

Aus dem Bereich Klinische Medizin

Fachrichtung Infektionsmedizin

Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie

der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Zelluläre und Humorale Immunantwort bei Leistungssportlern nach Influenza-Impfung

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

Vorgelegt von

Alexandra Ledo

geb. am 28.04.1995 in München

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung.....	12
2.1	Das Influenza Virus	12
2.1.1	Molekulare Grundlagen, Epidemiologie und Klinik.....	12
2.1.2	Diagnostik der Influenza.....	13
2.1.3	Influenza Therapie und Prävention.....	14
2.2	Immunologische Grundlagen.....	16
2.2.1	Entstehung und Funktion des zellulären adaptiven Immunsystems.....	16
2.2.2	Die Rezeptoren des zellulären adaptiven Immunsystems und ihre Wirkungsweise	16
2.2.3	Zytokine als Botenstoffe des Immunsystems.....	17
2.2.4	Vielfalt und Interaktion der T-Zellen über Zytokine	18
2.2.5	Follikuläre T-Helferzellen als Stütze der B- und T-Zellaktivierung und Reifung	19
2.2.6	Rolle kostimulatorischer Oberflächenmoleküle bei der T-Zellregulation.....	20
2.3	Bedeutung von Impfungen im Leistungssport.....	21
2.3.1	Der Einfluss des Leistungssports auf die Immunfunktion.....	23
2.3.2	Impfempfehlung für Influenza und Skepsis im Leistungssport	24
2.4	Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Geräte und Materialien	27
3.2	Antikörper.....	29
3.3	Antigene.....	30
3.4	Software.....	31
3.5	Probandenkollektiv und Studiendesign.....	31
3.6	Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen	32
3.6.1	Testprinzip	32
3.6.2	Antigen spezifische Stimulation im Vollblut.....	33
3.6.3	Fixierung der stimulierten Proben.....	33

3.6.4	Intrazelluläre Färbung stimulierter T-Zellen mit Fluorchrom-gekoppelten Antikörpern.....	34
3.7	Quantifizierung und Phänotypisierung von B- und T-Zellsubpopulationen mittels Oberflächenfärbung.....	35
3.7.1	Testprinzip	35
3.7.2	Durchführung der Oberflächenfärbung mit Fluorchrom-markierten Antikörpern	36
3.8	Durchflusszytometrie.....	37
3.8.1	Methodisches Prinzip	37
3.8.2	Messung und Auswertung am Durchflusszytometer	38
3.9	Semiquantitative und quantitative Bestimmung von anti-Influenza-IgG, -IgM und -IgA	42
3.9.1	Testprinzip	42
3.9.2	Durchführung des Anti-Influenza-IgG, -IgM und -IgA ELISA.....	43
3.9.3	Messung und Auswertung am Photometer.....	44
3.10	Quantitative Messung Virus-neutralisierender Antikörper mittels Neutralisationstestung	44
3.10.1	Testprinzip	44
3.10.2	Durchführung der Neutralisationstestung	45
3.10.3	Messung der Neutralisierenden Antikörpertiter.....	46
3.11	Statistische Analyse.....	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Probandenkollektiv.....	48
4.2	Durch Influenza-Impfung induzierter Anstieg des Anteils Influenza-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in Sportler-und Kontrollpersonen	49
4.3	Impf-induzierter Anstieg des Oberflächenmoleküls CTLA-4 auf den Influenza-spezifischen T-Zellen und Stabilität der CD27 Expression.....	51
4.4	Veränderung des Zytokinprofils Influenza-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen von multifunktionellem zu einfach Zytokin-positivem Expressionsmuster	55
4.5	Stabile Level T folliculärer Helferzellen und vergleichbare Expression von ICOS und PD1 von Sportlern und Kontrollpersonen auf diesem Zelltyp	57

4.6	Phänotyp und Differenzierungsstatus von B-Zellen und Induktion von Plasmablasten nach Influenza-Impfung	60
4.7	Induktion Influenza-spezifischer Antikörper nach Impfung.....	61
4.8	Impf-induzierte Zunahme der neutralisierenden Antikörper gegen die Influenza Stämme H1N1, H3N2, Brisbane und Phuket	62
4.9	Geringe Ausprägung von Nebenwirkungen der saisonalen Influenza-Impfung bei Kontrollen und Sportlern.....	65
5	Diskussion	67
5.1	Stärkere zelluläre und humorale Impfreaktion bei Leistungssportlern.....	67
5.2	Funktionelle Veränderungen der CD4 ⁺ T-Zellen ergeben keinen Hinweis auf Immunschwäche bei Leistungssportlern.....	71
5.3	Zellen mit Bedeutung für das humorale Immunsystem zeigen vergleichbare Ausprägungen in beiden Studienpopulationen.....	72
5.4	Die geringe Inzidenz, Intensität und Dauer der Impfnebenwirkungen spricht für eine generelle Influenzaimpfempfehlung für Leistungssportler	74
5.5	Limitationen der Studie.....	75
5.6	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	76
6	Literaturverzeichnis.....	78
7	Publikationen.....	84
7.1	Originalarbeiten.....	84
7.2	Kongressbeiträge.....	84
8	Danksagung	85
9	Lebenslauf.....	86

Vorbemerkung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in Form einer Originalarbeit publiziert (LEDO et al., 2020). Des Weiteren ging ein Teil der experimentellen Daten in eine weitere Originalarbeit ein (STENGER et. al., 2020). Bei der Durchführung der Arbeit und bei der Auswertung der Daten wurde ich von Herrn Dr. rer. nat. David Schub und Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester betreut. Bei dieser Dissertationsschrift handelt es sich um eine ausführlichere Fassung der publizierten Originalarbeit. Ein Teil des Textes und der Abbildungen dieser Dissertationsschrift stellen eine deutsche Reproduktion der Originalarbeit dar.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
APC	Antigen presenting cell
BCR	B cell Receptor
BKPyV	BK Humanes Polyomavirus 1
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD	Cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CMV	<i>Siehe</i> Zytomegalievirus
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCR5	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
E-MEM	Minimum Essential Medium mit Earl's salts
HIV	<i>Siehe</i> Humanes Immundefizienz Virus
ICOS	Inducible T-cell COStimulator
IFN γ	Interferon gamma
IQR	Interquartile range
kDa	Kilodalton
M2	Matrixprotein 2
MHC	major histocompatibility complex
NEA	Non-essential Amino acids
NKC	Natural Killer cell
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
pdm	pandemic
RNS	Ribonukleinsäure

SD Standard Deviation
STIKO Ständige Impfkommission

TCR T cell Receptor
Tfh follicular T helper
TH T Helper
TNF Tumornekrosefaktor
Treg regulatory T cell

VZV Varizella Zoster Virus

1 Zusammenfassung

Aktuelle Impfeempfehlungen werden im Leistungssport nur unzureichend befolgt. Dies beruht hauptsächlich auf der Skepsis der Impfwirksamkeit bei kontinuierlichem körperlichem Training, sowie auf der Sorge vor ausgeprägten Nebenwirkungen. Wenngleich Impfungen essenziell zur Prävention infektiöser Erkrankungen wie Influenza sind, ist die immunologische Wirkung der Impfung bei Leistungssportlern im Vergleich zu Kontrollpersonen nur unzureichend charakterisiert. Daher bestand das Ziel der Studie darin, die spezifisch induzierte zelluläre und humorale Immunantwort nach saisonaler Influenzaimpfung von Leistungssportlern mit der von gesunden, durchschnittlich trainierten Kontrollpersonen zu vergleichen. Zudem galt es herauszufinden, ob Leistungssportler stärker von Nebenwirkungen durch die Impfung betroffen sind, was je nach Ausprägung eine Einschränkung des Trainingsplans zur Folge hätte.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, rekrutierten wir 45 gesunde Leistungssportler und 25 Kontrollen, welche mit dem tetravalenten Influenza Impfstoff der Saison 2016/17 geimpft wurden. Blutentnahmen fanden vor sowie ein, zwei und 26 Wochen nach Impfung statt. Hierdurch sollten Erkenntnisse zur Induktion der zellulären und humoralen Immunantwort über einen Zeitraum von 6 Monaten nach Impfung gewonnen werden.

Die Dynamik Influenza-spezifischer und CD4⁺ T-Zellen wurde nach spezifischer Stimulation mit dem Impfstoff mittels intrazellulärer Zytokinfärbung im Durchflusszytometer quantifiziert. Zudem wurden Influenza-spezifische CD4⁺ T-Zellen mittels Oberflächenfärbung und Zytokinmuster phänotypisch und funktionell charakterisiert. Eine Charakterisierung von polyklonal stimulierten Zellen erfolgte parallel. Weiterhin wurden Zellsubpopulationen von T-Zellen inklusive der T folliculären Helferzellen und B-Lymphozyten identifiziert und im zeitlichen Verlauf vor und nach Impfung gemessen. Influenza-spezifische IgG, IgA und IgM gegen Influenza-A- und Influenza-B-Viren wurden mit einem ELISA quantifiziert. Die funktionelle Charakterisierung der Antikörper erfolgte über einen Neutralisationstest. Zusätzlich wurden Impfnebenwirkungen und Einschränkungen in der sportlichen Aktivität über ein Nebenwirkungstagebuch erfasst.

In der vorliegenden Studie konnte in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg Influenza-reaktiver CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden, welcher eine Woche nach Impfung am stärksten ausgeprägt war. In ähnlicher Weise zeigte sich auch ein signifikanter Anstieg der Influenza-spezifischen Antikörper, die quantitativ über ELISA- sowie qualitativ über Neutralisationstestungen charakterisiert wurden. In der Gruppe der Leistungssportler fiel sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunreaktion signifikant stärker aus. Durch die Analyse der Zytokinexpression konnten zudem charakteristische Veränderungen im Zytokinprofil der Influenza-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Vor Impfung wiesen die Zellen ein durch IFN γ , IL-2 und TNF α Koexpression gekennzeichnetes multifunktionelles

Profil auf, wohingegen in der Frühphase nach Impfung eine eingeschränkte Zytokinexpression mit mehrheitlich einfach Zytokin-produzierenden Zellen nachgewiesen wurde. Diese Änderung der Funktionalität war assoziiert mit einem signifikanten Anstieg der CTLA-4 Expression, welcher erneut für die Gruppe der Leistungssportler signifikant stärker ausgeprägt war.

Die Analyse der T folliculären Helferzellen zeigte einen schwachen Anstieg dieser Zellpopulation in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Proben der Leistungssportler auf. Die Expression der Oberflächenmoleküle ICOS und PD-1 auf diesen Zellen verhielt sich hingegen in beiden Gruppen stabil. Das vorrangig von Tfh Zellen produzierte Zytokin IL-21 war nur schwach nachweisbar, auch wenn nach Impfung signifikante Anstiege eine Woche nach Impfung in beiden Gruppen identifiziert wurden. Innerhalb der B-Zellsubpopulationen zeigte sich eine signifikante Zunahme im Anteil der Plasmablasten, während sich naive B-Zellen erwartungsgemäß im zeitlichen Verlauf stabil verhielten.

Lokale oder systemische Impfreaktionen waren mild bis moderat und zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Es wurden keine Impfnebenwirkungen angegeben, die zu einer Einschränkung im Training der Leistungssportler geführt haben.

Zusammenfassend waren sowohl Kontrollen als auch Leistungssportler in der Lage eine deutliche Influenza-spezifische zelluläre und humorale Immunantwort nach saisonaler Influenzaimpfung zu generieren. Die ausgeprägtere Immunität bei Leistungssportlern ergibt keinen Hinweis auf eine eingeschränkte Immunfunktion durch regelmäßiges und intensives körperliches Training. Zusammen mit der guten Verträglichkeit stützt diese Arbeit die Empfehlung der Influenzaimpfung zur Prävention einer Influenza im Leistungssport.

Summary

Current vaccination recommendations are insufficiently followed in competitive sport. This is mainly due to scepticism about the effectiveness of vaccination in continuous physical training, as well as concerns about pronounced side effects. Although vaccination is essential for the prevention of infectious diseases such as influenza, the immunological effect of vaccination in competitive athletes compared to control subjects is poorly characterised. Therefore, the aim of the study was to compare the specifically induced cellular and humoral immune response after seasonal influenza vaccination of competitive athletes with that of healthy, averagely trained control subjects. In addition, the aim was to find out whether competitive athletes are more affected by side effects from the vaccination, which, depending on their severity, would result in a restriction of the training schedule.

To address this question, we recruited 45 healthy athletes and 25 controls who were vaccinated with the tetravalent influenza vaccine of the 2016/17 season. Blood samples were taken before, one, two and 26 weeks after vaccination. The aim was to gain insights into the induction of the cellular and humoral immune response over a period of 6 months after vaccination.

The dynamics of influenza specific and CD4+ T cells were quantified after specific stimulation with the vaccine using intracellular cytokine staining in a flow cytometer. In addition, influenza specific CD4+ T cells were phenotypically and functionally characterised by surface staining and cytokine patterning. A characterisation of polyclonally stimulated cells was performed in parallel. Furthermore, cell subpopulations of T cells including follicular helper cells and B lymphocytes were identified and measured over time before and after vaccination. Influenza-specific IgG, IgA and IgM against influenza A and influenza B viruses were quantified by ELISA. The functional characterisation of the antibodies was performed by a neutralisation test. In addition, vaccination side effects and limitations in sports activity were recorded via a side effect diary.

In the present study, a significant increase in influenza reactive CD4+ T cells was observed in both groups, which was most pronounced one week after vaccination. Similarly, there was a significant increase in influenza-specific antibodies, which were characterised quantitatively by ELISA and qualitatively by neutralisation tests. In the group of competitive athletes, both the cellular and humoral immune responses were significantly stronger. By analysing cytokine expression, characteristic changes in the cytokine profile of the influenza-specific T cells could also be detected. Before vaccination, the cells exhibited a multifunctional profile characterised by IFN γ , IL-2 and TNF α co-expression, whereas in the early phase after vaccination, a restricted cytokine expression was detected with a majority of single cytokine-producing cells. This change in functionality was associated with a significant increase in CTLA-4 expression, which was again significantly greater for the competitive group.

Analysis of T follicular helper cells revealed a weak increase in this cell population in the control group compared to the competitive athlete samples. The expression of the surface molecules ICOS and PD-1 on these cells, however, remained stable in both groups. The cytokine IL-21, produced primarily by Tfh cells, was only weakly detectable, although significant increases were identified one week after vaccination in both groups. Within the B cell subpopulations, there was a significant increase in the proportion of plasmablasts, while naïve B cells remained stable over time, as expected.

Local or systemic vaccine reactions were mild to moderate and showed no differences between groups. No vaccination side effects were reported that led to limitation in training of the competitive athletes.

In conclusion, both controls and competitive athletes were able to generate a marked influenza-specific cellular and humoral immune response after seasonal influenza vaccination. The more pronounced immunity in competitive athletes gives no indication of impaired immune function due to regular and intensive physical training. Together with the good tolerability, this dissertation supports the recommendation of influenza vaccination for the prevention of influenza in competitive sports.

2 Einleitung

2.1 Das Influenza Virus

2.1.1 Molekulare Grundlagen, Epidemiologie und Klinik

Das Influenzavirus, auch Grippevirus genannt, gehört zur Familie der Orthomyxoviridae, welche 5 Untergruppen, u.a. die humanpathogenen Influenzaviren A bis C, unter sich vereint. Diese Genera unterscheiden sich in ihren viralen Antigenen, ihrer Virusstruktur und dem Wirt, welchen sie primär befallen. Influenza B Viren zirkulieren zum Beispiel nur beim Menschen. Die Virusoberfläche von Influenza A besitzt charakteristischerweise die Hüllproteine Hämagglutinin und Neuraminidase, durch deren Heterogenität beispielsweise die Subtypen H1N1 oder H3N2 unterschieden werden. Die Neuraminidase ist nur auf Influenza A und B vorhanden. Diese Proteine sind verantwortlich für die Infektion beziehungsweise Abschnürung von der Wirtszelle (Haas 2009). Das Genom des Grippevirus besteht aus einzelsträngiger und segmentierter RNA mit negativer Polarität (Hutchinson 2018). Im Rahmen der Antigendrift kommt es häufig, meist durch Punktmutationen, zu Veränderungen der antigenen Eigenschaften. Eine einmalige Immunisierung oder Infektion stellt somit keinen Schutz vor Reinfektionen dar (Haas 2009). Die Antigendrift kann Ursache einer Influenzaepidemie sein. Beim Antigen shift kommt es hingegen zum Austausch ganzer Genomsegmente, was in seltenen Fällen Ursprung von Pandemien darstellen kann (Groß 2013). Häufig wird Influenza über Tröpfcheninfektion oder indirektem Kontakt mit kontaminierten Oberflächen übertragen. Zielzellen des Virus sind Flimmerepithelien und Becherzellen des Tracheobronchialtrakts. Der Replikationszyklus des Virus dauert vier bis sechs Stunden, sodass bereits einen Tag nach der Infektion hohe Virustiter im Bronchialsekret messbar sind. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich zwei Tage und die infektiöse Periode hält in etwa vier bis fünf Tage an (Haas 2009).

Die Bedeutung des Virus resultiert aus dessen Epidemiologie und Klinik. Jährlich kommt es global gesehen durch die saisonale Influenza A/B zu 290.000-650.000 Todesfällen (Hutchinson 2018). In der Grippezeit 2017/2018 wurden dem Robert-Koch-Institut in Deutschland 333.567 Influenzafälle gemeldet. Davon wurden 18% hospitalisiert und es kam zu 1665 Todesfällen. Besonders die Meldungen überstiegen deutlich die Zahlen aus dem Vorjahr (113.788 gemeldete Fälle in der Saison 2016/2017) (Kochanek et al. 2018).

Die unkomplizierte Influenza ist charakteristischerweise durch einen plötzlichen und starken Krankheitsbeginn gekennzeichnet. Es kommt zu hohem Fieber mit Schüttelfrost und starkem Schwächegefühl. Viele Patienten beklagen multiple Schmerzen, wie Kopf- und Gliederschmerzen, unproduktiven Husten und Rhinitis. In selteneren Fällen kann es zu Pneumonien, entweder viral oder sekundär bakteriell bedingt, kommen.

Auch Myokarditiden, Enzephalitiden und das toxische Schock Syndrom können auftreten. Die Ausprägung der Krankheit hängt von der Virulenz des Influenzavirus selbst und dem Gesundheitsstatus des Wirtes ab (Haas 2009).

2.1.2 Diagnostik der Influenza

In der modernen Labordiagnostik stehen zum Nachweis einer Infektion mit dem Influenza Virus zahlreiche direkte und indirekte Nachweisverfahren zur Verfügung. Zum Nachweis mittels direkter Messmethoden wird häufig Patientenmaterial aus dem oberen Respirationstrakt mit Nasen- oder Rachenabstrichen gewonnen und in diesem über Virusanzucht, Antigennachweis oder Polymerasekettenreaktion (PCR) der Erreger nachgewiesen. Da die Virusreplikation ihren Höhepunkt nach ungefähr zwei Tagen erreicht, ist ein Nachweis nach zwei bis drei Tagen nach Symptombeginn besonders erfolgsversprechend. Indirekte Laborverfahren in der klinischen Routine beruhen auf der Detektion spezifischer Antikörper oder T-Zellen (Haas 2009).

Die in der Klinik in Deutschland verwendeten Schnelltests, welche über Enzymimmunoassay Technik funktionieren, stellen ein Beispiel für einen Antigentest dar (Haas 2009). Hierbei sind monoklonale Antikörper gegen Nukleoproteine von Influenza A und B in eine Membran eingebettet. Wenn das Virusantigen im Probenmaterial vorhanden ist, kommt es zu einer enzymkatalysierten Farbreaktion (Schütt and Bröker 2011). Diese Schnelltests sind durch ihre hohe Spezifität charakterisiert. Die Sensitivität kann jedoch zwischen 60 bis 100% schwanken. Testverfahren, die auf direkter oder indirekter Immunfluoreszenz beruhend virales Antigen nachweisen, sind ebenfalls weit verbreitet. Allerdings wird für diese Testverfahren Probenmaterial benötigt, welches ausreichend epitheliale Zellen enthält. Zusätzlich sollte zwischen Probenentnahme und Testung nur wenig Zeit vergehen (Haas 2009). Eine Anzucht des Influenzavirus in Hühnereiern oder Zellkulturen spielt für die Klinik, aufgrund der Kulturdauer keine Rolle. Kulturverfahren kommen jedoch im Rahmen der nationalen und globalen Überwachung der Influenzaepidemiologie zur Anwendung (Haas 2009).

Um das Genom des Influenza Virus nachzuweisen, steht die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) zur Verfügung. Die PCR gilt mit ihren verschiedenen Varianten als besonders sensitiv und spezifisch. In der alltäglichen Labordiagnostik erhält diese besondere Relevanz, da geringste Virusmengen nachgewiesen werden können. Kurze Nukleinsäuresequenzen, sogenannte Primer, werden spezifisch ausgewählt, um gewünschte Abschnitte des Genoms zu vervielfältigen. Anschließend kann das amplifizierte Genmaterial mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden (Haas 2009; Schütt and Bröker 2011).

Zu den erwähnten indirekten Nachweisverfahren zählen unter anderem Antikörpertests. Diese können Gesamtantikörper und einzelne Antikörperklassen differenziert bestimmen. Hierfür werden regulär Enzymimmunoassays, Immunfluoreszenztests oder Komplementbindungsreaktionen angewendet. Zudem werden Hämagglutinationshemmtests

und Neutralisationstestung in wenigen, spezialisierten Laboren durchgeführt. Zum Nachweis einer aktiven Influenza Infektion werden Antikörpertests im klinischen Alltag jedoch kaum bis gar nicht verwendet, da sie zu lange dauern und/oder wie im Falle der Influenza-spezifischen IgGs lange im Blut persistieren, sodass Serumpaare von zwei verschiedenen meist weit auseinanderliegenden Zeitpunkten benötigt werden. Zur Anwendung kommen sie aus diesem Grund vorrangig bei epidemiologischen Studien, Ausbruchsauflösungen oder Nachweismessungen der Impfwirksamkeit (Haas 2009).

Die zelluläre Immunität nach Impfung wird nur in wenigen spezialisierten Laboren untersucht. Hierbei wird die Tatsache genutzt, dass nach entsprechender Stimulation Antigen-spezifische CD4⁺ T Lymphozyten Zytokine produzieren und charakteristische Oberflächenmarker exprimieren. Diese Antigen-spezifischen Expressionen ermöglichen nach Markierung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern den Nachweis der Zellen im Durchflusszytometer. Die Methodik der intrazellulären Zytokinfärbung und anschließender Quantifizierung und Charakterisierung im Durchflusszytometer wurde auch in dieser Arbeit verwendet (Schmidt and Sester 2013). Influenza-spezifische CD4⁺ T-Zellen können zum Beispiel mittels Stimulation mit pandemischem oder saisonalem Virusantigen, welches im jeweiligen Impfstoff enthalten ist, nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgt über die Aktivierung und charakteristische Zytokinexpression, welche die Antigenstimulation induziert (Schmidt et al. 2012). Die Identifizierung der Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen kann über den Aktivierungsmarker CD69 und das Zytokin IFN γ erfolgen (Sester et al. 2013).

Die genaue Charakterisierung der Influenzaviren spielt für Diagnostik und Patientenmanagement im Alltag keine Rolle. Für die Erstellung der Impfstoffempfehlung und für Forschungszwecke erfolgt allerdings eine genaue Unterteilung der zirkulierenden Viren in Influenza A bis C. Bei Viren des Typs A erfolgt eine weitere Unterteilung nach den verschiedenen Hämagglutinin- und Neuraminidasetypen.

Die Systematik der Benennung folgt der Reihenfolge Ort, Labornummer und Jahr der primären Virusisolation (Haas 2009). Somit enthielt zum Beispiel der, für die Saison 2017/18 bevorzugt von der STIKOempfohlene quadrivalente Impfstoff, „A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-like virus“, „A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like virus“, „B/Brisbane/60/2008-like virus“ aus der Victoria Linie und „B/Phuket/3073/2013“ aus der Yamagata-Linie.

2.1.3 Influenza Therapie und Prävention

Aktuell können therapeutische Ansätze gegen die Influenza die Dauer der Krankheit reduzieren. Das Medikament Amantadin hemmt das Ionenkanalprotein M2 und verringert somit die Enthüllung des Virus in der Wirtszelle, auch „uncoating“ genannt. Allerdings wirkt es nur solange die Symptome nicht zu weit fortgeschritten sind. Zanamivir und Oseltamivir hemmen die virale Neuraminidase, wodurch die weitere Freisetzung des Virus aus der Wirtszelle verhindert werden soll. Diese Medikamente verkürzen die Krankheitsdauer im

Schnitt nur um einen Tag.(Lüllmann et al. 2016). Außerdem ist es für die Wirksamkeit dieser Therapieansätze essenziell, dass die Medikation spätestens innerhalb 48 Stunden, am besten sogar innerhalb 12 Stunden, nach Symptombeginn appliziert wird. Eine frühe Identifikation der infizierten Patienten ist somit entscheidend für die Therapiewirksamkeit (Moscona 2005). Diese Umstände machen die Prävention der Influenzainfektion durch Impfung umso bedeutsamer und praktikabler. Da Influenza C beim Menschen nur leichte respiratorische Symptome auslöst, sind nur Influenza A und B Bestandteil der saisonalen und pandemischen Impfstoffe. Einen Impfstoff für das Influenza C Virus gibt es nicht. Bei den zur Verfügung stehenden Impfstoffen wird zwischen inaktivierten Lebendimpfstoffen, Ganzvirusimpfstoffen sowie Spalt- und Untereinheitenimpfstoffen unterschieden. Gemeinsam haben diese eine Entwicklung und Produktion in Hühnereiern (Haas 2009).

Eine Influenzainfektion generiert üblicherweise Antikörper gegen Hämagglutinin und Neuraminidase, weshalb diese Proteine vorrangig in modernen Spalt- und Untereinheitenimpfstoffen vorhanden sind. Reste anderer Virusproteine, wie Matrix- und Nukleoproteine sind in reduzierter Menge in diesen Impfstoffen vorhanden. Je höher der Grad der Aufreinigung, desto mehr Hämagglutinin und Neuraminidase und desto weniger zusätzliche virale Proteine sind im Impfstoff enthalten (Haas 2009).

Wie zuvor erwähnt verändert sich das Virus durch die Mechanismen des Antigen shifts bzw. – drifts regelmäßig. Eine jährliche Impfung – idealerweise im Zeitraum von September bis November - ist deshalb notwendig, um entsprechenden Schutz zu gewährleisten (Haas 2009). Regulär empfohlene Impfstoffe waren bis zur Saison 2017/2018 trivalent und enthielten jeweils 15µg von zwei Influenza A Subtypen, meist H1N1 und H3N2, und einen Influenza B Stamm, meist Brisbane. Ein quadrivalenter Impfstoff enthielt einen weiteren Influenza B Stamm, zum Beispiel Phuket. Dieser wurde zwar im März 2017 von der Ständigen Impfkommision als bevorzugten Impfstoff angesehen, allerdings vom Gemeinsamen Bundesausschuss nicht dem Leistungskatalog hinzugefügt (Kochanek et al. 2018).

Wenn der im jeweiligen Jahr zirkulierende Impfstamm und Impfstoff gut übereinstimmen, können Grippeerkrankungen in bis zu 70 bis 95% junger gesunder Kontrollen verhindert werden (Stephenson and Nicholson 2001). Empfohlen wird die Influenza Impfung für über 60-Jährige, für Kinder, Jugendliche und Erwachsene, die aufgrund von individuellen Bedingungen wie Grunderkrankungen besonders komplikationsgefährdet sind und für Personen mit erhöhter Expositionsgefahr. Hier sind vorrangig medizinisches und pflegerisches Personal, aber auch generell Personen mit erhöhter beruflicher Exposition, gemeint (Kwetkat, Leischker, and Heppner 2018). Eine erhöhte Exposition durch Training und Wettkämpfe ist auch bei Sportlern gegeben und kann deren körperliche Leistungsfähigkeit beeinträchtigen (Jaworski and Rygiel 2019), sodass auch bei diesen Personen saisonale Influenza Impfungen sinnvoll sind.

2.2 Immunologische Grundlagen

Das Immunsystem lässt sich in angeborene und adaptive Komponenten unterteilen, die bei der Abwehr eines Erregers zusammenwirken. In Bezug zur vorliegenden Arbeit ist das adaptive oder auch erworbene Immunsystem von vordergründigem Interesse. Im Gegensatz zur angeborenen Immunabwehr lernt das adaptive Immunsystem im Laufe des Lebens als Anpassung auf Erregerexposition dazu. Mit seinen Mechanismen, die sich auf zellulärer und humoraler Ebene abspielen, kann es spezialisierte Abwehrkomponenten auf einzelne Antigene generieren (Murphy and Weaver 2018). Da das adaptive System ein Gedächtnis aufbaut, kommt es bei Zweitkontakt mit einem bekannten Erreger effizient und gezielt zu einer schnelleren Abwehrreaktion (Groß 2013). Das Prinzip des immunologischen Gedächtnisses macht man sich auch bei der Impfung zunutze.

2.2.1 Entstehung und Funktion des zellulären adaptiven Immunsystems

B- und T-Lymphozyten stellen die zelluläre Ebene des adaptiven Immunsystems dar. B-Zellen werden im Knochenmark antigenunabhängig gebildet und reifen spezifisch auf präsentierte Antigene in sekundären lymphatischen Organen, wie z.B. Lymphknoten und Milz, heran. Sie besitzen in der Membran verankerte monomere IgM-Antikörper als Antigenrezeptoren (B-Zell-Rezeptor, BCR). Plasmazellen stellen über Antigenstimulation herangereifte B-Lymphozyten dar und sind für die Antikörperproduktion zuständig (Schütt and Bröker 2011, Groß 2013). Antikörper setzen sich aus zwei leichten („light“) und zwei schweren („heavy“) Ketten zusammen. Letztere legen die verschiedenen Immunglobulinklassen A, D, E, G und M fest. Konstante Anteile der schweren Ketten bilden das Fc (kristallisierbares) Fragment, hypervariable und konstante Anteile der schweren und leichten Ketten bilden das Fab (antigenbindendes) Fragment. Die Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Antikörperklassen unterscheiden sich charakteristisch in ihrer Konfiguration. Immunglobuline G, E und D sind ausschließlich als monomere Strukturen vorhanden. IgA liegt im Plasma als Monomer, in Sekreten als Dimer vor. Letztlich liegt IgM charakteristischerweise als Pentamer vor. Die Dimer- bzw. Pentamerkonfigurationen werden über Verbindung mittels sogenannter J-Ketten mit und ohne S-Stück gebildet (Behrends 2012). Die Entstehung und Reifung von T-Zellen finden hingegen im Thymus und erst nach Kontakt mit MHC (major histocompatibility complex)-Molekülen statt. Analog zu den B-Zellen erfolgt die Antigen-spezifische Aktivierung der T-Zellen ebenfalls in sekundären lymphatischen Organen. Die genaue Funktion und der Aufbau dieser T-Lymphozyten werden im nächsten Kapitel genauer erläutert (Schütt and Bröker 2011).

2.2.2 Die Rezeptoren des zellulären adaptiven Immunsystems und ihre Wirkungsweise

B-Zellrezeptoren binden an das native Antigen und von Plasmazellen produzierte Antikörper können direkt Oberflächenantigene und Proteinbestandteile erkennen. Somit wird die Entfernung von Pathogenen aus dem Körper erleichtert (Murphy and Weaver 2018).

T-Zellrezeptoren sind heterodimere Membranmoleküle, welche in $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ unterteilt werden. Für die spezifische Immunreaktion ist der $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (TCR) verantwortlich und ist mit dem signalverarbeitenden CD3-Komplex assoziiert. Dieser TCR kann nur Antigene erkennen, welche von antigenpräsentierenden Zellen (APCs (Antigen presenting cells)) in MHC Molekülen der Klasse I oder II präsentiert werden (Groß 2013).

MHC-Moleküle, auch „human-leucocyte-associated antigens“ genannt, werden im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet. Sie binden Antigenfragmente und präsentieren diese an der Zelloberfläche. Über Phagozytose bzw. Endozytose in die Zelle aufgenommene und prozessierte Antigene werden in einem vom endoplasmatischen Retikulum gebildeten Vesikel von den MHC-Molekülen gebunden. Dieses Vesikel wird dann an die Zelloberfläche transportiert. Nur von MHC-Molekülen präsentierte Antigene werden von T-Zellen erkannt. Diese Erkennung geschieht antigenspezifisch für jede T-Zelle. Die MHC-Moleküle besitzen polymorphe und nicht polymorphe Domänen als Peptid- und CD4/8 Bindungsstellen, sowie transmembranäre und zytosolische Regionen (Behrends 2012).

MHC-I-Moleküle sind auf fast allen Körperzellen vorhanden und bestehen aus einer α -Molekülkette mit 45 kDa Masse (Schütt and Bröker 2011) sowie dem kovalent verknüpften β 2-Mikroglobulin. MHC-II-Moleküle werden nur auf professionell antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, die eine Funktion bei der Generierung einer zellulären Immunantwort ausüben. Dies sind dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen oder aktivierte B-Zellen. Die MHC-II-Moleküle sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Kette. (Behrends 2012).

