antikörpers (rat-anti-mouse, konjugiert mit Phycoerythrin „PE“) zur Markierung des nicht konjugierten anti-SC-1-anti-Idiotyp-Ak zugegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug 15 min und wurde von einem Waschschriff gefolgt.

Der erneuten Resuspendierung in 100µl FACS-Puffer-Lösung schloss sich der dritte und letzte Färbeschritt an. Hier wurden den Zellen nacheinander jeweils 1µl anti-human CD19-Ak (konjugiert mit PE-Alexa Fluor 700), anti-human IgD-Ak (konjugiert mit Fluorescein-Isothiocyanat „FITC“) und anti-human CD 5-Ak (konjugiert mit Allophycocyanin „APC“) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 15 min folgte ein letzter Waschschriff mit 500µl FACS-Puffer-Lösung, anschließender Zentrifugation bei 1500*g (2min) und Entnahme des gesamten Überstandes.

Die letzte Resuspendierung des Zellpelletts in 500µl FACS-Puffer-Lösung und die anschließende Überführung der Zellsuspension in FACS-Analyseröhrchen schlossen den Färbvorgang ab. Ansatz 2 und 3 wurden analog behandelt, unterschieden sich jedoch in der Verwendung der Antikörper (siehe Tabelle).

Die Ansätze konnten nun im FACS-Calibur®-Analysegerät (BD, Becton Dickinson, Heidelberg) untersucht werden.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Färbeschritt 1	nicht konjugierter anti-SC-1-anti-Idiotyp- Ak	nicht konjugierter anti-SC-1-anti-Idiotyp- Ak	anti-hu CD27 FITC anti-hu IgD PE anti-hu CD19 Alex anti-hu CD5 APC
Färbeschritt 2	rat-anti-mouse PE	rat-anti-mouse PE	
Färbeschritt 3	anti-hu IgD FITC anti-hu CD19 Alex anti-hu CD5 APC	anti-hu CD27 FITC anti-hu CD19 Alex anti-hu CD5 APC	

Tabelle 2 Färbe- und Waschschrte, Antikörper mit Farbstoffen ; anti-hu= anti-human, FITC= Fluorescein-Isothiocyanat, PE= Phycoerythrin, Alex= Alexa Fluor 700, APC= Allophycocyanin, nicht konjugiert= kein Farbstoff gebunden, die Bezugsquellen für die oben genannten Antikörper sind diesem Kapitel als Tabelle angehängt und werden aus Übersichtsgründen hier nicht weiter erläutert

Beispiel eines FACS-Plots

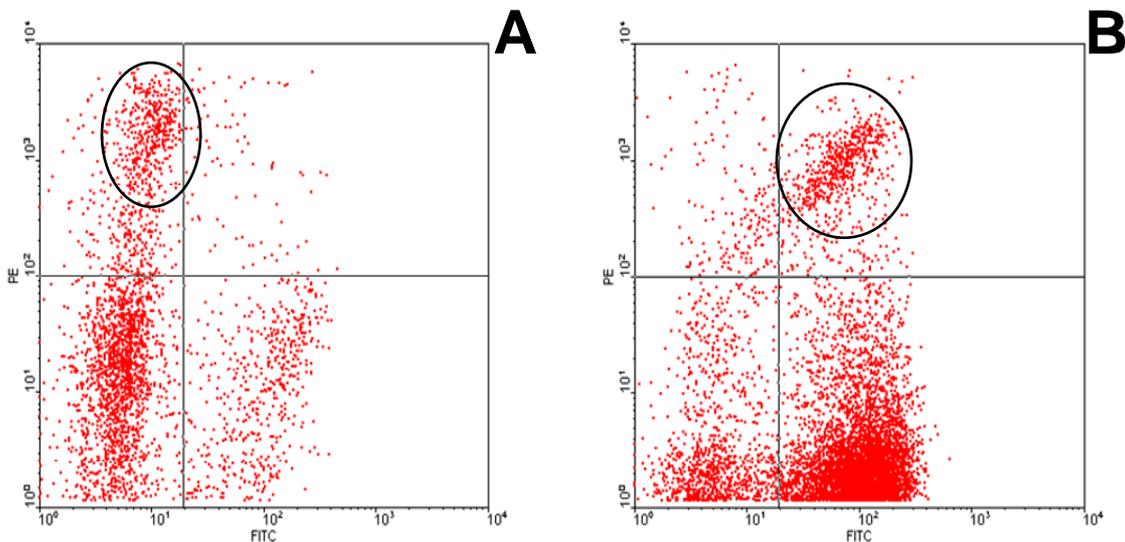


Abbildung 4 Beispiel eines FACS-Plots, A=Karzinompatient, B=Proband, dargestellt ist die Färbung mit anti-hu IgD-Ak (x-Achse) FITC farbmarkiert und dem anti-lambda 3r-Ak (y-Achse) sekundär PE farbmarkiert, im Hintergrund ist ein Gate mit ausschließlicher Anzeige von CD19+B-Zellen eingerichtet, dargestellt ist der IgD-Verlust auf B-Zellen des Karzinompatienten

2.4.3 Geräteeinstellung

Die Geräteeinstellung zur Messung der Proben war eine der wichtigsten Vorbereitungen in der durchgeführten Studie, da dies die Vergleichbarkeit der Messungen direkt beeinflussen kann.

Im Folgenden werden die wichtigsten Elemente der Gerätekonfiguration erwähnt, weniger wichtige wie beispielsweise die Messgeschwindigkeit (langsam, mittel, schnell), die je nach Zellgehalt der Suspension manuell verstellt wurde, werden nur beiläufig erwähnt werden.

2.4.4 Verstärkungsspannung

Eine wichtige Grundeinstellung des Gerätes besteht aus der Regelung der Verstärkerspannung nach Erfassung der Lichtquanten durch den Detektor und der Umwandlung des analogen Signals in digitale Daten.

Dadurch war im Prinzip eine Regulation der Sensorempfindlichkeit möglich, die sowohl mit Zellproben, als auch mit kleinen Kunststoffpartikeln definierter Größe, so genannten Beads, kontrolliert wurde, um eine gute Auftrennung der einzelnen Ereignisse zu erreichen, ohne aber durch die Verstärkung des Signals Ereignisse zu unterdrücken oder das Hintergrundrauschen zu stark zu betonen. Dies stellt sicher, dass Zellen einer bestimmten Größe erfasst werden und nicht durch das Untersuchungsraaster fallen.

Die Spannungsregelung wurde auch für jeden der vier Farbmesskanäle einzeln und gegeneinander mit Zellproben durchgeführt, da je nach verwendetem Fluorochrom eine unterschiedliche Lichtausbeute nach Anregung durch den Laser zu erwarten war. Ziel der Färbung, die nur mit einem Antikörper und einer in dem entsprechenden Kanal zu messenden Farbe durchgeführt wurde, war ebenfalls, eine maximale Auftrennung der Ereignisse zu erreichen und alle Ereignisse sicher im Dot Plot optisch darstellen zu können.

Die optische Kontrolle der Messeinstellungen durch Identifikation bekannter Zellpopulationen im Dot Plot ist die Voraussetzung für die nachfolgend beschriebene Kompensation.

2.4.5 Kompensation

Die weitere Feineinstellung betrifft die Trennschärfe der Lichtsensoren und des vorgeschalteten optischen Apparates. Hier ist es auf Grund von nahe beieinander liegenden Frequenzspektren des anregenden und des emittierten Lichtes nicht immer möglich, eine absolute Trennung zweier unterschiedlicher Signale zu erreichen (beispielsweise Trennung der Lichtquanten der Farbstoffe FITC und PE). Bei diesem Beispiel würden etwa sowohl in Kanal 1 als auch in Kanal 2 geringe Anzahlen an Lichtquanten des jeweils anderen Kanals mitgemessen, sodass es zu Überschneidungen in der Auswertung kommen kann.

Um nun trotzdem eine optimale Auftrennung der Ereignisse erreichen zu können, besteht die Möglichkeit die Daten nach digitaler Umrechnung nachträglich mit Hilfe mathematischer Verfahren voneinander zu trennen.

Dies wird als Kompensation bezeichnet und ist abhängig von dem aktuell verwendeten Gerät, den Proben und den Farbstoffen in den Messkanälen, die unterschiedliche Überlappungsbereiche aufweisen.

Um diese spektrale Überlappung nun bestmöglich zu eliminieren, führten wir Messungen mit Einzel- und Mehrfachfärbungen in unterschiedlicher Zusammensetzung, sowie mit definierten Plastikugeln, „Beads“ genannt (BD Calibrite Beads, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), durch und ermittelten die optimalen Kompensationsparameter (Subtraktionswerte). Diese wurden dann dem Computer bei jeder Messung als Grundlage zur Verfügung gestellt (Parameter-Setting). Die Kompensation ist kein mechanischer Vorgang, sondern ein mathematisches Verfahren, bei dem ein Teil der Fluoreszenzintensität eines Kanals von der eines anderen subtrahiert wird.

Im Dot Plot dargestellt gleicht es einer Verschiebung der Zellwolke parallel zur X- bzw. Y-Achse des Diagramms, wobei allerdings beide Kanäle beeinflusst werden.

Vor der Etablierung einer neuen Färbung führten wir diesen Vorgang an bekannten Zellpopulationen mit gut definierten Epitopen durch, sodass bei Verwendung neuer Antikörper ein Referenzwert vorhanden war, der die Bewertung des neuen Systems vereinfachte. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir zur Einstellung einerseits industriell gefertigte „Bead-Kits“ (BD Calibrite Beads, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), andererseits in der Verteilung auf B-Zellen gut definierte Moleküle wie IgD, CD19 und CD27 in Verbindung mit Proben eines erwachsenen, gesunden Individuums.

Die endgültigen Messungen erfolgten unter Verwendung des, wie oben beschrieben erstellten Parameter-Settings als „Standardeinstellung“. Durch geringe Kompensations-Korrekturen <1% konnte diese Einstellung den jeweiligen neuen biologischen Bedingungen der Proben angepasst werden. Durch die geringen Veränderungen und die regelmäßige Kontrolle mit „Beads“ war ein stabiles Setting auch für wiederholte Messungen erreichbar.

2.4.6 Gates

Die Vorgabe eines Gates ermöglicht es, Zellen mit einem besonderen Färbecharakteristikum in einer Messung ein- oder auszuschließen, somit gelingt es, in einem zweidimensionalen Dot-Plot mehr als zwei Eigenschaften gleichzeitig zu untersuchen. Die Verwendung mehrerer Gates und deren Kombination ist ebenfalls möglich.

In den durchgeführten Untersuchungen wurden die folgenden Gates verwendet. Die Erstellung des ersten Hintergrund-Gates zum Ein- und Ausschluss bestimmter Zellgruppen erfolgte, um die Gruppe der Lymphozyten getrennt von allen anderen Zellen (Granulozyten, Monozyten) untersuchen zu können (Regiongate R1). Die Lage des Gates wurde dabei durch die Größe und Granularität der Zellen individuell bestimmt, sodass sich immer das charakteristische Bild einer Lymphozytenwolke innerhalb der Markierung zeigte.

Die weiteren Gates wurden mit Hilfe von so genannten Isotypkontrollen gesetzt, sodass dabei Antikörper-spezifische cut-off-Werte entstanden. Der Isotypfärbung liegt die Annahme zu Grunde, dass unspezifisch bindende Antikörper, die nicht hoch-affin das eigentliche Epitop binden, sondern andere Strukturen mit niedrig affinen Bindungen auf der Zelle erkennen (Fc-Bereiche, FAB-Bereiche), zu falsch positiven Ereignissen in der Analyse führen. Um diese von Antikörper zu Antikörper unterschiedlich ausgeprägte Eigenschaft zu überprüfen, färbten wir alle Proben nicht nur mit antigenspezifischen, farbmarkierten Antikörpern, sondern zusätzlich mit den jeweils Spezies-, Klassen- und Farbgleichen Isotypantikörpern. Bei unspezifischer Bindung ergab sich dann hier ein Anteil positiver Zellsignale, der dann rechnerisch von dem in der Hauptmessung bestimmten Ergebnis subtrahiert wurde. Gegebenenfalls war es auch möglich, durch Verschiebung des cut-off-Wertes den Ausschluss dieser Zellen über die Definition des Gates zu erreichen. Durch Einschluss aller über dem cut-off-Wert liegenden Zellsignale mit dem Setzen des Gates R2 schlossen

wir in dieser Arbeit alle CD19-positiven Zellen in die weitere Subtypisierung ein. Dies lieferte nach Kombination des Gates R1 mit dem Gate R2 ($R3 = R1 + R2$) aus allen Zellen zuerst die Lymphozyten (ohne Monozyten, etc.) und dann alle CD19-positiven B-Zellen (ohne T-Zellen oder kleine Monozyten), die dann in den einzelnen zweidimensionalen Dot Plots subtypisiert werden konnten.

Die Speicherung des Gerätesettings als Einstellungsmakro im Programm CellQuest® ermöglichte die einfache Übertragung auf alle durchgeführten Messungen. Weiterhin wurden alle Gerätesettings als integraler Bestandteil einer jeden Datei angehängt und konnten so jederzeit wieder aufgerufen und kontrolliert bzw. wieder verwendet werden. Dies ermöglichte ein maximales Maß an Standardisierung.

Ein weiterer Teil der Standardisierung war neben den definierten Gates und Gerätemakros die Anzahl der pro Messung und Datei aufgezeichneten Ereignisse (Zellsignale). In unseren Messungen lag der Zielwert bei > 15000 Zellen, als Messergebnis aufgenommenen, CD19-positiven B-Zellen, dies ermöglichte eine sichere graphische Darstellung auch kleinerer B-Zellpopulationen im Dot-Plot.

2.4.7 Akquisition der Zellen

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte in Echtzeit und konnte visuell mit Hilfe einer Reihe von Dotplots und Histogrammen überprüft werden. Dies ermöglichte die sofortige Einstellungskontrolle und überdies die Kontrolle der Färbung selbst.

Beendet wurden die Messungen automatisch wie bereits vorher beschrieben nach Erreichen einer B-Zellzahl von >15000 oder manuell vor dem Ansaugen von Luft in die Probenadel, um Artefakte durch Blasenbildung zu vermeiden (selten bei Vorhandensein weniger Zellen in der Probenlösung).

Nachträgliche Veränderungen an den aufgezeichneten Dateien in Form von neuer Kompensation waren bei der verwendeten Software nicht möglich und erlaubten keinerlei Verschiebung oder Exklusion von Teilmengen der akquirierten Zellen bei der statistischen Auswertung (Analyse) am Gerät.

2.4.8 Einfluss unterschiedlicher Antikörper und Farbstoffe

Die in den verschiedenen Ansätzen mehrmals untersuchten Epitope auf den B-Zellen wurden teilweise mit unterschiedlichen Antikörpern und Farbkopplungen markiert. Um einen Einfluss der Messmethoden graphisch darzustellen wählten wir einen Scatterplot. Zur statistischen Beschreibung der Zusammenhänge dient ein U-Test nach Mann und Whitney für Unterschiede und eine Spearman'sche Rangkorrelation für die Enge des Zusammenhanges.

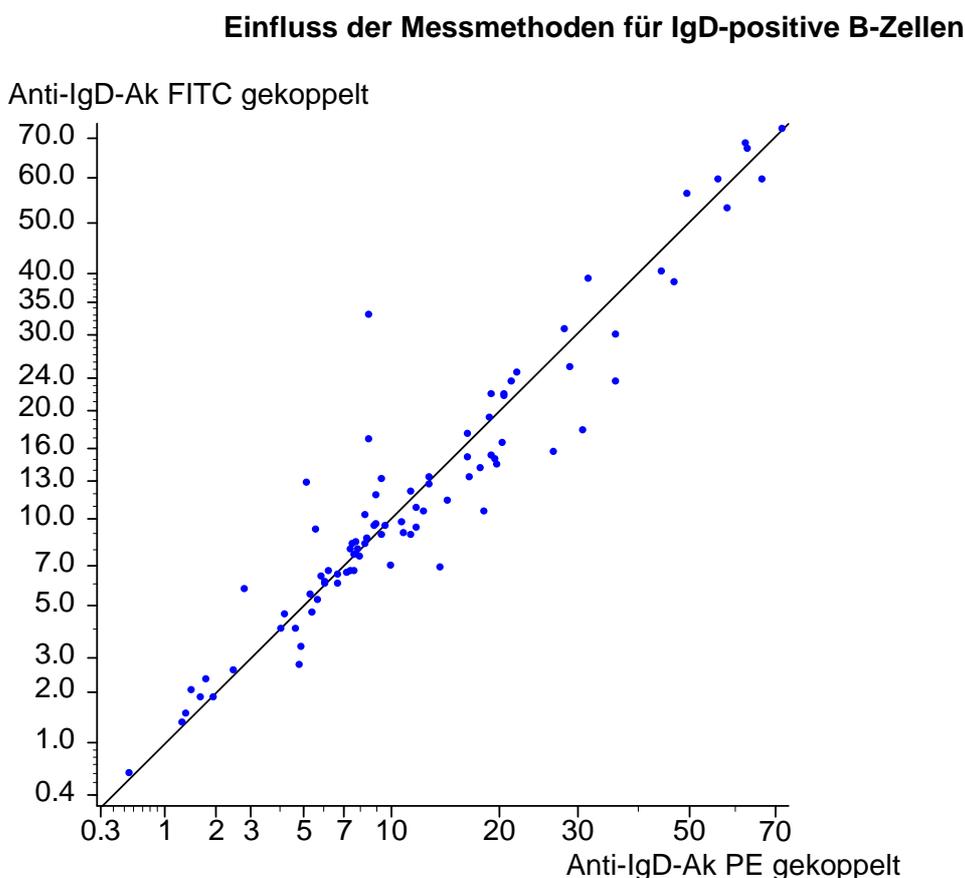


Abbildung 5 Unterschiedliche Antikörper, Farbkopplungen und Messkanäle bei Messung der IgD-positiven, CD19-positiven B-Zellen. Die diagonale Linie markiert exakt gleiche Werte. PE=Phycoerythrin, FITC=Fluorescein-Isothiocyanat;

Für die IgD-positiven, CD19-positiven B-Zellen gilt, dass es keinen Unterschied im Mittel der Messungen gibt ($p = 0.92$ im U-Test nach Mann und Whitney) und eine hohe Korrelation ($\rho = 0.94$, $p < 0.0005^{***}$ in der Spearman'schen Rangkorrelation) vorliegt.

Die Messungen in den unterschiedlichen Ansätzen können daher ohne Korrekturfaktoren miteinander verglichen werden.

Einfluss der Messmethoden für IgD- und CD5-positive B-Zellen

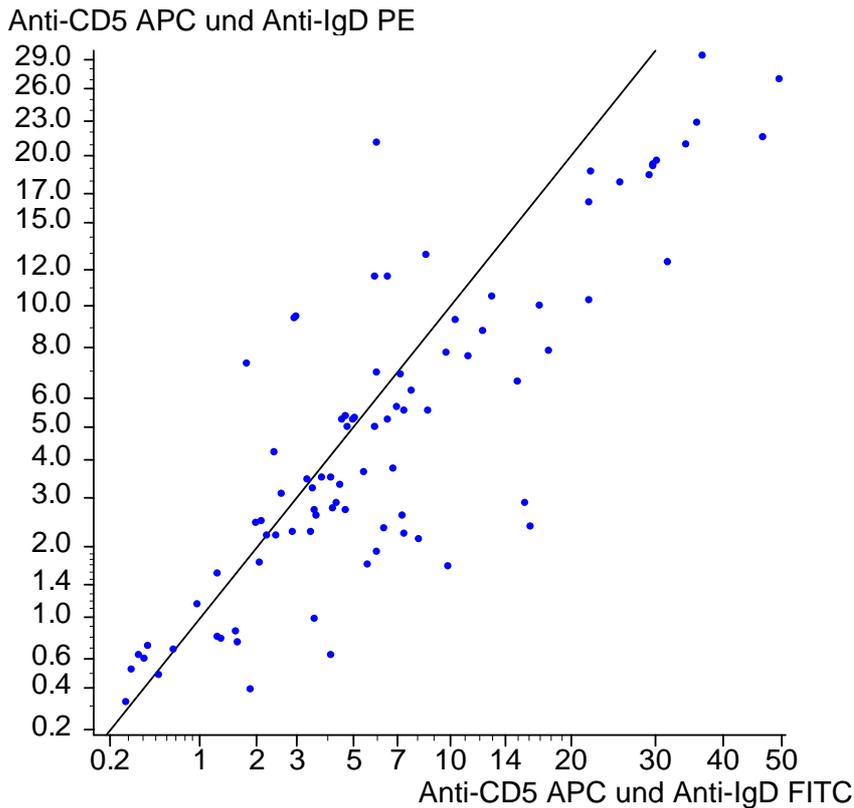


Abbildung 6 Unterschiedliche Antikörper, Farbkopplungen und Messkanäle bei Messung der IgD-positiven und CD5-positiven, CD19-positiven B-Zellen. Die diagonale Linie markiert exakt gleiche Werte. PE=Phycoerythrin, FITC=Fluorescein-Isothiocyanat, APC=Allophycocyanin;

Für CD 5- und IgD- positive, CD19 positive B-Zellen gilt, dass die Werte im Mittel signifikant verschieden sind, die Differenz ist 2.9 ± 6.0 Prozentpunkte. Die Werte korrelieren jedoch gut ($\rho = 0.79$ mit $p < 0.00005^{***}$ in der Spearman'schen Rangkorrelation). Die Korrelation ist aber nicht so eng, wie die bei den beiden Messkanälen von IgD, ein systematischer Fehler ist daher nicht auszuschließen.

2.4.9 Analyse der Daten

Analyse der Daten beschreibt den Vorgang des Aufrufens der einzelnen Probandaten in einem definierten Schema von Dot Plots und Histogrammen zur Darstellung aller Messkanäle paarweise gegeneinander. Dies ermöglichte es, alle Epitopkombinationen beurteilen zu können. In einer standardisierten Vorlage wurden nacheinander alle Ergebnisdateien

aufgerufen und prozentual die Verteilung der Zellen bestimmt. Ebenfalls möglich war die Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensitäten in eindimensionalen Diagrammen mit prozentualen Intensitätsdarstellungen. Als solche Auswertungsbögen wurden die Rohdaten gespeichert und ausgedruckt.

Diese Rohdaten wurden für die anschließenden statistischen Analysen in Tabellen und Diagrammen verwendet.

2.5 Statistik

Die Statistische Auswertung und Darstellung erfolgte unter Verwendung der Programme Microsoft Excel® und GraphPad Prism4® am PC.

Zur Feststellung statistischer Unterschiede wurden die nachfolgend genannten Tests verwendet und an gegebener Stelle in der Legende erläutert.

2.5.1 Statistische Tests

2.5.1.1 Mann-Whitney U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreier Test zur Homogenitätstestung, das heißt der Übereinstimmungsanalyse zweier Verteilungen. In der Literatur wird dieser Test auch Wilcoxon-Rangsummentest genannt.

Bei dem Test werden alle Werte einer Stichprobe A mit allen Werten einer Stichprobe B auf Größe der Messwerte verglichen ($A > B$ und $A < B$). Beim zweiseitigen Test wird auch auf Gleichheit untersucht ($A = B$).

2.5.1.2 Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis

Die Rangvarianzanalyse ist eine Erweiterung des U-Tests auf $k > 2$ oder $k = 2$ Stichproben und ist damit eine parameterfreie Alternative zur einfachen Varianzanalyse für unabhängige Stichproben. Ziel des Tests ist der Vergleich mehrerer Stichproben dahingehend, ob mindestens 2 von ihnen in der Größe der Messwerte signifikant unterschiedlich sind.

2.5.1.3 T-Test

Der T-Test ist ein Hypothesentest mit t-verteilter Testprüfgröße, dabei werden Hypothesen über Erwartungswerte einer oder zweier normalverteilter Grundgesamtheiten getestet. Da der Test nur bei Vorliegen einer Normalverteilung angewandt werden darf, wurde in dieser Arbeit als Alternative oft dem Wilcoxon-Rangsummentest der Vorzug gegeben.

2.5.1.4 Spearman Rangkorrelationskoeffizient

Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient ist ein parameterfreies Maß für Korrelation. Es kann untersucht werden, wie gut eine beliebige monotone Funktion den Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreiben kann, ohne Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung zu machen.

Der Rankkorrelationskoeffizient ist robust gegen Ausreißer und auch für nicht-lineare Zusammenhänge verwendbar. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient geht von Äquidistanz der Ränge aus.

2.5.2 Altersnormierte Darstellung

Die altersnormierte Darstellung geht von der Vorstellung aus, dass die gesunden Probanden als Referenzgruppen dienen. Mit Hilfe der bei diesen Gruppen gesammelten Daten

wurde eine Regressionskurve mit Konfidenzintervallen definiert und die Ergebnisse der Karzinompatienten darin eingetragen. Dies ermöglicht eine anschauliche graphische Darstellung der Abweichungen bei Karzinompatienten im Vergleich mit gesunden Probanden.

2.5.3 Multivariate Verfahren

Multivariate Verfahren zur Generierung eines ja-nein-Ergebnisses zur Prädiktion einer Gruppenzugehörigkeit wurden ebenfalls angewandt. Hier fanden die logistische Regression sowie die Diskriminanzanalyse nach Dirschedl Verwendung.

2.5.4 Signifikanzen

Als statistisch signifikanter Unterschied wurde in dieser Arbeit ein p-Wert von $p < 0,05$ angenommen, dieser wurde in den zugehörigen Diagrammen mit * graphisch gekennzeichnet. Die Verwendung der Zeichen ** und *** bezeichnen ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

Statistisch nicht unterschiedliche Werte wurden nicht gesondert gekennzeichnet.

Die Anordnung der verglichenen Kollektive wurde nach Alter von links nach rechts gegliedert, von Nabelschnurblut bis zu den 70er Probanden. Die Gruppe der Ca-Patienten, die vom Durchschnittsalter zwischen dem Kollektiv der 50er und dem der 70er einzuordnen war, wurde ganz rechts eingeordnet, da alle anderen Gruppen mit dieser verglichen wurden und so eine optisch bessere Darstellung ermöglicht wurde.

2.6 Materialien

2.6.1 Antikörper

Epitop	Farbstoff	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
anti-hu IgD	FITC	1:50	Ziege F(ab)2, pk	Caltag
anti-hu IgD	PE	1:50	Maus IgG2a	BD Pharmingen
anti-hu CD5	PE	1:50	Maus IgG1, mk	Caltag
anti-hu CD5	APC	1:50	Maus IgG1, k	BD Pharmingen
anti-hu CD19	APC	1:50	Maus IgG1, mk	Caltag
anti-hu CD19	Alexa	1:50	Maus IgG1, mk	Caltag
anti-hu CD20	PE	1:50	Maus IgG1, mk	Miltenyi Biotec
anti-hu CD27	FITC	1:50	Maus IgG1, mk	BD Pharmingen
anti-hu CD38	PE	1:50	Maus IgG1, mk	Caltag
anti-hu IgG	FITC	1:50	Maus IgG1, k	BD Pharmingen
anti-hu IgM	FITC	1:50	Maus IgG1, k	BD Pharmingen
anti-hu λ 3r (anti-SC1-Ak)	ohne Farb- stoff	100 μ g/ml	-	Institut für Pathologie, Uniklinik Würzburg, D
rat-anti-mouse	FITC	1:100	Maus IgG2a	BD Pharmingen
rat-anti-mouse	PE	1:100	Maus IgG2a	BD Pharmingen

Tabelle 3 Antikörper, Hersteller, Farbstoffe, Isotypen und Verdünnung; pk=polyklonal, mk= monoklonal, anti-hu= anti-human, FITC=Fluorescein-Isothiocyanat, PE= Phycoerythrin, Alex= Alexa Fluor 700, APC= Allophycocyanin, unlabeled= kein Farbstoff gebunden; Caltag international laboratories, Hamburg Deutschland; BD Pharmingen, San Diego USA, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland;

2.6.2 Isotypen

Isotyp	Farbstoff	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Maus IgG1	FITC	Maus Myeloma	1:50	BD Pharmingen
Maus IgG1	PE	Maus Myeloma	1:50	Caltag
Maus IgG1	Alexa 700	Maus Myeloma	1:50	Caltag
Maus IgG1	APC	Maus Myeloma	1:50	Caltag
pk F(ab)2	FITC	Maus Myeloma	1:50	Caltag

Tabelle 4 Isotypen der Antikörper, Hersteller, Farbstoffe und Verdünnung; pk= polyklonal, mk= monoklonal, anti-hu= anti-human, FITC= Fluorescein-Isothiocyanat, PE= Phycoerythrin, Alex= PE-Alexa Fluor 700, APC= Allophycocyanin, unlabeled= kein Farbstoff gebunden; Caltag international laboratories, Hamburg Deutschland; BD Pharmingen, San Diego USA,

2.6.3 Materialien und Geräte

Material/ Geräte	Hersteller
1,5ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
15ml und 50ml Falcon Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch PCR-Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Serva Feinchemie, Heidelberg, Deutschland
CellQuest Software Version 3.1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Dodecylsulfat (SDS)	Serva Feinchemie, Heidelberg, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Feinchemie, Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid (ETBR)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll-Lösung	FicoLiteH, Linaris, Wertheim-Bettingen, D
Flebogamma 50mg/ml	Grifols, Langen, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
Isopropranolol	Apotheke Universitätsklinikum Würzburg, D
Lichtmikroskop	Hund, Wetzlar, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega, Mannheim, Deutschland
Mastercycler PCR Maschine	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler Gradient PCR Maschine	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler Personal PCR Maschine	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mineral Öl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Molecular Grade Water	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Monovetten Na ⁺ -Heparin 7ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer, Ingelheim, Ingelheim, D
RPMI Kulturmedium + L-Glutamine	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SSC-Puffer (3 M NaCl; 0,3 M Natrium-citrat; pH 7,0)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TBE-Puffer (0,45 M Trissäure; 0,1 M EDTA)	Selbsterstellung, Rheumatologisches Labor der Uni-Kinderklinik Würzburg, Deutschland
Trisbase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Taq Polymerase in Storage Buffer A	Promega, Mannheim, Deutschland
UV-Crosslinker UV Stratalinker 1880	Stratagene, La Jolla, USA
Vakuumofen	Binder, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 5 Materialien, Geräte und Hersteller, Adressen;

3 Ergebnisse

3.1 Gesunde Probanden und Erkrankte

Patienten- und Probandengruppen	Gesamtzahl n = 88	Anzahl
Nabelschnurblut		16
Kinder		13
30-jährige Probanden		15
50-jährige Probanden		14
70-jährige Probanden		14
Ca-Patienten		16

Tabelle 6 Untersuchte Patienten- und Probandengruppen, Anzahl der untersuchten Proben pro Gruppe;

Zum Vergleich mit den Proben der 16 Ca-Patienten wurden 5 Gruppen zu je 13 bis 16 Personen aus unterschiedlichen Altersstufen herangezogen. Diese Gruppen wurden im Folgenden als Referenz verwandt. Eine Sonderstellung nimmt dabei der Vergleich der Ca-Patienten mit der Gruppe der 50er und 70er ein, da hiermit eine altersentsprechende Kontrollgruppe vorliegt.

3.2 Demographie

39 Patienten bzw. Probanden (54%) waren männlich, 33 (46%) waren weiblich. Bei den Nabelschnurblut-Proben der Neugeborenen war auf Grund der Anonymisierung im Rahmen der Datenschutzbestimmungen kein Geschlecht dokumentiert. Global war zwischen männlichen und weiblichen Patienten bzw. Probanden kein Altersunterschied zu erkennen ($p = 0,16$ im U-Test nach Mann und Whitney).

3.2.1 Demographie

Gruppe	n	Alter				Geschlecht		
		MW	ST	min	max	m	w	%w
Nabelschnurblut	16	0,0	–	0,0	0,0	–	–	–
Kinder	13	11,0	4,7	5,1	18,7	7	6	46
30er	15	29,0	7,5	20,1	45,2	6	9	60
50er	14	55,3	4,8	48,2	65,2	6	8	57
70er	14	69,3	3,6	64,8	79,3	7	7	50
Ca-Patienten	16	64,6	15,0	35,2	87,0	13	3	19

Tabelle 7 Gruppen, Anzahl der Proben, Alter und Geschlecht, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, min = kleinster Wert, max = größter Alterswert der Gruppe, m = männlich, w = weiblich, %w = prozentualer Anteil der weiblichen Probanden;

Um bei den Zellen einen Alterseffekt untersuchen zu können, führten wir eine Erweiterung der Untersuchungen mit drei weiteren Gruppen neben den altersentsprechenden Proben im Vergleich zu den Ca-Patienten durch. Dies waren die Gruppen der Neugeborenen, deren plazentares Nabelschnurblut verwendet wurde, die Gruppe der Kinder mit einem Durchschnittsalter von 11 Jahren und die Gruppe der 30er mit einem mittleren Alter von 29 Jahren.

Die direkt alterskorrelierten Vergleichsgruppen waren die Gruppe der ca. 50-jährigen (50er) mit einem mittleren Alter von 55,3 Jahren und die Gruppe der 70er mit einem Durchschnittsalter von 69,3 Jahren.

Die Verteilung der Geschlechter war in den Gruppen nicht signifikant verschieden, obwohl in der Gruppe der 16 Ca-Patienten 13 männliche und nur 3 (19%) weibliche Patienten zusammengefasst wurden ($p = 0,13$ im Chi-Quadrat-Test). Die Verteilung männlich/weiblich spiegelt die in der Universitäts-Klinik Würzburg zufällig aufgetretene Geschlechterverteilung von Magenkarzinompatienten in einem gewissen Zeitraum wieder, was der Geschlechterverteilung bei der Inzidenz der Erkrankung im Allgemeinen in etwa entspricht.

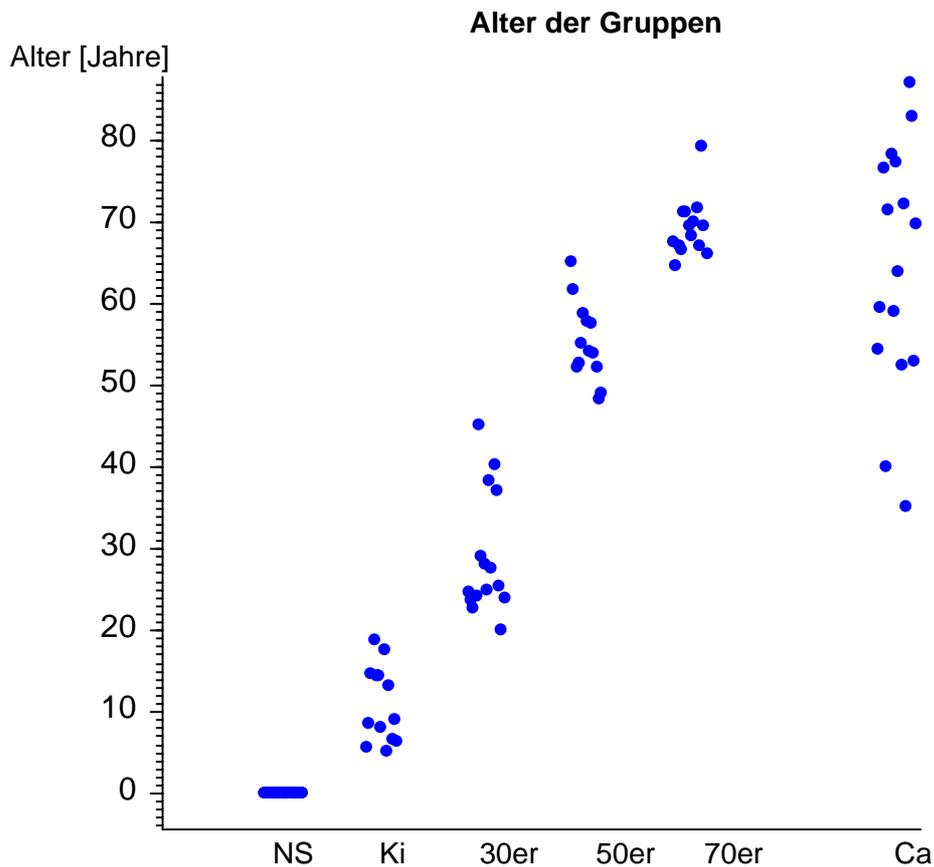


Abbildung 7 Alter der Patienten- bzw. Probandengruppen; Jeder Punkt stellt einen Patienten bzw. Probanden dar; NS = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

3.3 Blutbild

Bei den Magenkarzinompatienten und bei allen Probanden außer den Neugeborenen wurde vor der Probenanalyse ein maschinelles Blutbild im Labor der Kinderklinik erstellt, um Rückschlüsse auf die absolute Zellzahl ziehen zu können.

Über alle Gruppen gemittelt ergab sich eine Zahl von 6541 Leukozyten pro μl Vollblut und eine Zahl von 1980 Lymphozyten pro μl Blut, dies entspricht einem Anteil von 31,2% Lymphozyten an den Leukozyten.

3.3.1 Blutbild

Bei der absoluten Zahl der Leukozyten war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. Es zeigte sich lediglich ein Trend zur Abnahme der Zellzahl mit steigendem Alter.

Die Lymphozyten nahmen mit dem Alter ab, wobei die Werte der 70er Kontrollen wieder höher lagen, als die der 50-jährigen Probanden (s. **Tabelle 8**, und **Abbildung 8**). Die Ca-Patienten unterschieden sich von den 50ern und 70ern signifikant und wiesen eine Abnahme der Lymphozyten auf ($p = 0,0039$; Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, **Tabelle 9**).

Relativ gesehen fanden sich bei der Lymphozytenverteilung ebenfalls Gruppenunterschiede (siehe **Tabelle 8**). Die Patienten wiesen hier den geringsten Anteil Lymphozyten an den Leukozyten überhaupt auf ($p = 0,00073$ i. Vgl. zur Alterskontrolle, **Tabelle 9**). Anmerkung: Die Patienten hatten noch keine Chemotherapie erhalten, die untersuchten Blutproben stammen von der Erstabklärung.

