

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*UNTERSUCHUNG DER FRÜHEN IMMUNANTWORT NACH
HEPATITIS-B-IMPfung*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulf Leisner

2016

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*UNTERSUCHUNG DER FRÜHEN IMMUNANTWORT NACH
HEPATITIS-B-IMPfung*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulf Leisner

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Jilg

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Michael Reng

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2017

I	INHALTSVERZEICHNIS	1
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	2
III	TABELLENVERZEICHNIS	3
1	EINLEITUNG	4
2	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	MATERIAL	7
2.1.1	PROBANDENKOLLEKTIVE	7
2.1.2	ANTIKÖRPER	9
2.1.3	ZELLKULTURMEDIEN	9
2.2	METHODEN	10
2.2.1	STUDIENDURCHFÜHRUNG	10
2.2.2	ZELLKULTURTECHNIKEN	10
2.2.3	IMMUNOLOGISCHE NACHWEISMETHODEN	11
2.2.4	METHODIK DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG	14
3	ERGEBNISSE	16
3.1	VORSTUDIE: ZELLULÄRE ANTWORT NACH HBV-BOOSTERIMPFUNG	16
3.1.1	HUMORALE ANTWORT NACH HBV-BOOSTERIMPFUNG	16
3.1.2	BESTIMMUNG DER HBSAG SPEZIFISCHEN ZYTOKINPRODUZIERENDEN PBMCs NACH BOOSTERIMPFUNG	18
3.2	IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FRÜHEN ZELLULÄREN IMMUNANTWORT NACH ERSTMALIGER HBV-IMPFUNG	24
3.2.1	HUMORALE ANTWORT NACH HBV-IMPFUNG	24
3.2.2	CHARAKTERISIERUNG HBSAG-SPEZIFISCHER PBMC ANHAND IHRER ZYTOKINSEKRETION	28
3.2.3	HINTERGRUNDAKTIVITÄT UND ÜBERSCHIEßENDE NEGATIVKONTROLLEN	49
4	DISKUSSION	51
4.1	DER ELISPOT ASSAY ALS GEEIGNETE METHODIK ZUM NACHWEIS EINER FRÜHEN ZELLULÄREN IMMUNANTWORT NACH HBV-IMPFUNG	51
4.2	ÜBERSCHIEßENDE NEGATIVKONTROLLEN	54
4.3	FRÜHE ZYTOKINSEKRETION MÖGLICHER WEISE ALS AUSDRUCK DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS?	55
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	ANHANG	60
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
	DANKSAGUNG	82
	LEBENS LAUF	83

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

2.1.	PROGRAMMIERCODE ZUR STATISTISCHEN AUSWERTUNG IN ‚R‘	15
3.1.	ZEITLICHER VERLAUF VON ANTI-HBs NACH BOOSTERIMPFUNG	17
3.2-3.6	SPEZIFISCHE ZELLULÄRE ANTWORT NACH HBSAG-STIMULATION VON PBMC IM ELISPOT NACH HBV-BOOSTERIMPFUNG (VORSTUDIE: SPENDER B1-5)	19
3.7	ZEITLICHER VERLAUF DER ANTI-HBs-TITER BEI GRUNDIMMUNISIERUNG	26
3.8-3.23	SPEZIFISCHE ZELLULÄRE ANTWORT NACH HBSAG-STIMULATION VON PBMC IM ELISPOT NACH HBV-ERSTIMPFUNG (STUDIE: SPENDER 1-16)	29
3.24	SUMME DER ERSTNACHWEISE EINER ZELLULÄREN IMMUNANTWORT	45
3.25-3.26	ERSTNACHWEIS EINER SPEZIFISCHEN ZELLULÄREN ANTWORT IM ZEITLICHEN BEZUG ZUM AUFTRETEN EINER ERSTEN HUMORALEN ANTWORT	48
3.27	ZEITLICHE ENTWICKLUNG DER ZELLULÄREN UND HUMORALEN IMMUNANTWORT	50
4.1	GRAPHISCHE LITERATURÜBERSICHT	52

TABELLENVERZEICHNIS

2.1	CHARAKTERISTIKA DER STUDIENGRUPPE	8
2.2.	CHARAKTERISTIKA DER VORSTUDIENGRUPPE	8
2.3.	IM ELISPOT EINGESETZTE ANTIKÖRPER	9
3.1	ZEITLICHER VERLAUF DER ANTI-HBs-TITER NACH BOOSTERIMPFUNG	17
3.2	ANTI-HBs-TITER DER STUDIENGRUPPE	27
3.3.	STATISTISCH SIGNIFIKANTE NACHWEISE VON IFN γ UND IL2 NACH PRIMÄRER IMMUNISIERUNG	45

1 Einleitung

Die Hepatitis B als eine hepatotrope Erkrankung verbleibt auch im 21. Jahrhundert eine der großen Herausforderungen der Menschheit. Erstmals wurde die Erkrankung vor 125 Jahren von Lürmann beschrieben, als diese im Rahmen einer Pockenimpfung als Epidemie auftrat. Nach Schätzungen der WHO haben sich 2 Milliarden Menschen mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert. Hiervon sind 350 Millionen Menschen chronisch infiziert (1,2). Die weltweite Prävalenz der chronischen Virusträger lässt sich in Gruppen gliedern: Prävalenz $\geq 8\%$ in Zentralafrika und China, 2-7% im mittleren Orient, Nordafrika und Ost-/ Südeuropa, sowie $< 2\%$ in den übrigen Regionen (2).

Jährlich sterben etwa 600.000 Menschen an den Folgen der chronischen Verlaufsform oder an einer akuten Hepatitis B. Somit lässt sich weltweit jede dritte Leberzirrhose und jeder zweite maligne Leberzelltumor als eine Folge des Hepatitis-B-Virus (HBV) werten (3).

Besonders tragisch erscheint die Rolle der frühkindlichen Infektionen, da jedes 4. unmittelbar nach Geburt infizierte Kind in Folge der HBV-Infektion an einer Leberzirrhose oder einem Leberzellkarzinom verstirbt (2). Grundsätzlich gilt bezüglich kindlicher Infektionen: je früher der Zeitpunkt der Übertragung, umso höher ist das Risiko eine chronische Hepatitis B zu entwickeln. Diese sogenannte vertikale Transmission ist als ein Circulus vitiosus anzusehen: Chronisch infizierte Schwangere geben das Virus nur extrem selten intrauterin weiter. Erst durch das Geburtstrauma wird das HBV auf das Neugeborene übertragen. Das Neugeborene wird mit einer Wahrscheinlichkeit von $> 90\%$ zum chronischen Virusträger. In Hochendemiegebieten bilden dementsprechend Neugeborene das Reservoir des HBV für die Folgegeneration. Letztlich werden die chronisch erkrankten Töchter wieder selbst zu chronisch infizierten Müttern und infizieren so die Folgegeneration. Erschwerend kommt hinzu, dass chronisch Infizierte häufig symptomarm bis symptomlos sind. Dass diese Personen potentiell ansteckend sind, ist ihnen häufig nicht bewusst.

Die sogenannte horizontale Transmission hingegen, d.h. eine Ansteckung innerhalb einer Generation, führt meist nicht zu einer chronischen Hepatitis B. Ihre Chronifizierungsrate ist altersabhängig: bei Ein- bis Vierjährigen verlaufen noch etwa

30% aller Infektionen chronisch, während bei älteren Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen nur noch weniger als 5% aller Infektionen chronifizieren (4). Die horizontale Transmission führt häufig zu einer akuten Hepatitis B, welche meist folgenlos ausheilt und eine lebenslange Immunität hinterlässt (5). In ca. 0,1-1% der Fälle nimmt die akute Hepatitis B allerdings einen fulminanten Verlauf und führt bis zum Leberversagen und somit zum Tod (2).

Einem wirksamen Hepatitis-B-Impfstoff kam daher besondere Bedeutung zu. Im Jahr 1982 konnte der erste Hepatitis-B-Impfstoff zugelassen werden und im Jahre 1986 wurde ein rekombinanter Impfstoff -der Erste seiner Art- eingeführt.

Insbesondere die Impfung von Neugeborenen hat sich als besonders effektiv gezeigt. Durch die Immunisierung der Neugeborenen kann der *circulus vitiosus* der vertikalen Transmission durchbrochen werden. Hierdurch ist auf lange Sicht ein Rückgang der chronischen Virusträger und der Folgeerkrankungen zu erwarten.

Beispiel Süd-Korea: In den 1980-iger Jahren lag die HBV-Prävalenzrate in Süd-Korea bei fast 8%. 1988 wurde eine Aktiv-/ Passivimmunisierung aller Neugeborenen von HBsAg-positiven Müttern eingeführt. Daraufhin konnte bis 1993 die Prävalenzrate bei Kindern <10 Jahre auf 0,6%, die von Jugendlichen auf 1,6% und die von Erwachsenen zu Beginn des dritten Lebensjahrzehnts auf 3% gesenkt werden. Eine nennenswerte Veränderung konnte bei Erwachsenen, die das 20. Lebensjahr deutlich überschritten hatten, zunächst nicht festgestellt werden (6). 2006 konnte zuletzt bei Schulkindern bei einer Durchimpfungsrate von 95% eine Prävalenzrate von <1% verzeichnet werden (7).

Des Weiteren gilt es die Hepatitis B aus sozioökonomischer Sicht zu betrachten. Zur Therapie der chronischen Hepatitis B bedarf es einer gesonderten Expertise und medizinischen Infrastruktur. Dies betrifft insbesondere auch die Folgeerkrankungen: die Leberzirrhose und das Leberzellkarzinom. Genau dieses Fachwissen ist in vielen Teilen der Welt nicht vorhanden. Selbst in der westlichen Welt (z.B. USA oder Europa) kann ein mangelndes Wissen bezüglich der Interpretation von diagnostischen Ergebnissen und der differenzierten Therapie beobachtet werden (8). Diese Infrastrukturen zu schaffen ist kostenintensiv. Impfkampagnen, die eine hohe Durchimpfungsrate zum Ziel haben, zeigten sich als kosteneffektiv (9-11). Es muss nicht erwähnt werden, dass durch Impfkampagnen auch das Leid der Menschen bekämpft wird.

Die ersten erfolgreichen Versuche, eine Übertragung einer Hepatitis B von der (meist) chronisch infizierten Mutter auf das Neugeborene zu verhindern, wurden von Beasley und Mitarbeitern mittels Hepatitis-B-Immunglobulin vorgenommen (12).

Nach Einführung des Hepatitis-B-Impfstoffs wurde die aktiv-passive Postexpositionsprophylaxe etabliert, d.h. die sofortige postpartale aktive Impfung in Kombination mit einer ebenfalls unmittelbar nach Geburt vorgenommenen Immunglobulingabe. Man nahm an, dass die Infektion durch die Gabe des Immunglobulinpräparates verhindert wurde und die aktive Impfung eine bleibende Immunität erzeugte, die auch nach dem Verschwinden der übertragenen Antikörper eine spätere Infektion unterband. Spätere Studien konnten nun allerdings zeigen, dass auch die aktive Impfung allein sofort nach Geburt eine Infektion bzw. Chronifizierung unterbinden konnte (13). Ähnliches sah man nach einer alleinigen postexpositionellen aktiven Impfung nach Kontakt mit HBV durch eine Nadelstichverletzung (14,15). In beiden Fällen konnten nicht die Antikörper die Infektion verhindert haben, denn die Antikörperproduktion nach der aktiven Impfung kann in den meisten Fällen erst nach etlichen Tagen bzw. Wochen nachgewiesen werden. Hier tauchte nun die Frage auf, ob nicht eventuell frühe zelluläre Immunphänomene an der Unterdrückung der Infektion beteiligt sein könnten. Versuche in humanisierten transgenen Mäusen ließen darauf schließen, dass auch impfinduzierte T-Helferzellen die Virusreplikation – und damit das Fortschreiten der Infektion – verhindern können (16). Bis heute gibt es allerdings nur wenige Hinweise darauf, wann nach einer Impfung diese Zellen gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, wie schnell im Laufe einer Grundimmunisierung gegen Hepatitis B eine HBsAg-spezifische zelluläre Immunantwort auftritt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probandenkollektive

Die Teilnehmer dieser Studie waren freiwillige und gesunde Personen im Alter von 21 – 56 Jahren. Die Studienteilnehmer, die eine HBV-Grundimmunisierung erhielten (Tabelle 2.1), hatten anamnestisch keine HBV-Infektion durchgemacht. HBsAg und Anti-HBc konnten bei diesen Probanden nicht nachgewiesen werden.

Die Studienteilnehmer, die eine Boosterimpfung erhielten (Tabelle 2.2), hatten vor länger als zehn Jahren zuletzt eine HBV-Impfung erhalten.

Von allen Probanden wurde vor Studienteilnahme eine schriftliche Einwilligungserklärung für die Teilnahme eingeholt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt.

Impfstoff

Für die Durchführung der Studie wurde ausschließlich ein monovalenter Hepatitis B-Impfstoff (Engerix B[®], GSK, Rixensart, Belgium) verwendet, welcher 20µg eines in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellten, rekombinanten Hepatitis-B-Oberflächenantigens (HBsAg) enthält. Als Adjuvans enthält der Impfstoff Aluminiumhydroxid.

Antigene

Zur spezifischen Stimulation von PBMC im Elispot wurde rekombinantes HBsAg (freundliche Gabe von GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium, Klon HeF3004, c=1,35µg/µl) mit einer Endkonzentration von 5µg/ml im Well verwendet. Negativkontrollen enthielten Phosphat-gepufferte Salzlösung (Lonza, BioWhittaker, #BE17-516Q, LOT 9mB096). Als Positivkontrolle wurde Staphylokokken-Enterotoxin B (Sigma Aldrich; Taufkirchen, c=0,5µg/µl) mit Endkonzentration von 0,5µg/ml im Well verwendet.

	Alter	Geschlecht	Besonderheiten
Spender 1	44	m	
Spender 2	49	m	
Spender 3	23	w	
Spender 4	29	m	
Spender 5	30	m	
Spender 6	55	m	
Spender 7	24	w	
Spender 8	51	w	
Spender 9	22	w	
Spender 10	21	w	
Spender 11	43	m	
Spender 12	21	w	
Spender 13	56	w	Nimmt das Antihypertensivum Lercandininpin
Spender 14	23	w	
Spender 15	24	m	
Spender 16	25	m	3 Tage vor der Erstimpfung leichte Erkältung, kein Fieber

Tabelle 2-1 Studiengruppe: Charakteristika der Teilnehmer, die eine Grundimmunisierung erhielten. Alter der Gruppe 21 – 56 Jahre, durchschnittlich 33,7 Jahre.
Geschlechtsverhältnis: m:w=1:4

	Alter	Geschlecht	Besonderheiten
Spender B1	24	w	
Spender B2	23	w	
Spender B3	21	w	
Spender B4	27	m	
Spender B5	23	w	

Tabelle 2-2 Boostergruppe: Charakteristika der Teilnehmer, die eine Boosterimpfung erhielten. Alter der Gruppe 21 – 27 Jahre, durchschnittlich 23,6 Jahre.
Geschlechtsverhältnis: m:w=1:1

2.1.2 Antikörper

Die im *enzym-linked-immunospot-assay* (ELISPOT) verwendeten Antikörper werden in Tabelle 2.3 dargestellt.

Antikörper	Verwendung
1-D1K	IFN γ -Primärantikörper
7-B6-1, biotinyliert	IFN γ -Sekundärantikörper
IL2-I	Interleukin 2-Primärantikörper
IL2-II, biotinyliert	Interleukin 2-Sekundärantikörper

Tabelle 2-3: Im ELISPOT eingesetzte Antikörper. Alle Antikörper wurden von Mabtech, Naka Strand, Sweden in der Konzentration 1 μ g/ml bezogen

2.1.3 Zellkulturmedien

Die in der Studie für die PBMC verwendeten Kulturmedien hatten folgende Zusammensetzungen:

RPMI 1640 (Sarstedt) mit 2mM L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren (8,9 mg/l Alanin, 15mg/l Asparagin, 13,3 mg/l Asparaginsäure, 14,7 mg/l Glutaminsäure, 7,5 mg/l Glycin, 11,5 mg/l Prolin, 10,5 mg/l Serin), 2mM Natriumpyruvat

T-Zellmedium (TZM): 500ml RPMI mit 10% FCS mit 1% Penicillin/Streptomycin (PAN, Aidenbach)

Fetales Kälberserum (FCS Gibco, Thermofischer Scientific, #10270, LOT41K1361K, hitzeinaktiviert)

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendurchführung

Zur Durchführung der Studie konnten 16 Probanden (Spender 1-16) akquiriert werden, die eine HBV-Grundimmunisierung wünschten. Zur Impfung wurden je eine Dosis Engerix B[®] (vgl. 2.1.2) am Tag 0, Tag 28 und nach 9 Monaten in den M. deltoideus verabreicht. An den Tagen 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35, vor Impfung nach 9 Monaten, und schließlich nach 9 Monaten und einer Woche wurden jedem Spender 50ml Blut entnommen. An Tagen mit Impfung fand die Blutentnahme jeweils vor Applikation der Impfdosis statt. Unmittelbar nach den Blutabnahmen wurde nach Isolation der PBMC der Elispot-Assay angesetzt.

Des Weiteren wurden als Kontrollen fünf Probanden (Spender B1-5) im Rahmen einer HBV-Boosterimpfung untersucht. Hierzu wurde am Tag 0 eine Dosis Engerix B[®] verabreicht. An den Tagen 0, 2, 4, 7, 28 wurde Blut entnommen und dem obigen Schema folgend verarbeitet.

2.2.2 Zellkulturtechniken

2.2.2.1 Gewinnung der PBMC

Die Blutgewinnung erfolgte über eine periphere Blutabnahme (Arm) mittels 21G (0,8mm) Nadeln (Safety-Multifly[®]-Set, und 50ml Luer-Lok[™]-Spritze (BD-Plastikpak, Spain) nach vorausgehender Hautdesinfektion. In die Luer-Lok-Spritzen wurde zuvor unfraktioniertes Heparin (Heparin-Endkonzentration: 25 IU/ml) gegeben, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern.

Zur Isolation der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden zunächst 50 ml Leukosep[™]-Röhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) mit jeweils 15ml Pancoll human (Dichte 1,077 g/ml, Pan Biotec, Aidenbach) befüllt und für 1 min bei 1000g zentrifugiert. Im Anschluss wurde auf die Filter der Leukosep-Tubes 10ml steriles PBS (Lonza, BioWhittaker, Phosphatgehalt 0,067 M) zur Verdünnung des Blutes aufgebracht. Im nächsten Schritt wurden 25ml Vollblut mittels Luer-Lock-Spritze in je ein Tube überführt. Die eigentliche Dichtegradientenzentrifugation erfolgte für 15 min bei 800g (Ausschwingrotor). Die Lymphozytenpopulation wurde mittels einer Pasteurpipette abgezogen. Schließlich wurden die PBMC zweimalig durch Zentrifugation und anschließende Resuspension mit PBS gewaschen.

2.2.2.2 Bestimmung der PBMC-Konzentration und der „viability“ der Zellen

Die Vergleichbarkeit von Elispot-Assays ist in besonderem Maße vom Einsetzen korrekter Zellzahlen abhängig.

Daher wurde die Bestimmung der Zellkonzentration mittels eines elektronischen Zählgeräts (Beckman-Coulter-Counter) durchgeführt. Dabei erfolgt die Zellkonzentrationsbestimmung mittels Impedanzmessung. Hierdurch kann auf das Partikelvolumen und die Partikelmasse geschlossen werden. Der Ausschluss nicht-vitaler Zellen im Beckman-Coulter-Counter erfolgte mittels Trypan-Blau-Färbung.

2.2.3 Immunologische Nachweismethoden

2.2.3.1 Bestimmung von Anti-HBs-Titer und Anti-HBc-Titer

Zur Bestimmung der Anti-HBs-Titer wurden unter sterilen Bedingungen aus 50ml heparinisiertem Vollblut 10ml in ein separates Röhrchen überführt und für 10 min bei 100g zentrifugiert. Von dem überstehenden Plasma wurde 1ml abgenommen und zur Trennung von Thrombozyten erneut für 10min bei 1000g zentrifugiert. Bis zur Testung wurde das thrombozytenfreie Plasma bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen der Probe wurden etwaige Präzipitate erneut zentrifugiert (10min, 1000g). Zur Messung wurden je 250µl Plasma in einem automatisierten Immuno-Assay-System (Abbott Architect i1000SR; Abott Deutschland, Wiesbaden) zur quantitativen Bestimmung von Anti-HBs und zur Bestimmung von Anti-HBc eingesetzt. Der Abbott Architect i1000SR arbeitet nach dem Prinzip eines Chemilumineszenz Immunoassays (CMIA). Hierbei binden zu vermessende Antigen determinanten an AK-beschichtete Mikropartikel. Durch Hinzugabe eines Konjugats wird eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst. Die dann gemessenen relativen Lichteinheiten sind direkt proportional zur Konzentration der Antigen determinanten in der Probe. Mit diesem Test werden Anti-HBs-Werte ab 1 IU/l sicher erkannt (Anti-HBs-Test: Architect Anti-HBs; Anti-HBc-Test: Architect Anti-HBcAg II;).

2.2.3.2 Zytokin-Elispot-Assay zum Nachweis von reaktiven PBMC

Prinzip:

Mit Hilfe des enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) können HBsAg spezifische PBMC anhand ihrer Zytokinsekretion detektiert werden. Das Testprinzip gleicht einem herkömmlichen Elisa. Im Gegensatz hierzu werden aber beim Elispot

die Testplatten mit spezifischen gegen Zytokine gerichteten Antikörpern beschichtet. Die von den PBMC freigesetzten Zytokine werden gebunden, mittels Detektionsantikörpern sichtbar gemacht und in einem Elispot-Reader (s.u.) ausgewertet.

Durchführung

PVDF-96-Well-Mikrotiterplatten (MSIPN4550 Multiscreen Filterplates, Merck Millipore, Darmstadt) wurden unter sterilen Bedingungen mit 100µl eines monoklonalen, gegen menschliche Zytokine gerichteten Antikörpers über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Konzentration der Antikörper Anti-IFN γ und Anti-IL2 (vgl. 2.1.4) lag bei 5µg/ml. Zur Verdünnung wurde steriles PBS verwendet.

Am Folgetag wurde die Antikörperlösung abpipettiert und die Platte dreimalig mit je 200µl PBS gewaschen. Zur Blockierung / Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde je 200µl R10 hinzugefügt und für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Waschschrift erneut durchgeführt.

Zur Stimulation wurden zunächst HBsAg (50µl mit Endkonzentration 5µg/ml; freundliche Gabe von GlaxoSmithKline), sowie 50µl PBS (Negativkontrolle) vorgelegt. Frisch isolierte PBMC wurden zu 5×10^5 PBMC / Well in einem Volumen von 100µl TZM / Well (je 5 Replikate) eingesetzt. Je Spender wurde ein Well als Positivkontrolle mit 50µl SEB stimuliert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Brutschrank Heraeus Institutes, Langenselbold). Der Inkubationszeitraum zur Stimulation betrug bei IFN γ 24h und bei IL2 72h.

Anschließend wurden die Platten sechsmal mit unsteriler PBS-Waschlösung gewaschen (PBS +0,05% Tween20; Merck; Darmstadt; 200µl/Well) und dann wurden 100µl des jeweiligen biotinylierten Detektions-AK (Konz.= 1µg/ml) hinzugefügt.

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Danach wurde die Elispot-Platte erneut sechsmalig mit unsterilem PBS zur Entfernung ungebundener AK gewaschen. Die Platten wurde anschließend mit 100µl / Well von einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (MABTECH AB, Naka Strand, Sweden; 1µg/ml in PBS unsteril) für 2h bei Raumtemperatur oder erneut bei 4°C über Nacht inkubiert. Durch einen letzten Waschschrift wurde überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Aufpipettieren von 100µl / Well einer NBT/BCIP-Fertiglösung sowie einer ca. 10 minütigen Inkubation bei Dunkelheit (Dauer abhängig vom Alter der NBT/BCIP-Lösung) erfolgte die endgültige Detektion

der Zytokin-Spots. Das Stoppen der hydrolytischen Dephosphorylierung des BCIP durch die alkalische Phosphatase erfolgte durch das Abwaschen der Platten unter Leitungswasser. Die Platten wurden anschließend getrocknet und bis zur Auswertung bei Dunkelheit gelagert.

Die Auswertung der Elispot-Assays erfolgte mittels des AID robotic Elispot/Fluorospot Readers (Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany) und der zugehörigen AID Elispot 6.x Software. Dabei wurde durch die Software ein IFN γ -Spot als valide gewertet, wenn dieser ein Minimum der Intensität (I) von 10, der Größe (S) von 80, sowie des Gradienten (G) (=Maß für den Farbunterschied vom Mittelpunkt zum Rand des Spots) von 5 überschritt. Für die Detektion von IL2-Spots galten die Werte 12/160/19 (Intensität/Sensitivität/Gradient). Diese Einstellungseigenschaften sind dem AID Elispot Reader eigen und wurden durch Vorversuche ermittelt. Die gemessenen Ergebnisse werden in SFU gemessen (Spot forming Units; #Spots / Well).

2.2.4 Methodik der statistischen Auswertung

Die EDV-gestützte statistische Auswertung gelang mittels 'R' (R Foundation, Wien, Österreich, Version 0.95.265 Open Source) und dem Package 'Exact Rank Tests' (Version 0.8-24), sowie der Benutzeroberfläche R-Studio 2.15.3 (RStudio, Boston, MA, USA, März 2013). Zur graphischen Ausarbeitung wurden das R Package 'ggplot2', 'Sigmaplot' und Excel (Microsoft Office for Mac 2011, Version 14.3.5; Microsoft, Redmont, Washington, USA) verwendet.

Zur Ermittlung der jeweiligen Signifikanz wurde der mit Antigen stimulierte Ansatz mit der Negativkontrolle (d.h. die jeweils 5 Wells für Stimulation und 5 Wells für die Negativkontrolle) verglichen. Gemeinhin wird der T-Test zur Signifikanzermittlung unter Annahme von normalverteilten Ergebnissen herangezogen. Diese Annahme wird bei einer sehr geringen Zahl von Einzelergebnissen hinfällig. Eine Normalverteilung wurde für die Daten dieser Arbeit nicht angenommen. Daher wurde der Wilcoxon-Rangsummentest eingesetzt. Ein gewöhnlicher Wilcoxon-Rangsummentest ist nicht im Stande, gleichwertige, ganzzahligen Ergebnisse zu vergleichen. Daher wurde in dieser Arbeit der approximierende Wilcoxon-Rangsummen-Test verwendet. Hierfür konnte im Statistik-Programm R die Funktion 'Wilcox.exact' verwendet werden (17).

Zur weiteren Einordnung eines Stimulationsergebnisses wurde der stimulierte Ansatz des jeweiligen Zeitpunktes mit dem stimulierten Ansatz zum Zeitpunkt 0 verglichen und auf Signifikanz geprüft (entspricht dem Signifikanzwert 'pval (stim0vsstim)', vgl. Anhang). Der Signifikanzwert des Vergleichs von stimuliertem Ansatz und Negativkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt wurde mit 'pval (stimvsneg)' bezeichnet (vgl. Anhang). Eine Signifikanz wurde bei $pval < 0,05$ angenommen. Abbildung 2.1 zeigt den in 'R' verwendeten Programmiercode.

Vergleich von Stim zur Negativkontrolle zum jeweiligen ZP

```
P <- function(x){
  library(exactRankTests)
  pval = NULL
  pval <- vector(length=nrow(x))
  k <- seq(1,nrow(daten)-1, by=2)
  for (i in seq_along(k))
  {
    pval[k[i]] <- wilcox.exact(as.numeric(x[k[i],6:10]), as.numeric(x[k[i]+1,6:10]), alternative = "greater",
    conf.level=0.95)$p.value}
  return(pval)
}
P(daten)
Anmerkung: ,daten' entspricht den SFU-Ergebnissen (s. Anhang – Rohdaten)
```

Vergleich von ZP0 stim zum jeweiligen zeitlich später gelegenden ZPstim

```
Für alle Läufe außer Spender 1 Lauf 1
for (i in seq(33,613, by=20)) for(j in seq(0,18,by=2))
  pval[i+j] <- wilcox.exact(as.numeric(daten[i,6:10]),
  å as.numeric(daten[i+j,6:10]), alternative = "less", conf.level=0.95)$p.value
Für Lauf 1 Spender 1
for (i in seq(1,32, by=16)) for(j in seq(0,15,by=2))
  pval1[i+j] <- wilcox.exact(as.numeric(daten[i,6:10]),
  as.numeric(daten[i+j,6:10]), alternative = "less", conf.level=0.95)$p.value
```

(Anmerkung: Aufgrund verminderten Anzahl von Blutentnahmen war ein separater Code notwendig.)

Abbildung 2-1: Programmiercode zur statistischen Auswertung in ,R'

3 Ergebnisse

3.1 Vorstudie: Zelluläre Antwort nach HBV-Boosterimpfung

Fünf erwachsene Probanden, deren Grundimmunisierung gegen Hepatitis B über 10 Jahre zurücklag und die alle Anti-HBc-negativ waren, erhielten eine Auffrischimpfung. Unmittelbar vor der Boosterimpfung und im Verlauf (Tag 2, 4, 7, 14, 21, 28 nach Boosterimpfung) wurden Blutentnahmen vorgenommen und auf Anti-HBs im Enzymimmuntest sowie auf HBsAg-spezifische IFN- γ - und IL2-produzierende Zellen im Elispot untersucht. Die Probanden werden im Folgenden mit Spender B1-B5 bezeichnet.

3.1.1 Humorale Antwort nach HBV-Boosterimpfung

Bei drei Probanden konnten bereits zum Zeitpunkt der Boosterimpfung noch hohe Anti-HBs-Titer nachgewiesen werden (373, 836 und 3237 IU/L). Spender B2 hatte einen Titer von 2 IU/L, Spender B3 einen Titer von 39 IU/L. Bei allen Spendern konnte eine Anti-HBs-Zunahme um mindestens Faktor 10 zwischen Tag 4 und Tag 7 nach Boosterimpfung beobachtet werden (Tabelle 3.1, Abbildung 3.1).

Tabelle 3-1: Zeitlicher Verlauf der Anti-HBs-Titer (in IU/L) * nach Boosterimpfung

	ZP0	ZP2	ZP4	ZP7	ZP14	ZP21	ZP28
Spender B1	373	346	410	>15000	>15000	>15000	>15000
Spender B2	2	3	2	246	7122	5695	3803
Spender B3	3237	3474	2005	>15000	>15000	>15000	>15000
Spender B4	39	40	40	6731	>15000	>15000	>15000
Spender B5	836	903	887	>15000	>15000	>15000	>15000

*Anti-HBs-Titer ≥ 1 mIU/ml gelten als reaktiv.