MHC-Moleküle bilden die Struktur einer Grube aus, welche antigene Peptide einer Länge von ca. 9-15 Aminosäuren binden und präsentieren können. Polymorphismen der Moleküle finden sich vorrangig in diesen Antigenbindungsstellen (Kaufmann 2014). Die Qualität der spezifischen Immunabwehr ist somit nicht allein vom TCR abhängig. Die Peptidbindungen der verschiedenen MHC-Moleküle bestimmen welche Peptide bevorzugt in die Antigenbindungsstelle passen. $CD4^+$ T-Helferzellen werden Antigene über MHC-II-Moleküle präsentiert, wohingegen bei $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen MHC-I-Moleküle diese Funktion übernehmen (Schütt and Bröker 2011). Die Aktivierung von $CD8^+$ -T-Zellen führt zur Freisetzung zytotoxischer Botenstoffe, welche infizierte Zellen abtöten. Aktivierte $CD4^+$ -T-Zellen differenzieren zu T-Helferzellen. Diese sind essentiell für die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen und für die Aktivierung von Makrophagen (Behrends 2012).

2.2.3 Zytokine als Botenstoffe des Immunsystems

Zytokine stellen Botenstoffe innerhalb des Immunsystems dar, welche auf viele Zellen gleichzeitig wirken können und somit als pleiotrop bezeichnet werden. Bezüglich der vorliegenden Antigene agieren sie unspezifisch. Hinsichtlich ihrer Funktion ist die Spezifität hingegen stärker ausgeprägt. Außerdem besteht für manche dieser Botenstoffe eine funktionelle Überlappung. Zytokine fungieren als Wachstumsfaktoren, wirken regulierend, pro-

und antiinflammatorisch. Die Zytokine können auf die Zelle wirken, die sie sezerniert, auf benachbarte Zellen Einfluss haben und auch in die Blutstrombahn gelangen (Kaufmann 2014). IFN γ wird vorrangig von T-, NK-Zellen und Makrophagen produziert und ist für die Makrophagenaktivierung, Ig-Klassenwechsel zu IgG und die Expressionserhöhung der MHC-II-Moleküle zuständig. TNF α wird von den gleichen Zellen wie IFN γ produziert und aktiviert die endothelialen Zellen. IL-2 wird vor allem von T-Zellen produziert und wirkt proliferationsfördernd (Schütt and Bröker 2011).

2.2.4 Vielfalt und Interaktion der T-Zellen über Zytokine

T-Zellfunktionen sind vielseitig und werden durch verschiedene Subpopulationen verwirklicht. So gibt es T-Helferzellen (TH) von Typ 1 (TH1) und 2 (TH2), die jeweils Makrophagen und zytolytische T-Zellen bzw. B-Zellen und Eosinophile in ihren Funktionen unterstützen. Typ 17 TH Zellen unterstützen zudem Neutrophile. Die bereits erwähnten zytotoxischen T-Zellen stellen eine eigene Gruppe dar, genauso wie die regulatorischen T-Zellen (Treg). T-Zellen sind generell CD3 positiv. Zytotoxische T-Zellen sind zudem positiv für CD8 und T-Helferzellen für CD4. (Kaufmann 2014). Für die Abwehr eines viralen Infekts werden sowohl zytotoxische T-Zellen als auch TH-Zellen aktiviert. CD8 Zellen erkennen virale Peptide über MHC-I-Molekül Präsentation an der Oberfläche einer Körperzelle, was die Lyse einer infizierten Zelle erzielt (Groß 2013). Die Lyse kann direkt über den sogenannten Fas- „Todesrezeptor“ oder über Freisetzung zytolytischer Substanzen wie Granzyme und Perforine vermittelt werden (s. Abb. 1A). Parallel hierzu werden CD4⁺ TH-Zellen aktiviert, die nach Erkennung viraler Peptide in MHC Klasse II Molekülen die Makrophagen bzw. B Zellen in ihrer Funktion unterstützen, was durch Induktion von charakteristischen Zytokinen vermittelt wird. TH1-Zellen entstehen u.a. durch IL-12 und TH2-Zellen durch IL-4 Stimulus. TH1-Zellen produzieren selbst IFN γ , TNF α und IL-2, die die bereits angesprochene Abwehrfunktion gegen intrazelluläre Erreger durch Makrophagenaktivierung vermitteln. TH2-Zellen hingegen aktivieren über IL-4, IL-5 und IL-13 B-Zellen und unterstützen somit die humorale Abwehr des adaptiven Immunsystems. B-Lymphozyten interagieren mit TH2-Zellen in zwei Arten und werden so durch diese aktiviert. Zum einen erkennen TH2-Zellen das durch B-Lymphozyten präsentierte Antigen. Zum anderen bindet der CD40-Ligand auf TH2-Zellen mit CD40 auf B-Zellen. Über diese Mechanismen differenzieren sich B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen (s. Abb. 1B) (Groß 2013).

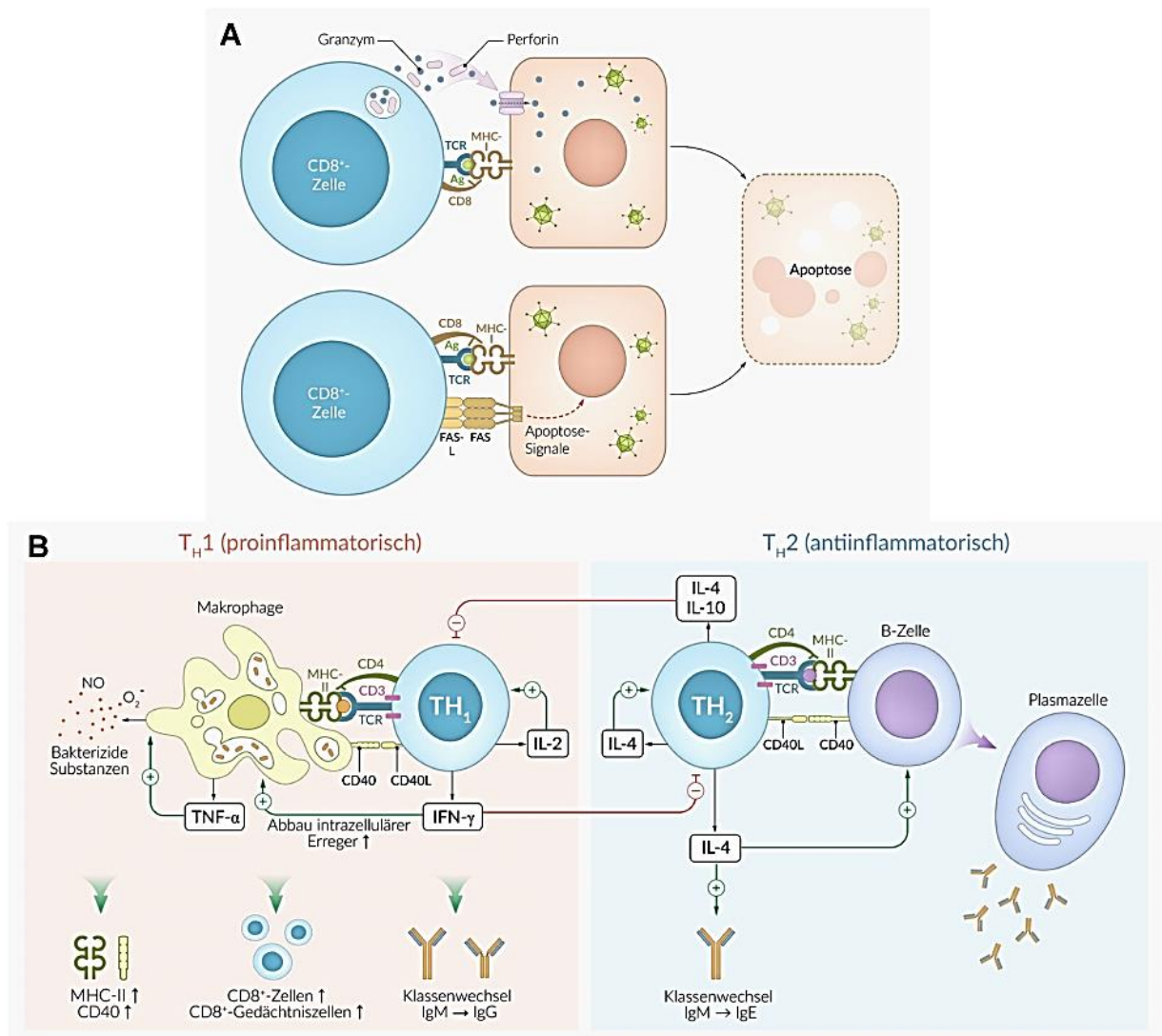


Abbildung 1 Zusammenspiel zytolytischer CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen bei der Immunabwehr. (A) Zytolytische CD8⁺ T-Zellen erkennen über MHC-I-Moleküle die virusinfizierte Körperzelle und leiten die Apoptose entweder über Granzym- bzw. Perforinsekretion ein oder über direkte Aktivierung des FAS-Rezeptors **(B)** CD4⁺ T-Helferzellen erkennen Antigene über MHC-II-Moleküle auf B-Zellen und Makrophagen. Makrophagen werden über TH1-Zellen zur Sekretion bakterizider Substanzen angeregt. TH2-Zellen induzieren die B-Zellentwicklung zu Plasmazellen und unterstützen hierüber die Antikörperproduktion. Zusätzlich fördern TH1-Zellen die Entstehung von CD8⁺-Zellen und Gedächtniszellen und den Immunglobulinklassenwechsel von IgM zu IgG. Über IL-4 wird der Klassenwechsel von IgM zu IgE gefördert. Weitere Zytokine nehmen stimulierende und hemmende Funktionen ein. Ag, Antigen; CD, Cluster of differentiation; IFN, Interferon; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin, L, Ligand; MHC, Major Histocompatibility Complex; NO, Stickstoffmonoxid; O₂⁻, Sauerstoffradikale; TCR, T-Zellrezeptor.

2.2.5 Follikuläre T-Helferzellen als Stütze der B- und T-Zellaktivierung und Reifung

Follikuläre T-Helferzellen (T_{fh}-Zellen) stellen eine weitere spezielle Subpopulation der CD4⁺ T-Lymphozyten dar. Diese sind gemeinsam mit den sogenannten Plasmablasten an der Produktion von Antikörpern beteiligt und haben somit Einfluss auf die humorale Immunabwehr.

Die T_{fh} Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen unterstützt B-Zellen bei der Generierung von hochaffinen Antikörpern und findet sich hierfür hauptsächlich in den Keimzentren sekundär

lymphatischer Organe. Über Expression von CXCR5 sind sie allerdings ebenfalls im Blut nachweisbar (Schmitt, Bentebibel, and Ueno 2014) und werden ebenfalls durch starke ICOS Expression charakterisiert (Rasheed et al. 2006). Plasmablasten sind die ersten Zellen, die Antikörper produzieren (Murphy and Weaver 2018) und können über CD38 Expression innerhalb der „switched-memory“ B-Zellen identifiziert werden (Mei et al. 2017). Im Gegensatz zu Plasmazellen sind diese noch länger teilungsaktiv und besitzen einige Merkmale aktivierter B-Zellen. Aus diesem Grunde können sie in Wechselwirkung mit T-Zellen treten. Erst einige Zeit später entstehen differenzierte Plasmazellen, welche in das Knochenmark wandern und von dort Antikörper produzieren. Plasmablasten nehmen somit eine Zwischenstellung zwischen ruhenden B-Zellen und Plasmazellen ein (Murphy and Weaver 2018). Wie bereits erwähnt wurden die Tfh Zellen in einigen bestehenden Arbeiten als positiv für CXCR5 charakterisiert (Schaerli et al. 2000; Vinuesa et al. 2005). Im peripheren Blut sind diese Zellen zudem positiv für CD45RO und CCR7. In sekundären lymphatischen Organen verlieren die Zellen CCR7, was entscheidend für ihre Anordnung in B-Zellfollikeln und Keimzentren ist. Hier entwickeln die Zellen eine hohe Expression von CD40-Liganden (CD40L) und ICOS (Breitfeld et al. 2000). CD40L ist relevant für die Aktivierung von B-Lymphozyten und ICOS spielt eine Rolle in der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen und deren Zytokinproduktion (Takahashi et al. 2009). Zudem fördern CD4⁺ CD45RO⁺ CXCR5⁺ Tfh Zellen auch die Produktion von IgA und IgG (Breitfeld et al. 2000). In in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass Tfh Zellen IL-21 produzieren und dieses Zytokin u.a. für die Entstehung von Keimzentren eine bedeutende Rolle spielt (Vogelzang et al. 2008). Somit nehmen Tfh Zellen eine entscheidende Position in der Entwicklung und Differenzierung von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen ein (Murphy and Weaver 2018).

2.2.6 Rolle kostimulatorischer Oberflächenmoleküle bei der T-Zellregulation

Die Expression und Rolle von ICOS bei Tfh Zellen wurde bereits angesprochen. Dieses Molekül gehört zur CD28 Rezeptorfamilie. Rezeptoren dieser Klasse finden sich auf Lymphozyten, binden Liganden der B7-Familie und sind als Kostimulatoren für die T-Zellaktivierung zuständig. ICOS besitzt diese aktivierenden Funktionen, wohingegen andere Moleküle dieser Klasse signalhemmend, regulierend und proapoptotisch wirken.

Zu den inhibierenden Rezeptoren gehören PD-1 und CTLA-4, welche auch in dieser Arbeit betrachtet wurden. Diese Rezeptoren werden im Zuge der Induktion einer Immunantwort hochreguliert und dienen somit zur Herunterregulation einer Immunantwort nach erfolgreicher Kontrolle eines Erregers. Bei chronischen Infektionen oder bei Tumorerkrankungen kommt es auf spezifischen T Zellen zu einer länger anhaltenden Expression dieser Moleküle auf Antigen-spezifischen T Zellen, die zu einer funktionellen Anergisierung der spezifischen Immunität beitragen. Im klinischen Alltag werden diese Moleküle daher im Rahmen der Checkpoint-Blockade in der Krebstherapie verwendet. Indem man die Inhibition dieser Moleküle hemmt,

kann die T-Zellantwort und somit die Effizienz der Krebstherapie gesteigert werden (Murphy and Weaver 2018; Schütt and Bröker 2011).

2.3 Bedeutung von Impfungen im Leistungssport

Leistungssportler zeichnen sich durch ihr junges Alter und ihren exzellenten körperlichen Leistungszustand aus. Auf dieser Basis stellen diese primär keine Bevölkerungsgruppe dar, für die die ständige Impfkommission eine jährliche Influenza Impfung empfiehlt. Dass Sportler jedoch dennoch von dieser und auch anderen Impfungen profitieren können, hat mehrere Gründe. Generell hat jede akute Infektionserkrankung zwangsläufig eine Trainingspause oder -einschränkung zur Folge. Im Leistungssport ist regelmäßiges Training allerdings entscheidend und ein Ausfall gravierend. Eine besonders unerwünschte Situation ergibt sich darüber hinaus, wenn der Sportler oder die Sportlerin aufgrund einer aktiven Infektion nicht an Wettkämpfen teilnehmen kann (Tafari, Sinesi, and Gallone 2017). Zudem lässt sich enger Körperkontakt in manchen Sportarten nicht vermeiden und Sportler leben vor allem während Wettkämpfen auf engem Raum zusammen. Resultierend daraus scheint das Expositionsrisiko für Infektionskrankheiten erhöht. Zudem haben Leistungssportler durch regelmäßige Wettkämpfe eine hohe Reiseaktivität, was das Infektionsrisiko zusätzlich erhöht. Im Rahmen der olympischen Sommerspiele im Jahr 2016 in Brasilien lag die Aufmerksamkeit wie noch nie zuvor auch auf der Prävention von übertragbaren Infektionserkrankungen. Während dieser internationalen Sportveranstaltung lebten beinahe 18.000 Sportler und technische Hilfskräfte in 3604 Wohnungen (Tafari, Sinesi, and Gallone 2017). Vor diesem Hintergrund wird eine regelmäßige Impfung von Leistungssportlern von Fachgesellschaften als wichtige Maßnahme zur Prävention von Infektionserkrankungen empfohlen (Gärtner and Meyer 2014). Im aktuellen Zeitgeschehen führte die Corona Pandemie im Leistungssport zu mehrfachen Wettkampfabgaben und -restriktionen und brachte erneut die Diskussion zu Nutzen und Risiko einer entsprechenden Impfung in den Vordergrund.(Hull et al. 2021)

Bislang gibt es widersprüchliche Daten zur Effizienz einer Impfung bei Leistungssportlern. Während moderates Training die Immunfunktion im Vergleich zu inaktiven Personen verbessert, scheint die Immunantwort bei intensivem Leistungssport eher eingeschränkt zu sein (Gleeson 2006). In diesem Zusammenhang wird von einer „j-shaped curve“ gesprochen. Dieses Modell beschreibt ein reduziertes Infektionsrisiko für Personen, die im Vergleich zu inaktiven Menschen moderat körperlich aktiv sind. Exzessive körperliche Belastung hingegen führe wiederum zu einem erhöhten Infektionsrisiko (Kakanis et al. 2010; Nieman et al. 1990). Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass Training im Sinne von Leistungssport, eine Erniedrigung des Infektionsrisikos bewirkt. Dies wird über die sogenannte „S-Curve“ beschrieben (Malm 2006) (s. Abb. 2).

Es zeigte sich im Gegensatz hierzu, dass sich eine akute und intensive Trainingsperiode negativ auf zelluläre Immunfunktionen auswirkt. Dies scheint die monozytäre

Antigenpräsentation, die Proliferation von T Lymphozyten oder auch die Antikörperproduktion durch B Lymphozyten zu betreffen. Diese temporäre Immunschwäche nach der Trainingsphase, auch „open window“ Phase genannt, scheint bei Leistungssportlern zu einer besonderen Empfänglichkeit für Erreger übertragbarer Erkrankungen zu führen (Gleeson 2006).

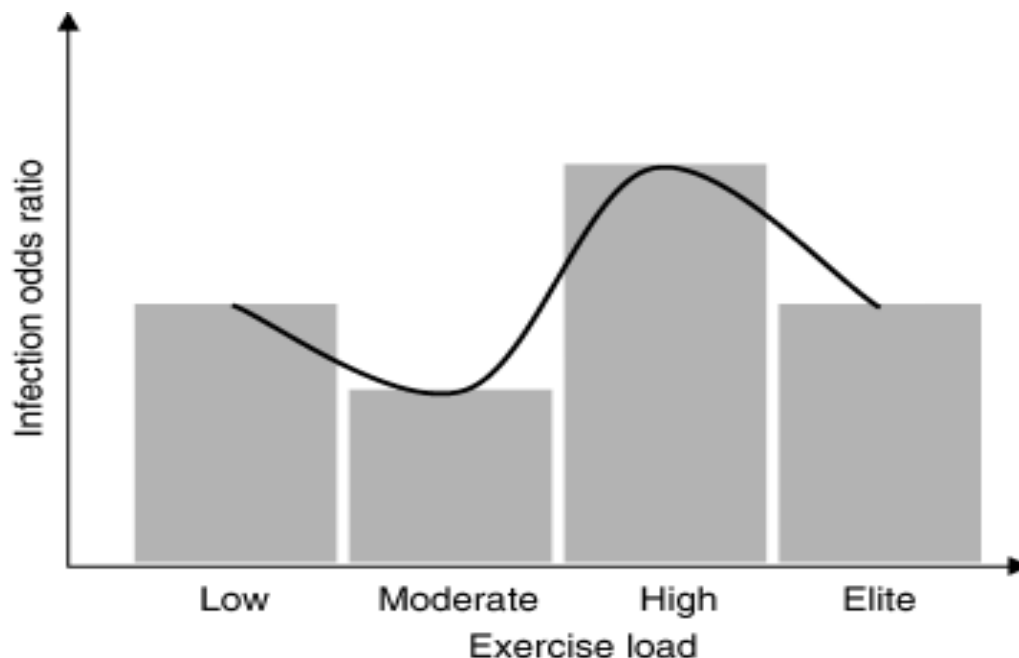


Abbildung 2 Vorgeschlagene Beziehung von körperlicher Belastung und Infektionsrisiko. Auf der x-Achse sind Intensitätsstufen des körperlichen Trainings von gering („low“) über moderat („moderate“), hoch („high“) bis Leistungssport („elite“) dargestellt und in Beziehung zum Odds Ratio von Infektionen auf der y-Achse gesetzt. Geringe und hohe Trainingslast sind mit erhöhtem Infektionsrisiko assoziiert, wohingegen moderater und professioneller Leistungssport mit geringerem Infektionsrisiko einhergehen. Aus „Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve“ von Christer Malm, erschienen in Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports Volume: 16, Issue: 1, 2006.

Wie diese bisherigen Erkenntnisse wegweisend interpretiert werden können, bleibt fraglich. Zudem gibt es auch aktuelle Studien, die einen positiven Einfluss von moderatem bis intensivem Training auf die CD4⁺ Zellzahl bei HIV-Patienten unter antiretroviraler Therapie verzeichnen (Bernal et al. 2022). Eine potenzielle Einschränkung in der Immunfunktion nach körperlichem Training wäre allerdings nicht nur relevant für eine akute Erkrankung, sondern hätte möglicherweise auch Konsequenzen für das Timing einer Impfung im zeitlichen Kontext des Trainings. Inwieweit eine Trainingspause vor einer Impfung zu einer verbesserten Impfantwort führen würde, ist bislang jedoch nur unzureichend erforscht.

Aus klinisch-epidemiologischer Sicht sollte aus den genannten Gründen eine Impfung bei Leistungssportlern empfohlen werden (Gärtner and Meyer 2014; Haas 2009). Unsicherheit besteht hingegen in der Frage, inwieweit Leistungssportler in adäquater Weise auf Impfungen ansprechen und eine Trainingspause vor einer Impfung den Erfolg einer Impfung verbessert.

2.3.1 Der Einfluss des Leistungssports auf die Immunfunktion

Auf Basis der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Theorien einer „j-shaped curve“ und des „open window“ ergibt sich, dass eine gewisse Suppression des Immunsystems nach intensiver körperlicher Aktivität eine verringerte Effizienz von Impfungen zur Folge haben könnte (Signorelli et al. 2016). Die immunologischen Einschränkungen beruhen vorrangig auf der vermehrten Produktion von Adrenalin und Cortisol. Diese Hormone induzieren während körperlicher Aktivität zunächst eine Leukozytose, die zu gleichen Teilen durch Lymphozyten und Neutrophile repräsentiert wird. In der Erholungsphase fällt Adrenalin rasch auf seine Ausgangswerte ab, wohingegen Cortisol noch bis zu zwei Stunden nach starker körperlicher Belastung erhöht sein kann und dominiert. Dies führt zu einer Lymphozytopenie und Neutrophilie im weiteren Verlauf nach intensiver körperlicher Betätigung. Da natürliche Killerzellen (NK Zellen) und zytotoxische T-Zellen eine höhere Dichte an β_2 -Adrenorezeptoren besitzen, ist der initiale Anstieg dieser Zellen während des Trainings besonders stark ausgeprägt, bevor deren Anzahl durch das immunsuppressiv wirkende Cortisol abnimmt (Nieman 1994). Es wird diskutiert, dass die immunsuppressive Wirkung nach intensivem Training durch Inhibition der IFN γ Produktion von T Lymphozyten vermittelt wird. Zudem soll Interleukin 6 der Muskulatur zu einer erhöhten Cortisolsekretion beitragen. Zusätzlich konnten geringe Zunahmen der antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-1ra und IL-10 gemessen werden. IL-1ra wird von Monozyten und Makrophagen gebildet und hemmt selbst IL-1, welches proinflammatorisch wirkt. IL-10 wird von Typ 2 T Lymphozyten, Monozyten und B-Zellen produziert und inhibiert wiederum Typ 1 TH-Zellen. Diese T-Zellen stellen normalerweise einen Schutz des Organismus gegen intrazelluläre Pathogene wie Influenza Viren dar.

Auf diesem Weg könnte körperliches Training zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber viralen Infektionen beitragen. Eine Dominanz von Typ 2 gegenüber Typ 1 TH-Zellen kann allerdings auch positive Konsequenzen für den Organismus tragen. Ein Shift zu Gunsten Typ 2 TH-Zellen verringert den durch Inflammation getriggerten Gewebeschaden und somit die notwendige Regenerationszeit nach intensiver körperlicher Belastung (Gleeson 2006).

In mehreren Studien wurden zusätzlich die Konzentrationen von IgA, IgG, IgM und sekretorischem IgA bei Leistungssportlern gemessen. Zum einen wurde eine Suppression dieser Immunglobuline festgestellt, zum anderen eine negative Korrelation des sekretorischen IgA und Infektionsraten der oberen Atemwege bestimmt (Gleeson 2006; Gleeson, Pyne, and Callister 2004).

Aufgrund dieser Veränderungen sind Leistungssportler zwar nicht klinisch immunsupprimiert, dennoch könnten diese Veränderungen zu einer erhöhten Anfälligkeit für übertragbare Erreger wie Influenza beitragen (Gleeson 2006). Eine Impfung als präventive Maßnahme scheint somit essenziell. Dennoch stellt sich die Frage, ob die Wirksamkeit der Impfung bei Sportlern

aufgrund der genannten immunologischen Veränderungen eingeschränkt sein könnte. Bisherige Studien, in denen Antikörpertiter gemessen wurden, konnten solche Theorien allerdings bisher nicht bestätigen (Gärtner and Meyer 2014). So konnten beispielsweise erhöhte Antikörpertiter gegen Pneumokokken nach akuter körperlicher Betätigung gemessen werden und auch nach Hepatitis B Impfung zeigten Sportler vergleichbare Titer wie die Normalbevölkerung (Edwards et al. 2012; Rosic et al. 2008). Einige Studien lassen sogar vermuten, dass akutes Training vor Impfung als eine Art Adjuvans wirken und somit die Impfwirksamkeit verstärken könnte (Ranadive et al. 2014; Edwards et al. 2010). Dies wurde in einer Studie untersucht, in der Antikörperlevel nach Pneumokokken- und Influenzaimpfung bestimmt wurden, nachdem zuvor ein moderates Training im aeroben Bereich durchgeführt wurde. Mithilfe der Bestimmung der Antikörpertiter konnte jedoch festgestellt werden, dass die Intensität des Trainings nicht ausreichte, um einen verstärkenden Effekt auf die Impfung zu entwickeln. (Long et al. 2012). Ob eine höhere Intensitätsstufe des Trainings einen adjuvanten Effekt auf die Impfungen hat, bleibt weiteren Studien vorbehalten.

2.3.2 Impfempfehlung für Influenza und Skepsis im Leistungssport

Was sind nun die aktuellen Impfempfehlungen bezüglich Influenza im Leistungssport und wie verhält sich die Akzeptanz unter Sportlern? Es wird empfohlen die Impfung mindestens zwei Wochen vor einer größeren Sportveranstaltung einmal jährlich zu applizieren. Für Sportler, die über beide Hemisphären im Rahmen des Leistungssportes reisen, empfiehlt es sich sogar zwei statt einer Impfung durchzuführen (Boston and Bryan 2018). Eventuell sollten auch hier regionale Unterschiede bei der Auswahl des Impfstoffs eine Rolle spielen (Gärtner and Meyer 2014). Die Influenza Impfung stellt sich komplizierter dar, als es bei anderen Impfungen der Fall ist. Es steht eine große Vielfalt an Impfstoffen und Applikationswegen zur Auswahl. Es gibt weltweit intranasal, intradermal und vor allem in unseren Breiten intramuskulär applizierte Impfstoffe, die entweder Lebendimpfungen oder inaktivierten Virusbestandteilen entsprechen.

Zusätzlich zu den oben bereits erwähnten verschiedenen Herstellungsprozessen der Antigene, bestehen Unterschiede in der Zugabe von Adjuvanzen, welche die Immunreaktion und auch eventuelle Nebenwirkungen beeinflussen. Für junge gesunde Sportler werden allgemein aus diesem Grund Impfstoffe ohne starke Adjuvanzen empfohlen (Gärtner and Meyer 2014). Der quadrivalente Impfstoff, welcher zwei Influenza A und zwei Influenza B Stämme enthält, wird zumeist empfohlen (Boston and Bryan 2018). Jede Applikationsform der Impfung hat Vor- und Nachteile. Intradermal appliziert verursacht die Impfung vielleicht weniger Schmerzen, ist jedoch schwieriger zu applizieren und führt zu mehr lokalen Nebenwirkungen als die intramuskuläre Impfung. Die Effizienz ist für beide allerdings vergleichbar. Intranasale Impfstoffe können den Sportler zunächst selbst ansteckend machen, wobei sich die Nebenwirkungen hier geringhalten. Für Erwachsene hat dieser Applikationsweg aktuell noch keine Relevanz (Boston and Bryan 2018). Letztendlich hängt die ideale

Applikationsstrategie auch von der jeweiligen sportlichen Disziplin ab. Bogenschützen profitieren womöglich von einer intraglutealen Injektion, wohingegen Läufer vermutlich einer Injektion in den Musculus deltoideus zugeneigter sind (Gärtner and Meyer 2014) .

Eine Impfstudie der Saison 2015/16 innerhalb der Erstliga Fußballteams in Italien zeigte für die Grippeimpfung eine ernüchternde Akzeptanzrate. In 75% aller Fußballteams wurde die Impfung angeboten, wobei nur 40% der 600 teilnehmenden Spieler geimpft wurden. Gründe für das Nicht-Impfen von Sportlerseite waren Angst vor Nebenwirkungen, vermeintlich wahrgenommene Unwirksamkeit des Impfstoffes oder eine mangelnde Risikowahrnehmung. In manchen Teams sollen zudem zu wenige Informationen von medizinischem Personal vermittelt worden sein. Die Impfrate zeigte letztendlich keine Korrelation mit der Rangliste der ersten Liga (Signorelli et al. 2016)

2.4 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Wie in oberen Abschnitten beschrieben, nehmen übertragbare Infektionserkrankungen im Leistungssport eine besondere Rolle ein. Sportler sind durch engen Körperkontakt in gemeinsamen Unterkünften während Training und Wettkampf, bei Kontaktsportarten und Teamreisen einem höheren Infektionsrisiko ausgesetzt.

Zudem haben auch komplikationslos verlaufende Infektionserkrankungen eine ganz andere Bedeutung für Leistungssportler als für die Normalpopulation, da diese zu einem Trainingsausfall oder Wettkampfunfähigkeit führen können (Gärtner and Meyer 2014). Außerdem wurden in mehreren Studien quantitative Veränderungen von Immunzellen und Antikörpern nachgewiesen, die eine bereits oben erwähnte, vulnerable Phase („open window“) des Immunsystems nach intensivem Training postulieren (Gleeson 2006; Kakanis et al. 2010). Eine effiziente Impfung gegen hochkontagiöse Erkrankungen wie Influenza besitzt deswegen einen hohen Stellenwert bezüglich präventiver Maßnahmen im Leistungssport. Ob diese Besonderheiten des Immunsystems bei Leistungssportlern allerdings auch die Impfwirksamkeit schwächen, ist noch nicht vollständig geklärt (Tafari, Sinesi, and Gallone 2017). Diese Problemstellung und die Frage nach impfassoziierten Nebenwirkungen, erfordern eine gründliche Auswahl von notwendigen Impfstoffen mit günstigem Wirkungs-Nebenwirkungsprofil und deren optimale Applikation. Außerdem sollten Impfzeitpunkte individuell mit dem Trainings- und Wettkampfplan des Sportlers oder der Sportlerin abgestimmt werden (Gärtner and Meyer 2014). Die Influenzaimpfung wird für Leistungssportler allgemein empfohlen (Boston and Bryan 2018), allerdings werden diese Empfehlungen nur mangelhaft umgesetzt. Sorge um Nebenwirkungen, Einschränkungen im Training oder Wettkampf und Bedenken zur Wirksamkeit der Impfung spielen hier eine große Rolle (Signorelli et al. 2016).

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit bestand daher in der quantitativen und qualitativen Charakterisierung der Impf-induzierten zellulären und humoralen Immunantwort von gesunden

Leistungssportlern. Dies erfolgte vor und im Verlauf nach Impfung mit dem saisonalen Influenza Impfstoff (Saison 2016/2017). Als Vergleichsgruppe dienten alters- und geschlechtsangepasste Personen der Normalbevölkerung, welche keinen Leistungssport, sondern maximal zwei Mal pro Woche körperliches Training betrieben. Influenza-spezifische T-Zellen und Antikörper wurden vor und im Verlauf nach Impfung quantifiziert. Zudem erfolgte eine funktionelle und phänotypische Analyse der Differenzierung und Funktionalität über Oberflächenmarker und die Expression von Zytokinen. Antikörper wurden mittels ELISA und Neutralisationstestung quantitativ und funktionell bestimmt. Des Weiteren wurden charakteristische T- und B-Zell Subpopulationen wie Tfh Zellen und Plasmablasten im Verlauf analysiert.

Im Einzelnen widmet sich die vorliegende Arbeit folgenden Fragen:

- Zeigen Leistungssportler Unterschiede in der Induktion einer Influenza-spezifischen T-Zellantwort im Vergleich zu Nicht-Leistungssportlern?
- Bestehen Unterschiede in Phänotyp und Zytokinprofil der Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zwischen Sportlern und Kontrollen?
- Führt die Impfung zu einer Induktion follikulärer T Helferzellen und Plasmablasten?
- Unterscheidet sich die humorale Immunantwort bezüglich IgG, IgA, IgM und neutralisierender Antikörper bei Kontrollen und Sportlern?
- Unterscheiden sich Sportler und Kontrollen in der Häufigkeit und Ausprägung von Nebenwirkungen nach Impfung?

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

Die in der Arbeit verwendeten Geräte und Materialien sind in den Tabellen 1-3 aufgeführt.