Gruppen	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
				Leukozyten/ μ l Blut		
Kinder	13	7267	1665	7200	5747	9116
30er	15	5866	1816	5800	4122	7235
50er	14	7237	2423	6780	5374	8563
70er	14	5860	1555	5760	4510	7266
Ca-Patienten	16	6569	1838	6575	4698	8200
Lymphozyten/ μ l Blut				Lymphozyten/ μ l Blut		
Kinder	13	2642	863	2581	1798	3756
30er	15	2190	566	2153	1724	2670
50er	14	1887	636	1894	1127	2512
70er	14	2064	803	2000	1346	2327
Ca-Patienten	16	1252	547	1233	899	1680
Lymphozyten [%]				Lymphozyten [%]		
Kinder	13	36,5	9,0	36,1	29,6	42,6
30er	15	38,6	8,0	38,7	31,4	46,3
50er	14	26,9	8,3	25,8	20,3	34,8
70er	14	35,6	9,7	35,8	24,6	45,9
Ca-Patienten	16	20,1	8,6	21,0	13,3	29,8

Tabelle 8 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellzahl (CD19-positive B-Zellen) in Zellen/ μ l Blut und Prozent dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
Leukozyten/ μ l Blut						p
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,15
	Kinder	30er	50er	70er		0,09
		30er	50er	70er		0,2
		30er	50er	70er	Ca	0,27
			50er	70er	Ca	0,29
Lymphozyten/ μ l Blut						
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00012***
	Kinder	30er	50er	70er		0,19
		30er	50er	70er		0,52
		30er	50er	70er	Ca	0,00079***
			50er	70er	Ca	0,0039**
Lymphozyten [%]						
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00001***
	Kinder	30er	50er	70er		0,0093**
		30er	50er	70er		0,005**
		30er	50er	70er	Ca	0,00001***
			50er	70er	Ca	0,00073***

Tabelle 9 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

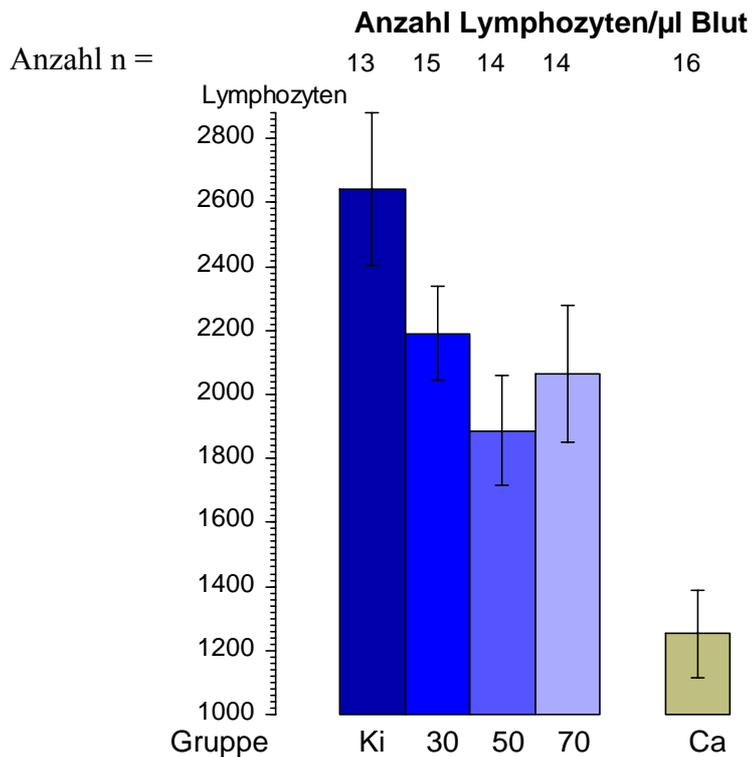


Abbildung 8 Gruppen und Lymphozytenzahl; Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes für die Probandengruppen und die Patientengruppe; Ki = Kinder Kontrolle; 30=30er Kontrolle; 50er, 70er; Ca = Ca-Patienten;

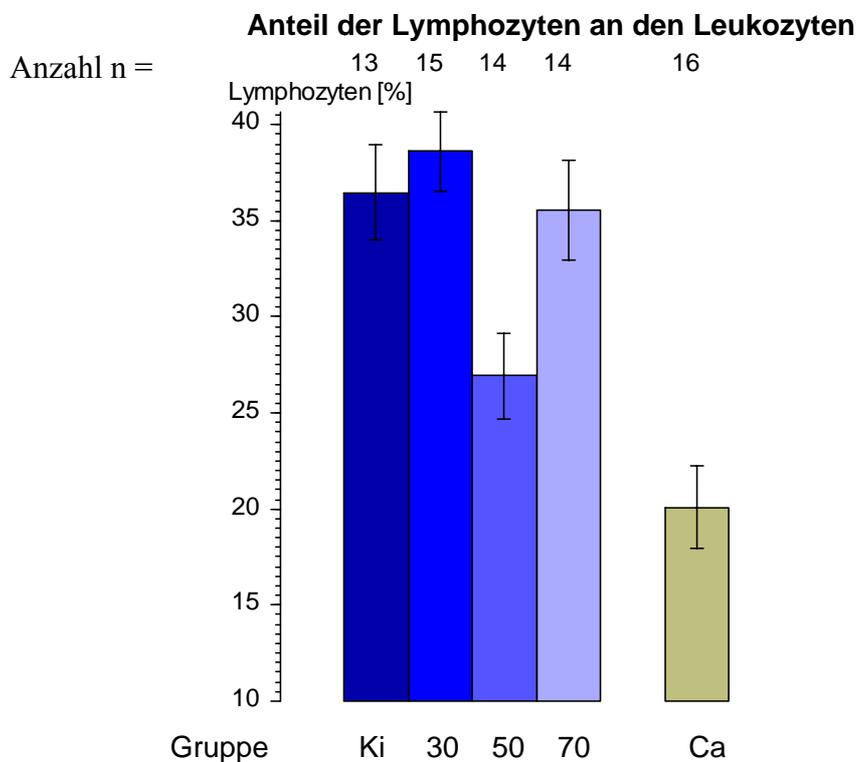


Abbildung 9 Gruppen und prozentuale Lymphozytenzahl; Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes für die Probandengruppen und die Patientengruppe; Ki= Kinder Kontrolle; 30er=30er Kontrolle; 50er, 70er; Ca = Ca-Patienten;

3.3.2 Demographie und Blutbild

Korrelation mit dem Alter						
Blutbild	Ca, Kinder, 30er, 50er, 70er			Kinder, 30er, 50er, 70er		
	n	rho	p	n	rho	p
Leukozyten	72	-0,1694	0,16	56	-0,1725	0,21
Lymphozyten	72	-0,4606	0,0001***	56	-0,3069	0,023*
Lymphozyten [%]	72	-0,3557	0,0023**	56	-0,1971	0,15

Tabelle 10 Alter und Blutbild; absolute und relative Werte; rho und p aus der Spearman'schen Rangkorrelation; Ca = Magenkarzinompatienten, 30er = ca. 30-jährige Gesunde, 50er..., 70er..., In der ersten Zeile Angabe der verglichenen Gruppen;

Die Lymphozytenzahl in Zellen/ μ l Blut nahm in der alterskorrelierten Darstellung mit dem Alter ab (s. **Tabelle 10**). Relativ gesehen nahm der Anteil der Lymphozyten bezogen auf die Leukozyten mit dem Alter ebenfalls signifikant ab. Dies gilt aber nur für die Vergleiche unter Einbeziehung der Karzinompatienten. Bei alleinigem Vergleich der gesunden Probanden ließ sich kein Unterschied darstellen.

Alter und relative Lymphozytenzahl

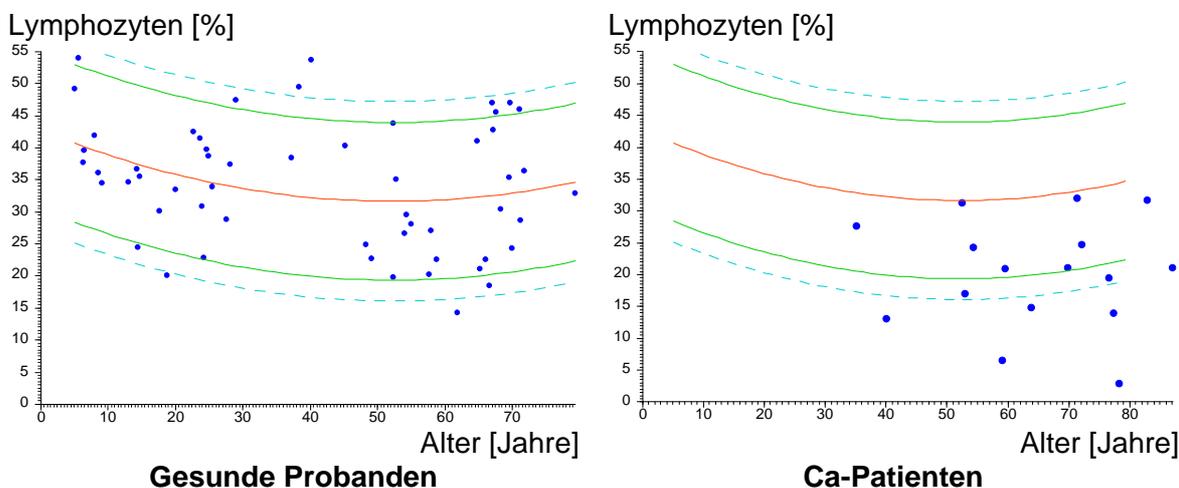


Abbildung 10 Alter und Anteil der Lymphozyten in % der Leukozyten; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person; Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar; die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Konfidenzintervalle; Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten;

Alter und absolute Lymphozytenzahl

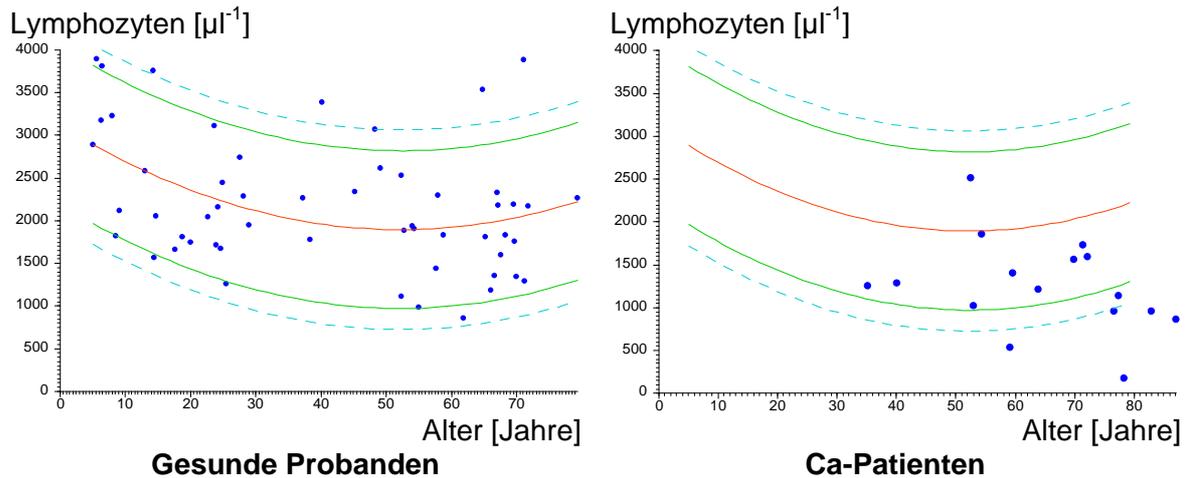


Abbildung 11 Alter und Lymphozyten / μl Blut; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person; Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche; Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten;

Die altersbezogenen Lymphozytenwerte waren bei den Ca-Patienten signifikant niedriger als bei den gesunden Probanden. Die absolute Lymphozytenzahl betrug bei den Probanden 1962 ± 697 Zellen/ μl und bei den Ca-Patienten 1156 ± 638 Zellen/ μl Vollblut. Die auf die Leukozyten bezogenen Lymphozyten-Prozentwerte waren bei den Probanden $32,6 \pm 9,3\%$, bei den Ca-Patienten $19,2 \pm 8,6\%$. Damit war sowohl der absolute als auch der relative Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten beim Erkrankten im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollen signifikant erniedrigt ($p = 0,00013^{***}$ und $p = 0,00001^{***}$ im U-Test nach Mann und Whitney).

3.3.2.1 Geschlechtsunterschiede global und in ausgewählten Gruppen

Ein Vergleich der Geschlechter zeigt innerhalb der Gesamtgruppe, der Gruppe der Kinder und der Gruppe der 30er signifikante Unterschiede. Hier waren die Leukozyten- und Lymphozytenwerte der weiblichen Probanden erhöht.

Vergleicht man die Lymphozytenzahlen aller gesunden Probanden untereinander, ohne Altersnormierung, so ergibt sich für die absolute Lymphozytenzahl ein signifikanter Geschlechtsunterschied, 1691 ± 514 bei den männlichen Probanden gegenüber 2205 ± 756 bei den Probandinnen ($p = 0,013^*$, im U-Test nach Mann und Whitney).

Für die relativen Werte dagegen ist kein signifikanter Unterschied feststellbar ($31,5 \pm 8,8$ gegenüber $32,9 \pm 9,8$; $p = 0,76$; im U-Test nach Mann und Whitney).

Die altersmäßig direkte Vergleichsgruppe der 50er und 70er zeigt im Vergleich zu den Ca-Patienten weder prozentual noch absolut signifikante Unterschiede bezüglich der geschlechtsspezifischen Zellverteilung.

3.4 B-Zellen

Im Mittel aller Probanden und Patienten betrug der Anteil der CD 19-positiven B-Zellen (im Folgenden auch als „CD19+BZ“ abgekürzt) an den monozytären Zellen des peripheren Blutes 24% mit einer Spanne von 2,3 bis 85,1%.

Die Verteilung der CD19-positiven B-Zellen wich von einer Gaußschen Normalverteilung ab, daher sei hier der Median angegeben. Die Hälfte der Personen hatten über 16% CD19+ B-Zellen an den peripheren Blut-Lymphozyten.

Die absolute B-Zellzahl (CD19+BZ) war bei den Nabelschnurblut-Proben nicht zu erheben, da kein Blutbild angefertigt wurde und somit keine absolute Lymphozytenkonzentration zur Verfügung stand. Bei den übrigen Gruppen betrug die Zellzahl im Mittel 354 Zellen/ μl mit einer Spanne von 28 bis 1469 Zellen/ μl Vollblut.

3.4.1 B-Zellen

Gruppe	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
B-Zellen / μl				B-Zellen / μl		
Kinder	13	635	332	576	303	845
30er	15	428	288	310	251	560
50er	14	373	212	403	130	612
70er	14	243	93	224	173	303
Ca-Patienten	16	134	91	112	55	207
B-Zellen [%]				B-Zellen [%]		
Nabelschnurblut	16	57,9	18,5	61,5	37,8	74,4
Kinder	13	23,4	6,9	22,5	16,7	28,9
30er	15	19,4	10,2	16,4	11,6	24,4
50er	14	20,1	12,2	16,7	10,8	28,2
70er	14	12,3	3,8	11,9	10,0	16,4
Ca-Patienten	16	11,0	5,4	10,2	6,5	13,6

Tabelle 11 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl (CD19-positive B-Zellen) in Zellen/ μ l Blut und Prozent dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
B-Zellen / μ l						p
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005 ***
	Kinder	30er	50er	70er		0,00077***
		30er	50er	70er		0,048*
		30er	50er	70er	Ca	0,00008***
			50er	70er	Ca	0,0012**
B-Zellen [%]						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005 ***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,0027**
	Kinder	30er	50er	70er		0,077
		30er	50er	70er		0,00005***
		30er	50er	70er	Ca	0,0054**
			50er	70er	Ca	0,024*

Tabelle 12 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Das Nabelschnurblut war am reichsten an B-Zellen, besonders relativ gesehen. Bei den Erwachsenen wurden unter 20% B-Zellen beobachtet und auch bei den Kindern nur knapp darüber. Die niedrigsten Werte, sowohl absolut als auch relativ, konnten bei den Ca-Patienten ermittelt werden. Hier zeigte sich im Mittel eine Zahl von 134 CD19+ B-Zellen/ μl Blut, was einem prozentualen Anteil von 11% an den peripheren Lymphozyten entspricht. Im Vergleich dazu wiesen die 50er 373 B-Zellen/ μl und die 70er 243 B-Zellen/ μl Blut auf. Relativ betrachtet entspricht dies 20,1% und 12,3% CD19+ B-Zellen an den Lymphozyten. Die Unterschiede sind signifikant ($p = 0,0012^{**}$ bei der absoluten und $p = 0,024^*$ bei der relativen Verteilung; siehe **Tabelle 12**).

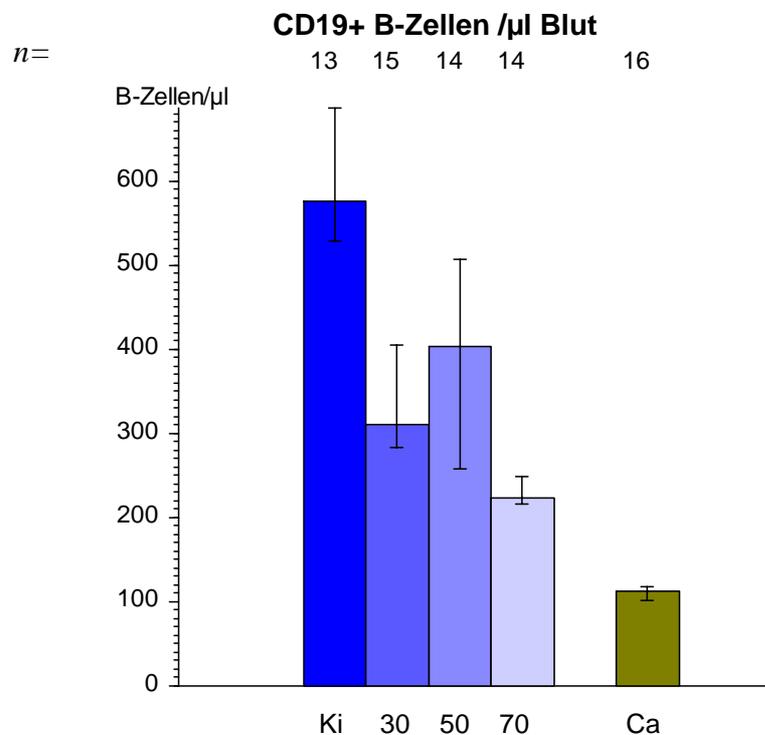


Abbildung 12 absolute CD19+ B-Zellzahl pro μl Vollblut bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenz Intervall des Medians; Ki = Kinder Kontrolle, 30er=30er Kontrolle, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Prozentualer Anteil CD19+ B-Zellen an den Lymphozyten

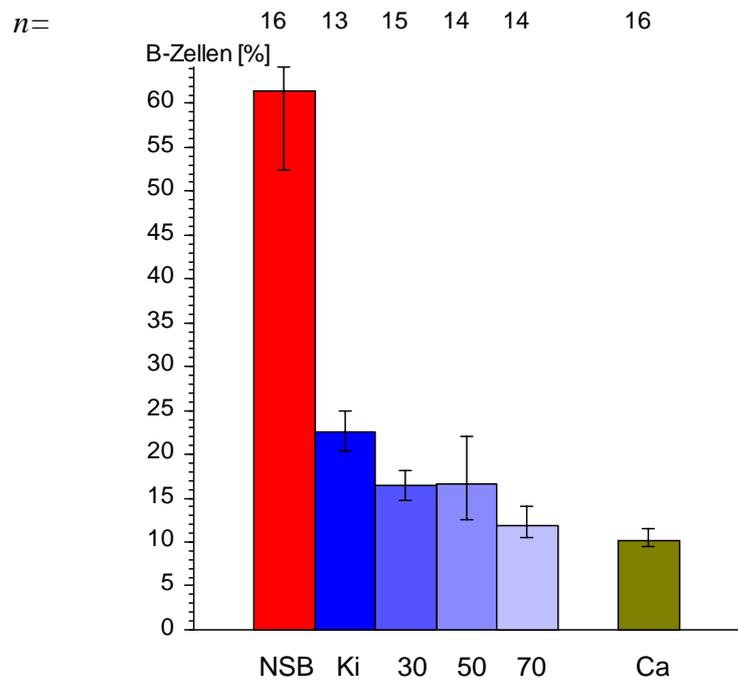


Abbildung 13 Prozentuale CD19+B-Zellzahl bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenz Intervall des Medians; NSB =Nabelschnurblut, Ki = Kinder Kontrolle, 30er = 30er Kontrolle, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

3.4.2 Demographie der CD19+ B-Zellen

Alter und prozentualer CD19+ B-Zellanteil an den Lymphozyten

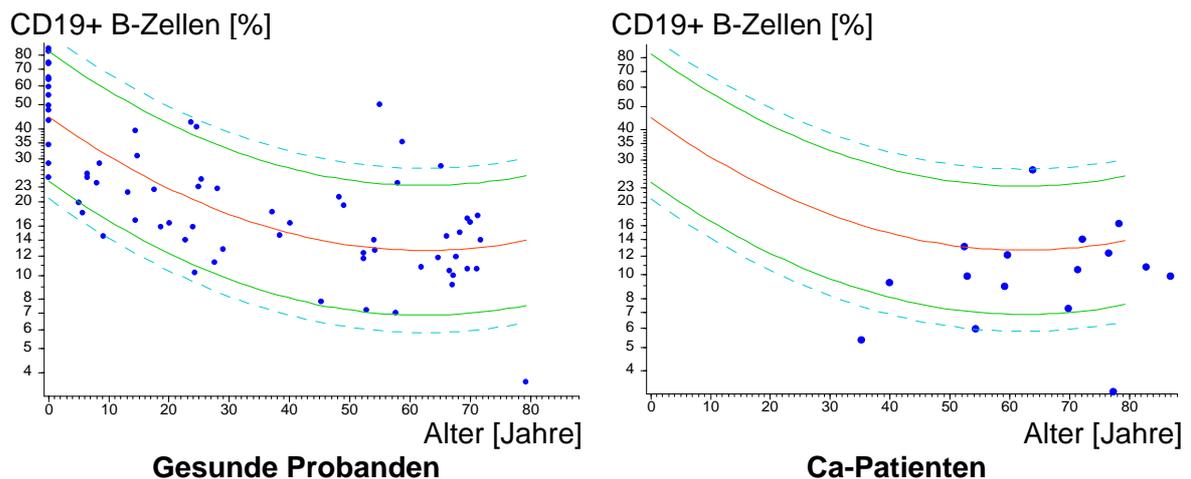


Abbildung 14 CD19+ B-Zellen in % der Lymphozyten, altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%- Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten. Die y-Achse ist logarithmisch eingeteilt.

Alter und absolute Anzahl der CD19+ B-Zellen / μ l Blut

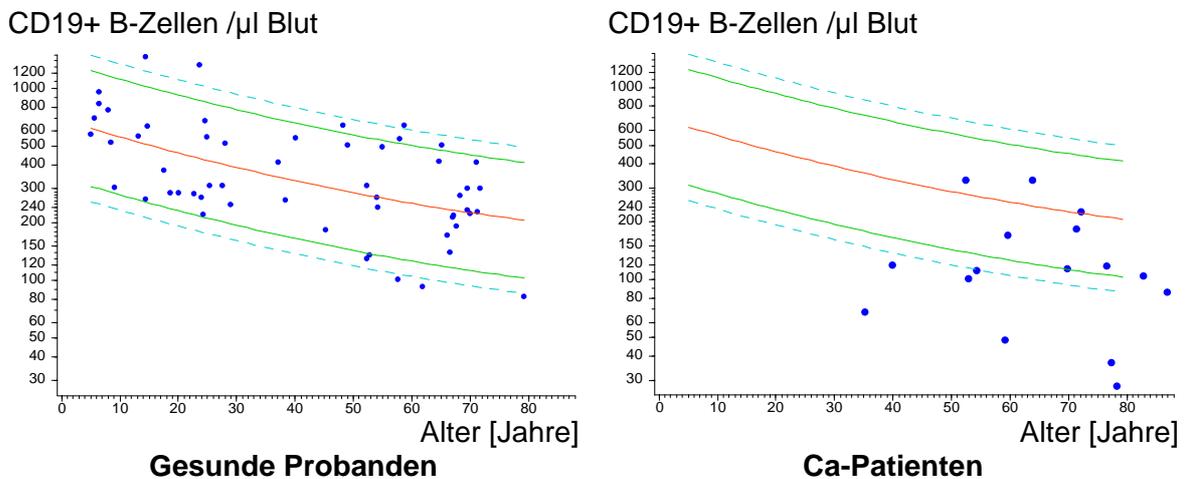


Abbildung 15 absolute Anzahl CD19+ B-Zellen / μ l Blut; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%- Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten. Die y-Achse ist logarithmisch eingeteilt.

Für die beiden über 80 Jahre alten Ca-Patienten gibt es streng genommen keine gleich alten oder älteren Probanden mehr, daher enden die Approximationskurven mit den Normwerten in den Diagrammen vorher. Dies gilt für den gesamten Verlauf der Untersuchungen.

Die altersbezogene Darstellung zeigt signifikante Unterschiede in der Verteilung der CD19+ B-Zellen, sowohl absolut, als auch prozentual, im Vergleich der Ca-Patienten mit allen Probanden. Die Werte der Ca-Patienten sind dabei jeweils erniedrigt ($p=0,00006^{***}$ absolut, $p=0,025^*$ relativ; siehe **Tabelle 23**).

3.4.3 Blutbild und B-Zellen

Je mehr Lymphozyten ein Patient oder Proband hatte, desto höher war statistisch der prozentuale Anteil der CD19+ B-Zellen ($\rho = 0,27$, $p = 0,020^*$ in der Spearman'schen Rangkorrelation). Wenn man die Lymphozytenzahl und die CD19+ B-Zellen auf das Alter

von 40 Jahren hoch- bzw. zurückrechnet, dann wird diese Beziehung noch stärker ($\rho = 0,46$, $p = 0,0001^{***}$ in der Spearman'schen Rangkorrelation).

Das liegt aber hauptsächlich an den Ca-Patienten, die niedrige Lymphozytenwerte und niedrige CD19+ B-Zellwerte hatten. Die Ursache dieses Effektes ist unklar, da keiner der Magenkarzinompatienten vor der Untersuchung therapiert worden war. Wenn man nur die gesunden Probanden testet, dann findet sich keine solche Beziehung zwischen Lymphozyten und dem CD19+ B-Zellen Anteil.

3.5 Marker

3.5.1 IgD

3.5.1.1 Verteilung der IgD-positiven CD19+ B-Zellen

Gruppe	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
IgD-positiv CD19+ B-Zellen/ μ l				IgD-positiv CD19+ B-Zellen/ μ l		
Kinder	13	407	199	358	200	606
30er	15	218	125	206	109	295
50er	14	220	145	183	67	369
70er	14	152	70	149	92	216
Ca-Patienten	16	66	58	66	17	90
IgD-positiv CD19+ B-Zellen [%]				IgD-positiv CD19+ B-Zellen [%]		
NSB	16	79,0	12,7	80,5	68,4	91,1
Kinder	13	63,7	19,8	68,0	44,9	78,6
30er	15	55,1	15,2	56,9	37,5	69,1
50er	14	59,9	17,0	62,1	49,3	74,0
70er	14	63,1	10,7	61,9	53,0	73,6
Ca-Patienten	16	46,85	20,7	49,7	26,5	67,7

Tabelle 13 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl (CD19-positiv B-Zellen) mit den entsprechenden Epitopen in Zellen/ μ l Blut und Prozent dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
IgD-positive CD19+ B-Zellen/ μ l						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	p
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er		0,0019**
		30er	50er	70er		0,26
		30er	50er	70er	Ca	0,00017***
			50er	70er	Ca	0,0007***
IgD-positive CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00003***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00031***
	Kinder	30er	50er	70er		0,31
		30er	50er	70er		0,07
		30er	50er	70er	Ca	0,13
			50er	70er	Ca	0,073

Tabelle 14 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

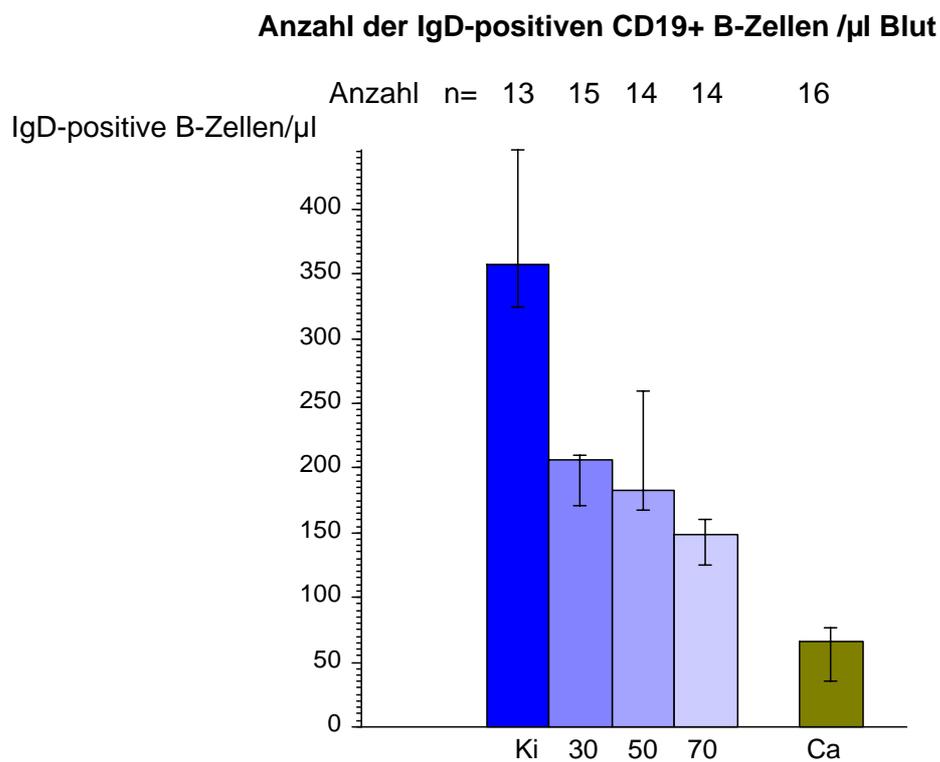


Abbildung 16 absolute Anzahl der IgD+, CD19+ B-Zellen pro μ l Vollblut bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenz Intervall des Medians; Ki = Kinder Kontrolle, 30er=30er Kontrolle, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

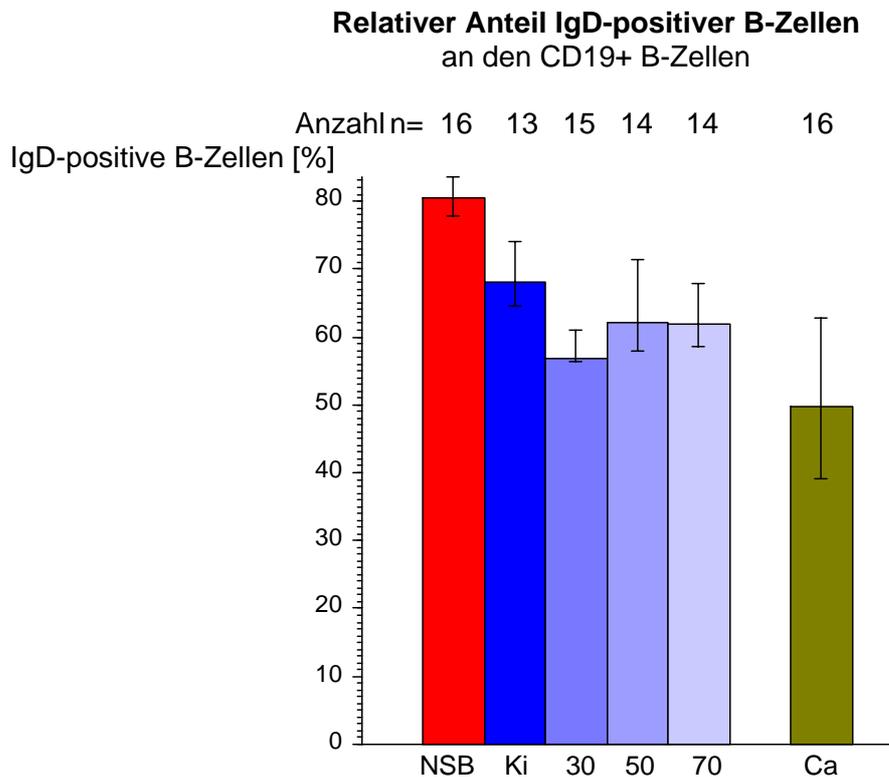


Abbildung 17 Prozentualer Anteil der IgD-positiven BZ an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Die absolute Anzahl der IgD-positiven, CD19-positiven B-Zellen ist bei den Ca-Patienten im Vergleich zur altersäquivalenten Gruppe der 50er und 70er signifikant erniedrigt ($p=0,0007$ in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; siehe **Tabelle 14, Abbildung 16**).

Der relative Anteil der IgD-positiven B-Zellen an den CD19+ B-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant, zeigt aber eine Tendenz zu niedrigeren Werten bei den Ca-Patienten (siehe **Tabelle 14, Abbildung 17**)

3.5.1.2 Demographie und IgD-positive, CD19+ B-Zellen

Alter und IgD-positive CD19+ B-Zellen / μ l Blut

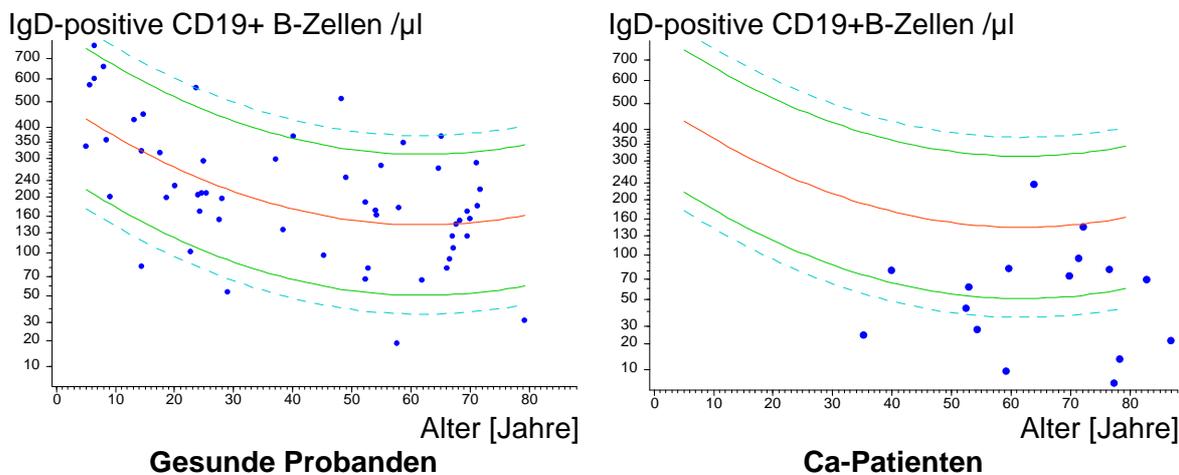


Abbildung 18 Anzahl der IgD-positiven, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut bei Probanden und Karzinompatienten; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%- Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten. Die y-Achse ist nach der Kubikwurzel eingeteilt.

Alter und IgD-positive CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen

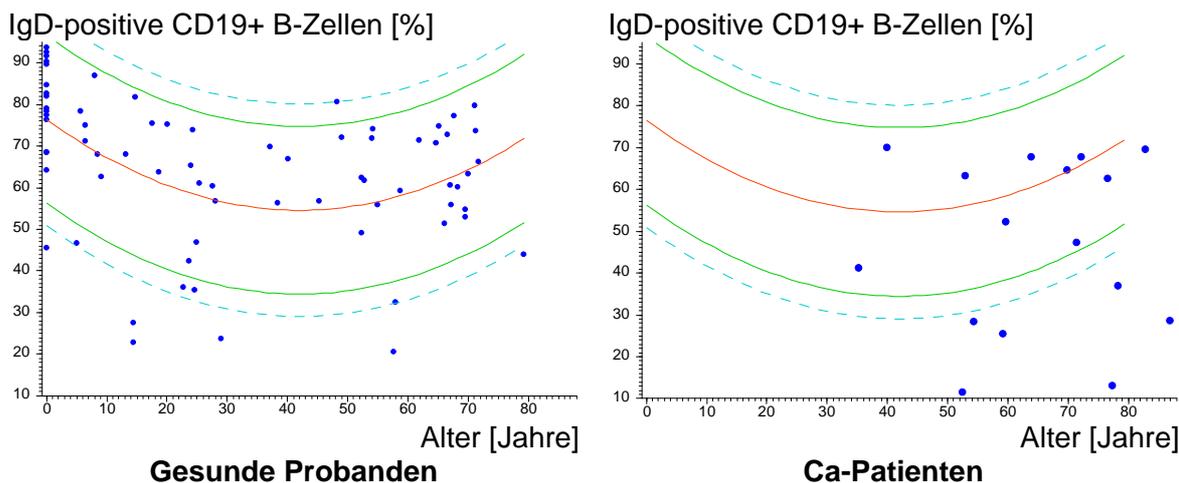


Abbildung 19 IgD-positive BZ an CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%- Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten.

Die altersbezogenen Absolutwerte der IgD-positiven, CD19-positiven B-Zellen waren bei den Ca-Patienten signifikant niedriger als bei den gesunden Probanden ($p = 0,00001^{***}$, siehe **Tabelle 23**). **Abbildung 18** illustriert diesen Unterschied und zeigt bei Ca-Patienten niedrige Werte.

Auch der altersbezogene, relative Anteil der IgD-positiven B-Zellen an den CD19+ B-Zellen war bei den Ca-Patienten signifikant niedriger als bei allen Gesunden ($p=0,0033^{**}$, s. **Tabelle 23**). Die Anzahl der Ausreißer nach unten (niedrige relative Werte) in **Abbildung 19** beträgt 6 von 16.