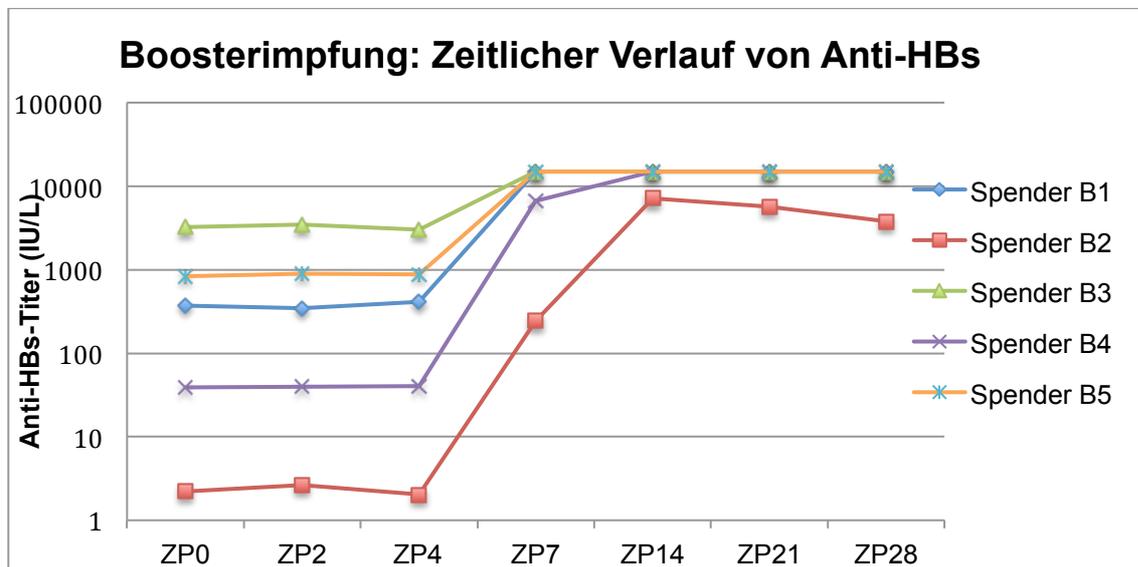


Abbildung 3-1: Zeitlicher Verlauf von Anti-HBs nach Boosterimpfung.

Blutabnahmezeitpunkte: **ZP0**: Vor HBV-Impfung; **ZP2**: 2. Tag nach Impfung; **ZP4**: 4. Tag nach Impfung etc.

3.1.2 Bestimmung der HBsAg spezifischen zytokinproduzierenden PBMCs nach Boosterimpfung

Die Ergebnisse der Zytokinbestimmung im Elispot sind in den Abbildungen 3.2-3.6 gezeigt. Die jeweils dritte (unterste) Abbildung zeigt die um die Negativkontrolle bereinigte Zytokinaktivität – d.h. die laut Literatur standardisierte Darstellungsweise.

Bei Spender B3 konnte eine IFN γ - und Interleukin 2-Aktivität bereits zum Zeitpunkt der Boosterimpfung nachgewiesen werden (Spender B3 war auch der Proband mit dem höchsten Anti-HBs-Titer von 3237 IU/L zum Zeitpunkt der Impfung). Alle übrigen Spender wiesen lediglich unspezifische Aktivitäten auf. Bei allen Spendern konnte aber bereits nach 48 Stunden eine neu aufgetretene IFN γ -Sekretion gemessen werden, welche bis auf einzelne Ausnahmen für 28 Tage weiterbestand. Somit zeigte sich IFN γ als dominierendes Zytokin.

Die Interleukin 2-Aktivität war weniger stark ausgeprägt. Abgesehen von Spender 2, bei dem sich keine IL2-Sekretion nachweisen ließ, entwickelten aber alle Spender bis zum Tag 28 eine IL2-Aktivität.

Dieser Vorversuch zeigte, dass mit dem hier etablierten Nachweisverfahren IFN- γ -sezernierende PBMCs gut zu erfassen sind; die gefundenen Werte sind mit den publizierten Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen vergleichbar. Für die Bestimmung von IL2 gibt es keine Daten in vergleichbaren Kollektiven; immerhin zeigt der Vorversuch die prinzipielle Nachweisbarkeit von IL2 sezernierenden Zellen.

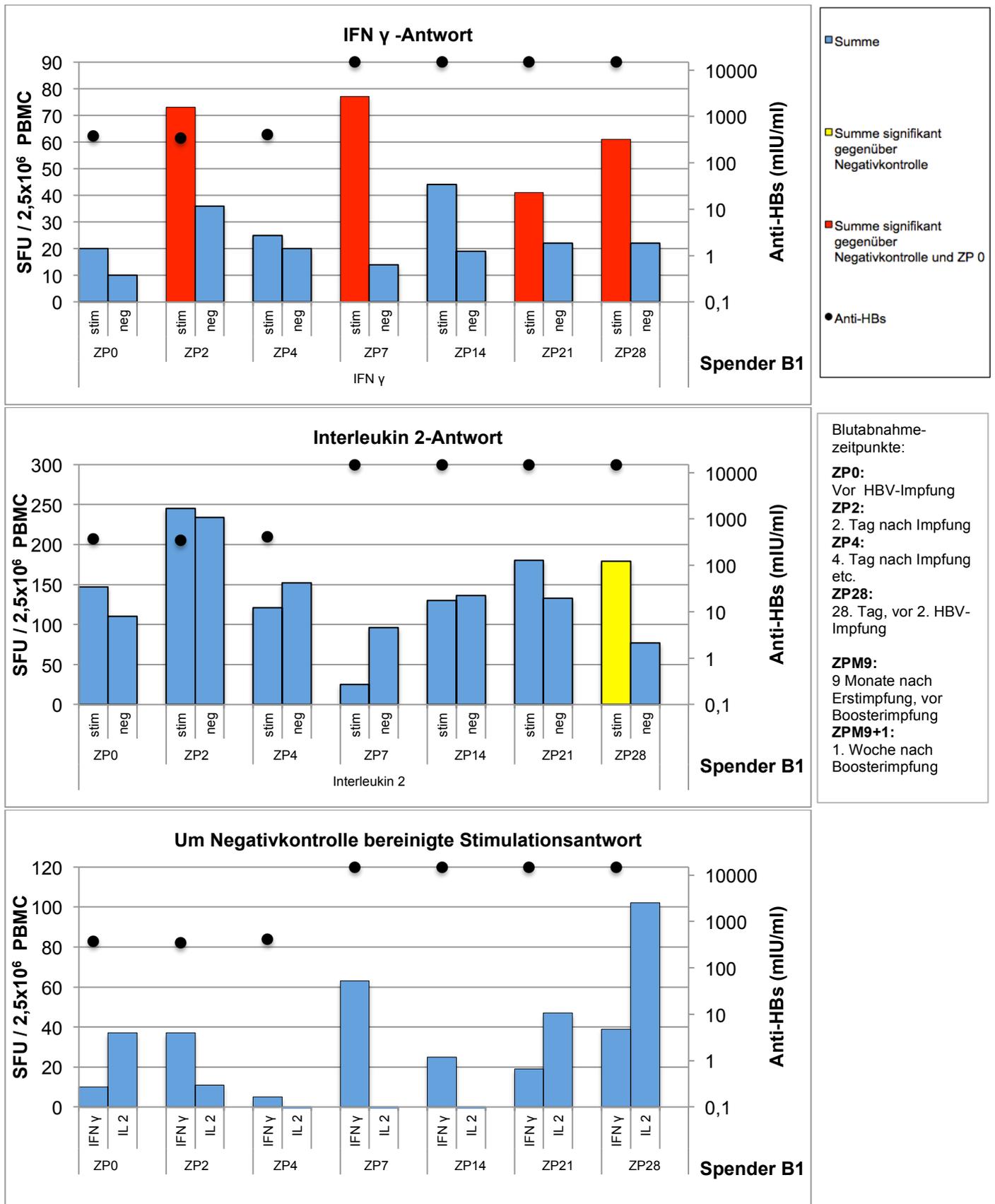


Abbildung 3.2: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

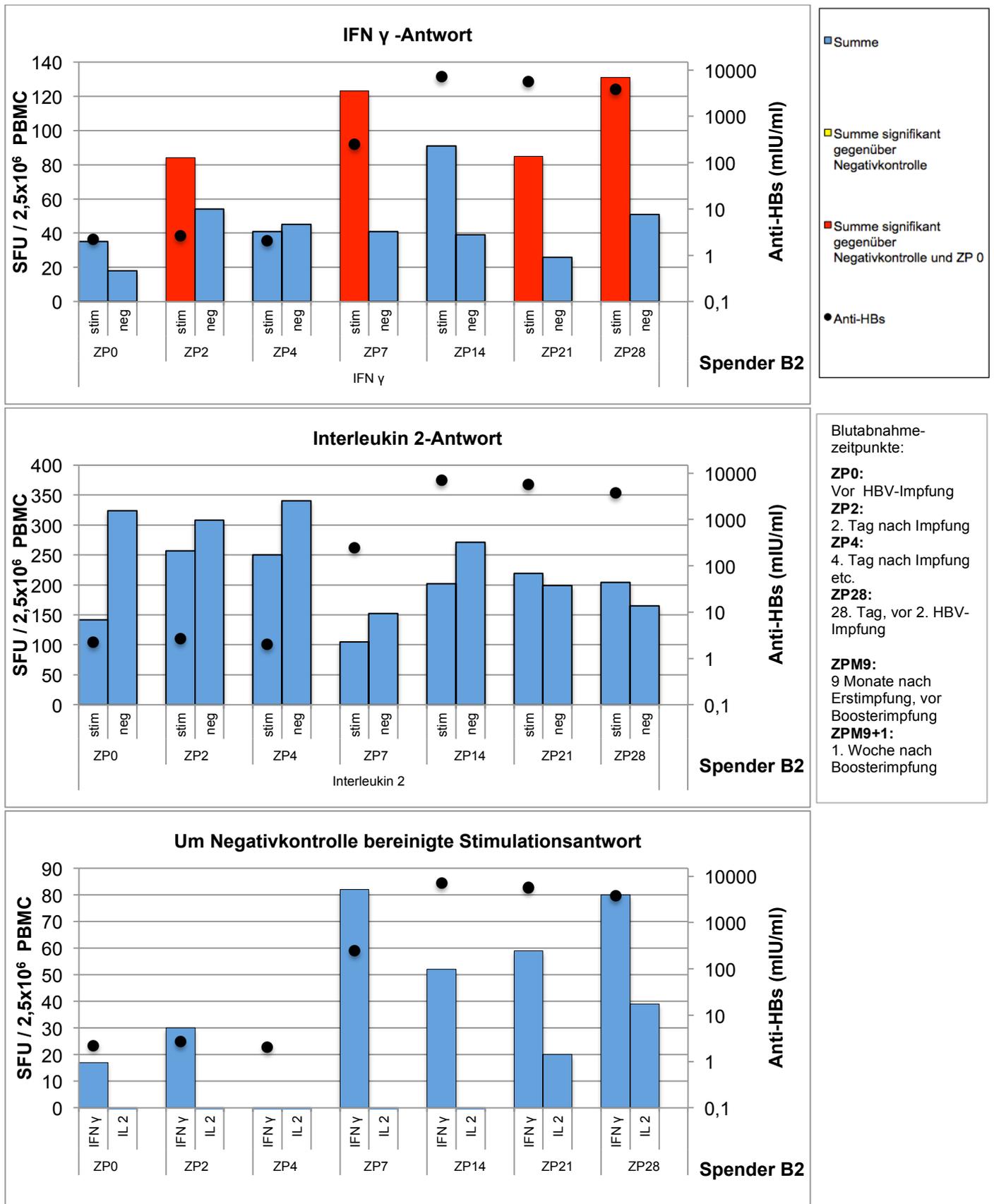


Abbildung 3.3: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

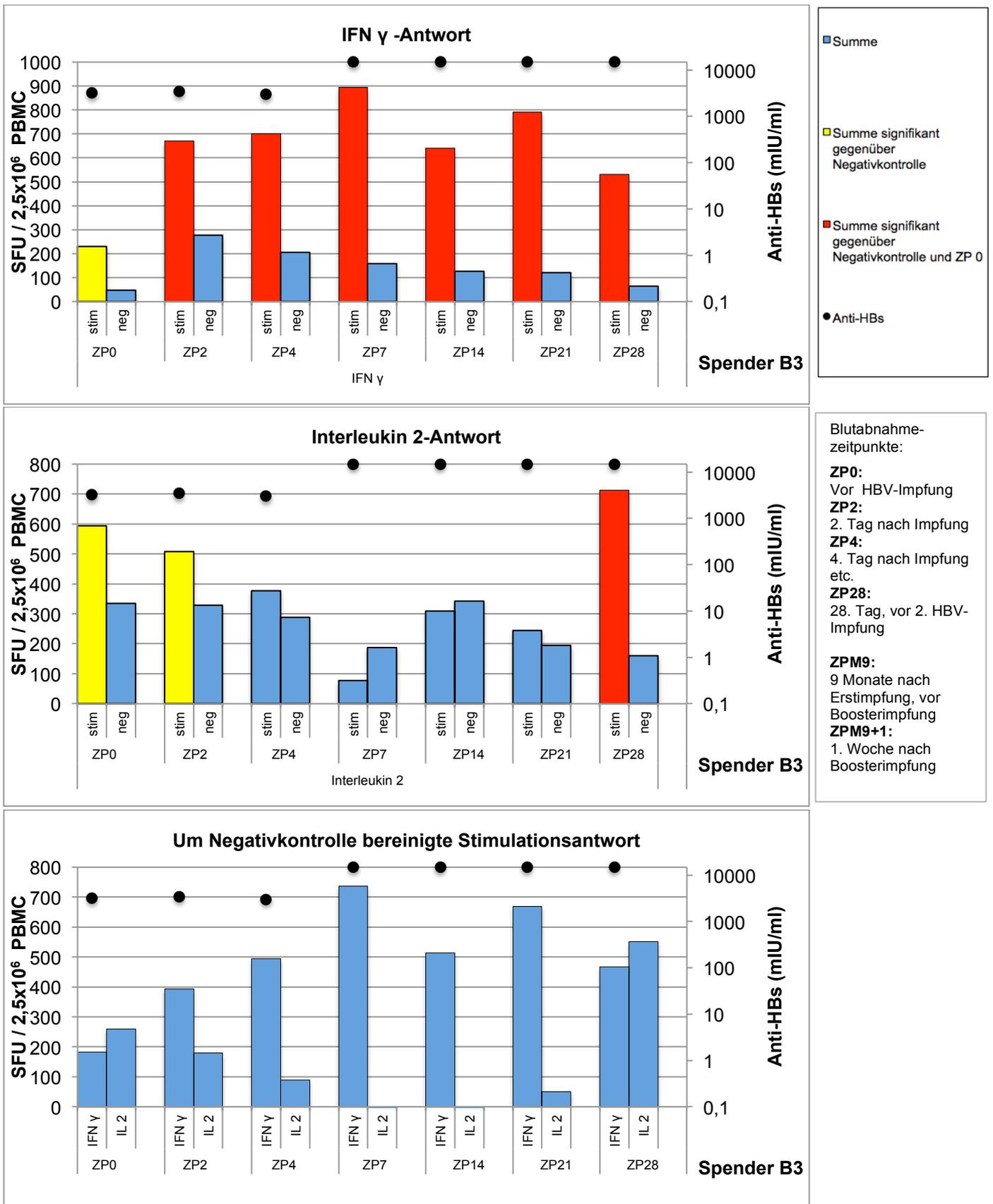


Abbildung 3.4: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

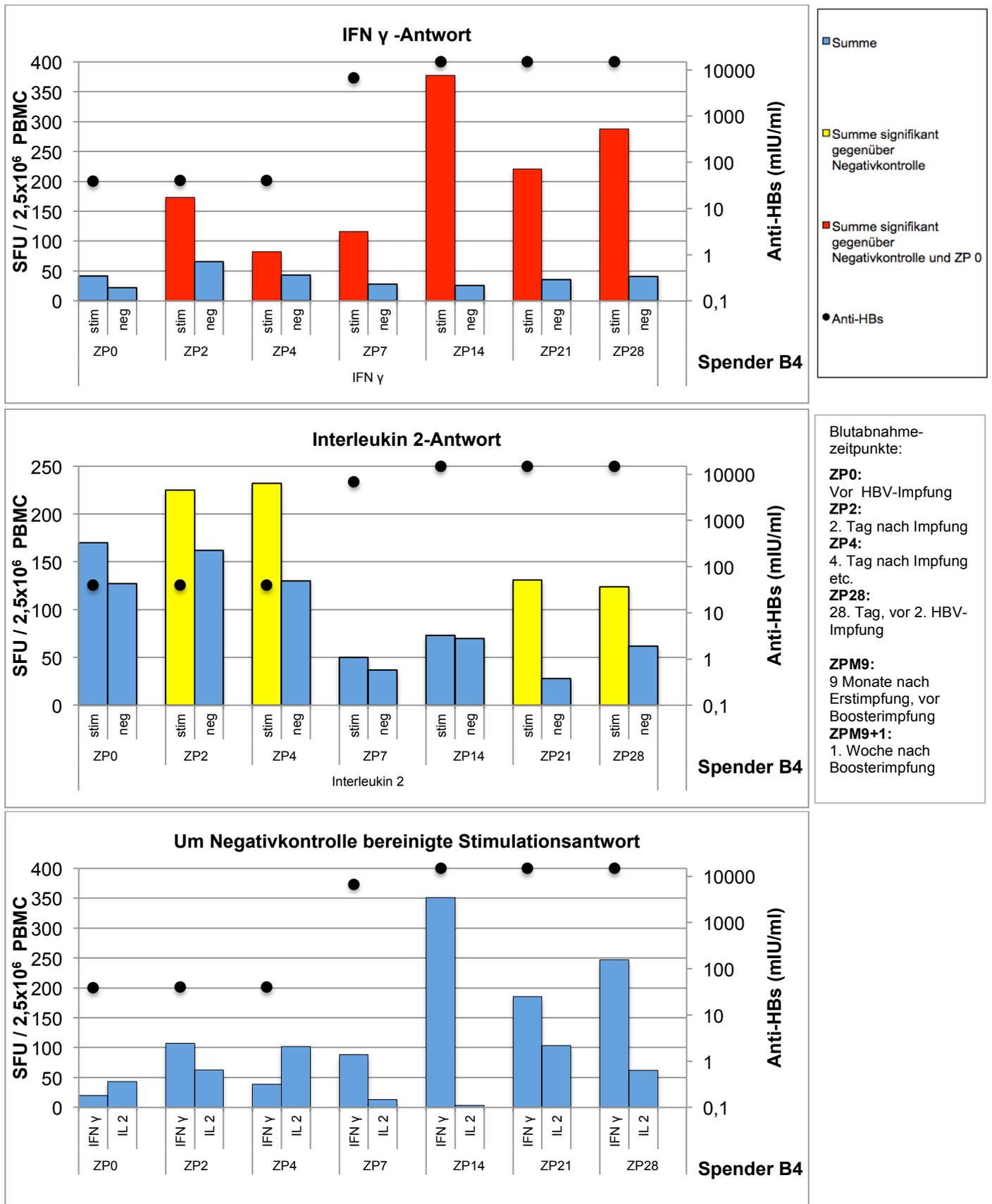


Abbildung 3.5: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

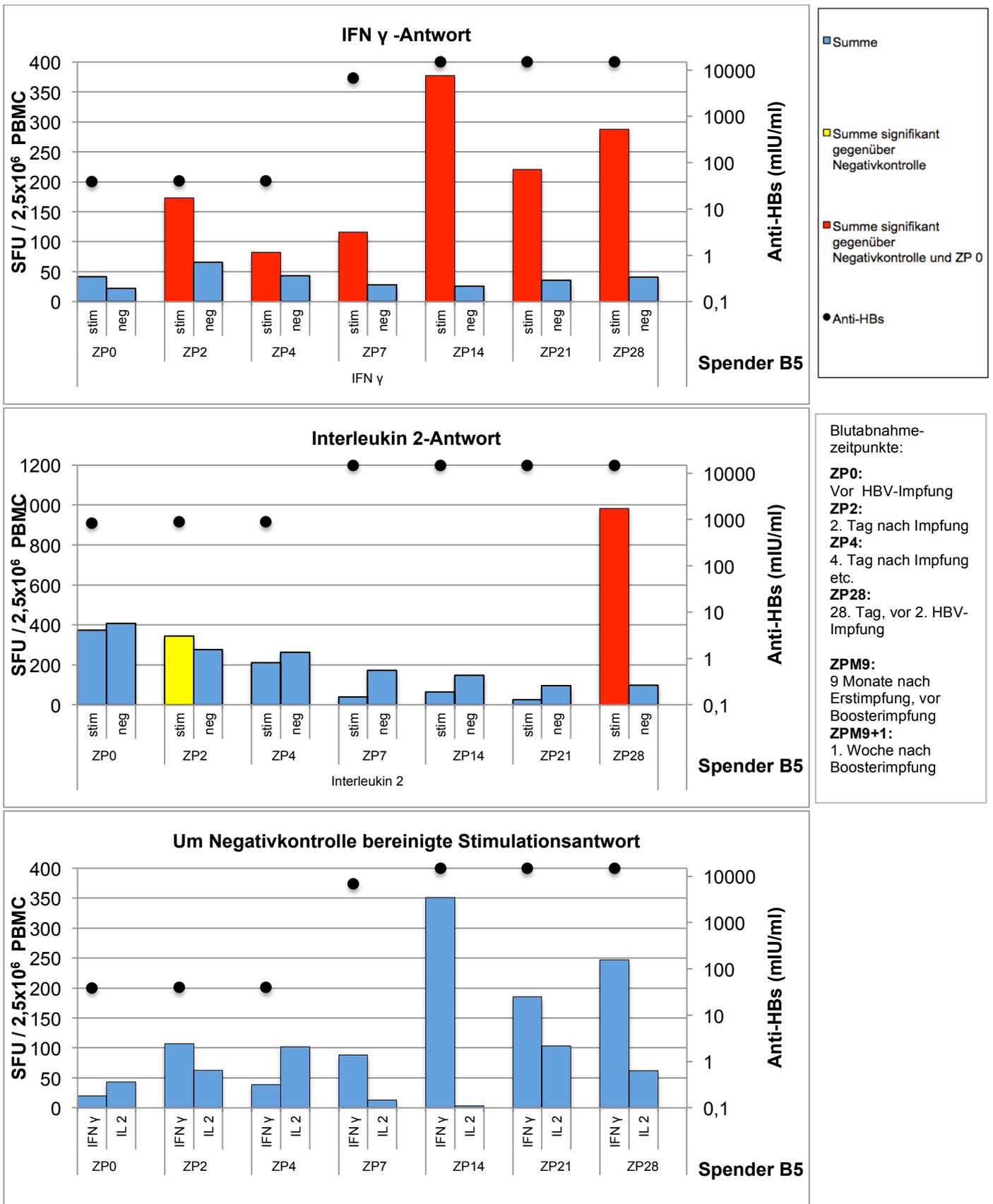


Abbildung 3.6: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

3.2 Immunologische Untersuchungen zur frühen zellulären Immunantwort nach erstmaliger HBV-Impfung

In der eigentlich dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie wurde die durch die Hepatitis B-Impfung vermittelte initiale zelluläre Immunantwort an einem Kollektiv bislang ungeimpfter Probanden (n=16) untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, wie schnell die spezifische zelluläre Reaktion – im Vergleich zur humoralen – auftritt. Das Kollektiv der Studie bestand aus Probanden, bei denen die Indikation zur HBV-Impfung gestellt wurde. Alle wurden vor Erstimpfung auf Antikörper gegen das Core-Antigen (Anti-HBc) getestet, um auszuschließen, dass bereits mit HBV Infizierte in die Studie aufgenommen würden. Bei keinem Probanden konnte Anti-HBc nachgewiesen werden. Unmittelbar vor der Impfung und in kurzen Abständen danach (an den Tagen 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35) sowie zum Zeitpunkt der 3. Impfung im Monat 9 und 7 Tage später wurden Serum und Zellen (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, PBMC) gewonnen. Zur Untersuchung der impfinduzierten zellulären Antwort wurden die Zellen in einem *enzym-linked immunospot*- (Elispot)-Test eingesetzt. Dabei werden aktivierte mononukleäre Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion charakterisiert. Die PBMC wurden mit rekombinantem HBsAg stimuliert. In den gleichen Blutproben wurde auch die Anti-HBsKonzentration bestimmt.

3.2.1 Humorale Antwort nach HBV-Impfung

Wie Tabelle 3.2 und Abbildung 3.7 zu entnehmen ist, wurde bei allen Probanden eine humorale Immunität (Anti-HBs) durch die Impfung induziert. Bei vier Teilnehmern konnte innerhalb der ersten 4 Wochen nach Erstimpfung ein Anti-HBs-Titer nachgewiesen werden, am frühesten bei einem Probanden bereits nach 2 Wochen. Sechs Teilnehmer waren eine Woche nach der zweiten, am Tag 28 verabreichten Impfdosis positiv, weitere vier erst am Tag der Boosterimpfung nach 9 Monaten. Die Schutzgrenze von 10 IU/l oder mehr erreichten erstmals ein Proband am Tag 21, sieben am Tag 35, drei im Monat 9 (Zeitpunkt der Boosterimpfung) und vier eine Woche später. Lediglich Proband 13 erreichte auch nach der Boosterimpfung nach 9 Monaten keinen protektiven Antikörper-Titer (Anti-HBs < 10 mIU). Bei diesem Probanden konnte am Tag 2 ein grenzwertiger Titer von 1,1 mIU/ml gemessen werden. Da in der Folge kein Titer mehr nachweisbar war, wurde diese Messung als Ausreißer gewertet. Eine eindeutige Korrelation der humoralen

Antwort zu Geschlecht und Alter war nicht erkennbar.

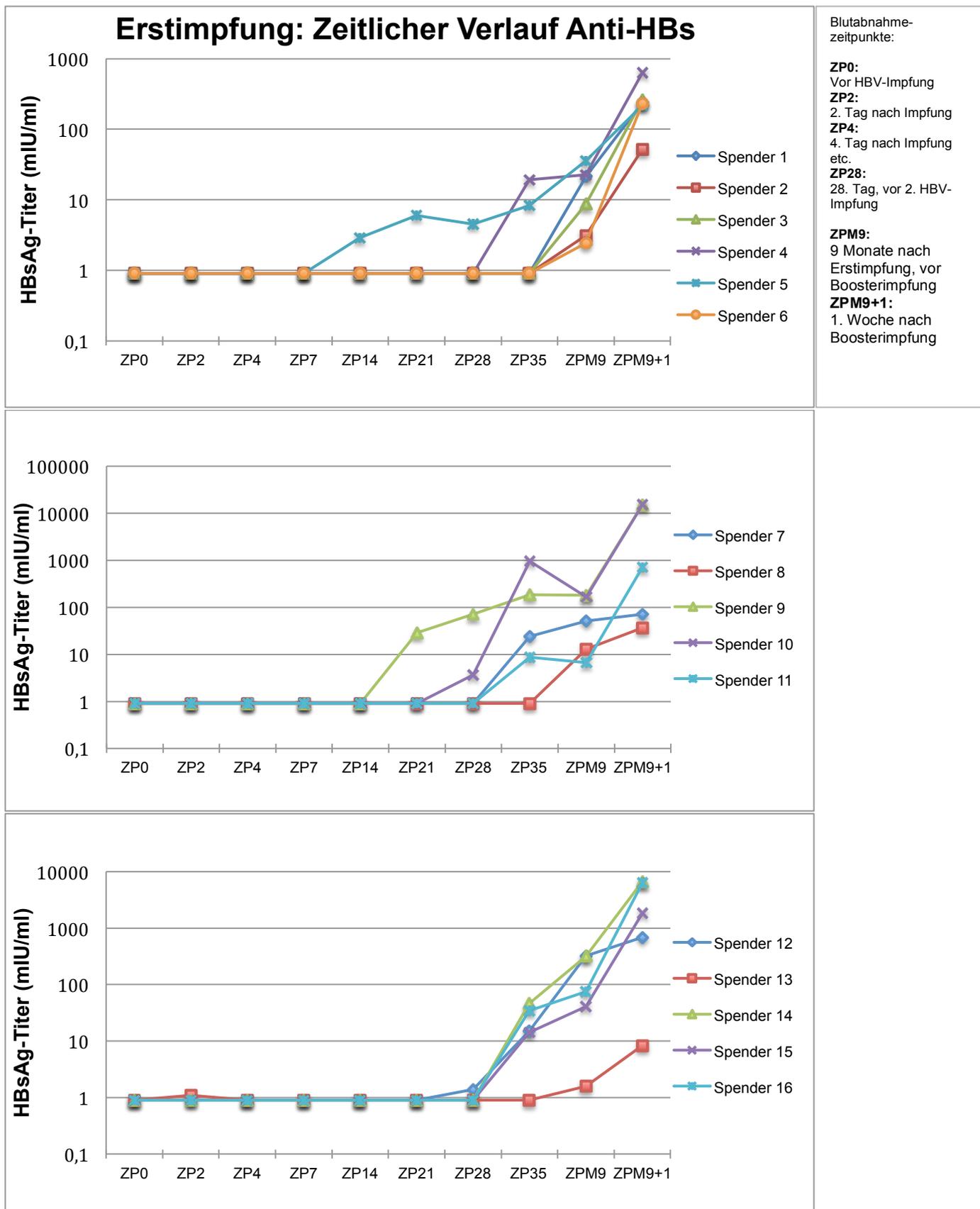


Abbildung 3.7: Zeitlicher Verlauf Anti-HBs-Titer bei Grundimmunisierung
 Zeitgleich zur Isolation der PBMC für das Elispot-Assay wurde der Anti-HBs-Titer bestimmt. Titer ≥ 1 mIU/ml gelten als reaktiv.

Tabelle 3-2 Anti-HBs-Titer der Studiengruppe (in IU/ml) *

	ZP0	ZP2	ZP4	ZP7	ZP14	ZP21	ZP28	ZP35	ZPM9	ZPM9+1
Spender 1	0,19	0,21	0,19	0,14	unb.	unb.	0,64	0,55	21,29	237,5
Spender 2	0,21	0,3	0,82	0,21	0,46	0,69	0,34	0,26	3,13	51,87
Spender 3	0,5	0,56	0,31	0,06	0,97	0,44	0,48	0,8	8,64	258,72
Spender 4	0,23	0,09	0,13	0,34	0,19	0,28	0,28	19,15	22,58	624,9
Spender 5	0	0,09	0,22	0,05	2,9	5,96	4,52	8,27	36,05	217,46
Spender 6	0,03	0,01	0	0,07	0	0,2	0	0	2,42	228,71
Spender 7	0	0,07	0	0,19	0	0,86	0,29	24,27	51,20	71,36
Spender 8	0	0,11	0	0	0,72	0,27	0,12	0,36	12,93	36,39
Spender 9	0,25	0,19	0,3	0,27	0,68	28,52	71,25	185,42	180,17	15000,00
Spender 10	0,15	0,39	0,14	0,48	0,23	0,69	3,65	947,16	165,64	15000,00
Spender 11	0,31	0,2	0	0,11	0,12	0,11	0,25	8,68	6,72	707,42
Spender 12	0,14	0,21	0,21	0,18	0,19	0,51	1,38	15,07	320,76	687,52
Spender 13	0,25	1,10	0,14	0,24	0,12	0,32	0,35	0,90	1,58	8,29
Spender 14	0,19	0,18	0,07	0,24	0,78	0,62	0,90	46,33	314,32	6713,60
Spender 15	0,19	0,19	0,16	0,31	0,52	0,13	0,06	14,25	41,13	1817,58
Spender 16	0,31	0,29	0,02	0,27	0,09	0,12	0,65	34,41	74,97	6325,54

*Anti-HBs-Titer ≥ 1 mIU/ml gelten als reaktiv (erstmaliger Antikörpernachweis grau unterlegt). Alle Probanden wurden zuvor Anti-HBc negativ getestet.

3.2.2 Charakterisierung HBsAg-spezifischer PMBC anhand ihrer Zytokinsekretion

Zur Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach HBV-Impfung wurden die 16 Probanden im Verlauf der HBV-Grundimmunisierung (Impfung am Tag 0, Tag 28 und nach 9 Monaten) untersucht. Unmittelbar vor der ersten Impfung (Zeitpunkt 0, kurz ZP0) und an folgenden Tagen wurde Blut entnommen: Tag 2, 4, 7, 21, 28, 35, nach 9 Monaten, sowie nach 9 Monaten (=ZPM9) und 7 Tagen(=ZM9+1).