Tabelle 1: Geräte

Gerät/Verbrauchsmaterialien	Firma/Firmensitz
96-well Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
405 TS Microplate Washer	Biotek, Bad Friedrichshall
Brutschrank (Hera cell 240 i)	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer (FACSCanto II)	BD Biosciences, Heidelberg
EDTA-Monovetten (2,7ml)	Sarstedt, Nümbrecht
ELISPOT- Analyseapparatur für Neutralisationstest	AID Diagnostika GmbH, Straßberg
Kanüle (Safety-Multifly)	Sarstedt, Nümbrecht
Kolbenhubpipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	HTL Lab Solutions, Warschau
Li-Hep Monovetten (4,7ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Photometer (Victor X4)	PerkinElmer, Rodgau
Multipipette plus Mehrkanalpipette (8 Kanäle 300µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Präzisions Dispenser Tips (5ml)	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße (1,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen 75x12mm für die Durchflusszytometrie	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen Polypropylen (15ml Falcon)	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipette (2, 5, 10, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serum-Monovetten (9ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Werkbank (Hera Safe)	Heraeus, Hanau
Titertek Multidrop	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge Laborfuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1. OR	Heraeus, Hanau

Tabelle 2: Chemikalien und Kits

Chemikalien und Kits	Firma, Firmensitz
Antibiotikapool	In house-Herstellung Labor Enders
Anti-Influenza-ELISA Kits (IgG, IgA, IgM)	Euroimmun, Lübeck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Brefeldin A	Sigma, Deisenhofen
EDTA (Ethyldiaminentetraacetat)	Sigma, Steinheim
E-MEM	Biorchrom, Berlin
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Shutdown	BD Biosciences, Heidelberg
FBS (fetales Kälberserum)	Sigma, Deisenhofen
FBS (fetales Kälberserum)	Gibco von Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lysing-Lösung (10x konzentriert, 1x Verdünnung mit H ₂ O dest.)	BD Biosciences, Heidelberg
Mardin-Darby canine kidney cells	ECCC, Salisbury
Natriumazid (NaN ₃)	Serva, Heidelberg
NEA	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmsted
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma, Deisenhofen
PBS	In house-Herstellung Labor Enders
Receptor Destroying Enzyme	Denka-Seiken, Tokyo
RPMI-Medium 1640+1% L-Glutamin	Sigma, Steinheim
Saponin	Sigma, Steinheim
Virus Verdünnung (NT) EMEM+0,1% antibiotics+2% FBS	Biochrom, Berlin

Tabelle 3: Zusammensetzung von Puffer, Medien und Stocklösungen

Puffer und Medien	Zusammensetzung
Brefeldin A-Stocklösung	5mg/ml Brefeldin A in Ethanol

Puffer und Medien	Zusammensetzung
Blockpuffer Neutralisationstest	1% bovines Serumalbumin/0,1% Thimerosal
EDTA-Stocklösung	PBS, 0,02% EDTA
FACS-Puffer	PBS, 5% FCS, 0,5% BSA, 0,07% NaN ₃
Natriumazid (NaN ₃)-Lösung	10% in H ₂ O dest.
Neutralisationstestmedium	1:1 virus diluent/3,2% Carboxy-Methylcellulose
Paraformaldehyd-Stocklösung	5g in 200ml PBS, pH 7,4-7,6
Saponin-Puffer	FACS-Puffer, 0,1% Saponin
Saponin-Stocklösung	2g Saponin in 39,7ml sterilem PBS+0,28ml 10%iges NaN ₃
Waschpuffer Neutralisationstest	137mM NaCl, 20mM Na ₂ HPO ₄ , 2.7mM KCl and 1mM K ₂ HPO ₄ , pH 7.3
Zellkulturmedium	RPMI, 1% Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin, 5% FCS

3.2 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 4-6 aufgeführt. Alle Antikörper wurden von der Firma BD Biosciences (kostimulatorische und Fluorochrom-gekoppelte Antikörper) bzw. Millipore (Antikörper für die Neutralisationstestung) bezogen.

Tabelle 4: Kostimulatorische Antikörper

Antikörper	Klon	Ig Klasse	Konzentration	Firma, Firmensitz
Anti-CD28	L293	IgG1 k	0,5mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD49d	9F10	IgG1 k	1mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 5: Fluorochrom-gekoppelte Antikörper zur Durchführung der durchflusszytometrischen Messung

Antikörper gegen	Fluorochrom	Klon	Ig Klasse
CD3	PerCp	Sk7	IgG1 k
CD4	APC-H7	SK3	IgG1 k
CD4	PE-Cy7	SK3	IgG1 k
CD8	V500	RPA-T8	IgG1 k
CD19	FITC	HIB19	IgG1 k
CD27	APC	L128	IgG1 k

Antikörper gegen	Fluorochrom	Klon	Ig Klasse
CD27	FITC	L128	IgG1 k
CD27	PE	L128	IgG1 k
CD38	PE	HB-7	IgG1 k
CD45RO	PE-Cy7	UCHL-1	IgG2ak
CD69	PerCp	L78	IgG1 k
CD152 (CTLA-4)	APC	BNI3	IgG2ak
CD278 (ICOS)	PE	DX29	IgG1 k
CD279 (PD-1)	APC	MIH4	IgG1 k
CXCR5	PerCp-Cy5.5	RF8B2	IgG2bk
IFN γ	FITC	4S.B3	IgG1 k
IgD	PE-Cy7	IA6-2	IgG2ak1
IL-21	AlexaFluor647	3A2-N2.1	IgG1

Tabelle 6: Antikörper für die Neutralisationstestung

Antikörper	Firma
Anti-Influenza A Antikörper, MAB8251	Millipore, Darmstadt
Anti-Influenza B Antikörper, MAB8661	Millipore, Darmstadt

3.3 Antigene

Die zur spezifischen Stimulation der Vollblutproben verwendeten Antigene sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Antigene

Antigen	Endkonzentration bei Stimulation	Firma, Firmensitz
Influsplit Tetra 2016/2017	17,8 μ l/ml	GlaxoSmithKline, München
PBS (Phosphate buffered saline)	17,9 μ l/ml	Sigma, Deisenhofen
SEB: <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B (Stock 1mg/ml in H ₂ O, Endkonz.)	2,5 μ g/ml	Sigma, Steinheim

3.4 Software

Die verwendete Software ist in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Software

Software	Verwendungszweck
BD FACSDiva Software 6.1.3	Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten
EndNote X8/X9	Literaturverwaltung
Graph Pad Prism 5.03/8.3/9.1	Statistische Auswertung, graphische Darstellung
Microsoft Office Access 2003	Datenverwaltung
Microsoft Office Excel 2007	Statistische Auswertung
Microsoft Office Word 2007/365	Textverarbeitung
Microsoft Office PowerPoint 2007	Graphische Darstellung, Präsentation
WorkOut Software 2.5	Messung und Auswertung der ELISA-Daten

3.5 Probandenkollektiv und Studiendesign

Die Rekrutierung der Leistungssportler erfolgte durch das Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes. Alle Probanden waren immungesund und betrieben professionellen Leistungssport an mindestens 5 Tagen pro Woche in verschiedenen Disziplinen auf internationaler oder nationaler Ebene. Als Trainingseinheiten galten geplante Wettkämpfe von 1,5 bis 4 Stunden Dauer, die für die Sportart spezifische Übungen enthielten. Diese Einheiten waren in einem Abstand von mindestens 2 Stunden von anderen sportlichen Aktivitäten bzw. Trainingseinheiten getrennt.

Als Kontrollpersonen wurden ebenfalls immungesunde Personen rekrutiert, die während der Studie und im Vorjahr nicht mehr als 2 Trainingseinheiten auf professionellem oder Freizeitlevel pro Woche absolvierten. Die Kontrollgruppe wurde im Verhältnis 1:2 alters- und geschlechtsangepasst zur Sportlergruppe zusammengestellt.

Um den Einfluss von körperlicher Aktivität kurz vor der Impfung auf Nebenwirkungen und Immunogenität zu untersuchen, wurden die Sportler randomisiert in zwei Gruppen unterteilt. Die Sportler der ersten Gruppe wurden nach einer 26-stündigen Trainingspause geimpft, wohingegen die Sportler der zweiten Gruppe bereits 2 Stunden nach der letzten Trainingseinheit geimpft wurden. Die Analyse eines möglichen Effektes von Trainingspausen auf die Immunität und auf Nebenwirkungen war Gegenstand einer weiteren Doktorarbeit am Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes (Clemens Ziller). Hierfür wurden die in dieser Arbeit erhobenen laborexperimentellen Daten zur Induktion von

Antikörpern und T Zellen herangezogen.

Allen Probanden wurde vor (Woche 0), 1 Woche (Woche 1), 2 Wochen (Woche 2) und 6 Monate (Woche 26) nach Impfung Blut entnommen. Ein Differentialblutbild (2.7ml EDTA-Blut) wurde im Labor der Sportmedizin oder im Zentrallabor des Universitätsklinikums erstellt. Für die experimentellen Analysen in unserem Labor der Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie in Homburg wurden 4.7ml Lithium-Heparin Blut zur Analyse der Lymphozytensubpopulationen, der spezifischen T-Zellen, B-Zellen und 9 ml Serum zur Bestimmung der Anti-Influenza IgG-, IgA- und IgM Antikörper verwendet. Die Analyse Influenza-spezifischer neutralisierender Antikörper wurde von mir im Labor Prof. G. Enders und Partner & Institut für Virologie, infektiöse Erkrankungen und Epidemiologie in Stuttgart unter Anleitung von Frau Silvia Meier durchgeführt. Zudem wurden in der ersten Woche nach der Impfung in einer standardisierten Selbstbeurteilung die Nebenwirkungen erfasst.

Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission (149/16, Ärztekammer des Saarlandes) genehmigt und alle Personen oder Eltern von Minderjährigen gaben eine schriftliche Einwilligung nach Aufklärung.

3.6 Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen

3.6.1 Testprinzip

Influenza-spezifische T-Zellen lassen sich nach spezifischer Stimulation mit dem Influenza-Impfstoff über die Aktivierung und Induktion von Zytokinen quantifizieren. Die Stimulation erfolgt direkt im Vollblut und wird durch Zugabe kostimulatorisch wirksamer Antikörper (gegen CD49d und CD28) optimiert. Neben einer spezifischen Stimulation mit Impfstoff wird eine Negativkontrolle durch Zugabe einer Phosphat-gepufferten Salzlösung („Phosphate buffered Salt“, PBS) durchgeführt. Als Positivkontrolle dient ein Ansatz, der mit dem *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) versetzt wird. SEB wirkt als Superantigen der T-Lymphozyten und bindet sowohl an den MHC II-Komplex der Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) als auch an die variable Region der β -Kette des T-Zellrezeptors (TCR). Nur Zellen mit der entsprechenden β -Kette, welche bei jedem Individuum in unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen, werden aktiviert. Aus diesem Grund ist der Anteil SEB-reaktiver T-Zellen von Person zu Person unterschiedlich. Somit erfolgt eine Antigen-unabhängige Stimulation der T-Zellen, die sicherstellt, dass die Zellen des jeweiligen Probanden grundsätzlich zur Reaktion in der Lage sind.

Bei der Stimulation der T-Zellen werden Zytokine induziert, die üblicherweise als Botenstoffe einer komplexen Signalkaskade in den extrazellulären Raum ausgeschüttet werden. Um die durch Stimulation induzierten Zytokine der jeweils aktivierten Zelle zuordnen zu können, wird der Transport aus der Zelle mittels Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A verhindert. Diese Substanz verhindert den anterograden Transport vom endoplasmatischen Retikulum

zum Golgi-Apparat. Somit akkumulieren die gebildeten Zytokine in der T-Zelle, so dass Antigen-spezifische T-Zellen anhand der intrazellulär akkumulierten Zytokine durchflusszytometrisch identifiziert werden können. Hierzu werden die Zellen nach der Stimulation und Inkubation permeabilisiert und mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper angefärbt. In Abbildung 3 sind die drei Stimulationsreaktionen, die pro Probanden und Zeitpunkt durchgeführt wurden, schematisch dargestellt.

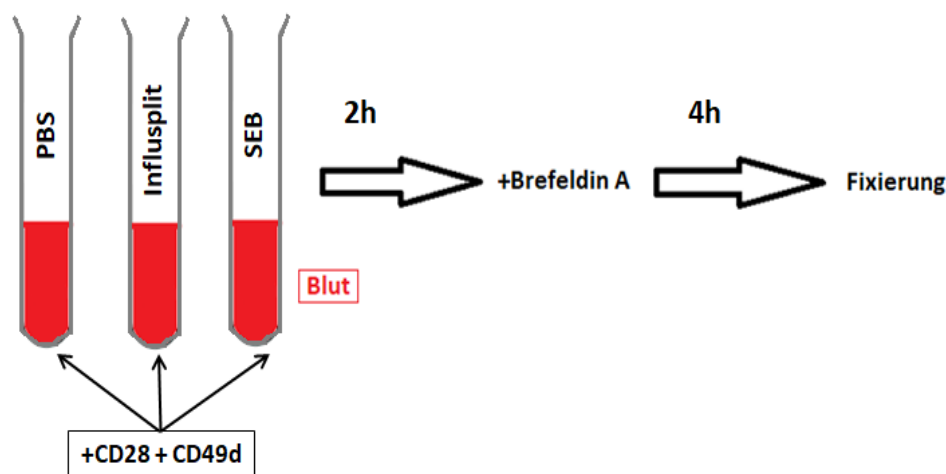


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Stimulationsansätze. Es wurden für jeden Studienteilnehmer und Zeitpunkt drei Blutproben mit jeweils PBS, Impfstoff (Influsplit) oder SEB stimuliert. Die Optimierung der Stimulationsbedingungen erfolgte über Zugabe der kostimulatorischen Antikörper anti-CD49d und anti-CD28. Durch Zugabe von Brefeldin A wurden gebildete Zytokine in der Zelle akkumuliert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen. CD, Cluster of differentiation; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; h, hour (Stunde)

3.6.2 Antigen spezifische Stimulation im Vollblut

Das benötigte Blutvolumen wurde mit 1 µg/ml der kostimulatorischen Antikörper anti-CD28 und anti-CD49d versetzt und durchmischt. Pro Stimulation wurden je 450µl auf 15ml Polypropylen Röhrchen verteilt und mit 17,8 µl/ml Influsplit Tetra, 17,8µl/ml PBS bzw. 2,5 µl/ml SEB versetzt. Anschließend wurden die Röhrchen mit dem Vortex gründlich gemischt und für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Die Deckel der Röhrchen waren hierbei lose angeschraubt, damit der Gasaustausch zwischen Proben und Umgebung stattfinden konnte. Nach 2 Stunden wurden 10µg/ml Brefeldin A zu pipettiert und für weitere 4 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert.

3.6.3 Fixierung der stimulierten Proben

Nach insgesamt 6 Stunden Stimulation wurden die Proben mit 100 µl/ml EDTA-Lösung versetzt (100µl/ml), mittels Vortex für 10 Sekunden gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt wurden Zell-Zell-Kontakte gelöst, sodass die Zellen vereinzelt wurden. Nachfolgend wurden Erythrozyten durch die Zugabe von 9ml Lysing-Lösung pro ml Vollblut und kurzem Vortexen lysiert und die Leukozyten durch in der Lysing-Lösung enthaltenes Paraformaldehyd fixiert.

Die Inkubation mit der Lysing-Lösung erfolgte über eine Dauer von 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben gewaschen. Hierzu wurden die Proben für 7 min bei 1300 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert, so dass der Überstand über den Zellen abgenommen werden konnte. Nachfolgend wurden die Zellen in 2ml FACS-Puffer resuspendiert, erneut bei gleichen Bedingungen gewaschen, und in 400µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder max. 72 Stunden bei 4°C bis zur intrazellulären Färbung im Kühlschrank gelagert.

3.6.4 Intrazelluläre Färbung stimulierter T-Zellen mit Fluorchrom-gekoppelten Antikörpern

Zur intrazellulären Färbung der stimulierten Zellen wurden für beide Färbeansätze jeweils 200µl dieser Zellsuspensionen in FACS Röhrchen überführt, was einem Blutvolumen von 225µl entsprach. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Proben mit 2ml Saponin-Puffer versetzt, 10 min bei RT inkubiert und für 7 min zentrifugiert. Der Überstand in den FACS Röhrchen wurde vorsichtig abgesaugt und jede Probe wurde mit 50µl einer Saponin-haltigen Antikörper-Mischung versetzt, deren Zusammensetzung in den Tabellen 9 und 10 dargestellt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils zwei Färbungen durchgeführt. Nach dem Durchmischen der Proben wurden diese für 30-45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch einen erneuten Waschschrift mit 3ml FACS-Puffer entfernt. Abschließend wurden die Zellen in 150µl 1% Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert, um die Zellen bis zur Messung am Durchflusszytometer für maximal 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln haltbar zu machen.

Tabelle 9: Färbeansatz 1 für den Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen und deren Zytokinexpressionsprofil

Antikörper gegen	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	PE-Cy7	1
CD69	PerCP	2
IFN γ	FITC	0,5
IL-2	PE	2
TNF- α	V450	1
IL-21	AlexaFluor647	5
Saponin 5%		1
FACS Puffer		37,5
Gesamt		50

Tabelle 10: Färbeansatz 2 für den Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen und deren Phänotyp

Antikörper gegen	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	PE-Cy7	1
CD69	PerCP	2
IFN γ	FITC	0,5
CD27	PE	2
CTLA-4	APC	2
Saponin 5%		1
FACS Puffer		41,5
Gesamt		50

3.7 Quantifizierung und Phänotypisierung von B- und T-Zellsubpopulationen mittels Oberflächenfärbung

3.7.1 Testprinzip

Zur Quantifizierung und Charakterisierung von Lymphozytensubpopulationen werden charakteristische Moleküle auf der Oberfläche der Blutzellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert.

3.7.2 Durchführung der Oberflächenfärbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern

Pro Probanden wurden 2 Färbungen durchgeführt. Hierzu wurde jeweils 100µl heparinisieretes Vollblut in FACS Röhren überführt. Zu beachten ist, dass bei der Färbung der B-Zellen das Blut vor der Färbung zunächst mit Medium gewaschen wurde, um das freie IgD zu entfernen. Hierfür wurden 500µl RPMI-Medium zum Vollblut gegeben, die Probe für 7 Minuten bei 1300rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert. Anschließend wurden 18,25µl der Antikörper-Mischung 3 bzw. 15µl der Antikörper-Mischung 4 (s. Tabellen 11 und 12) hinzu versetzt und gut gemischt. Nach der Zugabe der Antikörper-Mischungen wurden die Proben der T- und B-Zellfärbung für 20-30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2ml Lysing-Lösung hinzu pipettiert und gemischt, wodurch die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten fixiert wurden. Hierzu wurden die Proben erneut für 10 min im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurden die Proben mit je 2ml FACS-Puffer gewaschen und nach Absaugen des Überstands mit jeweils 150µl 1%PFA versetzt. Die gefärbten Zellen wurden innerhalb von 24h durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 11: Färbeansatz 3 zur phänotypischen Charakterisierung von T-Zellen anhand von Oberflächenmolekülen

Antikörper gegen	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	APC-H7	1
CD8	V500	1
CD45RO	PE-Cy7	1,25
CD27	FITC	4
CXCR5	PerCP-Cy5.5	1
ICOS	PE	5
PD1	APC	5
Gesamt		18,25

Tabelle 12: Färbeansatz 4 zur phänotypischen Charakterisierung von B-Zellen anhand von Oberflächenmolekülen

Färbung 4 Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD19	FITC	2,5
IgD	PE-Cy7	3
CD27	APC	0,5

CD38	PE	5
CD3	PerCP	4
Gesamt		50

3.8 Durchflusszytometrie

3.8.1 Methodisches Prinzip

Die Durchflusszytometrie (englisch FACS, Fluorescence activated cell sorting), ist eine Fluoreszenz-basierte Methode, um Fluorochrom-markierte Zellen anhand bestimmter Charakteristika quantitativ und qualitativ zu analysieren. Hierbei werden Zellen einer Suspension hydrodynamisch fokussiert und einzeln nacheinander durch ein Lasersystem analysiert.

Hierdurch werden zum einen unabhängig von der Fluoreszenz lichtbrechende Eigenschaften detektiert. Das charakteristische Vorwärtsstreulicht („FSC=Forward Scatter“) ist bedingt durch die Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht („SSC=Side Scatter“) durch die Struktur (Granularität) innerhalb der Zelle. Somit generieren große Granulozyten mit ihren intrazellulären Vesikeln ein stärkeres Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtsignal als z.B. kleine, agranuläre Lymphozyten. Der Streulichtdetektor liegt für das Vorwärtsstreulicht in der gleichen Ebene, wie der Laser, wohingegen der Seitwärtsstreulicht-Detektor zu 90° gegenüber dem Laser positioniert ist (Murphy K 2009). Eine weitere Charakterisierung der Zellen erfolgt über Detektion von Fluoreszenzlicht. Licht spezieller Laser, wovon moderne Durchflusszytometer mehrere besitzen, regen die Elektronen von antikörpergebundenen Fluorochromen auf eine höhere Energiestufe an, worauf Emissionslicht einer bestimmten Wellenlänge erzeugt wird, wenn die Elektronen auf ihr vorheriges Energie-Niveau zurückfallen. Diese Emission wird mittels Filterung und Spiegelung im System von einem Photomultiplier detektiert woraufhin die Umwandlung des Fluoreszenzsignals in ein Spannungssignal erfolgt. Die Fluorochrome sind an Antikörper gekoppelt, die spezifisch an Oberflächenmoleküle (z. B. CD4, CD8) oder intrazelluläre Moleküle (z. B. IFN γ , IL-2) binden, sodass das Fluoreszenzsignal das Vorhandensein des entsprechenden Moleküls anzeigt.

Nach Durchführung von Stimulation, Fixierung und Färbung der Zellen oder direkter Färbung im Vollblut anhand der Oberflächenfärbung können Zellen anhand der verschiedenen angefärbten Moleküle unterschieden werden. An der Zelloberfläche befindliche Marker sind auf bestimmten Zellen unterschiedlich stark exprimiert beziehungsweise fehlen komplett. Somit werden die Zellen nicht nur differenzierbar, sondern es können auch Aussagen über unterschiedliche Funktionalitäten und Phänotypen getroffen werden (Murphy et al, 2009).

Die in Tabelle 13 aufgeführten Fluorochrome besitzen oft die gleiche Anregungs-Wellenlänge aber verschiedene Emissions-Wellenlängen. Somit kann durch die Verwendung weniger

Laser eine Vielzahl von Fluorochromen unterschieden werden, sodass eine multi-parametrische Charakterisierung von Immunzellen in einer einzelnen Probe ermöglicht wird.

Tabelle 13: Verwendete Fluorochrome mit gängigen Abkürzungen

Fluorochrom		Wellenlänge [nm]	
Abkürzung	Name	Anregung	Emission
AlexaFluor647		650	668
APC	Allophycocyanin	650	660
APC-H7	Allophycocyanin	496	785
FITC	Fluorescein isothiocyanat	494	520
PE	R-Phycoerythrin	496	578
PE-Cy7	R-Phycoerythrin Cyanin 7	496	785
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein	482	678
PerCp-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Cyanin 5.5	482	678
V450	Violet 450	404	448
V500	Violet 500	415	500

3.8.2 Messung und Auswertung am Durchflusszytometer

Die Messung der fixierten und gefärbten Zellen erfolgte im Durchflusszytometer FACS Canto II. Gemessen wurden 10000 – 50000 CD4⁺ T-Zellen pro Probe. Die Auswertung der Proben erfolgte mithilfe der FACS Diva Software (Version 6.1.3) der Firma BD. Zwei Zellmarker konnten in einem Standardpunktdiagramm (Dotplot) dargestellt werden, in dem jeder Punkt einer Zelle entsprach.

Verschiedene Punktdiagramme konnten anhand einer festgelegten Hierarchie kombiniert und in einer Auswertstrategie zur detaillierten Unterteilung der Zellen genutzt werden. Abbildung 4 zeigt eine typische Auswertungsstrategie zum Nachweis und zur Charakterisierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Zunächst wurden die Lymphozyten anhand des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) identifiziert. Unter den Lymphozyten konnten CD4⁺ T-Zellen dargestellt und hinsichtlich der Expression von CD69⁺ und IFN γ charakterisiert und quantifiziert werden. Für eine weitere funktionelle und phänotypische Charakterisierung wurde die Produktion von TNF α , IL-2, IL-21 und das Expressionslevel von CD27 und CTLA-4 auf den spezifischen T-Zellen beurteilt. Somit konnte analysiert werden, wann die Zellen in welchem Ausmaß und in welchen Kombinationen Zytokine produzieren oder die Expression der Oberflächenmarker hoch- oder runterreguliert werden.

Diese Parameter wurden in zwei unterschiedlichen intrazellulären Färbeansätzen realisiert (Tabelle 9/10). Die Auswertstrategien zur Quantifizierung und Charakterisierung spezifischer T Zellen ist in Abbildung 4, die Auswertstrategie zur Bestimmung der Zytokinexpressionsprofile ist in Abbildung 5 dargestellt.

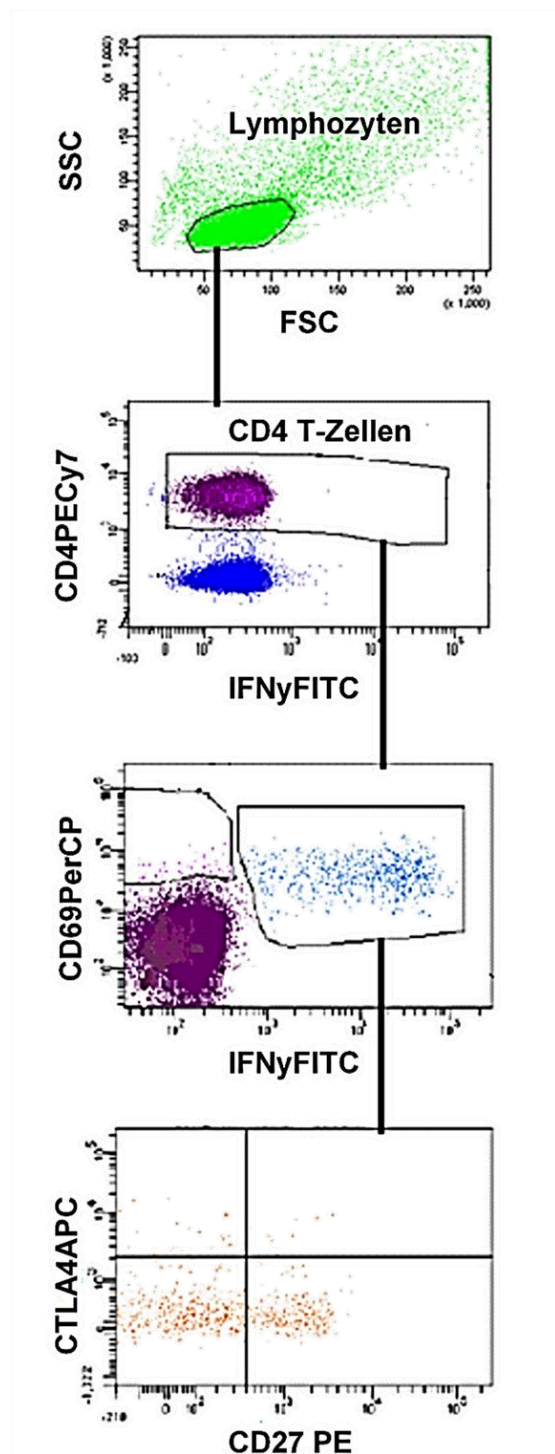


Abbildung 4: Auswertstrategie für den Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen und deren Phänotyp. Zunächst werden über FSC und SSC die Lymphozyten identifiziert. Im Punktdiagramm sind CD4⁺ Zellen über Backgating hervorgehoben. Unter den Lymphozyten werden in der Folge die CD4⁺ T-Zellen identifiziert. CD4⁺ T-Zellen, die sowohl CD69 als auch IFN γ exprimieren, stellen die reaktiven Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen dar. Zur weiteren funktionellen und phänotypischen Charakterisierung dieser T-Zellen werden diese hinsichtlich der Expression von CTLA-4 und CD27 (oder weiterer Zytokine (s. Abbildung 5)) analysiert. CD, Cluster of Differentiation; FSC, Forward Scatter; SSC, Sideward Scatter; IFN, Interferon; CTLA, cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein

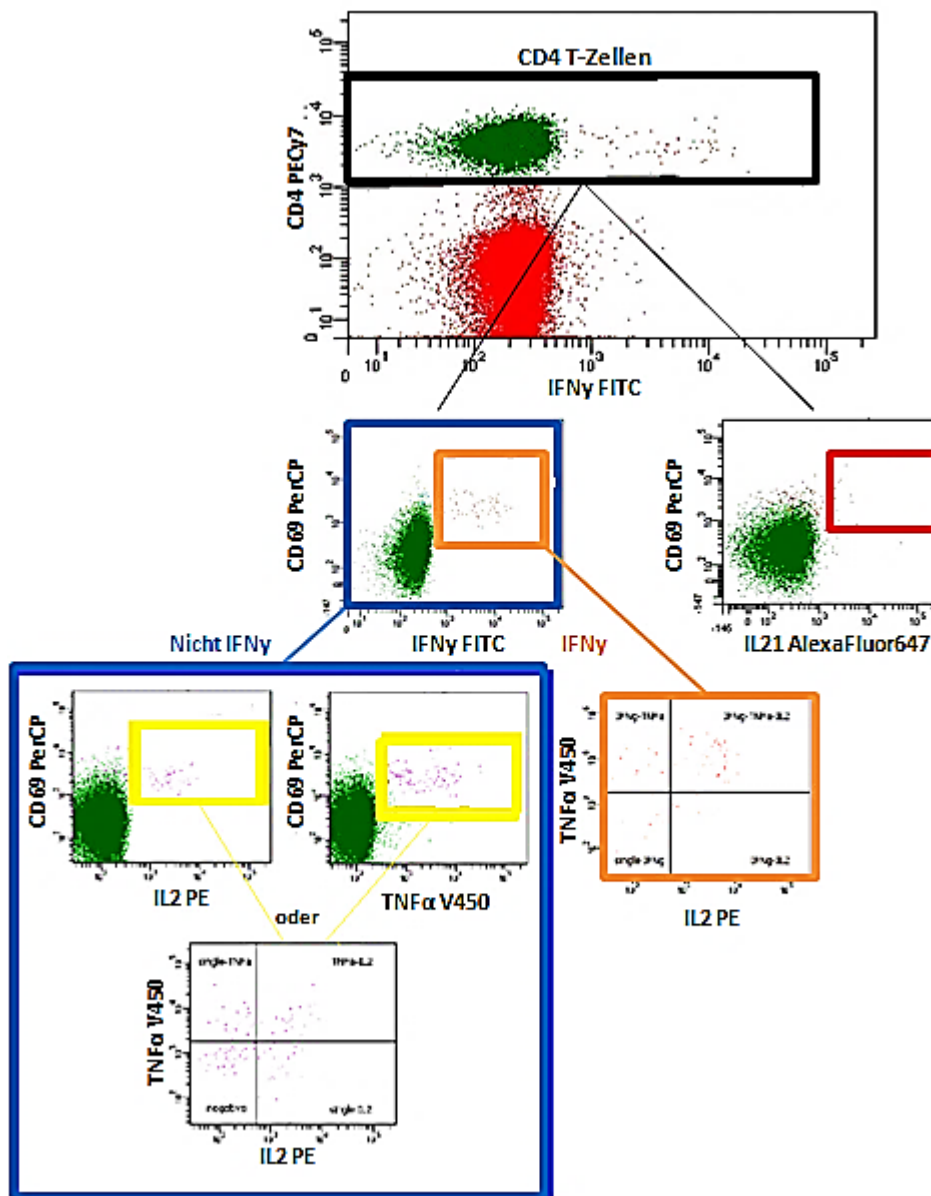


Abbildung 5: Auswertstrategie für den Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen und deren Zytokinexpressionsprofil. Die CD4⁺ T-Zellen werden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Expression verschiedener Zytokine analysiert. Zur Charakterisierung der Antigen-spezifischen Th1-Antwort werden die CD4⁺ T-Zellen hinsichtlich der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und der Zytokine IL2, TNF α und IFN γ analysiert, die entweder nur eines dieser Zytokine oder eine Kombination aus zwei oder allen drei Zytokinen exprimieren können. Des Weiteren wird der Anteil CD69⁺/IL21⁺ CD4⁺ T-Zellen als Nachweis für reaktive T folliculäre Helfer Zellen quantifiziert (nicht dargestellt). CD, Cluster of differentiation; IL, Interleukin; IFN; Interferon; TNF, Tumornekrosefaktor.

Bei der Auswertung der Oberflächenfärbungen wurden die T-Zellen ohne vorherige Stimulation in CD4 und CD8 positive T-Zellen unterteilt (Abb.6). Beide Populationen wurden in Ihrem Differenzierungsgrad mittels CD45RO, CD27, CXCR5, ICOS und PD1 beurteilt (Abb. 6A). T folliculäre Helferzellen wurden anhand der Expression von CXCR5 innerhalb der CD4 positiven Zellen identifiziert (Abb. 6B).