3.5.2 CD5

3.5.2.1 Verteilung der CD5-positiven CD19+ B-Zellen

Gruppe	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
CD5-positiv CD19+ B-Zellen /μl						
Kinder	13	87	56	65	36	142
30er	15	48	42	39	19	57
50er	14	33	26	29	13	44
70er	14	28	20	24	13	41
Ca-Patienten	16	24	30	15	6	40
CD5-positiv CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	16	32,4	9,8	33,5	25,5	41,3
Kinder	13	13,5	8,3	10,8	8,2	16,2
30er	15	10,6	2,9	9,0	8,0	13,5
50er	14	9,6	5,6	6,7	5,7	16,9
70er	14	11,4	4,8	9,9	7,2	14,5
Ca-Patienten	16	13,9	8,7	11,3	7,9	22,3

Tabelle 15 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl (CD19-positiv B-Zellen) mit den entsprechenden Epitopen in Zellen/ μ l Blut und Prozent dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
CD5-positive CD19+ B-Zellen / μ l						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	p
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00051***
	Kinder	30er	50er	70er		0,0046**
		30er	50er	70er		0,16
		30er	50er	70er	Ca	0,031*
			50er	70er	Ca	0,19
CD5-positive CD19+ B-Zellen %]						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er		0,16
		30er	50er	70er		0,18
		30er	50er	70er	Ca	–
			50er	70er	Ca	–

Tabelle 16 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Die absolute Zahl der CD5-positiven, CD19+ B-Zellen war bei den Kindern signifikant gegenüber den gesunden Erwachsenen erhöht (s. **Tabelle 15**, **Tabelle 16**). Ein Unterschied der prozentualen Verteilung bestand nur zwischen dem Nabelschnurblut und allen anderen Gruppen.

Zwischen den Ca-Patienten und den gesunden Kindern und Erwachsenen war bezüglich der relativen Anzahl CD5-positiver, CD19-positiver B-Zellen kein Unterschied zu erkennen, der Wert der absoluten Anzahl CD5-positiver, CD19+ B-Zellen lag aber beim Vergleich der Magenkarzinompatientengruppe mit den Gruppen 30er, 50er, 70er, signifikant unter den Werten der gesunden Erwachsenen ($p = 0,031^*$ siehe **Tabelle 16**).

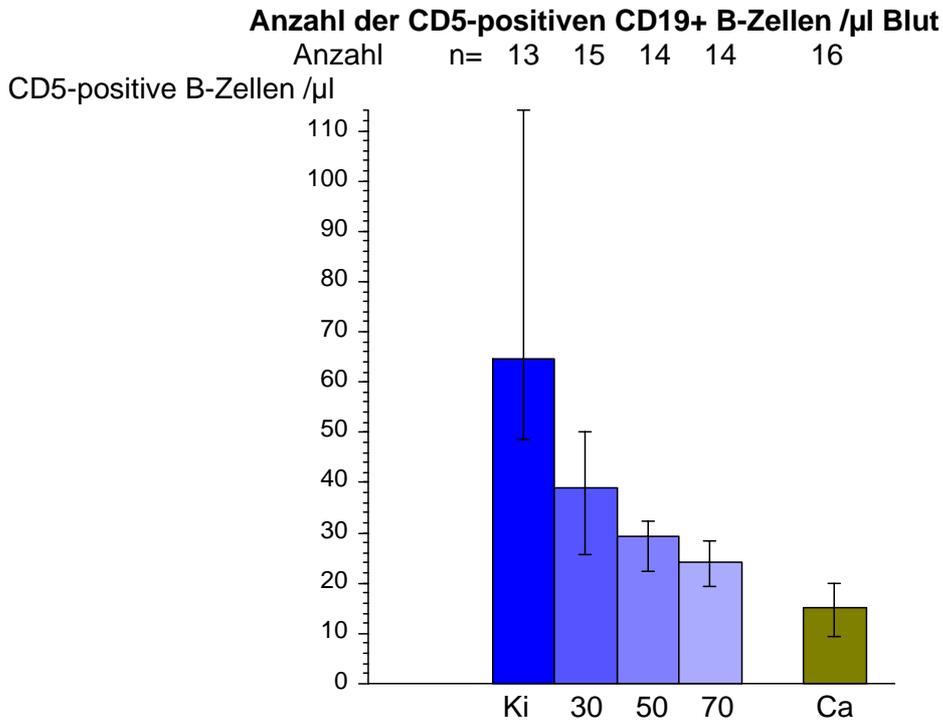


Abbildung 20 absolute Anzahl der CD5+ CD19+ B-Zellen pro μ l Vollblut bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenz Intervall des Medians; Ki = Kinder Kontrolle, 30er=30er Kontrolle, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

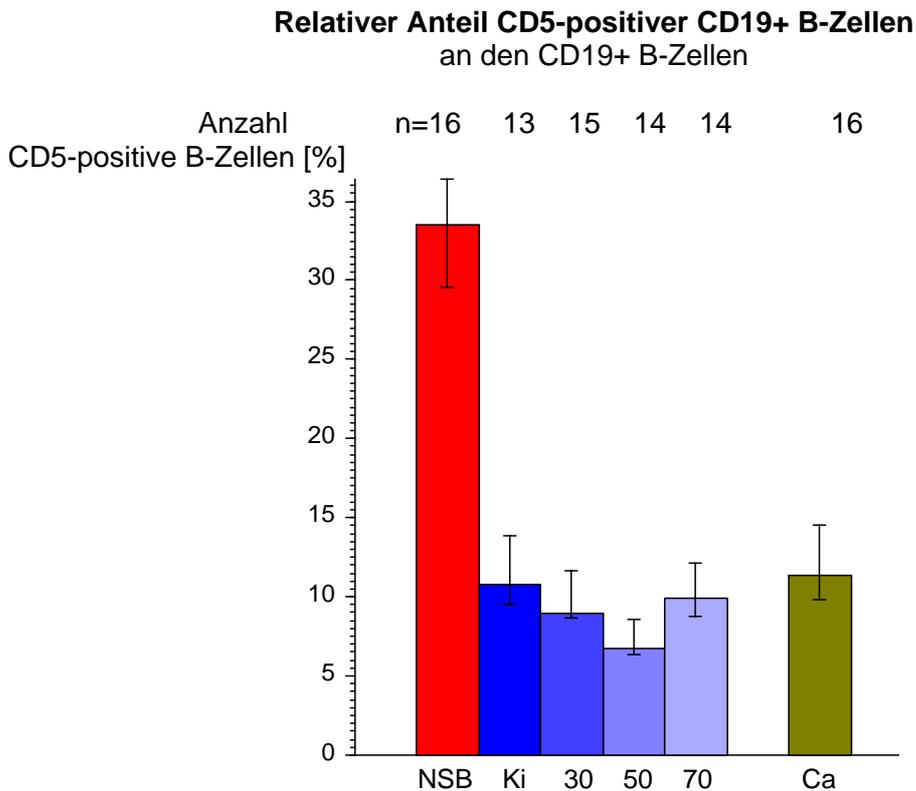


Abbildung 21 Prozentualer Anteil der CD5-positiven CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

3.5.2.2 Demographie und CD5-positive CD19+ B-Zellen

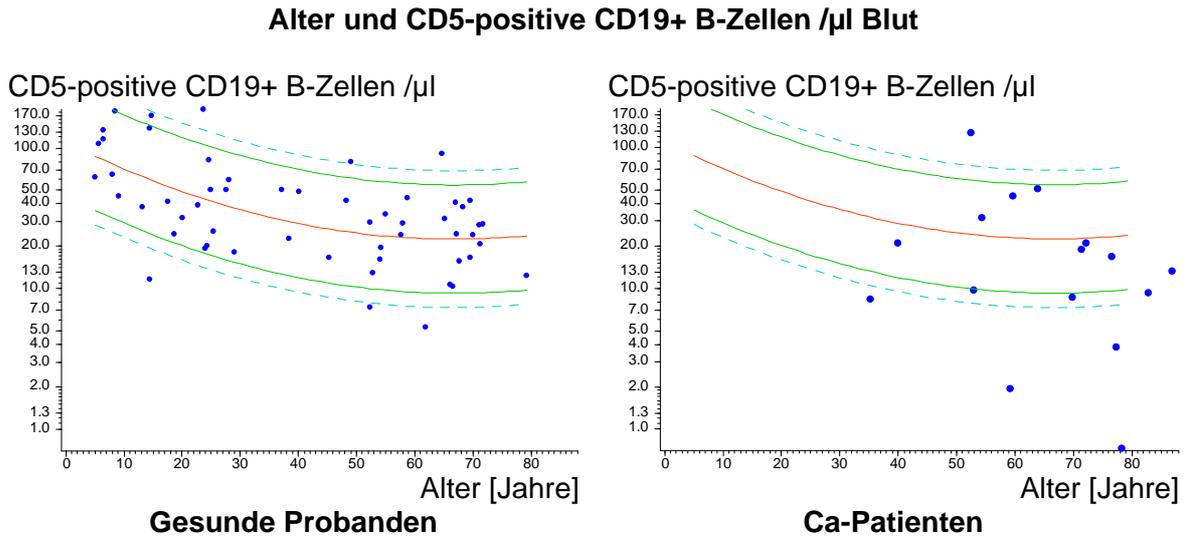


Abbildung 22 Anzahl der CD5-positiven, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut bei Probanden und Karzinompatienten; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%- Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten. Die y-Achse ist logarithmisch eingeteilt.

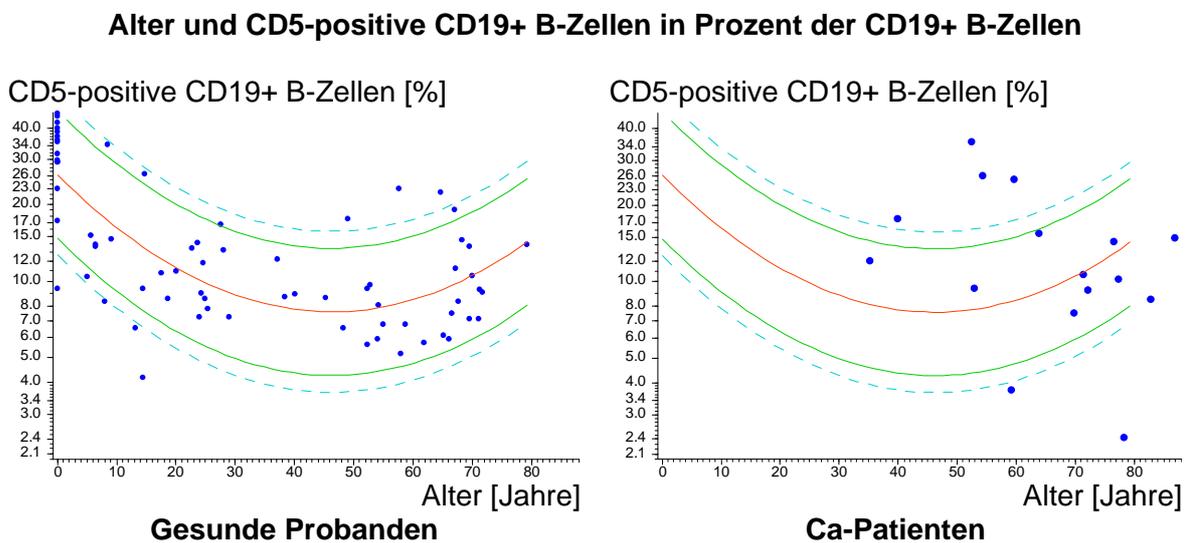


Abbildung 23 CD5-positive, CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%- Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten. Die y-Achse ist logarithmisch eingeteilt.

Die alterskorrigierte prozentuale Verteilung der CD5-positiven, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen bei Ca-Patienten zeigt gegenüber den gesunden Probanden keinen Unterschied im Mittelwert, aber eine größere Streubreite ($p = 0,0065^{**}$ im Mood-Test für die Prozentwerte), d.h. bei den Ca-Patienten gibt es einige Proben mit auffallend niedrigen CD5-Prozentwerten, aber auch einige mit auffallend hohen Werten.

Die absoluten Werte unterschieden sich zwischen allen Gesunden und Magenkarzinompatienten ($p=0,047^*$; siehe **Tabelle 23**), obwohl die Streubreite groß ist.

3.5.3 CD27

3.5.3.1 Verteilung der CD27-positiven CD19+ B-Zellen

Gruppe	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
CD27-positive CD19+ B-Zellen/μl						
Kinder	13	67	82	34	15	116
30er	15	82	57	80	18	123
50er	14	79	54	73	34	153
70er	14	64	24	62	45	87
Ca-Patienten	16	29	20	23	11	49
CD27-positive CD19+B-Zellen[%]						
NSB	16	4,3	7,6	2,3	1,0	4,7
Kinder	13	10,3	9,5	7,7	2,0	19,8
30er	15	23,1	15,8	27,4	6,3	40,4
50er	14	23,3	9,5	27,0	13,1	31,3
70er	14	26,7	7,4	27,9	20,2	33,6
Ca-Patienten	16	23,9	12,5	22,8	11,4	36,3

Tabelle 17 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl (CD19-positive B-Zellen) mit den entsprechenden Epitopen in Zellen/ μ l Blut und Prozent dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
CD27-positive CD19+ B-Zellen/ μ l						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	p
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,0063**
	Kinder	30er	50er	70er		0,41
		30er	50er	70er		0,79
		30er	50er	70er	Ca	0,0026**
			50er	70er	Ca	0,00072***
CD27-positive CD19+B-Zellen[%]						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er		0,0056**
		30er	50er	70er		0,0081**
		30er	50er	70er	Ca	0,86
			50er	70er	Ca	0,6

Tabelle 18 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Die CD-27-positiven, CD19-positiven B-Zellen nahmen im Vergleich aller Gruppen prozentual mit dem Alter nicht wie IgD+ und CD19-positiv B-Zellen oder wie CD5+ und CD19-positiv B-Zellen ab, sondern zu.

In der Gruppe der Patienten mit Magenkarzinom lag die Zahl der CD27-positiven, CD19+ B-Zellen absolut (in Zellen / μ l) am niedrigsten, dies wurde durch ein Signifikanzniveau von $p = 0,00072***$, (siehe **Tabelle 18**) im Vergleich zu allen gesunden Probanden, ausgedrückt.

Anzahl der CD27-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Blut

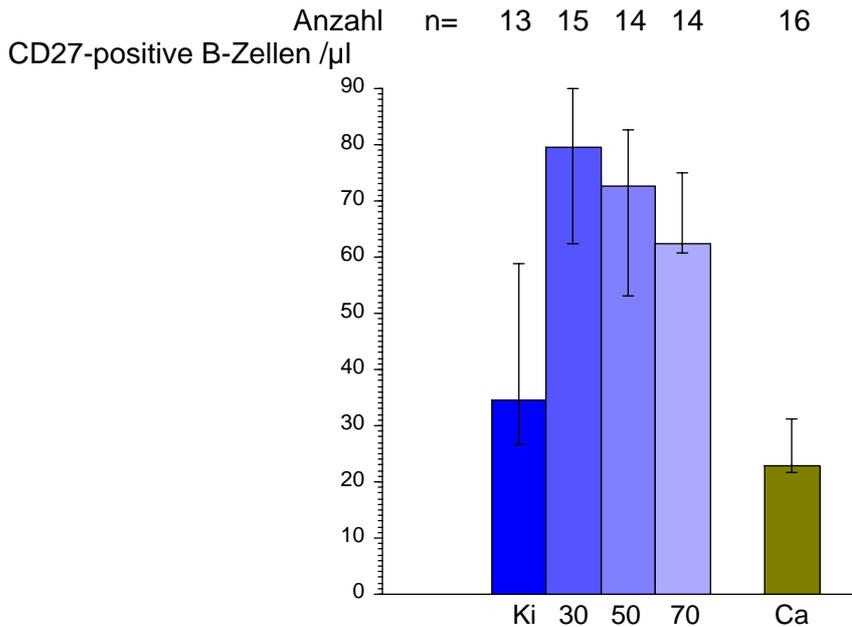


Abbildung 24 absolute Anzahl der CD27+ CD19+ B-Zellen pro μ l Vollblut bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenz Intervall des Medians; Ki = Kinder Kontrolle, 30er=30er Kontrolle, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Prozentualer Anteil der CD27-positiven CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

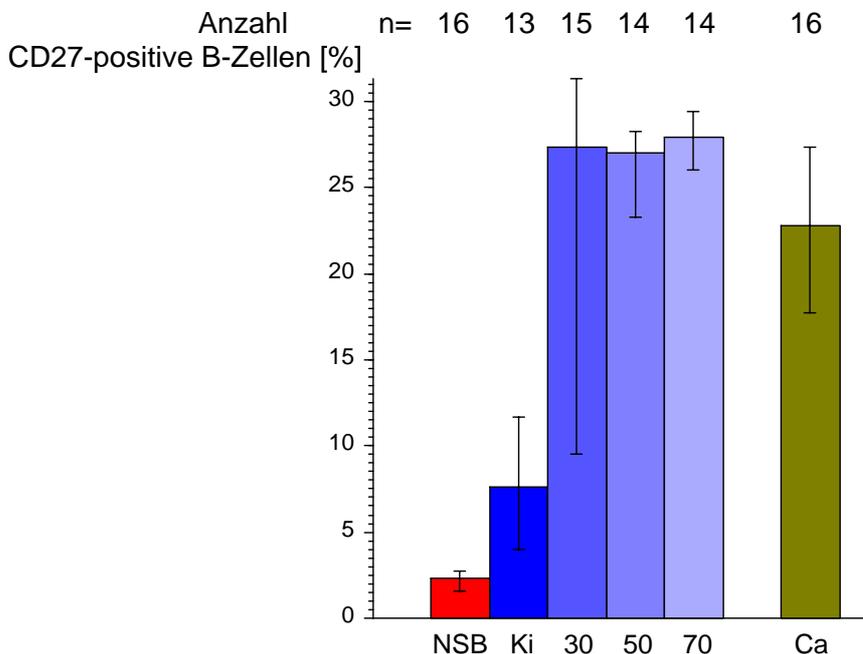


Abbildung 25 Prozentualer Anteil der CD27-positiven CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Für die absolute Zahl der CD27-positiven CD19+ B-Zellen war - innerhalb der gesunden Probanden - keine Abhängigkeit vom Alter zu erkennen ($\rho = 0,09$, $p = 0,52$), während der prozentuale Anteil der CD27-positiven, CD19+ B-Zellen an allen CD19-positiven B-

Zellen erwartungsgemäß bei allen Gesunden mit dem Alter zunahm ($\rho = 0,42$, $p = 0,0015^{**}$; beides in der Spearman'schen Rangkorrelation). Es ergab sich jedoch statistisch kein Unterschied in der Verteilung.

Die Gruppe der Ca-Patienten weist im Vergleich zur altersäquivalenten Vergleichsgruppe signifikant niedrigere absolute Memory-B-Zellwerte (CD19+,CD27+ B-Zellen) auf ($p=0,00072^{***}$, siehe **Tabelle 18**). Bei der relativen Zahl der CD27-positiven, CD19+ B-Zellen ist ein klarer Trend zu niedrigeren Werten erkennbar, ohne jedoch eine Signifikanz zu erreichen ($p = 0,6$ in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; siehe **Tabelle 18**).

„Extremwerte“ der prozentualen Verteilung weisen erwartungsgemäß die Neugeborenen auf, deren CD19-positive B-Zellen den Marker CD27 im Vergleich zu allen anderen Gruppen weit unterdurchschnittlich exprimieren ($p<0,000005^{***}$ in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, siehe **Tabelle 18**).

3.5.3.2 Demographie und CD27 positive B-Zellen

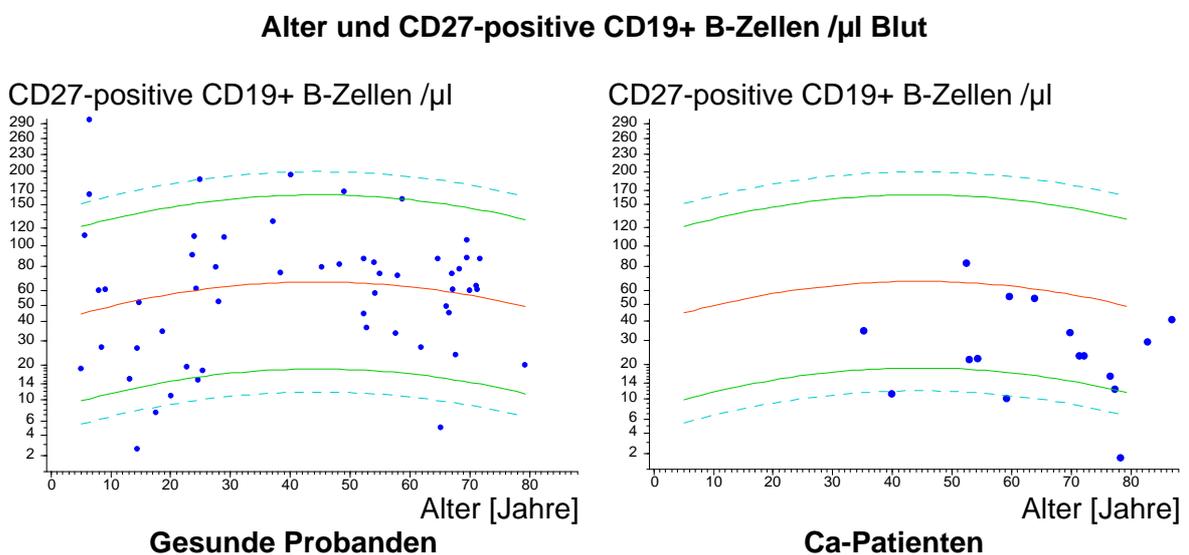


Abbildung 26 Anzahl der CD27-positiven, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut bei Probanden und Karzinompatienten; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%- Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten. Die y-Achse ist logarithmisch eingeteilt.

Alter und CD27-positive CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen

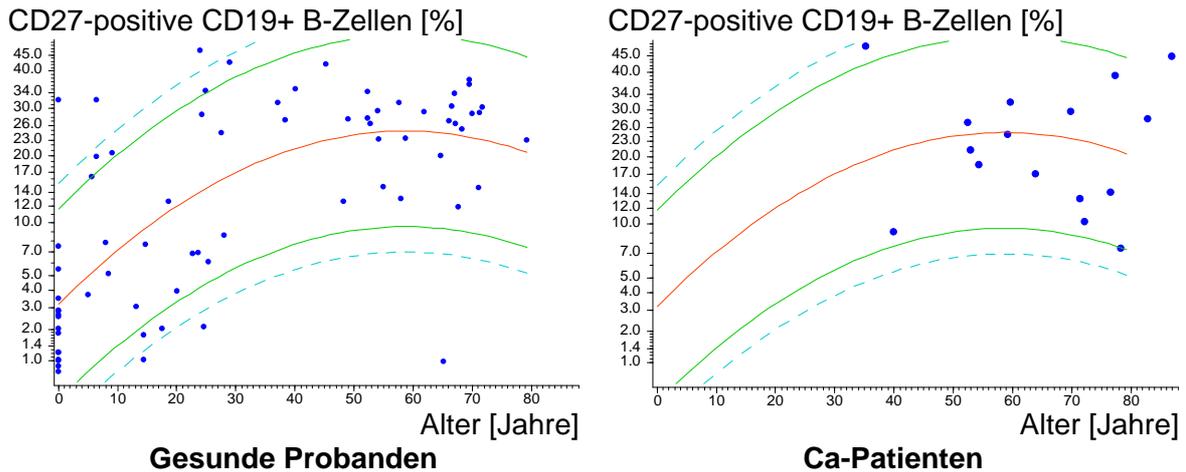


Abbildung 27 CD27-positive, CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten. Die y-Achse ist logarithmisch eingeteilt.

Beim Vergleich der altersbezogenen absoluten Anzahl CD27-positiver, CD19+ B-Zellen fallen Geschlechtsunterschiede auf, $m 55 \pm 39,3$; $w 88,5 \pm 73,3$ ($p = 0,024^*$ im U-Test nach Mann und Whitney). Die Signifikanz ist gering.

Die Werte der Ca-Patienten bei der absoluten Anzahl der CD27-positiven, CD19+ B-Zellen liegen alle bis auf eine Ausnahme unterhalb der quadratischen Regressionslinie (s. **Abbildung 26**) und unterscheiden sich von den altersentsprechenden Kontrollen deutlich ($p=0,00054^{***}$, im U-Test nach Mann und Whitney; siehe **Tabelle 23**). Extreme „Ausreißer“ unter den 95% Vertrauensbereich treten bei zwei Patienten auf.

Die relative Verteilung der CD19+, CD27+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen ist zwischen Kontrollen und Ca-Patienten statistisch nicht signifikant verschieden (siehe **Tabelle 23**).

3.5.4 λ 3r

3.5.4.1 Verteilung der λ 3r-positiven CD19+ B-Zellen

Gruppe	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
λ3r-positive CD19+ B-Zellen/μl						
Kinder	13	34	19	28	18	56
30er	15	36	41	23	11	35
50er	14	15	11	13	5	29
70er	14	10	4	10	6	15
Ca-Patienten	16	10	7	9	4	18
λ3r-positive CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	16	4,7	2,3	4,2	2,5	7,0
Kinder	13	5,3	1,9	5,2	3,7	7,2
30er	15	7,5	3,5	6,3	4,9	11,0
50er	14	4,2	1,2	3,7	3,1	5,7
70er	14	4,6	1,1	4,6	3,7	5,6
Ca-Patienten	16	9,0	6,7	7,1	4,7	12,1

Tabelle 19 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl (CD19-positive B-Zellen) mit den entsprechenden Epitopen in Zellen/ μ l Blut und Prozent dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
λ3r-positive CD19+ B-Zellen/μl						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	p
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00012***
	Kinder	30er	50er	70er		0,00058***
		30er	50er	70er		0,0066**
		30er	50er	70er	Ca	0,0042**
			50er	70er	Ca	0,59
λ3r-positive CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00068***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,0039**
	Kinder	30er	50er	70er		0,0018**
		30er	50er	70er		0,00057***
		30er	50er	70er	Ca	0,00035***
			50er	70er	Ca	0,0037**

Tabelle 20 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Für die Absolutwerte gab es bei den $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen einen Unterschied in der Verteilung zwischen den Ca-Patienten und den 30ern, 50ern und 70ern ($p = 0,0042^{**}$, siehe **Tabelle 20**). Ein Vergleich in der altersentsprechenden Gesundkontrollgruppe der 50er und 70er allein zeigte keinen Unterschied (siehe **Tabelle 20**).

Die prozentualen Werte der $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen ergaben für die Ca-Patienten im Vergleich zur altersäquivalenten Kontrollgruppe der 50er und 70er eine signifikante Erhöhung des Anteils der $\lambda 3r$ -positiven CD19+ B-Zellen ($p=0,0037^{**}$; siehe **Tabelle 20**, **Abbildung 29**).

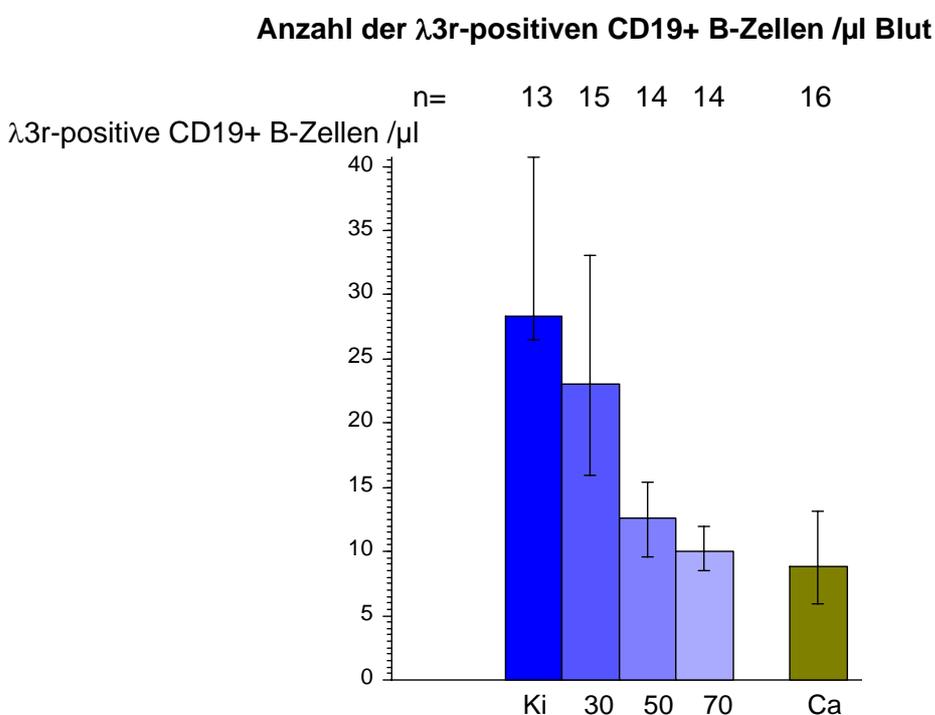


Abbildung 28 absolute Anzahl der $\lambda 3r$ +, CD19+ B-Zellen pro μ l Vollblut bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenz Intervall des Medians; Ki = Kinder Kontrolle, 30er=30er Kontrolle, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

**Prozentualer Anteil der $\lambda 3r$ -positiven CD19+ B-Zellen
an den CD19+ B-Zellen**

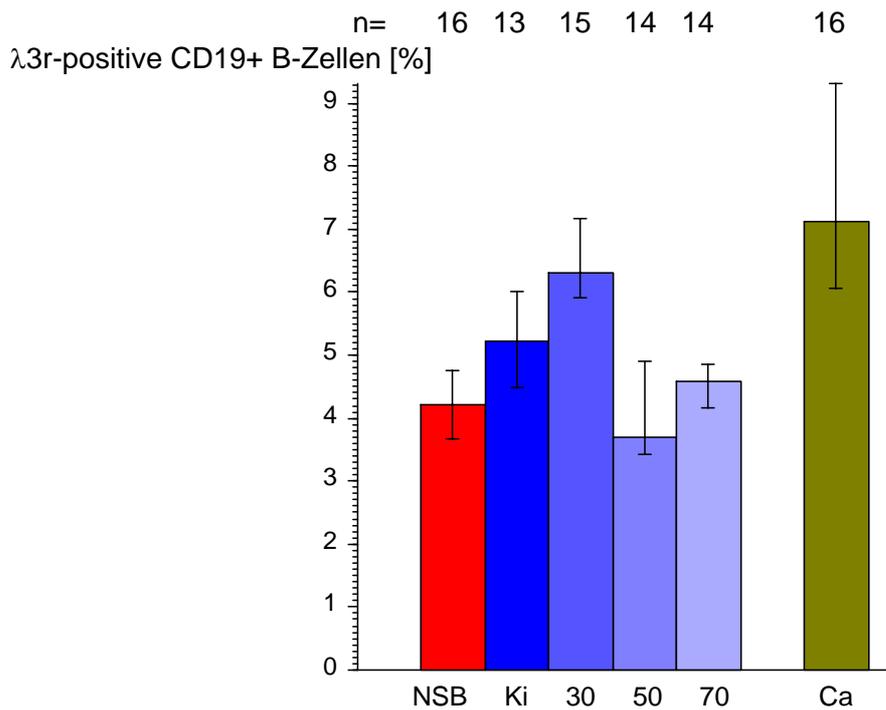


Abbildung 29 Prozentualer Anteil der $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

3.5.4.2 Demographie und $\lambda 3r$ -positive B-Zellen

Alter und $\lambda 3r$ -positive CD19+B-Zellen, absolut

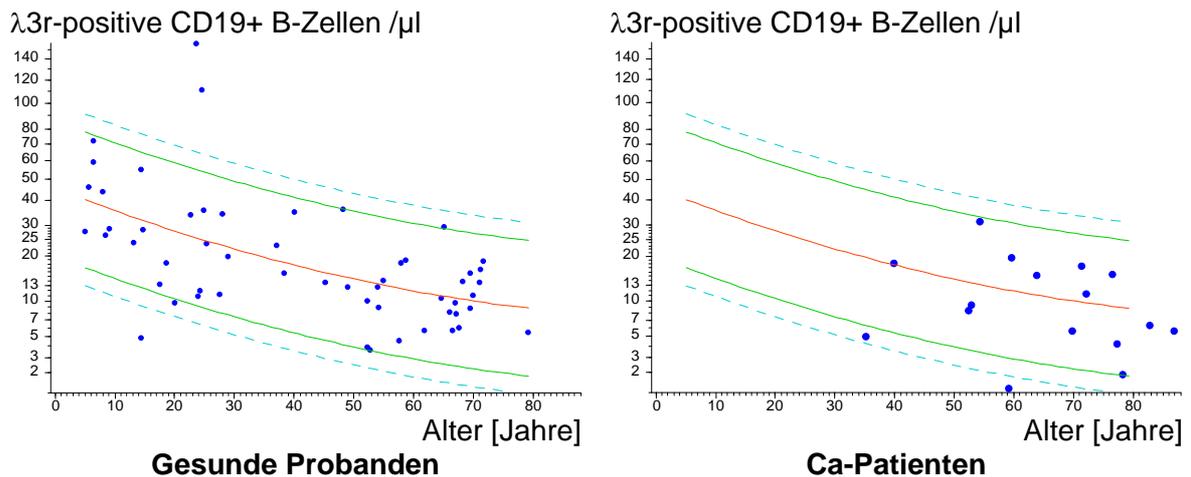


Abbildung 30 Anzahl der $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen pro μl Blut bei Probanden und Karzinompatienten; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%- Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten; Die Werte sind mit der Kubikwurzel transformiert.

Alter und $\lambda 3r$ -positive CD19+B-Zellen, relativ

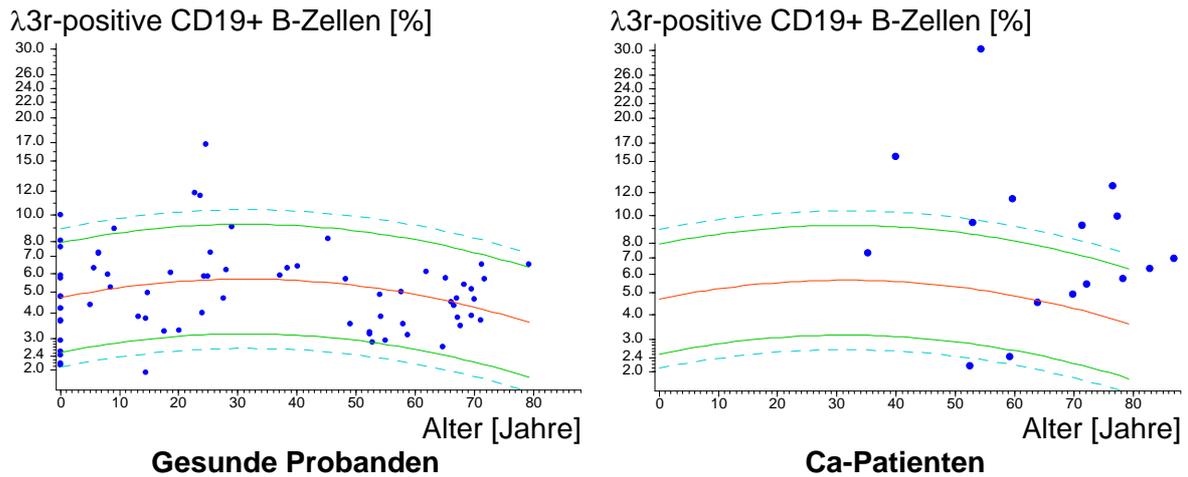


Abbildung 31 $\lambda 3r$ -positive, CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten. Die Werte sind mit der Kubikwurzel transformiert.

Die absolute Anzahl der $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen war bei den Magenkarzinompatienten, ohne erkennbaren Unterschied, altersentsprechend niedrig (siehe **Tabelle 23, Abbildung 30**).

Der relative Anteil der $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen hingegen war altersbezogen bei den Ca-Patienten mit $10.7 \pm 6.9\%$ (Mittelwert und Standardabweichung) signifikant höher, als bei den gesunden Probanden mit $5,9 \pm 2,7\%$ in der altersbezogenen Darstellung (Mittelwert und Standardabweichung, $p = 0,00038^{***}$ im U-Test nach Mann und Whitney; siehe **Tabelle 23, Abbildung 31**). Der relative Wert ist nicht bei allen Ca-Patienten auf das Doppelte erhöht, die Verteilungskurve ist aber eindeutig nach rechts verschoben.

3.5.4.3 Untergruppe der $\lambda 3r$ -positiven, CD19+B-Zellen

Zur genaueren Analyse der $\lambda 3r$ -positiven B-Zellen wurden weitere Untergruppen dieser unterschieden und ausgewertet.

3.5.4.3.1 Marker in der Untergruppe der $\lambda 3r$ - positiven, CD19+ B-Zellen

Gruppe	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
IgD+ an $\lambda 3r$+,CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	16	66,4	19,8	66,4	51,5	84,6
Kinder	13	62,3	17,0	61,2	46,4	76,9
30er	15	46,7	24,0	49,0	18,0	72,1
50er	14	60,1	10,4	60,2	54,8	67,4
70er	14	62,1	15,7	65,4	48,6	73,5
Ca-Patienten	16	33,5	20,4	26,0	18,6	52,8
CD5+ an $\lambda 3r$+,CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	16	41,5	10,0	42,4	32,6	50,7
Kinder	13	17,8	8,4	16,9	8,5	25,0
30er	15	16,7	7,8	15,4	9,8	26,6
50er	14	15,3	9,0	14,3	8,5	17,3
70er	14	18,5	8,4	15,8	11,6	28,2
Ca-Patienten	16	18,3	12,1	14,4	7,0	32,4
CD27+ an $\lambda 3r$+,CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	16	16,2	10,3	15,5	6,0	23,0
Kinder	13	17,9	16,0	9,1	5,8	40,3
30er	15	34,7	22,1	40,2	10,0	55,6
50er	14	33,8	22,0	30,0	8,4	53,0
70er	14	31,8	15,5	30,0	18,6	49,0
Ca-Patienten	16	38,5	18,5	39,6	18,3	57,2

Tabelle 21 Gruppen und relative B-Zellenzahl (CD19-positive B-Zellen) mit den entsprechenden Epitopen in Prozent dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
IgD+ an λ 3r+,CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	p
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00036***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,13
	Kinder	30er	50er	70er		0,22
		30er	50er	70er		0,0011**
		30er	50er	70er	Ca	0,0013**
			50er	70er	Ca	0,00031***
CD5+ an λ 3r+,CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er		0,6
		30er	50er	70er		0,81
		30er	50er	70er	Ca	0,71
			50er	70er	Ca	0,56
CD27+ an λ 3r+,CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,0019**
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,011*
	Kinder	30er	50er	70er		0,069
		30er	50er	70er		0,040*
		30er	50er	70er	Ca	0,8
			50er	70er	Ca	0,59

Tabelle 22 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Bei der Untergruppe der IgD+, CD19+ B-Zellen an den λ 3r+, CD19+ B-Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme dieser Zellen bei den Magenkarzinompatienten im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollen der 50er und 70er ($p = 0,00031$ ***; in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; siehe **Tabelle 22**, **Abbildung 32**), innerhalb der Gruppe aller Gesunden fand sich kein Unterschied.