Die frisch isolierten PMBC wurden im Elispot auf IFN γ - und Interleukin 2-Sekretion hin untersucht. Die Ergebnisse für die einzelnen Probanden sind in den Abbildungen 3.8 - 3.23 dargestellt, die Tabelle 3.3 zeigt die positiven Ergebnisse der gesamten Gruppe. Aus Abbildung 3.24 lässt sich ersehen, wie viele Probanden im Laufe der Studie erstmals eine positive Reaktion zeigten.

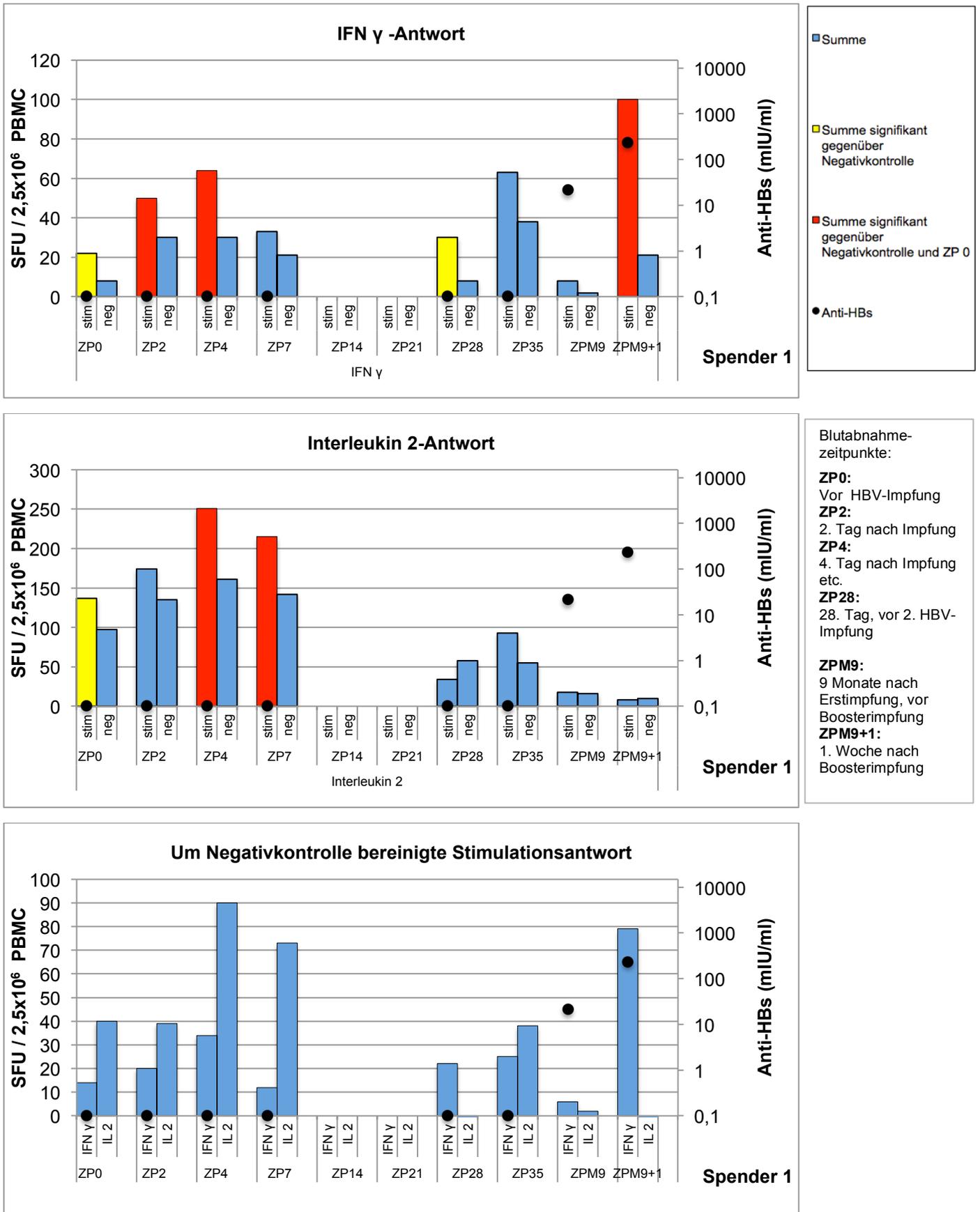


Abbildung 3.8: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

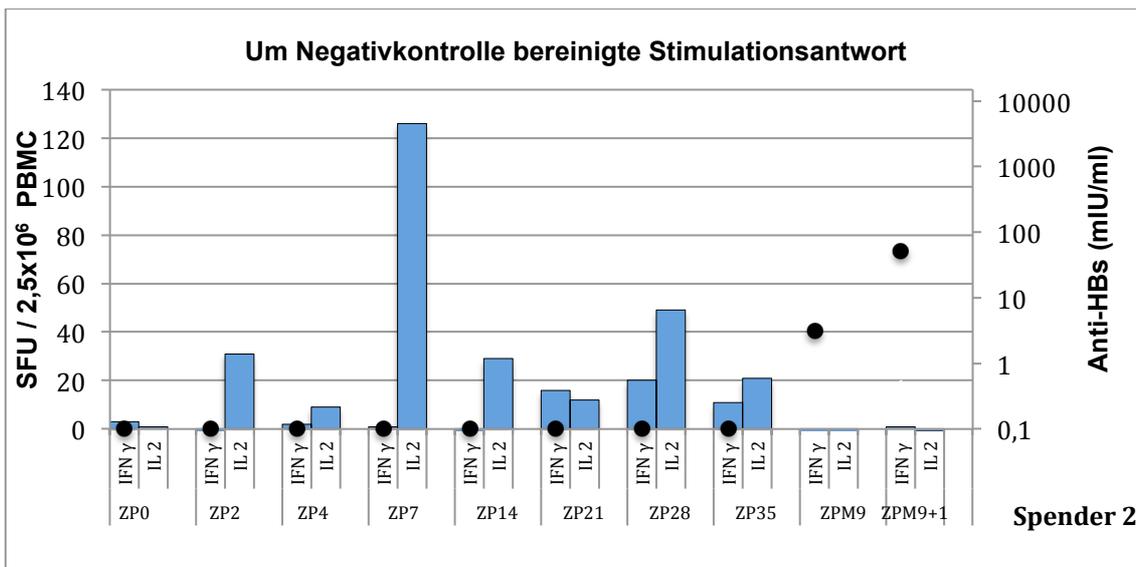
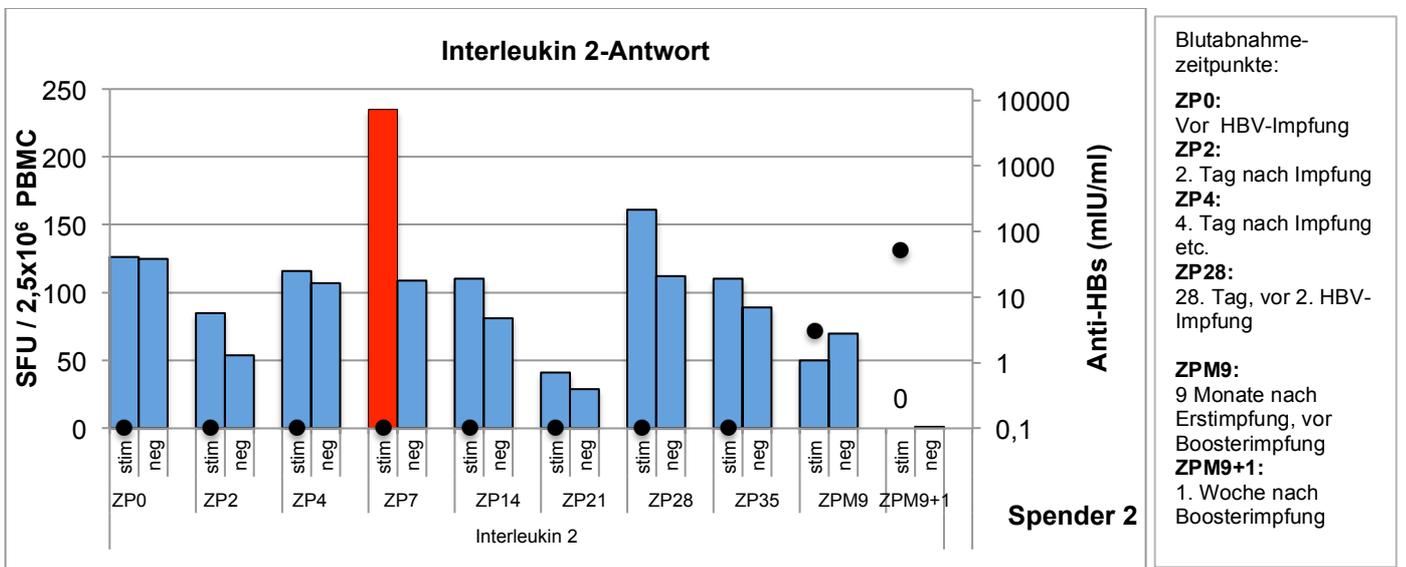
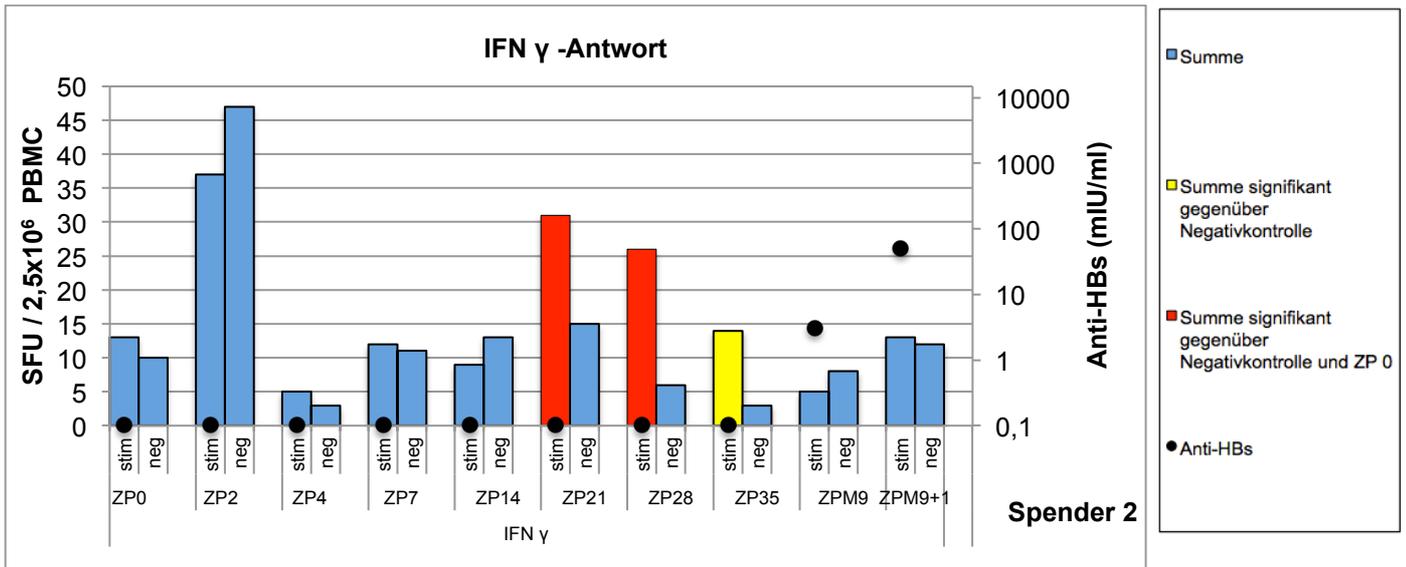


Abbildung 3.9: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

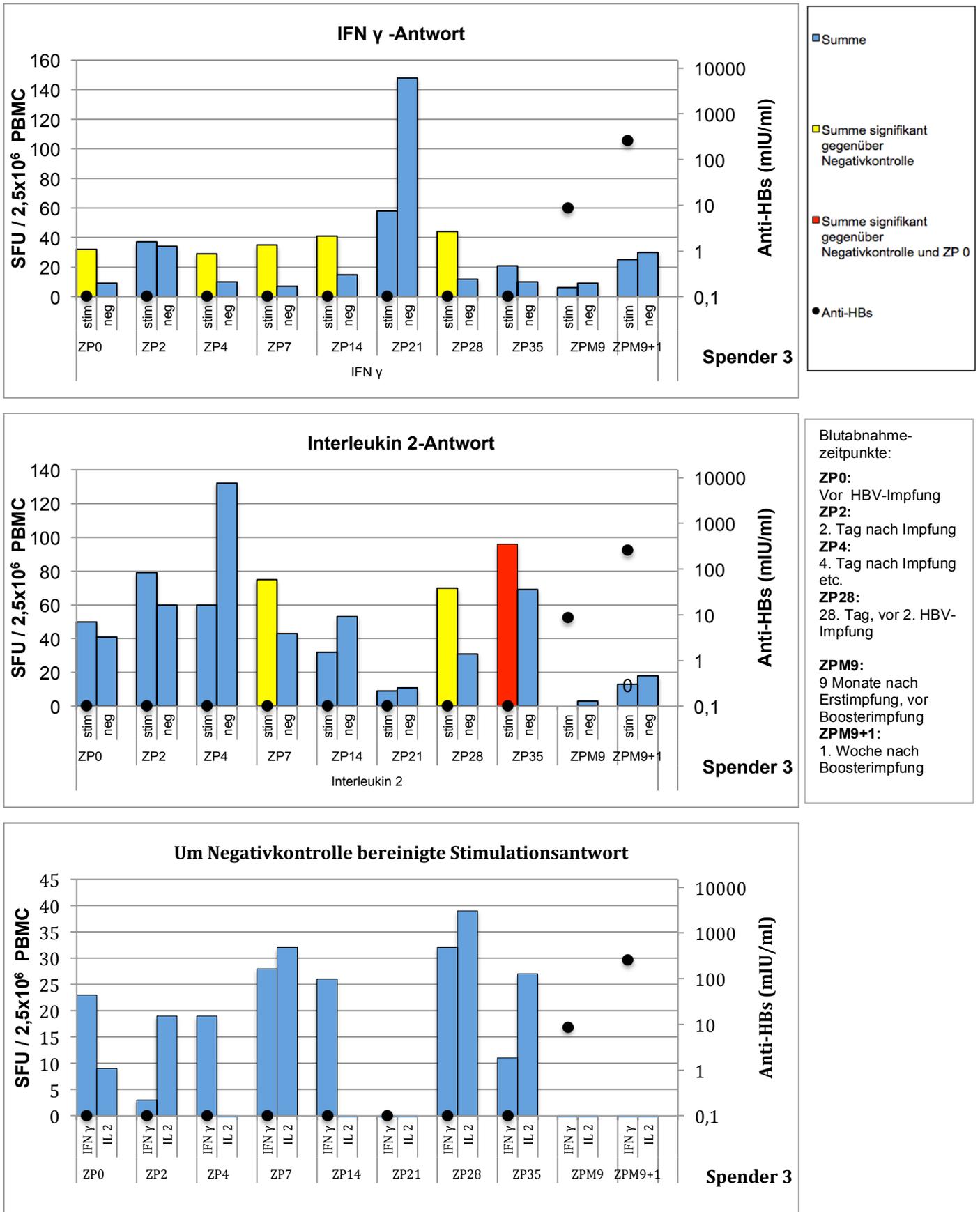


Abbildung 3.10: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

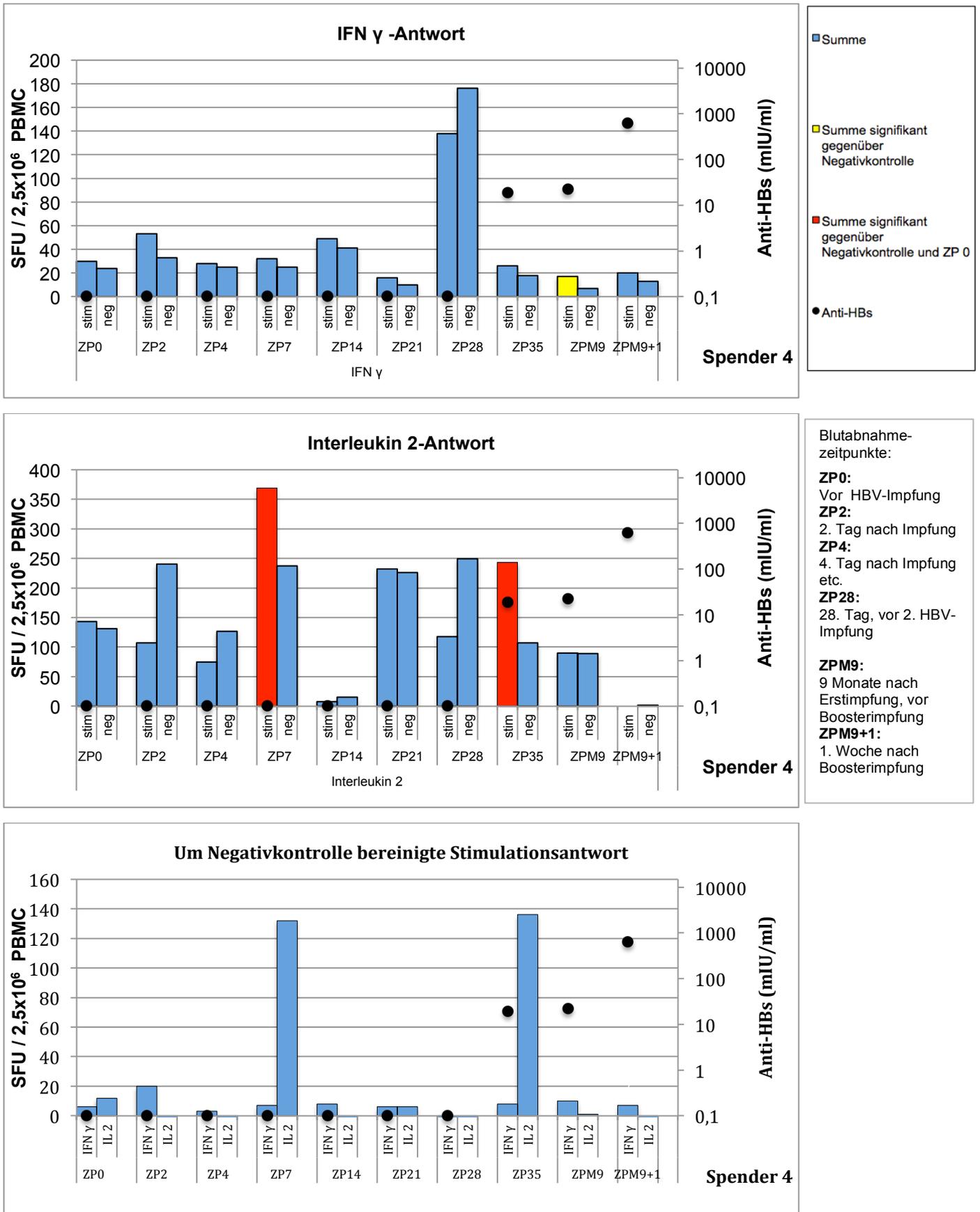


Abbildung 3.11: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

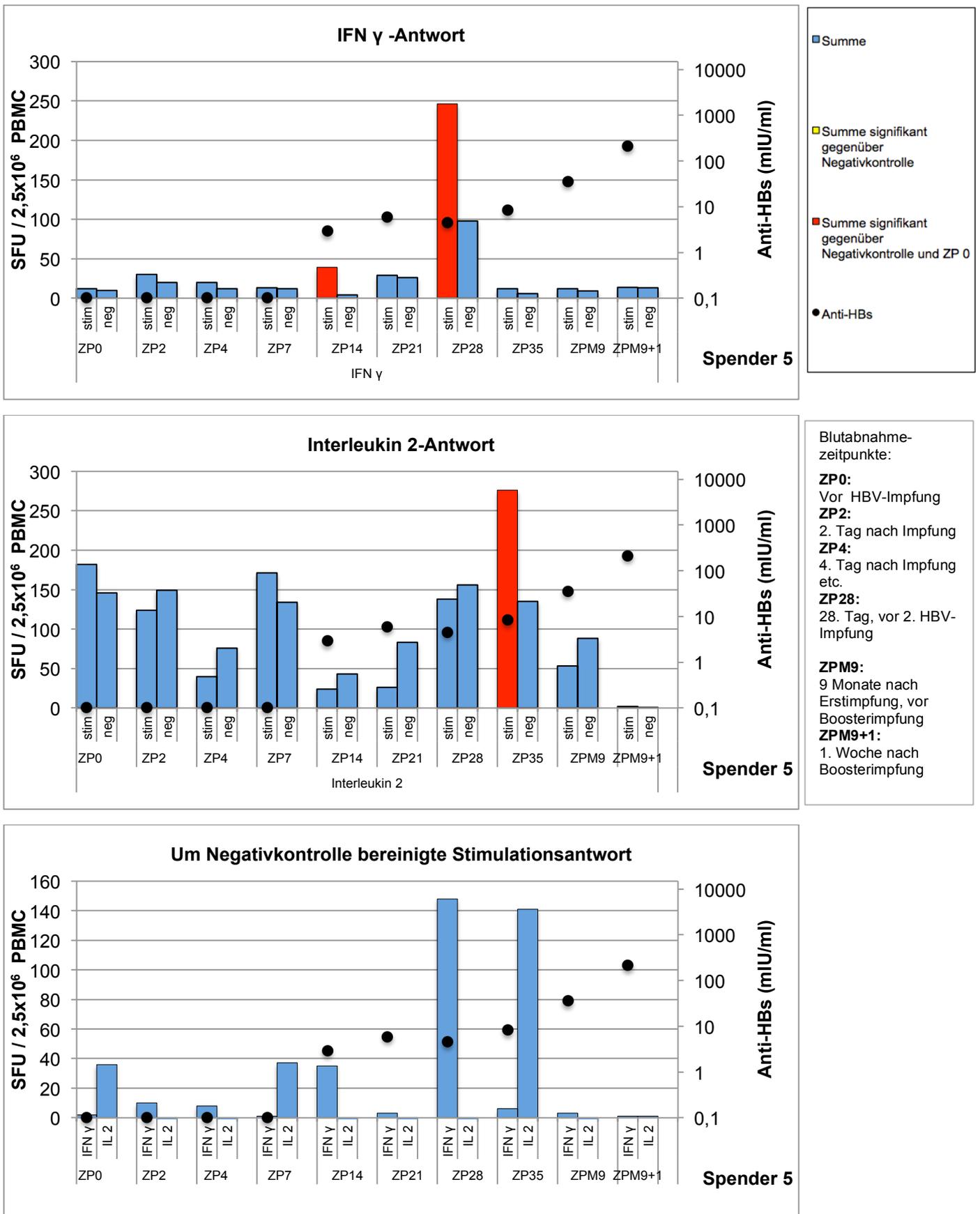


Abbildung 3.12: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

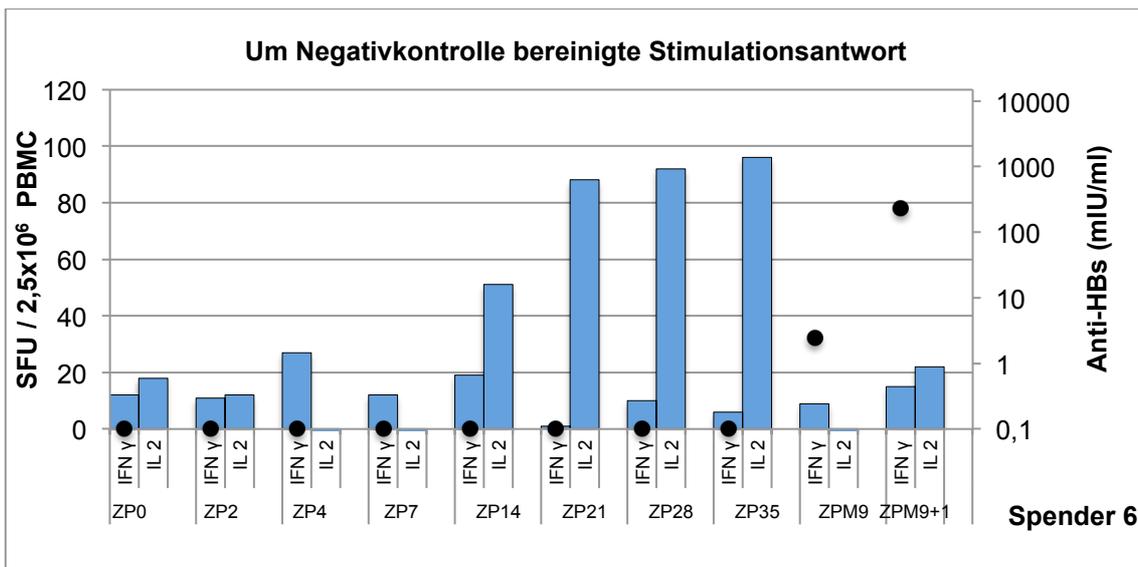
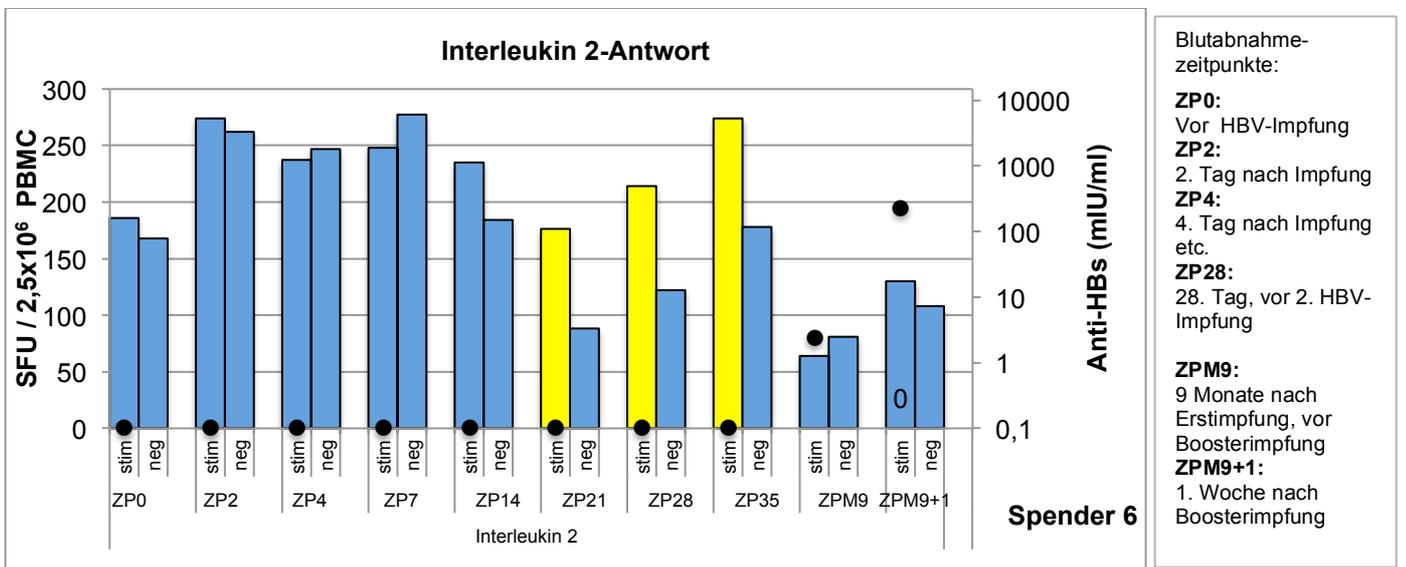
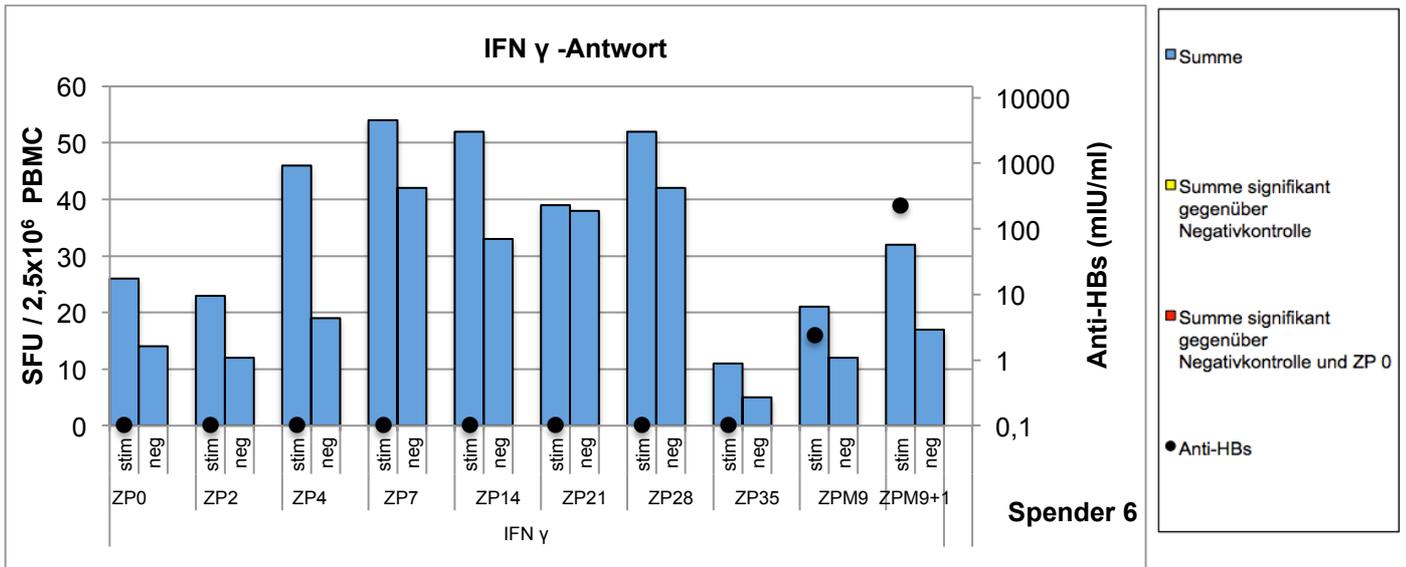