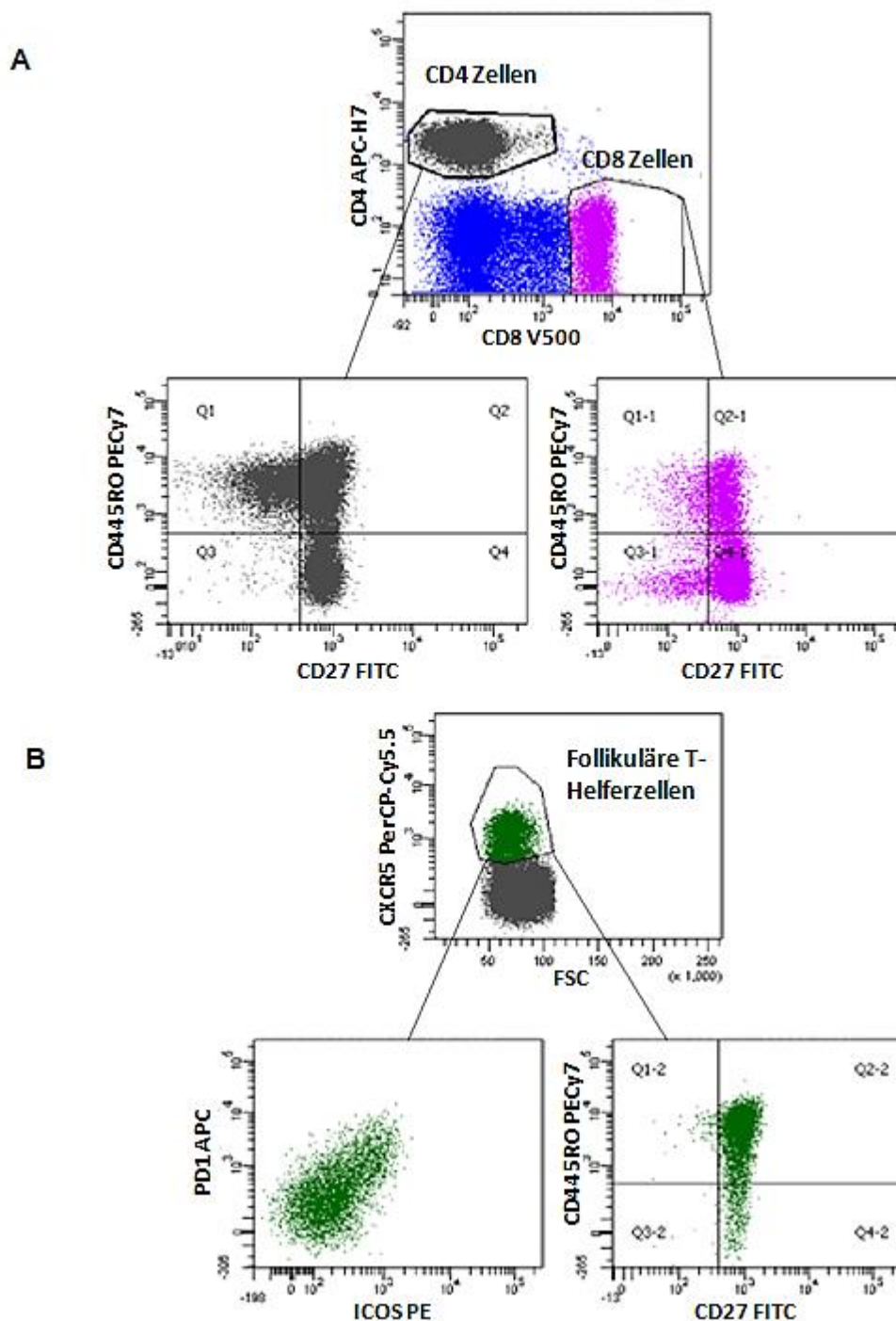


Abbildung 6: Auswertstrategie zur phänotypischen Charakterisierung von T-Zellen anhand von Oberflächenmolekülen. A) Nach dem Gating auf die Lymphozyten (nicht dargestellt) werden diese in CD4 und CD8 positive Lymphozyten aufgeteilt und jeweils entsprechend der Expression der Differenzierungsmarker CD45RO und CD27 dargestellt. B) Die CXCR5 positiven CD4⁺ T-Zellen (T folliculäre Helferzellen) werden zum einen hinsichtlich ihrer PD1 und ICOS Expression untersucht und zum anderen hinsichtlich ihres Differenzierungsstadiums anhand ihres CD27 und CD45RO Levels analysiert. CD, Cluster of differentiation; CXCR, CXC-Motiv-Chemokinrezeptor; FSC, Forward Scatter; ICOS, Inducible T-cell COStimulator; PD, Programmed Death.

In der zweiten Oberflächenfärbung wurden B-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation anhand der Expression von CD19 und dem gleichzeitigen Fehlen der Expression des T-Lymphozytenmarkers CD3 identifiziert (Abb. 7).

Über IgD und CD27 Expression der B-Zellen, konnten vier Subpopulationen differenziert werden. Innerhalb der IgD⁺CD27⁺ B-Zellen wurden die Plasmablasten anhand ihrer starken CD38-Expression identifiziert.

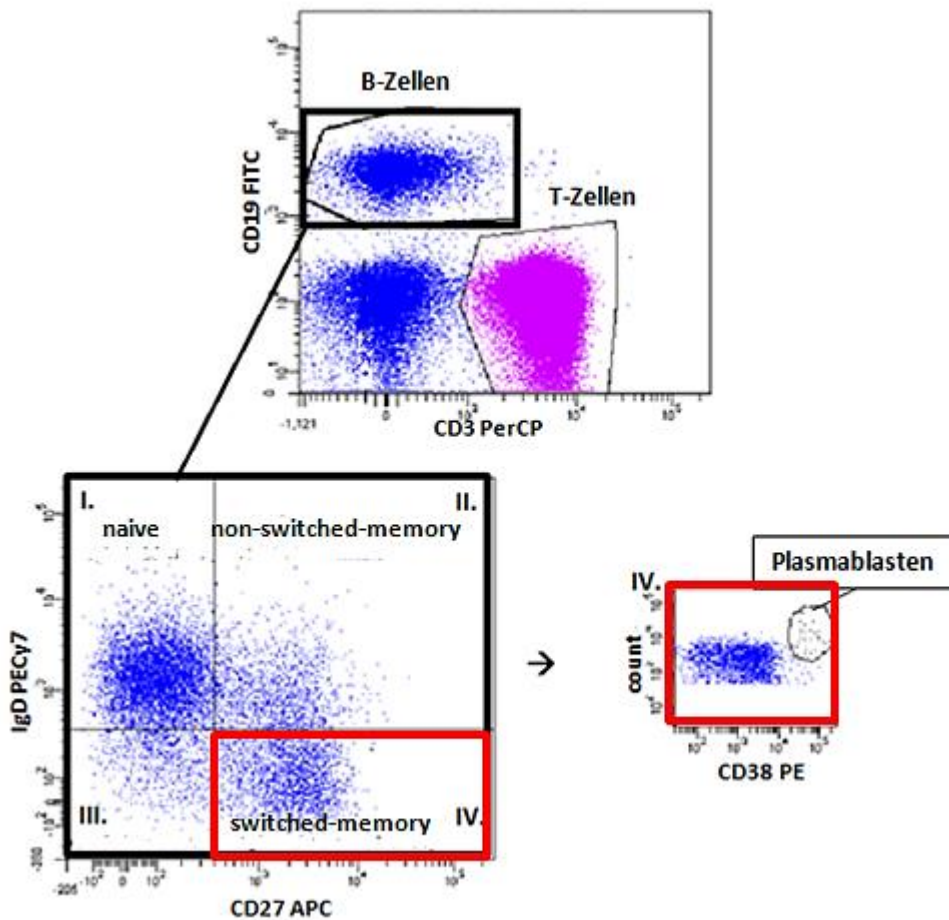


Abbildung 7 zur phänotypischen Charakterisierung von B-Zellen anhand von Oberflächenmolekülen. B-Zellen werden als CD19 positiv und CD3 negativ von den T-Zellen differenziert. Die weitere Phänotypisierung der B-Zellen erfolgt über Expression von CD27 und IgD (I-IV). Die Subpopulation der Plasmablasten wird anhand der hohen Expression von CD38 und CD27 identifiziert. CD, Cluster of differentiation; IgD, Immunglobulin D.

3.9 Semiquantitative und quantitative Bestimmung von anti-Influenza-IgG, -IgM und -IgA

3.9.1 Testprinzip

Influenza-Antikörper können durch einen enzymgekoppelten Immunsorptionsstest (*enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA*) semiquantitativ bzw. quantitativ nachgewiesen werden. Hierfür wird Probandenserum verdünnt und in eine Influenza-Antigen-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Die im Blut des Probanden befindlichen Antikörper können an das virale Antigen binden. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper werden anschließend Enzym-gekoppelte anti-human Antikörper hinzugefügt.

Nach Zugabe eines Substrates erfolgt die enzymatische Umsetzung des Substrates, die eine messbare Farbreaktion hervorruft. Diese wird durch Lichtadsorption in einem Photometer

bestimmt und quantifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei ELISA durchgeführt, mit denen Influenza-spezifische IgG, IgM und IgA Antikörper bestimmt werden. Da außer dem Probenmaterial auch eine Negativ-, eine Positivkontrolle und ein Kalibrator (IgM, IgA) bzw. drei Kalibratoren (für IgG) mitgeführt werden, kann zudem eine Quantifizierung der Antikörpermenge durchgeführt werden. Diese erfolgt semiquantitativ für IgM und IgA und quantitativ für IgG.

3.9.2 Durchführung des Anti-Influenza-IgG, -IgM und -IgA ELISA

Das Probandenserum wurde bei -20°C bis zur Analyse eingefroren und alle Seren eines Probanden wurden gleichzeitig auf einer Platte gemessen. Zur Quantifizierung von IgG, IgM und IgA Antikörper gegen Influenza wurde ein ELISA Kit der Firma Euroimmun nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Hierzu wurden die Seren bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 10min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Arbeitsschritte der drei verschiedenen ELISAs verliefen im Ablauf gleich und alle Inkubationsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Für jeden der drei ELISAs mussten die Proben im Verhältnis 1:101 verdünnt werden. Hierfür wurden jeweils 10µl Serum in 1000µl Probenpuffer gegeben und gut gemischt. Der IgM-Testsatz enthält zusätzlich ein IgG/RF(Rheumafaktor)-Absorbens im Probenpuffer, um spezifische IgG Antikörper aus dem Proben Serum zu entfernen. Spezifische IgG Antikörper können die IgM-Antigenbindung stören und somit zu falsch-negativen Ergebnissen der IgM-Messung führen. 100µl dieser Proben-Verdünnungen sowie Positiv-, Negativkontrolle und Kalibrator wurden in je eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert, die mit Antigenen der Influenza A und B Viren beschichtet ist. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit aus der Platte entleert. Anschließend wurde mithilfe einer 8 Kanalpipette in jede Vertiefung 300µl verdünnter Waschpuffer pipettiert und nach 30-60 Sekunden erneut geleert.

Dieser Waschschrift wurde dreimal hintereinander durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Platte kräftig auf Zellstoffpapier ausgeklopft, um zu verhindern, dass Flüssigkeitsrückstände die Messungen verfälschen können. Darauf folgend wurden mithilfe der Multipipette 100µl Enzymkonjugat (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgA bzw. IgM oder IgG vom Kaninchen) in die Vertiefungen pipettiert und durch leichtes Klopfen des Plattenrandes wurde die Lösung gleichmäßig verteilt. Es folgten weitere 30min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Mikrotiterplatte unterlief erneut einer dreimaligen Waschprozedur und anschließend wurde pro Vertiefung je 100µl Chromogen/Substratlösung (Tetramethylbenzidin/H₂O₂) zugegeben. Nach der Inkubation der Platte für 15 min erfolgte die direkte Zugabe von 100µl Stopplösung (0,5M Schwefelsäure). Die Messung der Proben wurde innerhalb von 30 min nach Abstoppen der Reaktion durchgeführt.

3.9.3 Messung und Auswertung am Photometer

Die photometrische Messung wurde an einem multifunktionalen Plattenleser Victor X4 der Firma PerkinElmer unter Verwendung der WorkOut Software 2.5 durchgeführt. Die Messwellenlänge betrug für alle Messungen 450nm und die Referenzwellenlänge 620nm bis 650nm.

3.10 Quantitative Messung Virus-neutralisierender Antikörper mittels Neutralisationstestung

3.10.1 Testprinzip

Der Neutralisationstest ist ein Verfahren, das zur quantitativen Bestimmung neutralisierender Antikörper angewandt wird. Im Vergleich zum ELISA Verfahren werden durch den Neutralisationstest funktionelle Eigenschaften der Antikörper erfasst. Hierfür werden Mikrotiterplatten verwendet, die MDCK Zellen enthalten. Zunächst werden Verdünnungsreihen der Probenseren in Verhältnissen von 1:10 – 1:1280 angefertigt und eine Suspension je eines Virusstammes – H1N1, H3N2, Brisbane, Phuket – hinzugefügt. Diese Mischung wird inkubiert und anschließend auf die Mikrotiterplatten mit der Zellkultur gegeben. Bei Testpersonen, deren Titer bei der ersten Testung bei 1:1280 liegen, werden die Proben erneut getestet und die Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 1:20480 erweitert. Die im Serum enthaltenen neutralisierenden Antikörper binden das Virus und verhindern eine Infektion der Zellen. Alle infizierten Zellen produzieren virale Proteine, welche mit Enzym-gekoppelten monoklonalen Antikörpern markiert werden. Diese sind gegen das Nukleoprotein und Hämagglutinin des Virus gerichtet. Zur quantitativen Bestimmung der neutralisierenden Antikörper wird die Verdünnung als Titer ermittelt, die im Vergleich zur Kontrolle zu einer 75% Hemmung der Infektion führt. Das Testprinzip ist in Abbildung 8 dargestellt.

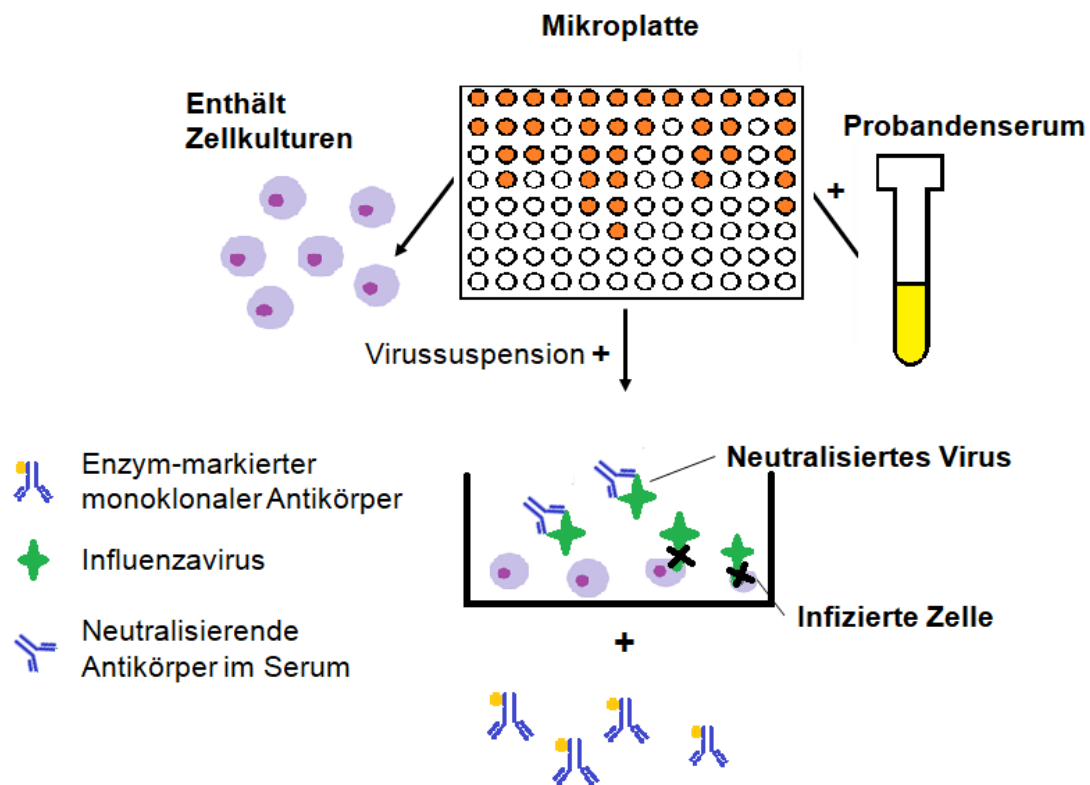


Abbildung 8 Schema der Neutralisationstestung. Exemplarisch abgebildet ist eine Mikrotiterplatte welche MDCK Zellkulturen enthält. Das jeweilige Probandenserum wird in einer Verdünnungsreihe eingesetzt und eine fest definierte Menge an Virussuspension wird zugegeben. Die im Serum des jeweiligen Probanden enthaltenen Antikörper können das Influenzavirus neutralisieren. Somit kann nur ein Bruchteil der Zellen in der Zellkultur infiziert werden. Die infizierten Zellen können mit zugegebenen Enzym-markierten Antikörpern und die Umsetzung eines Substrats identifiziert werden.

3.10.2 Durchführung der Neutralisationstestung

Um unspezifische Inhibitoren zu entfernen, wurden die Proben über Nacht mit Rezeptor zerstörendem Enzym (Receptor destroying enzyme; RDE) behandelt und anschließend bei 56°C für 30min hitzeinaktiviert. Darauffolgend wurde eine Verdünnungsreihe der Seren von 1:10 bis 1:1280 bzw. bis 1:20480 angelegt und mit den gleichen Volumina an Virussuspensionen gemischt. Diese enthielten 200-400 Plaque-formierende Einheiten (PFU). Hierbei handelte es sich um die Mindestanzahl an Erregern, die zu einer Infektion führten. Nach 90-minütiger Inkubation in einer feuchten Kammer im Brutschrank (37°C; 5% CO₂) wurde jeweils ein Volumen von 100µl auf eine MDCK Hunde-Nierenzell-Monoschicht in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit entsprechenden Kontrollen übertragen. Nach 1 Stunde Inkubation wurden 100µl Medium zugegeben und die Platten wurden für 24 bis 28 Stunden im Brutschrank kultiviert. Nach Ausklopfen des Überstandes wurden die Zellen mit einer Mischung aus 40%Aceton/60%Methanol für 10min fixiert und anschließend durch das Beifügen von Waschpuffer (1%BSA/0,1%Thimerosal) für 30min im Brutschrank geblockt.

Nach erneutem Entfernen des Überstandes mittels Ausklopfens wurden die Zellen mit Maus anti-Influenza A bzw. B Antikörper für 30min bei 37°C inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliger automatisierter Waschschrift mit Waschpuffer, bevor Peroxidase-markierter Maus anti-IgG

Antikörper zugegeben und die Ansätze für weitere 30min bei gleichen Bedingungen inkubiert wurden. Zuletzt wurde eine AEC-Substratlösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol Tablette gelöst in 4 ml N,N-Dimethylformamid und 16ml Acetatpuffer) hinzugefügt und erneut für 30min inkubiert. Danach wurde der Überstand mit einer Multipipette abgesaugt und die Platten für circa eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet

3.10.3 Messung der Neutralisierenden Antikörpertiter

Die Anzahl infizierter Zellen wurde in einer ELISPOT-Analyseapparatur ausgelesen. Das enzymatisch umgesetzte Substrat machte diese als einzelne Punkte in jeder Vertiefung sichtbar. Um die Genauigkeit der Messung zu optimieren, mussten fehlerhaft markierte Verunreinigungen manuell im Programm entfernt werden. Nachfolgend konnte die Zellverdünnung bestimmt werden, bei der im Vergleich zur Viruskontrolle 75% der viralen Zellinfektion gehemmt war. Abbildung 9 zeigt exemplarisch eine Verdünnungsreihe nach Influenzavirusinokulation auf der Mikrotiterplatte. Jeder Punkt entspricht einer infizierten Zelle.

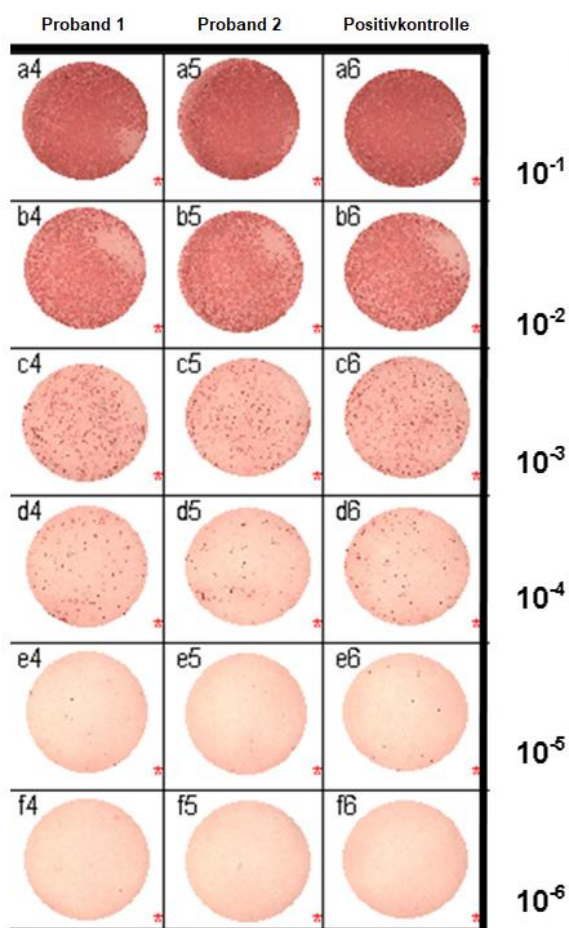


Abbildung 9: Verdünnte Serumproben von zwei Probanden und einer Influenza-Positivkontrolle. Exemplarische Darstellung einer MDCK-Zellkultur, die mit Influenzavirus inokuliert wurde. Die Influenzaviren bilden Plaques (PFU, Plaque formierende Einheiten), die immunohistochemisch angefärbt wurden. Jede infizierte Zelle erscheint somit als ein Punkt. Der Titer der Viruskontrolle beträgt $10^{6,3}$ PFU/ml. Die Seren wurden in einer Reihe von 10^{-1} – 10^{-6} . Diese Abbildung wurde zum Zwecke der Illustration in dieser Arbeit mit freundlicher Genehmigung der Enders Labore, Stuttgart zur Verfügung gestellt. Die Proben sind nicht Teil der in dieser Arbeit erhobenen Proben.

3.11 Statistische Analyse

Die statistische Datenanalyse wurde mit den Versionen 5.03, 8.3 und 9.1 von GraphPad Prism durchgeführt. Gepaarte kontinuierliche Variablen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test analysiert. Longitudinale Analysen dieser Parameter wurden mit dem Friedman-Test mit Dunn-Posttest durchgeführt. Da nach 26 Wochen bei einem Athleten keine Probenentnahme erfolgte, wurde der fehlende Wert auf der Grundlage des Rangs des entsprechenden Wertes unter den Werten aller Athleten 2 Wochen nach der Impfung extrapoliert. Der Wert wurde als Mittelwert aus dem nächsthöheren und -niedrigeren Rang extrapoliert. Die Gesamtergebnisse änderten sich nicht, wenn die Daten dieser Person aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Parametrische Analysen zwischen den beiden Studiengruppen wurden unter Verwendung des ungepaarten t-Tests bewertet. Fisher's exakter Test und Chi-Quadrat-Test wurden verwendet, um Unterschiede bei kategorialen Parametern zu ermitteln. Um eine robuste Statistik zu gewährleisten, wurde die Analyse der CTLA-4- oder CD27-Expressions- und Zytokin-Expressionsprofile auf Proben mit mindestens 15 bzw. 30 gemessenen Ereignissen unter den antigenreaktiven CD4-T-Zellen beschränkt.

4 Ergebnisse

4.1 Probandenkollektiv

Insgesamt wurden 71 Probanden geimpft, wovon 25 Kontrollpersonen und 46 Sportler waren. Unter den Sportlern waren 6 Badmintonspieler, ein Basketballer, 12 Radfahrer, 3 Hammerwerfer, 6 Ruderer, 3 Fußballer, 4 Schwimmer, 4 Triathleten, 2 Marathonläufer und 14 Ringer. Ein Sportler fiel zur 6 Monatsmessung aus der Studie, dessen Werte zu diesem Zeitpunkt für die statistische Analyse extrapoliert wurden. Ein weiterer Sportler verließ seine Sportmannschaft bereits nach der ersten Messung nach Impfung, sodass keine Folgemessungen durchgeführt werden konnten. Dieser Sportler wurde in die finale Datenanalyse nicht eingeschlossen, sodass 70 Probanden in den Analysen berücksichtigt wurden. Alter, Geschlecht und Ergebnisse des Differentialblutbildes zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Sportlern und Kontrollen (Tab. 1). Ausnahme waren lediglich etwas geringere prozentuale Lymphozytenanteile in der Sportlergruppe 2 Wochen nach Impfung. Acht Individuen, davon zwei Kontrollen und sechs Sportler, hatten in den Vorjahren bereits Influenza Impfungen erhalten. Alle anderen wurden zuvor noch nie gegen Influenza geimpft.

Tabelle 1: Demographische Probandendaten und Leuko- und Lymphozytenwerte

	Zeitpunkt^a	Kontrollen^b	Sportler^c	p-Wert
n		25	45	
Trainingszeit pro Woche		<2 h	14,0±4,6h	
Alter [Mittelwert±SD]		22.8 ± 4.1	23.2 ± 7.7	0.791
Geschlecht weiblich n (%)		8 (32.0)	9 (20.0)	0.383
Leukozyten/µl Blut	Vor	6500, 1900	6400, 2550	0.750
[median, IQR]	1 Woche	6700, 2000	6500, 2800	0.902
	2 Wochen	6500, 1550	6300, 1850	0.695
	26 Wochen	6700, 2400	6400, 3100	0.663
% Lymphozyten im Blut	Vor	36.2, 8.6	33.8, 12.6	0.239
[median, IQR]	1 Woche	35.8, 11.2	34.1, 12.0	0.851
	2 Wochen	39.2, 10.1	34.0, 12.9	0.041
	26 Wochen	37.0, 10.12	35.7, 12.4	0.878
zuvor Influenza geimpfte Probanden n (%)		2 (8,0)	6 (13.3)	0.702

^aZeitpunkt in Relation zur Impfung; ^bkein professioneller Sport (weniger als 2 Trainingseinheiten pro Woche, ein Jahr vor und während der Studie, die Trainingszeit wurde nicht genau quantifiziert; ^cProfessionelles Training für mindestens 5 Tage pro Woche (Sportarten: Badminton (n=6), Basketball (n=1), Radfahren (n=12), Hammerwerfen (n=3), Rudern (n=6), Fußball (n=3), Schwimmen (n=4), Triathlon (n=4), Marathon (n=2), Ringen (n=14)); SD, Standard Deviation; IQR, interquartile range)

4.2 Durch Influenza-Impfung induzierter Anstieg des Anteils Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in Sportlern und Kontrollpersonen

Zum Nachweis Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in Kontrollen und Sportlern wurden Blutproben vor, sowie 1, 2 und 26 Wochen nach Impfung mit dem Influenza-Antigen stimuliert. Stimulationen mit PBS bzw. SEB wurden jeweils als Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt. Die Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurden anhand der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Zytokins IFN γ durchflusszytometrisch quantifiziert. Exemplarische Dot Plots der Antigen-spezifischen CD4 T-Zellantwort eines 17-jährigen Sportlers im zeitlichen Verlauf vor und nach der Influenza-Impfung sind in Abbildung 10 dargestellt.

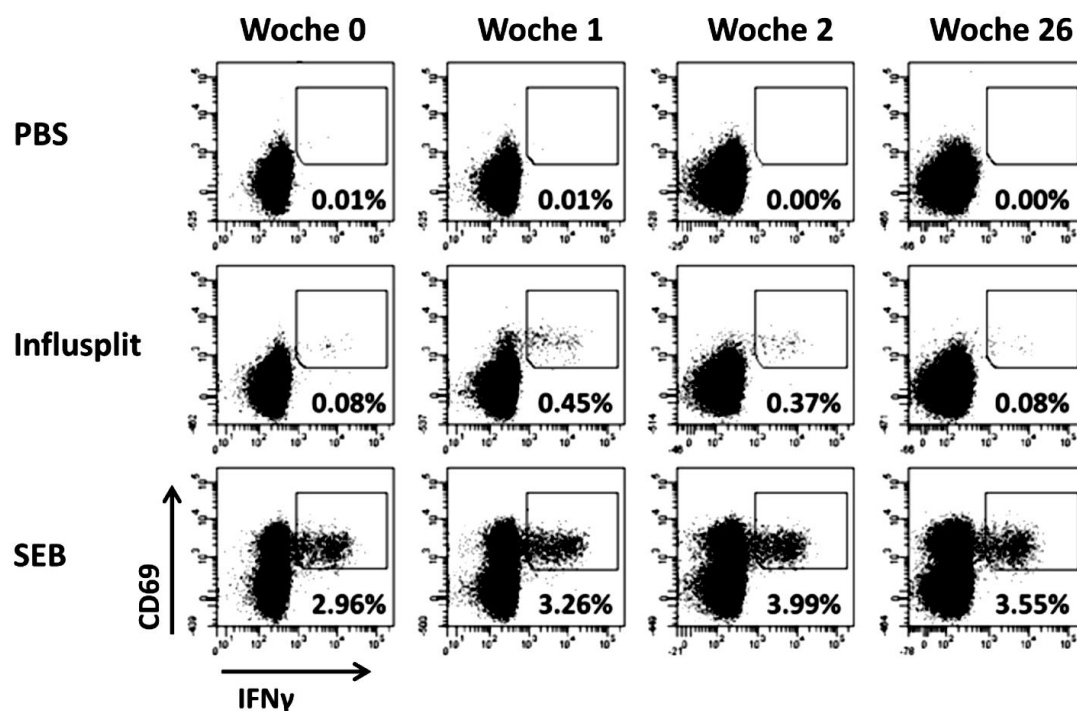


Abbildung 10: Repräsentative Dot Plot Ergebnisse der Antigen-spezifischen T-Zellstimulation aus Vollblut eines 17-jährigen Sportlers. Die umrahmten Areale zeigen die CD69⁺/IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen nach PBS, Influsplit und SEB Stimulation über den gesamten Studienzeitraum. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. Die Prozentwerte geben den Anteil der reaktiven CD4⁺ T-Zellen an allen CD4⁺ T-Zellen an. PBS, Phosphate buffered Saline; SEB, Staphylococcus aureus Enterotoxin B; CD, Cluster of differentiation; IFN, Interferon.

Erwartungsgemäß war die Hintergrundaktivität nach Stimulation mit dem Kontrollantigen (PBS) gering. Dies war für den gesamten Beobachtungszeitraum charakteristisch. Eine Reaktivität nach Stimulation mit dem Antigen SEB (Positivkontrolle) war über den ganzen Beobachtungszeitraum in ähnlichem Maße unabhängig von der Impfung detektierbar. In Abbildung 11 ist der Verlauf des Anteils spezifischer CD69⁺/IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen der

Kontrollprobanden und der Sportler über den gesamten Beobachtungszeitraum von 6 Monaten dargestellt. In beiden Gruppen war ein signifikanter Anstieg der Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort nach der Impfung ersichtlich, der nach einer Woche das Maximum erreichte und dann im weiteren Verlauf wieder abnahm ($p < 0,0001$). Bei der Stimulation mit SEB verblieben die Frequenzen über die Zeit erwartungsgemäß auf dem gleichen Level und stiegen nicht signifikant an.

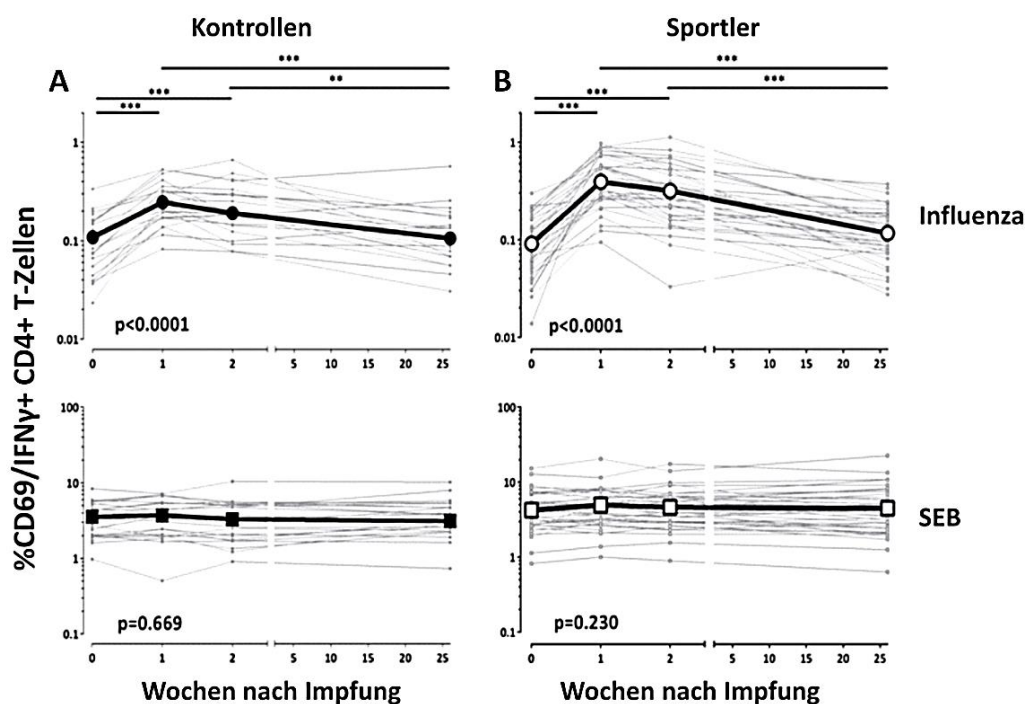


Abbildung 11: Signifikante Zunahme Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen eine Woche nach der Impfung und von Kontrollpersonen (A) und Sportlern (B). Auf der x-Achse ist der zeitliche Verlauf der Studie über 26 Wochen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil CD69/IFN γ positiver CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Die oberen Graphen stellen die Verläufe der Influenza-spezifischen CD4 T-Zellantwort dar, wohingegen in den unteren Graphen die SEB-reaktiven T-Zellfrequenzen dargestellt sind. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$). Die dicken Linien stellen die Verläufe der Mediane dar. CD, Cluster of differentiation; IFN, Interferon; SEB, Staphylococcus aureus Enterotoxin B.

