



Fakultät für Medizin

Institut für Virologie

Immunkontrolle des Epstein-Barr Virus als funktioneller Biomarker bei NachwuchsleistungssportlerInnen

Nina Körber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Halle

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Ulrike Protzer
2. Prof. Dr. Dirk Haller

Die Dissertation wurde am 05.04.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.11.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)	6
1.1.1 Taxonomie und Entdeckung	6
1.1.2 Morphologie	6
1.1.3 Genomaufbau	7
1.2 Die Epstein-Barr Virusinfektion	9
1.2.1 Epidemiologie und Übertragung	9
1.2.2 Der EBV-Infektionszyklus	10
1.2.2.1 Der lytische EBV-Infektionszyklus	10
1.2.2.2 Der latente EBV-Infektionszyklus	11
1.3 EBV-spezifische Immunantworten	12
1.3.1 Die innate Immunkontrolle der EBV-Infektion	14
1.3.2 Die adaptive EBV-spezifische Immunantwort	16
1.3.2.1 Die humorale EBV-spezifische Immunantwort	16
1.3.2.2 Die zelluläre EBV-spezifische Immunantwort	18
1.3.2.2.1 Die EBV-spezifische CD4 T-Zellantwort	18
1.3.2.2.2 Die EBV-spezifische CD8 T-Zellantwort	20
1.3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen	23
1.3.3.1 Infektiöse Mononukleose (IM)	23
1.3.3.2 Chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV)	24
1.3.3.3 X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung (XLP)	24
1.3.3.4 EBV-assoziierte Tumorerkrankungen	24
1.3.3.5 Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD)	26
1.3.3.6 EBV-assoziierte Autoimmunerkrankheiten	26
1.4 Die Epstein-Barr Virusinfektion im Kontext des Hochleistungssports	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit	30
2 Material und Methoden	32

2.1	Material.....	32
2.1.1	Medien	32
2.1.2	Medienzusätze	32
2.1.3	Reagenzien und Lösungen	32
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	33
2.1.5	Primer und Sonde für die real-time PCR (Taqman)	33
2.1.6	Kits.....	33
2.1.7	EBV-Peptidpools	33
2.1.8	Andere Antigene	34
2.1.9	Geräte.....	34
2.1.10	Software.....	34
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Diagnostisch-serologische Methoden zur Analyse EBV-spezifischer Immunantworten und der Epstein-Barr Viruslast	35
2.2.1.1	<i>recomLine</i> EBV IgG Immunoblot	35
2.2.1.2	Enzygnost [®] Anti-EBV/IgG bzw. IgM <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	37
2.2.1.3	Quantitativer EBV DNS-Nachweis mittels <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
2.2.2	Immunologische Methoden zur Detektion von EBV-spezifischen zellvermittelten Immunantworten (CMI)	39
2.2.2.1	Festlegung der Transportbedingungen des Probenmaterials	39
2.2.2.2	Isolierung und Kryokonservierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	39
2.2.2.3	Auftauen und „ <i>Resten</i> “ von PBMC	39
2.2.2.4	IFN- γ ELISpot Assay	39
2.2.2.5	IL-2 ELISpot Assay	40
2.2.2.6	IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay	41
2.2.2.7	Erfassung der Daten der ELISpot- und FluoroSpot Assays	42
2.2.2.8	Auswertung und Interpretation der Ergebnisse des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays.....	43