Abbildung 3.13: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

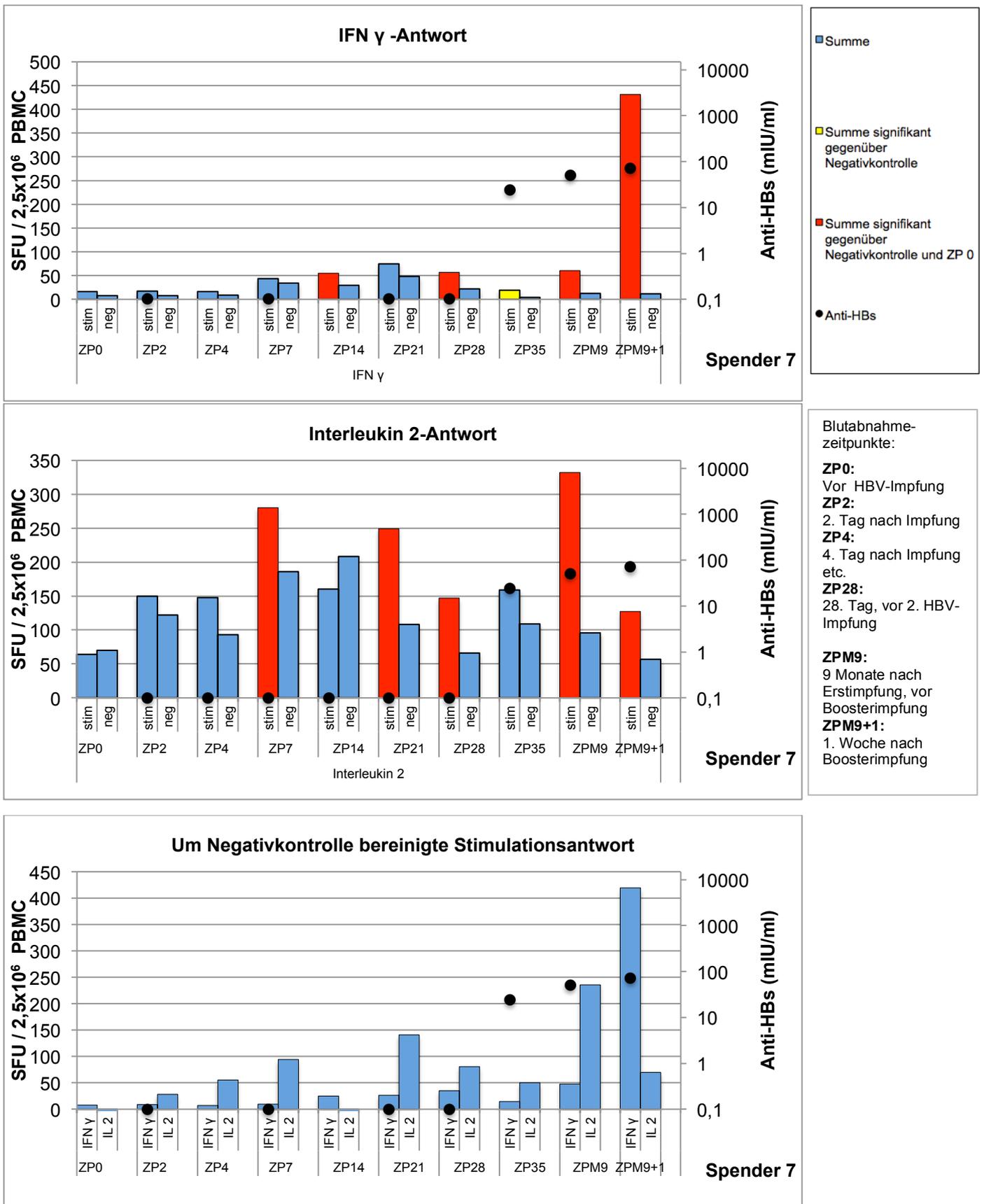
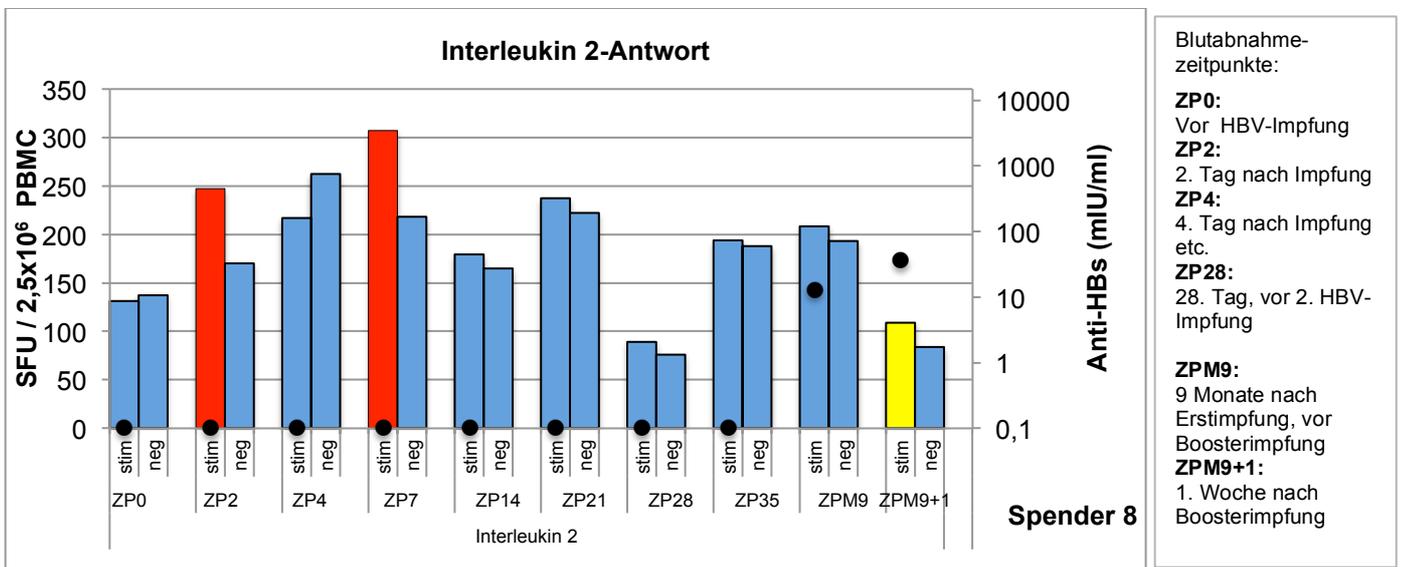
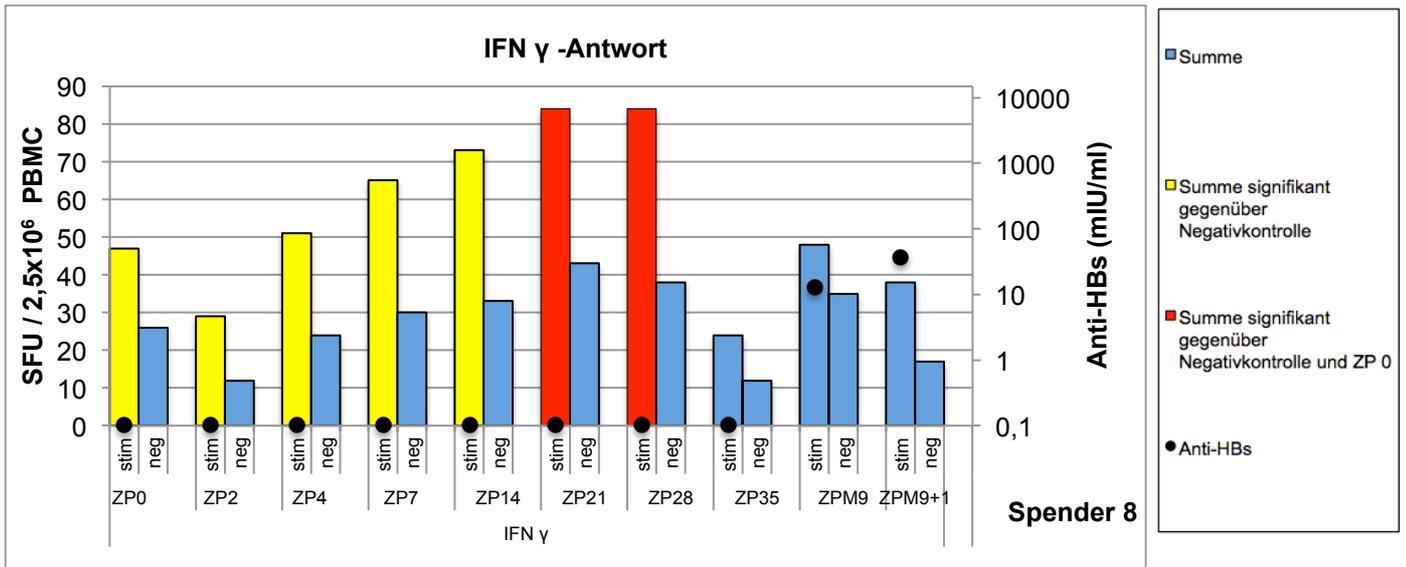


Abbildung 3.14: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.
 Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.



Blutabnahmezeitpunkte:
ZP0: Vor HBV-Impfung
ZP2: 2. Tag nach Impfung
ZP4: 4. Tag nach Impfung etc.
ZP28: 28. Tag, vor 2. HBV-Impfung
ZPM9: 9 Monate nach Erstimpfung, vor Boosterimpfung
ZPM9+1: 1. Woche nach Boosterimpfung

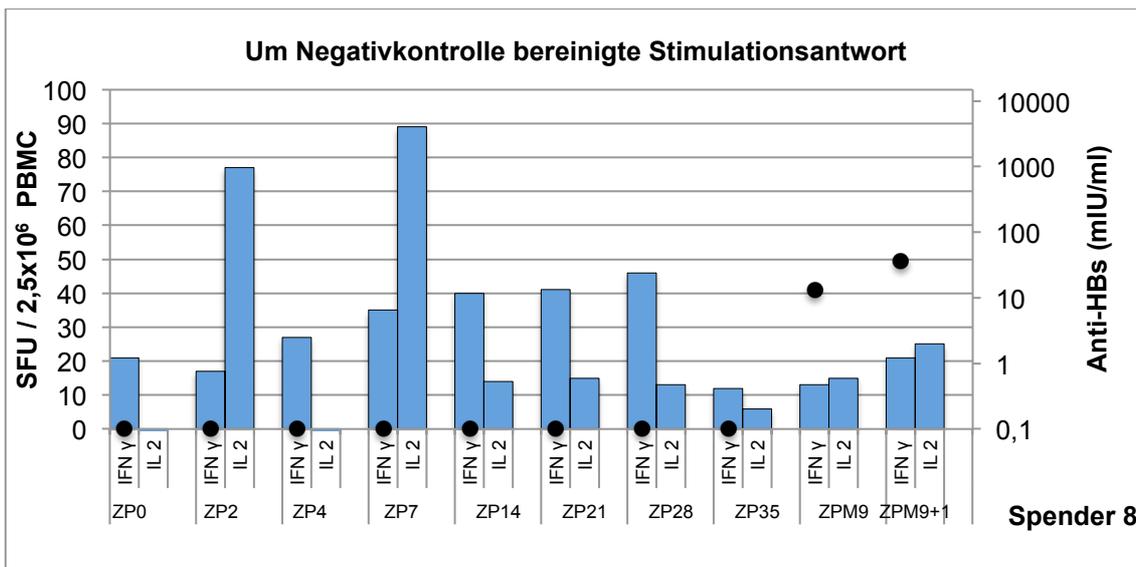


Abbildung 3.15: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

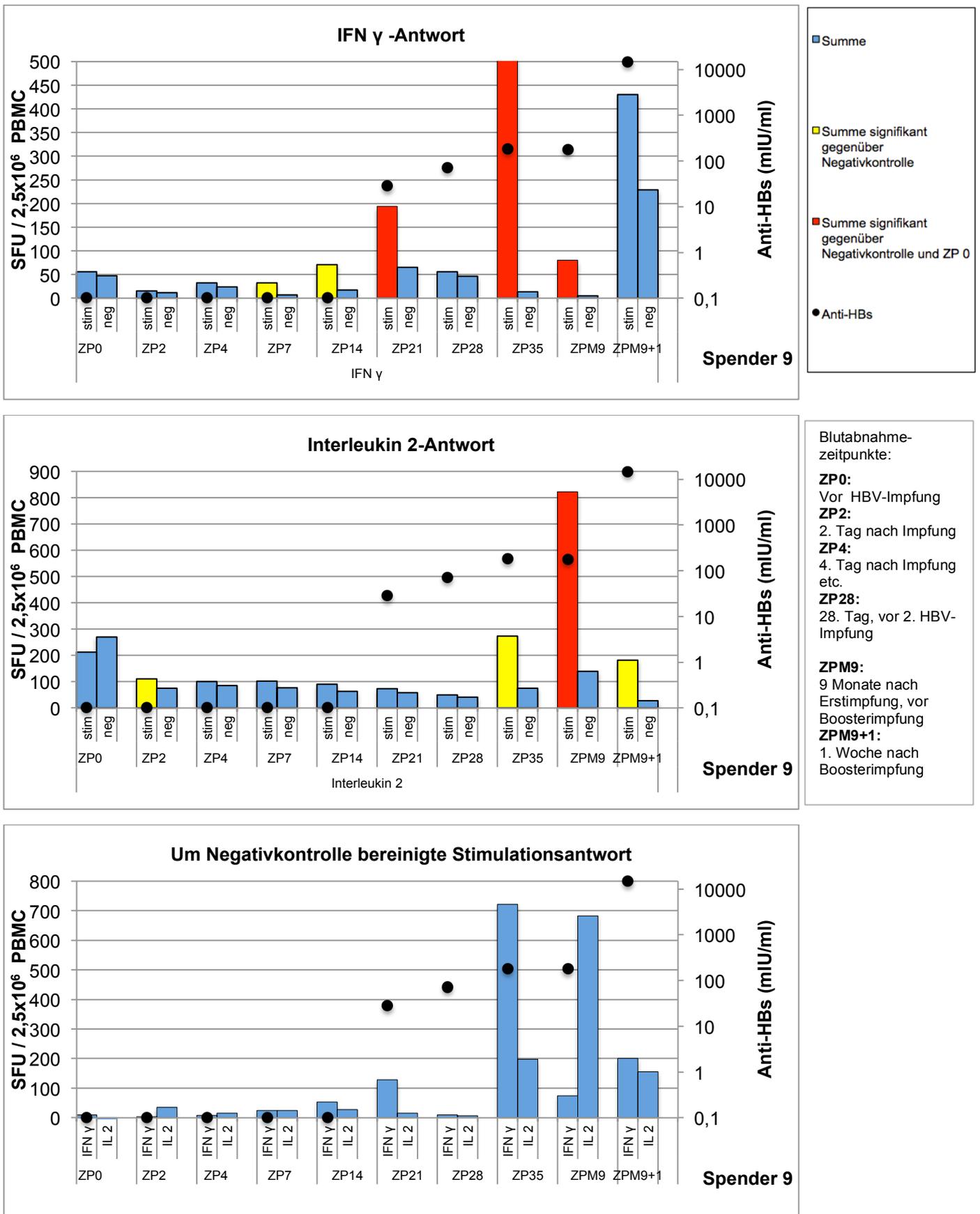


Abbildung 3.16: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

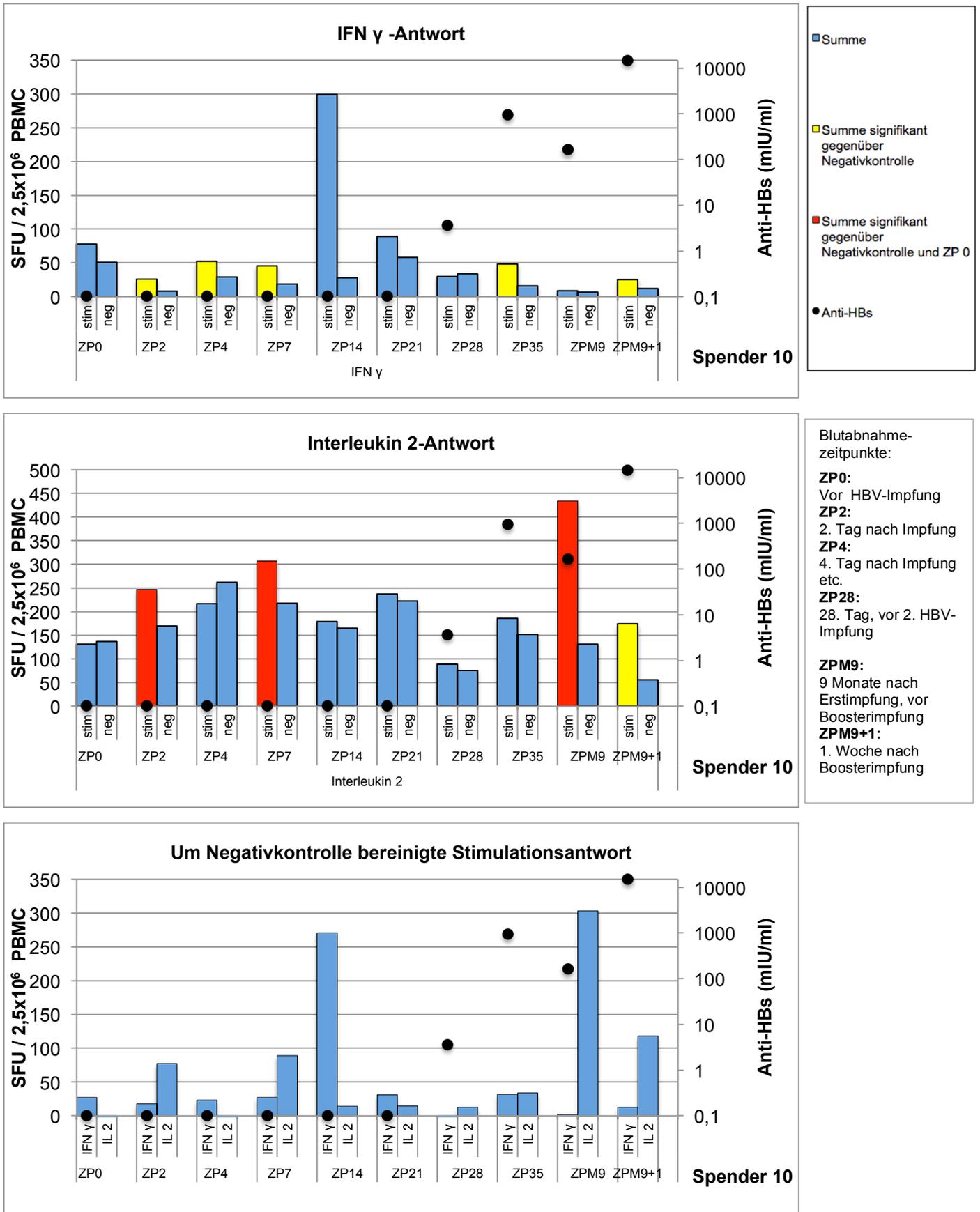


Abbildung 3.17: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

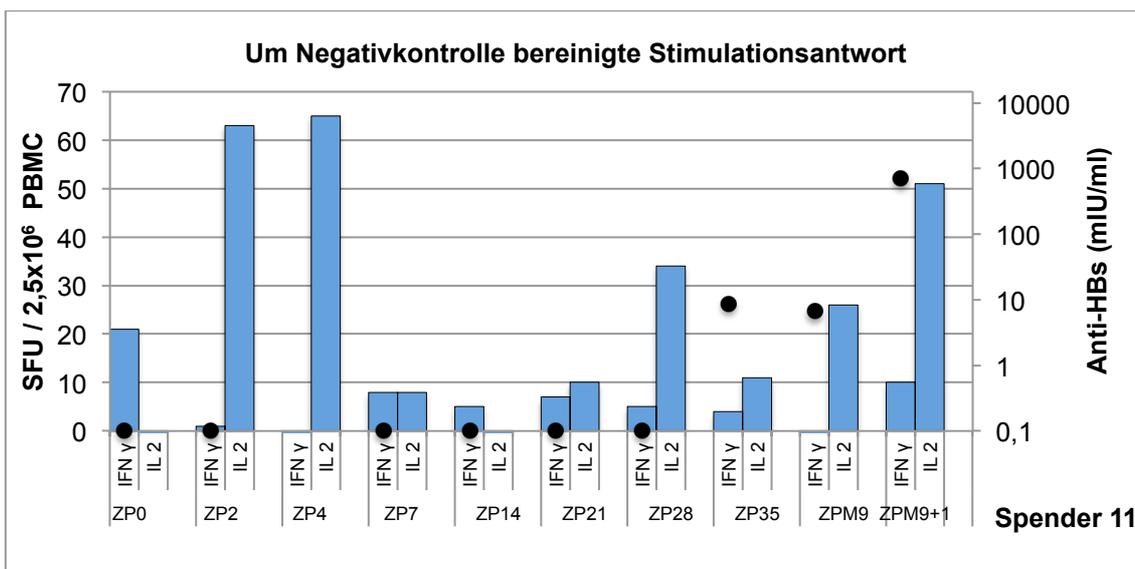
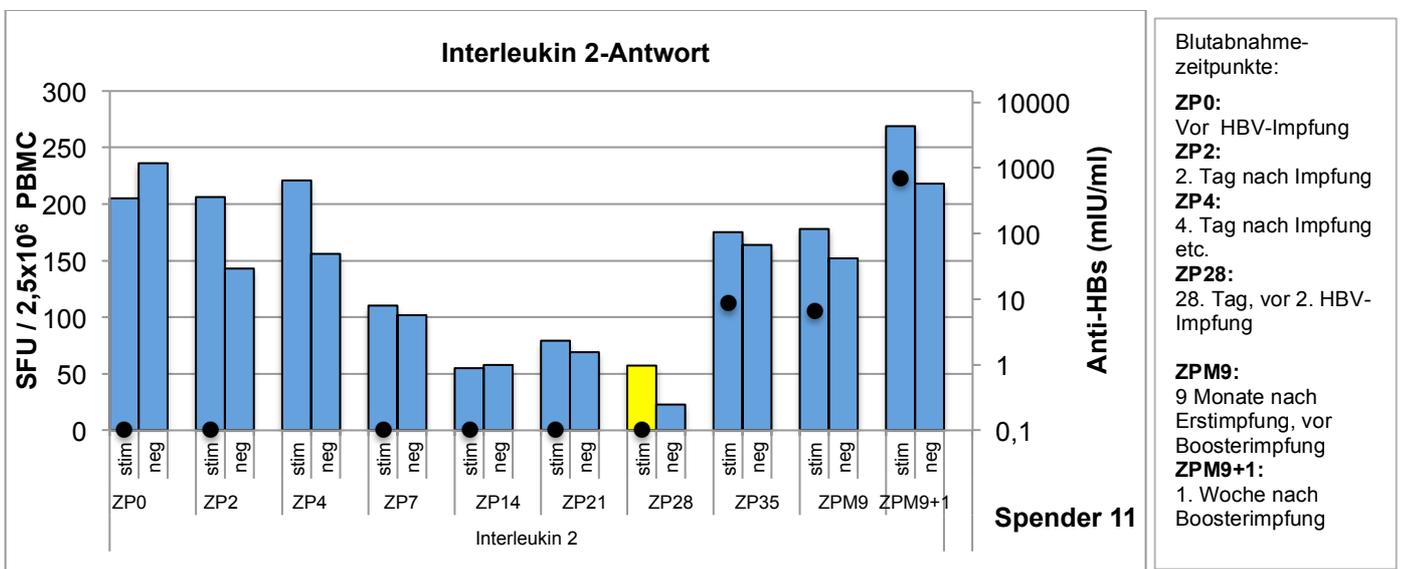
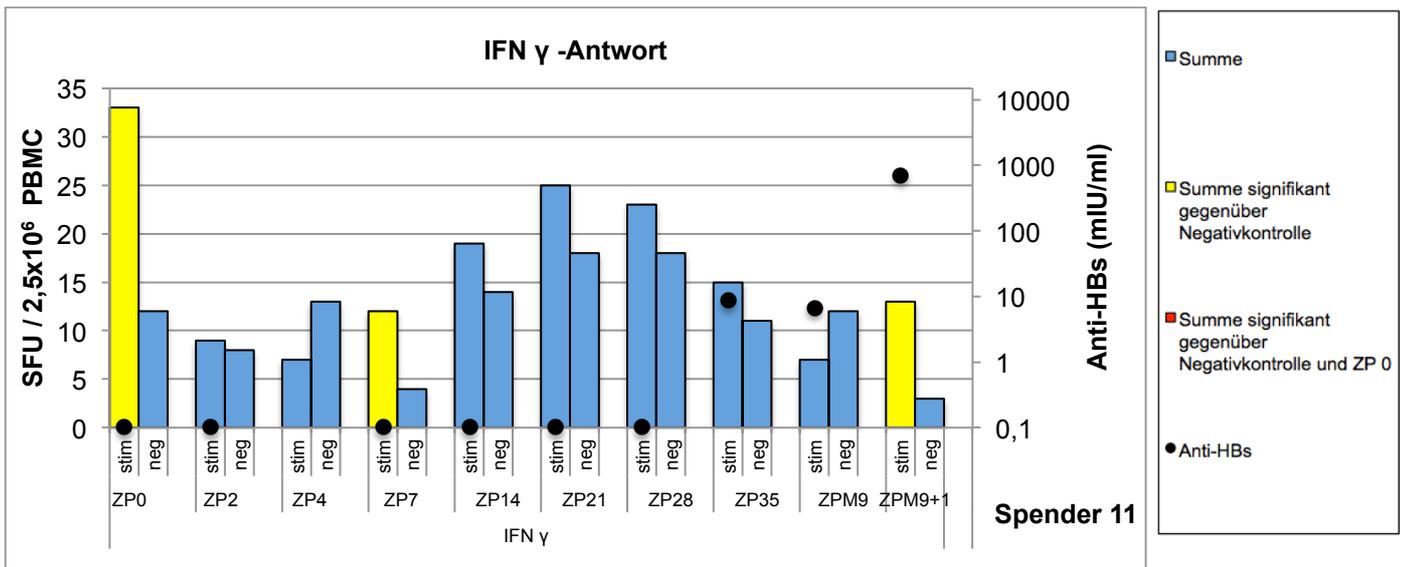