Um die Ausprägung dieses Anstiegs zu analysieren und einen Gruppenvergleich durchführen zu können, wurden die prozentualen Anteile Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen der Kontrollen, denen der Sportler gegenübergestellt (Abb. 12A). In Woche 1 und 2 lagen signifikante Unterschiede der spezifischen Anteile vor, wobei jeweils die Sportlergruppe höhere Frequenzen als die Kontrollgruppe aufwies (Woche 1: $p < 0,0002$; Woche 2: $p < 0,011$). Zudem wurde in jeder Gruppe der Anstieg als Maß für die Veränderung der Frequenzen in Woche 1, 2 und 26 im Vergleich zum Ausgangswert in Woche 0 berechnet (Abb. 12B). Diese Werte wurden jeweils zwischen Sportlern und Kontrollen verglichen. Hierüber wurde ersichtlich, dass der Anstieg Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in der Sportlergruppe in Woche 1 ($p = 0,0007$) bzw. Woche 2 ($p = 0,005$) signifikant stärker ausgeprägt war als in der Kontrollgruppe. Die Frequenz SEB-reaktiver T-Zellen war in beiden Gruppen nahezu gleich. Lediglich zwischen

dem Wert in Woche 2 zu Woche 0 bestand ein signifikanter Unterschied ($p=0,032$). Zusammenfassend waren in beiden Gruppen signifikante Anstiege der Influenza-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen nach der Impfung mit Inlusplit zu beobachten. In der Gruppe der Leistungssportler war die Zunahme der Influenza-spezifischen Zellen jedoch stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Nach 6 Monaten waren die Frequenzen Influenza-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen in beiden Gruppen rückläufig und es war kein Unterschied mehr im Vergleich zum Wert vor Impfung erkennbar.

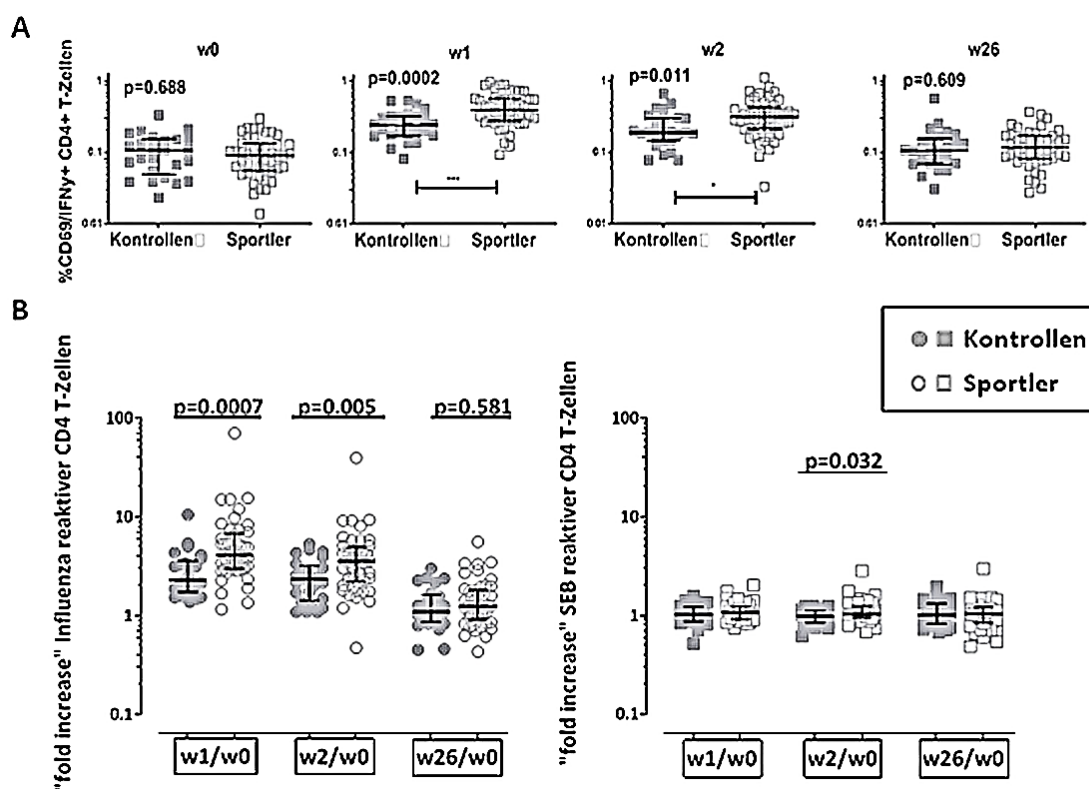


Abbildung 12: Signifikant stärkerer Anstieg Influenza-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen nach der Impfung von Sportlern im Vergleich zu Kontrollpersonen. (A) Frequenzvergleich Influenza-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen (y-Achse) zwischen Sportlern (offene Symbole) und Kontrollen (gefüllte Symbole) in Woche 0 (w0), Woche 1 (w1), Woche 2 (w2) und Woche 26 (w26). **(B)** Verhältnis der Influenza-spezifischen und SEB-reaktiven $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zwischen Kontrollen und Sportlern zum jeweiligen Zeitpunkt nach Impfung im Vergleich zum Wert vor Impfung (Woche 1 (w1), Woche 2 (w2) und Woche 26 (w26) zu Woche 0 (w0) dar). Die y-Achse bildet den „fold increase“ ab. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für $p<0,05$, ** für $p<0,01$, *** für $p<0,001$). CD, Cluster of differentiation; IFN, Interferon; w, Woche.

4.3 Impf-induzierter Anstieg des Oberflächenmoleküls CTLA-4 auf den Influenza-spezifischen T-Zellen und Stabilität der CD27 Expression

Im vorherigen Abschnitt wurde die rein quantitative Untersuchung der Influenza-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen dargestellt. Anhand der Verwendung von weiteren Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern in den Stimulationsexperimenten konnten zusätzliche Informationen zu den phänotypischen Eigenschaften dieser Zellen gewonnen werden. Es erfolgte die Messung der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von CTLA-4 auf reaktiven $CD4^+$ T-Zellen. Diese wurden, wie vorne beschrieben, definiert als $CD69$ und $IFN\gamma$ positiv. Abbildung 13 zeigt das Beispiel

einer Kontrollperson, bei der die CTLA-4 Expression der IFN γ -exprimierenden Zellen im zweidimensionalen Dotplot dargestellt ist, um die Veränderung der CTLA-4 MFI über den Studienzeitraum zu untersuchen.

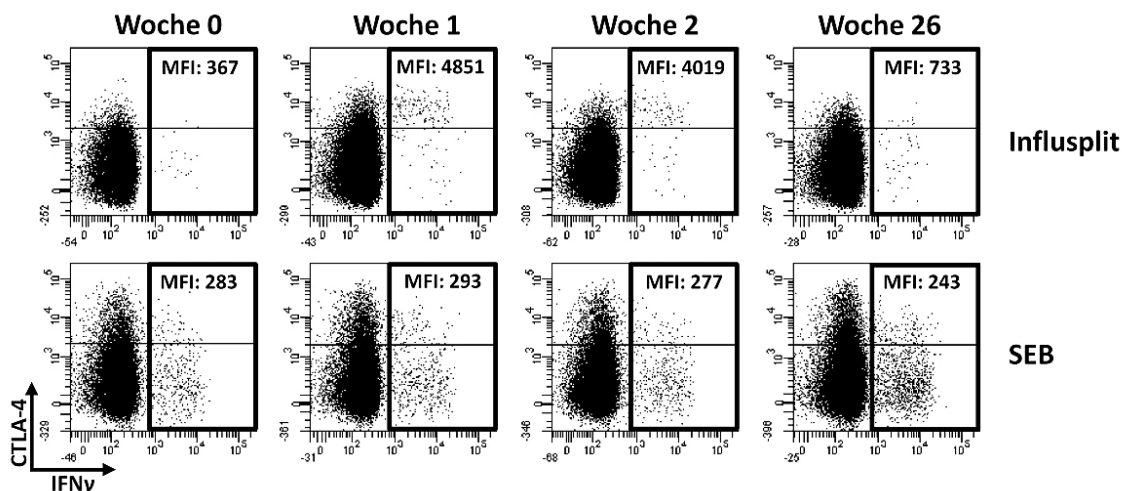


Abbildung 13: Repräsentative Dotplots der CTLA-4-Expression auf CD4⁺ T-Zellen einer 23-jährigen Kontrollperson vor und nach Influenza-impfung. Dargestellt ist die CTLA-4 Expression (Y-Achse) gegenüber der IFN γ -Expression (X-Achse) für Influsplit (oben) und SEB (unten) Stimulation zu allen vier Untersuchungszeitpunkten. Die angegebenen Zahlen stehen für die CTLA-4 MFI der Influenza-spezifischen bzw. SEB reaktiven CD4⁺ T-Zellen. MFI, mittlere Fluoreszenz Intensität. CTLA, cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein; IFN, Interferon.

Die CTLA-4-Expression der Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nahm nach der Impfung sowohl bei den Kontrollprobanden als auch bei den Sportlern deutlich zu, erreichte ihr Maximum nach 7 Tagen und nahm im weiteren Verlauf wieder ab ($p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu blieb die CTLA-4-Expression der SEB-reaktiven CD4⁺ T-Zellen zu allen vier Zeitpunkten trotz signifikanter Unterschiede auf einem niedrigen Niveau (Abb. 14).

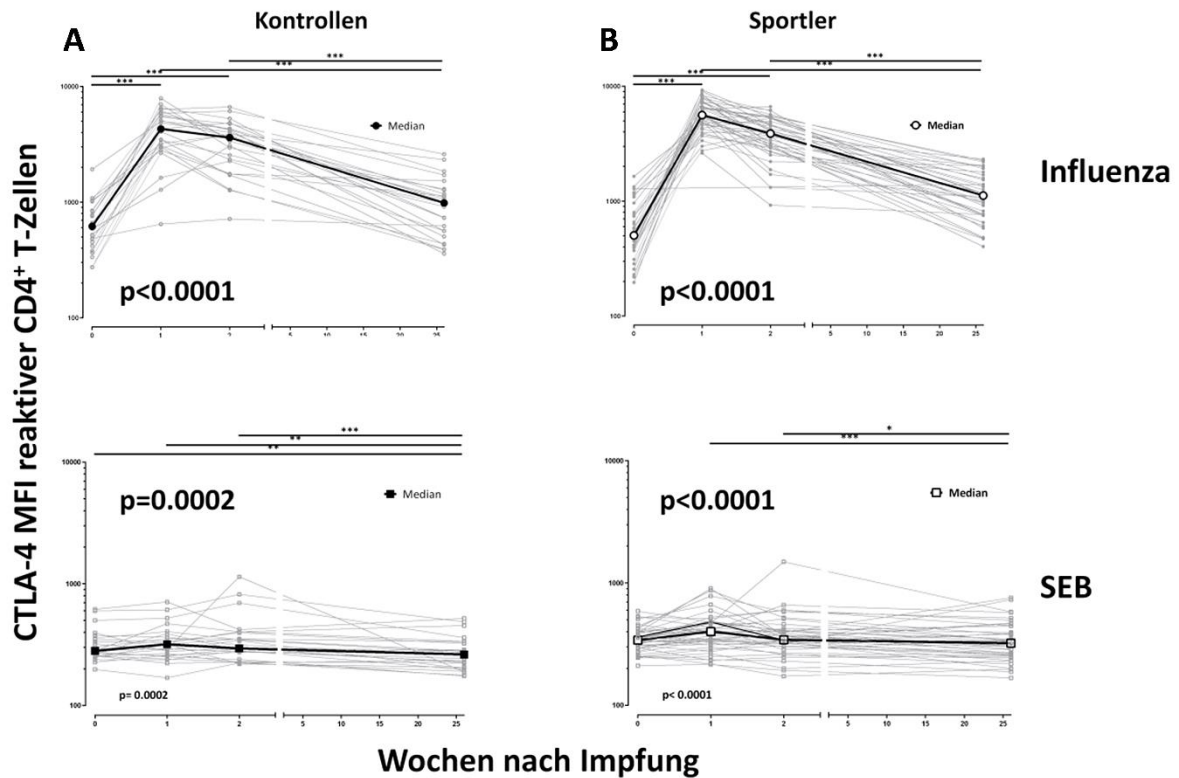


Abbildung 14: Impf-induzierte Zunahme der CTLA-4 Expression auf Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei Kontrollprobanden (A) und Sportlern (B). Auf der x-Achse ist der zeitliche Verlauf der Studie über 26 Wochen, auf der y-Achse die CTLA-4 MFI reaktiver CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Die oberen Graphen stellen die Verläufe nach Influenza- die unteren nach SEB-Stimulation dar. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für p<0,05, ** für p<0,01, *** für p<0,001). Die dicken Linien stellen die Verläufe der Mediane dar. CD, Cluster of differentiation; CTLA, cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein; SEB, Staphylococcus aureus Enterotoxin B.

Um die Gruppen hinsichtlich der CTLA-4 Expression zu vergleichen, wurden die CTLA-4 MFIs gegenübergestellt und erneut ein Anstieg als relatives Maß im Vergleich zum Wert vor Impfung bestimmt (Abb. 15). Analog zu den T-Zellfrequenzen weisen die Sportler im Vergleich zu den Kontrollpersonen eine Woche nach der Impfung eine signifikant höhere CTLA-4 Expression auf (p=0,004). Nach Woche 2 und 26 bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Nach SEB Stimulation waren die Unterschiede der CTLA-4-Expression zwischen beiden Gruppen gering. Allgemein lag die CTLA-4-Expression bei SEB reaktiven CD4⁺ T-Zellen auf niedrigerem Niveau als bei Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. (Abb. 15A). Bei der Berechnung des Anstiegs stellte sich heraus, dass ein signifikant höherer Anstieg der CTLA-4-Expression auf den Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen der Sportlergruppe bestand (w1/w0, p=0,006; w2/w0, p=0,012; w26/w0, p=0,044; Abb. 15B). Bei den SEB-reaktiven T-Zellen war dieser Effekt nicht zu beobachten.

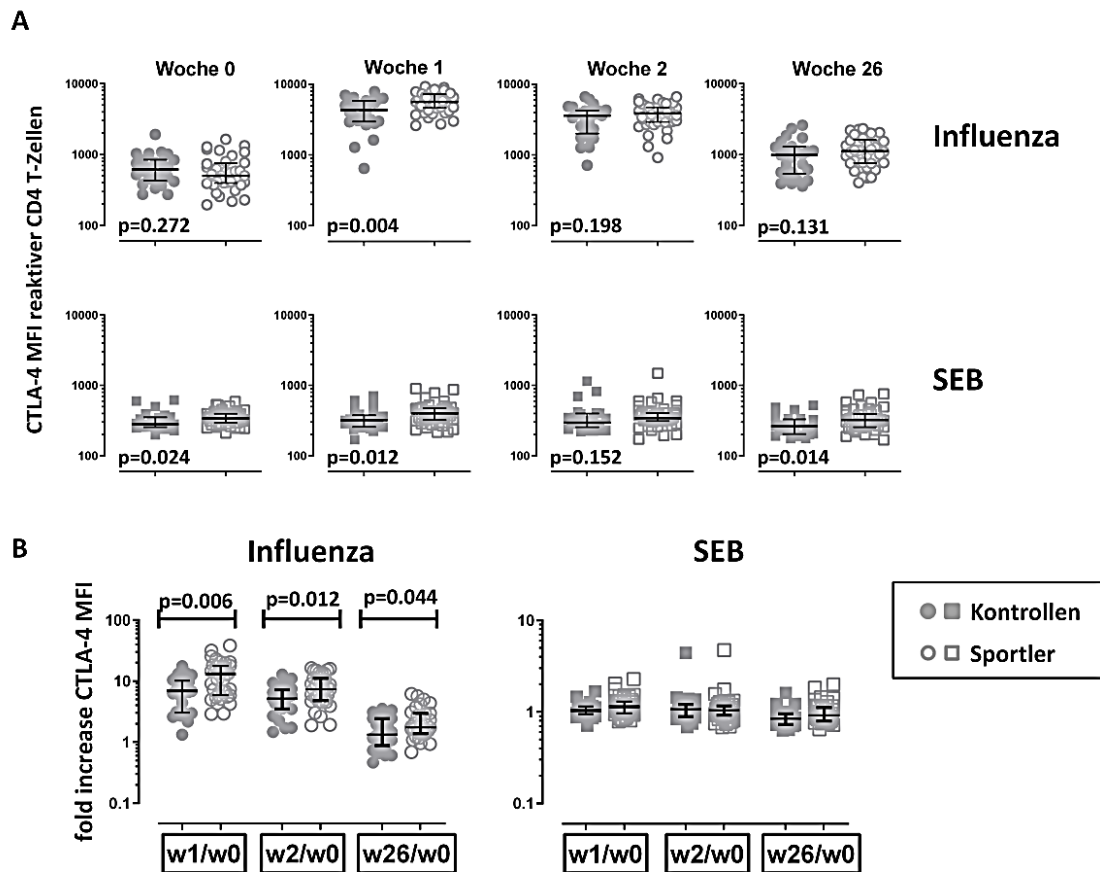


Abbildung 15: Signifikant stärkere Induktion der CTLA-4-Expression auf Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei Sportlern. (A) Vergleich der CTLA-4 MFI Influenza-spezifischer (oben) und SEB-reaktiver CD4⁺ T-Zellen (unten) von Kontrollen (gefüllte Symbole) und Sportlern (offene Symbole) an allen vier Untersuchungszeitpunkten. **(B)** Anstieg der CTLA-4 MFI nach Woche 1 (w1/w0), 2 (w2/w0) und 26 (w26/w0) im Vergleich zu dem Ausgangswert in Woche 0. Die Berechnung erfolgte für Influenza-spezifische (links) und SEB-reaktive CD4⁺ T-Zellen (rechts). CD, Cluster of differentiation; CTLA, cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein; SEB, Staphylococcus aureus Enterotoxin B; w, Woche.

Ein weiteres Molekül, dessen Expression in die phänotypische Beurteilung der CD4⁺ T-Zellen eingeschlossen wurde, war CD27. Repräsentative Dot Plots der CD27 Expression auf CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Influsplit bzw. SEB sind in Abbildung 16A dargestellt. Hieraus war bereits ersichtlich, dass nahezu alle Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen CD27-positiv waren und sich die Expression dieses Moleküls im gesamten Studienverlauf weder nach Influenza-spezifischer noch nach SEB Stimulation veränderte. Im Gruppenvergleich wurde deutlich, dass auch jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen Sportlern und Kontrollen bezüglich ihrer CD27 Expression bestand (Abb. 16B).

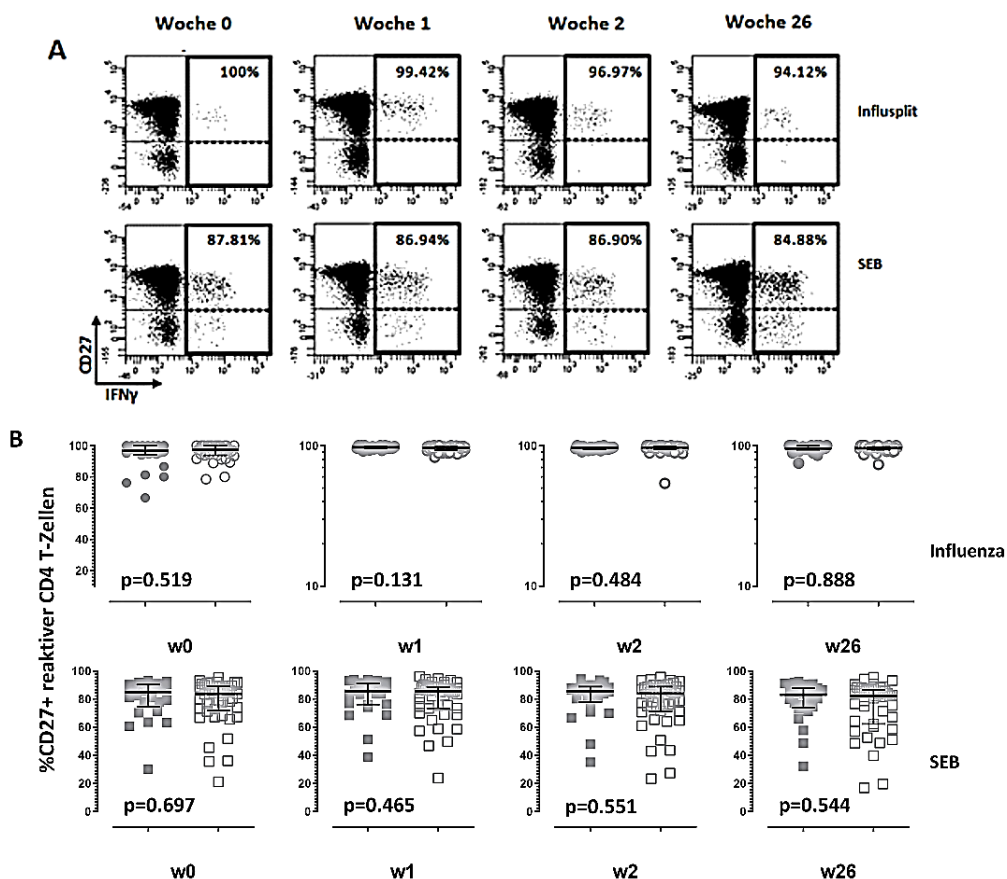


Abbildung 16: Unveränderte Expression von CD27 auf Influenza-spezifischen und SEB-reaktiven CD4⁺ T-Zellen nach Impfung. (A) Repräsentative Dot Plots einer geimpften 23-jährigen gesunden Kontrollperson zu den Untersuchungszeitpunkten Woche 0, 1, 2 und 26 nach Influsplit (oben) und SEB (unten) Stimulation. Es ist die CD27 (y-Achse) gegen die IFN γ (x-Achse) Expression aufgetragen. Die Prozentpunkte geben den Anteil CD27⁺ Zellen an IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen an. (B) Gruppenvergleich der CD27 Expression auf Influenza-spezifischen (oben) und SEB-reaktiven CD4⁺ T-Zellen (unten) zwischen Kontrollen und Sportlern zu allen Untersuchungszeitpunkten. CD, Cluster of differentiation; IFN, Interferon; SEB, Staphylococcus aureus Enterotoxin B; w, Woche.

4.4 Veränderung des Zytokinprofils Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen von multifunktionellem zu einfach Zytokin-positivem Expressionsmuster

Zur weiteren funktionellen Beurteilung der Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, wurden über den Färbeansatz 1 (s. Tabelle 9) die von diesen Zellen produzierten Zytokine IFN γ , IL2 und TNF α quantitativ bestimmt. Es wurden die Anteile bestimmter Zytokinkombinationen an allen produzierenden Zellen aus den gemessenen Ergebnissen berechnet. Diese verschiedenen Profile wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachtet. In Abbildung 17A sind repräsentative Dot Plots der Zytokinexpression von CD4⁺ T-Zellen einer 20-jährigen Kontrollperson dargestellt. Verschiedene Kombinationen der Zytokine IL2, TNF α und IFN γ waren möglich, weshalb übergeordnet betrachtet die Zellen drei, zwei oder nur eines dieser Zytokine produzieren konnten. Vor Impfung dominierten bei Sportlern und Kontrollen die multifunktionellen Zellen mit der Fähigkeit zur simultanen Expression aller drei Zytokine (>45%, 3-fach positiv, Abb. 17B).

In Woche 1 nach Impfung stieg der Anteil einfach positiver zytokinexprimierender Zellen für Kontrollen und für Sportler auf jeweils mehr als das Doppelte, wohingegen der Anteil der multifunktionalen 3-fach positiven Zellen bei beiden Gruppen deutlich abnahm. Diese Veränderung im Expressionsprofil war in Woche 1 am stärksten ausgeprägt und in Woche 2 noch leicht verringert vorhanden. Bis zu Woche 26 stellte sich wieder das ursprüngliche multifunktionelle Expressionsmuster ein. Nach SEB Stimulation waren weder bei Sportlern noch bei Kontrollen Veränderungen im Zytokinexpressionmuster im Verlauf nach Impfung zu beobachten.

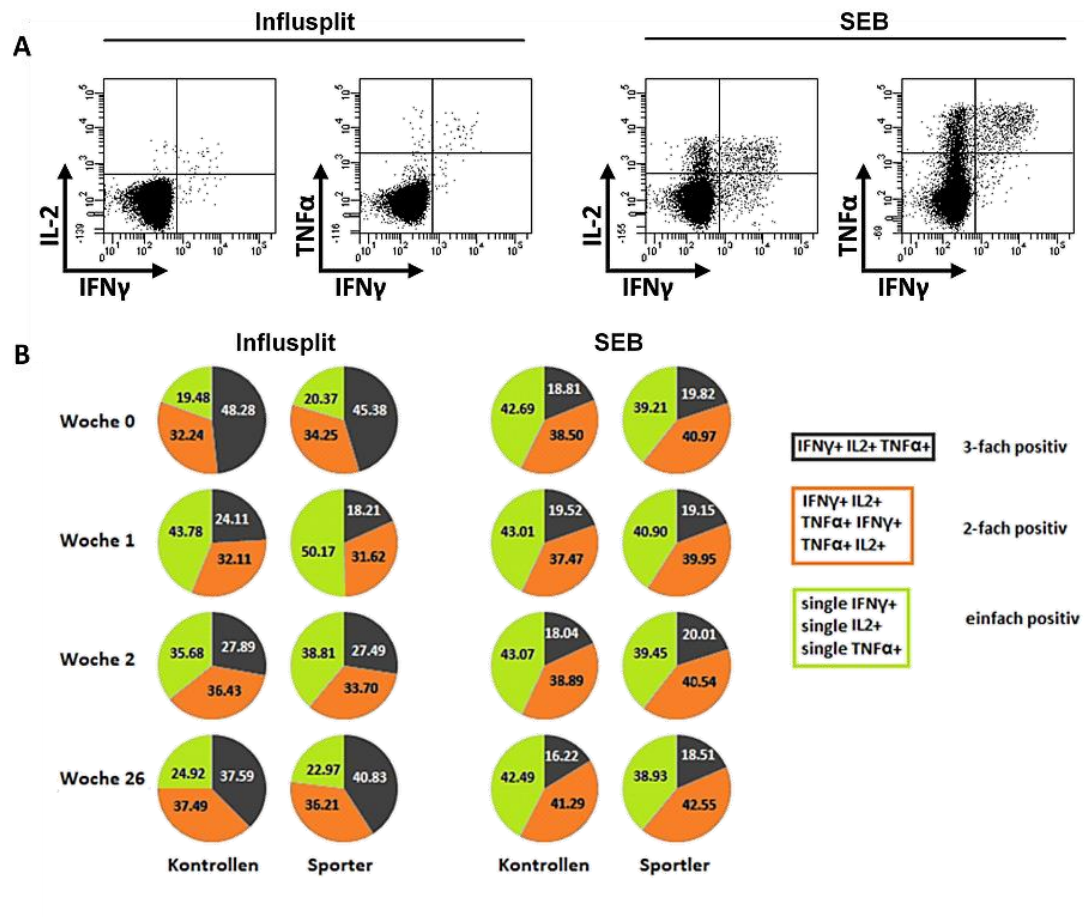


Abbildung 17: Impf-induzierte Veränderung der Zytokinexpression Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. (A) Repräsentative Dot Plots einer 20-Jährigen gesunden Kontrolle. Es ist die Expression der Zytokine IL2 und/oder IFN γ und/oder TNF α in verschiedenen Kombinationen jeweils nach Impfstoff und nach SEB Stimulation dargestellt. (B) Kuchendiagramme der 3-fach, 2-fach und einfach zytokinpositiven Zellen aller zytokinproduzierenden reaktiven CD4⁺ T-Zellen für Kontrollen (jeweils links) und Sportler (jeweils rechts) im zeitlichen Verlauf vor und nach Impfung. IL, Interleukin; IFN, Interferon; TNF, Tumornekrosefaktor; SEB, Staphylococcus aureus Enterotoxin B.

Exemplarisch wurden die prozentualen Veränderungen von reaktiven CD4⁺ T-Zellen separat analysiert und dargestellt, die lediglich IFN γ oder alle drei Zytokine produzierten, da bei diesen im Vergleich zu anderen Zytokinkombinationen die Veränderungen über die Zeit am deutlichsten ausgeprägt waren. Der jeweilige prozentuale Anteil an allen zytokinexprimierenden CD4⁺ T-Zellen wurde zwischen Sportlern und Kontrollen verglichen (Abb. 18).

Der Anteil IFN γ einfach-positiver Influenza-spezifischer Zellen stieg, wie bereits oben erwähnt, in beiden Gruppen nach der Impfung an und war in der ersten Woche nach Impfung in der Sportlergruppe höher ($p=0,020$).

Dies galt jedoch auch für SEB-reaktive CD4 $^+$ T-Zellen ($p=0,006$). Zum gleichen Zeitpunkt nahm der Anteil multifunktionaler IFN γ^+ TNF α^+ IL2 $^+$ produzierender Zellen ab und war bei den Influenza-spezifischen CD4 $^+$ T-Zellen der Sportler signifikant geringer als bei den Kontrollpersonen ($p=0,0096$). Für die SEB-reaktiven CD4 $^+$ T-Zellen konnte bezüglich des Anteils der multifunktionalen Zellen zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

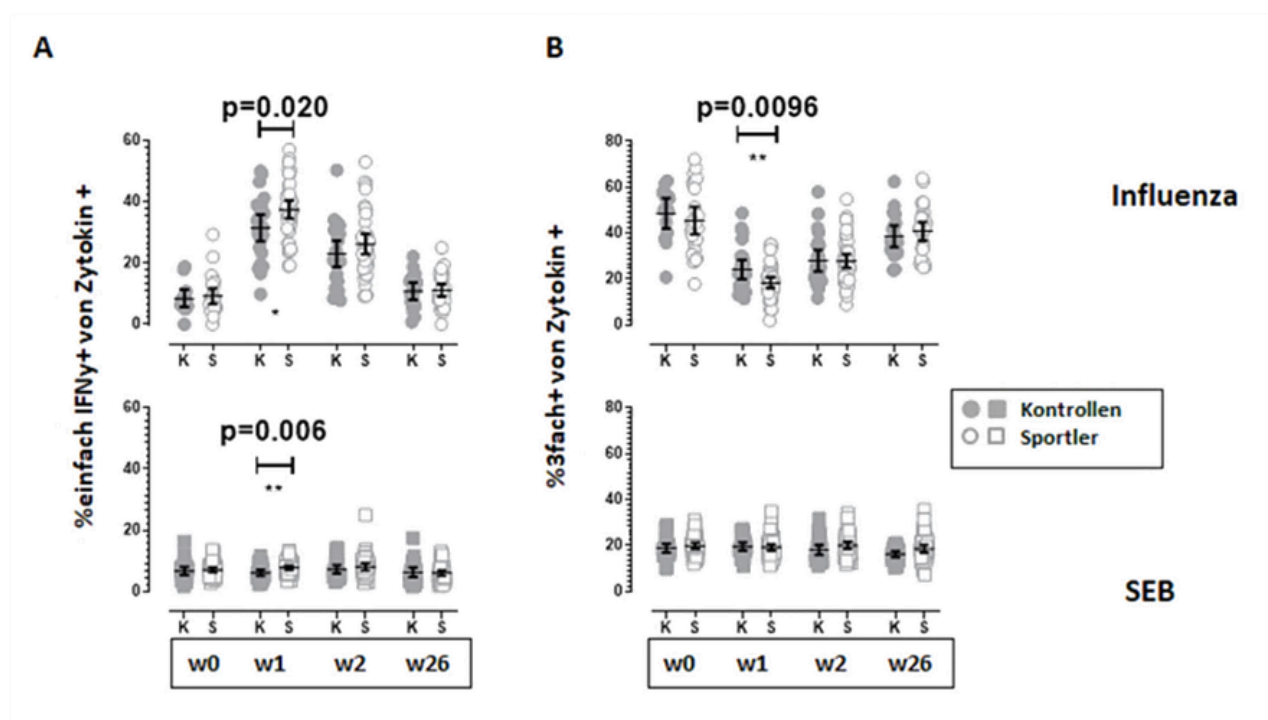


Abbildung 18: Signifikant stärkere Zunahme IFN γ einfachpositiver Zellen sowie signifikant stärkere Abnahme 3fach positiver Zellen unter allen zytokinpositiven Influenza-spezifischen CD4 $^+$ T-Zellen bei Sportlern eine Woche nach Impfung. Vergleich des Anteils einfach IFN γ^+ (A) und 3fach zytokinpositiver Zellen (B) zwischen Kontrollen (K) und Sportlern (S) in Woche 0 (w0), Woche 1 (w1), Woche 2 (w2) und Woche 26 (w26) nach Impfung. Influenza-spezifische CD4 $^+$ T-Zellen sind jeweils oben und SEB-reaktive T-Zellen jeweils unten dargestellt. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$). IFN, Interferon; K, Kontrollen; S, Sportler; SEB, Staphylococcus aureus Enterotoxin B; w, Woche.