Die Häufigkeit des Epitops CD5 in der λ 3r-Untergruppe wies bis auf eine erwartete Erhöhung bei den Neugeborenen keine Unterschiede im Auftreten auf ($p = 0,56$ in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; **Abbildung 33**; **Tabelle 22**).

Die Expressionsfrequenz des Memory-B-Zellmarkers CD27 wies im Vergleich der Karzinompatienten mit der zugehörigen Kontrollgruppe innerhalb der λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen keine statistischen Unterschiede auf, es zeigte sich allerdings ein Trend zu höheren Werten bei den Ca-Patienten ($p = 0,59$ in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; siehe **Tabelle 20**; **Abbildung 34**).

Relativer Anteil IgD positiver B-Zellen an den λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen

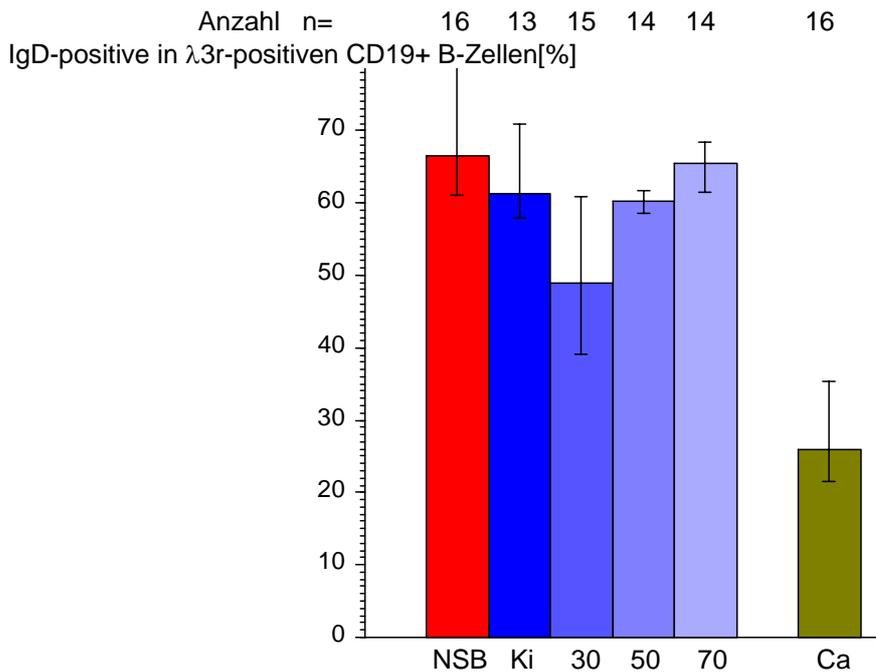


Abbildung 32 Prozentualer Anteil der IgD-positiven lambda 3r+ CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Relativer Anteil CD5-positiver B-Zellen an den λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen

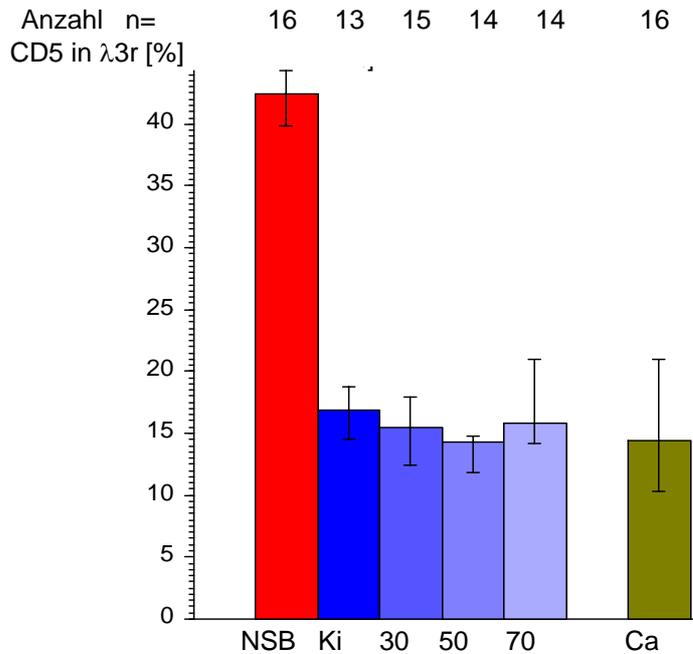


Abbildung 33. Prozentualer Anteil der CD5-positiven B-Zellen an den λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenz Intervall des Medians; Ki = Kinder Kontrolle, 30er=30er Kontrolle, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Relativer Anteil CD27-positiver B-Zellen an den λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen

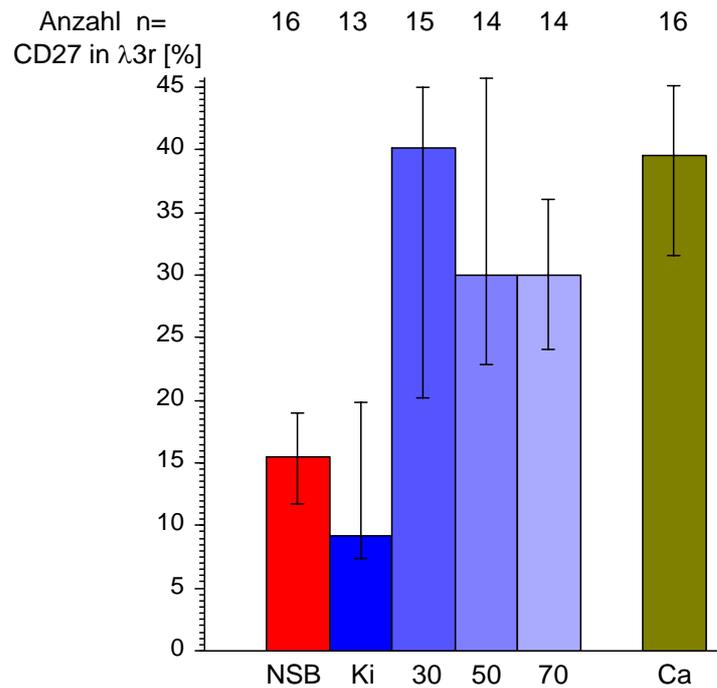


Abbildung 34 Prozentualer Anteil der CD27-positiven CD19+ B-Zellen an den λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenz Intervall des Medians; Ki = Kinder Kontrolle, 30er=30er Kontrolle, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

3.5.4.3.2 Demographie der Untergruppen der λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen

Alter und IgD-positive BZ in λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen

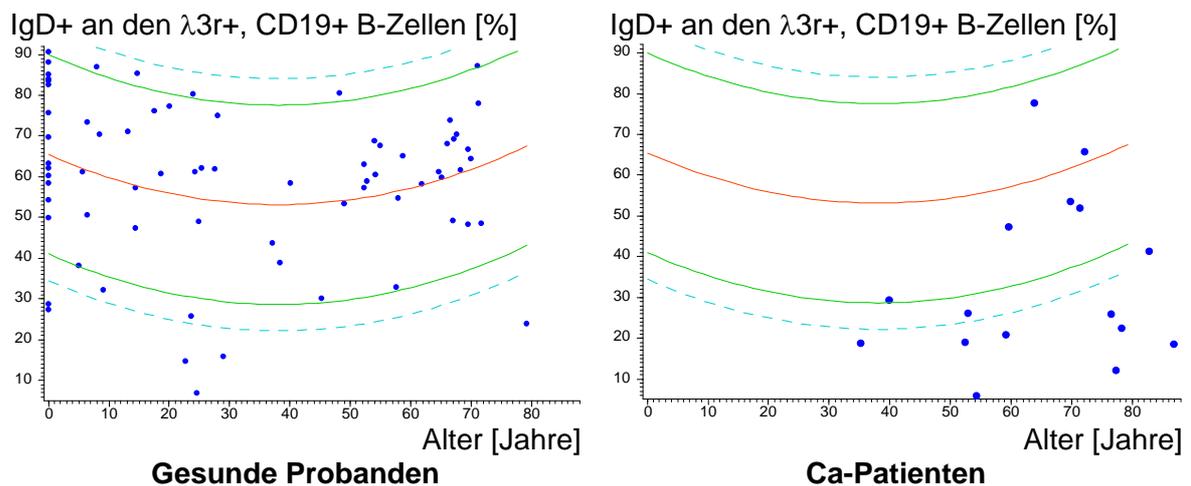


Abbildung 35 IgD-positive, CD19+ B-Zellen in Prozent der λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten.

Alter und CD5-positive BZ in λ 3r-positiven, CD19+B-Zellen

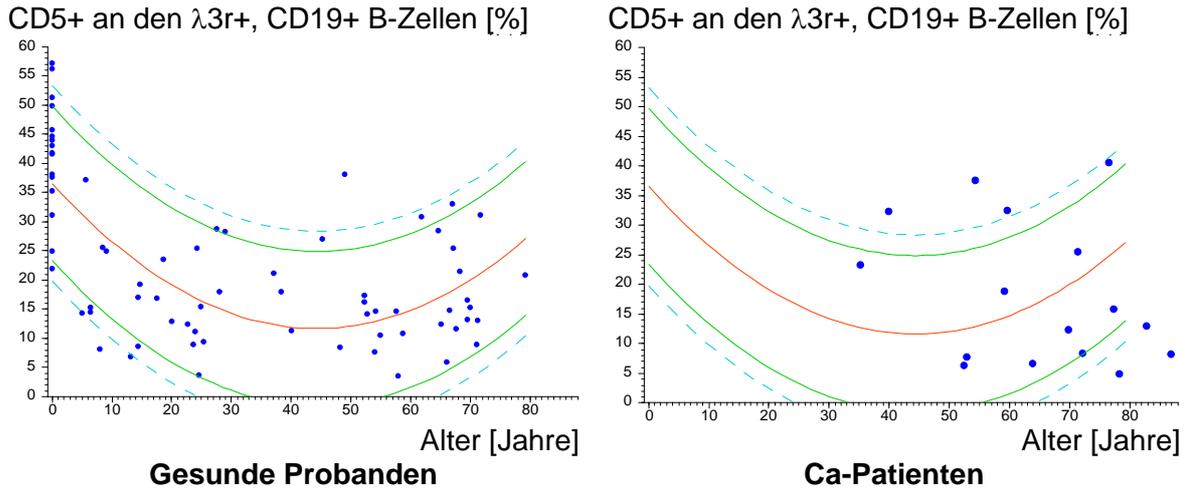


Abbildung 36 CD5-positive, CD19+ B-Zellen in Prozent der λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten..

Alter und CD27-positive BZ in λ 3r-positiven, CD19+B-Zellen

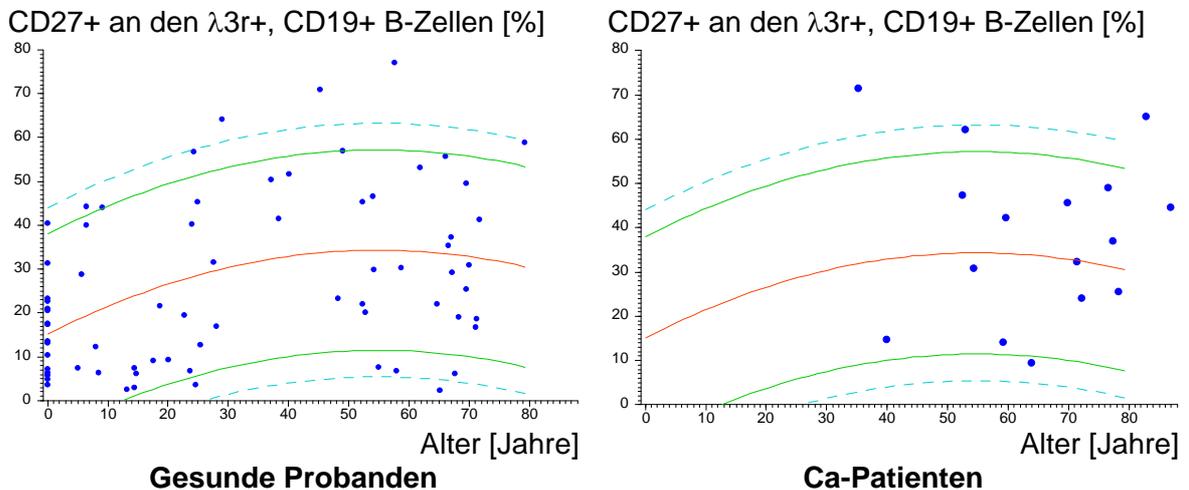


Abbildung 37 CD27-positive, CD19+ B-Zellen in Prozent der λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Karzinompatienten..

Die altersbezogene Darstellung der IgD-Untergruppe visualisiert die global gesehenen Unterschiede in der Verteilung der B-Zellen. Die Werte der Magenkarzinompatientengruppe liegen dabei in 50% der Fälle unter dem 95%Konfidenzintervall, das auf das Alter und die Probanden-Gruppen normiert wurde. Keiner der Werte liegt oberhalb des 90% Vertrauensintervalls und nur zwei Werte liegen über der quadratischen Regressionslinie (mittlere Linie der Abbildung; siehe **Abbildung 35**).

Die Verteilung der CD5-positiven, CD19+ B-Zellen an den λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen zeigt im Vergleich zu den Probanden (altersbezogen, 50er, 70er) bei den Patienten mit Karzinom eine große Streubreite mit vielen Extremwerten nach oben und unten (siehe **Abbildung 36**).

Die altersbezogene Darstellung der CD27-positiven, CD19+ B-Zellen an den λ 3r-positiven, CD19-positiven B-Zellen weist auf einen Trend zur Erhöhung der λ 3r-positiven Memory-B-Zellen bei den Patienten hin. Die Streubreite ist jedoch groß (siehe **Abbildung 37**).

3.6 Altersnormierung und verwendete Marker

a)	n	MW	ST	b) Gruppen zum Vergleich	p
CD19+ B-Zellen	55	379	207	Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,00006***
pro µl Blut	16	184	122		
CD19+ B-Zellen %	71	16,6	8,6	NSB, Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,025*
	16	12,2	6,5		
IgD+, CD19+ B-Zellen	55	197	114	Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,00001***
pro µl Blut	16	77	69		
IgD+, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen	71	54,6	15,3	NSB, Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,0033**
	16	38,0	22,2		
CD5+, CD19+ B-Zellen	55	36	25	Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,047*
pro µl Blut	16	29	38		
CD5+, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen	71	8,5	3,8	NSB, Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,68
	16	11,5	9,4		
CD27+, CD19+ B-Zellen	55	80	63	Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,00054***
pro µl Blut	16	35	22		
CD27+, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen	71	24,3	15,7	NSB, Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,83
	16	23,2	14,1		
λ3r+, CD19+ B-Zellen	55	21	20	Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,53
pro µl Blut	16	17	10		
λ3r+, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen	71	5,9	2,5	NSB, Ki, 30er, 50er, 70er Ca-Patienten	0,00038***
	16	10,7	6,9		

Tabelle 23 In a) Vergleich der altersbezogenen Werte zwischen Gesunden und Ca-Patienten dargestellt als Mittelwert; In b) p aus dem U-Test nach Mann und Whitney; verglichene Gruppen jeweils als Kombination dargestellt, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Die Tabelle zeigt die statistischen Unterschiede in der Verteilung der Oberflächenmoleküle bei Patienten und Probanden nach „Altersnormierung“ auf einen Blick. Im herkömmlichen Koordinatensystem wurde dabei die entsprechende Häufigkeit gegen das Alter aufgetragen, die mittlere Linie entspricht dann der quadratischen Regressionslinie und dient mit den beiden anderen Linien, den 90% und 95% Konfidenzintervallen der besseren Vergleichbarkeit der Messwerte der Karzinompatienten. Diese werden als Punkte in die aus den Probandenwerten errechneten Intervalle eingefügt und so eine graphische Verteilungsdarstellung ermöglicht. Eine Frequenzerhöhung bei den Karzinompatienten stellt sich daher als Punktwolke oberhalb der quadratischen Regressionslinie beziehungsweise der Konfidenzintervalllinien dar. Die im Teil b) errechneten p-Werte wurden im U-Test nach Mann und Whitney errechnet, bei diesem Test werden alle Werte einer Stichprobe A mit allen Werten einer Stichprobe B auf Größe der Messwerte verglichen. Entsprechende Querverweise auf die Auflistung in der Tabelle sind in den vorherigen Kapiteln eingefügt.

3.7 Marker-Paare

Markerpaare dienen zur detaillierten Beschreibung der analysierten B-Zellen. Die hier gemachten Angaben beziehen sich auf die Grundgesamtheit aller CD19-positiven B-Zellen eines jeden Individuums bzw. der Gruppen von Individuen.

Die möglichen Marker-Kombinationen und deren globale Häufigkeit in Prozent über alle Gruppen sind in **Tabelle 24** aufgeführt.

Markerpaare in % der CD19+ B-Zellen	MW	ST	Me-dian	68%-Konfidenz		min	max
IgD+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen	2,6	1,3	2,5	1,6	3,5	0,4	8,7
CD5+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen	1,3	1,5	0,8	0,4	1,8	0,1	11,2
CD27+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen	1,7	1,7	1,2	0,2	3,0	0,1	8,9
IgD+, CD5+, CD19+ B-Zellen	9,6	11	5,5	1,9	18,6	0,3	49,7
CD5+, CD27+, CD19+ B-Zellen	3,8	4,0	2,9	1,0	6,4	0,2	30,1
IgD+, CD27+, CD19+ B-Zellen	4,1	3,8	3,1	0,7	7,3	0,2	19,1

Tabelle 24 CD19+ B-Zellen mit den genannten beiden Markern bei allen Patienten und Probanden in Prozent der CD19-positiven B-Zellen dargestellt als Mittelwert; MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, Konfidenzintervall. min = kleinster Wert, max = höchster Wert; n = 88

In **Tabelle 25** sind die einzelnen Kombinationen und deren prozentuale Verteilung (in % aller CD19-positiven B-Zellen) innerhalb der Gruppen dargestellt, um Veränderungen oder Übereinstimmungen mit dem Kollektiv der Magenkarzinom-Patienten feststellen zu können. Im Folgenden wird nur auf den Vergleich der Ca-Patienten mit den altersäquivalenten Kontrollen aus 50ern und 70ern eingegangen werden.

Der Anteil der IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen ist bei den Ca-Patienten signifikant erniedrigt. Im Mittel betrug der Wert 2,4% bei den Ca-Patienten vs. 6,9% und 4,3% bei den 50er und 70er Kontrollen ($p = 0,0028^{**}$; in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; **Tabelle 26, Abbildung 38**).

Die Verteilung der IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen (IgD+-Memoryzellen) war zwischen Magenkarzinompatienten und altersentsprechenden Kontrollen statistisch nicht unterschiedlich ($p > 0,5$ in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; **Abbildung 39**).

Ebenfalls kein Unterschied fand sich bei der Verteilung der IgD+ und λ 3r+, CD19+B-Zellen, der CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen und der CD5 und λ 3r+, CD19+ B-Zellen, wenn Magenkarzinompatienten mit einer altersentsprechenden Gruppe der 50er und 70er Probanden verglichen wurden. Bei den erstgenannten war auch global unter Berücksichtigung aller Gruppen kein Unterschied auszumachen (**Tabelle 26** *Abbildung 40*, *Abbildung 42*, *Abbildung 41*).

Der Anteil der CD27+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen (λ 3r-positive Memory-Zellen) hingegen war bei den Ca-Patienten im Vergleich zur 50er, 70er Gruppe erhöht ($p=0,014^*$, in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; **Tabelle 26**, *Abbildung 43*).

3.7.1 Expressionsfrequenz der Marker-Paare in % der CD19+ B-Zellen

Prozentsatz der Marker-Paare in % der CD19+ B-Zellen						
Gruppe	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
IgD und CD5				IgD und CD5		
NSB	16	27,5	12,3	29,7	17,2	36,3
Kinder	13	10,0	8,0	7,8	3,5	13,8
30er	15	5,2	2,2	4,7	2,4	7,4
50er	14	4,3	3,5	3,5	2,3	5,0
70er	14	6,9	4,6	6,2	3,0	10,3
Ca-Patienten	16	2,4	2,5	1,6	0,4	4,9
IgD und CD27				IgD und CD27		
NSB	16	1,6	3,1	0,8	0,4	1,3
Kinder	13	2,4	2,6	1,3	0,6	3,8
30er	15	3,9	2,8	3,6	0,7	6,9
50er	14	5,7	3,6	4,5	2,2	10,0
70er	14	6,3	5,3	5,3	1,3	9,0
Ca-Patienten	16	4,9	2,8	5,3	1,8	6,6
IgD und λ3r				IgD und λ3r		
NSB	16	2,9	1,8	2,4	1,7	3,6
Kinder	13	3,1	1,5	3,4	1,5	4,6
30er	15	2,5	0,7	2,7	1,6	3,2
50er	14	2,6	1,0	2,1	1,8	3,4
70er	14	2,6	0,8	2,5	2,1	2,8
Ca-Patienten	16	2,2	1,4	2,0	1,0	3,5
CD5 und CD27				CD5 und CD27		
NSB	16	3,2	7,2	1,5	0,8	2,1
Kinder	13	1,9	1,4	2,2	0,5	3,2
30er	15	3,2	1,7	2,8	1,3	4,9
50er	14	4,1	3,4	3,0	1,4	6,6
70er	14	4,3	2,0	3,9	2,5	7,2
Ca-Patienten	16	6,0	3,8	5,8	1,8	9,9
CD5 und λ3r				CD5 und λ3r		
NSB	16	1,8	1,1	1,5	0,9	2,5
Kinder	13	0,9	0,6	1,0	0,5	1,4
30er	15	1,1	0,6	1,0	0,5	1,4
50er	14	0,6	0,4	0,5	0,3	0,7
70er	14	0,8	0,4	0,8	0,4	1,3
Ca-Patienten	16	2,1	2,9	0,7	0,3	4,4
CD27 und λ3r				CD27 und λ3r		
NSB	16	0,8	0,9	0,5	0,2	1,2
Kinder	13	1,1	1,1	0,4	0,2	2,8
30er	15	2,4	1,9	2,1	0,9	3,3
50er	14	1,3	1,0	1,1	0,2	2,4
70er	14	1,4	0,9	1,2	0,5	2,2
Ca-Patienten	16	3,2	2,4	3,0	1,0	5,5

Tabelle 25 Gruppen und relative B-Zellenzahl (CD19-positive B-Zellen) mit den entsprechenden Epitopen in Prozent dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
IgD und CD5-positive CD19+ B-Zellen						p
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er		0,046*
		30er	50er	70er		0,00041***
		30er	50er	70er	Ca	0,0021**
			50er	70er	Ca	0,0028**
IgD und CD27-positive CD19+ B-Zellen						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00004***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00011***
	Kinder	30er	50er	70er		0,023*
		30er	50er	70er		0,027*
		30er	50er	70er	Ca	0,51
			50er	70er	Ca	–
IgD und λ3r-positive CD19+ B-Zellen						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,62
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	–
	Kinder	30er	50er	70er		–
		30er	50er	70er		–
		30er	50er	70er	Ca	–
			50er	70er	Ca	–
CD5 und CD27-positive CD19+ B-Zellen						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00021***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,0011**
	Kinder	30er	50er	70er		0,18*
		30er	50er	70er		0,0038**
		30er	50er	70er	Ca	0,13
			50er	70er	Ca	–
CD5 und λ3r-positive CD19+ B-Zellen						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,002**
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00024***
	Kinder	30er	50er	70er		0,098
		30er	50er	70er		0,24
		30er	50er	70er	Ca	0,14
			50er	70er	Ca	–
CD27 und λ3r-positive CD19+ B-Zellen						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00035***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,0096**
	Kinder	30er	50er	70er		0,094
		30er	50er	70er		0,0073**
		30er	50er	70er	Ca	0,023*
			50er	70er	Ca	0,014*

Tabelle 26 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Prozentualer Anteil der IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

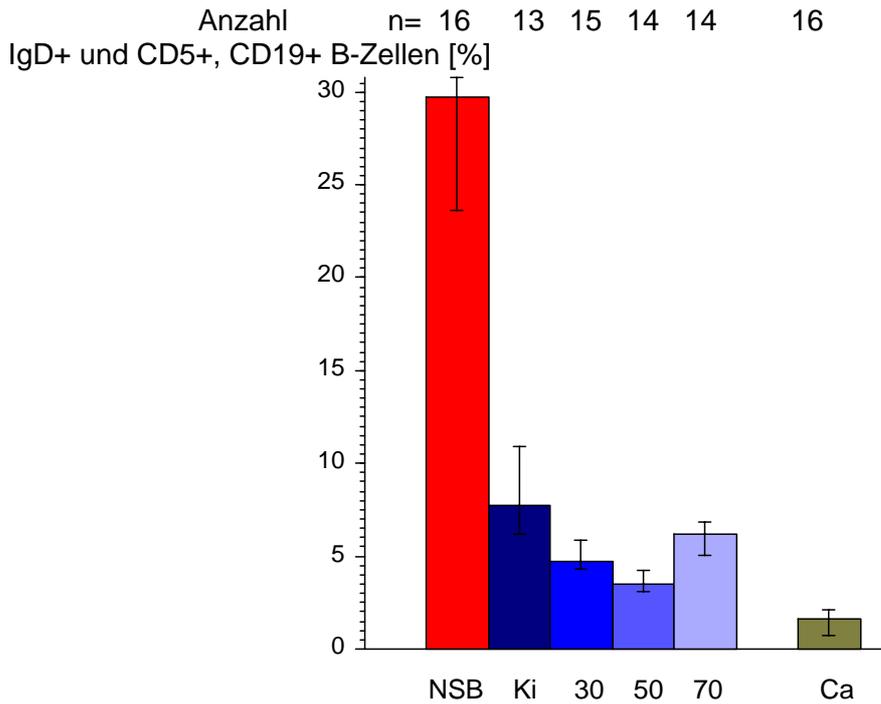


Abbildung 38 Prozentualer Anteil der IgD+ und CD5+ CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Prozentualer Anteil der IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

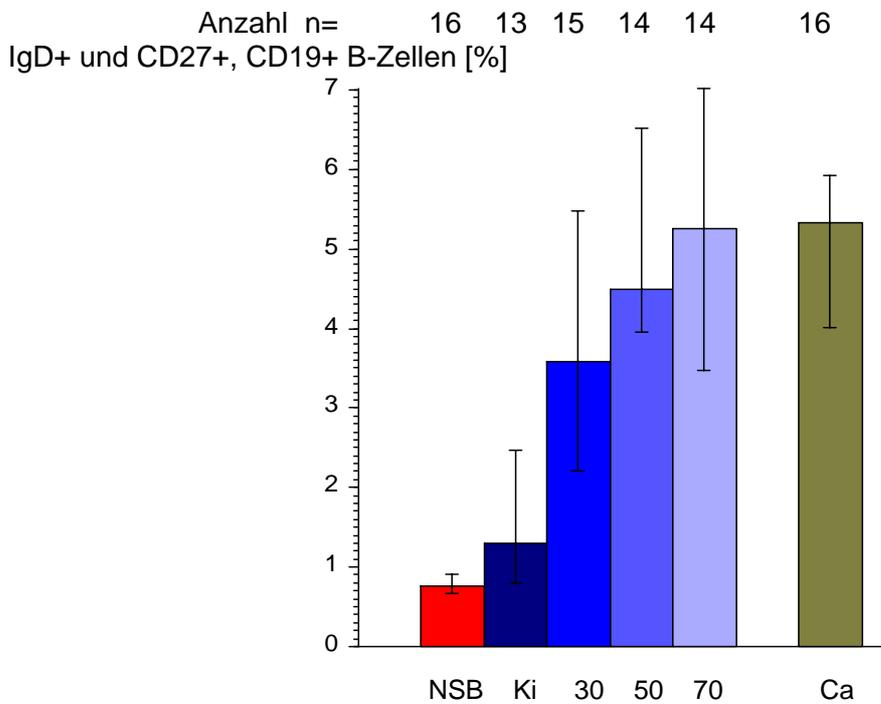


Abbildung 39 Prozentualer Anteil der IgD+ und CD27+ CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Prozentualer Anteil der IgD+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

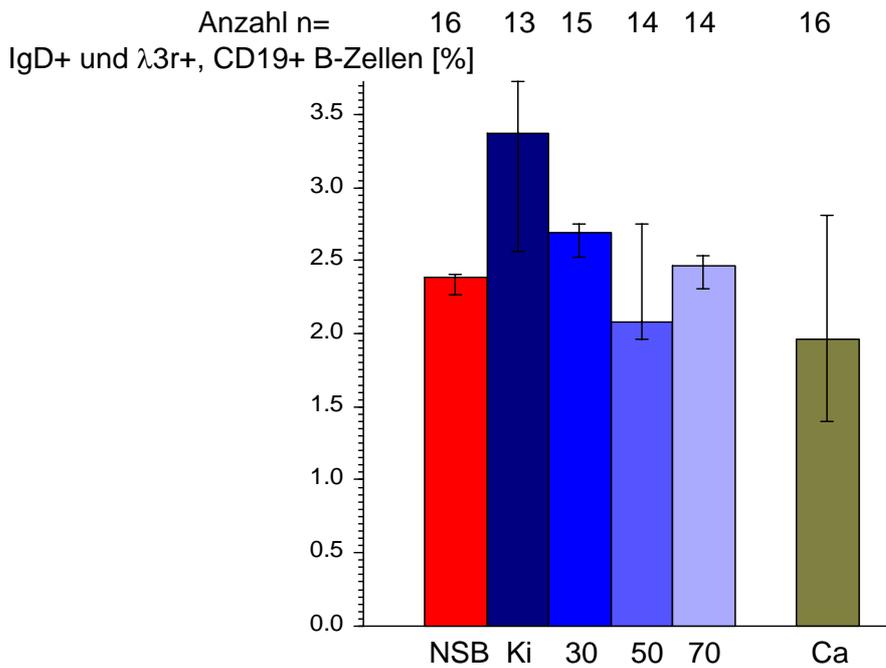


Abbildung 40 Prozentualer Anteil der IgD+ und $\lambda 3r+$ CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Prozentualer Anteil der CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

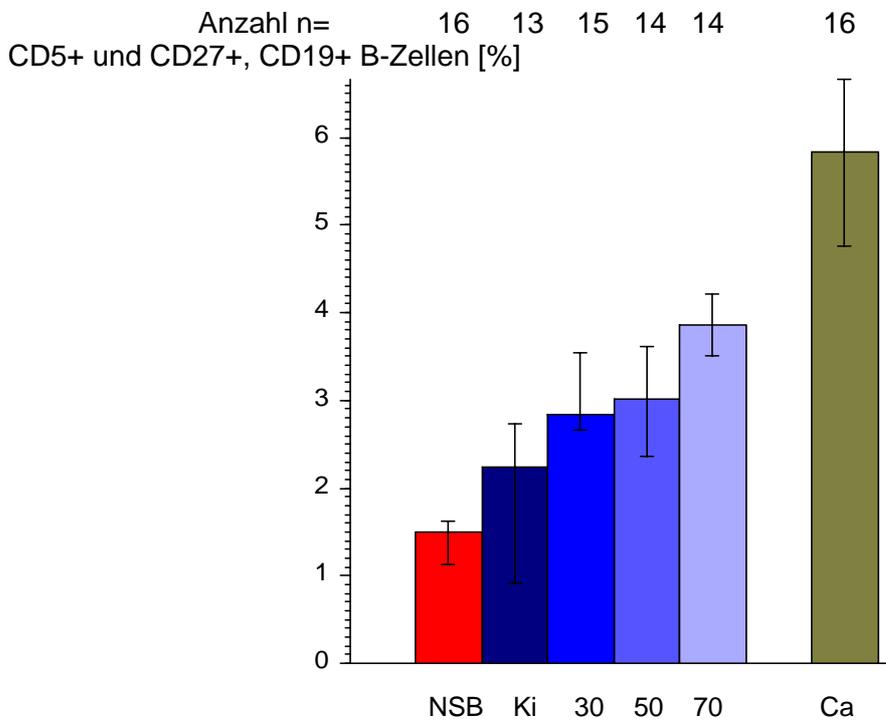


Abbildung 41 Prozentualer Anteil der CD5+ und CD27+ CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Prozentualer Anteil der CD5+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

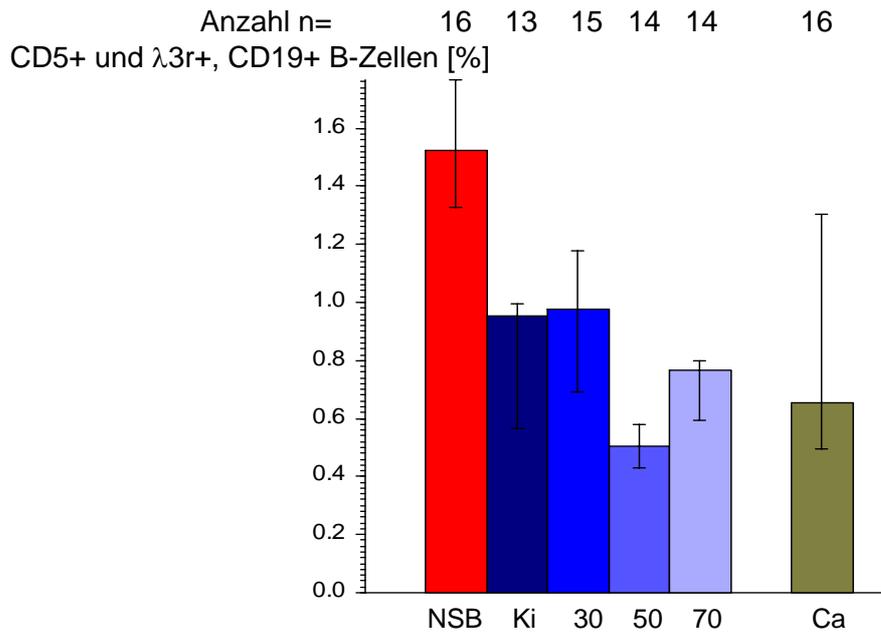


Abbildung 42 Prozentualer Anteil der CD5+ und λ 3r+ CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Prozentualer Anteil der CD27+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

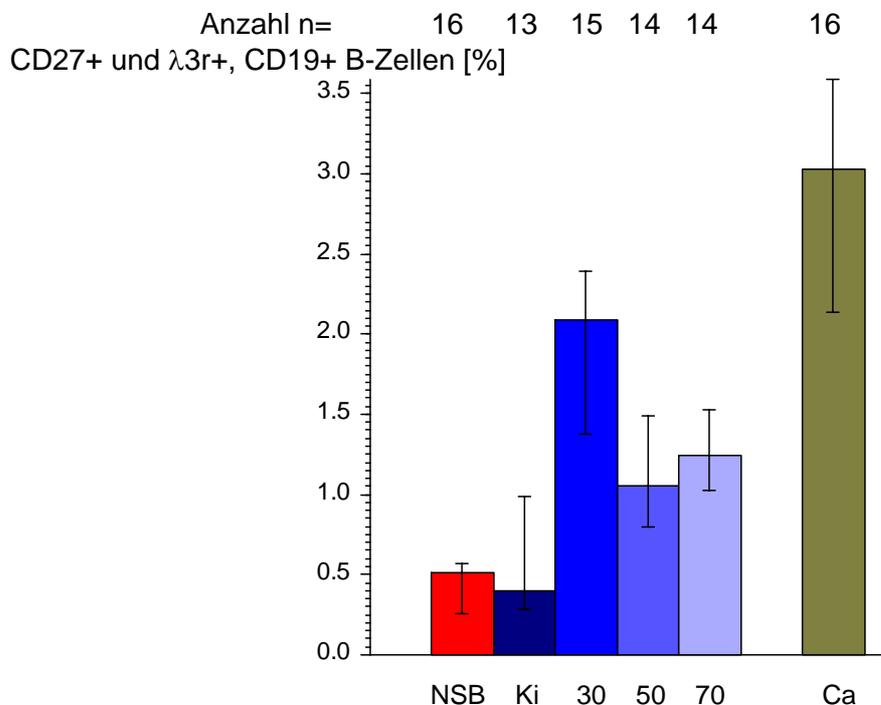


Abbildung 43 Prozentualer Anteil der CD27+ und λ 3r+ CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

3.7.2 Demographie und Marker-Paare

Korrelation mit dem Alter				
Anteil der Marker Paare an CD19+ B-Zellen in %	NSB, Ki, 30er, 50er, 70er n=71		Ki, 30er, 50er, 70er n=55	
	rho	p	rho	p
IgD+ und CD5+	-0,6	<0,00005***	-0,2	0,13
IgD+ und CD27+	0,6	<0,00001***	0,4	0,0035**
IgD+ und λ 3r+	-0,04	0,71	-0,1	0,32
CD5+ und CD27+	0,5	<0,00001***	0,4	0,0043**
CD5+ und λ 3r+	-0,4	0,0004***	-0,1	0,47
CD27+ und λ 3r+	0,3	0,021*	0,08	0,57

Tabelle 27 Alter und prozentualer Anteil der Markerpaare an den CD19+ B-Zellen; rho und p aus der Spearman'schen Rangkorrelation; NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30 jährigen; 50er...; 70er...; Bildung des Referenzwertes zur Alterskorrektur

Die in der Tabelle angegebenen rho-Werte sind ein Ausdruck der Rangkorrelation der Einzelparameter, diese reicht dabei von +1 gleichbedeutend mit maximaler positiver Korrelation über 0 keine Korrelation bis zu -1 maximal negative Korrelation. Ein Wert von +0,4 würde daher einer mittelstarken positiven Korrelation entsprechen, je mehr von einem Faktor a, desto mehr von Faktor b .