Abbildung 2.18: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

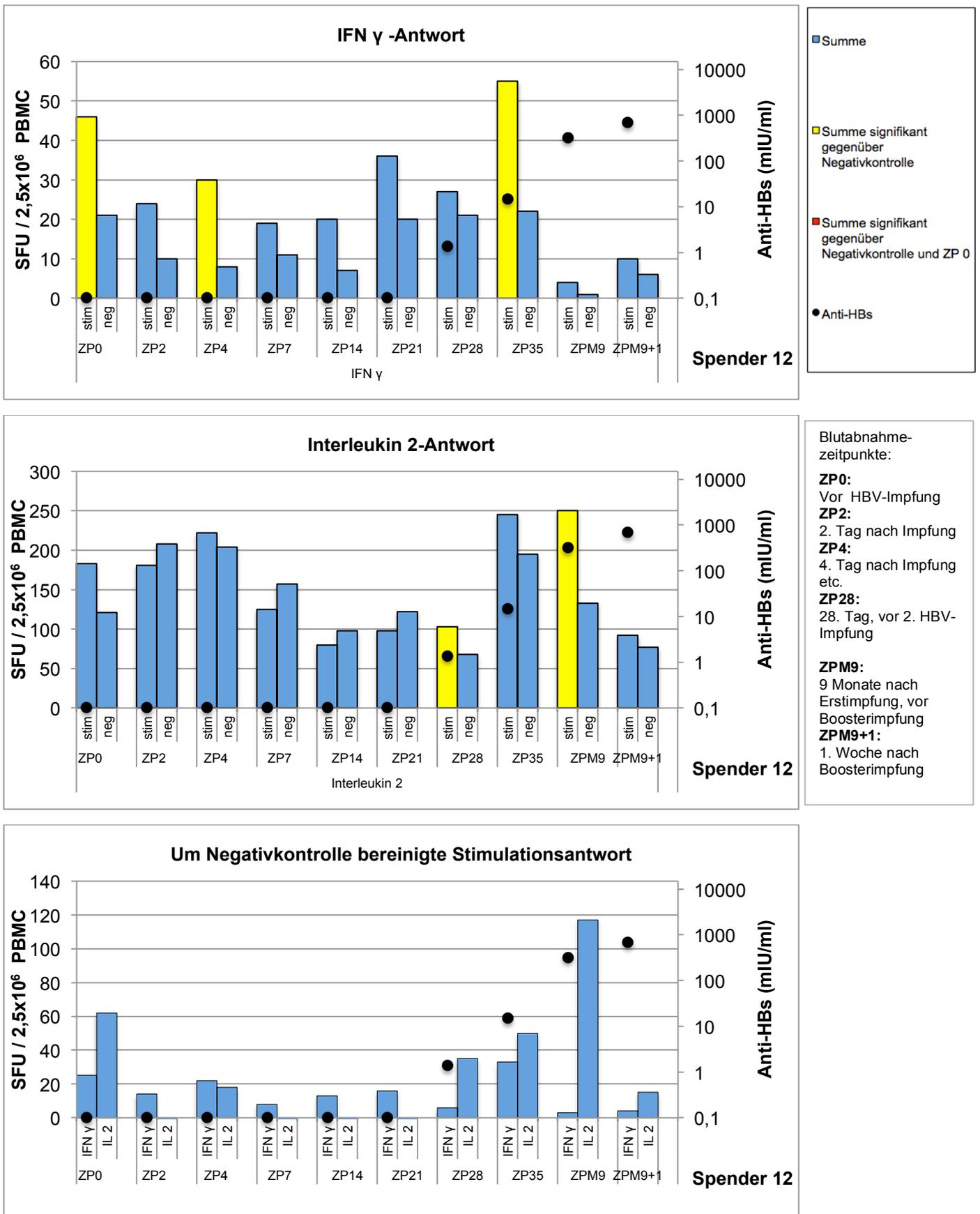


Abbildung 3.19: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

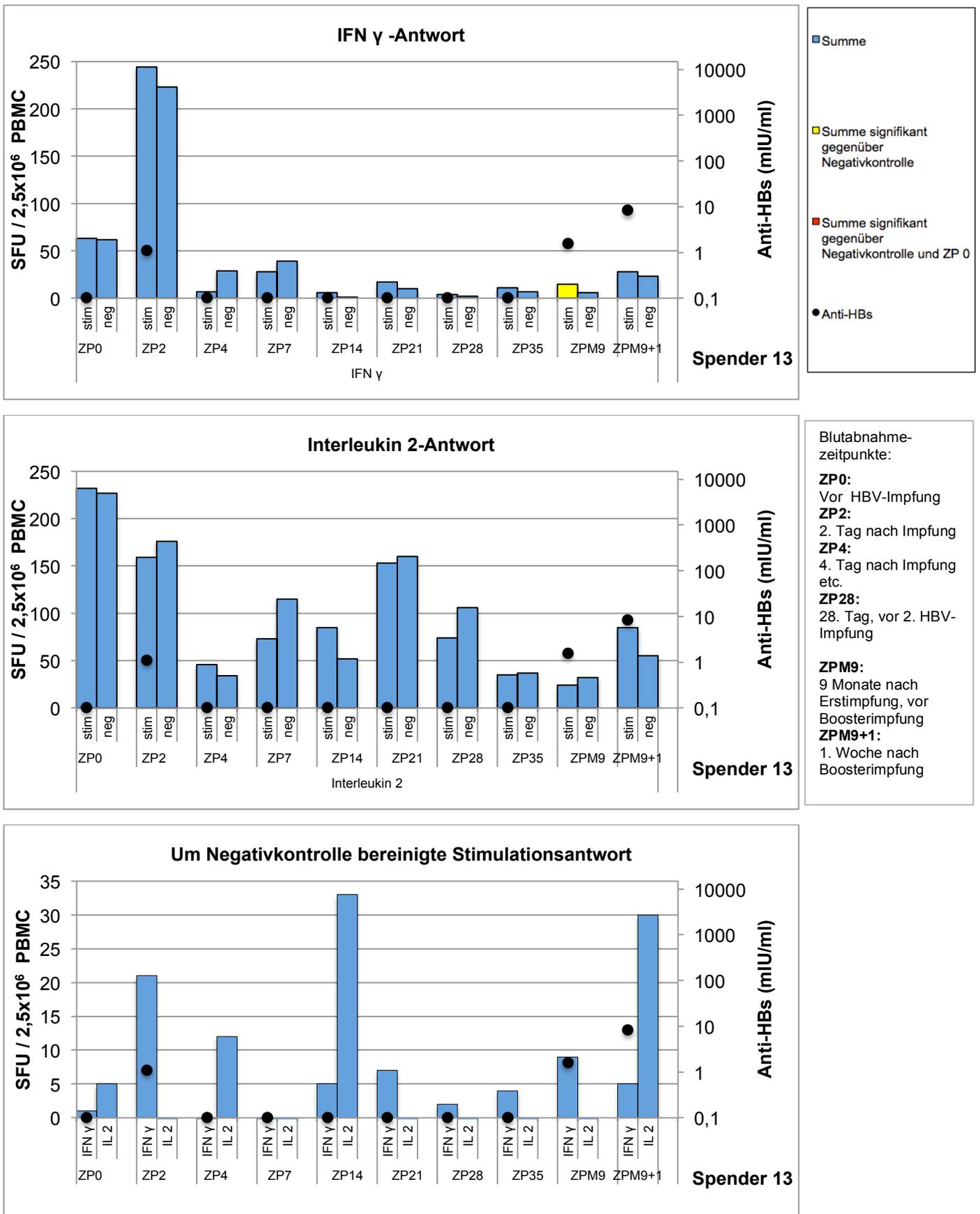


Abbildung 3.20: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

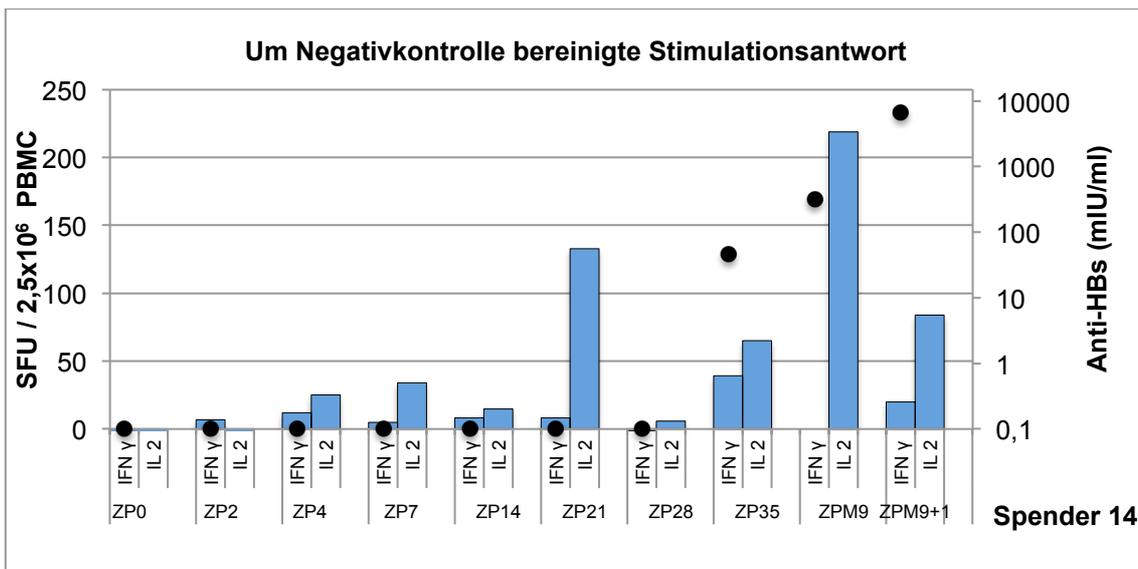
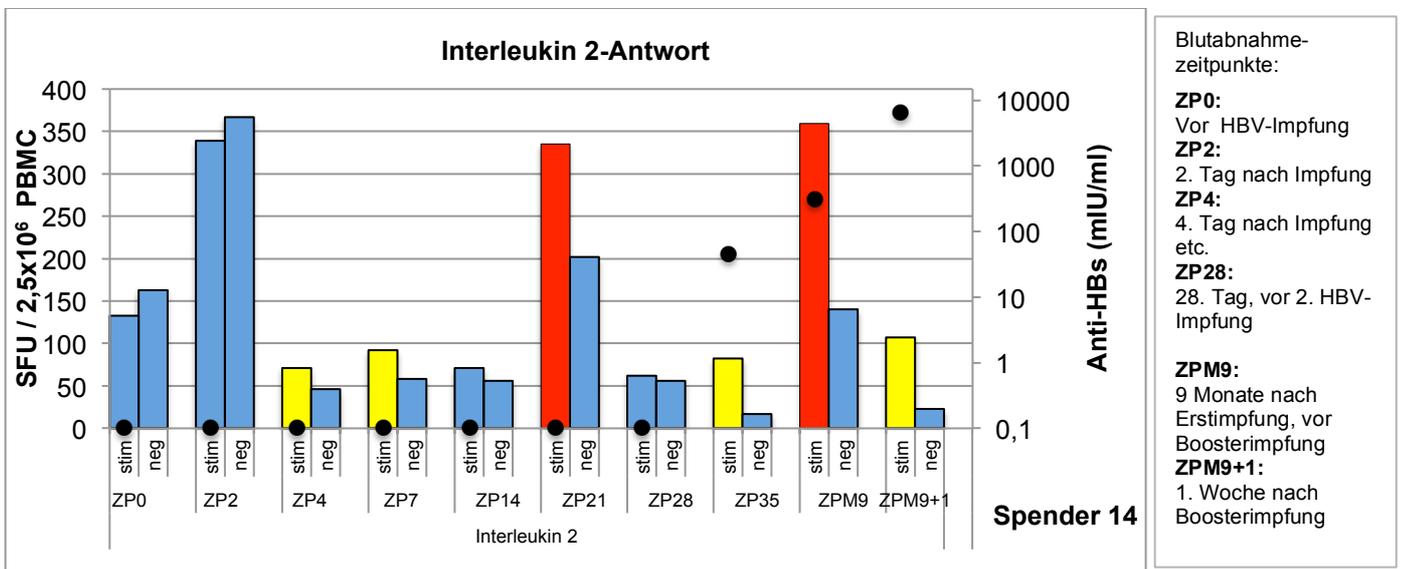
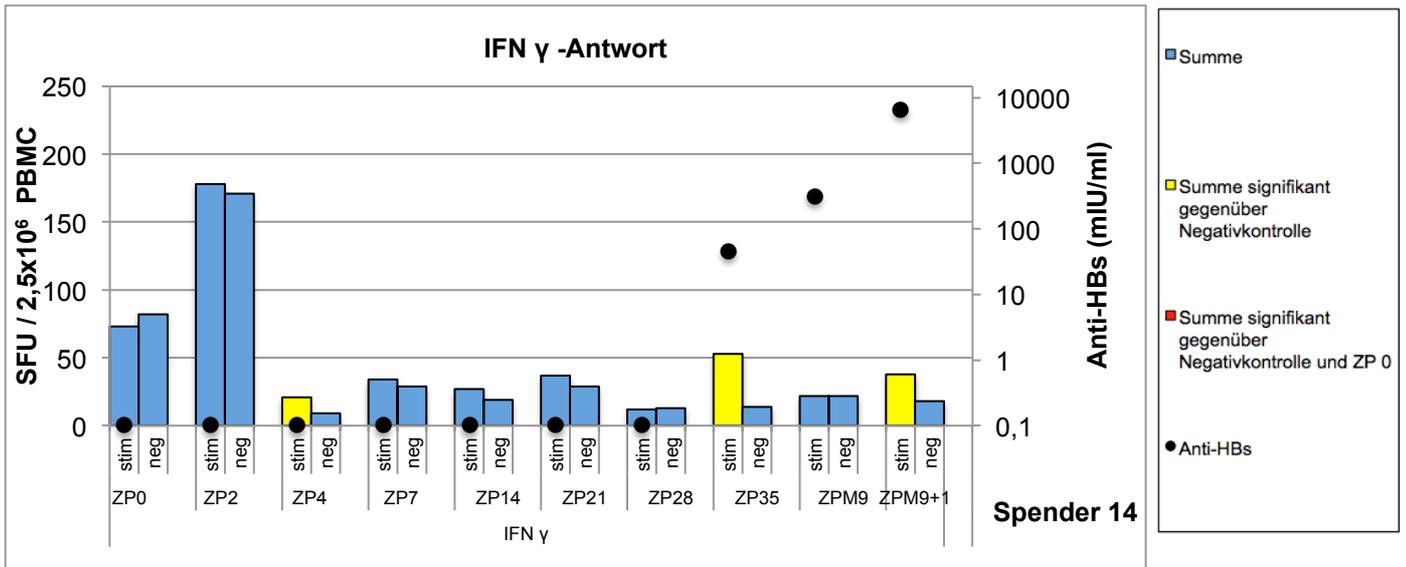


Abbildung 3.21: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

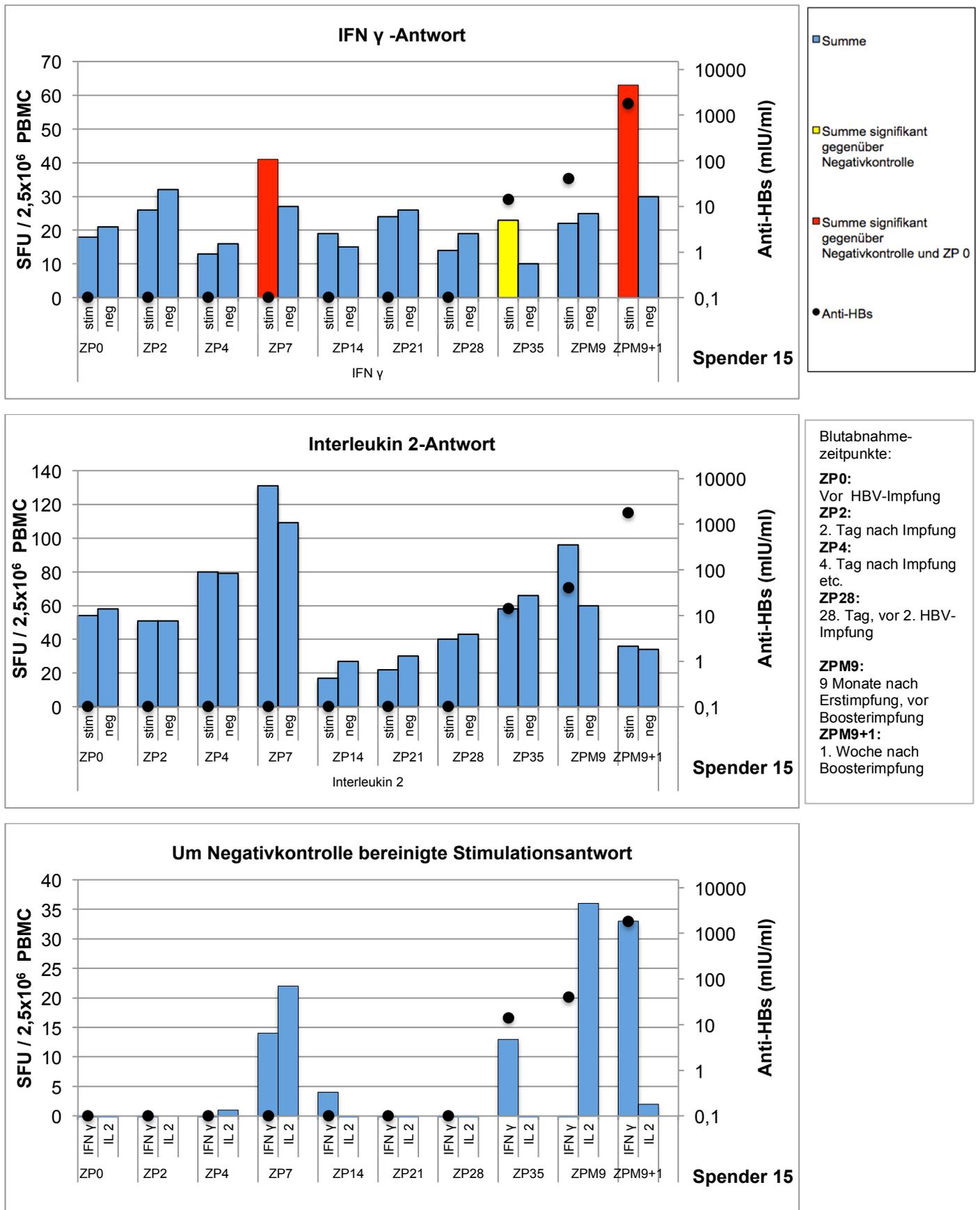


Abbildung 3.22: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

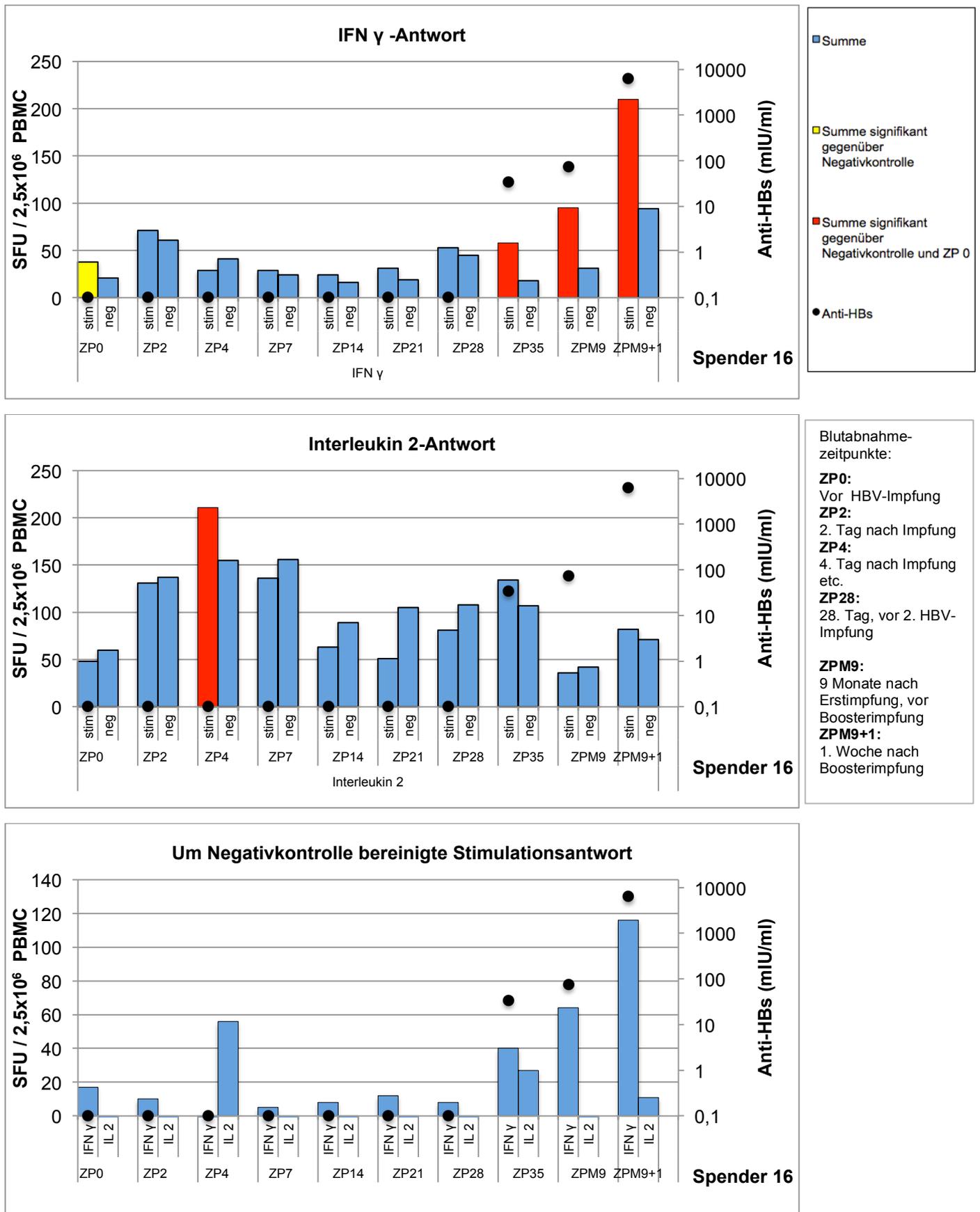


Abbildung 3.23: Spezifische zelluläre Antwort nach HBsAg-Stimulation von PBMC im Elispot.

Pro Zeitpunkt wurden 5×10^5 PBMC unter Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ HBsAg in fünf Replikaten angesetzt und für 24h (IFN γ) bzw. 72h (IL2) inkubiert. Die Simulationsantwort wird in spot forming units (SFU) wiedergegeben. Die Probe wurde als positiv gewertet, wenn der stimulierte Ansatz signifikant größer als die Negativkontrolle war (Balken gelb hinterlegt). Stimulierte Ansätze, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren, sind rot hinterlegt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des approximierten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

	ZP0*	ZP2	ZP4	ZP7	ZP14	ZP21	ZP28*	ZP35	ZPM9*	ZPM9+1
Sp 1	IFN γ /IL2	IFN γ *	IFN γ */IL2*	IL2*	n.u.	n.u.	IFN γ			IFN γ *
Sp 2				IL2*		IFN γ *	IFN γ *	IFN γ		
Sp 3	IFN γ		IFN γ	IFN γ /IL2	IFN γ		IFN γ /IL2	IL2*		
Sp 4				IL2*				IL2*	IFN γ	
Sp 5					IFN γ *		IFN γ *	IL2*		
Sp 6						IL2	IL2	IL2		
Sp 7				IL2*	IFN γ *	IL2*	IFN γ */IL2*	IL2	IFN γ */IL2*	IFN γ */IL2*
Sp 8	IFN γ	IFN γ /IL2*	IFN γ	IFN γ /IL2*	IFN γ	IFN γ *	IFN γ *			IL2
Sp 9		IL2		IFN γ	IFN γ	IFN γ *		IFN γ */IL2	IFN γ */IL2*	IL2
Sp 10		IFN γ /IL2*	IFN γ	IFN γ /IL2*				IFN γ	IL2*	IFN γ /IL2
Sp 11	IFN γ			IFN γ			IL2			IFN γ
Sp 12	IFN γ		IFN γ				IL2	IFN γ	IL2	
Sp 13									IFN γ	
Sp 14			IFN γ /IL2	IL2		IL2*		IFN γ /IL2	IL2*	IFN γ /IL2
Sp 15				IFN γ *				IFN γ		IFN γ *
Sp 16	IFN γ		IL2*					IFN γ *	IFN γ *	IFN γ *
Summe**	6	4	7	11	5	6	9	12	8	9

Tabelle 3-3: Statistisch signifikante Nachweise von IFN γ und IL2 nach primärer Immunisierung

* Messung einer Zytokinaktivität, die signifikant größer als die Negativkontrolle und als der stimulierte Ansatz zum Zeitpunkt 0 waren,

**Summe der signifikanten zellulären Aktivitäten zum jeweiligen Zeitpunkt

+ Tage an den eine Impfdosis appliziert wurde

Graue Schattierung: Erstnachweis einer signifikanten zellulären Aktivität des jeweiligen Probanden

ZP0 = Tag der ersten Impfung, ZP2 = Tag 2 nach Impfung, etc.; ZPM9 = 9 Monate nach Impfung, ZPM9+1 = 9 Monate und eine Woche nach Erstimpfung

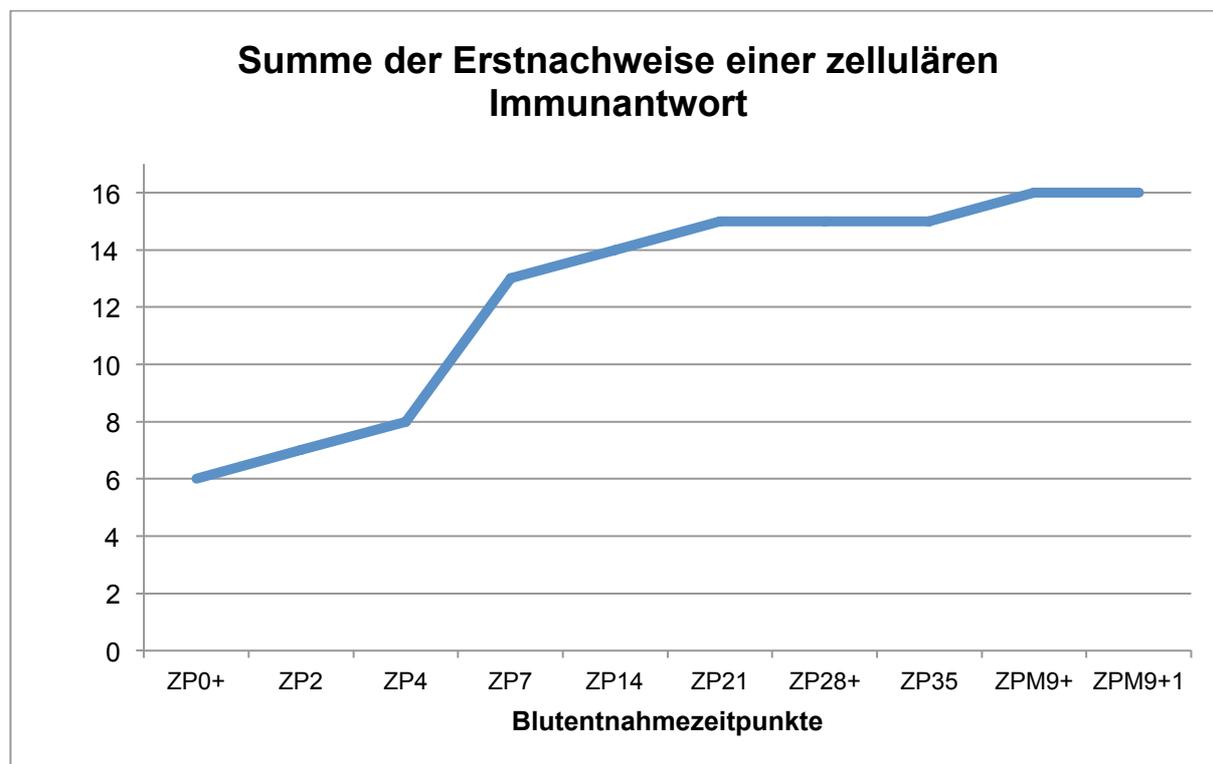


Abbildung 3-24: Graphische Darstellung der Tabelle 3.3

Gezeigt wird die Summe aller Erstnachweise einer signifikanten zellulären Aktivität zum jeweiligen Zeitpunkt ab ZP0. Bei 16 Spendern ist der Maximalwert daher 16. Somit konnten am Tag 7 nach der ersten HBV-Impfdosis bei 13 von 16 Spendern (81%) bereits eine zelluläre Zytokinaktivität nachgewiesen werden. (+) Tage an den eine Impfdosis appliziert wurde

Unter den 16 Probanden, deren Blut während der Grundimmunisierung im Verlauf von 9 Monaten untersucht wurde, kristallisierte sich kein Sekretionsprofil von IFN γ und Interleukin 2 heraus, welches allen Teilnehmern gemein wäre.

In sechs Fällen konnte bereits vor Immunisierung eine eindeutige IFN γ -Aktivität nachgewiesen werden (Probanden 1, 3, 8, 11, 12, 16). Eine spezifische IL2-Aktivität konnte nur bei einem der Probanden (Proband 1) unmittelbar vor der Impfung beobachtet werden. Acht Probanden zeigten innerhalb von 96 h nach der ersten Impfung eine spezifische Zytokinaktivität: zwei waren nur IFN γ -positiv (Nr. 3, 12), zwei nur IL2-positiv (Nr. 9, 16), vier wiesen sowohl IFN- γ - als auch IL2-produzierende Zellen auf (Nr. 1, 8, 10, 14). Sechs dieser Teilnehmer zeigten bereits vor der ersten Impfung eine spezifische IFN- γ - (3, 8, 11, 12, 16) bzw. eine spezifische IFN- γ - und IL2- (1) Reaktion. Nach 7 Tagen konnte bereits bei 13 von 16 Teilnehmern (81%) eine spezifische zelluläre Immunantwort nachgewiesen werden. Die drei verbliebenen Probanden zeigten eine erste zelluläre Reaktion am Tag 14 (Nr. 5, IFN γ), Tag 21 (Nr. 6, IL2) bzw. im Monat 9 (Nr. 13, IFN γ). Damit ließ sich bei allen Teilnehmern der Nachweis einer HBsAg-spezifischen zellulären Reaktion erbringen. Dreizehn der 16 Probanden zeigten sowohl IFN- γ - als auch IL2-Aktivitäten. Bei zwei Teilnehmern (Nr. 13, 15) konnten nur IFN- γ -sezernierende Zellen nachgewiesen werden, Proband Nr. 6 zeigte nur IL2-Aktivität. Fasst man IFN- γ - und IL2-Aktivitäten zusammen, so zeigen sich Gipfelpunkte der Aktivitäten am Tag 7 (11 Teilnehmer positiv, 14 positive Einzelwerte) und am Tag 35 (eine Woche nach der zweiten Impfung: 12 Teilnehmer positiv, 14 positive Einzelwerte) (Tabelle 3.3).

Die Abbildungen 3.25 - 3.26 verdeutlichen den zeitlichen Bezug des Erstnachweises einer zellulären Immunantwort nach HBV-Impfung zum Auftreten von Anti-HBs. Die Graphen zeigen jeweils für IFN γ und Interleukin 2, dass eine zelluläre Reaktivität einer Ausbildung von Antikörpern deutlich vorausgeht.

Abbildung 3.27 zeigt die zeitliche Entwicklung der zellulären und humoralen Antwort der gesamten Studiengruppe. Hierbei wurde die Summe aller signifikanten Nachweise von IFN γ , IL2 und Anti-HBs von allen Spendern für den jeweiligen Zeitpunkt aufsummiert. Aus der Graphik ist unmittelbar ersichtlich, dass IFN γ in der frühen zellulären Immunantwort das dominierende Zytokin ist. Hinzu tritt dann

Interleukin 2. Erst ab Tag 14 ist ein Anstieg der humoralen Immunantwort zu verzeichnen.

Das Zytokinprofil von Spender 13 gilt es besonders hervorzuheben. Einzig nach neun Monaten ist eine statistisch signifikante, aber dennoch sehr niedrige IFN γ einmalig nachzuweisen. Auch Anti-HBs ist erstmals zu diesem Zeitpunkt messbar. Das restliche Zytokinprofil zeigt lediglich unspezifische Aktivitäten. Hierunter sind auch überhöhte Negativkontrollen zu verzeichnen. Bei dem Spender handelte es sich um eine 56-jährige Frau ohne nennenswerte Vorerkrankungen.

Erstnachweis einer spezifischen zellulären Antwort im zeitlichen Bezug zum Auftreten einer ersten humoralen Antwort

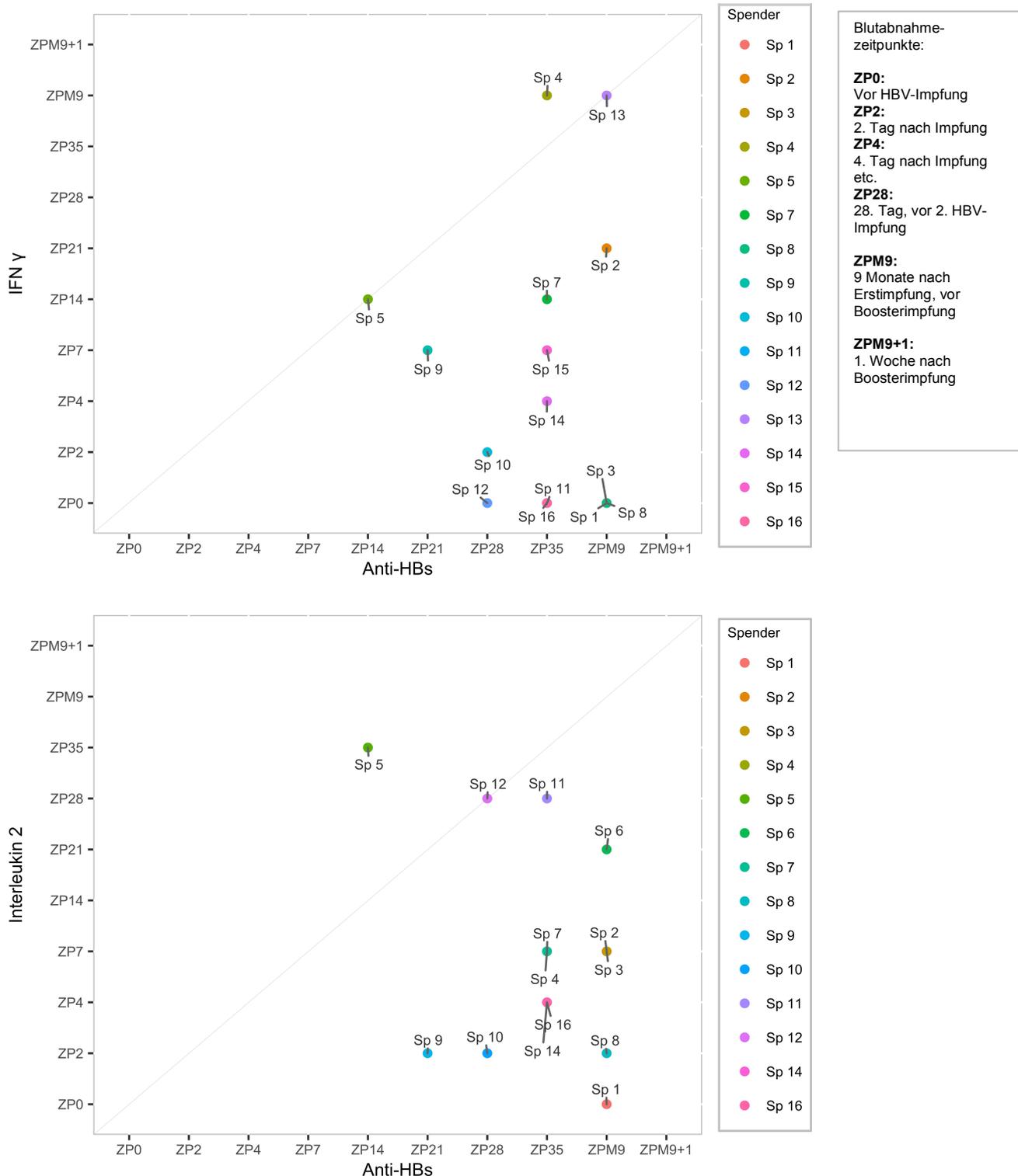


Abbildung 3-25 und 3-26: Zeitlicher Bezug der Ausbildung von Anti-HBs zum Erstnachweis einer zellulären Antwort (IFN γ / Interleukin2) zur humoralen Antwort.

Alle Datenpunkte hoben sich signifikant von der Negativkontrolle ab, die Signifikanz zum ZP0 wurde nicht geprüft. Bei Spender 6 konnte keine signifikante IFN γ -Sekretion nachgewiesen werden. Spender 13 / 15 blieben ohne Nachweis einer signifikanten Interleukin 2-Sekretion.

Ein eindeutiges Zytokinmuster, das der zellulären Reaktion aller Probanden gemein wäre, ließ sich nicht erkennen. Dennoch kristallisierte sich unter einigen Probanden die Tendenz zu einem diskreten Muster heraus. Den Probanden Nr. 2, 7, 9 und 16 war gemein, dass zunächst nur eine IL2-Sekretion zu messen war. Meist eine Woche später folgte darauf eine IFN γ -Aktivität, worauf sich sukzessive eine humorale Antwort entwickelte.

Die Anzahl der zytokinsezernierenden PBMC im Elispot variierte zwischen den Spendern stark. Demnach lag die Frequenz HBs-Ag spezifischer PBMC bei durchschnittlich $12,3 / 10^5$ PBMC (2,5 - 47,9 / 10^5 PBMC).