4.5 Stabile Level T folliculärer Helferzellen und vergleichbare Expression von ICOS und PD1 von Sportlern und Kontrollpersonen auf diesem Zelltyp

Weitere Analysen befassten sich mit T folliculären Helferzellen (Tfh Zellen), einer Subpopulation der CD4 $^+$ Helferzellen innerhalb der CD3 $^+$ T Zellpopulation. Der quantitative Nachweis der Tfh Zellen erfolgte unabhängig von einer Stimulation über Expressionsmessung des Oberflächenmoleküls CXCR5 der CD4 $^+$ T-Zellen. Tfh Zellen waren somit charakterisiert als CD3 $^+$ CD4 $^+$ CXCR5 $^+$. Repräsentative Dot Plots verbildlichen diese Aufteilung (Abb. 19A).

Während CD4 $^+$ T-Zellen je nach Expression der Differenzierungsmarker CD45RO und CD27

naiven T-Zellen, Zentralen Gedächtnis T-Zellen („Central Memory T cells“, CM) oder „Effector memory“ T-Zellen (EM) zuzuordnen waren, waren Tfh Zellen aufgrund ihres überwiegenden CD45RO⁺CD27⁺-Phänotyps hauptsächlich Zentrale Gedächtnis T-Zellen. Zudem exprimierten sie zu größeren Anteilen die Oberflächenmoleküle ICOS und PD1 (Abb. 19A).

Die Frequenz der Tfh Zellen zeigte zu den verschiedenen Zeitpunkten keine deutlichen Veränderungen, dennoch konnte bei der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme des Anteils CXCR5⁺ CD4⁺ T-Zellen in der ersten Woche nach der Impfung nachgewiesen werden ($p=0,0023$). Bei den Sportlern konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. (Abb.19B).

Im zeitlichen Verlauf konnten bei den Kontrollpersonen signifikante Unterschiede im Anteil der CD45RO⁺CD27⁻ Tfh Zellen nachgewiesen werden, wohingegen bei den Sportlern der Anteil der CM T-Zellen und der naiven Tfh Zellen leicht verändert war (Abb. 19C). Dennoch war zu allen Zeitpunkten der überwiegende Teil der Tfh Zellen CD45RO⁺CD27⁺, sodass die Tfh Zellen jeweils durch den „central memory T cell“ (CM) Phänotyp dominiert wurden. Um die Anteile der verschiedenen Zellpopulationen zwischen Sportlern und Kontrollen zu vergleichen, wurden die einzelnen Werte zu allen Zeitpunkten einander gegenübergestellt. Trotz vereinzelter signifikanter Werte unterschied sich die Verteilung der Subpopulationen zwischen den Gruppen im Wesentlichen nicht (Daten nicht abgebildet). Dies verdeutlicht, dass Impf-induzierte Effekte weniger auf zirkulierenden Gesamtzellen, sondern vorwiegend auf spezifisch stimulierten Influenza-spezifischen T Zellen zu beobachten waren.

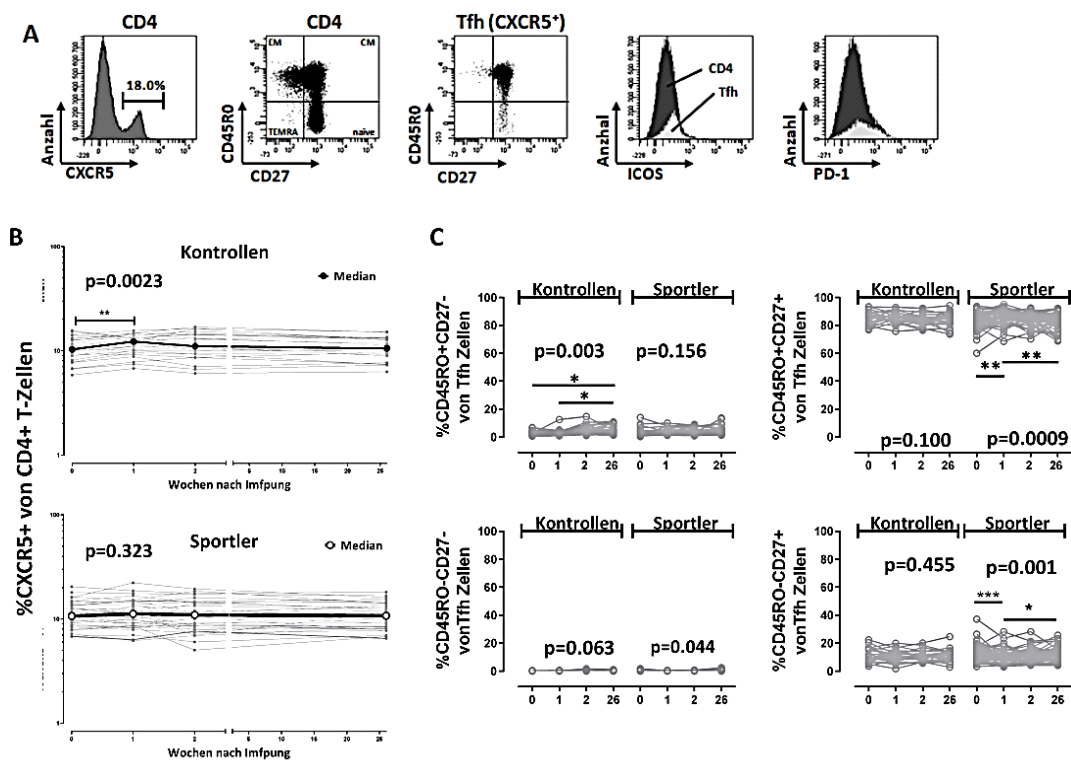


Abbildung 19: Charakteristischer Phänotyp und Differenzierungsstatus von Tfh-Zellen. (A) Dargestellt sind repräsentative Dot Plots und Histogramme CD4⁺ T-Zellen und Tfh Zellen. Tfh Zellen wurden innerhalb der CD4⁺ T-Zellen anhand der Expression von CXCR5 identifiziert. Entsprechend der Expression Oberflächenmoleküle CD27 und CD45R0 wurden CD4 und Tfh Zellen in naive, „central memory“ (CM), „effector memory“ (EM) und terminal differenzierte „effector memory“ (TEMRA) Zellen

unterteilt und zudem die Expression von ICOS und PD-1 analysiert. **(B)** Es sind die Verläufe der Frequenz der Tfh Zellen für Kontrollen (oben) und Sportler (unten) abgebildet. **(C)** Vergleich der Tfh-Subpopulationen EM (links oben), CM (rechts oben), TEMRA (links unten), naive (rechts unten) vor und im zeitlichen Verlauf nach der Impfung. Die x-Achse zeigt den zeitlichen Verlauf über 26 Wochen. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$). Die dicken Linien stellen die Verläufe der Mediane dar. EM, Effector memory; CM, Central memory; TEMRA, Effector memory RA; Tfh, T folliculäre Helferzelle; PD, Programmed death; ICOS, Inducible T-cell COStimulator; CXCR, CXC-Motiv-Chemokinrezeptor; CD, Cluster of differentiation.

Um die Expression von ICOS und PD-1 genauer zu analysieren, wurde die Expressionsdichte dieser Marker im Verlauf zwischen Kontrollen und Sportlern über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) verglichen. Hierbei zeigte sich, dass ICOS und PD-1 auf den Tfh Zellen von beiden Personengruppen gleich stark exprimiert wurden. Nur in Woche 2 und 26 erreichte die MFI von PD1 bei Sportlern ein signifikant höheres Niveau (Abb. 20).

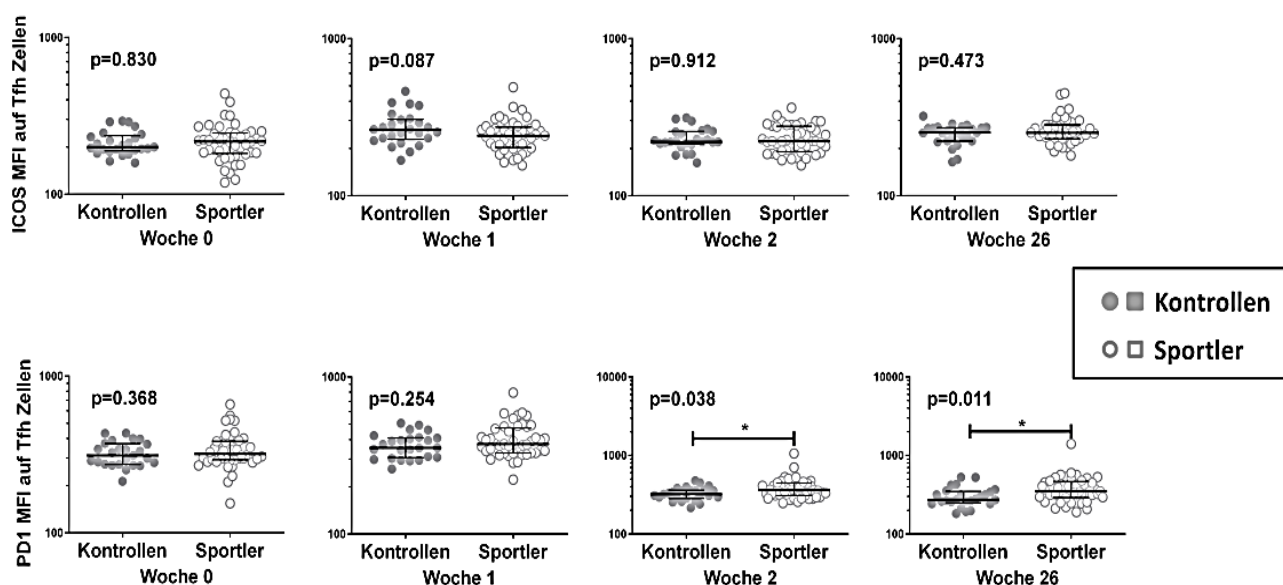


Abbildung 20: Ähnliche ICOS und PD-1 Expression auf Tfh Zellen bei Kontrollen und Sportlern. Vergleich der Expression von ICOS (oben) und PD1 (unten) auf Tfh Zellen zwischen Kontrollen und Sportlern. Es sind jeweils die vier Messzeitpunkte von Woche 0, 1, 2, 26 dargestellt. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$). ICOS, inducible T-cell COStimulator; PD, Programmed death; MFI, Mittlere Fluoreszenzintensität; Tfh, T folliculäre Helferzellen.

Ein weiterer funktioneller Aspekt der Tfh Zellen, der untersucht wurde, war die Produktion von Interleukin 21 (IL21). Die Expression dieses Zytokins, welches vorrangig von Tfh Zellen produziert wird, zeigte in beiden Gruppen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf (Abb. 21). Sowohl bei den Influenza-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen der Kontrollen als auch bei den Sportlern war 1-2 Wochen nach Impfung ein Anstieg der Frequenz IL21 positiver $CD4^+$ T-Zellen nachweisbar. Allerdings war sowohl bei den Influenza-spezifischen als auch bei den SEB-reaktiven Zellen der Anteil der IL21 positiven insgesamt sehr gering. Im Gruppenvergleich zwischen Sportlern und Kontrollen zeigte sich zudem über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg kein signifikanter Unterschied der IL21 Produktion nach der Stimulation mit dem Impfstoff (Daten nicht gezeigt).

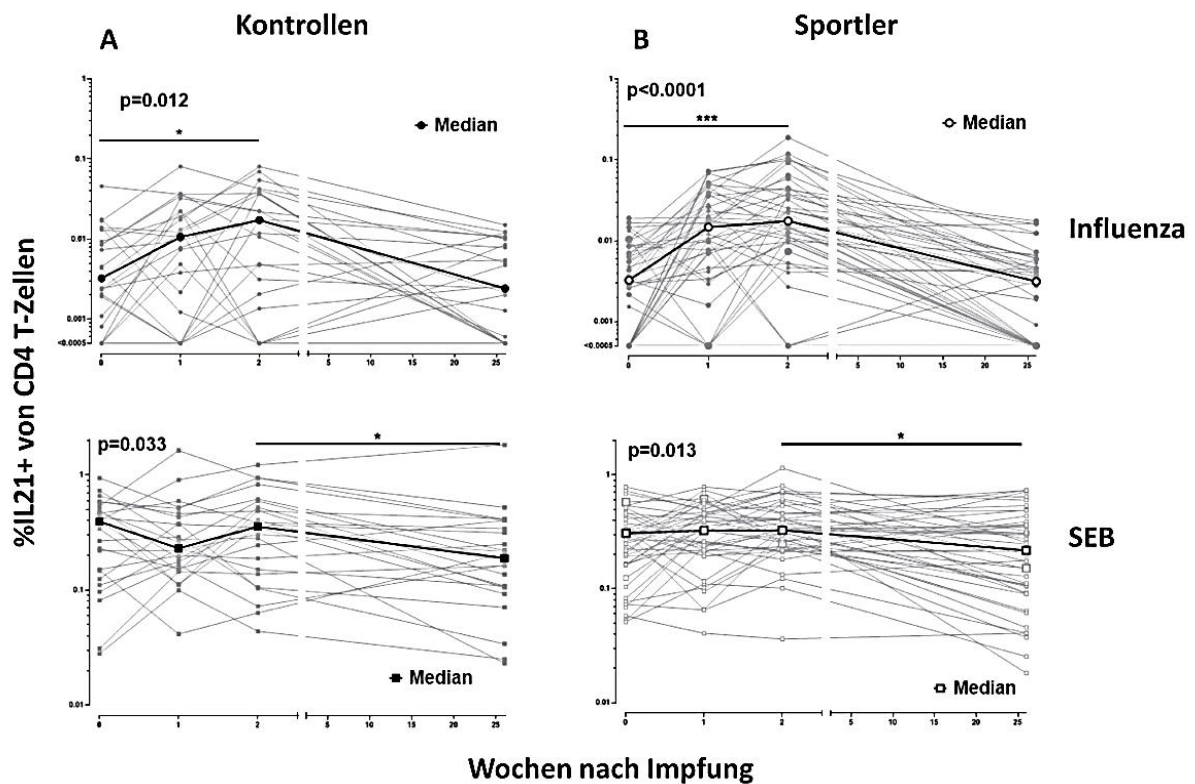


Abbildung 21: Signifikante Zunahme der IL21+ reaktiven CD4+ T-Zellen bei allgemein niedriger Gesamtzellzahl nach Impfung bei Kontrollen (A) und Sportlern (B). Dargestellt ist der Anteil IL21-positiver Influenza-spezifischer (oben) und SEB-reaktiver CD4+ T-Zellen im zeitlichen Verlauf vor und nach Influenza-Impfung von Kontrollprobanden und Sportlern. Die dicken Linien stellen die Verläufe der Mediane dar. IL, Interleukin; CD, Cluster of differentiation; SEB, Staphylococcus aureus Enterotoxin B.

4.6 Phänotyp und Differenzierungsstatus von B-Zellen und Induktion von Plasmablasten nach Influenza-Impfung

B-Zellen spielen vorrangig eine Rolle in der humoralen Abwehr und exprimieren CD19. Unter Durchführung einer Oberflächenfärbung wurden diese Zellen anhand der Expression von IgD, CD27 und CD38 detailliert analysiert. Es ließen sich naive (IgD^+CD27^-), „non-switched memory“ (IgD^+CD27^+) und „switched memory“ (IgD^-CD27^+) B-Zellen unterscheiden. Unter den „switched memory“ B-Zellen wurden zusätzlich Plasmablasten mittels hoher CD38 Expression identifiziert (Abb. 22A). Zu allen Messzeitpunkten dominierte der Anteil naiver B-Zellen, während der Anteil der „non-switched“ und „switched memory“ B-Zellen geringer war (Abb. 22B). Dieses Muster bestand in beiden Gruppen und es wurden zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und Sportlern gemessen (jeweils $p > 0,05$). Interessanterweise nahmen die $CD38^+$ Plasmablasten innerhalb der „switched memory“ Population eine Woche nach Impfung bei den Kontrollen und den Sportlern signifikant zu ($p=0,002$; $p<0,0001$; Abb. 22C).

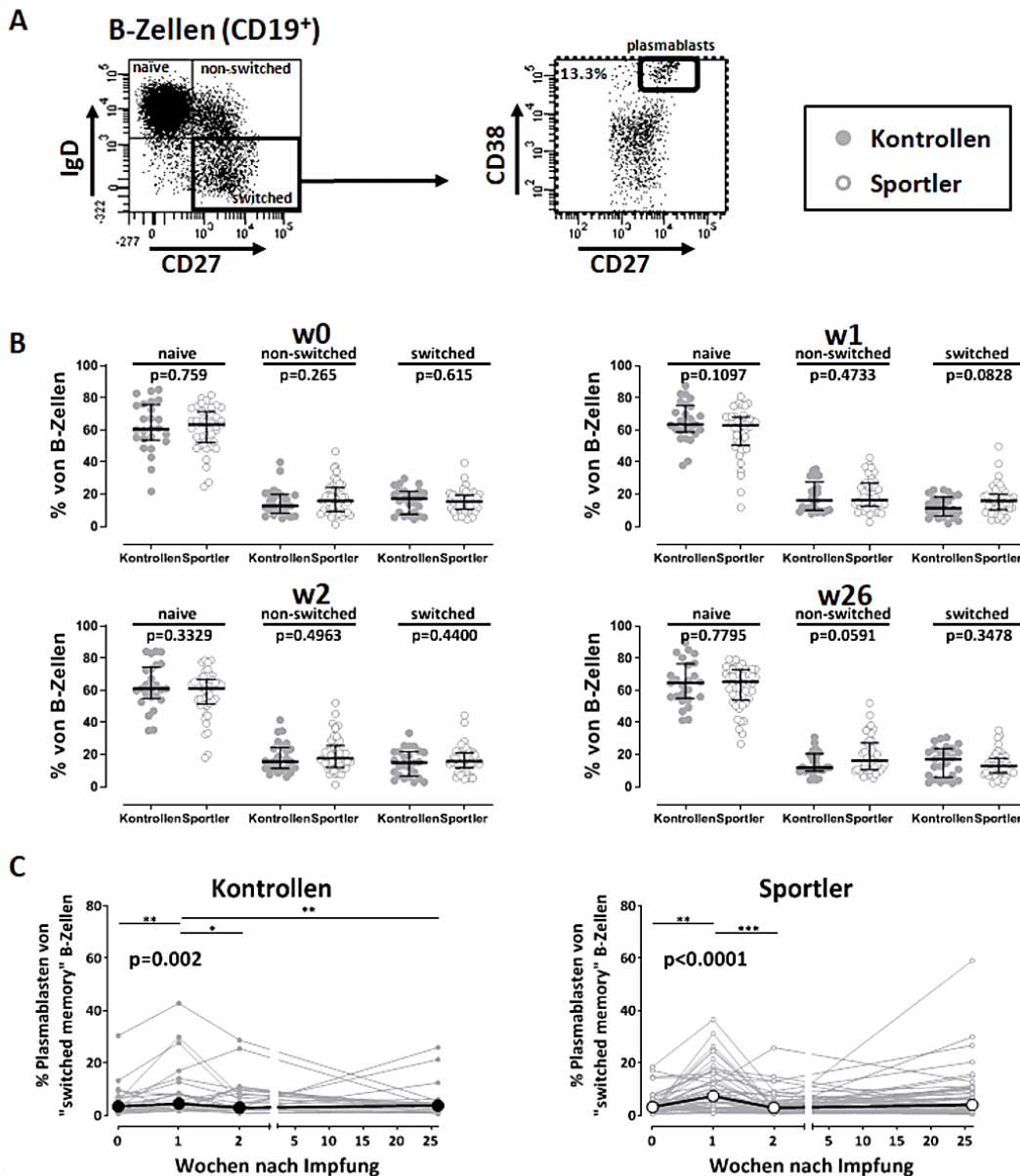


Abbildung 22: Phänotyp und Differenzierungsstatus von B-Zellen und Induktion von Plasmablasten im zeitlichen Verlauf nach Influenza-Impfung. (A) Dargestellt sind zwei charakteristische Dot Plots der B-Zellanalyse. Links wird die Einteilung in naive, „non-switched memory“ und „switched memory“ B-Zellen mittels CD27 (x-Achse) und IgD (y-Achse) dargestellt. Im rechten Dot Plot ist die Identifikation der Plasmablasten unter „switched memory“ anhand der hohen Expression von CD38 dargestellt. (B) Vergleich der B-Zellsubpopulationen in Kontrollen (ausgefüllte Symbole) und Sportlern (offene Symbole) zu den vier Untersuchungszeitpunkten (w0, w1, w2, w26). (C) Abgebildet sind die prozentualen Anteile der Plasmablasten innerhalb der „switched memory“ B-Zellen im zeitlichen Verlauf vor und nach Impfung. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$). Die dicken Linien stellen die Verläufe der Mediane dar. IgD, Immunglobulin D; CD, Cluster of differentiation; w, Wochen.

4.7 Induktion Influenza-spezifischer Antikörper nach Impfung

Ein wichtiger Teil der humoralen Immunabwehr sind Antikörper. In dieser Studie wurden die Level der Influenza-spezifischen Antikörperklassen IgM, IgG und IgA mittels ELISA gemessen und zwischen Kontrollen und Sportlern verglichen. Alle Influenza-spezifischen Antikörper-Level zeigten sowohl für Sportler als auch für Kontrollen einen signifikanten Anstieg eine

Woche nach Impfung und verhielten sich in Woche 2 bis 26 rückläufig ($p < 0.0001$, Abb. 23A). Die Ausprägung dieses Anstiegs war für IgM am größten. Zudem lagen die IgM Level der Sportler allgemein niedriger. Um den Impf-induzierten Anstieg der Influenza-spezifischen Antikörper-Level zwischen den Gruppen nach einer und nach 2 Wochen vergleichen zu können, wurde, wie oben bereits für die Frequenz der spezifischen CD4⁺ T-Zellen und für die CTLA-4 MFI durchgeführt, der Anstieg gegenüber dem Wert vor Impfung als relatives Maß berechnet. Hier zeigte sich, dass für keine Antikörperklasse ein Unterschied in der Ausprägung des Anstiegs zwischen Sportlern und Kontrollen von Woche 1 bzw. Woche 2 im Vergleich zu Woche 0 bestand (jeweils $p > 0,05$; Abb. 23B).

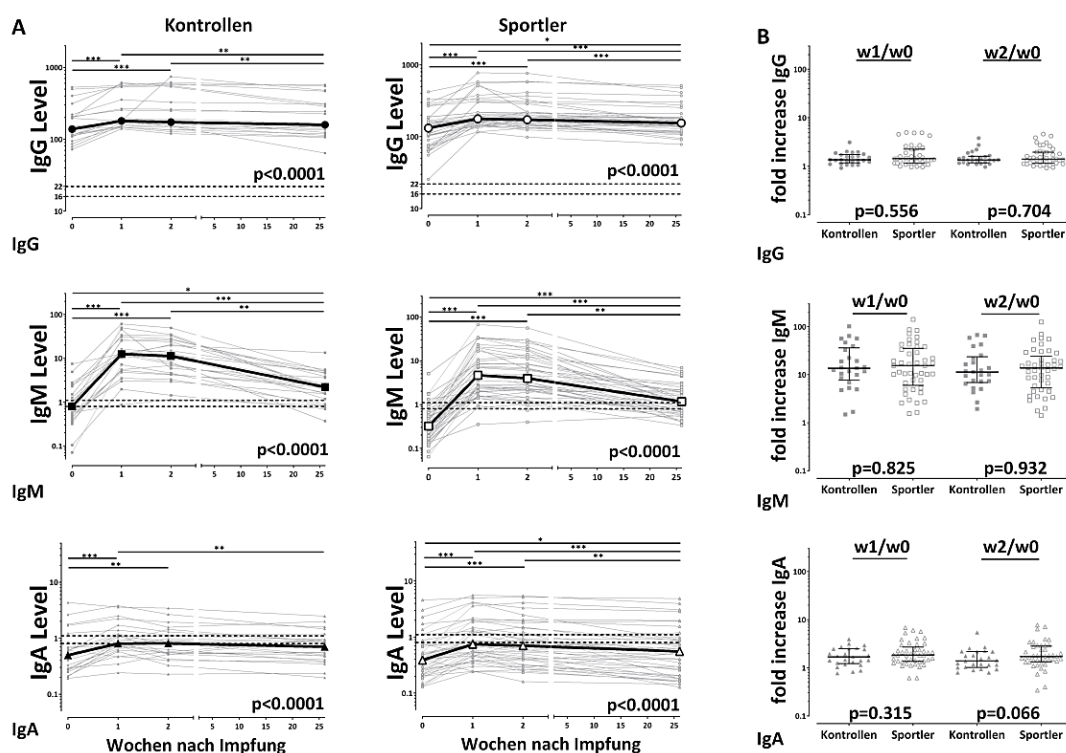


Abbildung 23: Signifikante Induktion der Influenza-spezifischen Antikörperlevel nach Impfung mit stärkster Ausprägung bei Antikörpern der Klasse IgM. (A) Verlauf der Influenza-spezifischen Antikörperlevel der Klassen IgG, IgM und IgA bei Kontrollen und Sportlern über den Zeitraum der Studie. Die gepunkteten Linien repräsentieren die jeweiligen Nachweisgrenzen **(B)** Abgebildet sind die „fold increases“ von Woche 1 (w1/w0) bzw. Woche 2 (w2/w0) jeweils zu Woche 0 für die Influenza-spezifischen IgG-, IgM- und IgA-Antikörperlevel im Vergleich zwischen Kontrollen und Sportlern. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$). Die dicken Linien stellen die Verläufe der Mediane dar. Ig, Immunglobulin; w, Woche.

4.8 Impf-induzierte Zunahme der neutralisierenden Antikörper gegen die Influenza Stämme H1N1, H3N2, Brisbane und Phuket

Die Funktionalität der humoralen Abwehr wurde in dieser Studie über den Nachweis neutralisierender Antikörper durchgeführt. Es wurden die Serumverdünnungen (Titer) bestimmt, bei denen im Neutralisationstest 75% der Influenzastämme H1N1, H3N2, Brisbane und Phuket neutralisiert wurden (IC75). Im zeitlichen Verlauf nach der Impfung nahm die IC75 in beiden Gruppen und für alle vier Virusstämme signifikant zu (jeweils $p < 0,0001$). Die

höchsten Titer wurden durchgehend für H1N1 erreicht, wohingegen die niedrigsten Titer für den Influenzastamm Phuket nachgewiesen wurden (Abb. 24).

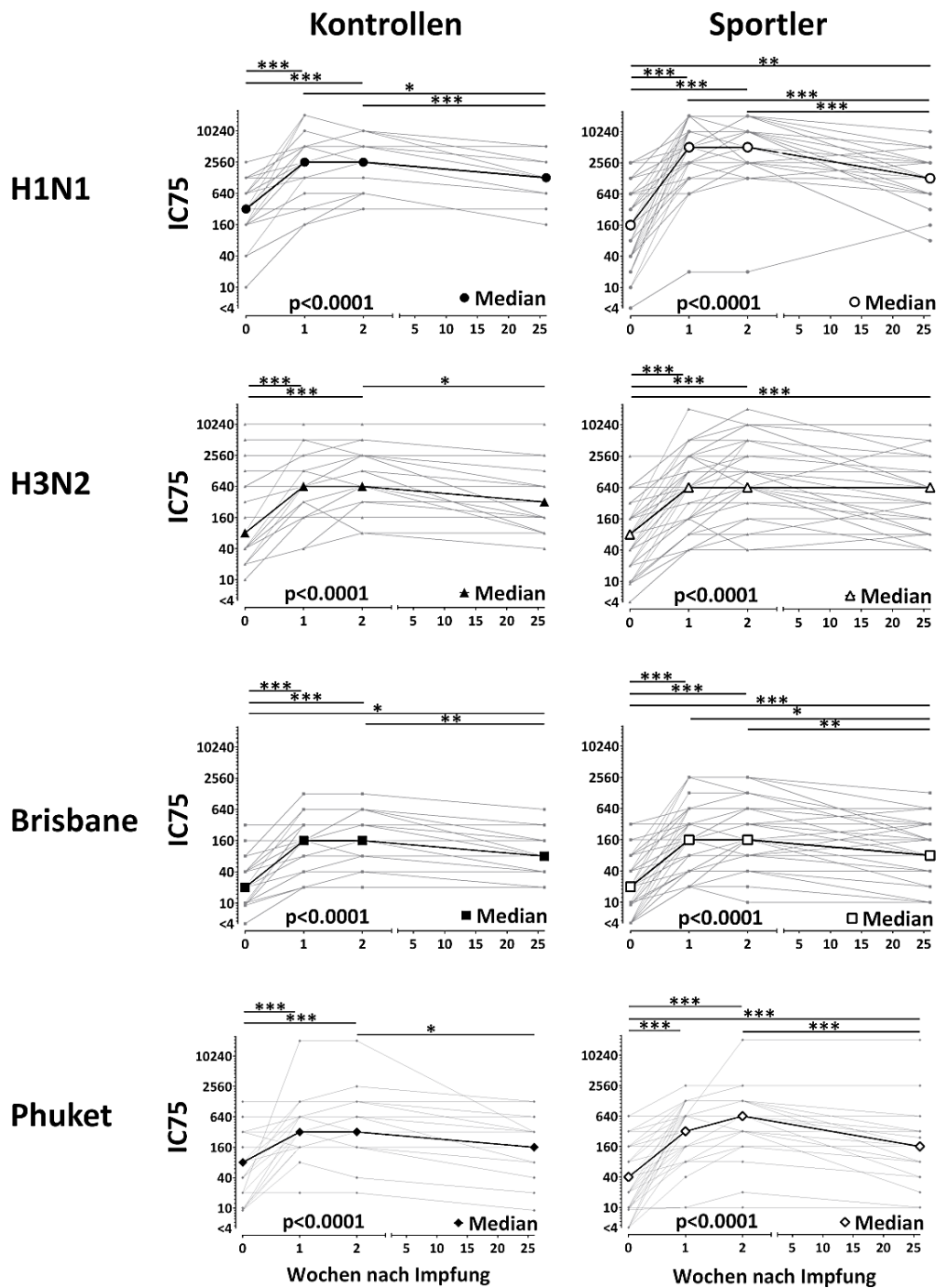


Abbildung 24: Deutliche Induktion neutralisierender Antikörpertiter gegen H1N1, H3N2, Brisbane und Phuket bei Kontrollen und Sportlern im Verlauf nach Influenza-Impfung. Dargestellt sind die Serumverdünnungen der Kontrollen (links) und Sportler (rechts) die zum jeweiligen Messzeitpunkt im Vergleich zum Kontrollansatz eine Reduktion der Infektion der Zellen durch die Influenzastämme H1N1, H3N2, Brisbane bzw. Phuket um 75% (IC75) verursachen. Signifikanzen werden mittels Sternchen angegeben (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$). Die dicken Linien stellen die Verläufe der Mediane dar. IC, inhibitory concentration; H, Hämagglutinin; N, Neuraminidase.

Um das Ausmaß der Induktion der neutralisierenden Antikörper-Titer zwischen den Probanden-Gruppen vergleichen zu können, wurden die Serumverdünnungen in Woche 1, 2

bzw. 26 mit denen in Woche 0 ins Verhältnis gesetzt und diese Verhältnisse zwischen beiden Gruppen verglichen. Der Anstieg der H1N1-Antikörpertiter war nach einer Woche bei den Sportlern signifikant höher als bei den Kontrollen ($p=0,003$; Abb. 25). Für die restlichen Stämme gab es zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede. Der Vergleich von Woche 2 bzw. 26 zu Woche 0 zeigte sowohl für H1N1 ($w2/w0$, $p=0,004$; $w26/w0$, $p=0,006$) als auch für H3N2 ($w2/w0$, $p=0,032$; $w26/w0$, $p=0,004$) signifikant höhere Anstiege bei den Sportlern, wohingegen die Induktion der neutralisierenden Antikörper gegen Brisbane und Phuket in beiden Gruppen erneut gleich stark ausgeprägt war.