2.3	Datenverarbeitung und Statistik	44
2.4	Studiendesign	46
3	Ergebnisse	48
3.1	Aufbau der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden	48
3.2	Humorale EBV-spezifische Immunantwort	49
3.2.1	Bestimmung des EBV-Serostatus in beiden Kohorten.....	49
3.2.1.1	Verteilung der EBV-Seroprävalenz in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden.....	49
3.2.1.2	EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler	50
3.2.1.3	EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter in der Gruppe der Kontrollprobanden	51
3.2.1.4	EBV-Reaktivierungen als ein möglicher Indikator für eine erhöhte physische oder psychische Belastung bei Nachwuchsleistungssportlern.....	52
3.2.1.5	Auftretende EBV-Primärinfektionen in beiden Kohorten	53
3.2.2	Quantifizierung der anti-EBV IgG-Titer in beiden Kohorten	53
3.2.2.1	Quantitativer Vergleich der anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden.....	53
3.2.2.2	Anti-EBV IgM-Titer in beiden Kohorten.....	54
3.2.2.3	Anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen	54
3.2.2.4	Anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen verglichen mit der Kontrollgruppe.....	56
3.2.2.5	Anti-EBV IgG-Titer der einzelnen Trainingskollektive der Nachwuchsleistungssportler verglichen mit der Kontrollgruppe.....	57
3.2.2.6	Anti-EBV IgG-Titer verschiedener interdisziplinärer Sportartprofile der Nachwuchsleistungssportler	58
3.3	Nachweis der Epstein-Barr Virus-Last in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden.....	60
3.3.1	Korrelation der EBV-Last mit dem EBV-Serostatus und der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer	61
3.4	Zelluläre EBV-spezifische Immunantwort.....	64
3.4.1	Etablierung und Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays.....	64

3.4.1.1	Bestimmung geeigneter Stimulatorantigene für den Nachweis zellvermittelter EBV-spezifischer Immunantworten (CMI)	64
3.4.1.2	Festlegung der Stimulatorantigenkonzentration für die <i>in vitro</i> Restimulation von kryokonservierten PBMC.....	65
3.4.1.3	Antigenspezifität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	68
3.4.1.4	Detektionslimit des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	69
3.4.1.5	Untere Nachweisgrenze des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	70
3.4.1.6	Obere Nachweisgrenze des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	70
3.4.1.7	Linearität und optimale Zelldichte des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	71
3.4.1.8	Präzision des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays.....	74
3.4.1.8.1	Intra-Assay Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	75
3.4.1.8.2	Inter-Assay Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	79
3.4.1.8.3	Inter-Day Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	81
3.4.1.9	Vergleichbarkeit der detektierten Ergebnisse des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays und dem IFN- γ - und IL-2 ELISpot Assay.....	83
3.4.2	Analyse der Quantität und Qualität EBV-spezifischer zellvermittelter Immunantworten in der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden.	86
3.4.2.1	Vergleich der Quantität der detektierten EBV-spezifischen CMI von Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden.....	86
3.4.2.2	Quantität der EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase	88
3.4.2.3	Vergleich der Quantität der detektierten EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler während der verschiedenen Belastungsphasen und den Kontrollprobanden	91
3.4.2.4	Qualität der EBV-spezifischen T-Zellantwort der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden.....	94
3.4.2.4.1	Monofunktionale EBV-spezifische CMI der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden.....	95
3.4.2.4.2	Monofunktionale EBV-spezifische IFN- γ SFC der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase	96
3.4.2.4.3	Vergleich monofunktionaler EBV-spezifischer IFN- γ SFC der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen und der Kontrollprobanden.....	98