3.2.3 Hintergrundaktivität und überschießende Negativkontrollen

In der Vorstudie wie in der eigentlichen Untersuchung konnten zum Teil unspezifische Zytokinaktivitäten gemessen werden, die höher waren als die Aktivitäten nach spezifischer Stimulation. Dieses Phänomen war vor allem beim Interleukin 2 sehr ausgeprägt. Geringfügige Unterschiede lassen sich mit durch die Schwankungsbreite bei insgesamt kleinen Zahlen der zytokinsezernierenden Zellen erklären, für die in einigen Fällen aber sehr deutlichen Unterschiede mit signifikant höheren Werten in der Negativkontrolle (wie z.B. bei den Spendern 3, 4, B1, B2, B3) muss man wohl andere Ursachen annehmen, auf die in der Diskussion eingegangen werden soll.

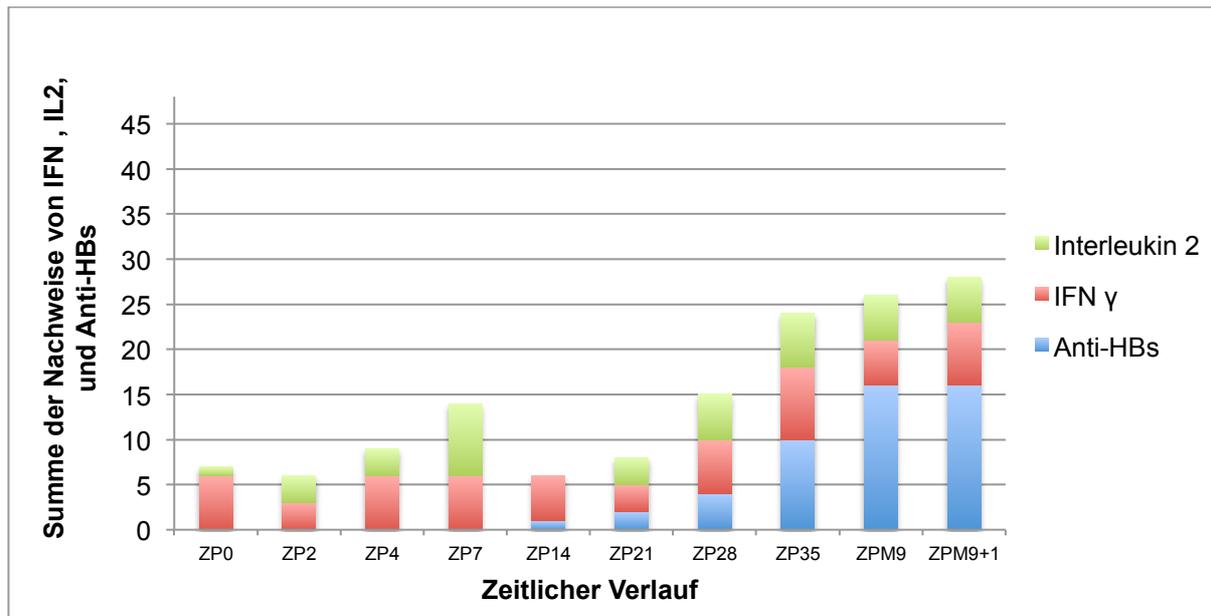


Abbildung 3-27: Zeitliche Entwicklung der zellulären und humoralen Immunantwort.

Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die signifikanten Nachweise von IFN γ , Interleukin 2 und Anti-HBs von allen Spendern aufsummiert.

Blutabnahmezeitpunkte: ZP0: Tag 0 vor HBV-Impfung; ZP2: 2. Tag nach Impfung; ZP4: 4. Tag nach Impfung etc.

4 Diskussion

4.1 Der Elispot Assay als geeignete Methodik zum Nachweis einer frühen zellulären Immunantwort nach HBV-Impfung

Für die HBV-Impfung konnte gezeigt werden, dass nach Exposition mit dem Hepatitis-B-Virus durch eine aktive Impfung Infektionen verhindert werden können. Als protektiv gilt das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern (Anti-HBs) nach HBV-Impfung. Dennoch könnte ein früher Impfschutz auch ohne Nachweis von Anti-HBs zu bestehen. Bislang wurden insbesondere keine Untersuchungen der frühen zellulären Immunantwort nach Hepatitis-B-Impfung durchgeführt (vgl. Abbildung 4.1). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer frühen zellulären Immunantwort nach HBV-Impfung.

Trotz großer Bemühungen die zelluläre Immunität nach HBV-Impfung zu charakterisieren, gibt es bislang keine Daten zur zellulären Immunantwort innerhalb der ersten 4 Wochen nach HBV-Impfung. Einzelne Studien betrachteten jedoch bereits die spezifische zelluläre Aktivität nach Abschluss der HBV-Grundimmunisierung (18-24). Hierbei kamen verschiedene Methoden zum Einsatz: Proliferation Assay, Elispot, *fluorescence activated cell sorting* (FACS). Der Literatur war zu entnehmen, dass das Vorkommen von HBsAg spezifischen T-Lymphozyten mit einer Häufigkeit von $1,66-3,44 / 10^5$ PBMC angegeben wird (25). Über die Sensitivität der unterschiedlichen Methoden konnten nur wenige Angaben in der Literatur gefunden werden. Die Sensitivität des Elispot wird mit $1/300.000$ angegeben (24). FACS unterstützte Methoden (*intrazelluläres Staining, Cytokine Secretion Assay*) werden mit einer Sensitivität von $1/1000$ bis $1/5000$ angegeben (Desombere et al. 2004; Herstellerangaben von Miltenyi, Bergisch Gladbach). Aufgrund der höheren Sensitivität wurde für diese Arbeit der Elispot-Assay gewählt. Als Nachteil des Elispot gegenüber dem Cytokine Secretion Assay ist zu nennen, dass Zytokin sezernierende Zellen nicht weiter an Hand der Oberflächenantigene analysiert werden können.

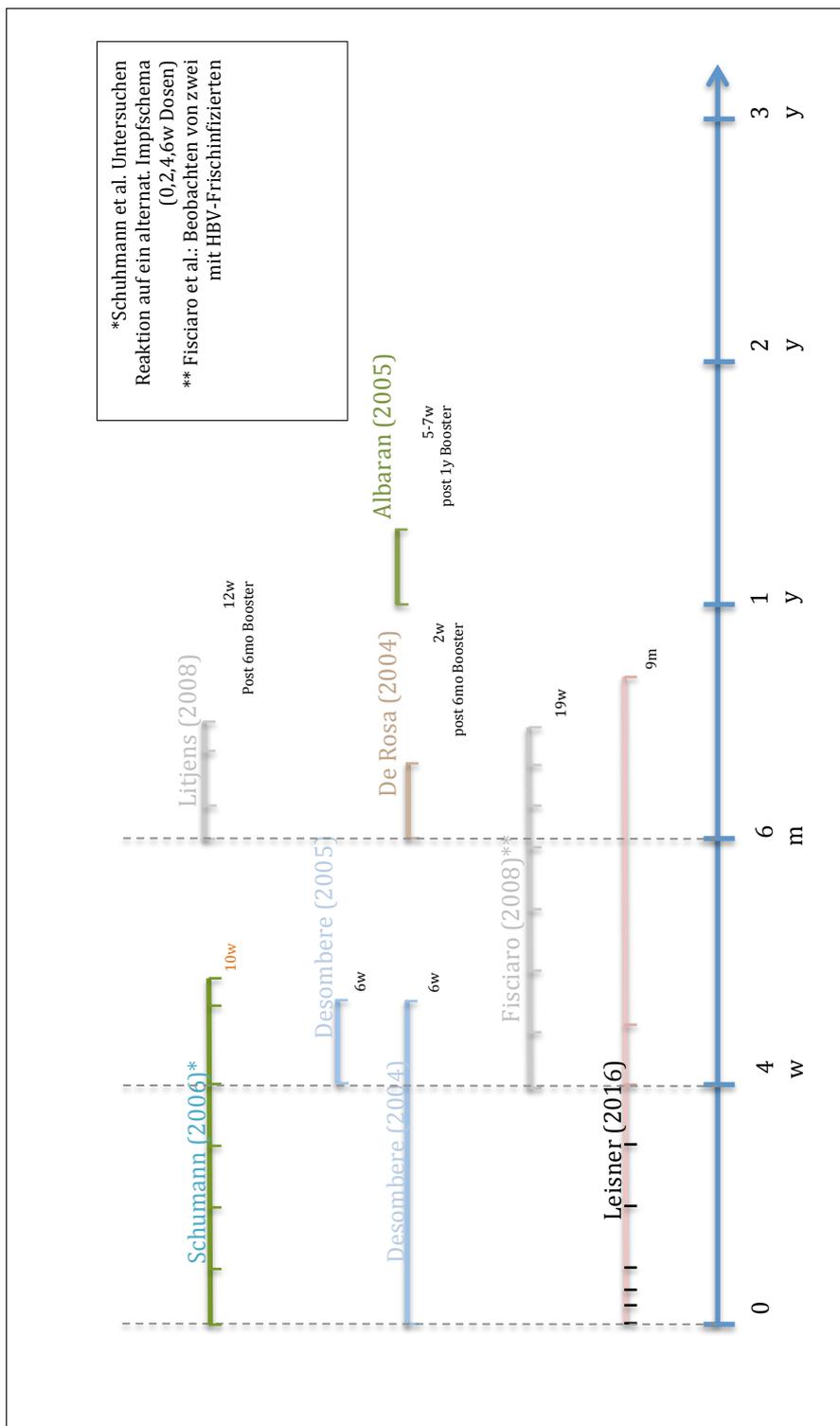


Abbildung 4.1: Graphische Literaturübersicht

Zeitlich wird der Untersuchungszeitraum nach Erstimpfung und die Untersuchungszeiträume der Studien abgetragen. Die vertikalen gestrichelten Linien markieren die Zeitpunkte der Impfungen. Vertikale Markierungen der Studienzeiträume verdeutlichen die Zeitpunkte der Blutentnahmen. In dieser Arbeit wurde abweichend die Boosterimpfung nach 9 Monaten appliziert.

Desombere und Mitarbeiter (2004) konnten eindrucksvoll zeigen, dass die IFN γ -Sekretion von PBMC nicht selbstverständlich T-Lymphozyten zugeordnet werden können. Ein Großteil (80%) der IFN γ produzierenden Zellen war den NK-Zellen (CD56⁺/CD8⁻) zuzuordnen. Nur 4,2% der aktivierten Zellen waren Th-Zellen. Des Weiteren konnten auch zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde daher auf die weitere Fraktionierung der PBMC mittels *magnetic activated cell sorting* (MACS) verzichtet. Es sollten so keine Zellpopulation im Vorhinein von der Messung ausgeschlossen werden. Die *ex vivo* gewonnenen PBMC sollten möglichst wenig durch etwaige Aufbereitung manipuliert werden und im sensitiven Elispot vermessen werden. Aus denselben Beweggründen wurde auf eine Kryokonservierung der PBMC verzichtet.

De Rosa und Mitarbeiter konnten erstmals zeigen, dass IFN γ keineswegs das alleinig vorherrschende Zytokin der T-Zellen nach Stimulation mit rekombinantem HBsAg ist(19). De Rosa et al. untersuchten die Zytokinsekretion von T-Zellen nach abgeschlossener HBV-Grundimmunisierung bzw. nach HBV-Boosterimpfung mittels intrazellulärer Färbung von PBMC im FACS. Überraschender Weise sezernierte ein Großteil der CD4⁺-T-Zellen Interleukin 2 und nicht IFN γ . Litjens und Mitarbeiter gelang es CD4⁺-T-Effector-Memory-Zellen (T_{em}) zu identifizieren, die sich durch die Sekretion von Interleukin 2 auszeichneten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Zellen und die Sekretion von Interleukin 2 entscheidend bei der Differenzierung von Memory-B-Lymphozyten zu Anti-HBs produzierenden Plasmazellen sind(26). Die Wahl der zu untersuchenden Zytokine in der hier vorliegenden Studie fiel daher auf Interferon γ und Interleukin 2.

4.2 Überschießende Negativkontrollen

Jedes hoch sensitive Testverfahren birgt die Gefahr von unspezifischen Messungen. Dies gilt auf für das Elispot Assay. Auch für diese Studie wurden große Bemühungen betrieben eine unspezifische Aktivierung der PBMC zu verhindern und somit letztlich die Höhe der Negativkontrollen möglichst gering zu halten. Dennoch konnte bei vielen Spendern unspezifische Zytokinaktivitäten beobachtet werden. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür dürften inapparente Infekte sein, die zu einer ausgeprägten Zytokininduktion führten. Interleukin 2 schien hiervon häufiger als Interferon γ betroffen zu sein.

Ebenso unklar ist das allerdings deutlich seltener auftretende Phänomen, dass in einigen Fällen die Negativkontrollen wesentlich höher als die stimulierten Proben ausfielen (vgl. 3.2.3). Einzig eine aktive Inhibition des stimulierten Ansatzes könnte dafür eine mögliche Erklärung bieten. Schmidt und Mitarbeitern(27) konnten zeigen, dass T-regulatorische-Zellen ($CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$) die Aktivierung von NF- κ B in T-Zellen herunterregulieren können. Auf diese Weise könnte die Sekretion von Effektorzytokinen, wie Interferon γ und Interleukin 2, supprimiert werden.

4.3 Frühe Zytokinsekretion möglicher Weise als Ausdruck des angeborenen Immunsystems?

Wie bereits gezeigt wurde (vgl. Desombere 2004) kann aus dem Nachweis einer IFN γ / Interleukin 2-Sekretion nicht selbstverständlich auf dem Nachweis von T-Lymphozyten geschlossen werden. Somit kann aus der in dieser Studie beobachteten Zytokinsekretion nicht ohne Weiteres auf einzelne Zellpopulationen geschlossen werden. Unter Berücksichtigung der Literatur gibt es jedoch Anlass zu begründeten Spekulationen.

Unter den Probanden, die während einer HBV-Grundimmunisierung beobachtet wurden, konnte eine sehr frühe Interferon γ -Sekretion nachgewiesen werden. Bei einzelnen Probanden wurde diese bereits vor der ersten Impfung beobachtet. Da alle Patienten HBcAg negativ getestet wurden, ist eine Reaktivierung des Immunsystems nach überstandener HVB-Infektion ausgeschlossen. Da eine zelluläre Reaktivität in Form einer Interferon γ -Sekretion schon kurz nach der Impfung bzw. schon vor der Impfung vorlag, ist es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um eine Reaktion des adaptiven Immunsystems handelt.

Die bereits oben genannte Arbeit von Desombere und Mitarbeitern betrachteten PBMC mittels Cytokin Secretion Assay von Probanden vor einer Erstimpfung und 6 Wochen danach. Nach der Impfung konnte ein hoher Anteil der IFN γ sezernierenden PBMC als NK-Zellen identifiziert werden. In einer Folgestudie(20) zeigte sich, dass insbesondere bei einer Stimulationsdauer der PBMC mit HBsAg von 24 Stunden vorwiegend NK-Zellen aktiviert werden und IFN γ sezernieren. Dies ist aber auch die in dieser Studie gewählte Stimulationsdauer. Für diese Arbeit kann also angenommen werden, dass die beobachtete frühe IFN γ - Aktivität vorwiegend den NK-Zellen zuzuordnen ist. Diese NK-Aktivität ist aber wahrscheinlich eine Folge der Aktivierung von T-Zellen und somit als ein indirekter Hinweis für spezifische T-Zellen zu werten (vgl. Desombere 2005). Eine Interleukin 2-Sekretion wurde von Desombere et al. nicht betrachtet. Zu bedanken wäre, dass die T-Zellen zwar einen kleinen Anteil unter der PBMC darstellen, sie funktionell jedoch trotzdem die entscheidende Zellpopulation sind.

Andere Arbeiten betrachteten lediglich T-Lymphozyten nach Abschluss der Grundimmunisierung ohne hierbei NK-Zellen zu berücksichtigen. Als weitere Erklärung der bereits vor der Impfung beobachteten IFN γ -Aktivität muss auch das Vorliegen einer Kreuzreaktion in Betracht gezogen werden. Auch dieses Phänomen ist bereits vorbeschrieben. Schließlich sind HBsAg-spezifische T-Zellen auch in Personen nachgewiesen worden, die keinerlei Hepatitis-B-Marker aufwiesen, aber Sexualpartner von Patienten mit chronischer Hepatitis B waren (28).

Wie bereits beschrieben, gab es in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf ein diskretes Zytokinmuster im Rahmen einer späten zellulären Immunantwort (siehe 3.1.2). Im Rahmen der Grundimmunisierung folgte hierbei auf eine Interleukin 2-Sekretion eine IFN γ -Aktivität, welche schließlich mit dem Nachweis von Anti-HBs assoziiert war. Da dieses Reaktionsmuster im Abstand von 2-4 Wochen nach der ersten Impfung auftrat, ließ dies eher an eine Reaktion des adaptiven Immunsystems denken.

Im gleichen zeitlichen Abstand zur einer HBV-Impfung konnten Litjens und Mitarbeitern(26) IL2-sezernierende T_{em}-Zellen nachweisen, welche an der Ausbildung von B-Lymphozyten zu AK-produzierenden Plasmazellen eine entscheidende Rolle zu tragen scheinen. Diese IL2 positiven T_{em}-Zellen traten gleichzeitig mit IFN γ -sezernierenden CD4⁺-T-Zellen auf. Das Sekretionsmuster und der zeitliche Verlauf dieser Arbeit, sowie die Verbindung zur Entwicklung von Anti-HBs weisen einige Parallelen zum in dieser Arbeit beobachteten Sekretionsmuster. Bei Litjens und Mitarbeitern konnten die Beobachtungen zwei Wochen nach der Boosterimpfung (6 Monatsimpfung) gemacht werden. Das Muster in der vorliegenden Arbeit konnte meist 3-4 Wochen nach der ersten HBV-Impfung verzeichnet werden und konnte auch nicht bei allen Spendern nachgewiesen werden.

Litjens *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass die IL2 positiven T_{em}-Memory-Zellen auch nach durchschnittlich 9 Jahren noch mit der Höhe des Anti-HBs-Titers korreliert waren. Die vorliegende Studie konnte nur bedingt Hinweise für diese Zellpopulation finden. Das dominierende Zytokin der zellulären Immunantwort nach Boosterimpfung

in dieser Studie war IFN γ . Weiterhin war zu beobachten, dass insbesondere Spender B2 keine spezifische Interleukin 2-Aktivität entwickelte. Dieser Spender konnte vor der Boosterimpfung lediglich einen Anti-HBs-Titer von nur 2,2 mIU/ml vorweisen. Hierbei ist ein unmittelbarer Zusammenhang mit den Ergebnissen von Litjens und Mitarbeitern zu sehen. Diese konnten zeigen, dass bei low respondern (in diesem Fall dialysepflichtigen Patienten) nur vereinzelt bis keine IL2⁺-T_{em}-Zellen nachgewiesen werden konnten. Auch bei Spender B2 schien ein niedriger Titer mit dem fehlenden Nachweis von Interleukin 2 assoziiert zu sein (vgl. 4.2).

Zusammenfassend gilt es zu betonen, dass diese Studie erstmals die frühe zelluläre Immunantwort nach HBV-Impfung betrachtete.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass bereits nach 96 Stunden bei 44 % der Spender eine HBsAg spezifische Immunantwort nachgewiesen werden konnte. 25% der Spender wiesen bereits vor HBV-Impfung eine signifikante Zytokinaktivität auf. Aufgrund des Studienaufbaus lassen sich die Interleukin 2- bzw. IFN γ -Aktivität keiner speziellen Zellpopulation zuordnen. Es gibt allerdings starke Hinweise, dass möglicherweise NK-Zellen für diese frühe HBsAg-spezifische Aktivität in Betracht gezogen werden müssen. Zur Durchführung derartiger Studien wäre daher eine Nachweismethode wünschenswert, die die Sensitivität des Elispot und die Aussagekraft eines FACS basierten *multipanel cytokin secretion assay* miteinander verbindet. Eine solche Technologie ist derzeit jedoch nicht verfügbar.

5 Zusammenfassung

Nach Einführung des Hepatitis-B-Impfstoffs wurde die aktiv-passive Postexpositionsprophylaxe etabliert, d.h. die sofortige postpartale aktive Impfung in Kombination mit einer ebenfalls unmittelbar nach Geburt vorgenommenen Immunglobulingabe. Man nahm an, dass die Infektion durch die Gabe des Immunglobulinpräparates verhindert wurde und die aktive Impfung eine bleibende Immunität erzeugte, die auch nach dem Verschwinden der übertragenen Antikörper eine spätere Infektion unterband. Spätere Studien konnten nun allerdings zeigen, dass auch die aktive Impfung allein sofort nach Geburt eine Infektion bzw. Chronifizierung unterbinden konnte. Ähnliches sah man nach einer alleinigen postexpositionellen aktiven Impfung nach Kontakt mit HBV durch eine Nadelstichverletzung. In beiden Fällen konnten nicht die Antikörper die Infektion verhindert haben, denn die Antikörperproduktion nach der aktiven Impfung kann in den meisten Fällen erst nach etlichen Tagen bzw. Wochen nachgewiesen werden. Hier tauchte nun die Frage auf, ob nicht eventuell frühe zelluläre Immunphänomene an der Unterdrückung der Infektion beteiligt sein könnten. Versuche in humanisierten transgenen Mäusen ließen darauf schließen, dass auch impfinduzierte T-Helferzellen die Virusreplikation – und damit das Fortschreiten der Infektion – verhindern können. Bis heute gibt es allerdings nur wenige Hinweise darauf, wann nach einer Impfung diese Zellen gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, wie schnell im Laufe einer Grundimmunisierung gegen Hepatitis B eine HBsAg-spezifische zelluläre Immunantwort auftritt.

Zur Evaluation des für die Studie etablierten hochsensitiven Elispot-Test wurden zunächst fünf Probanden untersucht, die >10 Jahre nach einer Hepatitis-B-Grundimmunisierung eine Boosterimpfung erhielten und bei denen eine zelluläre Immunantwort zu erwarten war. Hierzu wurde den Spendern nach HBV-Boosterimpfung im Verlauf der ersten 28 Tagen sechsmal Blut entnommen und auf eine spezifische IFN γ - / IL2-Aktivität untersucht. Drei Spender wiesen vor der Boosterimpfung einen Anti-HBs-Titer >100mIU/ml, einer <100mIU/ml und ein weiterer <10mIU/ml auf. Bei allen fünf Probanden konnte ein Anti-HBs-Anstieg zwischen Tag 4 und Tag 7 nach der Impfung beobachtet werden. Lediglich ein Proband wies zum Zeitpunkt der Impfung eine spezifische Interferon γ - und

Interleukin 2-Sekretion auf. Bei allen Probanden konnte nach 48h eine signifikante IFN γ -Aktivität nachgewiesen werden. Weiterhin konnte bei einem Großteil der Probanden ein ähnliches diskretes Zytokinsekretionsmuster beobachtet werden: Unter einer für 28 Tage fortbestehenden IFN γ -Aktivität entwickelte sich eine diskrete Interleukin 2 Aktivität am Tag 21 bzw. 28.

Der Vorversuch zeigte, dass mit dem hier etablierten Nachweisverfahren IFN γ -sezernierende PBMCs gut zu erfassen sind; die gefundenen Werte sind mit den publizierten Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen vergleichbar. Für die Bestimmung von IL2 gibt es keine Daten in vergleichbaren Kollektiven. Der Vorversuch zeigte immerhin die prinzipielle Nachweisbarkeit von IL2 sezernierenden Zellen.

Für die eigentliche Studie wurden 16 Probanden während einer Hepatitis-B-Grundimmunisierung beobachtet. Am Tag der Erstimpfung sowie 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 Tage, 9 Monate, und 9 Monate und eine Woche nach Impfbeginn wurde den Probanden Blut entnommen. Anschließend wurden die frisch isolierte PBMC im Elispot unter Stimulation mit HBsAg auf eine spezifische Interferon γ - und Interleukin 2-Sekretion untersucht.

13 der 16 Spender entwickelten erst nach der zweiten Impfung am Tag 28 einen Anti-HBs-Titer, nur bei drei Spendern konnte ein Anti-HBs-Titer zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen werden, frühestens jedoch 14 Tage nach Erstimpfung. Dagegen war bei 7 der 16 Spender bereits nach 48h Stunden, bei 13 der 16 Spender nach 7 Tagen eine HBsAg-spezifische zelluläre Immunantwort vorhanden. Innerhalb der ersten 96h dominierte das Zytokin Interferon γ . Überraschenderweise zeigte sich bei 6 der 16 Spender bereits vor Impfung eine Zytokinantwort nach Stimulation mit HBsAg, deren Natur unklar ist. Bei den der Impfung folgenden zellulären Reaktionen konnte kein einheitliches Zytokinsekretionsmuster beobachtet werden. Ein Spender zeigte eine ausschließlich unspezifische Zytokinsekretion, die auch mit einer späten und unzureichenden Antikörperentwicklung assoziiert war (Anti-HBs <10mIU/ml).

Somit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass bei über 80% der Probanden eine spezifische zelluläre Immunantwort bereits innerhalb der ersten 7 Tage nach Erstimpfung vorhanden war. Das dominierende Zytokin in der Frühphase war Interferon γ . Die zelluläre Immunantwort nach HBV-Erstimpfung ging der Entwicklung von Anti-HBs Wochen, in Einzelfällen Monate voraus.

6 Anhang

Rohdaten

Im Folgenden werden die Rohdaten der Elisspots, sowie der Anti-HBs-Titer-Bestimmungen dargelegt. Hierbei waren alle Anti-HBs-Titer > 1 IU/l als positiv zu werten. pval (stimvneg) gibt das p-value aus dem approximierten Wilcoxon-Rangsummentest des stimulierten Ansatzes verglichen mit der Negativkontrolle an. Pval (stim0vsstim) gibt das p-value des stimulierten Ansatzes verglichen mit dem stimulierten Ansatz zum Zeitpunkt ,0' an. Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU						Anti-HBs	pval	pval
												(stimvneg)	(stim0vsstim)
1	1	IFN γ	stim	ZP0	7	2	3	3	7	0,19	0,040	0,643	
1	1	IFN γ	neg	ZP0	3	2	0	2	1		0,000	0,000	
1	1	IFN γ	stim	ZP2	12	12	9	6	11	0,21	0,020	0,016	
1	1	IFN γ	neg	ZP2	7	4	6	5	8		0,000	0,000	
1	1	IFN γ	stim	ZP4	6	13	18	18	9	0,19	0,032	0,016	
1	1	IFN γ	neg	ZP4	5	6	3	7	9		0,000	0,000	
1	1	IFN γ	stim	ZP7	9	7	7	7	3	0,14	0,119	0,143	
1	1	IFN γ	neg	ZP7	8	3	3	6	1		0,000	0,000	
1	1	IFN γ	stim	ZP28	5	3	5	10	7	0,64	0,012	0,230	
1	1	IFN γ	neg	ZP28	2	0	3	3	0		0,000	0,000	
1	1	IFN γ	stim	ZP35	13	7	8	18	17	0,55	0,056	0,012	
1	1	IFN γ	neg	ZP35	6	7	10	7	8		0,000	0,000	
1	1	IFN γ	stim	ZPM9	0	0	2	3	3	21,29	0,143	0,984	
1	1	IFN γ	neg	ZPM9	0	1	1	0	0		0,000	0,000	
1	1	IFN γ	stim	ZPM91	25	20	7	28	20	237,5	0,012	0,012	
1	1	IFN γ	neg	ZPM91	2	7	2	3	7		0,000	0,000	
1	1	IL2	stim	ZP0	22	20	30	34	31	0,19	0,028	0,587	
1	1	IL2	neg	ZP0	21	16	16	25	19		0,000	0,000	
1	1	IL2	stim	ZP2	35	24	54	33	28	0,21	0,083	0,155	
1	1	IL2	neg	ZP2	24	23	32	25	31		0,000	0,000	
1	1	IL2	stim	ZP4	43	52	49	49	58	0,19	0,004	0,004	
1	1	IL2	neg	ZP4	38	28	34	26	35		0,000	0,000	
1	1	IL2	stim	ZP7	50	35	55	34	41	0,14	0,004	0,008	
1	1	IL2	neg	ZP7	30	33	21	27	31		0,000	0,000	
1	1	IL2	stim	ZP28	0	1	10	9	14	0,64	0,889	1,000	
1	1	IL2	neg	ZP28	7	6	15	12	18		0,000	0,000	
1	1	IL2	stim	ZP35	18	23	37	7	8	0,55	0,230	0,889	

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU						Anti-HBs	pval	pval
												(stimvsneg)	(stimOvsstim)
1	1	IL2	neg	ZP35	14	9	7	12	13		0,000	0,000	
1	1	IL2	stim	ZPM9	5	7	0	5	1	21,29	0,460	1,000	
1	1	IL2	neg	ZPM9	3	6	2	2	3		0,000	0,000	
1	1	IL2	stim	ZPM91	1	7	0	0	0	237,5	0,849	1,000	
1	1	IL2	neg	ZPM91	2	3	4	0	1		0,000		
2	2	IFN γ	stim	ZP0	4	1	3	3	2	0,21	0,298	0,603	
2	2	IFN γ	neg	ZP0	0	0	0	4	6		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZP2	5	10	7	8	7	0,3	0,857	0,004	
2	2	IFN γ	neg	ZP2	9	13	13	8	4		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZP4	2	1	1	0	1	0,82	0,321	0,996	
2	2	IFN γ	neg	ZP4	0	1	1	0	1		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZP7	2	2	3	2	3	0,21	0,500	0,754	
2	2	IFN γ	neg	ZP7	2	2	3	3	1		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZP14	2	1	3	0	3	0,46	0,766	0,877	
2	2	IFN γ	neg	ZP14	1	1	5	2	4		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZP21	2	5	8	9	7	0,69	0,048	0,036	
2	2	IFN γ	neg	ZP21	4	3	4	1	3		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZP28	4	4	6	5	7	0,34	0,004	0,012	
2	2	IFN γ	neg	ZP28	0	2	2	2	0		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZP35	3	4	5	1	1	0,26	0,024	0,464	
2	2	IFN γ	neg	ZP35	0	0	2	0	1		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZPM9	2	1	1	0	1	3,13	0,802	0,996	
2	2	IFN γ	neg	ZPM9	1	0	3	3	1		0,000	0,000	
2	2	IFN γ	stim	ZPM91	4	1	4	3	1	51,87	0,500	0,500	
2	2	IFN γ	neg	ZPM91	1	3	3	1	4		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZP0	32	16	24	32	22	0,21	0,508	0,595	
2	2	IL2	neg	ZP0	16	20	18	34	37		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZP2	11	7	22	23	22	0,3	0,119	0,956	
2	2	IL2	neg	ZP2	11	4	9	14	16		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZP4	38	21	19	24	14	0,82	0,405	0,742	
2	2	IL2	neg	ZP4	30	18	19	16	24		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZP7	38	50	44	54	49	0,21	0,004	0,004	
2	2	IL2	neg	ZP7	17	33	19	15	25		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZP14	20	17	17	14	42	0,46	0,262	0,821	
2	2	IL2	neg	ZP14	13	16	7	22	23		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZP21	16	12	5	3	5	0,69	0,298	1,000	
2	2	IL2	neg	ZP21	4	3	10	7	5		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZP28	8	11	27	61	54	0,34	0,401	0,476	
2	2	IL2	neg	ZP28	16	28	24	22	22		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZP35	22	13	21	28	26	0,26	0,171	0,810	
2	2	IL2	neg	ZP35	13	3	16	40	17		0,000	0,000	
2	2	IL2	stim	ZPM9	4	6	13	17	10	3,13	0,865	0,996	
2	2	IL2	neg	ZPM9	19	19	4	19	9		0,000	0,000	