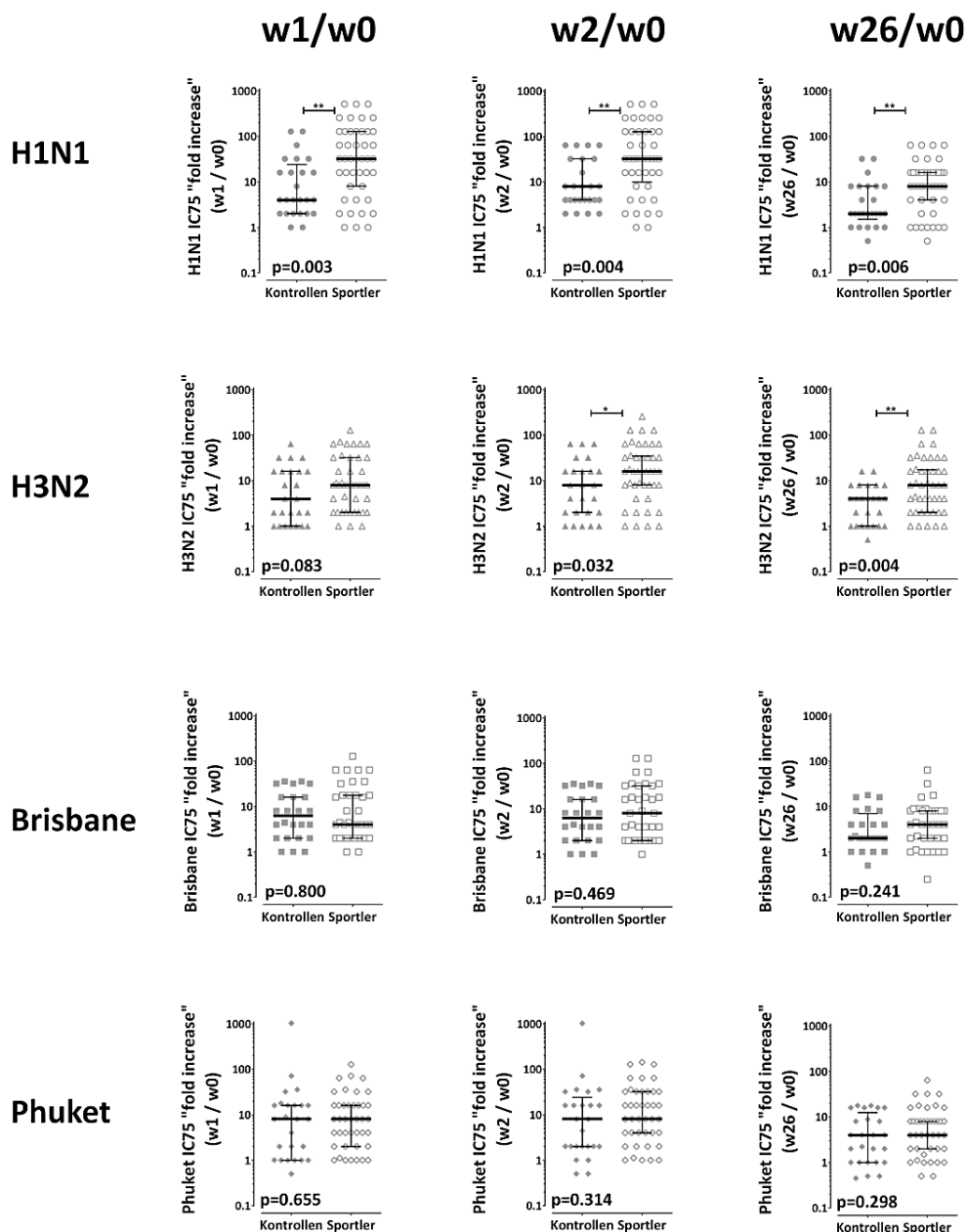


Abbildung 25: Signifikant höhere Induktion neutralisierender Influenza-spezifischer Antikörper gegen H1N1 und H3N2 bei Sportlern im Vergleich zu Kontrollen. Dargestellt ist jeweils der „fold increase“ der neutralisierenden Antikörpertiter von Kontrollen und Sportlern von Woche 1, 2 bzw. 26 im Vergleich zum Ausgangswert (Woche 0). Signifikanzen zwischen Kontrollen und Sportlern werden mittels Sternchen angegeben (* für $p<0,05$, ** für $p<0,01$, *** für $p<0,001$). IC, inhibitory concentration; H, Hämagglutinin; N, Neuraminidase; w, Woche.

4.9 Geringe Ausprägung von Nebenwirkungen der saisonalen Influenza-Impfung bei Kontrollen und Sportlern

Mittels Fragebögen wurden im Verlauf der ersten Woche nach Impfung die Nebenwirkungen der Impfung sowie potenzielle Einschränkungen im Training erhoben. Diese Daten wurden durch die Probanden dokumentiert. Die Daten der Sportler wurden von Clemens Ziller (Saarbrücken) erhoben und die Unterschiede zwischen Sportlern und Kontrollen wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet.

Die Evaluation der lokalen Nebenwirkungen, d.h. die Schmerzintensität an der Injektionsstelle und deren Dauer zeigte, dass 48% der Kontrollen und 27% der Sportler keine Schmerzen hatten, wohingegen 52% der Kontrollen und 66% der Sportler lediglich moderate Schmerzen (Grad 1-2) und nur 7% der Sportler stärkere Schmerzen (Grad 3) angaben. Somit war die Schmerzintensität eher mild und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und Sportlern ($p=0,119$; Abb. 26A). Die Dauer des Schmerzes an der Injektionsstelle war insgesamt auf wenige Tage begrenzt (Abb. 26B). So hielten die Schmerzen bei 16% der Kontrollen maximal 3 Tage und bei 33% der Sportler 3 bis 4 Tage an. 36% der Kontrollen und 40% der Sportler berichteten hingegen eine Schmerzdauer von lediglich 1 bis 2 Tagen. Die restlichen Probanden gaben wie bereits erwähnt keine Schmerzen an. Auch für die Dauer der Schmerzen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p=0,202$). Systemische Nebenwirkungen, wie Kopfschmerzen und erhöhte Temperaturen traten in beiden Gruppen gleich häufig auf. Eine Kontrollperson und ein Sportler entwickelten Fieber über $38,5^{\circ}\text{C}$ für einen Tag und bei einem Sportler kam es zu einer Schwellung einer Brustwarze. Zu beachten ist, dass es nach der Impfung bei keinem der Sportler zu zeitlichen Trainingsausfällen kam und nur ein Sportler zeitweise die Sportart im Training von Schwimmen auf Fahrradfahren umstellen musste. Insgesamt sind die Nebenwirkungen der saisonalen Influenza-Impfung bei Sportlern somit von vergleichbarer geringer Intensität und Dauer wie bei den Kontrollpersonen.

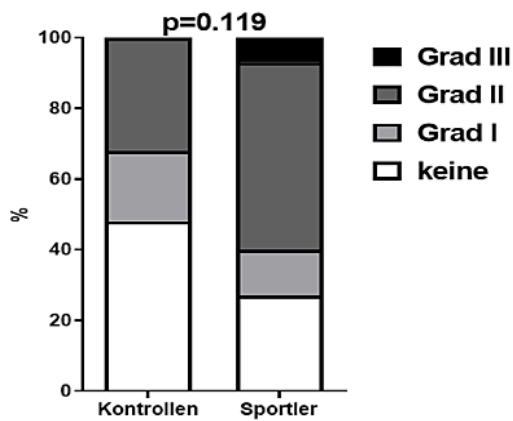
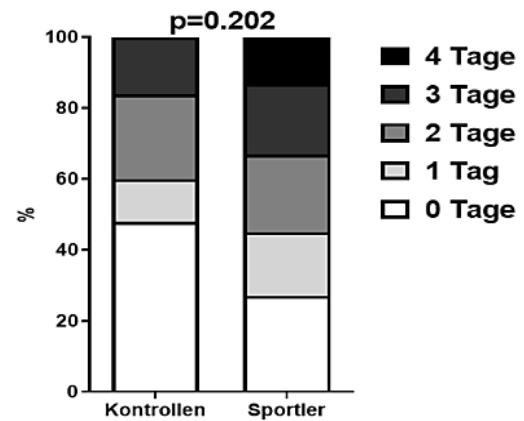
A**Maximale Schmerzintensität****B****Schmerzdauer**

Abbildung 26: Milde Nebenwirkungen nach Influenzaimpfung und keine Unterschiede in der Ausprägung bei Kontrollen und Sportlern. (A) Maximale Schmerzintensität an der Impfstelle bei Kontrollen und Sportlern. Diese waren unterteilt in „keine“, „Grad I“ (Schmerzen bei Berührung der Injektionsstelle), „Grad II“ (Schmerzen bei Bewegung des Arms) und „Grad III“ (Schmerzen ohne jedwede Provokation), (B) Schmerzdauer an der Impfstelle für beide Gruppen. Die Maximale Schmerzdauer betrug 4 Tage. Die y-Achsen geben die prozentuale Verteilung von Schmerzintensität bzw. -dauer innerhalb der Kontrollen bzw. Sportler an.

5 Diskussion

5.1 Stärkere zelluläre und humorale Impfreaktion bei Leistungssportlern

Leistungssportler würden generell in besonderem Maße von einer Influenza Impfung profitieren (Gärtner and Meyer 2014; Trabacchi et al. 2015). Dennoch bestehen Vorbehalte unter Sportlern und Trainern, dass die Impfung weniger effizient sei und zu einer Einschränkung in der Leistungsfähigkeit führen könnte. Es existieren bereits mehrere Studien zu Veränderungen der Immunabwehr nach intensivem Training (Nieman and Pedersen 1999), allerdings sind Auswirkungen des Trainings auf die durch Impfung induzierte Immunreaktion bisher nur wenig untersucht worden. Dies könnte daran liegen, dass die körperliche Belastung durch das Training und strikte Wettkampfzeiten die Auswahl eines geeigneten Zeitpunkts der Impfung verkomplizieren können. Eine Impfung innerhalb einer Trainings- bzw. Wettkampfphase müsste zum Beispiel kurz nach dem Wettkampf appliziert werden, um eine möglichst lange Ruhephase bis zum nächsten Wettkampf zu ermöglichen (Gärtner and Meyer 2014). Die Dynamik Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nach Impfung von Leistungssportlern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen war ebenfalls bislang nur unzureichend erforscht.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass der Anteil Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen eine Woche nach Impfung sowohl bei Leistungssportlern als auch bei Kontrollen signifikant zunahm. Dieser Anstieg fiel bei Sportlern signifikant stärker aus als bei Kontrollen. Da diese Zellen eine entscheidende Rolle in der Produktion hochaffiner Antikörper, der Expansion, Differenzierung und Expansion von CD8⁺ T-Zellen und auch in der Unterstützung der frühen angeborenen Immunabwehr spielen (Sant, Richards, and Nayak 2018), ergeben unsere Ergebnisse keinen Hinweis auf ein beeinträchtigte Impfantwort bei Leistungssportlern. Im Tiermodell zeigte sich ein vergleichbares Resultat bereits nach Impfung von moderat aktiven Mäusen (Rogers et al. 2008). Unsere Ergebnisse unterstützen folglich Hinweise, dass regelmäßiges Training die Immunität des Körpers nach Impfung verstärkt (Campbell and Turner 2018). Man könnte argumentieren, dass die deutlichere Induktion der Immunität bei Leistungssportlern durch die enge zeitliche Assoziation der Probengewinnung zur körperlichen Aktivität zustande gekommen ist und somit einen generellen Einfluss auf die Erhöhung der Funktionalität der Zellen ausgeübt hat. Allerdings waren die beobachteten Effekte spezifisch für das Influenza Vakzin und nicht nach polyklonaler Stimulation mit SEB messbar.

Unabhängig von einer Impfung lieferten andere Studien gegensätzliche Ergebnisse zur Auswirkung des sportlichen Trainings auf Lymphozytenpopulationen. So wurden nach intensiver körperlicher Betätigung nach einem initialen Anstieg der Gesamt CD4⁺ T-Zellen letztlich verringerte Zellzahlen nachwiesen (Shaw et al. 2018). Diese Resultate bezogen sich jedoch immer auf alle T-Zellen und nicht, wie in unserer Studie, auf eine gegen ein spezifisches Antigen wie Influenza gerichtete T Zell-Antwort. Bei Untersuchungen an Marathonläufern wurden proinflammatorische IFN γ produzierende T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) und

antiinflammatorische IL-4 produzierende T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2) charakterisiert. Im Vergleich zu Kontrollen war die Anzahl der Th1-Zellen bei Marathonläufern verringert, wohingegen die Th2-Zellzahl erhöht war (Rehm, Sunesara, and Marshall 2015). Hierauf basieren Überlegungen einer durch Sport vermittelten Immunsuppression, welche eine adäquate Immunantwort auf Infektionen verringern könnte (Gleeson 2006; Peake et al. 2017; Shaw et al. 2018). All diese Veränderungen wurden allerdings unmittelbar nach akuter Belastung gemessen, sodass die Langzeitwirkung auf das Immunsystem nicht beurteilt werden kann. Der lange Untersuchungszeitraum und die Wahl von Leistungssportlern in unserer Studie erlaubt hingegen Rückschlüsse auf den Einfluss kontinuierlichen Trainings und ist nicht auf eine einmalige sportliche Belastung beschränkt. Neuere Untersuchungen geben außerdem Hinweise darauf, dass die zellulären Veränderungen nach körperlicher Aktivität mit einer Mobilisierung der Immunzellen in periphere Gewebe zusammenhängt und einer verbesserten Immunüberwachung dient (Campbell et al. 2009; Campbell and Turner 2018). Die genauen Mechanismen sind beim Menschen bisher nicht ausreichend untersucht und konnten bisher nur im Tiermodell studiert werden. Zum einen zeigte vor allem zeitlich moderates Training im Vergleich zu keinem und langem Training eine Verringerung der Mortalität von Mäusen nach Influenza Infektion (Lowder, Padgett, and Woods 2005). In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die durch körperliches Training induzierte Mobilisierung von T-Zellen in periphere Gewebe, im Anschluss eine Freisetzung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in den Kreislauf bewirkte (Kruger et al. 2008; Mooren and Kruger 2015). Eine Mobilisierung der T-Zellen in Peyersche Plaques und Lungengewebe könnte eine optimierte Immunabwehr in diesen wichtigen Abwehrfronten des Körpers erzeugen (Kruger et al. 2008). Allerdings wurde dieser Effekt akuter körperlicher Belastung nur bei untrainierten Mäusen beobachtet, wohingegen bei Versuchstieren, die über mehrere Wochen körperliches Training absolvierten, keine signifikante Mobilisierung von Immunvorläuferzellen gemessen werden konnte (Kruger et al. 2008; Mooren and Kruger 2015).

Eine stärkere Induktion der Influenza-spezifischen Immunantwort in der Gruppe der Leistungssportler könnte auf einen höheren Anteil an Probanden ohne vorbestehende Immunität zurückzuführen sein. So zeigten Hämodialyse Patienten mit urämischer Immundefizienz in zwei aufeinanderfolgenden Influenzaimpfsaisons eine gleich starke Induktion spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Bei gesunden Kontrollpersonen hingegen folgte nach der zweiten Influenzaimpfung ein weniger starker Anstieg, was bei der Folgeimpfung auf eine bessere Aufrechterhaltung eines immunologischen Gedächtnisses bei Kontrollpersonen im Vergleich zu Hämodialyse Patienten zurückgeführt werden konnte. Dies könnte eine Ursache für rezidivierende Infektionserkrankungen bei diesen Patienten darstellen (Sester et al. 2013). In der hier vorliegenden Studie ergab sich jedoch kein Hinweis für eine geringere vorbestehende Immunität, da der Anteil an bereits in der Vergangenheit mit Influenza

geimpften Probanden in beiden Gruppen gering war und sich nicht in den Gruppen unterschied. Zudem war der Anteil vorbestehender Influenza-spezifischer T Zellen und neutralisierender Antikörper in beiden Gruppen gleich.

Diese vorbestehende Immunität wurde schon in anderen Studien zu Influenza nachgewiesen und der Kreuzreaktivität mit anderen Influenza Stämmen und Pathogenen zugeschrieben, mit denen das Immunsystem in vorherigen Influenzasaisons konfrontiert wurde (Altenburg, Rimmelzwaan, and de Vries 2015; Schmidt et al. 2012).

In der Einleitung wurde bereits die „open window“ Theorie erwähnt, die eine Vulnerabilität des Immunsystems von Sportlern nach intensivem Training bezüglich Infektionserkrankungen postuliert (Gleeson 2006). Diese vermutete Immundefizienz könnte im Kontext einer Impfung, vergleichbar mit der der Hämodialyse Patienten, die stärkere Induktion der Influenza-spezifischen Immunantwort bei Sportlern zur Folge haben. Da die beschriebene Vulnerabilität des Immunsystems bei Sportlern jedoch vorrangig auf der Abnahme der absoluten NK Zellzahlen und der verringerten phagozytischen Neutrophilenfunktion beruht und in einer Studie ein Anstieg der CD4 Zellzahlen nach 4 bis 6 Stunden im Anschluss an intensives Ausdauertraining nachgewiesen werden konnte (Kakanis et al. 2010), erscheint ein mangelhaftes zelluläres Immungedächtnis auf Basis dieser Vulnerabilitätstheorie eher unwahrscheinlich. Eine potenzielle Immunschwäche wurde außerdem bereits in einer anderen Studie an Triathleten untersucht. Anhand dieser Gruppe von Sportlern, die unmittelbar einen Probewettkampf bestritt, konnten Auswirkungen der akuten körperlichen Belastung auf die zelluläre Immunität nach einer Diphtherie-, Tetanus- und Pneumokokkenimpfung gezeigt werden. Kontrollgruppen waren zum einen Triathleten, die ihr normales Training fortführten, aber nicht am Wettkampf teilnahmen und gesunde moderat trainierte Männer. Die Impfung wurde 30 Minuten nach Beendigung des Wettkampfs durchgeführt. Es wurde ein Hauttest durchgeführt, bei dem die Induration der Haut auf die Impfantigene nach Applikation unterschiedlicher Toxoide, sowie bakterieller und mykotischer Antigene gemessen wurde. Die Triathleten, die unmittelbar belastet wurden, zeigten eine geringere Reaktion auf einen Hauttest als die Männer der beiden anderen Gruppen. Antikörper nach Diphtherie-, Tetanus- und Pneumokokkenimpfung, die nach zwei Wochen gemessen wurden, waren allerdings in allen drei Gruppen in vergleichbarem Niveau angestiegen (Bruunsgaard et al. 1997). Langfristig stellte die körperliche Betätigung somit keinen einschränkenden Faktor dar. Die initial geschwächte Hautreaktion mag auf die unspezifische Immunabwehr durch NK Zellen und Neutrophile, die bei akuter Belastung reduziert sind, zurückzuführen sein. Möglich wäre allerdings auch, dass erst eine Erholungsphase dem Immunsystem ermöglicht, adäquat auf die präsentierten Antigene zu reagieren (Bruunsgaard et al. 1997). Eine langfristig geschwächte zelluläre Immunabwehr und ein eingeschränktes Immungedächtnis durch akuten und kontinuierlichen Leistungssport kann somit nicht belegt werden. Allerdings wurde kein Vergleich zu untrainierten Kontrollpersonen angestellt, wie wir es in unserer Studie

vorgenommen haben.

Die oben erwähnten Antikörperlevel wurden in unserer Studie quantitativ und qualitativ mittels Hämagglutinationshemmtests und Neutralisationsverfahren nachgewiesen. Eine höhere Sensitivität bezüglich der Serumantikörperdetektion wurde für das Neutralisationsverfahren nachgewiesen (Verschoor et al. 2015). Darüber hinaus wurde nahegelegt, dass dieses eine exaktere Bewertung der impfinduzierten Immunität ermöglicht und die Einschätzung der schützenden Wirksamkeit gegen PCR-bestätigte Infektionen höher ausfiel (Cheng et al. 2012; Nunes et al. 2018; Verschoor et al. 2015). In unserer Arbeit zeigten die Antikörperlevel für beide Verfahren eine und zwei Wochen nach der Influenza-Impfung in beiden Gruppen ein deutlich erhöhtes Niveau im Vergleich zum Ausgangswert. Die signifikant höheren Anstiege in der Gruppe der Leistungssportler sind vereinbar mit anderen Studien, die den Einfluss von körperlichem Training als eine Art Adjuvans auf die humorale Immunabwehr nach Meningokokken Impfung untersucht haben (Pascoe, Fiatarone Singh, and Edwards 2014). In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass akute sportliche Betätigung ähnlich zu mentalem Stress den Anstieg der Meningokokken A IgG Level nach der Impfung vergrößert. Dieser Effekt wurde nur bei Männern beobachtet. In Gegensatz zu unserer Studie waren die Studienteilnehmer hier jedoch keine Leistungssportler, sondern durchschnittlich trainierte und gesunde Probanden, welche an einem Training auf dem Fahrradergometer teilnahmen (Edwards et al. 2008). In einer anderen Studie wurde, ebenfalls bei Nicht-Leistungssportlern, die Auswirkung von akutem Krafttraining des Musculus Deltoideus und Musculus Biceps brachii sechs Stunden vor Influenza Impfung auf die humorale Immunabwehr untersucht. Die Anti-Influenza Antikörpertiter stiegen hierdurch bei Frauen, die die körperliche Belastung durchführten, im Vergleich zu den Kontrollen ohne Belastung stärker an. Bei Männern war dieser Effekt nicht zu sehen. Allerdings wurde bei Männern nach Krafttraining im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte IFN γ Antwort nach antigen-spezifischer in-vitro Stimulation als Ausdruck der zellulären Immunabwehr gemessen (Edwards et al. 2007). Die signifikant höhere Antikörpertiterinduktion nach Influenza Impfung wurde auch in einer anderen Studie festgestellt. Hier wurden die Probanden, bei denen es sich erneut nicht um Leistungssportler handelte, entweder einem körperlichen Training, mentalem Stress oder einer Ruhephase ausgesetzt. Eine höhere Antikörperinduktion wurde in der Frauengruppe zwischen Stressgruppe (mental oder körperlich) und Kontrollgruppe gemessen. In der Männergruppe war die Antikörpertiterinduktion in allen drei Untergruppen gleich stark. (Edwards et al. 2006). In einer Studie zur Pneumokokkenimpfung bei jungen gesunden Probanden zeigte akutes Training vor Impfung einen adjuvanten Effekt auf die humorale Immunität einen Monat nach Impfung vor allem für trainierende Probanden, die nur die halbe Impfdosis erhielten. Bei voller Dosis war dieser Effekt nicht zu beobachten (Edwards et al. 2012). Es wird diskutiert, ob dieser adjuvante Effekt auf einer Schädigung von Muskelfasern beruhen könnte, welcher eine Entzündungsreaktion zur Folge hat (Sorichter, Puschendorf, and Mair 1999). Diese

Entzündungsreaktion könnte zum einen die Antigen Aufnahme und Prozessierung im Lymphknoten verbessern oder auch Lymphozyten an die Stelle der Impfapplikation locken (Pascoe, Fiatarone Singh, and Edwards 2014). Wir haben in unserer Studie keine muskulären Marker wie die Kreatinkinase untersucht und konnten somit keinen Gewebeschaden erfassen. Allerdings könnten die stärkeren Muskelschmerzen, welche in der Gruppe der Sportler an der Injektionsstelle der Impfung vermerkt wurden, hinweisend auf eine Entzündungsreaktion sein. Andere Untersuchungen zeigten einen ausbleibenden adjuvanten Effekt von akutem Training auf die zelluläre und humorale Immunabwehr zwischen Kontrollen und Trainierenden. Hier wurde argumentiert, dass der Trainingseffekt auf die Immunabwehr vor allem beobachtet wird, wenn die Antwort der Kontrollgruppe schwach ausfällt. Ein einmaliges Training habe somit keinen verstärkenden Effekt auf eine bereits ausgeprägte Immunabwehr (Campbell et al. 2010). All diese Studien lassen sich bis zu einem gewissen Niveau mit unseren Ergebnissen vergleichen. Die Tatsache, dass sie sich aber zum großen Teil nicht mit Leistungssportlern befassen, welche nachgewiesene Besonderheiten der Immunabwehr aufweisen, limitiert jedoch die Aussagekraft bezüglich eines potenziellen adjuvanten Effekts einer sportlichen Betätigung auf das Ansprechen auf eine Impfung.

Insgesamt gibt es somit viele potenzielle Ursachen für die stärkere Induktion der Influenza-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort. Es wäre denkbar, dass der langfristige Trainingszustand der Leistungssportler unserer Studie, im Gegensatz zu einmaliger körperlicher Aktivität, einen signifikanten immunverstärkenden Effekt mit sich bringt. In einer aktuellen Studie wurde bereits der stabilisierende und anti-apoptotische Effekt von kontinuierlichem Ausdauertraining auf die Lymphozytenzahl bei Leistungssportlern dargestellt (Alack et al. 2019).

5.2 Funktionelle Veränderungen der CD4⁺ T-Zellen ergeben keinen Hinweis auf Immunschwäche bei Leistungssportlern

Neben der Quantifizierung der spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort wurde auch eine detaillierte funktionelle Analyse anhand des Nachweises verschiedener exprimierter Zytokine und Oberflächenmarker durchgeführt. Das Zytokinexpressionsprofil der Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen war dabei bei allen Probanden vor der Impfung durch multifunktionelle, IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen dominiert. Eine Woche nach Impfung stieg der Anteil insbesondere IFN γ einfach positiver CD4⁺ T-Zellen, während der Anteil dreifach positiver Zellen abnahm. Diese Veränderungen waren nach 2 bis 26 Wochen rückläufig. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Studien, die sich mit der Immunität gegen verschiedene Erreger wie beispielsweise Influenza, BK-Polyomavirus oder VZV befassten und zeigen konnten, dass eine akute Auseinandersetzung mit dem jeweiligen Erreger durch Infektion oder Impfung ebenfalls zu einer ähnlichen Veränderung der Zytokin-Expression der Erreger-spezifischen CD4⁺ T-Zellen führt (Schmidt et al. 2014; Schmidt et al. 2012; Schub et al. 2015;

Sester et al. 2008; Schub et al. 2018). Interessant war jedoch, dass diese Veränderungen in unserer Studie bei den Sportlern signifikant stärker ausfielen als bei den Kontrollen. In einer Studie an jungen, weiblichen, rhythmischen Sportturnerinnen waren Zytokine wie IFN γ , TNF α und IL2 in vergleichbarem Niveau messbar wie bei entsprechenden Kontrollpersonen. Die Sportlerinnen waren erwartungsgemäß durch einen höheren Anteil fettfreier Masse charakterisiert, welche unabhängig von IFN γ assoziiert war (Jurimae et al. 2017). Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die signifikanten Unterschiede der Sportler unserer Studie, vor allem bezüglich IFN γ , auf Differenzen der Fettverteilung zwischen Leistungssportlern und untrainierten Probanden beruhen. Allerdings wurden in der erwähnten Studie die allgemeinen Expressionsmuster von Zytokinen untersucht und nicht die Expression durch Erreger-spezifische T-Zellen (Jurimae et al. 2017). Dieser Sachverhalt macht einen Vergleich mit unseren Ergebnissen schwierig.

Der Verlust multifunktionaler, dreifach positiver CD4⁺ T-Zellen war in einer Studie zum BK-Polyomavirus (BKPyV) mit einer höheren BK-Virus Komplikationsrate bei Patienten nach Nierentransplantation assoziiert. Hier wurde diskutiert, ob die erhöhte Anzahl BKPyV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen und Antikörper als Kompensationsmechanismus des Multifunktionalitätsverlusts der T-Zellen betrachtet werden kann (Schmidt et al. 2014). Diese Betrachtungsweise mag auch in unserer Studie eine Erklärung für die quantitative Zunahme der Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei gleichzeitiger Einschränkung der Multifunktionalität darstellen.

Ein weiterer Teil der funktionellen Analyse der vorliegenden Studie beinhaltete die Messung der CTLA-4 und CD27 Expression auf den Influenza-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Hier zeigte sich für CTLA-4 ein signifikanter Anstieg eine Woche nach Impfung, welcher in der Sportlergruppe signifikant stärker ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu kam es zu keiner abweichenden Veränderung bezüglich der Expression von CD27. CTLA-4 zeigt als wichtiges negativ kostimulatorisches Oberflächenmolekül eine ähnliche Kinetik in Studien zu VZV und Influenza Infektion bzw. Impfung (Schmidt et al. 2012; Schub et al. 2015; Schub et al. 2018). Der Anstieg von CTLA-4 nach Impfung stellt eine regulatorische Reaktion des Immunsystems dar, welche die Balance zwischen Stimulation und Inhibition der T-Zellantwort sichert (Alegre et al. 1998). So ist es plausibel, dass eine verstärkte Induktion Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen bei Leistungssportlern eine gegenregulatorische Expression von CTLA-4 zur Folge hat, welche im Vergleich zu Kontrollen ebenfalls stärker ausfällt.

5.3 Zellen mit Bedeutung für das humorale Immunsystem zeigen vergleichbare Ausprägungen in beiden Studienpopulationen

In der Einleitung wurde bereits die Bedeutung von Tfh Zellen und Plasmablasten in der Formation von Keimzentren in Lymphfollikeln und der hiermit verbundenen Antikörperproduktion beschrieben (Murphy and Weaver 2018). Tfh Zellen zeigten in unserer

Studie höhere Expressionslevel von ICOS und PD-1 als andere CD4⁺ T-Zellen. Außerdem waren sie in Sportlern und Kontrollen in ähnlicher Ausprägung vorhanden und verhielten sich, abgesehen von einem gering signifikanten Anstieg in Woche 1 bei den Kontrollen, über den Verlauf der Studie stabil. Die Expression von ICOS und PD-1 war in beiden Gruppen vergleichbar, mit Ausnahme gering signifikant höherer PD-1 Level bei Sportlern in Woche 2 und 26. Die Zunahme der PD-1 Expression wurde bereits als Marker für CD4⁺ T-Zellerschöpfung als Reaktion auf aktive Infektionen mit *M. tuberculosis*, SARS-CoV-2 oder Cytomegalievirus („CMV“) und das Humane Immundefizienz Virus („HIV“) identifiziert und korrelierte häufig mit der Erregerlast (Day et al. 2006; Pollock et al. 2016; Sester et al. 2008; Dirks et al. 2013; Sester et al. 2016; Sester et al. 2011; Schub et al. 2020). Die Bedeutung dieser Expressionsveränderung auf Tfh Zellen ist bisher noch unbekannt. ICOS wurde bereits als wichtiger Regulator des adaptiven Immunsystems identifiziert, welcher zu einer Verstärkung der T-Zellantworten nach Fremdartigenkontakt führt. Darunter fallen Proliferation, Zytokinproduktion, Hochregulierung der für Zell-Zell-Interaktion entscheidenden Moleküle und B-Zellunterstützung bei der Antikörperproduktion (Hutloff et al. 1999). Zudem korreliert der Anstieg ICOS exprimierender Tfh Zellen im Blut nach Impfung mit dem Anstieg vorbestehender Antikörper. Tfh Zellen waren hier für die erneute Antikörperinduktion durch Gedächtnis B-Zellen und nicht durch naive B-Zellen verantwortlich (Bentebibel et al. 2013). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Zunahme ICOS⁺PD-1⁺CXCR3⁺ Tfh Zellen mit der steigenden Antikörperbindungsfähigkeit nach Influenza Impfung korrelierte und diese Korrelation vor allem für Probanden bestand, die zuvor weniger hochaffine Antikörper besaßen (Bentebibel et al. 2016). Generell betrachtet korrelierte die Zunahme von Aktivierungsmarkern wie ICOS und PD-1 auf zirkulierenden Tfh Zellen mit der zunehmenden Anzahl und Bindungsfähigkeit der Influenza-spezifischen Antikörper (Sant, Richards, and Nayak 2018). Auch wenn Tfh Zellen und Plasmablasten eine Rolle bei der Induktion einer Immunantwort spielen und dysfunktionale Tfh Zellen auch für mangelnde Impfwirksamkeit verantwortlich gemacht werden konnten (Pallikkuth et al. 2019), fielen die Veränderungen dieser Zellpopulationen im Verlauf nach Impfung in unseren Messungen allerdings eher gering aus. Demgegenüber verdeutlichen unsere Daten zur sehr viel deutlicheren Dynamik der Influenza-spezifischen Antikörper und CD4⁺ T-Zellen, dass das immunologische Geschehen und insbesondere Unterschiede zwischen Sportlern und Kontrollen sehr viel deutlicher durch antigenspezifische Analyse charakterisiert werden können.

In unserer Studie wurden B-Zellen und Tfh Zellen in verschiedene Reifungsstadien eingeteilt. Wir stellten fest, dass in beiden Probandengruppen die Gedächtniszellen dominierten. Zudem machten „central memory“ (CM) Tfh Zellen den Großteil aller Tfh Zellen aus, wohingegen CD4⁺ T-Zellen allgemein größere Anteile naiver und „effector memory“ (EM) T-Zellen aufwiesen. Auch wenn signifikante Veränderungen der CM und naiven Tfh Zellen über die Zeit bei den Sportlern gemessen wurden, waren diese nur marginal und es zeigten sich keine signifikanten

Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen. Interessanterweise konnte in aktuellen Untersuchungen eine Korrelation zwischen antigenspezifischen CM Zell-Basiswerten und Zunahme der Antikörpertiter nach Influenza Impfung gezeigt werden (Nienen et al. 2019). Zudem wurde gezeigt, dass die Influenza-spezifischen T-Zellen nach der Impfung vorwiegend aus der Gruppe der kreuzreaktiven CM Zellpopulation rekrutiert wurden und nicht aus dem Pool naiver T-Zellen (Nienen et al. 2019). die CM Zellpopulation scheint somit wichtig für die weitere Vermehrung Influenza-spezifischer T-Zellen nach Impfung zu sein.

Eine signifikante Zunahme der Plasmablasten innerhalb der „switched memory“ B-Zellen war in beiden Gruppen eine Woche nach Impfung nachweisbar. Bei Sportlern stiegen zudem Plasmablasten bezogen auf die gesamte Zellpopulation eine Woche nach Impfung an. Diese stärkere Zunahme dieser Vorläuferpopulation differenzierter B-Zellen könnte vermuten lassen, dass eher ein bezüglich des Antigens naives Immunsystem vorliegt. So konnten Nienen et al. bei Probanden ohne vorbestehende Hämagglutinin-inhibierende Antikörper stärkere Plasmablastenzunahmen und höhere absolute Zellzahlen messen, als bei Probanden mit präformierten Antikörpern (Nienen et al. 2019). Auch wenn in unseren Messungen Sportler und Kontrollen im Allgemeinen vergleichbare Level neutralisierender Antikörper aufwiesen, könnten Unterschiede in der vorbestehenden Immunität gegen einzelne Antigene beispielsweise eine verstärkte Zunahme H1N1 spezifischer Antikörper bei Sportlern erklären.