Alter und IgD+ sowie CD5+, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen

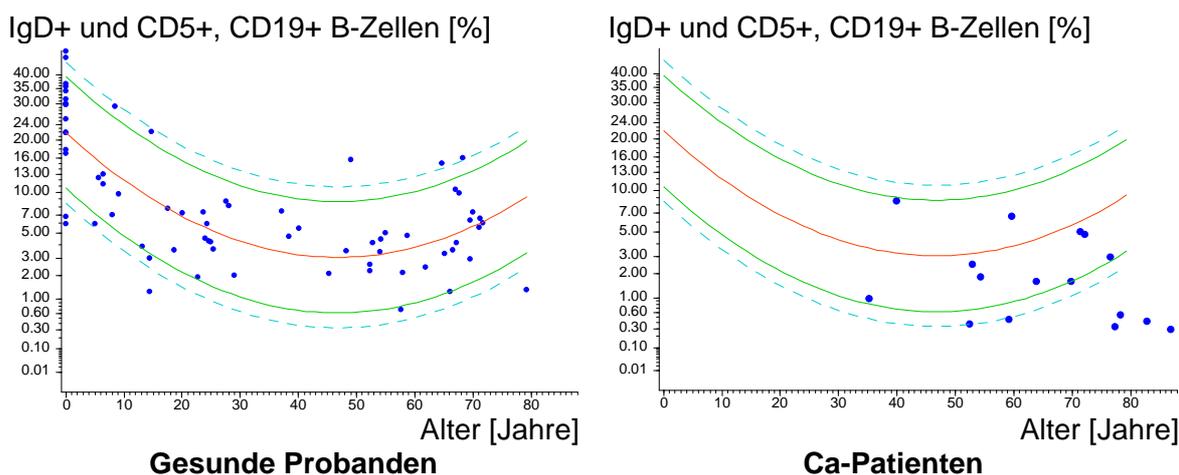


Abbildung 44 IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind mit der Kubikwurzel transformiert.

Alter und IgD+ sowie CD27+, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen

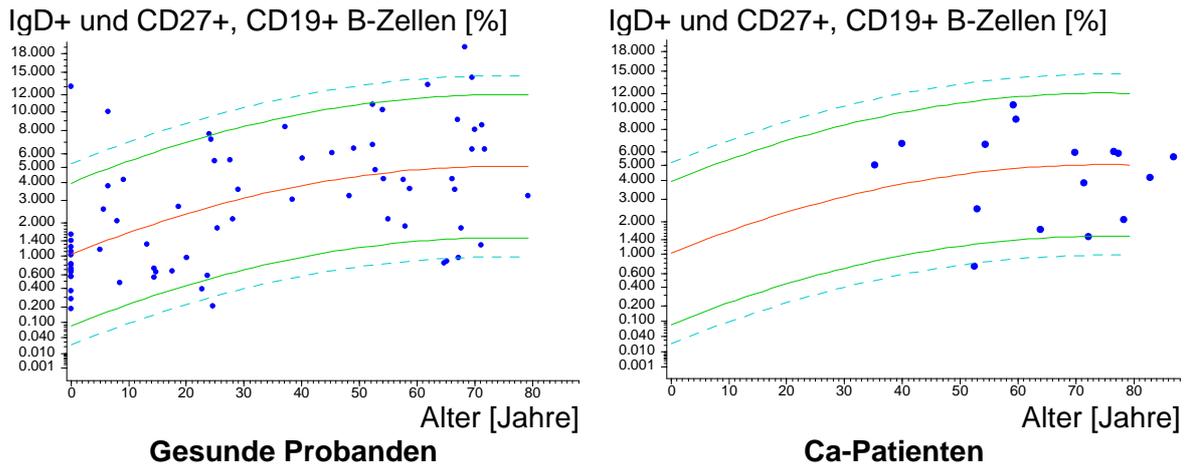


Abbildung 45 IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind mit der Kubikwurzel transformiert.

Alter und IgD+ sowie $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen

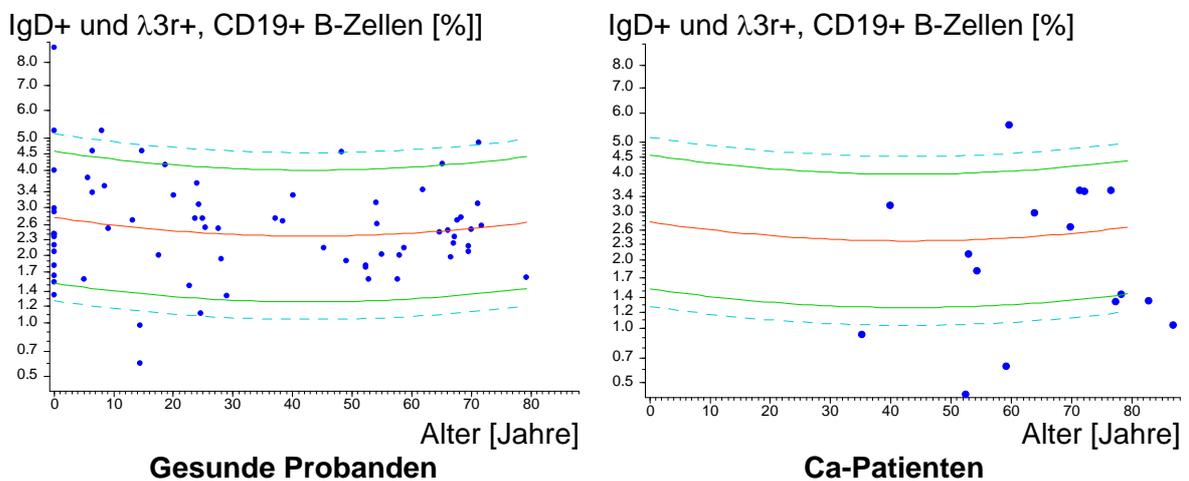


Abbildung 46 IgD+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind mit der Kubikwurzel transformiert.

Alter und CD5+ sowie CD27+, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen

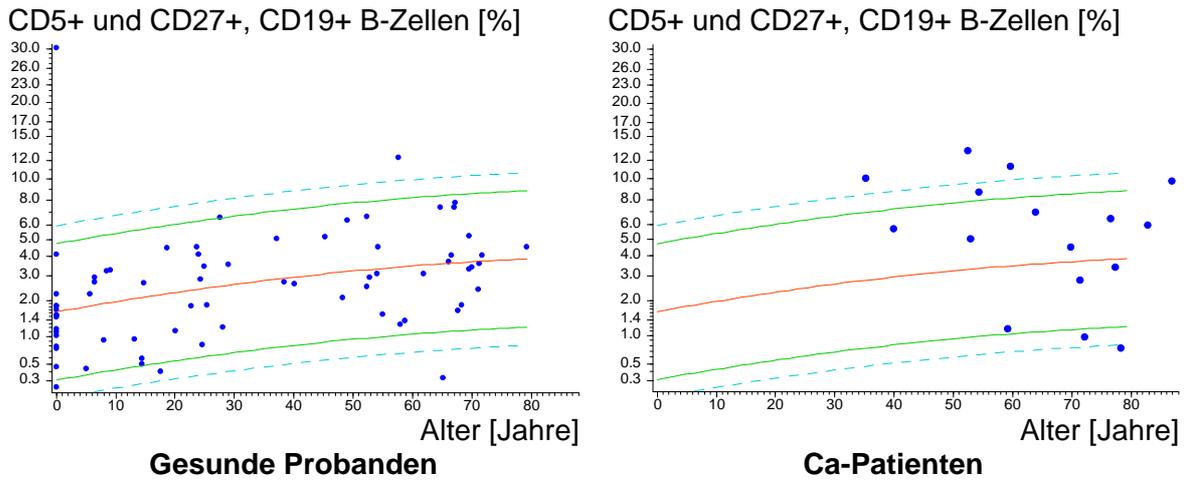


Abbildung 47 CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind mit der Kubikwurzel transformiert.

Alter und CD5+ sowie $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen

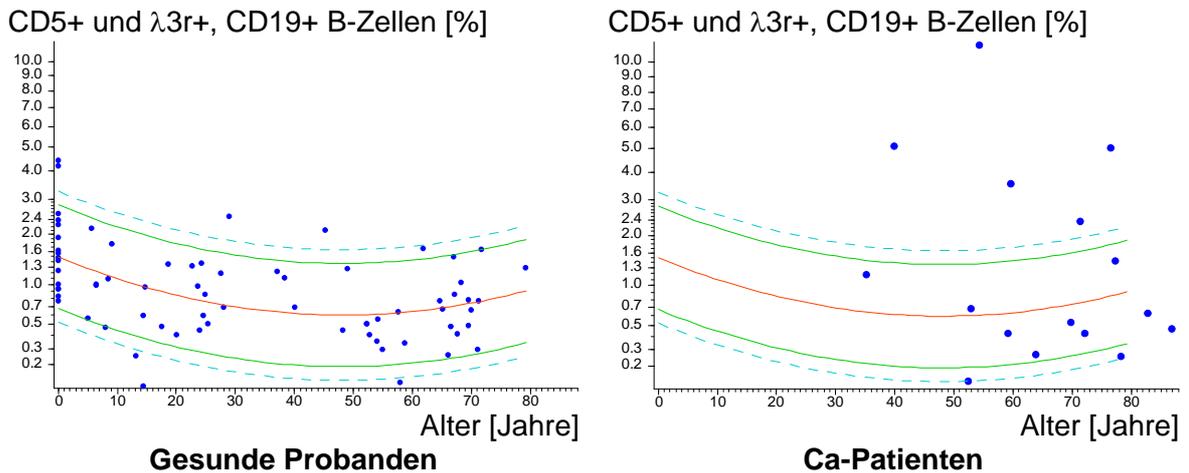


Abbildung 48 CD5+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind mit der Kubikwurzel transformiert.

Alter und CD27+ sowie λ 3r+, CD19+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen

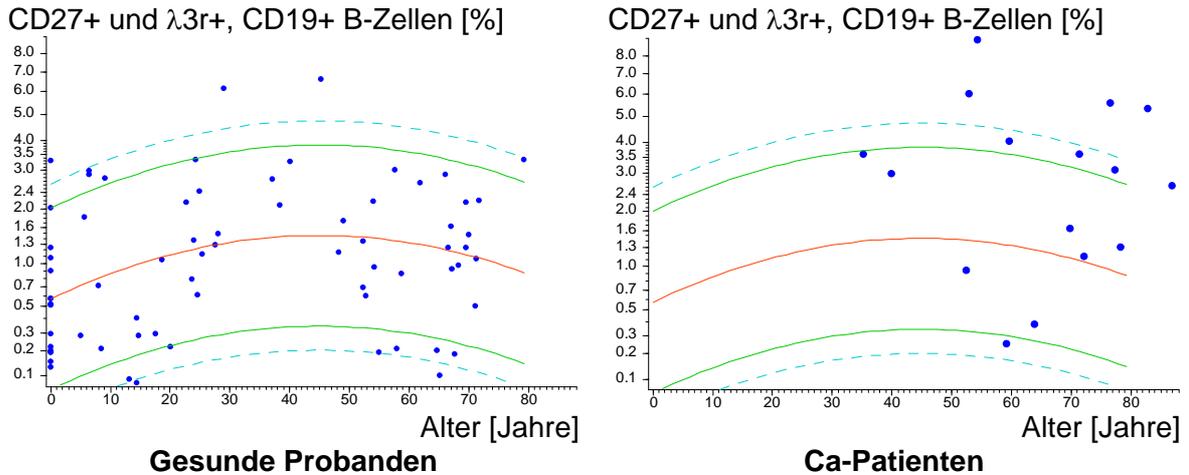


Abbildung 49 CD27+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind mit der Kubikwurzel transformiert.

Nach „Altersnormierung“ waren für IgD+ und CD5-positive B-Zellen die Werte der Ca-Patienten mit $1,7 \pm 2,4\%$ signifikant niedriger, als die der Probanden mit $4,2 \pm 3,4\%$ ($p = 0,00041^{***}$). Die CD27+ und λ 3r-positiven B-Zellen dagegen waren nach Alterskorrektur für die Ca-Patienten signifikant erhöht, $3,8 \pm 2,6\%$ gegenüber $1,8 \pm 1,5\%$ ($p = 0,0022^{**}$) bei den Probanden. Die Werte für CD5+ und CD27-positive B-Zellen waren nach der Alterskorrektur für die Ca-Patienten mit $5,3 \pm 3,6\%$ ebenfalls leicht höher als die der Probanden mit $3,6 \pm 4,6\%$ ($p = 0,048^*$, alle Signifikanzen im U-Test nach Mann und Whitney).

3.7.3 IgD-negative und $\lambda 3r$ -positive, CD19+ B-Zellen prozentual

Gruppe	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
IgD-negative und $\lambda 3r$-positive, CD19+ B-Zellen [%]						
NSB	16	1,8	2,0	1,0	0,4	2,4
Kinder	13	1,9	1,4	1,5	0,8	2,7
30er	15	4,3	3,9	2,9	1,1	7,8
50er	14	1,7	0,7	1,5	1,1	2,4
70er	14	1,7	1,2	1,4	1,0	2,3
Ca-Patienten	16	6,1	6,8	4,3	1,9	8,9

Tabelle 28 Gruppen und relative B-Zellenzahl (CD19-positive B-Zellen) mit den entsprechenden Epitopen in Prozent der CD19+B-Zellen dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
IgD-negative und $\lambda 3r$-positive, CD19+ B-Zellen [%]						p
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00079 ***
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,08
	Kinder	30er	50er	70er		0,11
		30er	50er	70er		0,0014**
		30er	50er	70er	Ca	0,0013**
			50er	70er	Ca	0,00047***

Tabelle 29 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, NSB = Nabelschnurblut, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Relativer Anteil IgD-negativer, $\lambda 3r$ –positiver, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

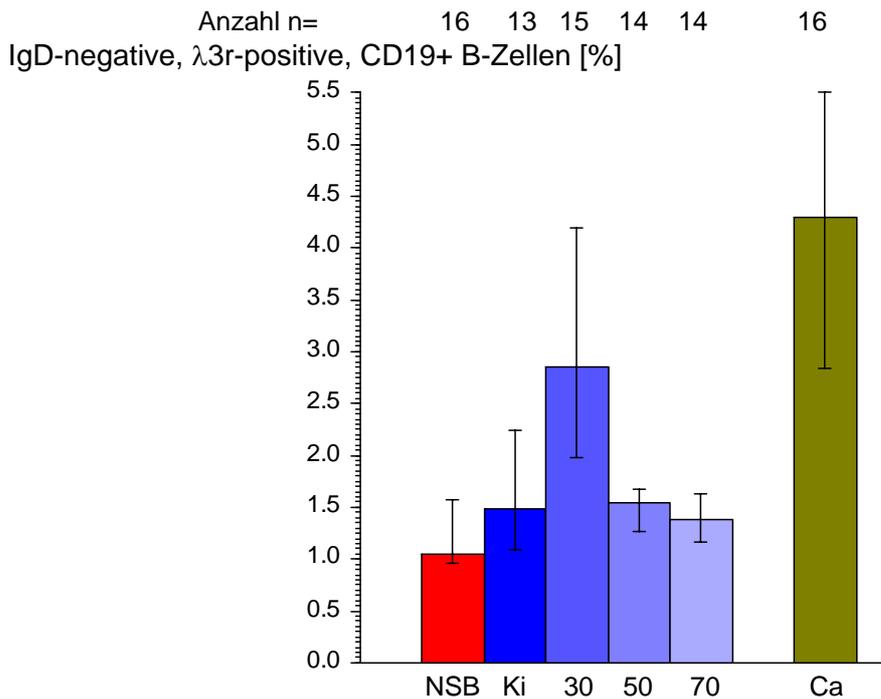


Abbildung 50 Prozentualer Anteil der IgD-negativen $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Median mit dem 68%- Konfidenz Intervall des Medians; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Relativer Anteil IgD-negativer, $\lambda 3r$ –positiver, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen

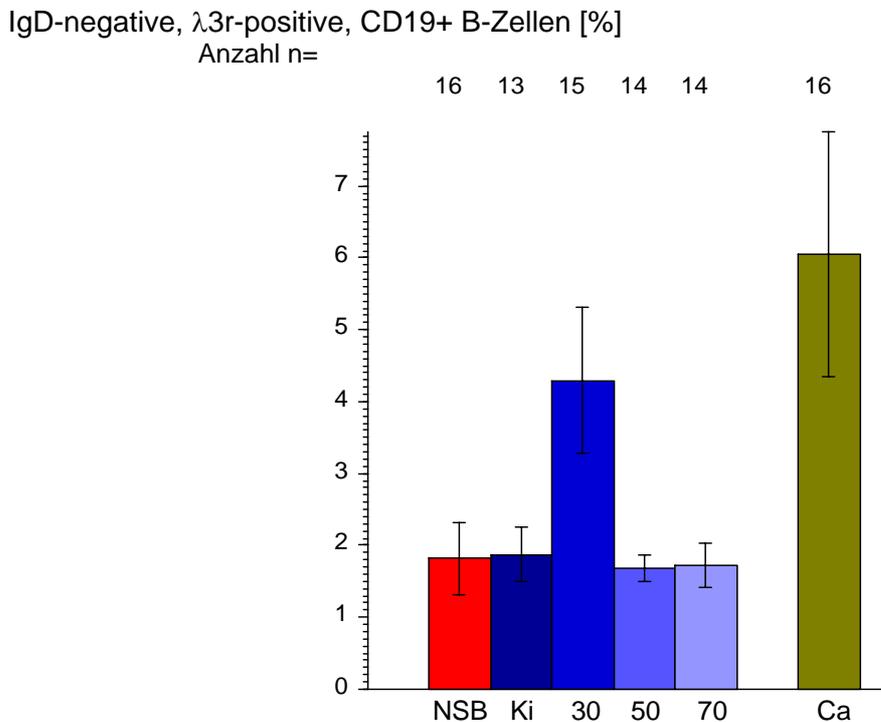


Abbildung 51 Prozentualer Anteil der IgD-negativen, $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen bei Probanden und Patienten; Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung; NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Im Gegensatz zu den IgD-positiven und $\lambda 3r$ -positiven B-Zellen, die keinen Unterschied in der Verteilung aufwiesen, ist der prozentuale Anteil der **IgD-negativen und $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen** bei den Ca-Patienten mit 6,1% im Vergleich zu den 50ern und 70ern (1,7% und 1,7%) stark erhöht. Die Erhöhung ist signifikant ($p = 0,00047^{***}$ in der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; siehe **Tabelle 29**). Die Trennschärfe des Mittelwerts ist in diesem Fall eindeutiger als die Darstellung mit Hilfe des Medians (**Abbildung 50**, **Abbildung 51**).

Die altersbezogene Darstellung zeigt ein ähnliches Ergebnis mit 5 Extremwerten, die das 95% CI übersteigen, die Hälfte der Werte liegen über dem 90% Vertrauensintervall (**Abbildung 52**). Es gibt bei den Ca-Patienten keine „Extremwerte“ nach unten.

3.7.4 Demographie der IgD-negativen und $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen

Alter und IgD-negative, $\lambda 3r$ -positive, CD19+B-Zellen

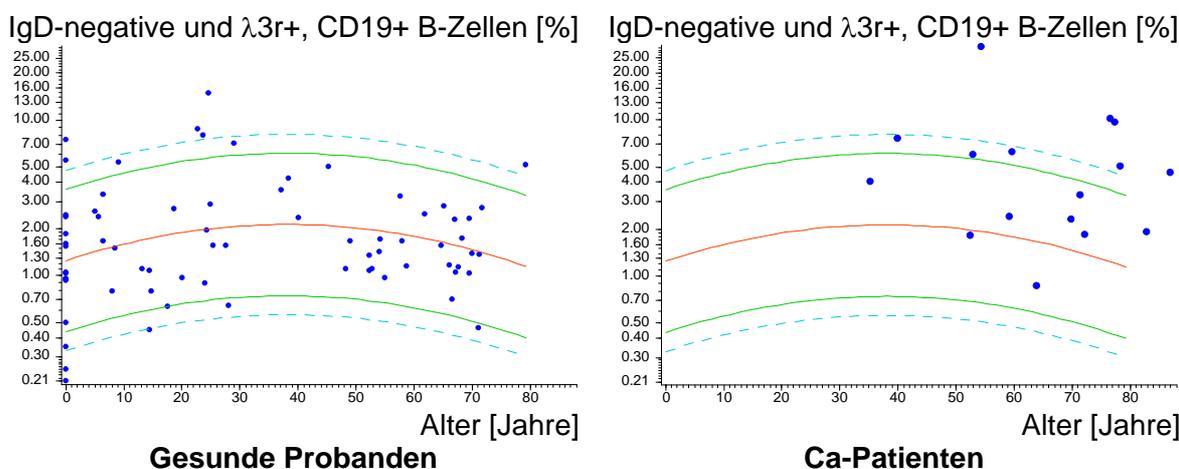


Abbildung 52 Prozentualer Anteil **IgD-negativer** und $\lambda 3r$ -positiver, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung; Jeder Punkt entspricht einer Person. Die Linien sind aus den Werten der gesunden Probanden berechnet und dienen als Normbereich. Die zentrale Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten

3.8 Statistisch erwartete Expressionsfrequenz der Marker-Paare

Zu den beobachteten doppelt markierten B-Zellen (z.B. IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen aus dem Kapitel 4.7.1) kann man aus den beiden einzelnen Messungen (IgD+, CD19+ B-Zellen aus Kapitel 4.5.1 und CD5+, CD19+ B-Zellen aus Kapitel 4.5.2) berechnen, wieviel Prozent der B-Zellen beide Marker tragen würden, wenn zwischen der Expression dieser beiden Marker keinerlei Zusammenhang bestünde. Dieser bei Unabhängigkeit erwartete prozentuale Wert der B-Zellen mit zwei Markern ist das Produkt der Prozentwerte des ersten und des zweiten Markers geteilt durch 100 (in dem obigen Beispiel entspricht dies $X_{\text{erwartet}} = ([\text{Frequenz IgD} * \text{Frequenz CD5}] / 100)$; berechnet für jeden Probanden einzeln).

Den berechneten Prozentsatz kann man dann mit dem tatsächlich beobachteten vergleichen und aus dem Unterschied darauf schließen, ob die beiden Marker statistisch zusammenhängen oder unabhängig voneinander auf der Oberfläche der Zelle exprimiert werden.

Es handelt sich daher lediglich um die statistisch dargestellte Unabhängigkeit zweier Oberflächenmarker. Eine definitive Aussage über die tatsächliche Unabhängigkeit kann keinesfalls getroffen werden, ein Trend jedoch kann vermutet werden.

Im Falle der Markerkombination IgD und CD5 etwa kann man vermuten, dass bei den Karzinompatienten im Gegensatz zu den Probanden keine unabhängige Expression vorliegt. Hier liegen alle Werte der Karzinompatienten unterhalb der Winkelhalbierenden, es liegt eine negative Korrelation vor.

Im Folgenden wird diese statistische Unabhängigkeitshypothese graphisch dargestellt werden.

Expressionsfrequenz der Marker-Paare in Prozent der CD19+ B-Zellen				Differenz erwartet / beobachtet		Ergebnis im Wilcoxon-Test
Marker-Paar	n	MW	ST	MW	ST	p
IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen						
erwartet	88	10,1	9,1	0,5	3,3	0,042*
beobachtet	88	9,6	10,9			
IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen						
erwartet	88	10,4	7,7	6,3	5,9	<0,000005***
beobachtet	88	4,1	3,8			
IgD+ und λ3r+, CD19+ B-Zellen						
erwartet	88	3,4	1,7	0,8	1,6	<0,000005***
beobachtet	88	2,6	1,3			
CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen						
erwartet	88	2,4	2,2	-1,5	2,2	<0,000005***
beobachtet	88	3,8	4,0			
CD5+ und λ3r+, CD19+ B-Zellen						
erwartet	88	0,9	1,0	-0,3	0,7	<0,000005***
beobachtet	88	1,3	1,5			
CD27+ und λ3r+, CD19+ B-Zellen						
erwartet	88	3,4	1,7	1,7	1,7	<0,000005***
beobachtet	88	1,7	1,7			

Tabelle 30 Beobachtete und statistisch erwartete Expressionsfrequenz der Markerpaare auf den CD19+ B-Zellen bei allen Probanden und Karzinompatienten dargestellt als Mittelwert, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p aus dem Wilcoxon-Test;

B-Zellen (CD19+BZ), die gleichzeitig IgD+ und CD5-positiv waren, wurden, global über alle Gruppen verglichen, seltener als erwartet gesehen. Ebenso IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen, IgD+ und λ 3r-positiv, CD19+ B-Zellen sowie CD27+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen (siehe **Tabelle 30**).

Gleichzeitig CD5+ und CD27-positiv, CD19+ B-Zellen sowie CD5+ und λ 3r-positiv, CD19+ B-Zellen dagegen kamen global über alle Gruppen verglichen häufiger vor als erwartet (siehe **Tabelle 30**).

**Statistisch erwartete und beobachtete Expressionsfrequenz
des Marker-Paars IgD+ und CD5+ auf CD19+B-Zellen
in % der CD19+ B-Zellen**

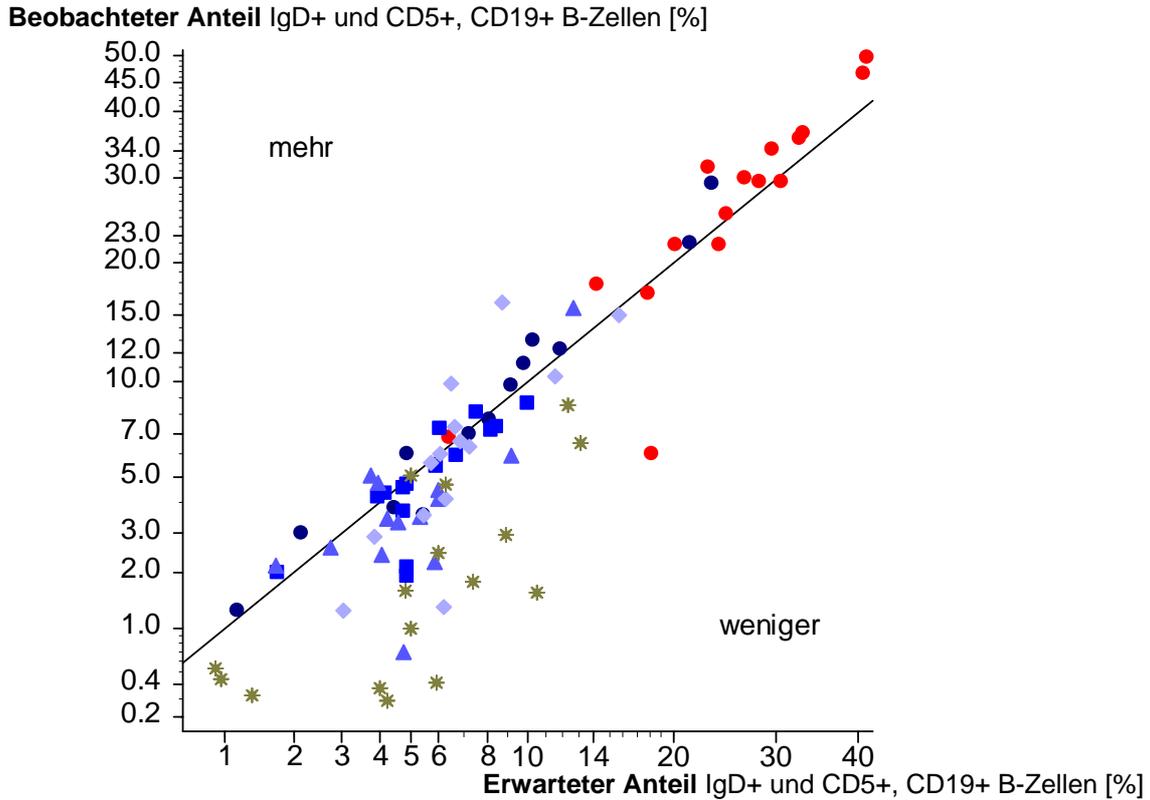


Abbildung 53 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz der Oberflächenmoleküle IgD und CD5 als Paar auf CD19+ B-Zellen, dargestellt in % der CD19+ B-Zellen; Jeder Punkt stellt einen Probanden bzw. Karzinompatienten dar, dessen erwartete Expressionsfrequenz auf der x-Achse und dessen beobachtete Expressionsfrequenz auf der y-Achse abzulesen ist; Die Punkte sind nach Alters- bzw. Diagnosegruppe markiert; ● = Nabelschnurblut, ● = Kinder, ■ = 30-jährige, ▲ = 50-jährige, ◆ = 70-jährige Probanden, * = Ca-Patienten. Punkte unter der schrägen Linie symbolisieren Probanden bzw. Patienten, deren beobachtete Expressionsfrequenz geringer ist, als erwartet.

Bei den Ca-Patienten scheinen sich die Epitope IgD und CD5, im Gegensatz zu den gesunden Probanden, zu „verdrängen“, da das Auftreten doppelt positiver CD19+ B-Zellen weniger häufig beobachtet wird, als dies statistisch zu erwarten wäre. Es scheint daher eine negative Korrelation zwischen der Expression des Oberflächenmoleküls IgD und des Moleküls CD5 zu geben, da zu erwarten wäre, dass die Punkte in der Nähe der schrägen Linie lägen, falls Unabhängigkeit gegeben wäre ($p = 0,0049^{**}$ im Vergleich der Ca-Patienten mit den 50ern und 70ern, Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; siehe **Tabelle 31**). Bei der Mehrzahl der gesunden Probanden aller Altersgruppen liegen die Werte auf der Winkelhalbierenden und scheinen daher unabhängig voneinander exprimierte Epitope zu repräsentieren.

**Statistisch erwartete und beobachtete Expressionsfrequenz
des Marker-Paars IgD+ und CD27+ auf CD19+B-Zellen
in % der CD19+ B-Zellen**

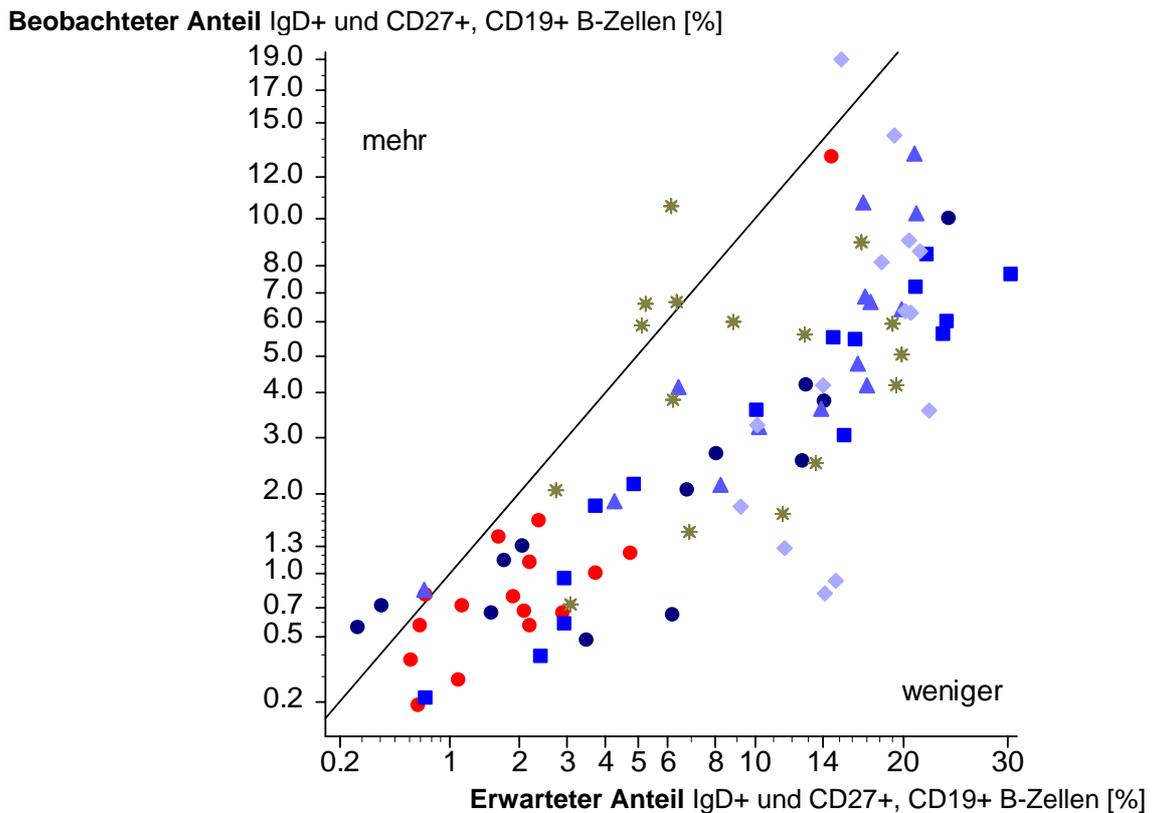


Abbildung 54 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz der Oberflächenmoleküle IgD und CD27 als Paar auf CD19+ B-Zellen, dargestellt in % der CD19+ B-Zellen; Jeder Punkt stellt einen Probanden bzw. Karzinompatienten dar, dessen erwartete Expressionsfrequenz auf der x-Achse und dessen beobachtete Expressionsfrequenz auf der y-Achse abzulesen ist; Die Punkte sind nach Alters- bzw. Diagnosegruppe markiert; ● = Nabelschnurblut, ● = Kinder, ■ = 30-jährige, ▲ = 50-jährige, ◆ = 70-jährige Probanden, * = Ca-Patienten. Punkte unter der schrägen Linie symbolisieren Probanden bzw. Patienten, deren beobachtete Expressionsfrequenz geringer ist, als erwartet.

Bei den meisten gesunden Probanden liegt der beobachtete Anteil der IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen weit unter dem erwarteten Wert ($p = 0,00003^{***}$, im Vergleich der Ca-Patienten mit den 50ern und 70ern, Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis siehe **Tabelle 31**). Dieses Verteilungsmuster entspricht der derzeitigen wissenschaftlichen Hypothese, da das Oberflächenmolekül „IgD“ als Marker für naive B-Zellen definiert und das Epitop „CD27“ ein Marker für gereifte B-Zellen ist.

Bei einigen Ca-Patienten hingegen scheint eine Koexpression stattzufinden, da die erwarteten Werte mit den gemessenen übereinstimmen, die B-Zellen scheinen beide Moleküle unabhängig voneinander auf der Oberfläche zu tragen ($p > 0,05$, im Vergleich der Ca-Patienten mit den 50ern und 70ern, Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; siehe **Tabelle 31**).

**Statistisch erwartete und beobachtete Expressionsfrequenz
des Marker-Paars IgD+ und $\lambda 3r+$ auf CD19+B-Zellen
in % der CD19+ B-Zellen**

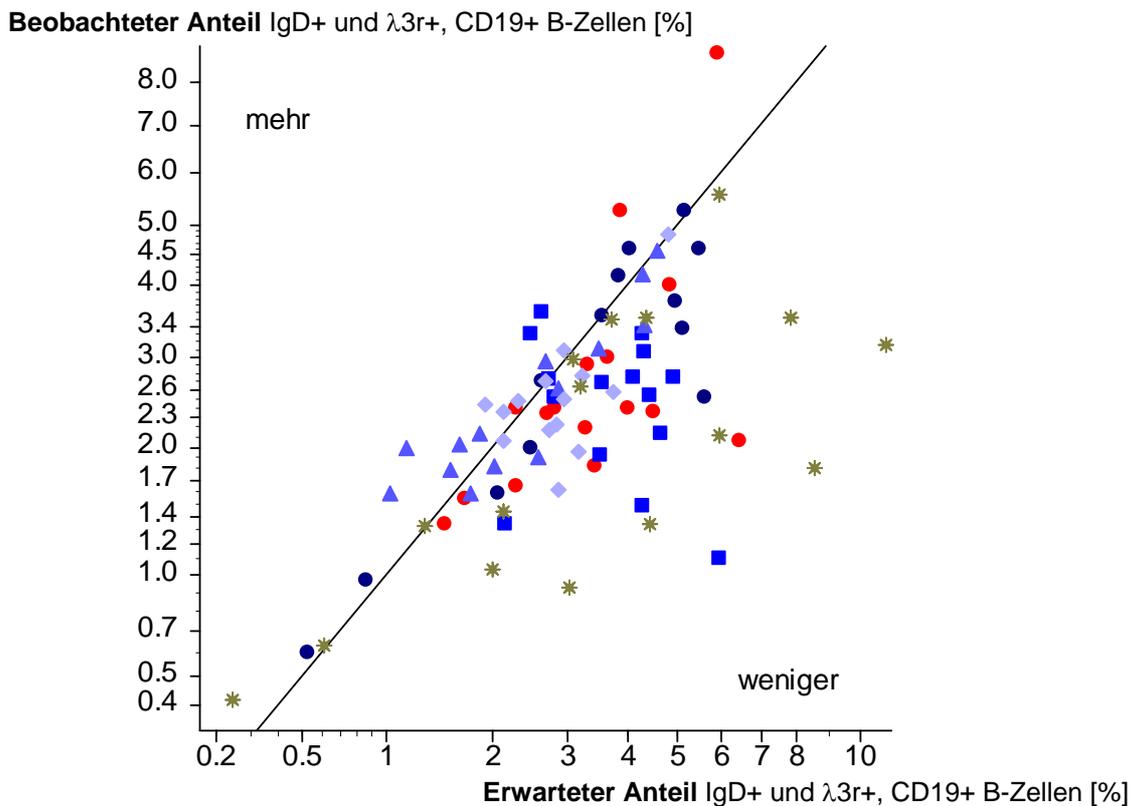


Abbildung 55 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz der Oberflächenmoleküle IgD und $\lambda 3r+$ als Paar auf CD19+ B-Zellen, dargestellt in % der CD19+ B-Zellen; Jeder Punkt stellt einen Probanden bzw. Karzinompatienten dar, dessen erwartete Expressionsfrequenz auf der x-Achse und dessen beobachtete Expressionsfrequenz auf der y-Achse abzulesen ist; Die Punkte sind nach Alters- bzw. Diagnosegruppe markiert; ● = Nabelschnurblut, ● = Kinder, ■ = 30-jährige, ▲ = 50-jährige, ◆ = 70-jährige Probanden, * = Ca-Patienten. Punkte unter der schrägen Linie symbolisieren Probanden bzw. Patienten, deren beobachtete Expressionsfrequenz geringer ist, als erwartet.