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU					Anti-HBs	pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
2	2	IL2	stim	ZPM91	0	0	0	0	0	51,87	1,000	1,000
2	2	IL2	neg	ZPM91	0	1	0	0	0		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZP0	5	7	5	9	6	0,5	0,004	0,595
3	2	IFN γ	neg	ZP0	1	1	3	2	2		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZP2	17	11	3	5	1	0,56	0,563	0,659
3	2	IFN γ	neg	ZP2	10	10	5	3	6		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZP4	7	5	4	6	7	0,31	0,008	0,667
3	2	IFN γ	neg	ZP4	2	0	3	1	4		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZP7	12	6	5	8	4	0,06	0,004	0,524
3	2	IFN γ	neg	ZP7	3	0	2	2	0		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZP14	6	11	7	9	8	0,97	0,008	0,087
3	2	IFN γ	neg	ZP14	3	6	3	0	3		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZP21	15	11	10	11	11	0,44	1,000	0,004
3	2	IFN γ	neg	ZP21	31	33	16	30	38		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZP28	6	13	9	11	5	0,48	0,012	0,159
3	2	IFN γ	neg	ZP28	1	2	6	2	1		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZP35	5	1	6	2	7	0,8	0,087	0,901
3	2	IFN γ	neg	ZP35	3	5	0	1	1		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZPM9	3	1	0	2	0	8,64	0,758	1,000
3	2	IFN γ	neg	ZPM9	1	4	1	3	0		0,000	0,000
3	2	IFN γ	stim	ZPM91	9	6	4	3	3	258,72	0,802	0,893
3	2	IFN γ	neg	ZPM91	8	4	4	4	10		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZP0	8	9	9	15	9	0,5	0,067	0,683
3	2	IL2	neg	ZP0	8	4	13	8	8		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZP2	15	10	19	16	19	0,56	0,099	0,012
3	2	IL2	neg	ZP2	9	7	8	22	14		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZP4	24	8	5	21	2	0,31	0,984	0,683
3	2	IL2	neg	ZP4	22	30	35	15	30		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZP7	23	16	13	14	9	0,06	0,036	0,052
3	2	IL2	neg	ZP7	9	7	7	5	15		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZP14	12	5	2	7	6	0,97	0,968	0,972
3	2	IL2	neg	ZP14	11	11	10	13	8		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZP21	2	3	1	0	3	0,44	0,730	1,000
3	2	IL2	neg	ZP21	2	4	1	0	4		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZP28	22	16	13	9	10	0,48	0,016	0,052
3	2	IL2	neg	ZP28	4	4	4	11	8		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZP35	16	18	25	20	17	0,8	0,020	0,004
3	2	IL2	neg	ZP35	13	11	17	16	12		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZPM9	0	0	0	0	0	8,64	1,000	1,000
3	2	IL2	neg	ZPM9	0	1	1	1	0		0,000	0,000
3	2	IL2	stim	ZPM91	9	1	3	0	0	258,72	0,821	0,996
3	2	IL2	neg	ZPM91	6	6	1	1	4		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZP0	3	3	16	3	5	0,23	0,675	0,659

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU					Anti-HBs	pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
4	3	IFN γ	neg	ZP0	4	4	3	9	4		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZP2	12	13	11	14	3	0,09	0,075	0,167
4	3	IFN γ	neg	ZP2	7	8	7	7	4		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZP4	6	14	3	1	4	0,13	0,615	0,532
4	3	IFN γ	neg	ZP4	4	3	7	3	8		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZP7	10	7	5	6	4	0,34	0,290	0,123
4	3	IFN γ	neg	ZP7	8	6	4	1	6		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZP14	14	15	8	3	9	0,19	0,258	0,167
4	3	IFN γ	neg	ZP14	7	9	14	6	5		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZP21	3	4	2	4	3	0,28	0,107	0,778
4	3	IFN γ	neg	ZP21	4	3	1	1	1		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZP28	22	31	26	41	18	0,28	0,921	0,004
4	3	IFN γ	neg	ZP28	43	28	31	26	48		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZP35	8	2	3	8	5	19,15	0,270	0,484
4	3	IFN γ	neg	ZP35	4	4	2	3	5		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZPM9	3	7	2	3	2	22,58	0,024	0,881
4	3	IFN γ	neg	ZPM9	2	1	1	1	2		0,000	0,000
4	3	IFN γ	stim	ZPM91	6	5	3	2	4	624,9	0,123	0,587
4	3	IFN γ	neg	ZPM91	4	3	1	3	2		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZP0	31	15	32	39	26	0,23	0,294	0,587
4	3	IL2	neg	ZP0	21	14	31	39	26		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZP2	41	21	10	16	19	0,09	0,996	0,845
4	3	IL2	neg	ZP2	48	49	49	57	37		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZP4	19	11	8	28	9	0,13	0,972	0,984
4	3	IL2	neg	ZP4	32	23	26	25	21		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZP7	84	86	65	63	71	0,34	0,004	0,004
4	3	IL2	neg	ZP7	52	55	52	45	33		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZP14	0	0	2	3	3	0,19	0,429	1,000
4	3	IL2	neg	ZP14	0	1	12	1	1		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZP21	43	69	43	44	33	0,28	0,484	0,008
4	3	IL2	neg	ZP21	66	60	51	22	27		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZP28	33	39	21	14	11	0,28	1,000	0,746
4	3	IL2	neg	ZP28	48	55	55	51	40		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZP35	70	48	26	47	52	19,15	0,008	0,032
4	3	IL2	neg	ZP35	20	19	23	18	27		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZPM9	9	17	15	21	28	22,58	0,532	0,956
4	3	IL2	neg	ZPM9	11	18	25	26	9		0,000	0,000
4	3	IL2	stim	ZPM91	0	0	0	0	0	624,9	1,000	1,000
4	3	IL2	neg	ZPM91	0	0	1	0	1		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZP0	2	2	4	2	2	0	0,500	0,778
5	3	IFN γ	neg	ZP0	2	2	2	4	0		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZP2	1	5	12	6	6	0,09	0,175	0,071
5	3	IFN γ	neg	ZP2	2	4	5	6	3		0,000	0,000

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU					Anti-HBs	pval	
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
5	3	IFN γ	stim	ZP4	1	6	1	6	6	0,22	0,151	0,298
5	3	IFN γ	neg	ZP4	0	0	6	4	2		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZP7	5	2	3	3	0	0,05	0,417	0,282
5	3	IFN γ	neg	ZP7	2	0	1	3	6		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZP14	8	5	9	10	7	2,9	0,004	0,004
5	3	IFN γ	neg	ZP14	0	0	2	1	1		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZP21	4	12	5	4	4	5,96	0,444	0,016
5	3	IFN γ	neg	ZP21	5	3	6	2	10		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZP28	52	96	36	31	31	4,52	0,024	0,004
5	3	IFN γ	neg	ZP28	42	26	0	30	0		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZP35	4	2	4	1	1	8,27	0,123	0,560
5	3	IFN γ	neg	ZP35	3	0	1	0	2		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZPM9	0	5	3	3	1	36,05	0,357	0,452
5	3	IFN γ	neg	ZPM9	4	1	0	3	1		0,000	0,000
5	3	IFN γ	stim	ZPM91	1	2	4	5	2	217,46	0,496	0,440
5	3	IFN γ	neg	ZPM91	2	1	2	4	4		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZP0	55	39	35	24	29	0	0,230	0,587
5	3	IL2	neg	ZP0	25	19	19	39	44		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZP2	13	22	38	36	15	0,09	0,845	0,925
5	3	IL2	neg	ZP2	20	23	21	45	40		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZP4	1	0	8	22	9	0,22	0,917	1,000
5	3	IL2	neg	ZP4	7	10	16	27	16		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZP7	22	26	26	45	52	0,05	0,135	0,710
5	3	IL2	neg	ZP7	24	17	26	24	43		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZP14	9	9	4	1	1	2,9	0,921	1,000
5	3	IL2	neg	ZP14	12	11	7	12	1		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZP21	4	5	11	4	2	5,96	0,988	1,000
5	3	IL2	neg	ZP21	23	13	4	18	25		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZP28	22	31	26	41	18	4,52	0,841	0,889
5	3	IL2	neg	ZP28	43	28	28	31	26		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZP35	58	46	68	60	44	8,27	0,016	0,016
5	3	IL2	neg	ZP35	17	12	25	31	50		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZPM9	3	7	12	20	11	36,05	0,881	1,000
5	3	IL2	neg	ZPM9	11	8	16	20	33		0,000	0,000
5	3	IL2	stim	ZPM91	1	0	0	1	0	217,46	0,500	1,000
5	3	IL2	neg	ZPM91	0	1	0	0	0		0,000	0,000
6	4	IFN γ	stim	ZP0	4	3	9	4	6	0,03	0,056	0,603
6	4	IFN γ	neg	ZP0	3	2	1	2	6		0,000	0,000
6	4	IFN γ	stim	ZP2	5	4	7	6	1	0,01	0,056	0,524
6	4	IFN γ	neg	ZP2	0	4	4	1	3		0,000	0,000
6	4	IFN γ	stim	ZP4	3	16	14	10	3	0	0,099	0,246
6	4	IFN γ	neg	ZP4	2	6	5	5	1		0,000	0,000
6	4	IFN γ	stim	ZP7	9	8	10	12	15	0,07	0,063	0,012

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU						Anti-HBs	pval	pval
												(stimvsneg)	(stimOvsstim)
6	4	IFN γ	neg	ZP7	7	6	7	16	6		0,000	0,000	
6	4	IFN γ	stim	ZP14	1	6	9	17	19	0	0,230	0,151	
6	4	IFN γ	neg	ZP14	4	5	2	9	13		0,000	0,000	
6	4	IFN γ	stim	ZP21	11	3	4	13	8	0,2	0,563	0,222	
6	4	IFN γ	neg	ZP21	6	4	9	11	8		0,000	0,000	
6	4	IFN γ	stim	ZP28	6	4	16	19	7	0	0,500	0,087	
6	4	IFN γ	neg	ZP28	9	0	10	11	12		0,000	0,000	
6	4	IFN γ	stim	ZP35	0	4	3	4	0	0	0,175	0,980	
6	4	IFN γ	neg	ZP35	2	0	2	0	1		0,000	0,000	
6	4	IFN γ	stim	ZPM9	1	6	5	2	7	2,42	0,198	0,667	
6	4	IFN γ	neg	ZPM9	2	5	2	2	1		0,000	0,000	
6	4	IFN γ	stim	ZPM91	1	5	14	8	4	228,71	0,194	0,425	
6	4	IFN γ	neg	ZPM91	2	2	3	5	5		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZP0	17	13	21	93	42	0,03	0,710	0,587	
6	4	IL2	neg	ZP0	41	30	32	24	41		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZP2	57	46	69	62	40	0,01	0,286	0,111	
6	4	IL2	neg	ZP2	54	53	45	57	53		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZP4	23	23	52	84	55	0	0,627	0,139	
6	4	IL2	neg	ZP4	48	42	37	64	56		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZP7	35	21	62	66	64	0,07	0,655	0,167	
6	4	IL2	neg	ZP7	74	18	61	54	70		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZP14	35	30	39	59	72	0	0,210	0,210	
6	4	IL2	neg	ZP14	17	15	25	84	43		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZP21	23	33	43	39	38	0,2	0,048	0,274	
6	4	IL2	neg	ZP21	9	20	7	12	40		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZP28	54	39	43	40	38	0	0,020	0,210	
6	4	IL2	neg	ZP28	40	20	19	24	19		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZP35	45	35	58	73	63	0	0,032	0,111	
6	4	IL2	neg	ZP35	29	20	34	35	60		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZPM9	1	8	17	18	20	2,42	0,675	0,933	
6	4	IL2	neg	ZPM9	16	8	10	19	28		0,000	0,000	
6	4	IL2	stim	ZPM91	18	28	45	22	17	228,71	0,421	0,444	
6	4	IL2	neg	ZPM91	23	14	27	24	20		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZP0	2	3	2	6	3	0	0,095	0,643	
7	4	IFN γ	neg	ZP0	1	0	2	3	2		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZP2	2	2	7	0	6	0,07	0,226	0,595	
7	4	IFN γ	neg	ZP2	0	2	3	2	1		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZP4	7	0	4	2	3	0	0,206	0,500	
7	4	IFN γ	neg	ZP4	2	2	1	0	4		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZP7	9	7	7	6	15	0,19	0,456	0,008	
7	4	IFN γ	neg	ZP7	1	3	10	11	9		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZP14	13	9	8	16	9	0	0,040	0,004	
7	4	IFN γ	neg	ZP14	9	8	3	8	2		0,000	0,000	

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU						Anti-HBs	pval	pval
												(stimvsneg)	(stimOvsstim)
7	4	IFN γ	stim	ZP21	18	9	12	19	17	0,86	0,083	0,004	
7	4	IFN γ	neg	ZP21	18	5	7	14	4		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZP28	14	8	9	13	13	0,29	0,016	0,004	
7	4	IFN γ	neg	ZP28	2	3	12	1	4		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZP35	8	3	2	2	4	24,27	0,012	0,413	
7	4	IFN γ	neg	ZP35	2	1	0	1	0		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZPM9	11	17	12	13	8	51,20	0,004	0,004	
7	4	IFN γ	neg	ZPM9	0	1	1	4	7		0,000	0,000	
7	4	IFN γ	stim	ZPM91	63	64	71	119	114	71,36	0,004	0,004	
7	4	IFN γ	neg	ZPM91	2	5	2	2	1		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZP0	33	3	8	5	15	0	0,806	0,587	
7	4	IL2	neg	ZP0	13	12	19	18	8		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZP2	25	44	25	29	27	0,07	0,298	0,040	
7	4	IL2	neg	ZP2	32	26	12	23	29		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZP4	22	22	17	51	36	0	0,111	0,024	
7	4	IL2	neg	ZP4	20	22	11	26	14		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZP7	47	40	56	71	66	0,19	0,016	0,004	
7	4	IL2	neg	ZP7	36	44	25	43	38		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZP14	31	23	20	41	45	0	0,889	0,028	
7	4	IL2	neg	ZP14	33	29	34	58	54		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZP21	36	44	40	52	77	0,86	0,004	0,004	
7	4	IL2	neg	ZP21	13	12	20	30	33		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZP28	33	25	26	24	39	0,29	0,004	0,032	
7	4	IL2	neg	ZP28	10	12	14	12	18		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZP35	40	20	19	28	52	24,27	0,230	0,028	
7	4	IL2	neg	ZP35	21	12	20	28	28		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZPM9	61	63	60	71	77	51,20	0,004	0,004	
7	4	IL2	neg	ZPM9	24	6	28	16	22		0,000	0,000	
7	4	IL2	stim	ZPM91	22	24	17	22	42	71,36	0,004	0,044	
7	4	IL2	neg	ZPM91	10	10	12	10	15		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZP0	12	9	6	10	10	0	0,028	0,603	
8	4	IFN γ	neg	ZP0	10	4	5	2	5		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZP2	3	5	4	8	9	0,11	0,032	0,988	
8	4	IFN γ	neg	ZP2	3	1	5	2	1		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZP4	11	8	12	10	10	0	0,004	0,302	
8	4	IFN γ	neg	ZP4	5	3	7	7	2		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZP7	13	8	12	17	15	0	0,004	0,056	
8	4	IFN γ	neg	ZP7	6	7	7	5	5		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZP14	9	15	14	25	10	0,72	0,004	0,083	
8	4	IFN γ	neg	ZP14	8	8	6	4	7		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZP21	20	24	12	13	15	0,27	0,004	0,008	
8	4	IFN γ	neg	ZP21	11	8	7	8	9		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZP28	16	10	23	16	19	0,12	0,008	0,016	

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU						Anti-HBs	pval	pval
												(stimvsneg)	(stimOvsstim)
8	4	IFN γ	neg	ZP28	12	9	7	5	5		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZP35	5	4	5	1	9	0,36	0,063	0,996	
8	4	IFN γ	neg	ZP35	1	3	1	4	3		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZPM9	9	12	13	4	10	12,93	0,131	0,413	
8	4	IFN γ	neg	ZPM9	11	6	8	4	6		0,000	0,000	
8	4	IFN γ	stim	ZPM91	9	7	12	2	8	36,39	0,060	0,841	
8	4	IFN γ	neg	ZPM91	3	5	3	4	2		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZP0	40	6	29	27	29	0	0,258	0,603	
8	4	IL2	neg	ZP0	28	23	22	39	25		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZP2	50	47	38	49	63	0,11	0,016	0,008	
8	4	IL2	neg	ZP2	33	32	26	48	31		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZP4	41	42	42	36	56	0	0,885	0,008	
8	4	IL2	neg	ZP4	50	54	50	40	68		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZP7	68	62	62	61	54	0	0,016	0,004	
8	4	IL2	neg	ZP7	25	40	42	56	55		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZP14	24	36	25	45	49	0,72	0,325	0,262	
8	4	IL2	neg	ZP14	34	35	35	29	32		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZP21	35	38	49	49	66	0,27	0,377	0,012	
8	4	IL2	neg	ZP21	49	38	47	42	46		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZP28	12	18	22	15	22	0,12	0,190	0,952	
8	4	IL2	neg	ZP28	10	13	13	21	19		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZP35	23	37	32	51	51	0,36	0,317	0,095	
8	4	IL2	neg	ZP35	36	27	30	46	49		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZPM9	38	32	44	47	47	12,93	0,325	0,012	
8	4	IL2	neg	ZPM9	25	34	42	53	39		0,000	0,000	
8	4	IL2	stim	ZPM91	19	28	22	19	21	36,39	0,040	0,921	
8	4	IL2	neg	ZPM91	12	17	19	21	15		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZP0	11	8	9	10	18	0,25	0,448	0,587	
9	5	IFN γ	neg	ZP0	13	4	15	4	11		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZP2	2	0	2	9	2	0,19	0,738	0,996	
9	5	IFN γ	neg	ZP2	3	3	1	2	3		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZP4	7	4	6	8	7	0,3	0,063	1,000	
9	5	IFN γ	neg	ZP4	5	5	6	4	4		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZP7	6	4	3	3	16	0,27	0,012	0,972	
9	5	IFN γ	neg	ZP7	2	0	1	3	1		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZP14	9	12	15	17	18	0,68	0,004	0,143	
9	5	IFN γ	neg	ZP14	1	5	3	6	2		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZP21	46	21	42	51	34	28,52	0,004	0,004	
9	5	IFN γ	neg	ZP21	13	14	14	11	13		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZP28	10	5	6	16	19	71,25	0,294	0,603	
9	5	IFN γ	neg	ZP28	21	9	5	9	2		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZP35	104	149	136	150	196	185,42	0,004	0,004	
9	5	IFN γ	neg	ZP35	2	3	4	4	1		0,000	0,000	

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU						Anti-HBs	pval	pval
												(stimvsneg)	(stimOvsstim)
9	5	IFN γ	stim	ZPM9	15	11	14	20	20	180,17	0,004	0,032	
9	5	IFN γ	neg	ZPM9	1	1	1	1	1		0,000	0,000	
9	5	IFN γ	stim	ZPM91	114	29	56	105	126	15000,00	0,075	0,004	
9	5	IFN γ	neg	ZPM91	19	46	33	93	38		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZP0	56	34	46	34	42	0,25	0,984	0,595	
9	5	IL2	neg	ZP0	43	63	48	59	57		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZP2	27	21	20	22	21	0,19	0,016	1,000	
9	5	IL2	neg	ZP2	10	15	15	21	15		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZP4	17	16	15	28	24	0,3	0,444	1,000	
9	5	IL2	neg	ZP4	19	20	9	17	20		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZP7	25	8	15	31	23	0,27	0,210	1,000	
9	5	IL2	neg	ZP7	7	5	19	29	17		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZP14	17	27	5	23	18	0,68	0,075	1,000	
9	5	IL2	neg	ZP14	13	5	17	12	16		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZP21	16	16	5	12	24	28,52	0,238	1,000	
9	5	IL2	neg	ZP21	19	12	9	7	11		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZP28	6	5	13	14	11	71,25	0,258	1,000	
9	5	IL2	neg	ZP28	4	6	9	10	13		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZP35	41	39	56	51	86	185,42	0,004	0,167	
9	5	IL2	neg	ZP35	12	12	12	18	22		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZPM9	167	154	136	182	182	180,17	0,004	0,004	
9	5	IL2	neg	ZPM9	38	18	21	34	28		0,000	0,000	
9	5	IL2	stim	ZPM91	24	39	32	34	53	15000,00	0,004	0,893	
9	5	IL2	neg	ZPM91	2	6	6	6	7		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZP0	24	14	18	9	13	0,15	0,056	0,587	
10	5	IFN γ	neg	ZP0	7	7	23	5	9		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZP2	6	4	2	6	8	0,39	0,020	1,000	
10	5	IFN γ	neg	ZP2	0	3	0	4	1		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZP4	11	12	12	11	6	0,14	0,028	0,976	
10	5	IFN γ	neg	ZP4	10	0	7	6	6		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZP7	5	7	11	17	6	0,48	0,024	0,972	
10	5	IFN γ	neg	ZP7	8	1	3	3	4		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZP14	276	4	8	6	5	0,23	0,226	0,952	
10	5	IFN γ	neg	ZP14	10	3	4	2	9		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZP21	9	12	24	20	24	0,69	0,147	0,369	
10	5	IFN γ	neg	ZP21	10	8	13	13	14		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZP28	6	4	7	8	5	3,65	0,758	1,000	
10	5	IFN γ	neg	ZP28	6	5	5	9	9		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZP35	11	12	16	5	4	947,16	0,028	0,952	
10	5	IFN γ	neg	ZP35	3	3	0	5	5		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZPM9	2	2	2	2	1	165,64	0,242	1,000	
10	5	IFN γ	neg	ZPM9	1	2	1	3	0		0,000	0,000	
10	5	IFN γ	stim	ZPM91	2	3	8	6	6	15000,00	0,036	1,000	

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU					Anti-HBs	pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
10	5	IFN γ	neg	ZPM91	5	1	2	2	2		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZP0	40	6	29	27	29	0,15	0,258	0,603
10	5	IL2	neg	ZP0	28	23	22	39	25		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZP2	50	47	38	49	63	0,39	0,016	0,008
10	5	IL2	neg	ZP2	33	32	26	48	31		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZP4	41	42	42	36	56	0,14	0,885	0,008
10	5	IL2	neg	ZP4	50	54	50	40	68		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZP7	68	62	62	61	54	0,48	0,016	0,004
10	5	IL2	neg	ZP7	25	40	42	56	55		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZP14	24	36	25	45	49	0,23	0,325	0,262
10	5	IL2	neg	ZP14	34	35	35	29	32		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZP21	35	38	49	49	66	0,69	0,377	0,012
10	5	IL2	neg	ZP21	49	38	47	42	46		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZP28	12	18	22	15	22	3,65	0,190	0,952
10	5	IL2	neg	ZP28	10	13	13	21	19		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZP35	30	24	49	34	49	947,16	0,147	0,095
10	5	IL2	neg	ZP35	24	32	19	30	47		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZPM9	85	73	78	107	91	165,64	0,004	0,004
10	5	IL2	neg	ZPM9	38	25	25	34	9		0,000	0,000
10	5	IL2	stim	ZPM91	14	39	37	44	40	15000,00	0,016	0,119
10	5	IL2	neg	ZPM91	16	6	7	19	8		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZP0	4	5	11	6	7	0,31	0,012	0,587
11	5	IFN γ	neg	ZP0	3	3	5	0	1		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZP2	1	3	3	1	1	0,2	0,500	1,000
11	5	IFN γ	neg	ZP2	2	1	2	0	3		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZP4	3	1	0	0	3	0	0,790	1,000
11	5	IFN γ	neg	ZP4	2	2	2	6	1		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZP7	1	2	3	3	3	0,11	0,028	1,000
11	5	IFN γ	neg	ZP7	1	1	0	0	2		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZP14	5	7	1	2	4	0,12	0,258	0,944
11	5	IFN γ	neg	ZP14	3	8	1	2	0		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZP21	9	1	7	3	5	0,11	0,262	0,770
11	5	IFN γ	neg	ZP21	3	6	1	4	4		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZP28	1	10	3	0	9	0,25	0,492	0,845
11	5	IFN γ	neg	ZP28	3	6	1	6	2		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZP35	0	3	2	3	7	8,68	0,254	0,980
11	5	IFN γ	neg	ZP35	1	1	5	2	2		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZPM9	0	4	0	2	1	6,72	0,821	1,000
11	5	IFN γ	neg	ZPM9	3	5	1	3	0		0,000	0,000
11	5	IFN γ	stim	ZPM91	6	3	1	1	2	707,42	0,040	0,988
11	5	IFN γ	neg	ZPM91	1	0	0	1	1		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZP0	43	38	27	43	54	0,31	0,905	0,603
11	5	IL2	neg	ZP0	54	39	45	53	45		0,000	0,000

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU					Anti-HBs	pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
11	5	IL2	stim	ZP2	43	55	35	40	33	0,2	0,075	0,575
11	5	IL2	neg	ZP2	28	38	21	42	14		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZP4	46	49	44	37	45	0	0,075	0,190
11	5	IL2	neg	ZP4	51	36	10	28	31		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZP7	16	37	4	11	42	0,11	0,500	0,984
11	5	IL2	neg	ZP7	12	9	40	27	14		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZP14	6	14	4	8	23	0,12	0,742	1,000
11	5	IL2	neg	ZP14	9	14	7	17	11		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZP21	20	12	8	12	27	0,11	0,369	1,000
11	5	IL2	neg	ZP21	20	16	9	7	17		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZP28	7	10	10	10	20	0,25	0,008	1,000
11	5	IL2	neg	ZP28	6	4	8	4	1		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZP35	50	40	31	32	22	8,68	0,274	0,833
11	5	IL2	neg	ZP35	49	38	28	30	19		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZPM9	34	37	26	34	47	6,72	0,262	0,865
11	5	IL2	neg	ZPM9	21	28	39	29	35		0,000	0,000
11	5	IL2	stim	ZPM91	32	50	54	62	71	707,42	0,167	0,079
11	5	IL2	neg	ZPM91	32	37	56	51	42		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZP0	9	14	11	5	7	0,14	0,032	0,587
12	5	IFN γ	neg	ZP0	2	1	3	7	8		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZP2	7	3	1	4	9	0,21	0,079	0,976
12	5	IFN γ	neg	ZP2	1	2	2	3	2		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZP4	5	10	8	5	2	0,21	0,016	0,925
12	5	IFN γ	neg	ZP4	2	1	0	3	2		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZP7	5	1	2	6	5	0,18	0,187	0,996
12	5	IFN γ	neg	ZP7	1	0	1	2	7		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZP14	2	5	5	1	7	0,19	0,056	0,996
12	5	IFN γ	neg	ZP14	1	2	1	0	3		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZP21	5	4	12	4	11	0,51	0,087	0,841
12	5	IFN γ	neg	ZP21	2	5	3	3	7		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZP28	2	1	1	11	12	1,38	0,679	0,853
12	5	IFN γ	neg	ZP28	5	2	5	6	3		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZP35	14	14	11	10	6	15,07	0,008	0,230
12	5	IFN γ	neg	ZP35	5	6	4	3	4		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZPM9	1	1	1	1	0	320,76	0,103	1,000
12	5	IFN γ	neg	ZPM9	0	0	0	0	1		0,000	0,000
12	5	IFN γ	stim	ZPM91	1	2	1	3	3	687,52	0,210	1,000
12	5	IFN γ	neg	ZPM91	1	0	0	2	3		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZP0	49	21	33	30	50	0,14	0,083	0,587
12	5	IL2	neg	ZP0	25	23	14	26	33		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZP2	40	44	33	27	37	0,21	0,881	0,516
12	5	IL2	neg	ZP2	51	37	34	44	42		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZP4	61	47	33	40	41	0,21	0,325	0,226

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU	Anti-HBs					pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
12	5	IL2	neg	ZP4	46	34	39	51	34		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZP7	25	10	14	33	43	0,18	0,770	0,897
12	5	IL2	neg	ZP7	33	26	25	49	24		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZP14	20	15	13	15	17	0,19	0,913	1,000
12	5	IL2	neg	ZP14	17	19	29	18	15		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZP21	22	31	13	16	16	0,51	0,885	0,984
12	5	IL2	neg	ZP21	28	29	25	20	20		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZP28	13	20	19	22	29	1,38	0,028	0,992
12	5	IL2	neg	ZP28	14	9	18	17	10		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZP35	49	38	56	55	47	15,07	0,071	0,083
12	5	IL2	neg	ZP35	47	49	33	42	24		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZPM9	44	42	39	55	70	320,76	0,004	0,111
12	5	IL2	neg	ZPM9	25	21	29	27	31		0,000	0,000
12	5	IL2	stim	ZPM91	14	25	22	16	15	687,52	0,206	0,992
12	5	IL2	neg	ZPM91	12	15	18	18	14		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZP0	10	19	7	10	17	0,25	0,619	0,603
13	6	IFN γ	neg	ZP0	19	13	10	10	10		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZP2	53	56	49	31	55	1,10	0,341	0,004
13	6	IFN γ	neg	ZP2	53	59	42	38	31		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZP4	1	1	1	0	4	0,14	0,980	1,000
13	6	IFN γ	neg	ZP4	3	9	9	7	1		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZP7	11	3	8	2	4	0,24	0,575	0,968
13	6	IFN γ	neg	ZP7	3	6	7	21	2		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZP14	2	0	2	0	2	0,12	0,083	1,000
13	6	IFN γ	neg	ZP14	0	0	0	0	1		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZP21	2	6	5	2	2	0,32	0,056	1,000
13	6	IFN γ	neg	ZP21	1	1	5	2	1		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZP28	0	1	0	2	1	0,35	0,341	1,000
13	6	IFN γ	neg	ZP28	0	0	0	1	1		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZP35	2	1	0	5	3	0,90	0,325	1,000
13	6	IFN γ	neg	ZP35	0	1	3	1	2		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZPM9	4	2	1	3	5	1,58	0,044	1,000
13	6	IFN γ	neg	ZPM9	1	1	2	1	1		0,000	0,000
13	6	IFN γ	stim	ZPM91	8	6	3	6	5	8,29	0,202	0,996
13	6	IFN γ	neg	ZPM91	4	5	2	5	7		0,000	0,000
13	6	IL2	stim	ZP0	43	36	61	42	50	0,25	0,492	0,587
13	6	IL2	neg	ZP0	37	48	43	57	42		0,000	0,000
13	6	IL2	stim	ZP2	30	25	19	48	37	1,10	0,607	0,972
13	6	IL2	neg	ZP2	30	29	62	26	29		0,000	0,000
13	6	IL2	stim	ZP4	8	7	11	13	7	0,14	0,274	1,000
13	6	IL2	neg	ZP4	3	9	1	7	14		0,000	0,000
13	6	IL2	stim	ZP7	19	8	9	20	17	0,24	0,996	1,000
13	6	IL2	neg	ZP7	25	25	19	22	24		0,000	0,000