3.4.2.4.4	Bifunktionale EBV-spezifische CMI der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden.....	99
3.5	Korrelation der EBV-spezifischen CMI mit den anti-EBV IgG-Titern und der EBV-Last bei Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden.....	100
4	Diskussion.....	101
4.1	Bestimmung des EBV-Serostatus in beiden Kohorten	102
4.1.1	Bestimmung der EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter	102
4.1.2	Detektion von EBV-Reaktivierungen in beiden Kohorten.....	103
4.1.3	Detektion von EBV-Primärinfektionen in beiden Kohorten.....	103
4.2	Quantifizierung der anti-EBV IgG-Titer in beiden Kohorten	104
4.2.1	Anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen und im Vergleich mit der Kontrollgruppe.....	105
4.2.2	Quantifizierung der anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler in Abhängigkeit verschiedener Anforderungs- und Belastungsprofile	107
4.3	Nachweis der Epstein-Barr Virus-Last in beiden Kohorten.....	108
4.4	Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays	109
4.4.1	Festlegung geeigneter Stimulatorantigene für den Nachweis EBV-spezifischer CMI.....	110
4.4.2	Bestimmung des Detektionslimits, der Nachweisgrenzen, der Linearität und der Präzision des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays.....	111
4.4.3	Vergleichbarkeit der detektierten Ergebnisse des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays und dem IFN- γ - und IL-2 ELISpot Assay.....	112
4.5	Analyse der zellvermittelten EBV-spezifischen Immunantworten	113
4.5.1	Vergleich der Quantität der detektierten EBV-spezifischen CMI von Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden	113
4.5.2	Quantität der EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen.....	114
4.5.3	Qualität der detektierten EBV-spezifischen CMI	115
4.5.4	Beurteilung der Auswahl der Stimulatorantigene und der Assay-Methode hinsichtlich der Detektion von EBV-spezifischen CMI.....	116
4.6	Verifikation der Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports? – Die EBV-spezifische Immunantwort als ein funktioneller Biomarker für den Grad der Belastbarkeit?	119
5	Literaturverzeichnis	121

6	Publikationen und Kongresse.....	134
6.1	Publikationen.....	134
6.2	Kongresse.....	134
7	Danksagung.....	135

Zusammenfassung

Im Bereich des Hochleistungssports wird häufig darüber diskutiert, ob aufgrund der vorliegenden hohen physischen und psychischen Belastung eine geschwächte Immunfunktion in Athleten vorliegt. Gehäuft auftretende Infektionen der oberen Atemwege (URTI, *upper respiratory tract infection*) werden oft mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) in Zusammenhang gebracht, da der Nachweis eines pathogenen Keimes meist fehlt. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports, bezogen auf die EBV-spezifische Immunantwort, in einem Kollektiv von Nachwuchsleistungssportlern geprüft werden. Hierfür wurde der individuelle EBV-Serostatus, die Höhe der anti-EBV IgG-Titer, die Epstein-Barr Viruslast und die zellvermittelte EBV-spezifische Immunantwort in einem Kollektiv von Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden bestimmt und verglichen.

Auf den erhaltenen Ergebnissen aufbauend, sollte zudem überprüft werden, ob die individuelle EBV-spezifische Immunantwort als funktioneller Biomarker genutzt werden kann, welcher den allgemeinen Immunstatus der Nachwuchsleistungssportler widerspiegelt und somit als Grad der Belastbarkeit in der Praxis genutzt werden kann. Die Bestimmung der zellvermittelten EBV-spezifischen Immunantwort erforderte eine grundlegende Etablierung und Validierung eines neu auf dem Markt befindlichen IFN- γ /IL-2 FluoroSpot-Assays, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Um eine differenziertere Aussage über den Einfluss der mit dem Hochleistungssport verbundenen psychischen und physischen Belastungen auf die EBV-spezifische Immunantwort treffen zu können, wurden die genannten diagnostisch-serologischen und immunologischen Parameter der Nachwuchsleistungssportler zu Zeitpunkten verschiedener Belastungsintensitäten (Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase) bestimmt und ausgewertet.

Zusammenfassend zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer, der EBV-Last und der EBV-spezifischen zellvermittelten Immunantworten der Nachwuchsleistungssportler, verglichen mit den Kontrollprobanden. Hinsichtlich der verschiedenen Belastungsphasen, wurden signifikant höhere anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Wettkampfphase, verglichen mit der Intensivierungsphase und im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit, konnte die Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports, bezogen auf die EBV-spezifische Immunantwort in dem getesteten Kollektiv, nicht bestätigt werden. Weiter zeigte sich, dass die individuelle EBV-spezifische Immunantwort nicht als funktioneller Biomarker, welcher den allgemeinen Immunstatus eines Nachwuchsleistungssportlers widerspiegelt und somit den Grad der Belastbarkeit in der Praxis aufzeigen soll, genutzt werden kann.