Bei den Ca-Patienten lagen die beobachteten Koexpressionsfrequenzen für die Marker IgD und $\lambda 3r$ auffallend häufig unter den erwarteten Werten. Dies muss als Hinweis auf eine voneinander abhängige Expression gewertet werden, es ist offensichtlich selektiv bei Karzinompatienten eine Reduktion naiver, IgD+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen, im Vergleich zur

altersentsprechenden Kontrollgruppe beobachtbar ($p=0,0059^{**}$; im Vergleich der Ca-Patienten mit den 50ern und 70ern, Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, **Tabelle 31**). Probanden der altersäquivalenten Kontrollgruppe weisen dieses Verteilungsmuster in keinem der Fälle auf.

Statistisch erwartete und beobachtete Expressionsfrequenz des Marker-Paars CD5+ und CD27+ auf CD19+B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen

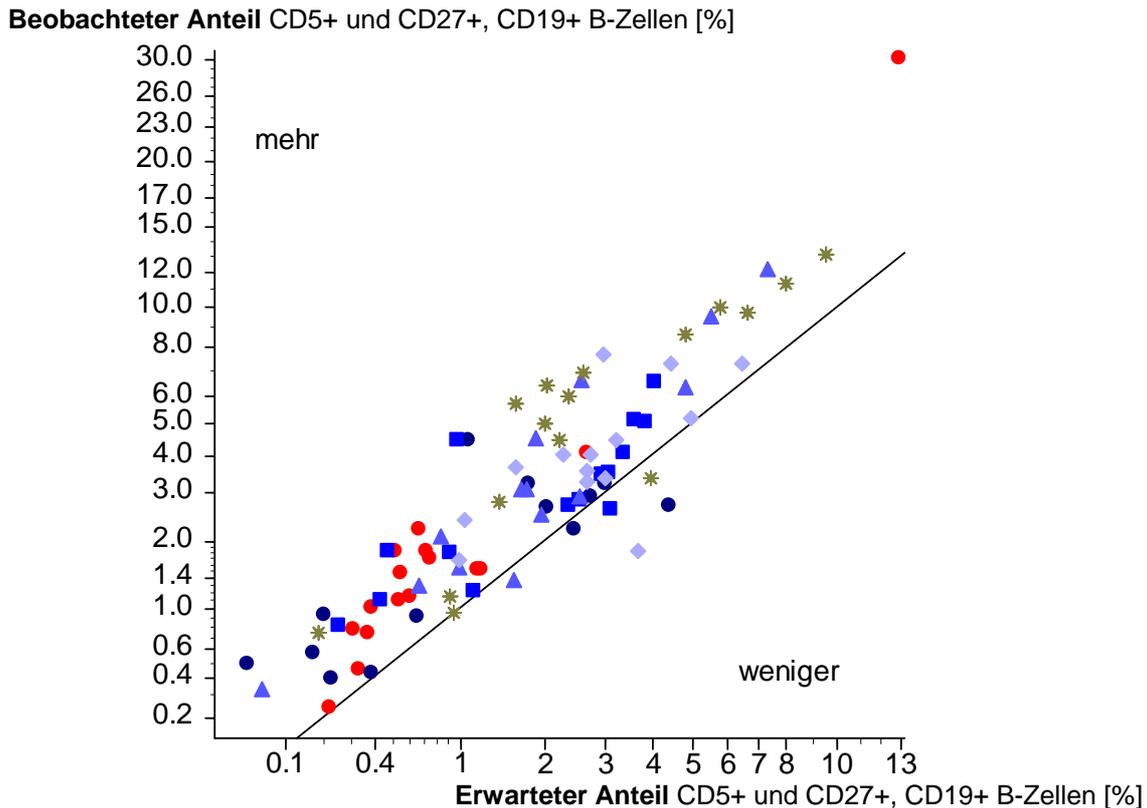


Abbildung 56 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz der Oberflächenmoleküle CD5 und CD27 als Paar auf CD19+ B-Zellen, dargestellt in % der CD19+ B-Zellen; Jeder Punkt stellt einen Probanden bzw. Karzinompatienten dar, dessen erwartete Expressionsfrequenz auf der x-Achse und dessen beobachtete Expressionsfrequenz auf der y-Achse abzulesen ist; Die Punkte sind nach Alters- bzw. Diagnosegruppe markiert; ● = Nabelschnurblut, ● = Kinder, ■ = 30-jährige, ▲ = 50-jährige, ◆ = 70-jährige Probanden, * = Ca-Patienten. Punkte unter der schrägen Linie symbolisieren Probanden bzw. Patienten, deren beobachtete Expressionsfrequenz geringer ist, als erwartet.

Das Auftretensmuster des Marker-Paares CD5 und CD27 folgt in etwa der Winkelhalbierenden zwischen erwarteten und beobachteten Werten und weist nahezu keine Ausreißer auf, ein Unterschied ist nicht zu erkennen ($p>0,05$, im Vergleich der Ca-Patienten mit den 50ern und 70ern, Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; siehe **Tabelle 31**). Man kann daher von unabhängiger Expression der Epitope auf der B-Zell-Oberfläche bei Kontrollen und Karzinompatienten ausgehen.

**Statistisch erwartete und beobachtete Expressionsfrequenz
des Marker-Paars CD5+ und λ 3r+ auf CD19+B-Zellen
in % der CD19+ B-Zellen**

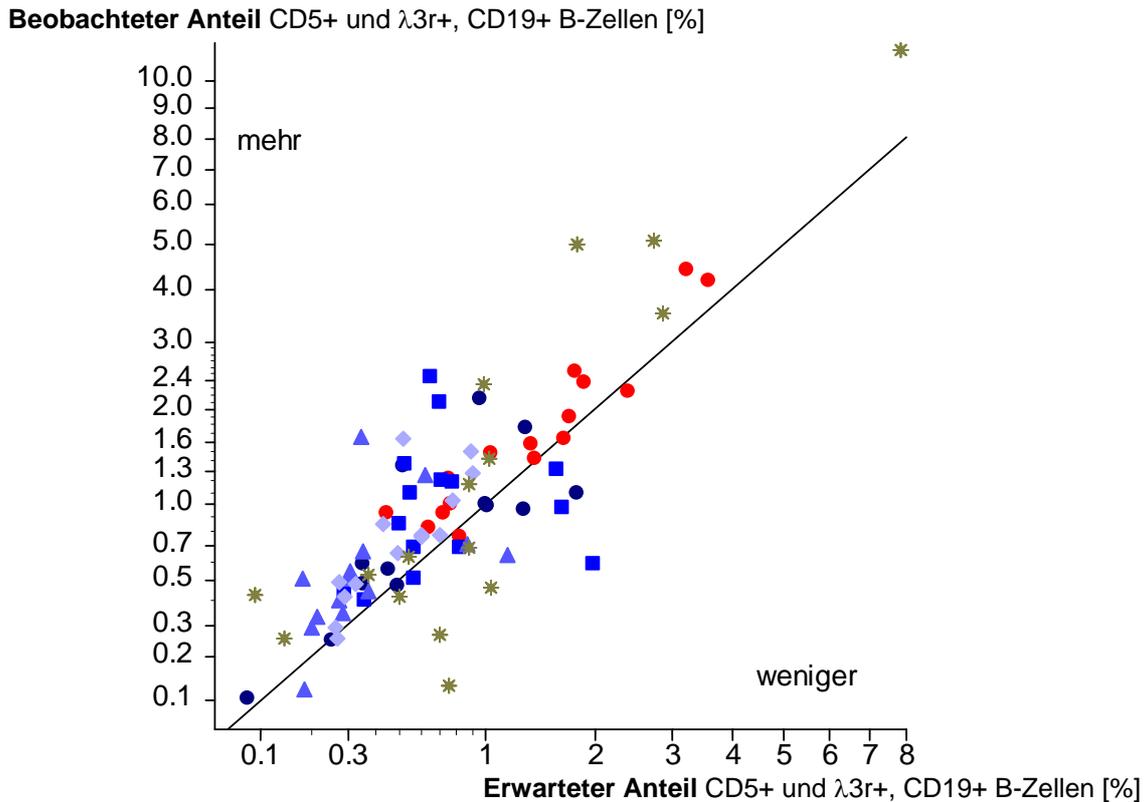


Abbildung 57 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz der Oberflächenmoleküle CD5 und λ 3r als Paar auf CD19+ B-Zellen, dargestellt in % der CD19+ B-Zellen; Jeder Punkt stellt einen Probanden bzw. Karzinompatienten dar, dessen erwartete Expressionsfrequenz auf der x-Achse und dessen beobachtete Expressionsfrequenz auf der y-Achse abzulesen ist; Die Punkte sind nach Alters- bzw. Diagnosegruppe markiert; ● = Nabelschnurblut, ● = Kinder, ■ = 30-jährige, ▲ = 50-jährige, ◆ = 70-jährige Probanden, * = Ca-Patienten. Punkte unter der schrägen Linie symbolisieren Probanden bzw. Patienten, deren beobachtete Expressionsfrequenz geringer ist, als erwartet.

Die Expression der Epitope CD5 und λ 3r auf den CD19+ B-Zellen zeigt beim Vergleich der Patienten mit den Probanden keinen Unterschied zwischen erwarteten und gemessenen Werten ($p > 0,05$, im Vergleich der Ca-Patienten mit den 50ern und 70ern, Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, siehe **Tabelle 31**). Die Oberflächenmarker scheinen daher bei Karzinompatienten und Gesunden statistisch betrachtet unabhängig voneinander exprimiert zu werden.

**Statistisch erwartete und beobachtete Expressionsfrequenz
des Marker-Paars CD27+ und λ 3r+ auf CD19+B-Zellen
in % der CD19+ B-Zellen**

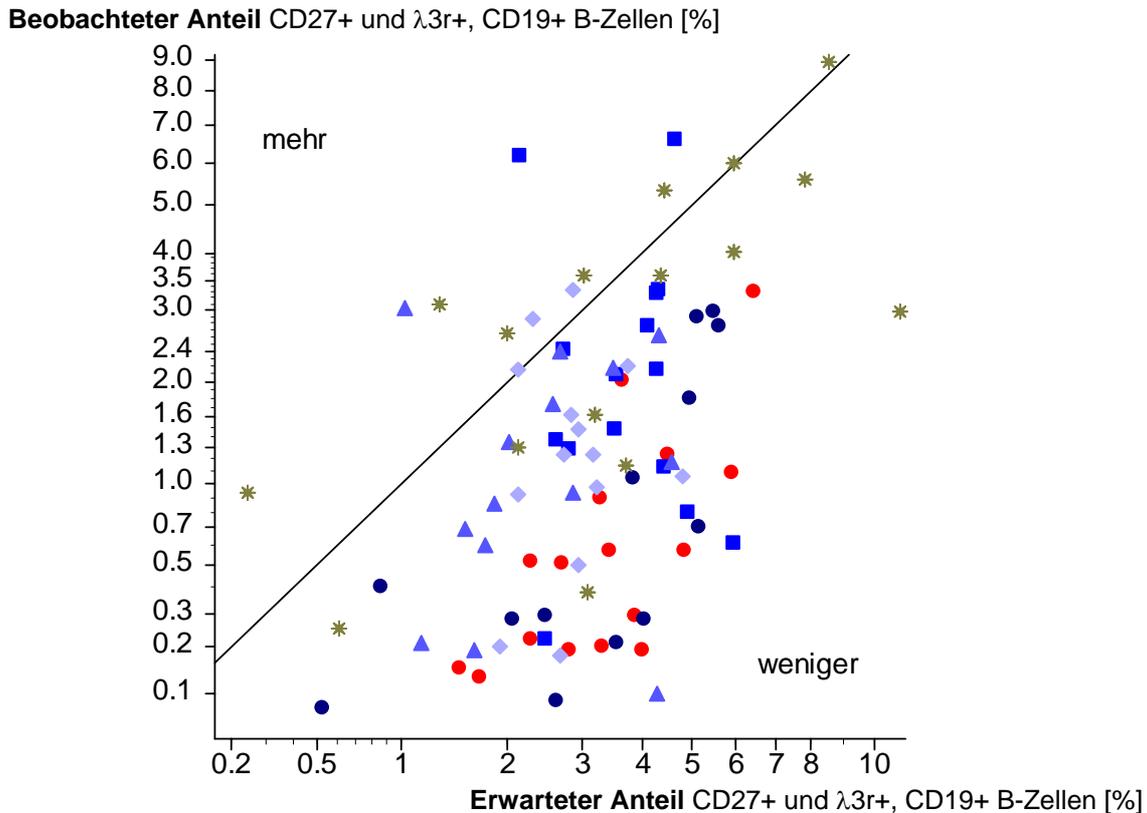


Abbildung 58 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz der Oberflächenmoleküle CD27 und λ 3r als Paar auf CD19+ B-Zellen, dargestellt in % der CD19+ B-Zellen; Jeder Punkt stellt einen Probanden bzw. Karzinompatienten dar, dessen erwartete Expressionsfrequenz auf der x-Achse und dessen beobachtete Expressionsfrequenz auf der y-Achse abzulesen ist; Die Punkte sind nach Alters- bzw. Diagnosegruppe markiert; ● = Nabelschnurblut, ● = Kinder, ■ = 30-jährige, ▲ = 50-jährige, ◆ = 70-jährige Probanden, * = Ca-Patienten. Punkte unter der schrägen Linie symbolisieren Probanden bzw. Patienten, deren beobachtete Expressionsfrequenz geringer ist, als erwartet.

Die Epitope CD27 und λ 3r scheinen sich bei der Expression stark zu beeinflussen, da die B-Zellen entweder das eine oder das andere, selten aber beide Marker exprimieren. In der Abbildung liegen die Punkte daher unter der Winkelhalbierenden. ($p = 0,0024^{**}$ für alle Probanden, Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, siehe **Tabelle 31, Abbildung 58**). Ein Großteil der Ca-Patienten scheint jedoch von dieser Regel abzuweichen, da hier die beiden Epitope gleich häufig oder überzufällig häufig zusammen auftreten (siehe **Tabelle 31, Abbildung 58**). Dies deckt sich mit der Hypothese, dass die Frequenz der λ 3r-positiven Memory B-Zellen bei Karzinompatienten erhöht zu sein scheint. Einige Ausreißer der Kontrollgruppe aus 50ern und 70ern zeigen jedoch ein ähnliches Verhalten.

3.8.1 Gruppen und Abweichung vom statistischen Erwartungswert der Expressionsfrequenz der Marker-Paare auf CD19+B-Zellen

Abweichung vom statistischen Erwartungswert der Expressionsfrequenz				b) Ergebnis der Rangvarianzanalyse	
a)	n	MW	ST	p	verglichene Gruppen
IgD und CD5					
NSB	16	1,8	4,9	0,00001***	Ca, NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er,
Kinder	13	0,8	1,9	0,0050**	NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er
30er	15	-0,6	1,2	0,053	Kinder,30er, 50er, 70er
50er	14	-1,0	2,0	0,00007***	Ca, Kinder, 30er, 50er, 70er,
70er	14	-0,2	2,8	0,0021**	Ca, 30er, 50er, 70er
Ca-Patienten	16	-3,6	2,5	0,0049**	Ca, 50er und 70er
IgD und CD27					
NSB	16	-1,2	1,0	0,00012***	Ca, NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er,
Kinder	13	-4,9	4,7	0,00003***	NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er
30er	15	-9,1	7,1	0,060	Kinder,30er, 50er, 70er
50er	14	-7,9	4,2	0,069	Ca, Kinder, 30er, 50er, 70er,
70er	14	-10,2	5,4	<i>0,18</i>	Ca, 30er, 50er, 70er
Ca-Patienten	16	-5,3	6,1	<i>0,084</i>	Ca, 50er und 70er
IgD und λ3r					
NSB	16	-0,6	1,5	0,0083**	Ca, NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er,
Kinder	13	-0,5	1,0	0,021*	NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er
30er	15	-1,3	1,5	0,018*	Kinder,30er, 50er, 70er
50er	14	-0	0,5	0,0047**	Ca, Kinder, 30er, 50er, 70er,
70er	14	-0,3	0,6	0,0025**	Ca, 30er, 50er, 70er
Ca-Patienten	16	-1,9	2,5	0,0059**	Ca, 50er und 70er
CD5 und CD27					
NSB	16	1,7	4,2	0,012*	Ca, NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er,
Kinder	13	0,5	1,1	0,088	NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er
30er	15	0,9	1,0	<i>0,062</i>	Kinder,30er, 50er, 70er
50er	14	1,7	1,6	0,0097**	Ca, Kinder, 30er, 50er, 70er,
70er	14	1,2	1,5	0,071	Ca, 30er, 50er, 70er
Ca-Patienten	16	2,6	1,7	<i>0,16</i>	Ca, 50er und 70er
CD5 und λ3r					
NSB	16	0,3	0,3	0,67	Ca, NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er,
Kinder	13	0,1	0,5	0,50	NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er
30er	15	0,2	0,8	<i>0,52</i>	Kinder,30er, 50er, 70er
50er	14	0,2	0,4	0,70	Ca, Kinder, 30er, 50er, 70er,
70er	14	0,3	0,3	<i>0,86</i>	Ca, 30er, 50er, 70er
Ca-Patienten	16	0,7	1,3	<i>0,69</i>	Ca, 50er und 70er
CD27 und λ3r					
NSB	16	-2,8	1,0	0,00079***	Ca, NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er,
Kinder	13	-2,5	1,1	0,0024**	NSB, Kinder, 30er, 50er, 70er
30er	15	-1,4	2,2	0,048*	Kinder,30er, 50er, 70er
50er	14	-1,3	1,4	0,028*	Ca, Kinder, 30er, 50er, 70er,
70er	14	-1,5	1,2	0,39	Ca, 30er, 50er, 70er
Ca-Patienten	16	-1,0	2,3	<i>0,29</i>	Ca, 50er und 70er

Tabelle 31 In a) Abweichung der erwarteten von der beobachteten Expressionsfrequenz der Marker-Paare in % der CD19+ B-Zellen dargestellt als Mittelwert, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, In b) p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis; verglichene Gruppen jeweils als Kombination dargestellt: NSB = Nabelschnurblut, Ki = Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten, kursiv geschriebene Zahlen illustrieren statistisch nicht streng konforme Ergebnisse, da in den übergeordneten Gruppen keine Unterschiede darstellbar waren;

3.9 Marker-Paare und Absolutwerte

Marker-Paar	MW	ST	Median	68%-CI		min	max
IgD+, λ 3r+ CD19+ B-Zellen	24	32	13	2	42	1	154
CD5+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen	14	15	8	3	23	1	91
CD27+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen	10	10	7	2	17	1	47
IgD+, CD5+, CD19+ B-Zellen	12	11	8	4	20	1	59
CD5+, CD27+, CD19+ B-Zellen	3	3	2	1	5	1	16
IgD+, CD27+, CD19+ B-Zellen	31	30	21	4	51	1	155

Tabelle 32 Anzahl der CD19+B-Zellen mit den genannten beiden Markern bei allen Patienten und Probanden pro μ l Vollblut; MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, CI = Konfidenzintervall. min = kleinster Wert, max = höchster Wert. n = 72

Die möglichen Marker-Kombinationen und deren globale Häufigkeit in Zellen/ μ l über alle Gruppen sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Die Absolutzahlen wurden unter Zuhilfenahme des Blutbildes und den zu den Messungen gehörenden relativen Werten ermittelt und statistisch verglichen. Die verwendeten Tests werden an den jeweiligen Stellen erwähnt.

Die Absolutzahlen sind berechnet für alle Gruppen außer den Neugeborenen, von denen kein Blutbild angefertigt wurde. Die Gesamtzahl der verglichenen Proben beträgt daher n=72.

Ein Vergleich der Ca-Patienten mit den altersentsprechenden Probanden der 50er und 70er Gruppe zeigte bei den Karzinompatienten eine Erniedrigung aller CD19+ B-Zell-Anzahlen in den Marker-Paar-Kombinationen (siehe **Tabelle 33**). Ausnahme hiervon ist das Markerpaar CD27 und λ 3r. Hier war eine Erhöhung der Zellzahl mit 38 Zellen/ μ l bei den Magenkarzinompatienten vs. 20 und 24 Zellen/ μ l bei den 50ern und 70ern festzustellen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (siehe **Abbildung 63**, **Abbildung 64**).

3.9.1 Marker-Paare und absolute Zellzahlen der CD19+B-Zellen in den Gruppen

Absolutwerte der Marker-Paare in den Gruppen						
	n	MW	ST	Median	68% Konfidenz	
IgD und CD5-positive CD19+B-Zellen /μl Blut						
Kinder	13	64	49	44	23	123
30er	15	23	22	22	7	30
50er	14	17	16	11	4	28
70er	14	18	15	18	5	21
Ca-Patienten	16	4	4	2	0	10
IgD und CD27-positive CD19+B-Zellen /μl Blut						
Kinder	13	16	24	8	3	19
30er	15	15	12	12	3	25
50er	14	18	13	14	7	26
70er	14	16	17	10	4	21
Ca-Patienten	16	5	3	5	2	8
IgD und λ3r-positive CD19+B-Zellen /μl Blut						
Kinder	13	20	13	17	8	30
30er	15	10	8	7	5	16
50er	14	10	8	7	2	20
70er	14	6	3	6	4	9
Ca-Patienten	16	3	3	2	1	7
CD5 und CD27-positive CD19+B-Zellen /μl Blut						
Kinder	13	11	8	10	2	20
30er	15	14	14	9	5	20
50er	14	14	14	9	3	20
70er	14	11	7	8	5	16
Ca-Patienten	16	9	11	7	1	16
CD5 und λ3r-positive CD19+B-Zellen /μl Blut						
Kinder	13	6	4	6	2	9
30er	15	4	3	3	2	5
50er	14	2	2	1	1	3
70er	14	2	1	2	1	3
Ca-Patienten	16	2	3	1	0	6
CD27 und λ3r-positive CD19+B-Zellen /μl Blut						
Kinder	13	25	30	9	3	59
30er	15	45	39	31	12	85
50er	14	20	15	18	4	35
70er	14	24	18	17	12	41
Ca-Patienten	16	38	36	34	8	53

Tabelle 33 Gruppen und absolute B-Zellzahl (CD19-positive B-Zellen) mit den entsprechenden Epitopen in Zellen/ μ l Blut dargestellt, n= Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung; Medianwerte und die jeweiligen 68% Konfidenzintervalle, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten;

Ergebnis der Rangvarianzanalyse bei den verglichenen Gruppen						
IgD und CD5-positive CD19+ B-Zellen / μ l Blut						
NSB	Kinder	30er	50er	70er	Ca	p
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	<0,000005***
	Kinder	30er	50er	70er		0,0046**
		30er	50er	70er		0,49
		30er	50er	70er	Ca	0,00012***
			50er	70er	Ca	0,00083***
IgD und CD27-positive CD19+ B-Zellen / μ l Blut						
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,011*
	Kinder	30er	50er	70er		0,48
		30er	50er	70er		<i>0,53</i>
		30er	50er	70er	Ca	0,004**
			50er	70er	Ca	0,0015**
IgD und λ 3r-positive CD19+ B-Zellen / μ l Blut						
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,00003***
	Kinder	30er	50er	70er		0,0058**
		30er	50er	70er		0,34
		30er	50er	70er	Ca	0,0035**
			50er	70er	Ca	0,0095**
CD5 und CD27-positive CD19+ B-Zellen / μ l Blut						
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,57
	Kinder	30er	50er	70er		<i>0,99</i>
		30er	50er	70er		<i>0,95</i>
		30er	50er	70er	Ca	<i>0,39</i>
			50er	70er	Ca	<i>0,34</i>
CD5 und λ 3r-positive CD19+ B-Zellen / μ l Blut						
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,002**
	Kinder	30er	50er	70er		0,00068***
		30er	50er	70er		0,0058**
		30er	50er	70er	Ca	0,017*
			50er	70er	Ca	0,46
CD27 und λ 3r-positive CD19+ B-Zellen / μ l Blut						
	Kinder	30er	50er	70er	Ca	0,19
	Kinder	30er	50er	70er		<i>0,18</i>
		30er	50er	70er		<i>0,14</i>
		30er	50er	70er	Ca	<i>0,14</i>
			50er	70er	Ca	<i>0,16</i>

Tabelle 34 p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis, verglichene Gruppen und Eigenschaften sind grau unterlegt und stammen aus der vorangegangenen Tabelle, Signifikanzniveau * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, Kinder, 30er = Gruppe der 30-jährigen Probanden; 50er...; 70er...; Ca = Gruppe der Magenkarzinompatienten, streng statistisch nicht zulässige p-Wertberechnungen sind kursiv hervorgehoben;

Anzahl der IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen/ μ l Blut

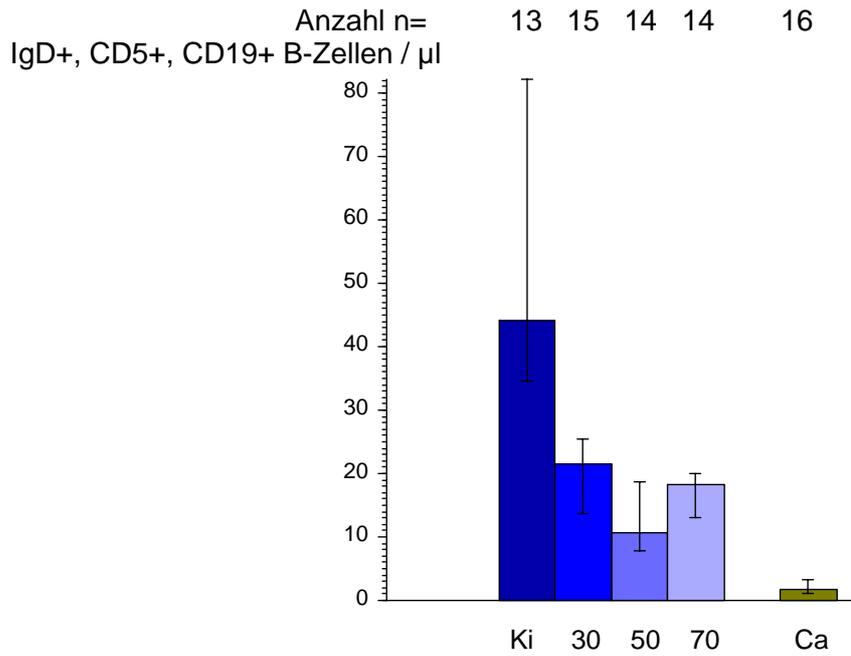


Abbildung 59 Anzahl der IgD+ und CD5-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenzintervall des Medians, Ki= Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Anzahl der IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen / μ l Blut

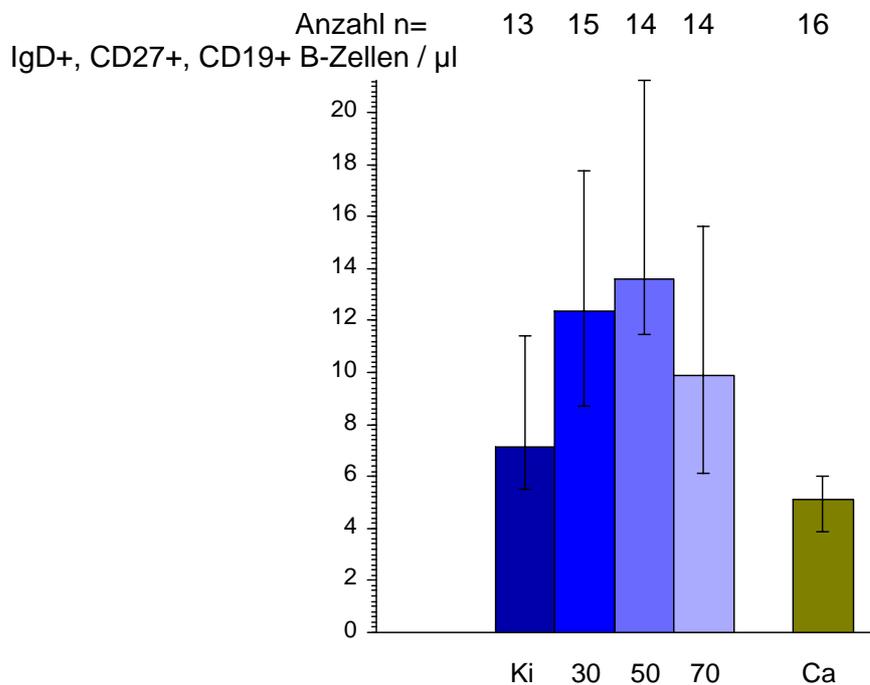


Abbildung 60 Anzahl der IgD+ und CD27-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenzintervall des Medians, Ki= Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Anzahl der IgD+ und λ 3r, CD19+ B-Zellen / μ l Blut

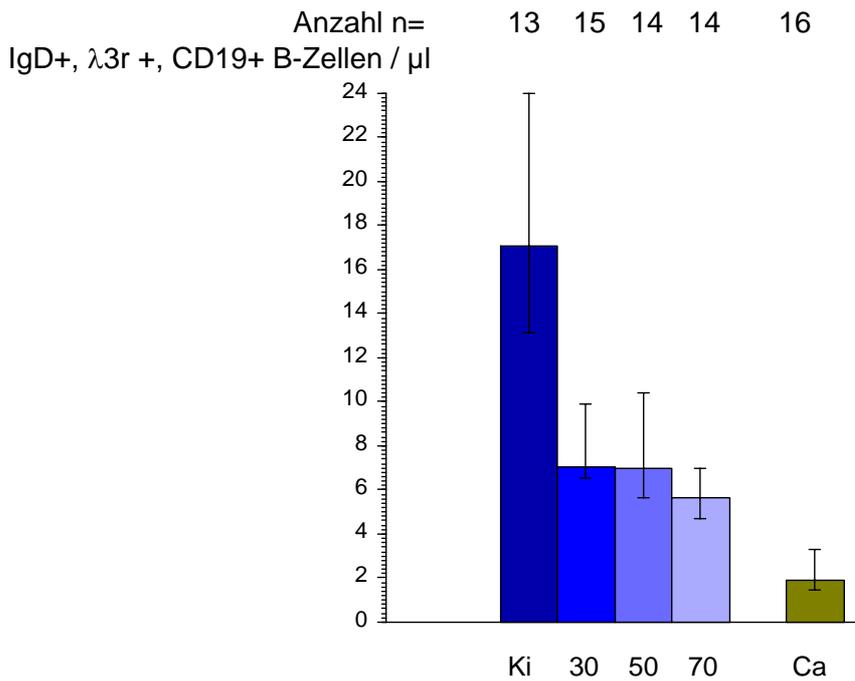


Abbildung 61 Anzahl der IgD+ und λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenzintervall des Medians, Ki= Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

Anzahl der CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen / μ l Blut

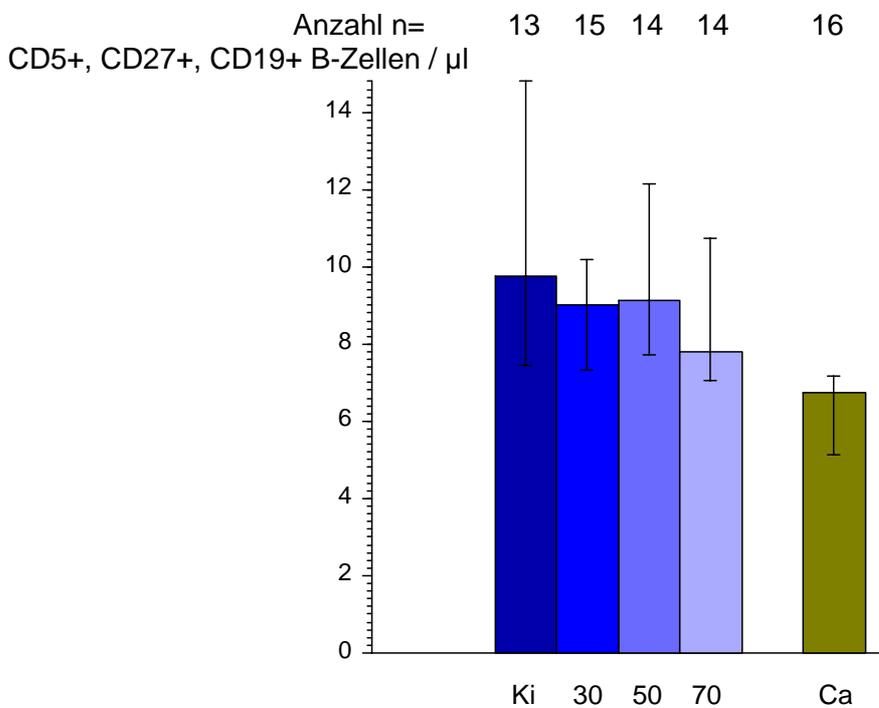


Abbildung 62 Anzahl der CD5+ und CD27-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenzintervall des Medians, Ki= Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

**Anzahl der CD5+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen
/ μ l Blut**

Anzahl n= 13 15 14 14 16
CD5+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen / μ l

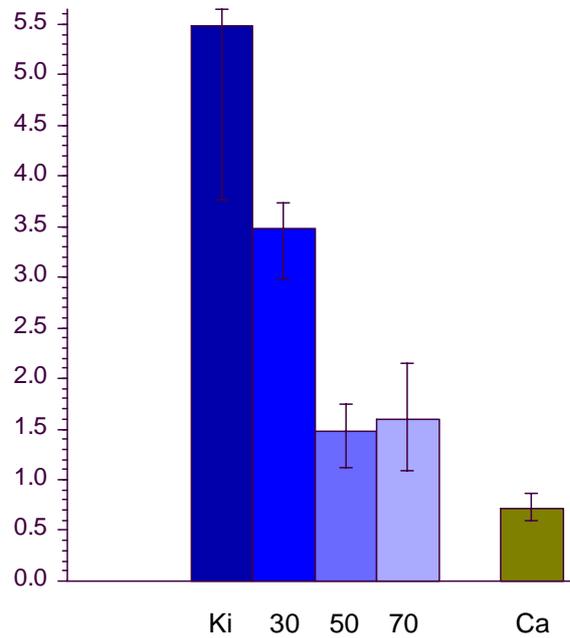


Abbildung 63 Anzahl der CD5+ und λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenzintervall des Medians, Ki= Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

**Anzahl der CD27+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen
/ μ l Blut**

Anzahl n= 13 15 14 14 16
CD27+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen / μ l

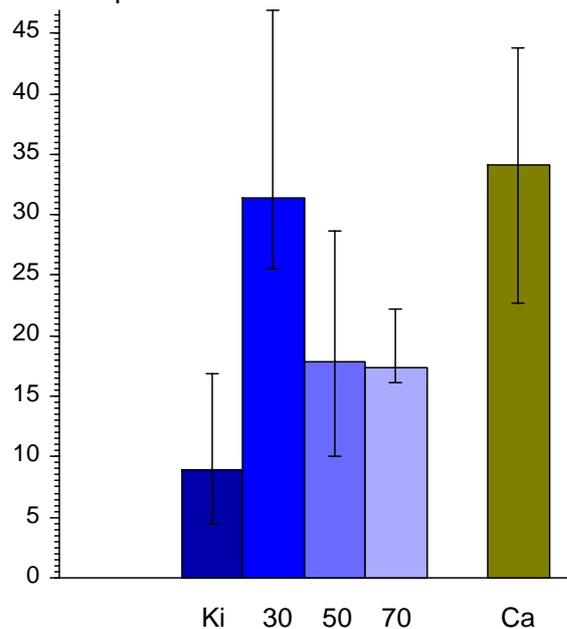


Abbildung 64 Anzahl der CD27+ und λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-Konfidenzintervall des Medians, Ki= Kinder, 30 = ca. 30-jährige Probanden, 50er..., 70er..., Ca = Ca-Patienten;

3.9.2 Demographie und Anzahl der Marker-Paar-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Blut

Korrelation der Marker-Paare mit dem Alter		
	Referenzwert aus allen Probanden	
Anzahl der Marker-Paar-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Blut	rho	p
IgD+, CD5+, CD19+ B-Zellen / μ l Blut	-0,479	0,0002***
IgD+, CD27+, CD19+ B-Zellen / μ l Blut	0,062	0,65
IgD+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen / μ l Blut	-0,465	0,0003***
CD5+, CD27+, CD19+ B-Zellen / μ l Blut	-0,077	0,58
CD5+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen / μ l Blut	-0,525	<0,0001***
CD27+, λ 3r+, CD19+ B-Zellen / μ l Blut	0,013	0,93

Tabelle 35 Korrelation der Anzahl der CD19+B-Zellen mit den genannten beiden Markern bei allen gesunden Probanden mit dem Alter; rho und p aus der Spearman'schen Rangkorrelation; Erstellung des Referenzwertes;

Tabelle 35 zeigt die globale Korrelation der CD19+ B-Zell-Anzahl in den Marker-Paar-Untergruppen mit dem Alter bei allen gesunden Probanden, die zur Referenzwertbestimmung eingeführt wurden.

Statistische Unterschiede ergaben sich in der Varianzanalyse für die Paare IgD und CD5 ($p = 0,0002^{***}$, Spearman'sche Rangkorrelation), IgD und λ 3r ($p = 0,0003^{***}$, Spearman'sche Rangkorrelation) und CD5 und λ 3r ($p < 0,0001^{***}$, Spearman'sche Rangkorrelation). Diese Unterschiede bedeuten, dass die Anzahl der Marker-Paar-positiven Zellen über die verschiedenen Altersstufen hinweg nicht konstant ist.

In den Darstellungen (**Abbildung 65** bis **Abbildung 70**) ist dies an einer gekrümmt verlaufenden quadratischen Regressionslinie (mittlere Linie) erkennbar. Die übrigen Markerpaare zeigten keine Altersvarianz.

Der Vergleich mit den Ca-Patienten geschieht im Folgenden.