5.4 Die geringe Inzidenz, Intensität und Dauer der Impfnebenwirkungen spricht für eine generelle Influenzaimpfempfehlung für Leistungssportler

Akute Nebenwirkungen und Sorgen über langfristige Schäden nach Impfapplikation zählen zu den Bedenken, welche nicht nur in der Allgemeinbevölkerung, sondern auch bei Leistungssportlern angeführt werden (Edwards et al. 2016; Signorelli et al. 2016). Bei Sportlern kommen zudem Sorgen über eine potenzielle Einschränkung im Training zum Tragen. Das Auftreten von Nebenwirkungen und deren Intensität fiel insgesamt sowohl bei Kontrollen als auch bei Sportlern gering aus. Signifikante Unterschiede bezüglich der Nebenwirkungen waren zwischen Sportlern und Kontrollen nicht feststellbar. Einzelne Sportler zeigten allerdings die Tendenz etwas ausgeprägter Schmerzintensität und- dauer zu erleben. Höhergradige Schmerzen an der Injektionsstelle bildeten nur wenige dieser Athleten aus und dauerten maximal 4 Tage an. Bei Kontrollen erreichten die Schmerzen nur ein moderates Niveau über maximal 3 Tage. Als eine mögliche Erklärung für diese marginalen Unterschiede könnte der Umstand dienen, dass die körperliche Betätigung in den Armen von Sportlern die Reizung des Gewebes durch die Impfinjektion verstärkt, indem der evozierte Muskelfaserschaden eine Entzündungsreaktion verursacht (Sorichter, Puschendorf, and Mair 1999).

Die verschiedenen Disziplinen der Leistungssportler belasteten unterschiedliche Körperregionen und abhängig von der jeweiligen Sportart die Arme in variierendem Ausmaß, was die Schmerzen nach Impfung in den Oberarm beeinflusst haben könnte. Eine weitere

Erklärung für das stärkere Schmerzempfinden der Sportler könnte eine ausgeprägtere Introspektion im Vergleich zu Kontrollen gewesen sein. Diese könnte dazu führen, dass sie mehr auf spürbare Änderungen und Beschwerden achten, da ein anderes Gewicht auf der Integrität ihres körperlichen Zustandes liegt.

Eine Infektion, Schmerzgefühl oder Schwellung, mögen sie noch so gering ausgeprägt sein, haben für Leistungssportler andere Konsequenzen als für die Normalbevölkerung, da sie die Belastungskapazität für Training und Wettkampf reduzieren können (Gärtner and Meyer 2014).

Innerhalb der Leistungssportler wurden die Impfung bei einer Subgruppe innerhalb von zwei Stunden nach Training verabreicht, während eine weitere Subgruppe eine Trainingspause von 26 h einlegte. Auf Basis der immunologischen Daten dieser Arbeit zeigten beide Gruppen keine Unterschiede, so dass eine Trainingspause keinen Einfluss auf die durch Impfung induzierte Antikörper- und T Zell-Immunität zu haben scheint (ref Stenger et al.).

Zusammenfassend waren zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich lokaler und systemischer Impfreaktionen feststellbar und es kam aufgrund der beklagten Reaktionen zu keinem Trainingsausfall bei den Sportlern. Somit stehen die angegebenen Nebenwirkungen in keinem Verhältnis zur Infektion mit Influenza, welche schwere Symptome zur Folge haben kann, häufig ist und mehr als 20% der Normalbevölkerung befallen kann (Paules and Subbarao 2017).

5.5 Limitationen der Studie

In unserer Studie wurden hauptsächlich Leistungssportler vom Olympiastützpunkt Saarbrücken rekrutiert. Einige Studien konnten allerdings bereits Unterschiede in der Immunreaktion nach Impfung bei trainierenden Männern und Frauen nachweisen (Edwards et al. 2006). Wenngleich es keinen signifikanten Unterschied im Verhältnis von Frauen und Männern in Sportler- und Kontrollgruppe gab, ist die Fallzahl nicht ausreichend, um Unterschiede zwischen den Geschlechtern herauszuarbeiten.

Nur ein Bruchteil der Leistungssportler unserer Studie trainierte in Ausdauerdisziplinen. Die bereits vorhandene Literatur, die eine Einschränkung des Immunsystems nachweisen konnte, befasste sich allerdings vorrangig mit Ausdauersportlern (Bruunsgaard et al. 1997).

Die Rekrutierung der Sportler erfolgte aus verschiedenen Disziplinen, die sowohl Ausdauersport als auch verschiedene andere Sportarten umfasste. Ob sich potenzielle Unterschiede in der körperlichen Belastung auch auf die Impfantwort auswirken, lässt sich jedoch aufgrund der Fallzahl nicht klären. Allerdings war die Mehrzahl der Sportler unserer Studie an das olympische Trainingszentrum angebunden. Somit nahmen die Probanden an einem kontinuierlichen und vergleichbaren Trainingsprogramm teil, welches die Heterogenität ihrer jeweiligen Disziplinen relativieren dürfte.

Die Analyse von Tfh Zellen nach Impfung lieferte in der vorliegenden Arbeit zwar durchaus verwertbare Ergebnisse, allerdings nimmt diese Zellpopulation ihre Hauptfunktion vorrangig inner- und außerhalb von Keimzentren sekundär lymphatischer Organe ein (Renand et al. 2013). Die hauptsächliche Lokalisierung der Zellen in diesen Geweben könnte die Aussagekraft bei alleinigem Nachweis aus dem Blut eingeschränkt haben. In der Literatur wird eine mangelnde Sensitivität der etablierten Techniken für den Nachweis von IL21 diskutiert (Poorbaugh et al. 2019). Grundsätzlich gelang der Nachweis Influenza-spezifischer Tfh Zellen über intrazelluläre Färbung von IL21, aber generell war der prozentuale Anteil dieser Zellen im Blut aufgrund des dominierenden Vorkommens in lymphatischen Geweben sehr gering. Dies erschwert die Charakterisierung der Dynamik dieser Zellen nach Impfung bei alleiniger Berücksichtigung von Blut. Eine Untersuchung in lymphatischem Gewebe wäre wünschenswert, ist jedoch aufgrund der Invasivität bei gesunden Probanden nur schwer vertretbar.

Letztlich bleibt noch ungeklärt, ob unsere Ergebnisse stärkerer zellulärer und humoraler Immuninduktion bei Leistungssportlern nach Impfung einen besseren Schutz vor Erkrankung vermitteln. Dies kann lediglich im Rahmen großer Studien mit großer Fallzahl und langer Nachbeobachtungszeit geklärt werden.

5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Impfungen stellen eine der wichtigsten Maßnahmen zur Prävention infektiöser Erkrankungen dar (Edwards et al. 2016). Impfempfehlungen bezüglich Influenza wurden auch für Leistungssportler bereits ausgesprochen (Gärtner and Meyer 2014); dennoch bestehen sowohl von Seiten der Sportler als auch der Trainer Bedenken hinsichtlich der Effizienz und der Nebenwirkungen. Auch im Rahmen der Corona Pandemie werden sowohl Wirksamkeit, Nutzen und Risiken einer entsprechenden Impfung im Leistungssport diskutiert (Hull et al. 2021). Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Immunsystem von Leistungssportlern verglichen mit dem gesunder Kontrollpersonen keine Einschränkungen auf zellulärer oder humoraler Ebene im Bezug zur saisonalen Influenza Impfung aufwies. Quantitativ betrachtet entwickelten Leistungssportler eine Woche nach Impfung signifikant höhere Level Influenza-spezifischer CD4⁺ T-Zellen und Antikörper. Funktionell betrachtet waren Veränderungen bezüglich Zytokinprofil und CTLA-4 Expression bei Sportlern stärker ausgeprägt.

Eine Einschränkung des humoralen und zellulären Immunsystems konnte in unserer Studie somit nicht nachgewiesen werden.

Da Impfn Nebenwirkungen in beiden Gruppen benigne und ohne signifikante Unterschiede ausfielen, kann eine Influenza Impfung ohne Bedenken sicher bei Leistungssportlern durchgeführt werden. Dies wird umso mehr durch die Tatsache bestärkt, dass die Infektion asymptomatisch bis fulminant verlaufen kann und durch eine hohe Kontagiosität

charakterisiert ist (Paules and Subbarao 2017). Auch wenn sie nicht schwerwiegend sind, treten durchaus Nebenwirkungen nach der Influenzaimpfung auf. Aus diesem Grund ist eine zeitliche Planung dieser und auch anderer Impfungen sowohl bei Sportlern als auch bei der restlichen Bevölkerung notwendig. Empfehlenswert wäre die Durchführung der Impfung vor einem (trainings-)freien Tag, da Nebenwirkungen am häufigsten und stärksten am ersten Tag nach Impfung auftreten (Vilella et al. 2000).

6 Literaturverzeichnis

- Alack, K., K. Kruger, A. Weiss, R. Schermuly, T. Frech, M. Eggert, and F. C. Mooren. 2019. 'Aerobic endurance training status affects lymphocyte apoptosis sensitivity by induction of molecular genetic adaptations', *Brain Behav Immun*, 75: 251-57.
- Alegre, M. L., H. Shiels, C. B. Thompson, and T. F. Gajewski. 1998. 'Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells', *J Immunol*, 161: 3347-56.
- Altenburg, A. F., G. F. Rimmelzwaan, and R. D. de Vries. 2015. 'Virus-specific T cells as correlate of (cross-)protective immunity against influenza', *Vaccine*, 33: 500-6.
- Behrends, J., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Hoth, M., Wischmeyer, E. 2012. *Physiologie* (Thieme Verlag: Stuttgart).
- Bentebibel, S. E., S. Khurana, N. Schmitt, P. Kurup, C. Mueller, G. Obermoser, A. K. Palucka, R. A. Albrecht, A. Garcia-Sastre, H. Golding, and H. Ueno. 2016. 'ICOS(+)/PD-1(+)/CXCR3(+) T follicular helper cells contribute to the generation of high-avidity antibodies following influenza vaccination', *Sci Rep*, 6: 26494.
- Bentebibel, S. E., S. Lopez, G. Obermoser, N. Schmitt, C. Mueller, C. Harrod, E. Flano, A. Mejias, R. A. Albrecht, D. Blankenship, H. Xu, V. Pascual, J. Banchereau, A. Garcia-Sastre, A. K. Palucka, O. Ramilo, and H. Ueno. 2013. 'Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination', *Sci Transl Med*, 5: 176ra32.
- Bernal, E., M. Martinez, J. A. Campillo, G. Puche, C. Baguena, C. Tomas, A. Jimeno, M. J. Alcaraz, A. Alcaraz, A. Munoz, E. Oliver, A. de la Torre, I. Marin, A. Cano, and A. Minguela. 2022. 'Moderate to Intense Physical Activity Is Associated With Improved Clinical, CD4/CD8 Ratio, and Immune Activation Status in HIV-Infected Patients on ART', *Open Forum Infect Dis*, 9: ofab654.
- Boston, Christopher D., and Jennifer J. Bryan. 2018. 'Immunizations in Athletes', *Sports Health*, 10: 427-33.
- Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Forster. 2000. 'Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production', *J Exp Med*, 192: 1545-52.
- Bruunsgaard, H., A. Hartkopp, T. Mohr, H. Konradsen, I. Heron, C. H. Mordhorst, and B. K. Pedersen. 1997. 'In vivo cell-mediated immunity and vaccination response following prolonged, intense exercise', *Med Sci Sports Exerc*, 29: 1176-81.
- Campbell, J. P., K. M. Edwards, C. Ring, M. T. Drayson, J. A. Bosch, A. Inskip, J. E. Long, D. Pulsford, and V. E. Burns. 2010. 'The effects of vaccine timing on the efficacy of an acute eccentric exercise intervention on the immune response to an influenza vaccine in young adults', *Brain Behav Immun*, 24: 236-42.
- Campbell, J. P., N. E. Riddell, V. E. Burns, M. Turner, J. J. van Zanten, M. T. Drayson, and J. A. Bosch. 2009. 'Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype', *Brain Behav Immun*, 23: 767-75.
- Campbell, J. P., and J. E. Turner. 2018. 'Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan', *Front Immunol*, 9: 648.
- Cheng, L. W., S. W. Huang, L. M. Huang, L. Y. Chang, P. L. Shao, D. Kiang, and J. R. Wang. 2012. 'Comparison of neutralizing and hemagglutination-inhibiting antibody responses for evaluating the seasonal influenza vaccine', *J Virol Methods*, 182: 43-9.
- Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B. D. Walker. 2006. 'PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated

- with T-cell exhaustion and disease progression', *Nature*, 443: 350-4.
- Dirks, J., H. Tas, T. Schmidt, S. Kirsch, B. C. Gärtner, U. Sester, and M. Sester. 2013. 'PD-1 analysis on CD28(-) CD27(-) CD4 T cells allows stimulation-independent assessment of CMV viremic episodes in transplant recipients', *Am J Transplant*, 13: 3132-41.
- Edwards, K. M., V. E. Burns, A. E. Adkins, D. Carroll, M. Drayson, and C. Ring. 2008. 'Meningococcal A vaccination response is enhanced by acute stress in men', *Psychosom Med*, 70: 147-51.
- Edwards, K. M., V. E. Burns, L. M. Allen, J. S. McPhee, J. A. Bosch, D. Carroll, M. Drayson, and C. Ring. 2007. 'Eccentric exercise as an adjuvant to influenza vaccination in humans', *Brain Behav Immun*, 21: 209-17.
- Edwards, K. M., V. E. Burns, T. Reynolds, D. Carroll, M. Drayson, and C. Ring. 2006. 'Acute stress exposure prior to influenza vaccination enhances antibody response in women', *Brain Behav Immun*, 20: 159-68.
- Edwards, K. M., J. P. Campbell, C. Ring, M. T. Drayson, J. A. Bosch, C. Downes, J. E. Long, J. A. Lumb, A. Merry, N. J. Paine, and V. E. Burns. 2010. 'Exercise intensity does not influence the efficacy of eccentric exercise as a behavioural adjuvant to vaccination', *Brain Behav Immun*, 24: 623-30.
- Edwards, K. M., J. M. Hackell, The Committee On Practice Committee On Infectious Diseases, and Medicine Ambulatory. 2016. 'Countering Vaccine Hesitancy', *Pediatrics*, 138.
- Edwards, K. M., M. A. Pung, L. M. Tomfohr, M. G. Ziegler, J. P. Campbell, M. T. Drayson, and P. J. Mills. 2012. 'Acute exercise enhancement of pneumococcal vaccination response: a randomised controlled trial of weaker and stronger immune response', *Vaccine*, 30: 6389-95.
- Gärtner, B. C., and T. Meyer. 2014. 'Vaccination in elite athletes', *Sports Med*, 44: 1361-76.
- Gleeson, M. 2006. 'Immune system adaptation in elite athletes', *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9: 659-65.
- Gleeson, M., D. B. Pyne, and R. Callister. 2004. 'The missing links in exercise effects on mucosal immunity', *Exerc Immunol Rev*, 10: 107-28.
- Groß, Uwe. 2013. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*.
- Haas, Walter. 2009. *Influenza: Prävention, Diagnostik, Therapie und öffentliche Gesundheit* (Urban & Fischer: München).
- Hull, J. H., M. P. Schwellnus, D. B. Pyne, and A. Shah. 2021. 'COVID-19 vaccination in athletes: ready, set, go', *Lancet Respir Med*, 9: 455-56.
- Hutchinson, E. C. 2018. 'Influenza Virus', *Trends Microbiol*, 26: 809-10.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Kroczeck. 1999. 'ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28', *Nature*, 397: 263-6.
- Jaworski, C. A., and V. Rygiel. 2019. 'Acute Illness in the Athlete', *Clin Sports Med*, 38: 577-95.
- Jurimae, J., K. Vosoberg, A. L. Tamm, K. Maasalu, L. Remmel, and V. Tillmann. 2017. 'Body composition and inflammatory markers in pubertal girls: Comparison between athletes and non-athletic controls', *Eur J Sport Sci*, 17: 867-73.
- Kakanis, M. W., J. Peake, E. W. Brenu, M. Simmonds, B. Gray, S. L. Hooper, and S. M. Marshall-Gradisnik. 2010. 'The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes', *Exerc Immunol Rev*, 16: 119-37.
- Kaufmann, S. H. E. 2014. *Basiswissen Immunologie* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Kochanek, M., B. Böll, A. Shimabukuro-Vornhagen, T. Welte, U. Wieland, M. Pletz, M. Hallek, G. Fätkenheuer, and B. Salzberger. 2018. 'Influenzasaison 2017/2018 – „business as usual“?', *Der Internist*, 59: 1122-24.

- Kruger, K., A. Lechtermann, M. Fobker, K. Volker, and F. C. Mooren. 2008. 'Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms', *Brain Behav Immun*, 22: 324-38.
- Kwetkat, A., A. Leischker, and H. J. Heppner. 2018. '[Influenza: special aspects in old age]', *Z Gerontol Geriatr*, 51: 585-96.
- Long, J. E., C. Ring, M. Drayson, J. Bosch, J. P. Campbell, J. Bhabra, D. Browne, J. Dawson, S. Harding, J. Lau, and V. E. Burns. 2012. 'Vaccination response following aerobic exercise: can a brisk walk enhance antibody response to pneumococcal and influenza vaccinations?', *Brain Behav Immun*, 26: 680-7.
- Lowder, T., D. A. Padgett, and J. A. Woods. 2005. 'Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus', *Brain Behav Immun*, 19: 377-80.
- Lüllmann, Heinz, Klaus Mohr, Martin Wehling, and Lutz Hein. 2016. 'Influenza-Viren.' in Heinz Lüllmann, Klaus Mohr, Martin Wehling and Lutz Hein (eds.), *Pharmakologie und Toxikologie* (Georg Thieme Verlag).
- Malm, C. 2006. 'Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve', *Scand J Med Sci Sports*, 16: 4-6.
- Mei, H. E., S. Hahne, A. Redlin, B. F. Hoyer, K. Wu, L. Baganz, A. R. Lisney, T. Alexander, B. Rudolph, and T. Dorner. 2017. 'Plasmablasts With a Mucosal Phenotype Contribute to Plasmacytosis in Systemic Lupus Erythematosus', *Arthritis Rheumatol*, 69: 2018-28.
- Mooren, F. C., and K. Kruger. 2015. 'Apoptotic lymphocytes induce progenitor cell mobilization after exercise', *J Appl Physiol (1985)*, 119: 135-9.
- Moscona, A. 2005. 'Neuraminidase inhibitors for influenza', *N Engl J Med*, 353: 1363-73.
- Murphy K, Travers P, Walport M. 2009. *Janeway Immunologie* (Spektrum, akademischer Verlag: 7edn Heidelberg).
- Murphy, Kenneth, and Casey Weaver. 2018. *Janeway Immunologie* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Nieman, D. C. 1994. 'Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system', *Med Sci Sports Exerc*, 26: 128-39.
- Nieman, D. C., L. M. Johanssen, J. W. Lee, and K. Arabatzis. 1990. 'Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon', *J Sports Med Phys Fitness*, 30: 316-28.
- Nieman, D. C., and B. K. Pedersen. 1999. 'Exercise and immune function. Recent developments', *Sports Med*, 27: 73-80.
- Nienen, M., U. Stervbo, F. Molder, S. Kaliszczyk, L. Kuchenbecker, L. Gayova, B. Schweiger, K. Jurchott, J. Hecht, A. U. Neumann, S. Rahmann, T. Westhoff, P. Reinke, A. Thiel, and N. Babel. 2019. 'The Role of Pre-existing Cross-Reactive Central Memory CD4 T-Cells in Vaccination With Previously Unseen Influenza Strains', *Front Immunol*, 10: 593.
- Nunes, M. C., A. Weinberg, C. L. Cutland, S. Jones, D. Wang, B. Dighero-Kemp, M. Z. Levine, N. Wairagkar, and S. A. Madhi. 2018. 'Neutralization and hemagglutination-inhibition antibodies following influenza vaccination of HIV-infected and HIV-uninfected pregnant women', *PLoS One*, 13: e0210124.
- Pallikkuth, S., L. R. de Armas, S. Rinaldi, V. K. George, L. Pan, K. L. Arheart, R. Pahwa, and S. Pahwa. 2019. 'Dysfunctional peripheral T follicular helper cells dominate in people with impaired influenza vaccine responses: Results from the FLORAH study', *PLoS Biol*, 17: e3000257.
- Pascoe, A. R., M. A. Fiatarone Singh, and K. M. Edwards. 2014. 'The effects of exercise on vaccination responses: a review of chronic and acute exercise interventions in humans', *Brain Behav Immun*, 39: 33-41.
- Paules, C., and K. Subbarao. 2017. 'Influenza', *Lancet*, 390: 697-708.

- Peake, J. M., O. Neubauer, N. P. Walsh, and R. J. Simpson. 2017. 'Recovery of the immune system after exercise', *J Appl Physiol (1985)*, 122: 1077-87.
- Pollock, K. M., D. J. Montamat-Scotte, L. Grass, G. S. Cooke, M. S. Kapembwa, O. M. Kon, R. D. Sampson, G. P. Taylor, and A. Lalvani. 2016. 'PD-1 Expression and Cytokine Secretion Profiles of Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4+ T-Cell Subsets; Potential Correlates of Containment in HIV-TB Co-Infection', *PLoS One*, 11: e0146905.
- Poorbaugh, J., T. Samanta, S. W. Bright, S. E. Sissons, C. Y. Chang, P. Oberoi, A. J. MacDonald, A. P. Martin, K. L. Cox, and R. J. Benschop. 2019. 'Measurement of IL-21 in human serum and plasma using ultrasensitive MSD S-PLEX(R) and Quanterix SiMoA methodologies', *J Immunol Methods*, 466: 9-16.
- Ranadive, S. M., M. Cook, R. M. Kappus, H. Yan, A. D. Lane, J. A. Woods, K. R. Wilund, G. Iwamoto, V. Vanar, R. Tandon, and B. Fernhall. 2014. 'Effect of acute aerobic exercise on vaccine efficacy in older adults', *Med Sci Sports Exerc*, 46: 455-61.
- Rasheed, A. U., H. P. Rahn, F. Sallusto, M. Lipp, and G. Muller. 2006. 'Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression', *Eur J Immunol*, 36: 1892-903.
- Rehm, K., I. Sunesara, and G. D. Marshall. 2015. 'Increased Circulating Anti-inflammatory Cells in Marathon-trained Runners', *Int J Sports Med*, 36: 832-6.
- Renand, A., P. Milpied, J. Rossignol, J. Bruneau, F. Lemonnier, M. Dussiot, S. Coulon, and O. Hermine. 2013. 'Neuropilin-1 expression characterizes T follicular helper (Tfh) cells activated during B cell differentiation in human secondary lymphoid organs', *PLoS One*, 8: e85589.
- Rogers, C. J., D. A. Zaharoff, K. W. Hance, S. N. Perkins, S. D. Hursting, J. Schlom, and J. W. Greiner. 2008. 'Exercise enhances vaccine-induced antigen-specific T cell responses', *Vaccine*, 26: 5407-15.
- Rosic, I., S. Malicevic, S. Medic, and C. Vlasich. 2008. 'Immune response by athletes to hepatitis B vaccination', *Vaccine*, 26: 3190-1.
- Sant, A. J., K. A. Richards, and J. Nayak. 2018. 'Distinct and complementary roles of CD4 T cells in protective immunity to influenza virus', *Curr Opin Immunol*, 53: 13-21.
- Schaerli, P., K. Willimann, A. B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher, and B. Moser. 2000. 'CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function', *J Exp Med*, 192: 1553-62.
- Schmidt, T., C. Adam, H. H. Hirsch, M. W. Janssen, M. Wolf, J. Dirks, P. Kardas, T. Ahlenstiel-Grunow, L. Pape, T. Rohrer, D. Fliser, M. Sester, and U. Sester. 2014. 'BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication', *Am J Transplant*, 14: 1334-45.
- Schmidt, T., J. Dirks, M. Enders, B. C. Gärtner, H. Uhlmann-Schiffler, U. Sester, and M. Sester. 2012. 'CD4+ T-cell immunity after pandemic influenza vaccination cross-reacts with seasonal antigens and functionally differs from active influenza infection', *Eur J Immunol*, 42: 1755-66.
- Schmidt, T., and M. Sester. 2013. 'Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry', *Methods Mol Biol*, 1064: 267-74.
- Schmitt, N., S. E. Bentebibel, and H. Ueno. 2014. 'Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood', *Trends Immunol*, 35: 436-42.
- Schub, D., M. Fousse, K. Fassbender, B. C. Gärtner, U. Sester, M. Sester, and T. Schmidt. 2018. 'CTLA-4-expression on VZV-specific T cells in CSF and blood is specifically increased in patients with VZV related central nervous system infections', *Eur J Immunol*, 48: 151-60.
- Schub, D., E. Janssen, S. Leyking, U. Sester, G. Assmann, P. Hennes, S. Smola, T. Vogt, T. Rohrer,

- M. Sester, and T. Schmidt. 2015. 'Altered phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity in individuals with active infection', *J Infect Dis*, 211: 600-12.
- Schub, D., V. Klemis, S. Schneitler, J. Mihm, P. M. Lepper, H. Wilkens, R. Bals, H. Eichler, B. C. Gärtner, S. L. Becker, U. Sester, M. Sester, and T. Schmidt. 2020. 'High levels of SARS-CoV-2-specific T cells with restricted functionality in severe courses of COVID-19', *JCI Insight*, 5.
- Schütt, Christine, and Barbara Bröker. 2011. *Grundwissen Immunologie* (Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg).
- Sester, M., C. Leboeuf, T. Schmidt, and H. H. Hirsch. 2016. 'The "ABC" of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation', *Am J Transplant*, 16: 1697-706.
- Sester, U., M. Fousse, J. Dirks, U. Mack, A. Prasse, M. Singh, A. Lalvani, and M. Sester. 2011. 'Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states', *PLoS One*, 6: e17813.
- Sester, U., D. Presser, J. Dirks, B. C. Gärtner, H. Kohler, and M. Sester. 2008. 'PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus-specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy', *Am J Transplant*, 8: 1486-97.
- Sester, U., T. Schmidt, M. K. Kuhlmann, B. C. Gärtner, H. Uhlmann-Schiffler, and M. Sester. 2013. 'Serial influenza-vaccination reveals impaired maintenance of specific T-cell memory in patients with end-stage renal failure', *Vaccine*, 31: 4111-20.
- Shaw, D. M., F. Merien, A. Braakhuis, and D. Dulson. 2018. 'T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise', *Cytokine*, 104: 136-42.
- Signorelli, C., A. Odone, A. Miduri, P. Cella, C. Pasquarella, A. Gozzini, P. Tamburrino, and E. Castellacci. 2016. 'Flu vaccination in elite athletes: A survey among Serie A soccer teams', *Acta Biomed*, 87: 117-20.
- Sorichter, S., B. Puschendorf, and J. Mair. 1999. 'Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury', *Exerc Immunol Rev*, 5: 5-21.
- Stephenson, I., and K. G. Nicholson. 2001. 'Influenza: vaccination and treatment', *Eur Respir J*, 17: 1282-93.
- Tafari, Silvio, Domenico Sinesi, and Maria Serena Gallone. 2017. 'Vaccinations among athletes: evidence and recommendations', *Expert Review of Vaccines*, 16: 867-69.
- Takahashi, N., K. Matsumoto, H. Saito, T. Nanki, N. Miyasaka, T. Kobata, M. Azuma, S. K. Lee, S. Mizutani, and T. Morio. 2009. 'Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients', *J Immunol*, 182: 5515-27.
- Trabacchi, V., A. Odone, L. Lillo, C. Pasquarella, and C. Signorelli. 2015. 'Immunization practices in athletes', *Acta Biomed*, 86: 181-8.
- Verschoor, C. P., P. Singh, M. L. Russell, D. M. Bowdish, A. Brewer, L. Cyr, B. J. Ward, and M. Loeb. 2015. 'Microneutralization assay titres correlate with protection against seasonal influenza H1N1 and H3N2 in children', *PLoS One*, 10: e0131531.
- Vilella, A., R. Dal-Re, D. Simo, P. Garcia-Corbeira, P. Diego, and J. M. Bayas. 2000. 'Reactogenicity profile of tetanus-diphtheria (adult-type) vaccine: results of a naturalistic study performed at an adult vaccination center', *J Clin Pharmacol*, 40: 1267-73.
- Vinuesa, C. G., S. G. Tangye, B. Moser, and C. R. Mackay. 2005. 'Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity', *Nat Rev Immunol*, 5: 853-65.
- Vogelzang, A., H. M. McGuire, D. Yu, J. Sprent, C. R. Mackay, and C. King. 2008. 'A fundamental

role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells', *Immunity*, 29: 127-37.

7 Publikationen

Die Daten dieser Arbeit sind vollständig in zwei Originalarbeiten publiziert. Die laborexperimentellen Daten beider Manuskripte wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert. Innerhalb der Sportler wurde der Einfluss des zeitlichen Abstandes des Trainings in Relation zum Impfzeitpunkt auf die Induktion Influenza-spezifischer T-Zellen und Antikörper durch Clemens Ziller im Rahmen seiner Dissertation untersucht. Dies erfolgte unter Verwendung der laborexperimentellen Daten dieser Arbeit (Influenza-spezifische T-Zellen und Antikörper).

7.1 Originalarbeiten

Ledo, A., Schub, D., Ziller, C., Enders, M., Stenger, T., Gärtner, B.C., Schmidt, T., Meyer, T., and Sester, M. Elite athletes on regular training show more pronounced induction of vaccine-specific T-cells and antibodies after tetravalent influenza vaccination than controls.

Brain Behav Immun 2020; 83:135-145.

Impact Punkte: **7.217**.

Stenger, T., **Ledo, A.**, Ziller, C., Schub, D., Schmidt, T., Enders, M., Gärtner, B.C., Sester, M., and Meyer, T. Timing of vaccination after training: immune response and side effects in athletes.

Med Sci Sport Exer 2020; 52:1603-1609.

Impact Punkte: **5.411**.

7.2 Kongressbeiträge

- **Ledo, A.**, Schub, D., Schmidt, T., Enders, M., Ziller, C., Stenger, T., Gärtner, B., Meyer, T., Sester, M. Elite athletes show more pronounced induction of influenza-specific T cells and antibodies after tetravalent influenza vaccination than controls.

47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Erlangen 12.09.2017-15.09.2017 (Präsentation durch Alexandra Ledo)

- Schub, D., **Ledo, A.**, Schmidt, T., Enders, M., Ziller, C., Stenger, T., Gärtner, B., Meyer, T., Sester, M. Elite athletes show more pronounced induction of influenza-specific T cells and antibodies after tetravalent influenza vaccination than controls.

28th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Madrid 21.04.2018-24.04.2018 (Präsentation durch Dr. David Schub)

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester für die großzügige Überlassung dieses Themas. Dafür, dass sie mir das wissenschaftliche Arbeiten nähergebracht hat und die Freude hierfür geweckt hat. Vielmals danke ich auch Herrn Prof. Dr. med. Urban Sester, dafür dass er mich von meiner Heimatuniversität der LMU München nach Homburg für diese Dissertation empfohlen hat.

Besonders großer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. David Schub für die wundervolle Betreuung und Anleitung im Labor und bei der Auswertung. Besonders dankbar bin ich für die zuverlässige und schnelle Erreichbarkeit auch über die Ferne zu allen Fragestellungen und Problemen. An dieser Stelle danke ich auch Frau Dr. rer. nat. Tina Schmidt, die mich ebenfalls ausgezeichnet bei der statistischen Auswertung der Arbeit betreute.

Danken möchte ich ebenfalls Univ.-Prof. Dr. med. Tim Meyer und Dr. med. Tanja Stenger der Sportmedizin Saarbrücken, für die Koordination der Rekrutierung der Sportler. Zudem danke ich Clemens Ziller, der für die Erhebung der Nebenwirkungen bei Leistungssportlern und Kontrollpersonen, den Transport der Proben und die Probandenaufklärung verantwortlich war. Ich danke Frau Lieblang-Alff für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Blutbildanalysen in Saarbrücken.

Frau Prof. Dr. med. Barbara Gärtner möchte ich für ihre Expertise und für die Unterstützung bei der Auswertung der Nebenwirkungen danken.

Ich danke vielmals unseren medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Candida Guckelmus und Frau Lisa Lieblang für die Einweisung in die präzise und saubere Laborarbeit und für die Unterstützung bei technischen und organisatorischen Fragestellungen des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Weiterer Dank gebührt Frau Stefanie Marx und Frau Dr. rer. nat. Michaela Fischer für die Ratschläge zu vielen Aspekten des wissenschaftlichen Arbeitens.

Herrn Dr. med. Martin Enders danke ich für die Möglichkeit, die Neutralisationstests in seinem Labor in Stuttgart durchführen zu können. Ich bin Frau Dr. Maren Eggers dankbar für die Unterstützung während meines Aufenthaltes in Stuttgart und außerhalb davon. Frau Silvia Meier danke ich für die kompetente Einweisung in die Technik.

Zuletzt, aber mit besonderer Betonung, danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Meine Eltern Johanna und Luis Ledo sind einzigartige Menschen und haben mir den einjährigen Aufenthalt in Homburg erst ermöglicht. Sie sind eine verlässliche Unterstützung in meiner gesamten Studienlaufbahn gewesen.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 27.01.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester
2. Univ.-Prof. Dr. med. Tim Meyer
3. Prof. Dr. rer. nat. Carsten Watzl