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU						Anti-HBs	pval	pval
												(stimvsneg)	(stimOvsstim)
13	6	IL2	stim	ZP14	10	22	16	13	24	0,12	0,052	1,000	
13	6	IL2	neg	ZP14	10	5	12	11	14		0,000	0,000	
13	6	IL2	stim	ZP21	43	29	34	23	24	0,32	0,726	0,988	
13	6	IL2	neg	ZP21	27	33	39	36	25		0,000	0,000	
13	6	IL2	stim	ZP28	10	7	19	22	16	0,35	0,901	1,000	
13	6	IL2	neg	ZP28	18	14	20	22	32		0,000	0,000	
13	6	IL2	stim	ZP35	4	13	3	8	7	0,90	0,718	1,000	
13	6	IL2	neg	ZP35	8	10	4	10	5		0,000	0,000	
13	6	IL2	stim	ZPM9	5	5	3	8	3	1,58	0,877	1,000	
13	6	IL2	neg	ZPM9	7	5	4	6	10		0,000	0,000	
13	6	IL2	stim	ZPM91	8	14	27	17	19	8,29	0,071	1,000	
13	6	IL2	neg	ZPM91	6	6	12	17	14		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZP0	18	16	18	10	11	0,19	0,579	0,595	
14	6	IFN γ	neg	ZP0	13	18	8	28	15		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZP2	34	24	46	41	33	0,18	0,365	0,004	
14	6	IFN γ	neg	ZP2	33	41	37	27	33		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZP4	2	4	3	6	6	0,07	0,028	1,000	
14	6	IFN γ	neg	ZP4	3	2	2	1	1		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZP7	7	6	10	5	6	0,24	0,349	1,000	
14	6	IFN γ	neg	ZP7	7	8	3	5	6		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZP14	6	5	4	7	5	0,78	0,063	1,000	
14	6	IFN γ	neg	ZP14	3	3	7	2	4		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZP21	5	7	10	8	7	0,62	0,123	1,000	
14	6	IFN γ	neg	ZP21	5	7	9	4	4		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZP28	2	0	3	1	6	0,90	0,694	1,000	
14	6	IFN γ	neg	ZP28	2	1	2	4	4		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZP35	5	5	15	5	23	46,33	0,016	0,877	
14	6	IFN γ	neg	ZP35	2	1	2	5	4		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZPM9	2	7	2	6	5	314,32	0,595	1,000	
14	6	IFN γ	neg	ZPM9	4	3	0	8	7		0,000	0,000	
14	6	IFN γ	stim	ZPM91	8	2	8	8	12	6713,60	0,032	0,992	
14	6	IFN γ	neg	ZPM91	6	3	1	5	3		0,000	0,000	
14	6	IL2	stim	ZP0	20	22	11	33	47	0,19	0,845	0,587	
14	6	IL2	neg	ZP0	39	16	37	35	36		0,000	0,000	
14	6	IL2	stim	ZP2	109	57	64	58	51	0,18	0,790	0,004	
14	6	IL2	neg	ZP2	100	61	78	75	53		0,000	0,000	
14	6	IL2	stim	ZP4	13	11	14	20	13	0,07	0,012	0,948	
14	6	IL2	neg	ZP4	9	8	6	11	12		0,000	0,000	
14	6	IL2	stim	ZP7	20	17	16	26	13	0,24	0,020	0,857	
14	6	IL2	neg	ZP7	17	12	10	8	11		0,000	0,000	
14	6	IL2	stim	ZP14	8	18	9	19	17	0,78	0,226	0,984	
14	6	IL2	neg	ZP14	4	7	13	13	19		0,000	0,000	
14	6	IL2	stim	ZP21	64	72	56	79	64	0,62	0,004	0,004	

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU	Anti-HBs					pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
14	6	IL2	neg	ZP21	44	51	37	41	29		0,000	0,000
14	6	IL2	stim	ZP28	17	5	8	20	12	0,90	0,456	0,976
14	6	IL2	neg	ZP28	18	10	12	10	6		0,000	0,000
14	6	IL2	stim	ZP35	14	21	12	17	18	46,33	0,004	0,925
14	6	IL2	neg	ZP35	5	2	4	2	4		0,000	0,000
14	6	IL2	stim	ZPM9	48	81	75	86	69	314,32	0,004	0,004
14	6	IL2	neg	ZPM9	29	28	24	28	31		0,000	0,000
14	6	IL2	stim	ZPM91	21	19	7	28	32	6713,60	0,004	0,790
14	6	IL2	neg	ZPM91	5	3	5	5	5		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZP0	1	5	5	3	4	0,19	0,667	0,595
15	7	IFN γ	neg	ZP0	6	5	4	3	3		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZP2	6	4	8	6	2	0,19	0,778	0,119
15	7	IFN γ	neg	ZP2	9	3	7	10	3		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZP4	2	2	6	2	1	0,16	0,770	0,810
15	7	IFN γ	neg	ZP4	2	3	6	1	4		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZP7	7	8	12	8	6	0,31	0,012	0,004
15	7	IFN γ	neg	ZP7	5	5	7	5	5		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZP14	4	0	3	7	5	0,52	0,325	0,500
15	7	IFN γ	neg	ZP14	2	2	1	5	5		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZP21	3	7	3	7	4	0,13	0,718	0,325
15	7	IFN γ	neg	ZP21	7	4	6	5	4		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZP28	2	4	5	1	2	0,06	0,881	0,790
15	7	IFN γ	neg	ZP28	3	2	4	5	5		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZP35	3	6	4	7	3	14,25	0,024	0,313
15	7	IFN γ	neg	ZP35	1	1	2	3	3		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZPM9	7	8	3	4	0	41,13	0,683	0,397
15	7	IFN γ	neg	ZPM9	5	8	1	5	6		0,000	0,000
15	7	IFN γ	stim	ZPM91	7	8	22	16	10	1817,58	0,028	0,004
15	7	IFN γ	neg	ZPM91	5	4	6	12	3		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZP0	6	10	13	9	16	0,19	0,631	0,587
15	7	IL2	neg	ZP0	14	8	15	7	14		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZP2	4	7	5	20	15	0,19	0,726	0,726
15	7	IL2	neg	ZP2	11	9	10	8	13		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZP4	15	11	18	16	20	0,16	0,440	0,032
15	7	IL2	neg	ZP4	7	13	24	24	11		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZP7	31	32	25	24	19	0,31	0,143	0,004
15	7	IL2	neg	ZP7	25	26	23	16	19		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZP14	2	4	7	3	1	0,52	0,893	0,996
15	7	IL2	neg	ZP14	9	6	2	4	6		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZP21	5	4	3	5	5	0,13	0,500	1,000
15	7	IL2	neg	ZP21	4	3	4	5	14		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZP28	4	5	12	10	9	0,06	0,639	0,885
15	7	IL2	neg	ZP28	5	8	7	12	11		0,000	0,000

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU					Anti-HBs	pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
15	7	IL2	stim	ZP35	4	3	10	22	19	14,25	0,726	0,532
15	7	IL2	neg	ZP35	7	11	13	21	14		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZPM9	9	22	18	33	14	41,13	0,143	0,052
15	7	IL2	neg	ZPM9	11	2	14	15	18		0,000	0,000
15	7	IL2	stim	ZPM91	1	9	5	7	14	1817,58	0,456	0,905
15	7	IL2	neg	ZPM91	7	3	6	6	12		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZP0	8	3	9	10	8	0,31	0,036	0,603
16	7	IFN γ	neg	ZP0	6	3	5	5	2		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZP2	22	18	8	15	8	0,29	0,337	0,099
16	7	IFN γ	neg	ZP2	11	13	11	13	13		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZP4	5	9	4	6	5	0,02	0,940	0,861
16	7	IFN γ	neg	ZP4	11	5	8	8	9		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZP7	9	3	3	7	7	0,27	0,250	0,913
16	7	IFN γ	neg	ZP7	9	2	2	5	6		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZP14	4	3	6	4	7	0,09	0,190	0,956
16	7	IFN γ	neg	ZP14	1	1	4	5	5		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZP21	11	4	5	4	7	0,12	0,159	0,786
16	7	IFN γ	neg	ZP21	5	3	0	4	7		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZP28	4	9	8	16	16	0,65	0,413	0,234
16	7	IFN γ	neg	ZP28	8	9	11	6	11		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZP35	17	12	9	9	11	34,41	0,004	0,024
16	7	IFN γ	neg	ZP35	3	2	5	4	4		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZPM9	18	15	19	21	22	74,97	0,004	0,004
16	7	IFN γ	neg	ZPM9	5	9	4	7	6		0,000	0,000
16	7	IFN γ	stim	ZPM91	26	42	46	49	47	6325,54	0,008	0,004
16	7	IFN γ	neg	ZPM91	23	20	12	28	11		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZP0	15	4	4	12	13	0,31	0,817	0,595
16	7	IL2	neg	ZP0	14	16	4	11	15		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZP2	23	28	24	21	35	0,29	0,833	0,004
16	7	IL2	neg	ZP2	24	24	29	30	30		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZP4	53	29	38	46	45	0,02	0,024	0,004
16	7	IL2	neg	ZP4	34	34	32	27	28		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZP7	25	24	47	19	21	0,27	0,933	0,004
16	7	IL2	neg	ZP7	40	32	25	28	31		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZP14	19	12	16	8	8	0,09	0,909	0,226
16	7	IL2	neg	ZP14	27	15	12	18	17		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZP21	13	15	2	12	9	0,12	1,000	0,532
16	7	IL2	neg	ZP21	27	18	16	25	19		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZP28	25	10	14	14	18	0,65	0,968	0,075
16	7	IL2	neg	ZP28	21	19	26	20	22		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZP35	27	23	17	27	40	34,41	0,258	0,004
16	7	IL2	neg	ZP35	19	24	28	18	18		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZPM9	5	11	5	8	7	74,97	0,476	0,718

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU	Anti-HBs					pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
16	7	IL2	neg	ZPM9	6	3	1	14	18		0,000	0,000
16	7	IL2	stim	ZPM91	11	13	8	20	30	6325,54	0,377	0,171
16	7	IL2	neg	ZPM91	8	20	16	7	20		0,000	0,000
N1	N	IFN γ	stim	ZP0	2	2	4	6	6	373,07	0,103	0,643
N1	N	IFN γ	neg	ZP0	1	2	0	3	4		0,000	0,000
N1	N	IFN γ	stim	ZP2	14	13	13	22	11	346,02	0,028	0,004
N1	N	IFN γ	neg	ZP2	4	5	2	13	12		0,000	0,000
N1	N	IFN γ	stim	ZP4	1	4	5	7	8	410,28	0,302	0,298
N1	N	IFN γ	neg	ZP4	2	1	4	7	6		0,000	0,000
N1	N	IFN γ	stim	ZP7	21	11	19	12	14	15000	0,004	0,004
N1	N	IFN γ	neg	ZP7	1	3	4	3	3		0,000	0,000
N1	N	IFN γ	stim	ZP14	3	12	18	5	6	15000	0,087	0,107
N1	N	IFN γ	neg	ZP14	0	2	5	4	8		0,000	0,000
N1	N	IFN γ	stim	ZP21	3	7	14	10	7	15000	0,048	0,024
N1	N	IFN γ	neg	ZP21	4	5	6	1	6		0,000	0,000
N1	N	IFN γ	stim	ZP28	8	11	12	19	11	15000	0,008	0,004
N1	N	IFN γ	neg	ZP28	6	8	0	5	3		0,000	0,000
N1	N	IL2	stim	ZP0	13	10	28	43	53	373,07	0,345	0,587
N1	N	IL2	neg	ZP0	8	16	17	25	44		0,000	0,000
N1	N	IL2	stim	ZP2	24	47	41	46	87	346,02	0,726	0,155
N1	N	IL2	neg	ZP2	31	45	55	52	51		0,000	0,000
N1	N	IL2	stim	ZP4	3	8	40	57	13	410,28	0,726	0,750
N1	N	IL2	neg	ZP4	11	25	32	35	49		0,000	0,000
N1	N	IL2	stim	ZP7	5	4	6	5	5	15000	1,000	1,000
N1	N	IL2	neg	ZP7	7	18	9	28	34		0,000	0,000
N1	N	IL2	stim	ZP14	31	14	24	8	53	15000	0,476	0,607
N1	N	IL2	neg	ZP14	12	21	12	45	46		0,000	0,000
N1	N	IL2	stim	ZP21	22	23	62	52	21	15000	0,107	0,345
N1	N	IL2	neg	ZP21	17	19	17	40	40		0,000	0,000
N1	N	IL2	stim	ZP28	28	30	38	26	57	15000	0,004	0,298
N1	N	IL2	neg	ZP28	9	20	12	15	21		0,000	0,000
N2	N	IFN γ	stim	ZP0	11	4	3	6	11	2,21	0,095	0,595
N2	N	IFN γ	neg	ZP0	1	2	2	7	6		0,000	0,000
N2	N	IFN γ	stim	ZP2	22	13	11	16	22	2,64	0,032	0,012
N2	N	IFN γ	neg	ZP2	10	16	7	12	9		0,000	0,000
N2	N	IFN γ	stim	ZP4	7	6	4	15	9	2,04	0,837	0,345
N2	N	IFN γ	neg	ZP4	7	10	7	11	10		0,000	0,000
N2	N	IFN γ	stim	ZP7	24	33	19	22	25	245,57	0,004	0,004
N2	N	IFN γ	neg	ZP7	15	6	5	12	3		0,000	0,000
N2	N	IFN γ	stim	ZP14	17	4	15	26	29	7121,53	0,060	0,036
N2	N	IFN γ	neg	ZP14	9	8	4	8	10		0,000	0,000
N2	N	IFN γ	stim	ZP21	17	15	14	16	23	5695,3	0,004	0,004
N2	N	IFN γ	neg	ZP21	3	12	3	3	5		0,000	0,000

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU					Anti-HBs	pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
N2	N	IFN γ	stim	ZP28	16	15	24	29	47	3803,44	0,016	0,004
N2	N	IFN γ	neg	ZP28	8	9	8	8	18		0,000	0,000
N2	N	IL2	stim	ZP0	42	21	18	20	41	2,21	1,000	0,587
N2	N	IL2	neg	ZP0	70	56	60	48	90		0,000	0,000
N2	N	IL2	stim	ZP2	50	38	58	55	56	2,64	0,996	0,016
N2	N	IL2	neg	ZP2	62	60	68	62	56		0,000	0,000
N2	N	IL2	stim	ZP4	28	43	28	77	74	2,04	0,881	0,044
N2	N	IL2	neg	ZP4	87	61	38	88	66		0,000	0,000
N2	N	IL2	stim	ZP7	20	9	14	34	28	245,57	0,925	0,861
N2	N	IL2	neg	ZP7	32	33	23	21	43		0,000	0,000
N2	N	IL2	stim	ZP14	19	46	27	78	32	7121,53	0,925	0,210
N2	N	IL2	neg	ZP14	34	54	53	71	59		0,000	0,000
N2	N	IL2	stim	ZP21	37	31	9	60	82	5695,3	0,500	0,274
N2	N	IL2	neg	ZP21	47	25	39	52	36		0,000	0,000
N2	N	IL2	stim	ZP28	37	36	20	56	55	3803,44	0,210	0,171
N2	N	IL2	neg	ZP28	30	33	19	38	45		0,000	0,000
N3	N	IFN γ	stim	ZP0	36	47	55	43	49	3236,87	0,004	0,587
N3	N	IFN γ	neg	ZP0	13	2	8	19	6		0,000	0,000
N3	N	IFN γ	stim	ZP2	159	97	124	144	146	3474,4	0,004	0,004
N3	N	IFN γ	neg	ZP2	56	56	60	57	48		0,000	0,000
N3	N	IFN γ	stim	ZP4	138	124	143	152	143	3005,05	0,004	0,004
N3	N	IFN γ	neg	ZP4	49	47	50	24	36		0,000	0,000
N3	N	IFN γ	stim	ZP7	165	161	201	175	193	15000	0,004	0,004
N3	N	IFN γ	neg	ZP7	34	33	40	29	23		0,000	0,000
N3	N	IFN γ	stim	ZP14	121	94	151	141	133	15000	0,004	0,004
N3	N	IFN γ	neg	ZP14	13	26	33	35	20		0,000	0,000
N3	N	IFN γ	stim	ZP21	209	114	161	184	122	15000	0,004	0,004
N3	N	IFN γ	neg	ZP21	25	21	25	24	26		0,000	0,000
N3	N	IFN γ	stim	ZP28	98	119	84	126	104	15000	0,004	0,004
N3	N	IFN γ	neg	ZP28	7	25	12	13	7		0,000	0,000
N3	N	IL2	stim	ZP0	119	103	110	114	147	3236,87	0,004	0,587
N3	N	IL2	neg	ZP0	32	53	92	79	78		0,000	0,000
N3	N	IL2	stim	ZP2	97	69	83	135	123	3474,4	0,008	0,845
N3	N	IL2	neg	ZP2	67	61	56	64	80		0,000	0,000
N3	N	IL2	stim	ZP4	28	18	154	109	68	3005,05	0,500	0,925
N3	N	IL2	neg	ZP4	70	82	42	49	45		0,000	0,000
N3	N	IL2	stim	ZP7	8	7	30	12	20	15000	0,996	1,000
N3	N	IL2	neg	ZP7	39	21	34	39	54		0,000	0,000
N3	N	IL2	stim	ZP14	50	24	94	75	66	15000	0,655	1,000
N3	N	IL2	neg	ZP14	90	67	44	83	58		0,000	0,000
N3	N	IL2	stim	ZP21	7	11	21	197	9	15000	0,952	0,952
N3	N	IL2	neg	ZP21	39	23	33	53	46		0,000	0,000
N3	N	IL2	stim	ZP28	151	113	123	156	169	15000	0,004	0,048

Anhang

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU	Anti-HBs					pval	pval
											(stimvsneg)	(stimOvsstim)
N3	N	IL2	neg	ZP28	35	31	26	33	35		0,000	0,000
N4	N	IFN γ	stim	ZP0	7	10	6	8	11	39	0,103	0,587
N4	N	IFN γ	neg	ZP0	1	0	7	11	3		0,000	0,000
N4	N	IFN γ	stim	ZP2	30	29	32	38	44	39,86	0,004	0,004
N4	N	IFN γ	neg	ZP2	14	10	8	19	15		0,000	0,000
N4	N	IFN γ	stim	ZP4	13	17	11	23	18	40,26	0,012	0,008
N4	N	IFN γ	neg	ZP4	12	11	6	9	5		0,000	0,000
N4	N	IFN γ	stim	ZP7	34	22	10	24	26	6731,32	0,008	0,012
N4	N	IFN γ	neg	ZP7	11	2	4	7	4		0,000	0,000
N4	N	IFN γ	stim	ZP14	105	60	81	57	74	15000	0,004	0,004
N4	N	IFN γ	neg	ZP14	4	3	5	5	9		0,000	0,000
N4	N	IFN γ	stim	ZP21	29	62	43	49	38	15000	0,004	0,004
N4	N	IFN γ	neg	ZP21	8	5	9	5	9		0,000	0,000
N4	N	IFN γ	stim	ZP28	50	60	53	55	70	15000	0,004	0,004
N4	N	IFN γ	neg	ZP28	7	3	12	12	7		0,000	0,000
N4	N	IL2	stim	ZP0	27	19	27	31	66	39	0,258	0,603
N4	N	IL2	neg	ZP0	26	33	17	34	17		0,000	0,000
N4	N	IL2	stim	ZP2	42	48	45	48	42	39,86	0,020	0,079
N4	N	IL2	neg	ZP2	27	28	36	45	26		0,000	0,000
N4	N	IL2	stim	ZP4	34	24	54	52	68	40,26	0,048	0,143
N4	N	IL2	neg	ZP4	38	30	16	27	19		0,000	0,000
N4	N	IL2	stim	ZP7	4	9	14	12	11	6731,32	0,238	1,000
N4	N	IL2	neg	ZP7	9	5	5	4	14		0,000	0,000
N4	N	IL2	stim	ZP14	10	30	11	7	15	15000	0,675	0,980
N4	N	IL2	neg	ZP14	16	20	5	14	15		0,000	0,000
N4	N	IL2	stim	ZP21	53	10	16	16	36	15000	0,004	0,833
N4	N	IL2	neg	ZP21	5	6	4	6	7		0,000	0,000
N4	N	IL2	stim	ZP28	26	19	13	37	29	15000	0,024	0,802
N4	N	IL2	neg	ZP28	11	15	7	15	14		0,000	0,000
N5	N	IFN γ	stim	ZP0	22	10	12	15	7	836,29	0,369	0,587
N5	N	IFN γ	neg	ZP0	6	18	9	18	10		0,000	0,000
N5	N	IFN γ	stim	ZP2	33	34	29	60	36	902,7	0,444	0,004
N5	N	IFN γ	neg	ZP2	34	48	32	38	25		0,000	0,000
N5	N	IFN γ	stim	ZP4	20	20	30	33	21	886,86	0,004	0,024
N5	N	IFN γ	neg	ZP4	13	16	10	14	14		0,000	0,000
N5	N	IFN γ	stim	ZP7	59	41	57	89	41	15000	0,004	0,004
N5	N	IFN γ	neg	ZP7	4	9	6	9	5		0,000	0,000
N5	N	IFN γ	stim	ZP14	102	76	43	58	40	15000	0,004	0,004
N5	N	IFN γ	neg	ZP14	24	25	15	23	18		0,000	0,000
N5	N	IFN γ	stim	ZP21	60	47	44	75	73	15000	0,004	0,004
N5	N	IFN γ	neg	ZP21	14	9	5	7	3		0,000	0,000
N5	N	IFN γ	stim	ZP28	83	70	70	86	107	15000	0,004	0,004
N5	N	IFN γ	neg	ZP28	28	17	37	24	13		0,000	0,000

Proband	Lauf	Messgröße	Ansatz	Zeitpunkt	SFU						Anti-HBs	pval	pval
												(stimvsneg)	(stimOvsstim)
N5	N	IL2	stim	ZP0	107	57	39	68	103	836,29	0,710	0,587	
N5	N	IL2	neg	ZP0	84	87	81	69	87		0,000	0,000	
N5	N	IL2	stim	ZP2	70	72	65	73	64	902,7	0,008	0,500	
N5	N	IL2	neg	ZP2	61	44	51	56	64		0,000	0,000	
N5	N	IL2	stim	ZP4	93	42	11	38	26	886,86	0,790	0,972	
N5	N	IL2	neg	ZP4	57	29	30	90	56		0,000	0,000	
N5	N	IL2	stim	ZP7	15	3	6	10	6	15000	1,000	1,000	
N5	N	IL2	neg	ZP7	25	34	28	40	45		0,000	0,000	
N5	N	IL2	stim	ZP14	10	12	2	22	17	15000	1,000	1,000	
N5	N	IL2	neg	ZP14	26	25	40	30	27		0,000	0,000	
N5	N	IL2	stim	ZP21	10	8	0	6	2	15000	1,000	1,000	
N5	N	IL2	neg	ZP21	21	20	14	16	24		0,000	0,000	
N5	N	IL2	stim	ZP28	224	173	126	203	257	15000	0,004	0,004	
N5	N	IL2	neg	ZP28	23	24	15	16	20		0,000	0,000	

7 Literaturverzeichnis

1. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. 2009. pp. S13–21.
2. WHO. Hepatitis B. WHO, editor. WHO. World Health Organization; 2008 Aug 1; Revised August 2008.
3. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology*. 2006 Oct;45(4):529–38.
4. Edmunds WJ, Medley GF, Nokes DJ, Hall AJ, Whittle HC. The Influence of Age on the Development of the Hepatitis B Carrier State. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society; 1993 Aug 23;253(1337):197–201.
5. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005 Mar;5(3):215–29.
6. Sim JG, Seo JK, Suh SJ. Prevalence and Its Changes of Hepatitis B Viral Markers from 1988 to 1993 in Korean Children. *Korean Journal of Pediatrics*. 38(11):1535–9.
7. So Young Kwon CHL. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *The Korean Journal of Hepatology*. Korean Association for the Study of the Liver; 2011 Jun 1;17(2):87.
8. Ferrante JM, Winston DG, Chen P-H, la Torre de AN. Family physicians' knowledge and screening of chronic hepatitis and liver cancer. *Fam Med*. 2008 May;40(5):345–51.
9. Tilson L, Thornton L, O'Flanagan D, Johnson H, Barry M. Cost effectiveness of hepatitis B vaccination strategies in Ireland: an economic evaluation. *The European Journal of Public Health*. 2008 Feb 7;18(3):275–82.
10. Guy W Neff. The Current Economic Burden of Cirrhosis. *Gastroenterology & Hepatology*. Millenium Medical Publishing; 2011 Oct 1;7(10):661.
11. Sun-Young Kim Jassjg. Economic evaluation of hepatitis B vaccination in low-income countries: using cost-effectiveness affordability curves. *Bulletin of the World Health Organization*. World Health Organization; 2007 Nov 1;85(11):833.
12. Beasley et al. HBIG prophylaxis for perinatal HBV infections--final report of the Taiwan trial. *Developments in biological Standization*. 1983 Apr 29;54:363–75.
13. Lee C, Gong Y, Brok J, Boxall EH, Gluud C. Effect of hepatitis B immunisation in newborn infants of mothers positive for hepatitis B surface antigen: systematic review and meta-analysis [Internet]. *BMJ*, doi:10.1136/bmj.38719.435833.7C. 2006 [cited 2012 Apr 3]. Available from:

<http://www.bmj.com/content/332/7537/328?view=long&pmid=16443611>

14. Hofmann F, Kralj N. Hepatitis B - Postexpositionelle Prophylaxe, Übertragungsrisiko, Schutzimpfung. In: Hofmann F, Jilg W, editors. Nosokomiale Übertragung von HBV, HCV und HIV. Ecomed Verlag; 1998. pp. 42–7.
15. Iwarson S, Wahl M, Ruttiman E, Snoy P, Seto B, Gerety RJ. Successful postexposure vaccination against hepatitis B in chimpanzees. *J Med Virol*. 1988 Aug 1;25(4):433–9.
16. France A, Guidotti LG, Hobbs MV, Pasquetto V, Chisari FV. Pathogenetic Effector Function of CD4-Positive T Helper 1 Cells in Hepatitis B Virus Transgenic Mice. *J Immunol*. 1997 Aug 15;159(4):2001–8.
17. Hollander M, Wolfe DA, Chicken E. *Nonparametric Statistical Methods*. 3rd ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 7 p.
18. Schumann A, Fiedler M, Dahmen U, Grosse-Wilde H, Roggendorf M, Lindemann M. Cellular and humoral immune response to a third generation hepatitis B vaccine. *J Viral Hepat*. 2007 Aug;14(8):592–8.
19. De Rosa SC, Lu FX, Yu J, Perfetto SP, Falloon J, Moser S, et al. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *The Journal of Immunology*. 2004 Nov 1;173(9):5372–80.
20. Desombere I, Clement F, Rigole H, Leroux-Roels G. The duration of in vitro stimulation with recall antigens determines the subset distribution of interferon-gamma-producing lymphoid cells: a kinetic analysis using the Interferon-gamma Secretion Assay. *J Immunol Methods*. 2005 Jun;301(1-2):124–39.
21. Albarran B, Goncalves L, Salmen S, Borges L, Fields H, Soyano A, et al. Profiles of NK, NKT cell activation and cytokine production following vaccination against hepatitis B. *APMIS*. 2005 Jun;113(7-8):526–35.
22. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut*. 2009 Jul;58(7):974–82.
23. Litjens NHR, Huisman M, Baan CC, van Druningen CJ, Betjes MGH. Hepatitis B vaccine-specific CD4(+) T cells can be detected and characterised at the single cell level: limited usefulness of dendritic cells as signal enhancers. *J Immunol Methods*. 2008 Jan 31;330(1-2):1–11.
24. Desombere I, Meuleman P, Rigole H, Willems A, Irsch J, Leroux-Roels G. The interferon gamma secretion assay: a reliable tool to study interferon gamma production at the single cell level. *J Immunol Methods*. 2004 Mar;286(1-2):167–85.
25. Bauer T. Untersuchungen zur zellulären Immunantwort nach Impfung gegen das Hepatitis B-Virus. 2002. pp. 1–158.

26. Litjens NHR, Huisman M, Hijdra D, Lambrecht BMN, Stittelaar KJ, Betjes MGH. IL-2 producing memory CD4+ T lymphocytes are closely associated with the generation of IgG-secreting plasma cells. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):3665–73.
27. Schmidt A, Oberle N, Weiß E-M, Vobis D, Frischbutter S, Baumgrass R, et al. Human Regulatory T Cells Rapidly Suppress T Cell Receptor-Induced Ca²⁺, NF-κB, and NFAT Signaling in Conventional T Cells. *Science Signaling.* *Science Signaling*; 2011;4(204):ra90–0.
28. Wiegand J, Meya S, Schlaphoff V, Manns MP, Mössner J, Wedemeyer H, et al. HBV-specific T-cell responses in healthy seronegative sexual partners of patients with chronic HBV infection. *J Viral Hepat.* 2009 Oct.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jilg für die Möglichkeit unter seiner Betreuung diese Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Ich möchte mich für die große Unterstützung und die stets offene Türe herzlich bedanken.

Weiter möchte ich mich für die große Hilfestellung und Motivation, sowie stets wohlwollende Kritik von Barbara Huber und Jürgen Wenzel bedanken. Nicht zuletzt auch die angenehme Atmosphäre und selbstverständliche Aufnahme durch die MitarbeiterInnen der Routineabteilung des Instituts haben beträchtlich zur vorliegenden Arbeit beigetragen.

Schließlich möchte ich mich für die selbstlose und immerwährende Unterstützung meiner Familie und meiner Lebensgefährtin Julia Hois bedanken, ohne die all dies nie möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Ulf Leisner
Geburtsdatum/ -ort: 19.09.1983 / Henstedt-Ulzburg
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Werdegang

08/94-07/04 Carl-Duisberg-Gymnasium, Wuppertal (Abiturdurchschnittsnote 1,4)
08/00-07/01 Akademisches Austauschjahr in Los Angeles, CA, U.S.A.
08/04-04/05 Zivildienst beim DRK Wuppertal e.V.
10/05-07/06 Diplom Mathematikstudium , Friedrich-Wilhelm Universität Bonn
10/06-06/13 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg (Gesamtnote 2,0)
09/07 Tagespraktika ER Fresno Community Hospital & American Ambulance
(Fresno, CA, U.S.A.)
08/13-07/16 Facharztweiterbildung Innere Medizin
Dr. med. Joachim Berger, Goldbergklinik Kelheim
seit 08/2016 Facharztweiterbildung Innere Medizin
Prof. Dr. med. Lars Maier, Universitätsklinik Regensburg

Fortbildungen / Zusatzbezeichnung:

06/16 Sachkundekurs Herzschrittmachertherapie (Universitätsklinik Regensburg)
04/16 PHTLS-Provider
03/16 DGIIN ICU Beginner-Kurs (Universitätsklinik Aachen)
12/15 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin, seit 2/16 aktive Teilnahme am Notarztdienst
10/15 EPLS-Provider (Universitätsklinik Köln)
04/15 DEGUM Grundkurs Abdomensonographie (KH Agatharied)
12/14-10/15 Grundkurs / Spezialkurs im Strahlenschutz
10/08-10/11 Leitung der studentischen Arbeitsgruppe Notfallmedizin
Sprachkenntnisse : Englisch (flüssig in Schrift und Sprache),
Arabisch & Französisch (Grundkenntnisse)