Alter und IgD+, CD5+, CD19+ B-Zellen pro μl Blut

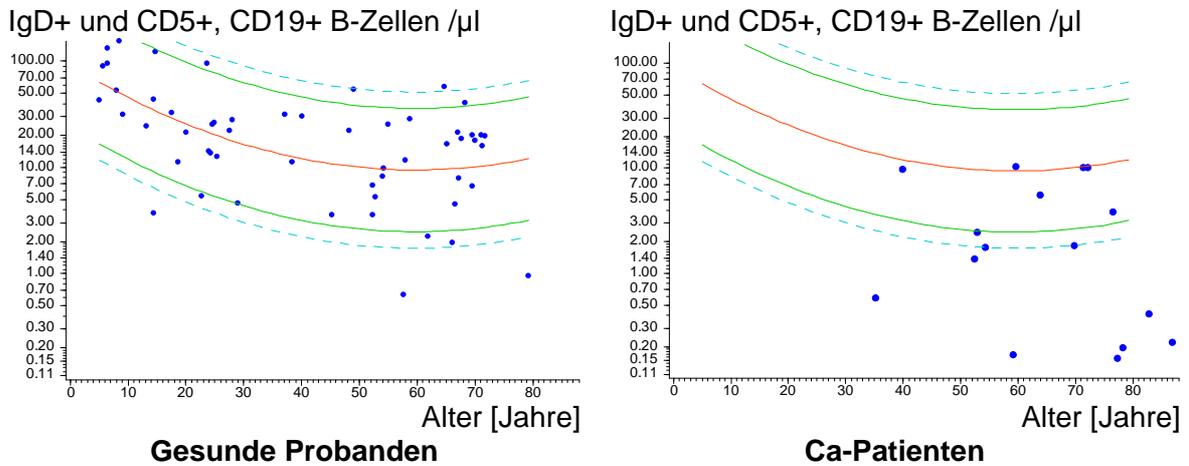


Abbildung 65 IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind logarithmiert.

Alter und IgD+, CD27+, CD19+ B-Zellen pro μl Blut

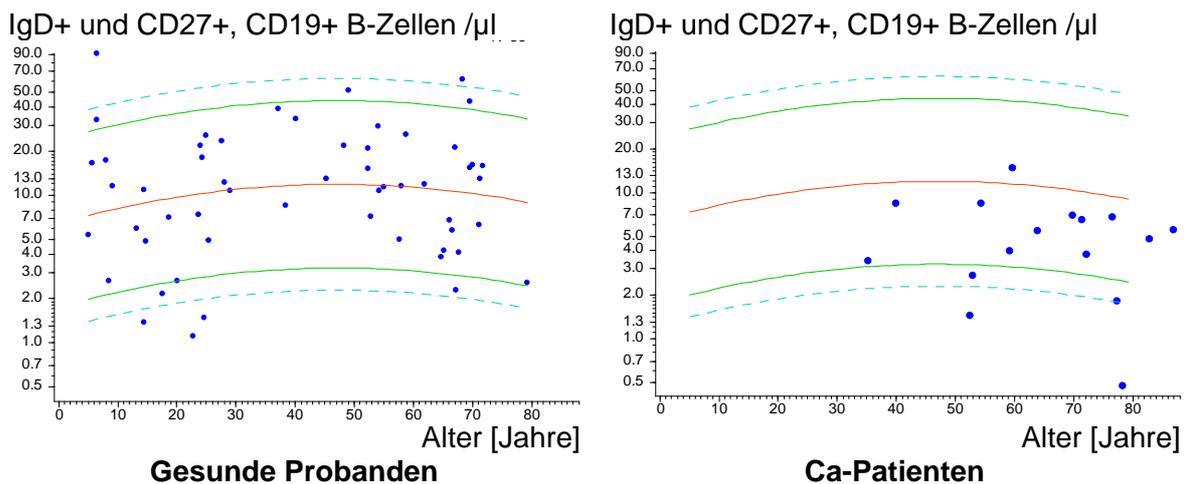


Abbildung 66 IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind logarithmiert.

Alter und IgD+ sowie $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut

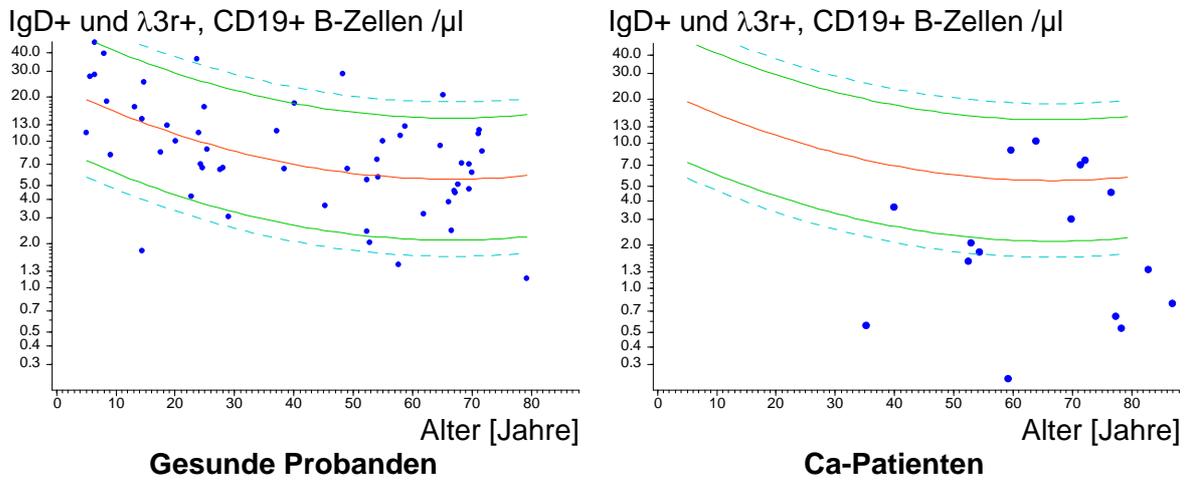


Abbildung 67 IgD+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind logarithmiert.

Alter und CD5+ sowie CD27+, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut

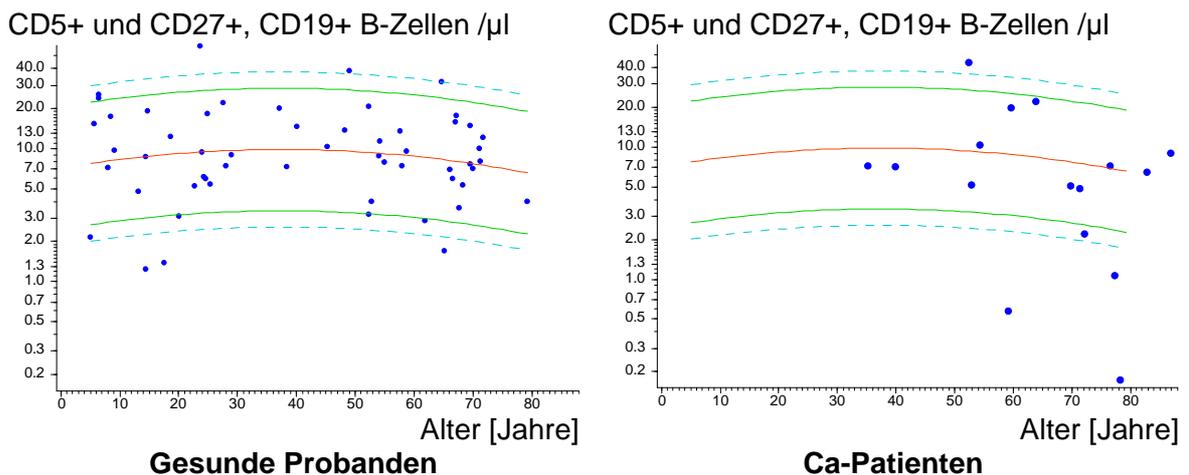


Abbildung 68 CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind logarithmiert.

Alter und CD5+ sowie λ 3r+, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut

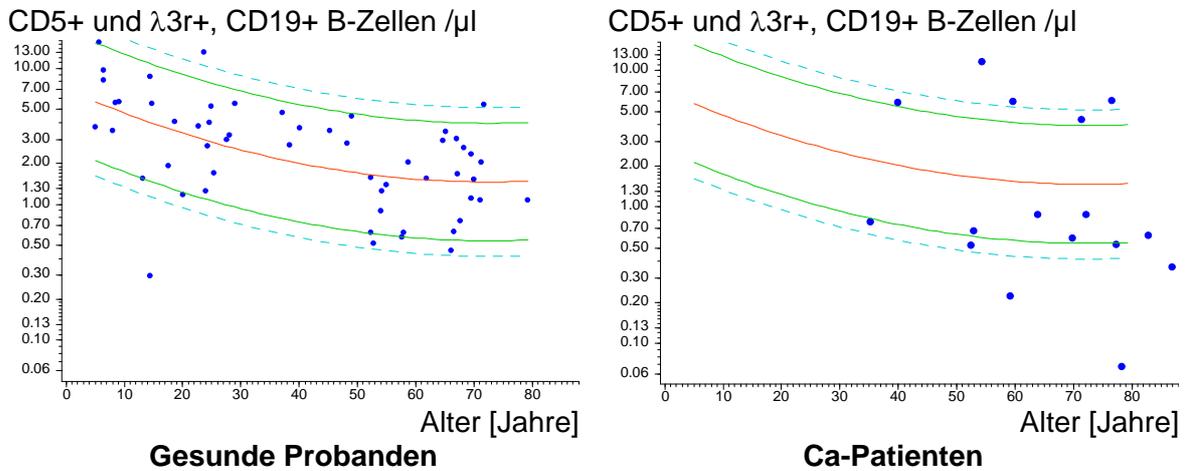


Abbildung 69 CD5+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind logarithmiert.

Alter und CD27+ sowie λ 3r+, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut

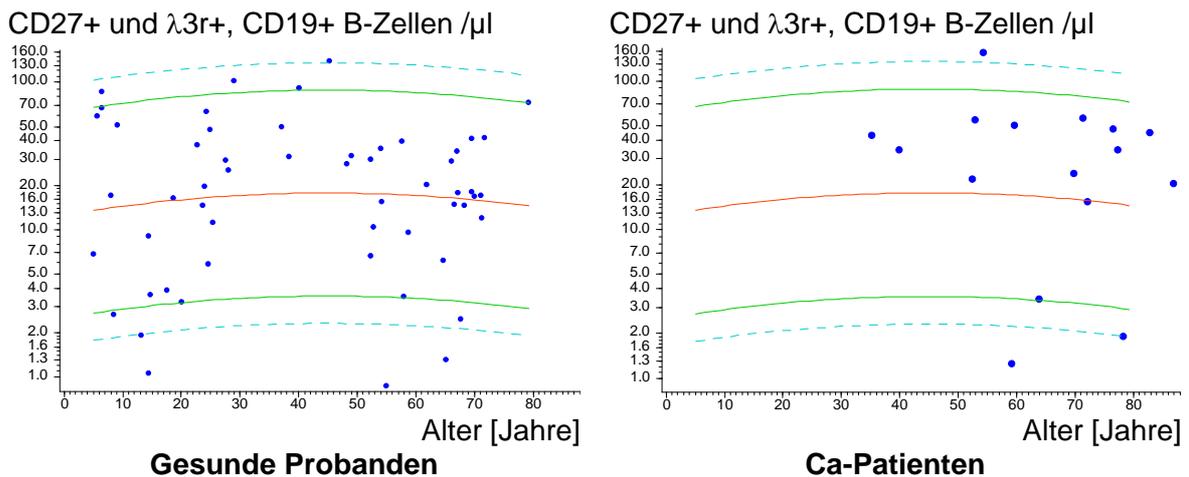


Abbildung 70 CD27+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung. Jeder Punkt entspricht einer Person. Die mittlere Linie stellt eine quadratische Regressionslinie dar, die begleitenden Linien deren 90%- und 95%-Vertrauensbereiche. Das Bild rechts enthält die gleichen Regressionskurven wie das linke Bild, eingetragen sind aber die zu vergleichenden Patienten. Die Werte sind logarithmiert.

Marker-Paare	Gruppe	n	MW	ST	p
IgD und CD5	gesunde Probanden	56	18	16	0,00001***
	Ca-Patienten	16	4	5	
IgD und CD27	gesunde Probanden	56	19	22	0,00081***
	Ca-Patienten	16	6	4	
IgD und λ 3r	gesunde Probanden	56	9	6	0,00086***
	Ca-Patienten	16	4	4	
CD5 und CD27	gesunde Probanden	56	13	11	0,29
	Ca-Patienten	16	11	12	
CD5 und λ 3r	gesunde Probanden	56	3	2	0,14
	Ca-Patienten	16	3	4	
CD27 und λ 3r	gesunde Probanden	56	31	31	0,19
	Ca-Patienten	16	41	37	

Tabelle 36 Altersbezogene Absolutwerte der Marker-Paar-positiven, CD19+ B-Zellen in Zellen / μ l Blut; verglichen wurden die Karzinompatienten mit allen gesunden Probanden dargestellt als Mittelwert; MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Die Auswertung der absoluten CD19+ B-Zell-Anzahlen ergab für drei der Marker-Kombinationen einen statistischen Unterschied in der Verteilung nach „Altersnormierung“. Nennenswert dabei ist, dass sich jeweils eine Erniedrigung der absoluten B-Zell-Anzahlen bei den Ca-Patienten im Vergleich zu den Gesunden zeigte und die Marker-Paare, welche IgD beinhalteten besonders betroffen waren. Die absolute Anzahl der Zellen, welche die Marker-Paare IgD und λ 3r, IgD und CD5 sowie IgD und CD27 trugen, waren signifikant erniedrigt ($p=0,00086^{***}$, $p=0,00001^{***}$, $p=0,00081^{***}$, U-Test nach Mann und Whitney, siehe **Tabelle 36**). Für die übrigen Marker-Kombinationen war kein statistischer Unterschied zwischen Gesunden und Karzinompatienten erkennbar.

3.10 Multivariate Diskriminanz der Ca-Patienten von den Gesunden

3.10.1 Multivariate Diskriminanz mit altersnormierten und relativen Werten

Die folgende Analyse wurde mit den altersbezogenen Parametern berechnet und ohne die absolute Lymphozyten-Anzahl, unter Einschluss der Nabelschnurblut-Proben.

Die logistische Regression ist ein multivariates Verfahren, um aus einer Reihe von Parametern, den Prediktoren, ein zugehöriges ja-nein-Ergebnis vorauszusagen.

Aus den Gewichtsfaktoren β wird eine Formel erstellt, die für jeden Probanden oder Patienten einen Wert errechnet, dieser liegt für die Probanden nahe an Null und für die Ca-Patienten nahe an 1. Das Verfahren wird schrittweise absteigend durchgeführt. Der erste Schritt umfasst alle Parameter.

Logistische Regression	n	beta	Str(β)	Odds-Ratio	95%-CI		p
Basis	88	-1,97	2,24				
CD19+ B-Zellen	88	-0,04	0,073	0,96	0,83	1,11	0,56
IgD+, CD19+ B-Zellen	88	0,01	0,03	1,01	0,95	1,07	0,79
CD5+, CD19+ B-Zellen	88	0,15	0,10	1,16	0,95	1,43	0,14
CD27+, CD19+ B-Zellen	88	-0,06	0,05	0,94	0,86	1,04	0,23
λ 3r+, CD19+ B-Zellen	88	0,24	0,16	1,27	0,92	1,74	0,15
CD5+ und IgD+, CD19+ B-Zellen	88	-0,75	0,41	0,47	0,21	1,05	0,064
CD27+ und IgD+, CD19+ B-Zellen	88	0,06	0,21	1,07	0,71	1,60	0,75
IgD+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen	88	-0,14	0,37	0,87	0,42	1,80	0,7
CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen	88	-0,02	0,15	0,99	0,73	1,33	0,92
CD5+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen	88	0,47	0,77	1,60	0,35	7,20	0,54
CD27+ und λ 3+, CD19+ B-Zellen	88	0,21	0,32	1,24	0,66	2,30	0,5

Tabelle 37 Prognostische Variablen die die Ca-Patienten von den Kontrollen abgrenzen sollen; Koeffizienten beta mit Standardabweichung (Str), Odds-Ratio mit 95%-Konfidenzintervall (CI) und p-Wert aus der logistischen Regression; Werte in Prozent der CD19-positiven B-Zellen; BZ = B-Zellen

Dann wird der Parameter mit dem geringsten Einfluss, d.h. mit dem größten p-Wert entfernt und die Berechnung erneut durchgeführt. Im Prinzip enden die Schritte, wenn alle Parameter signifikant sind. Da es sich aber um ein rein deskriptives Verfahren handelt, kann man bereits Schritte interpretieren, bei denen alle p-Werte nur wenig über der Signifikanzschranke von $p = 0,05$ liegen.

logistische Regression	n	beta	Str(β)	Odds-Ratio	95%-CI		p
Basis	88	-3,02	1,20				
CD5+, CD19+ B-Zellen	88	0,15	0,07	1,16	1,01	1,33	0,03*
CD27+, CD19+ B-Zellen	88	-0,05	0,03	0,96	0,91	1,01	0,1
λ 3r+, CD19+ B-Zellen	88	0,24	0,13	1,27	0,98	1,64	0,068
CD5+ und IgD+, CD19+ B-Zellen	88	-0,56	0,21	0,57	0,38	0,86	0,007**
CD27+ und λ 3+, CD19+ B-Zellen	88	0,35	0,26	1,42	0,86	2,34	0,17

Table 38 Prognostische Variablen die die Ca-Patienten von den Kontrollen abgrenzen sollen; Koeffizienten beta mit Standardabweichung (Str), Odds-Ratio mit 95%-Konfidenzintervall (CI) und p-Wert aus der logistischen Regression;

logistische Regression	n	beta	Str(β)	Odds Ratio	95%-CI		p
Basis	88	-3,22	1,14				
CD5+, CD19+ B-Zellen	88	0,15	0,07	1,16	1,02	1,33	0,029*
CD27+, CD19+ B-Zellen	88	-0,03	0,02	0,97	0,93	1,02	0,21
λ 3r+, CD19+ B-Zellen	88	0,34	0,12	1,41	1,12	1,77	0,004**
CD5+ und IgD+, CD19+ B-Zellen	88	-0,60	0,21	0,55	0,36	0,83	0,004**

Table 39 Prognostische Variablen die die Ca-Patienten von den Kontrollen abgrenzen sollen; Koeffizienten beta mit Standardabweichung (Str), Odds-Ratio mit 95%-Konfidenzintervall (CI) und p-Wert aus der logistischen Regression;

Dies ist das streng vorschriftsmäßige Ergebnis:

logistische Regression	n	beta	Str(β)	Odds-Ratio	95%-CI	p
Basis	88	-3,87	1,06			
CD5+, CD19+ B-Zellen	88	0,14	0,06	1,15	1,01 1,30	0,029*
λ 3r+, CD19+ B-Zellen	88	0,32	0,11	1,38	1,11 1,72	0,004**
CD5+ und IgD+, CD19+ B-Zellen	88	-0,52	0,19	0,60	0,41 0,86	0,006**

Tabelle 40 Prognostische Variablen die die Ca-Patienten von den Kontrollen abgrenzen sollen; Koeffizienten beta mit Standardabweichung (Str), Odds-Ratio mit 95%-Konfidenzintervall (CI) und p-Wert aus der logistischen Regression; **Endgültiges Ergebnis**, Alterskorrigierte Werte,

Unter Verwendung der altersbezogenen Daten ohne Absolutwerte haben folgende Werte einen prädiktiven Charakter:

- der bei den Ca-Patienten erhöhte Anteil der CD5-positiven, CD19+ B-Zellen an allen CD19-positiven B-Zellen,
- der bei den Magenkarzinompatienten erhöhte Anteil der λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen und
- der bei den Erkrankten erniedrigte Anteil der CD5-positiven und IgD-positiven, CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen.

3.10.2 Multivariate Analyse mit dem Alter und den prozentualen B-Zellanteilen

Variable	n	beta	Str(β)	Odds-Ratio	95%-CI	p
Basis	88	-9,17	3,11			
Alter	88	0,10	0,04	1,10	1,03 1,18	0,006**
λ 3r+, CD19+ B-Zellen	88	0,50	0,17	1,65	1,18 2,32	0,004**
CD5+ und IgD+, CD19+ B-Zellen	88	-0,50	0,22	0,60	0,40 0,92	0,02*
CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen	88	0,20	0,11	1,22	1,00 1,51	0,055

Tabelle 41 Prognostische Variable für die Ca-Patienten gegenüber Kontrollen aus Alter und relativen Anteilen der B-Zellsubpopulationen an den CD19+ B-Zellen; Koeffizienten beta mit Standardabweichung (Str), Odds-Ratio mit 95%-Konfidenzintervall(CI) und p-Wert. 1.Zwischenschritt, bei dem alle p-Werte bereits unter 0.1 sind.

Variable	n	beta	Str(β)	Odds-Ratio	95%-CI	p
Basis	88	-7,07	2,48			
Alter	88	0,09	0,03	1,1	1,02 1,16	0,008**
λ 3r+, CD19+ B-Zellen	88	0,45	0,15	1,57	1,16 2,12	0,004**
CD5+ und IgD+, CD19+ B-Zellen	88	-0,5	0,21	0,61	0,4 0,91	0,017*

Tabelle 42 Prognostische Variable für die Ca-Patienten gegenüber Kontrollen aus Alter und Prozentualen Markeranteilen. Koeffizienten beta mit Standardabweichung (Str), Odds Ratio mit 95%-Konfidenzintervall(CI) und p-Wert. Endergebnis, wo alle Variablen signifikant sind.

In dieser Analyse tragen

- das Alter,
- der bei den Erkrankten erhöhte prozentuale Anteil der λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen und
- der bei Karzinompatienten erniedrigte Anteil der IgD-positiven und CD5-positiven, CD19+ B-Zellen an allen CD19+ B-Zellen zur Unterscheidung von Karzinomerkrankten im Vergleich zu Gesunden bei.

Das vorangegangene multivariate Verfahren berücksichtigte das Alter. Im Gegensatz zum ersten, bei dem das Alter über die Alterskorrektur untrennbar mit den prozentualen B-Zell-Anteilen verbunden war, ist es im zweiten Ansatz als freier Parameter integriert.

Dennoch ist das Alter auch im zweiten Ansatz unter den Ergebnisparametern, was seine Bedeutung für die Diskriminierung verdeutlicht.

Auch die Parameter $\lambda 3r$ -positive, CD19+ B-Zellen sowie IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen kommen in beiden Voraussageergebnissen vor, was auch hier deren Bedeutung unterstreicht.

3.11 IgG-positive CD19+ B-Zellen

3.11.1 Verteilung der IgG-positiven CD19+ B-Zellen

a)	Gruppe	n	MW	ST	b) p
Anteil der IgG+ , CD19+ B-Zellen	Ca	9	30,2	16,2	0,55
	50er, 70er	9	23,3	8	
Anteil der IgG+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen	Ca	9	0,4	0,2	0,73
	50er, 70er	9	0,3	0,1	
IgG+, CD19+ B-Zellen in % der $\lambda 3r+$ und CD19+ B-Zellen	Ca	9	2,6	2,2	1,0
	50er, 70er	9	2,3	2,1	

Tabelle 43 In a) IgG-positive Subpopulationen in Prozent der CD19+ B-Zellen. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, In b) p aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney, Vergleich von altersäquivalenten Gruppen aus Ca-Patienten und gesunden Kontrollpatienten der 50er und 70er Gruppe;

Verteilung der IgG-positiven CD19+ B-Zellen

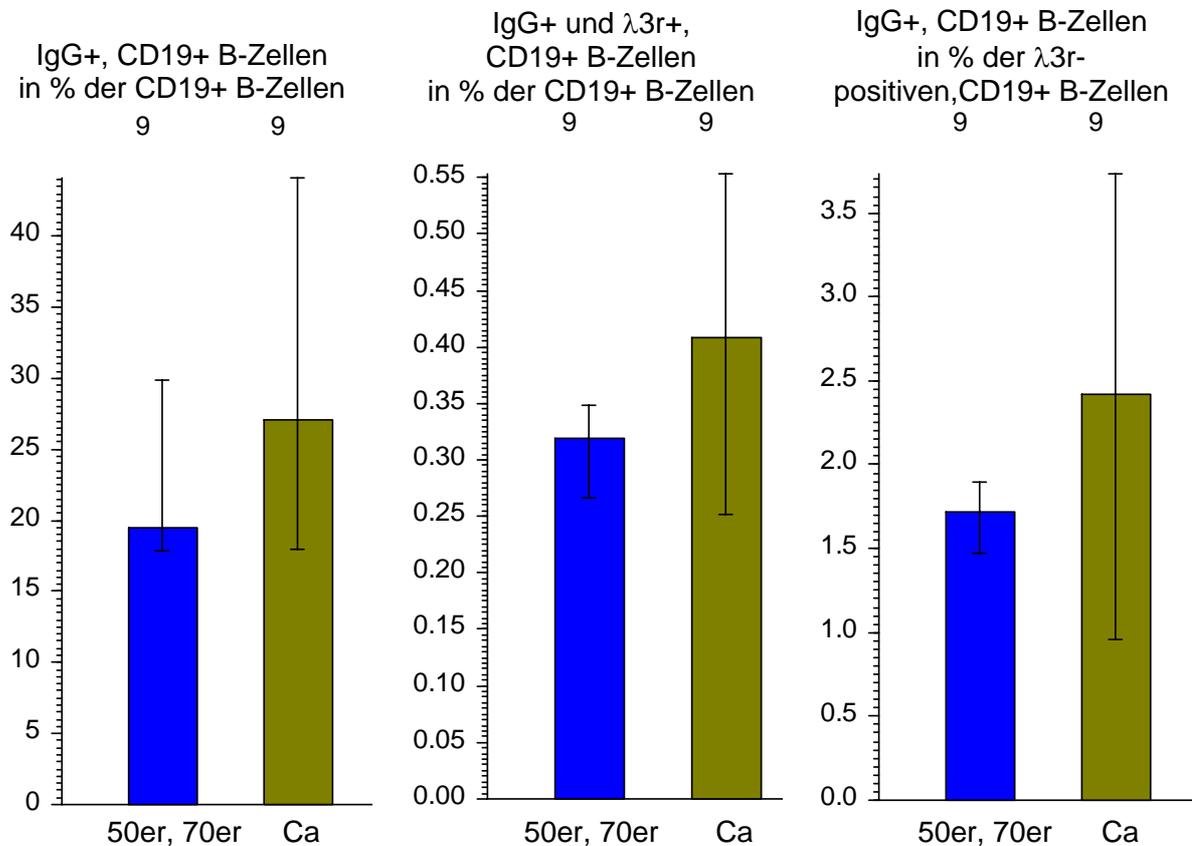


Abbildung 71 Verteilung der IgG+ CD19+ B-Zellen; Dargestellt ist der Median mit dem 68%-CI des Medians, je eine Säule für gesunde Kontrollen aus der Gruppe der 50er und 70er und für Ca-Patienten; Y-Achse in Prozent;

Die Verteilung der IgG-positiven, CD19+ B-Zellen auf die Gruppen wurde außerhalb des regulären Versuchsansatzes an einem kleineren Kollektiv von altersäquivalenten Probanden der 50er und 70er Gruppen und Ca-Patienten untersucht. Hierbei zeigten sich keine statistisch fassbaren Unterschiede in der Verteilung der B-Zellsubpopulationen bei Gesunden und Kranken, die Streuung der Ergebnisse innerhalb der Gruppen jedoch war bei den Ca-Patienten signifikant unterschiedlich. Daher seien hierfür im Weiteren statt der Balkendiagramme die Punkt-Diagramme angegeben (**Abbildung 72** bis **Abbildung 74**).

**IgG-positive CD19+ B-Zellen
in % der CD19+ B-Zellen**

IgG+ B-Zellen in % der CD19+ B-Zellen

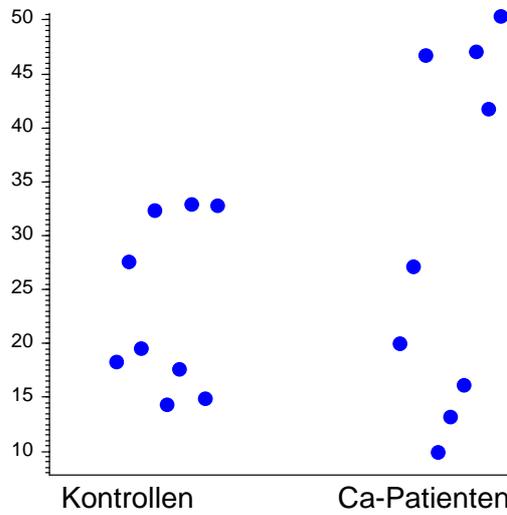


Abbildung 72 Prozentsatz der IgG-positiven, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen bei gesunden Kontrollen und bei Ca-Patienten. Jeder Punkt stellt den Wert einer Person dar.

**IgG+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen
in % der CD19+ B-Zellen**

IgG+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen

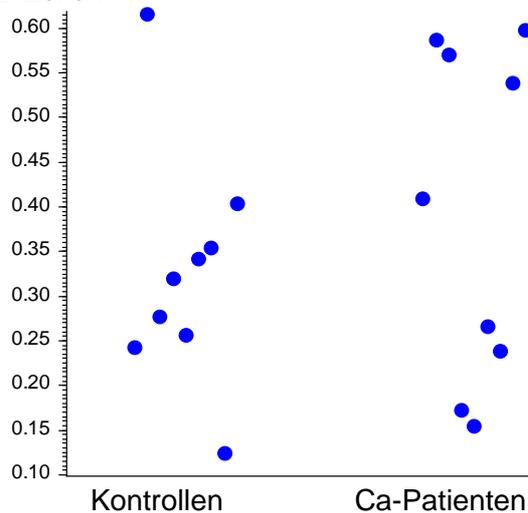


Abbildung 73 Prozentsatz der IgG-positiven und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen bei gesunden Kontrollen und bei Ca-Patienten. Jeder Punkt stellt den Wert einer Person dar.

**IgG-positive B-Zellen
in % der $\lambda 3r+$ und CD19+ B-Zellen**

IgG+, CD19+ B-Zellen

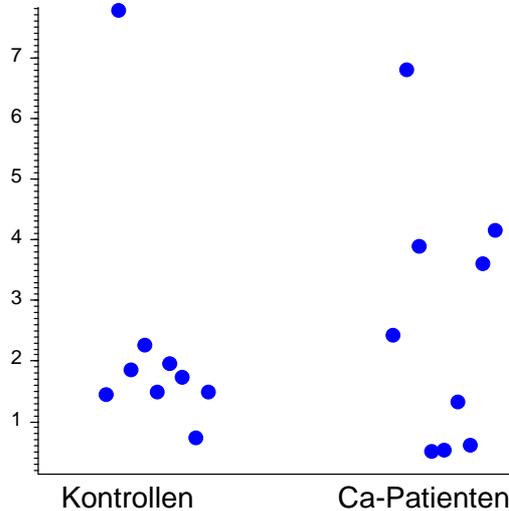


Abbildung 74 Prozentsatz der IgG-positiven, CD19+ B-Zellen in Prozent der $\lambda 3r+$ und CD19+ B-Zellen bei gesunden Kontrollen und bei Ca-Patienten. Jeder Punkt stellt den Wert einer Person dar.

3.11.2 Streuungsbreite der IgG-positiven B-Zellen

a)	Gruppe	n	MW	ST	b) p
Anteil der IgG+, CD19+ B-Zellen	Ca	9	30,2	16,2	0,0022**
	50er, 70er	9	23,3	8	
Anteil der IgG+ und $\lambda 3r+$, CD19+ B-Zellen	Ca	9	0,4	0,2	0,1
	50er, 70er	9	0,3	0,1	
IgG+, CD19+ B-Zellen in % der $\lambda 3r+$ und CD19+ B-Zellen	Ca	9	2,6	2,2	0,039*
	50er, 70er	9	2,3	2,1	

Tabelle 44 In a) IgG-positiv Subpopulationen in Prozent der CD19+ B-Zellen dargestellt als Mittelwert; Streuung der Werte bei Gesunden und Patienten im Vergleich;. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, In b) p aus dem Mood-Test.

Bei der Berechnung des Anteils der IgG+, CD19+ B-Zellen an den CD19+ B-Zellen fiel eine Neigung der Ca-Patienten zu Extremwerten auf. Die Varianzanalyse mit Hilfe des Mood-Tests ergab eine statistisch signifikant breitere Streuung der IgG-positiven, CD19+

B-Zellen als Anteil an den CD19+ B-Zellen bei den Ca-Patienten im Vergleich zu einer altersentsprechenden Gruppe aus Gesunden ($p=0,0022^{**}$, im Mood Test; **Tabelle 44, Abbildung 72**).

Die Subgruppe der IgG+, CD19+ B-Zellen an den $\lambda 3r$ -positiven und CD19+ B-Zellen wies ebenfalls eine signifikant größere Streuung der Werte bei den Ca-Patienten im Vergleich zu den Gesunden auf ($p=0,039^*$, im Mood-Test, **Tabelle 44, Abbildung 74**).

4 Diskussion

4.1 Frequenzanalyse CD19-positiver B-Zellen bei Probanden unterschiedlichen Alters

Ziel dieser Arbeit war es mittels moderner biologischer und molekularbiologischer Untersuchungsverfahren am Beispiel der lambda 3r-positiven CD19+B-Zellen die Frequenz und Subtypisierung der B-Zellen bei gesunden Probanden und Magenkarzinompatienten im Vergleich zu untersuchen. Durch die Wahl der Probandengruppen war weiterhin eine Beobachtung der immunologischen Alterung möglich.

Eine erste Hypothese ging dabei davon aus, dass es eine Seneszenz des Immunsystems, verbunden mit der Abnahme der CD19+B-Zellen gibt.

Diese Hypothese kann durch unsere Daten unterstützt werden und findet sich in der Literatur bestätigt, Ghia et al.⁴¹ etwa beschreiben eine Abnahme der naiven B-Zellen zu Gunsten der Memory-B-Zellen bei Abnahme der Gesamtzahl der CD19+B-Zellen. In der vorliegenden Arbeit findet sich eine Abnahme von ca. 600 CD19+B-Zellen/ μ l Blut bei Kindern auf etwa 240 Zellen/ μ l Blut bei den 70-jährigen Probanden (**Tabelle 11**). Relativ betrachtet entspricht dies etwa einer Halbierung des Anteils der CD19+B-Zellen an den Lymphozyten, von 23% auf 12% im Vergleich der zuvor genannten Gruppen (**Tabelle 11**).

Abgesehen von der Abnahme der Gesamtzellzahl kommt es im Kompartiment der B-Zellen zu weiteren Veränderungen im Laufe des Lebens, besonders im Hinblick auf die funktionellen Subgruppen.

Nennenswert ist dabei etwa die Entwicklung von naiven zu gereiften B-Zellen und den funktionellen Endzuständen in Form von Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen. Beim Neugeborenen liegen beispielsweise kaum antikörperproduzierende Plasmazellen oder Gedächtniszellen vor. Der Hauptbestandteil der B-Zellen zeigt ein naives Muster mit Expression von IgD und IgM auf der Oberfläche. Dies weist auf einen bisher fehlenden Antigenkontakt und fehlende Differenzierung hin. In unseren Untersuchungen waren 79% der CD19+B-Zellen bei Neugeborenen IgD-positiv (**Tabelle 13**), bei den 50ern und 70ern hingegen konnten nur Anteile von 59,9% und 63,1% dieser Zellen nachgewiesen werden (**Tabelle 13**). Im Umkehrschluss sind die CD27+ und CD19+Memory-B-Zellen bei Neugeborenen weniger häufig zu finden, diese machen nur etwa 4,3% des Gesamtpools der B-

Zellen aus. Bei 50- und 70-jährigen Probanden hingegen stellen sie einen Anteil von 23,3% bzw. 26,7% am B-Zellpool (**Tabelle 17**).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei Betrachtung des B-Zellkompartiments (CD19+B-Zellen) im Laufe des Lebens eine Entwicklung von naiven B-Zellen hin zu spezialisierten, durch Erregerkontakt selektionierten, B-Zellen stattfindet. Die hier beobachteten Ergebnisse gehen konform mit den Ergebnissen vieler anderer Arbeitsgruppen wie etwa Ghia et al.⁴¹, Agematsu et al.⁸ oder Janeway et al.¹.

Die Rolle des Oberflächenmarkers CD5 zur Charakterisierung von B-Zellen wird in der Literatur diskutiert, es existieren mehrere Hypothesen zur Funktion und Genese CD5-positiver, CD19-positiver B-Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Marker CD5 auf seine Frequenz untersucht, da die initial isolierte, SC-1-Epitop tragende B-Zelle das Oberflächenmolekül CD5 aufwies. In der Literatur sind spärliche Daten zur Frequenz von CD5+, CD19+B-Zellen im Altersverlauf vorhanden^{50, 51}, die meisten Daten sind im Zusammenhang mit autoimmunologischen Phänomenen und einer dabei beobachteten Zunahme beschrieben^{17, 52-54}. Wir gingen als Hypothese von einer konstanten relativen Verteilung dieser Zellen in den unterschiedlichen Gruppen aus.

Als Ergebnis konnte analog zur allgemeinen B-Zellabnahme eine Abnahme mit dem Alter konstatiert werden. Die absolute Anzahl CD5-positiver, CD19-positiver B-Zellen fiel dabei von den Kindern bis zur Gruppe der 70er ab (87 Zellen/ μ l bei Kindern, 28 Zellen/ μ l bei 70ern, **Tabelle 15**). Dieser Abfall war statistisch signifikant ($p=0,0046$). Relativ gesehen zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil CD5-positiver, CD19+B-Zellen bei Neugeborenen und Kindern im Vergleich zu den anderen Altersklassen ($p<0,001$, **Tabelle 15**), bei Betrachtung der weiteren Altersstufen jedoch zeigte sich ein konstanter relativer Anteil von ca. 10% an den CD19+B-Zellen.