Summary

There is an ongoing discussion in the field of competitive sports, if a compromised immune function exists in athletes due to extensive exercise and mental stress. Recurrent upper respiratory tract infections (URTI) are often associated with an Epstein-Barr virus (EBV) infection, because no causative pathogen could be evidenced. The aim of the present work was to verify the hypothesis of an immunity-weakening effect of competitive sports, in relation to the EBV-specific immune response. Therefore, the individual EBV serostatus, the amount of anti-EBV IgG-titers, the EBV load and the EBV-specific cell-mediated immunity (CMI) was determined and analyzed in a group of young competitive athletes and an age-matched non-athlete group.

Based on the obtained results, this work should question if the individual EBV-specific immune response could be used as a kind of biomarker, which reflects the grade of resilience and the overall immune status of an athlete. All diagnostic, serological and immunological parameters of the young competitive athletes were determined during different periods of physical and mental stress (regeneration-, training-, competition period), to strengthen the output of this study. The determination of the EBV-specific CMI during this work included the establishment and validation of the relative new method of the IFN- γ /IL-2 FluoroSpot assay.

In summary, no significant difference, regarding anti-EBV IgG-titers, EBV load and EBV-specific cell-mediated immunity was detected between a cohort of young competitive athletes and the non-athletes group. Analyzing EBV-specific IgG-titers of the athletes during the different intensification phases yielded significantly higher titers during the competition phase compared to the training phase. In addition, EBV-specific IgG-titers of the athletes were significantly higher during the competition phase in comparison to the non-athletes group.

In conclusion, the hypothesis of an immunity-weakening effect of competitive sports, in relation to the EBV-specific immune response could not be certified in a cohort of young competitive athletes. Furthermore, the present work showed that the individual EBV-specific immune response could not be used as a biomarker, which reflects the grade of resilience and the overall immune status of an individual athlete.

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
AS	Aminosäure
BL	Burkitt-Lymphom
CAEBV	chronisch aktive EBV-Infektion
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
CMI	Zellvermittelte Immunantwort (<i>cell-mediated immunity</i>)
CMV	Cytomegalovirus
CR2	Komplementrezeptor 2 (<i>complement receptor type 2</i>)
CTL	Zytotoxische T-Zellen (<i>cytotoxic T cells</i>)
CV	Variationskoeffizient (<i>coefficient of variation</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EA	frühe Antigene (<i>early antigens</i>)
EBV	Epstein-Barr Virus
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>enzyme linked immuno spot assay</i>
FCS	fetales Kälberserum
FluoroSpot	<i>fluorescent based immuno spot assay</i>
GEQ	Genomäquivalente
GP	Glykoproteine
HHV	Humanes Herpesvirus

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HLH	hämophagozytische Lymphohistiozytose
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IEA	sehr frühe Antigene (<i>immediate early antigens</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
IR	interne Sequenzwiederholungen (<i>internal repeat</i>)
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
LF	linker Leserahmen (<i>left frame</i>)
LLOQ	untere Quantifizierungsgrenze (<i>lower limit of quantification</i>)
LOD	Detektionslimit (<i>limit of detection</i>)
LPD	<i>lymphoproliferative disease</i>
LTB4	Leukotriene B4
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	Multiple Sklerose
nm	Nanometer
NPC	Nasopharynxkarzinom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

OriP	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pDC	plasmacytoide DC
PID	primäre Immundefizienz (<i>primary immunodeficiency</i>)
PRR	<i>pattern-recognition-receptors</i>
PTLD	Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (<i>post-transplant lymphoid disorder</i>)
RA	rheumatoide Arthritis
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RF	rechter Leserahmen (<i>right frame</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SFC	Zytokin-sekretierende Zellen, Spot-bildende Zellen (<i>spot forming cells</i>)
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SOT	solide Organtransplantation (<i>solid organ transplantation</i>)
T_H	T-Helferzelle
TLR	<i>toll-like receptors</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	terminale Sequenzwiederholungen (<i>terminal repeat</i>)
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
ULOQ	obere Quantifizierungsgrenze (<i>upper limit of quantification</i>)