Das Oberflächenmolekül CD5 scheint daher besonders im unreifen Immunsystem vermehrt aufzutreten, was durch aktuelle Ergebnisse (Lee J. et al.⁵⁵) bestätigt wird, welche CD5 als Marker für pre-naive B-Zellen beschreiben. Auch die Einteilung in B-1-B-Zellen und B-2-B-Zellen wird in der Literatur durch einige Autoren beschrieben^{10, 11, 13}, weiterhin scheint das Auftreten von CD5 mit Autoimmunologischen Phänomenen zu korrelieren^{17, 52-54, 56, 57}.

Die weitestgehende Bestätigung der Literaturdaten bei Betrachtung der Frequenz von B-Zellen und deren Subgruppen in unseren Untersuchungen diente uns als interne Qualitätskontrolle der Messergebnisse und Färbemethoden. Auf Grund dieser haben wir Grund zu

der Annahme, dass die von uns neu beschriebenen Daten bei noch fehlender Vergleichbarkeit zu anderen Literaturquellen einen hohen Validitätsgrad erreichen.

4.2 Unterschiede in der Frequenz der Lymphozyten und CD19-positiven B-Zellen bei Probanden und Magenkarzinompatienten

Ausgehend von den Ergebnissen der B-Zellverteilung in den unterschiedlichen Altersgruppen der Probanden dieser Arbeit stellten wir mehrere Hypothesen zur Verteilung der Lymphozyten und der CD19-positiven B-Zellen bei Magenkarzinompatienten auf.

Bei deutlicher allgemeiner B-Zell-Altersdynamik postulierten wir, dass sich die Frequenzen der B-Zellen und deren Subgruppen analog zur altersentsprechenden Vergleichsgruppe aus 50-jährigen Probanden und 70-jährigen Probanden verändern würden.

Diese Hypothese musste im Falle der Lymphozyten verworfen werden, es zeigte sich bei gleicher Anzahl von Leukozyten pro μl Blut eine deutliche Abnahme der Lymphozytenzahl bei Magenkarzinompatienten im Vergleich zu altersäquivalenten Probanden (50er und 70er), der Unterschied war signifikant ($p=0,0039^{**}$, **Tabelle 9**). Der relative Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten sank bei Magenkarzinompatienten im Vergleich zu 50ern und 70ern im Median von etwa 20% und 24% auf etwa 13% bei Karzinompatienten (**Tabelle 8**, $p<0,001^{***}$ **Tabelle 9**).

Für die Verteilung der CD19-positiven B-Zellen erwarteten wir ebenfalls keinen Unterschied. Auch hier zeigten sich differente Ergebnisse.

Die absolute Zahl der CD19+B-Zellen etwa betrug bei Magenkarzinompatienten im Mittel 134 B-Zellen pro μl Blut und 373 B-Zellen pro μl Blut bei den 50-jährigen Probanden, beziehungsweise 243 B-Zellen pro μl Blut bei den 70ern. Prozentual bedeutet dies eine Frequenz von 11% bei den Karzinompatienten versus 20,1% und 12,3% CD19+B-Zellen an den Lymphozyten bei 50ern und 70ern (**Tabelle 11**). Die Abnahme in der relativen und absoluten Frequenz war signifikant ($p=0,0012^{**}$ und $p=0,024^*$, **Tabelle 12**).

Zusammenfassend kann man von einer globalen Reduktion im Kompartiment der Lymphozyten und CD19+B-Zellen ausgehen, welche mit dem Auftreten des Magenkarzinoms assoziiert zu sein scheint, da artifizielle Ursachen wie eine vorhergehende Chemotherapie als Grund für einen Zellmangel durch die Entnahme der Proben bei der Erstdiagnostik

lung ausgeschlossen werden konnten. In der Literatur finden sich aber ebenfalls Hinweise, dass das Auftreten eines Tumors mit einer Reduktion des B-Zellkompartiments einhergeht. Bugrov et al beschrieben 2008 ein ähnliches Phänomen ebenfalls bei Auftreten eines Magenkarzinoms⁵⁸. Eine kausale Zuordnung ist dennoch im Rahmen dieses Untersuchungssettings nicht möglich.

4.3 Die Bedeutung von lambda 3r beim Magenkarzinom

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe eines Maus-anti-human-Antikörpers potentielle tumorreaktive B-Zellen mit dem Oberflächenmolekül SC-1 weiter zu charakterisieren. Im Vorfeld der Untersuchungen konnte in einem weiteren Projekt unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der zur Frequenzmessung verwendete, putative anti-SC-1-Idiotyp-Antikörper als Bindungsmolekül mit einer Spezifität von etwa 88% die lambda-Leichtkette 3r von B-Zellen erkennt (**Abbildung 2**, Richl et al.⁴⁰). Aus formalen Gründen wurden daher in der vorliegenden Arbeit alle untersuchten B-Zellen, welche von diesem Antikörper erkannt wurden als lambda3r-positiv bezeichnet und nicht als SC-1-Epitop tragend charakterisiert. Eine direkte Tumoraktivität kann daher nicht gefolgert werden, trotzdem konnte ihnen eine besondere Bedeutung im Zusammenhang mit dem Auftreten eines Magenkarzinoms nachgewiesen werden.

Hier zeigte sich zum Ersten nach Einzelzellsortierung und Sequenzierung des Immunglobulins in einem geringen Prozentsatz doch eine molekulare Identität dieser Zellen mit der erstbeschriebenen SC-1-B-Zelle (klonale Identität der leichten und schweren Ig-Kette, Richl et al.⁴⁰).

Weiterhin konnte bisher in der Literatur keine besondere Assoziation der Expression von lambda3r-Leichtketten und einer angeborenen Tumormunität gefunden werden, die Verwendung dieser Leichtkette ist lediglich als normalverteilt im Rahmen des normalen B-Zellrepertoires beschrieben⁵⁹. An Hand unserer Daten jedoch können wir folgern, dass bei Auftreten eines Magenkarzinoms eine Zunahme lambda3r-positiver B-Zellen festzustellen ist (bei Suppression aller anderen B-Zellsubtypen und den hier untersuchten Patienten, **Tabelle 19**, **Tabelle 20**). Die Expansion dieser B-Zellen scheint darüberhinaus einige Besonderheiten beim Karzinompatienten im Vergleich zu den Probanden mit sich zu bringen. Diese werden im Folgenden weiter erläutert werden und liefern weitere wichtige

Hinweise auf die besondere Stellung des Epitops der Leichtkette lambda3r bei Magenkarzinompatienten.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass lambda3r als Marker im Rahmen der natürlichen B-Zell-Immunreaktion mit der Präsenz von Magenkarzinomen vergesellschaftet ist. Daher erscheint eine weitere Subtypisierung und Frequenzanalyse dieser B-Zellen vielversprechend für die Erforschung der „natürlichen“ Tumormunität.

4.4 Verteilung und Häufigkeit der lambda 3r positiven B-Zellen in den Gruppen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Blut von Probanden und Magenkarzinompatienten auf das Vorkommen von lambda 3r-positiven CD19+B-Zellen, die mutmaßlich, ähnlich wie SC-1-Epitop tragende B-Zellen, tumorassoziiert sind, untersucht.

Für das Vorkommen dieser Zellen postulierten wir eine Analogie zum generellen Alterstrend der B-Zellen mit einer relativen und absoluten Abnahme dieser im Laufe des Lebens.

Diese These konnte bei den Probanden angenommen werden, da hier die relative Häufigkeit der lambda 3r-positiven, CD19+B-Zellen einen signifikant ansteigenden Anteil von den Neugeborenen über die Kinder bis hin zu den 30ern aufwies (**Tabelle 19**). Die 50er und 70er hingegen wiesen wieder einen signifikant verringerten Anteil dieser Zellen an den CD19+B-Zellen auf (**Tabelle 19**, **Tabelle 20**), analog zur Verteilung der CD19-positiven B-Zellen im Allgemeinen.

Den Daten in der Literatur^{14, 41, 45, 50, 58} und unseren eigenen Ergebnissen folgend, erwarteten wir daher bei Betrachtung der lambda 3r-positiven, CD19+B-Zellen bei den Magenkarzinompatienten eine weitere Abnahme dieser Zellen im Vergleich zu den altersentsprechenden Probanden.

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten B-Zellsubtypen, die bei Magenkarzinompatienten im Vergleich zur altersentsprechenden Kohorte der 50er und 70er immer erniedrigt waren, zeigte sich diesmal jedoch eine signifikante Expansion der lambda3r-positiven CD19+B-Zellfraktion. Der Mittelwert war mit 9% (versus 4,2% und 4,6% bei den 50ern und 70ern, **Tabelle 19**) auch im Vergleich mit den 30ern (7,5%), welche den Maximalwert

der gesunden Probanden an lambda 3r-positiven CD19+B-Zellen aufwiesen, signifikant erhöht (**Tabelle 20**).

Dies bedeutet, dass das Auftreten eines Magenkarzinoms die relative Zunahme einer Subgruppe von lambda 3r-Leichtkette tragenden, CD19+B-Zellen spezifisch begünstigt, was im starken Gegensatz zu den restlichen B-Zellpopulationen steht, die durch das Auftreten eines Tumors deutlich supprimiert erscheinen⁵⁸.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich lambda3r-positive, CD19+B-Zellen entgegen der Immunseneszenz und gegen eine scheinbar tumorassoziierte B-Zellsuppression durchsetzen und eine Expansion erfahren, die am ehesten polykonal ist. Dies konnte in einer bisher nicht veröffentlichten Arbeit von Richl et al gezeigt werden. Hier fand sich neben einigen SC-1-identischen B-Zellen auch die Verwendung anderer schwerer Ketten in Zusammenhang mit der Expression der leichten Kette lambda3r auf den analog zu dieser Arbeit sortierten B-Zellen.

4.5 Subtypisierung der lambda 3r-positiven CD19+B-Zellen bei Probanden und Magenkarzinompatienten

Die Subtypisierung der λ 3r-positiven B-Zellen (CD19+) mittels Kombination von Oberflächenmarkern in der FACS-Analyse ermöglicht eine Zuordnung dieser Zellen zu bestimmten Funktionskompartimenten der B-Zellen.

Ausgehend von der Hypothese, dass lambda3r-positive, CD19+B-Zellen, ähnlich wie die erstbeschriebenen SC-1-Epitop tragenden B-Zellen dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen sind, erwarteten wir die Koexpression von IgD als Marker für naive B-Zellen bei Probanden und Magenkarzinompatienten gleichermaßen.

Dies konnte insofern bestätigt werden, als sich die Frequenzen der IgD+ λ 3r+ CD19+B-Zellen zwischen Probanden und Magenkarzinompatienten gleichen Alters nicht unterschieden (**Tabelle 25, Tabelle 26**, $p > 0,05$, **Abbildung 40**), jedoch konnte zusätzlich hierzu bei Magenkarzinompatienten ein hochsignifikant erhöhter Anteil IgD-negativer, lambda3r-positiver, CD19+B-Zellen im Vergleich zur Kohorte der 50er und 70er gefunden werden ($p = 0,00047^{***}$, **Tabelle 28, Tabelle 29**). Insgesamt ergibt dies einen erhöhten Gesamtanteil lambda3r-positiver, CD19+B-Zellen bei den Patienten. Unterstützt wird diese

Beobachtung durch die signifikante Zunahme der CD27+, lambda3r-positiven, CD19+Memory-B-Zellen (**Tabelle 25**, **Tabelle 26**, $p=0,014^*$, **Abbildung 43**).

Ausgehend von einer Grundmenge naiver lambda3r-positiver, CD19+B-Zellen des angeborenen Immunsystems scheint es bei Auftreten eines Magenkarzinoms unter Beibehaltung dieser, zu einer am ehesten polyklonalen Vermehrung lambda3r tragender B-Zellen mit Affinitätsreifungszeichen (Verlust des Epitops IgD und vermehrte Expression von CD27) bei Karzinompatienten zu kommen. Der Nachweis eines Immunglobulinklassenwechsels war im Rahmen des initialen Versuchsaufbaus nicht möglich, weshalb eine kleine separat durchgeführte Messreihe ergänzt wurde. Hier zeigte sich ein auf Grund einer hohen Streubreite und kleiner Probenanzahl nicht signifikanter, aber eindeutiger Trend für einen Klassenwechsel mit Expression des Immunglobulins IgG (**Tabelle 43**, **Abbildung 71**) bei Magenkarzinompatienten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit Hinweise auf eine fakultative Reifung von B-Zellen des angeborenen Immunsystems bei Auftreten eines Karzinoms. Dies steht im Gegensatz zu den Thesen der vorangehenden Arbeiten von Vollmers et al. und Brändlein et al.^{19, 30-32, 35-37, 39, 60-62}, SC-1-Epitop-positiv B-Zellen wurden dabei als B1-B-Zellen des angeborenen Immunsystems beschrieben. Diese wurden als eigene Entität mit Ursprung im Peritoneum angesehen, eine Möglichkeit zur Affinitätsreifung wurde bisher nicht gesehen⁶³.

Im Rahmen weiterer Arbeiten konnte eine weitere Hypothese zur Entstehung von B1-B-Zellen formuliert werden, die besagt, dass durch geeignete Stimuli ein Übergang zwischen B1-B-Zellen (peritoneale B-Zellen mit naive Charakter ohne somatische Mutationen) und klassischen B-2-B-Zellen (affinitätsgereifte B-Zellen, durch Antigenkontakt gereift) möglich ist. Dies wurde bereits in mehreren Arbeiten und Reviews diskutiert, eine abschließende Bewertung zur Richtigkeit einer der beiden Hypothesen ist derzeit nicht in Sicht, sodass beide nebeneinander Bestand haben^{10, 11, 13}.

In der vorliegenden Arbeit wird die Differenzierungs-Hypothese am Beispiel lambda3r-positiver, CD19+B-Zellen unterstützt, da diese sowohl Eigenschaften der angeborenen Immunität mit einer potentiellen Surveillancefunktion bei Gesunden zeigen, als auch eine Affinitätsreifung bei Auftreten eines Magenkarzinoms durchmachen.

5 Zusammenfassung

Ausgehend von einer potentiell anti-Tumor-aktiven B-Zellen des menschlichen Immunsystem haben sich durch die Untersuchung des peripheren Blutes auf das Vorliegen von lambda3r-positiven, CD19+B-Zellen bei Magenkarzinompatienten und Probanden unterschiedlichen Alters einige sehr interessante Ergebnisse im Bereich der B-Zellimmunität ergeben.

Es scheint dabei eine Art B-Zell-Immunosurveillance in Form dieser B-Zellen, sowohl bei Karzinompatienten, als auch bei Gesunden von früher Kindheit an zu geben. Die relative Verteilung dieser Zellen ändert sich dabei im Laufe des Lebens entsprechend den Veränderungen des gesamten B-Zellkompartiments. Es findet eine Abnahme mit dem Alter statt. Im Falle des Auftretens eines Magenkarzinoms kommt es dann zu einer relativen Expansion der in dieser Arbeit beschriebenen lambda3r-positiven CD19+B-Zellen trotz einer gleichzeitig stattfindenden bisher nicht erklärlichen Involution des restlichen B-Zellsystems. Bei der relativen Zunahme dieser Zellen handelt es sich um eine Art Boostierung. Das expandierte Zellkompartiment zeigt dabei Reifungstendenzen, sichtbar im Verlust des Oberflächenmoleküls IgD sowie der Expression von CD27 und IgG.

Ob den lambda3r-positiven CD19+B-Zellen dabei eine anti-Tumoraktivität zukommt, kann derzeit nicht abschließend beurteilt werden, eine enge Korrelation mit dem Auftreten des Karzinoms ist aber eindrucklich.

Dem Oberflächenmarker CD5 scheint im Gegensatz zur initialen Hypothese bei der Erstbeschreibung der SC-1-positiven B-Zelle keine zentrale Rolle zuzukommen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen viele interessante neue Fragen auf, die eine weitere Untersuchung erfordern. So könnte der hier verwendete anti-lambda3r-Antikörper eventuell als Screening-Antikörper dienen. Auch wäre es interessant die klinischen Verläufe der Patienten zu vergleichen, da es innerhalb der Gruppe der Magenkarzinompatienten einige Unterschiede in der Expressionsfrequenz von lambda3r, aber auch den Subtypen der lambda3r-positiven CD19+B-Zellen gab. Eine Korrelation der Überlebenskurven mit den erhobenen Ergebnissen wäre ebenfalls interessant.

6 Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Anikörper
Alex	Alexa Fluor 700®
APC	Allophycocyanin
CD	Cluster of differentiation
CDR	complementary determining regions
CH	konstanter Teil der schweren Kette
CL	konstanter Teil der leichten Kette
D	diversity-Segment des Immunglobulins
Et al.	Et alii
FACS	Durchflusszytometrie
Fitc	Fluorescein-Isothiocyant
Ig	Immunglobulin
JH	J-Segment der schweren Kette
κ	kappa-Genlokus der leichten Kette
λ	lambda-Genlokus der leichten Kette
n-Nukleotide	zufällig eingefügte Basenpaare
NSB	Nabelschnurblut
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RAG	recombination activating gene, Rekombinationsenzym
VH	variabler Teil der schweren Kette
VL	variabler Teil der leichten Kette
50er	Gruppe der ca. 50-jährigen Probanden
70er	Gruppe der ca. 70-jährigen Probanden

7 Literaturverzeichnis

1, 6-9, 12, 14-18, 20-22, 25, 27, 34, 35, 39, 41, 44, 46-48, 54, 57, 60, 64-85

1. Janeway, C. Immunobiology 5 : the immune system in health and disease (Garland Pub., New York, 2001).
2. Lai, Y. & Gallo, R. L. Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infect Disord Drug Targets* 8, 144-55 (2008).
3. Akira, S. & Sato, S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 35, 555-62 (2003).
4. Arancibia, S. A. et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 40, 97-112 (2007).
5. de Diego, J. L., Gerold, G. & Zychlinsky, A. Sensing, presenting, and regulating PAMPs. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 83-95 (2007).
6. Girschick, H. J., Grammer, A. C., Nanki, T., Mayo, M. & Lipsky, P. E. RAG1 and RAG2 expression by B cell subsets from human tonsil and peripheral blood. *J Immunol* 166, 377-86 (2001).
7. Girschick, H. J., Grammer, A. C., Nanki, T., Vazquez, E. & Lipsky, P. E. Expression of recombination activating genes 1 and 2 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 46, 1255-63 (2002).
8. Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H. & Komiyama, A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today* 21, 204-6 (2000).
9. Burrows, P. D. & Cooper, M. D. B-cell development in man. *Curr Opin Immunol* 5, 201-6 (1993).
10. Wortis, H. H. Origins of b1B-Cells. *J Immunol* (2001).
11. Su, I.-h. B1 Cells orthodox or conformist. *Curr Opin Immunol* (2000).
12. Martin, F. B1 cells similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol* (2001).
13. Rothstein, T. Two B1 or not to B One. *J Immunol* (2002).
14. Carsetti, R., Rosado, M. M. & Wardmann, H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197, 179-91 (2004).
15. Ghia, P., ten Boekel, E., Rolink, A. G. & Melchers, F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today* 19, 480-5 (1998).
16. Girschick, H. J. & Lipsky, P. E. The kappa gene repertoire of human neonatal B cells. *Mol Immunol* 38, 1113-27 (2002).
17. Morbach, H., Singh, S. K., Faber, C., Lipsky, P. E. & Girschick, H. J. Analysis of RAG expression by peripheral blood CD5+ and CD5- B cells of patients with childhood systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65, 482-7 (2006).
18. Grandien, A., Modigliani, Y., Freitas, A., Andersson, J. & Coutinho, A. Positive and negative selection of antibody repertoires during B-cell differentiation. *Immunol Rev* 137, 53-89 (1994).
19. Vollmers, H. P. & Brandlein, S. The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol Histopathol* 20, 927-37 (2005).
20. Hokibara, S., Agematsu, K. & Komiyama, A. B cell development and primary immunodeficiencies with hypogammaglobulinemia. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48, 267-71 (2000).
21. Agematsu, K. Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol* 15, 573-6 (2000).
22. Klein, U., Rajewsky, K. & Kuppers, R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188, 1679-89 (1998).

23. Shi, Y., Agematsu, K., Ochs, H. D. & Sugane, K. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin Immunol* 108, 128-37 (2003).
24. Mitre, E. & Nutman, T. B. IgE memory: persistence of antigen-specific IgE responses years after treatment of human filarial infections. *J Allergy Clin Immunol* 117, 939-45 (2006).
25. Melchers, F. et al. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 7, 214-27 (1995).
26. Pschyrembel, W. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch* (de Gruyter, Berlin, 2000).
27. Hurwitz, H. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-42 (2004).
28. Glennie, M. J., French, R. R., Cragg, M. S. & Taylor, R. P. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44, 3823-37 (2007).
29. Hirata, Y. et al. Rituximab for the treatment of CD20-positive peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Leuk Res* (2008).
30. Vollmers, H. P. & Brandlein, S. Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies. *Hum Antibodies* 11, 131-42 (2002).
31. Vollmers, H. P., O'Connor, R., Muller, J., Kirchner, T. & Muller-Hermelink, H. K. SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells. *Cancer Res* 49, 2471-6 (1989).
32. Vollmers, H. P. et al. Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results. *Oncol Rep* 5, 549-52 (1998).
33. Levy, M., Visokai, V., Lipska, L. & Topolcan, O. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma* 55, 138-42 (2008).
34. Hensel, F. et al. Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis. *Lab Invest* 81, 1553-63 (2001).
35. Illert, B. et al. Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. *Oncol Rep* 13, 765-70 (2005).
36. Vollmers, H. P. & Brandlein, S. Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 755-65 (2006).
37. Vollmers, H. P. et al. Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: a new therapeutical approach for stomach cancer. *Oncol Rep* 5, 35-40 (1998).
38. Vollmers, H. P. et al. [Adjuvant immunotherapy of stomach carcinoma with antibody-induced apoptosis]. *Zentralbl Chir* 125 Suppl 1, 37-40 (2000).
39. Brandlein, S. et al. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 63, 7995-8005 (2003).
40. Richl, P. Doktorarbeit.
41. Ghia, P., Melchers, F. & Rolink, A. G. Age-dependent changes in B lymphocyte development in man and mouse. *Exp Gerontol* 35, 159-65 (2000).
42. Shi, Y. et al. Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J Immunol* 175, 3262-7 (2005).
43. Richl, P., Stern, U., Lipsky, P. E. & Girschick, H. J. The lambda gene immunoglobulin repertoire of human neonatal B cells. *Mol Immunol* 45, 320-7 (2008).
44. Bohnhorst, J. O., Bjorgan, M. B., Thoen, J. E., Natvig, J. B. & Thompson, K. M. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol* 167, 3610-8 (2001).
45. Colonna-Romano, G. et al. B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mech Ageing Dev* 124, 389-93 (2003).

46. Ehlich, A. & Kuppers, R. Analysis of immunoglobulin gene rearrangements in single B cells. *Curr Opin Immunol* 7, 281-4 (1995).
47. Ehlich, A., Martin, V., Muller, W. & Rajewsky, K. Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol* 4, 573-83 (1994).
48. Gay, D., Saunders, T., Camper, S. & Weigert, M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 177, 999-1008 (1993).
49. Johnson, C. C. E. (Kinderklinik und Poliklinik der Universität Würzburg, Deutschland, 2004).
50. Erkeller-Yuksel, F. M. et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 120, 216-22 (1992).
51. Hannel, I., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V. & DeBruyere, M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* 13, 215, 218 (1992).
52. Calvert, J. E., Duggan-Keen, M. F., Smith, S. W., Givan, A. L. & Bird, P. The CD5⁺ B cell: a B cell lineage with a central role in autoimmune disease? *Autoimmunity* 1, 223-40 (1988).
53. Vernino, L. A., Pisetsky, D. S. & Lipsky, P. E. Analysis of the expression of CD5 by human B cells and correlation with functional activity. *Cell Immunol* 139, 185-97 (1992).
54. Pospisil, R. & Mage, R. G. CD5 and other superantigens as 'ticklers' of the B-cell receptor. *Immunol Today* 19, 106-8 (1998).
55. Lee, J., Kuchen, S., Fischer, R., Chang, S. & Lipsky, P. E. Identification and characterization of a human CD5⁺ pre-naïve B cell population. *J Immunol* 182, 4116-26 (2009).
56. Lydyard, P. M. et al. CD5⁺ B cells and the immune system. *Immunol Lett* 38, 159-66 (1993).
57. Morbach, H. Analysis of RAG expression by peripheral blood CD5⁺ and CD5⁻ B-Cells. *Ann. Rheum. Dis* (2005).
58. Bugrov, V. V., Absaliatova, O. V., Savkova, R. F. & Kozlova, N. M. [T-and B-cell immune response of lymph nodes and immunosuppression correlating with metastatic spread of stomach cancer]. *Vopr Onkol* 54, 216-9 (2008).
59. Farner, N. L., Dorner, T. & Lipsky, P. E. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. *J Immunol* 162, 2137-45 (1999).
60. Brandlein, S. & Vollmers, H. P. Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. *Histol Histopathol* 19, 897-905 (2004).
61. Vollmers, H. P. nature's best weapon to fight cancer revival of human monoclonal ab. *Hum Antibodies* (2002).
62. Vollmers, H. P. & Brandlein, S. Natural IgM antibodies: from parias to parvenus. *Histol Histopathol* 21, 1355-66 (2006).
63. Baumgarth, N., Tung, J. W. & Herzenberg, L. A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 26, 347-62 (2005).
64. Arce, E. et al. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 167, 2361-9 (2001).
65. Brandlein, S. et al. CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by the natural human monoclonal antibody PAM-1. *Oncol Rep* 11, 777-84 (2004).
66. Cambier, J. C. et al. The B-cell antigen receptor: structure and function of primary, secondary, tertiary and quaternary components. *Immunol Rev* 132, 85-106 (1993).
67. Casanova, J. L. & Abel, L. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. *J Exp Med* 202, 197-201 (2005).

68. Gaur, A., Yao, X. R. & Scott, D. W. B cell tolerance induction by cross-linking of membrane IgM, but not IgD, and synergy by cross-linking of both isotypes. *J Immunol* 150, 1663-9 (1993).
69. Hansen, A. et al. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 46, 2160-71 (2002).
70. Hillion, S., Rochas, C., Youinou, P. & Jamin, C. Expression and reexpression of recombination activating genes: relevance to the development of autoimmune states. *Ann N Y Acad Sci* 1050, 10-8 (2005).
71. Isaacs, J. D. et al. A therapeutic human IgG4 monoclonal antibody that depletes target cells in humans. *Clin Exp Immunol* 106, 427-33 (1996).
72. Krueztzmann, S. Human IgM memory B-Cells controlling Strep. pneumoniae. *J. Exp. Med* (2003).
73. MacLennan. The dynamic relationship between B-Cell populations in adults. *Immunol Today* (1993).
74. Lindesmith, L. et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9, 548-53 (2003).
75. m, m. Oral application of polysaccharides activates B-1 cells. (1994).
76. Market, E. VDJ Rekombination and the Evolution of the Adaptive immune system. *PLoS Biology*.
77. Meffre, E. Antibody regulation of B-Cell development. *Nature Immunol* (2000).
78. Melchers, F. Roles of IgH and L chains and of surrogate. *Annu Rev Immunol* (1994).
79. Milner, E. Human innate B-Cells a link between host defence and autoimmunity. *Immunopathology* (2004).
80. Odendahl, M. Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in SLE. *J Immunol* (2000).
81. Odendahl, M. Perturbation of peripheral B-Cell homeostasis in children with SLE. *Ann. Rheum. Dis* (2003).
82. P.Sims, G. Identification and Charakterisation of circulating human transitional B-Cells. *Blood First Edition Paper* (2005).
83. Pages, F. et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353, 2654-66 (2005).
84. Parmiani, G. Tumor-infiltrating T cells--friend or foe of neoplastic cells? *N Engl J Med* 353, 2640-1 (2005).
85. R, C. A role for Immunoglobulin D interference with tolerance induction. *Eur J Immunol* (1993).

8 Abbildungsverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abbildung 1 Entstehung eines Antikörpers	7
Abbildung 2 Leichtkettengenverteilung (V lambda)	12
Abbildung 3 Frühe Entwicklungsstadien der B-Zelle im Knochenmark	14
Abbildung 4 Beispiel eines FACS-Plots	25
Abbildung 5 Unterschiedliche Antikörper, Farbkopplungen und Messkanäle	30
Abbildung 6 Unterschiedliche Antikörper, Farbkopplungen und Messkanäle	31
Abbildung 7 Alter der Patienten- bzw. Probandengruppen	39
Abbildung 8 Gruppen und Lymphozytenzahl	42
Abbildung 9 Gruppen und prozentuale Lymphozytenzahl	42
Abbildung 10 Alter und Anteil der Lymphozyten in % der Leukozyten	43
Abbildung 11 Alter und Lymphozyten / μ l Blut	44
Abbildung 12 absolute CD19+ B-Zellzahl pro μ l Vollblut	47
Abbildung 13 Prozentuale CD19+B-Zellzahl	48
Abbildung 14 CD19+ B-Zellen in % der Lymphozyten	48
Abbildung 15 absolute Anzahl CD19+ B-Zellen / μ l Blut	49
Abbildung 16 absolute Anzahl der IgD+, CD19+ B-Zellen pro μ l Vollblut	52
Abbildung 18 Anzahl der IgD-positiven, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut	53
Abbildung 19 IgD-positive BZ an CD19+ B-Zellen	53
Abbildung 20 absolute Anzahl der CD5+ CD19+ B-Zellen pro μ l Vollblut	56
Abbildung 22 Anzahl der CD5-positiven, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut	57
Abbildung 23 CD5-positiv, CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen	57
Abbildung 24 absolute Anzahl der CD27+ CD19+ B-Zellen pro μ l Vollblut	60
Abbildung 25 Prozentualer Anteil der CD27-positiven CD19+ B-Zellen	60
Abbildung 26 Anzahl der CD27-positiven, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut	61
Abbildung 27 CD27-positiv, CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen	62
Abbildung 28 absolute Anzahl der λ 3r+, CD19+ B-Zellen pro μ l Vollblut	64
Abbildung 29 Prozentualer Anteil der λ 3r-positiven, CD19+ B-Zellen	65
Abbildung 30 Anzahl der λ 3r -positiven, CD19+ B-Zellen pro μ l Blut	65
Abbildung 31 λ 3r-positiv, CD19+ B-Zellen in Prozent der CD19+ B-Zellen	66
Abbildung 32 Prozentualer Anteil der IgD-positiven lambda 3r+ CD19+ B-Zellen	69
Abbildung 33. Prozentualer Anteil der CD5-positiven B-Zellen	69
Abbildung 34 Prozentualer Anteil der CD27-positiven CD19+ B-Zellen	70
Abbildung 35 IgD-positiv, CD19+ B-Zellen in Prozent der λ 3r+, CD19+B-Zellen	70
Abbildung 36 CD5-positiv, CD19+ B-Zellen in Prozent der λ 3r+, CD19+B-Zellen	71
Abbildung 37 CD27-positiv, CD19+ B-Zellen in Prozent der λ 3r+, CD19+B-Zellen	71
Abbildung 38 Prozentualer Anteil der IgD+ und CD5+ CD19+ B-Zellen	78
Abbildung 39 Prozentualer Anteil der IgD+ und CD27+ CD19+ B-Zellen	78
Abbildung 40 Prozentualer Anteil der IgD+ und λ 3r+ CD19+ B-Zellen	79
Abbildung 41 Prozentualer Anteil der CD5+ und CD27+ CD19+ B-Zellen	79
Abbildung 42 Prozentualer Anteil der CD5+ und λ 3r+ CD19+ B-Zellen	80
Abbildung 43 Prozentualer Anteil der CD27+ und λ 3r+ CD19+ B-Zellen	80
Abbildung 44 IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	81
Abbildung 45 IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	82
Abbildung 46 IgD+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	82
Abbildung 47 CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	83
Abbildung 48 CD5+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	83
Abbildung 49 CD27+ und λ 3r+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	84

Abbildung 50 Prozentualer Anteil der IgD-negativen $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen	86
Abbildung 51 Prozentualer Anteil der IgD-negativen, $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen	86
Abbildung 52 Prozentualer Anteil IgD-negativer und $\lambda 3r$ -positiver, CD19+ B-Zellen	87
Abbildung 53 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz	90
Abbildung 54 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz	91
Abbildung 55 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz	92
Abbildung 56 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz	93
Abbildung 57 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz	94
Abbildung 58 Vergleich der erwarteten mit der beobachteten Expressionsfrequenz	95
Abbildung 59 Anzahl der IgD+ und CD5-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut	100
Abbildung 60 Anzahl der IgD+ und CD27-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut	100
Abbildung 61 Anzahl der IgD+ und $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut	101
Abbildung 62 Anzahl der CD5+ und CD27-positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut	101
Abbildung 63 Anzahl der CD5+ und $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut	102
Abbildung 64 Anzahl der CD27+ und $\lambda 3r$ -positiven, CD19+ B-Zellen / μ l Vollblut	102
Abbildung 65 IgD+ und CD5+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	104
Abbildung 66 IgD+ und CD27+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	104
Abbildung 67 IgD+ und $\lambda 3r$ +, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	105
Abbildung 68 CD5+ und CD27+, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	105
Abbildung 69 CD5+ und $\lambda 3r$ +, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	106
Abbildung 70 CD27+ und $\lambda 3r$ +, CD19+ B-Zellen; altersbezogene Darstellung	106
Abbildung 71 Verteilung der IgG+ CD19+ B-Zellen	113
Abbildung 72 Prozentsatz der IgG-positiven, CD19+ B-Zellen	114
Abbildung 73 Prozentsatz der IgG-positiven und $\lambda 3r$ +, CD19+ B-Zellen	114
Abbildung 74 Prozentsatz der IgG-positiven, CD19+ B-Zellen	115

8.2 Tabellen

Tabelle 1. Untersuchte Patienten- und Probandengruppen	19
Tabelle 2 Färbe- und Waschschrte	25
Tabelle 3 Antikörper, Hersteller, Farbstoffe, Isotypen	35
Tabelle 4 Isotypen der Antikörper	35
Tabelle 5 Materialien, Geräte und Hersteller, Adressen	36
Tabelle 6 Anzahl der untersuchten Proben pro Gruppe	37
Tabelle 7 Gruppen, Anzahl der Proben, Alter und Geschlecht	38
Tabelle 8 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl Blutbild	40
Tabelle 9 p der Blutbildwerte	41
Tabelle 10 Alter und Blutbild, Alterskorrelation	43
Tabelle 11 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl, CD19+B-Zellen	46
Tabelle 12 p der CD19+B-Zellen	46
Tabelle 13 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl, IgD+B-Zellen	50
Tabelle 14 p der IgD+B-Zellen	51
Tabelle 15 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl, CD5+B-Zellen	54
Tabelle 16 p der CD5+B-Zellen	55
Tabelle 17 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl, CD27+B-Zellen	58
Tabelle 18 p der CD27+B-Zellen	59
Tabelle 19 Gruppen und absolute sowie relative B-Zellenzahl, lambda 3r+B-Zellen	63

Tabelle 20	p der lambda 3r+B-Zellen	63
Tabelle 21	Gruppen und relative Anzahl an Markerpaar-positiven B-Zellen	67
Tabelle 22	p der Markerpaar-positiven B-Zellen	68
Tabelle 23	Altersnormierung	73
Tabelle 24	Markerpaarverteilung	74
Tabelle 25	Markerpaare in den einzelnen Gruppen	76
Tabelle 26	p der Markerpaare in den einzelnen Gruppen	77
Tabelle 27	Alter und prozentualer Anteil der Markerpaare	81
Tabelle 28	Gruppen und relative B-Zellenzahl, IgD-B-Zellen	85
Tabelle 29	p der IgD-B-Zellen	85
Tabelle 30	Beobachtete und statistisch erwartete Expressionsfrequenz der Markerpaare	89
Tabelle 31	Gruppen und Abweichung von der erwarteten Frequenz	96
Tabelle 32	Anzahl der CD19+B-Zellen mit den genannten beiden Markern absolut	97
Tabelle 33	Gruppen und absolute B-Zellenzahl der Markerpaare	98
Tabelle 34	p der Gruppen und absolute B-Zellenzahl der Markerpaare	99
Tabelle 35	Korrelation der Anzahl der CD19+B-Zellen mit den Markern	103
Tabelle 36	Altersbezogene Absolutwerte der Marker-Paar-positiven B-Zellen	107
Tabelle 37	Prognostische Variablen	108
Tabelle 38	Prognostische Variablen	109
Tabelle 39	Prognostische Variablen	109
Tabelle 40	Prognostische Variablen Endgültiges Ergebnis	110
Tabelle 41	Prognostische Variable	111
Tabelle 42	Prognostische Variable Ergebnis	111
Tabelle 43	Verteilung der IgG+B-Zellen	112
Tabelle 44	Streubreite der IgG+B-Zellen	115

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Girschick, im Labor vielen und auch mir besser bekannt unter seinem Vornamen, für eine immer engagierte und freundschaftliche Betreuung der Doktorarbeit, egal zu welcher Tages- und Nachtzeit (Feiertage inbegriffen)!

Die wissenschaftlichen Impulse und klinischen Ausflüge in die Kinderheilkunde und besonders die Kinderrheumatologie habe ich immer sehr zu schätzen gewusst!

Einem immer fröhlichen Laborteam mit Barbara, Brigitte, Gaby, Tina, Traudl, Ulrike und allen meinen Mitstreitern ein besonderer Dank für die Arbeitsatmosphäre, ich habe mich stets wohlgefühlt bei euch. Die Zuverlässigkeit der Arbeit sei natürlich ebenfalls gerühmt!

Dir lieber Henner verdanke ich die Analen der FACS-Analyse, mit deiner immer hilfsbereiten und zuvorkommenden Art hast du mir gern über die anfänglichen Zweifel hinweggeholfen und hast mich motiviert die B-Zellforschung als „zentralen Punkt der Wissenschaft“ anzuerkennen.

An Petra, die mich im Bereich der Molekularbiologie auf das Leben als Mediziner vorbereitet hat und die Chancen und Grenzen der PCR ausgelotet hat, vielen Dank für die vielen Impulse und persönlichen Gespräche.

Last but not least meinen Freunden und meiner Familie, die mich immer unterstützt haben und auf vieles während dieser Zeit verzichten mussten.

Vielen Dank!