URTI	Infektion der oberen Atemwege (<i>upper respiratory tract infection</i>)
U_s	singuläre kurze Sequenz (<i>unique short</i>)
U_L	singuläre lange Sequenz (<i>unique long</i>)
VCA	Virus-Kapsid-Antigene (<i>virus capsid antigene</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organization</i>)
XLP	X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)

1.1.1 Taxonomie und Entdeckung

Das Epstein-Barr Virus (EBV), welches auch als humanes Herpesvirus 4 (HHV4) bezeichnet wird, gehört zur Gattung der Lymphocryptoviren, welche innerhalb der Familie der Herpesviren zu den Gammaherpesviren gezählt werden. EBV stellt das einzige humanpathogene Lymphocryptovirus dar (Kutok & Wang, 2006) und ist mit einer weltweiten Durchseuchungsrate von 90 - 95 % weit verbreitet (Cohen, 2000) (Beltran et al., 2009). Mit allen Herpesviren hat EBV die Eigenschaft gemeinsam, nach der Primärinfektion in einen latenten Infektionszyklus überzugehen und somit lebenslang im Wirt zu persistieren. Das EBV ist mit einer Vielzahl von malignen und nicht-malignen Krankheiten assoziiert und wurde 1997 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO, *world health organization*) als Tumovirus klassifiziert.

Anthony Epstein und Yvonne Barr gelten zwar als die Entdecker des EBV, eigentlich ist es jedoch primär den Beobachtungen des britischen Chirurgen Dennis Burkitt zu verdanken, dass dieses Virus entdeckt wurde. Er beschrieb als Erster einen in Ost- und Zentralafrika gehäuft auftretenden Tumor, dass später nach ihm benannte Burkitt-Lymphom (BL) (Burkitt, 1958; Burkitt & O'Connor, 1961). Anthony Epstein, Yvonne Barr und Bert Achong wurden 1961 auf die von Dennis Burkitt beschriebenen Lymphome aufmerksam und untersuchten diese daraufhin nach Tumor-auslösenden Viren. 1964 gelang ihnen aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von kultivierten Tumorzellen schließlich der Nachweis von EBV in BL (Epstein, Achong, & Barr, 1964). Nach derzeitigem Stand werden 1 - 2 % der humanen Tumorerkrankungen durch das EBV verursacht (Young & Rickinson, 2004).

1.1.2 Morphologie

Epstein-Barr Viruspartikel (Virionen) haben einen Durchmesser von ca. 120 nm und werden aus über 30 Strukturproteinen zusammengesetzt (Abbildung 1.1 A). Das doppelsträngige lineare DNS-Genom (172 kbp) bildet innerhalb des Virions mit verschiedenen viralen Proteinen einen DNS-Proteinkomplex (*core*). Dieser ist von einem ikosaedrischen Nukleokapsid umgeben, welches aus 162 Kapsomeren besteht. Das sogenannte Tegument stellt die Schicht zwischen dem Kapsid und der von der inneren Kernmembran abgeleiteten Hüllmembran dar und beinhaltet folgende regulatorisch aktive Proteine: BPLF-1, BOLF-1, BBLF-1, BGLF-2, BSRF-1, BVRF-1, BGLF-1, BGLF-4, BNRF-1, BLRF-2, BRRF-2, BDLF-2, BKRF-4, BORF-2, BALF-2, BXLF-1 und BMRF-1 (Johannsen et al., 2004). Die Virushülle ist eine Lipiddoppelschicht, in welche virale Glykoproteine (hauptsächlich gp350/220) eingelagert sind, die unter anderem für

die Interaktion, die Anlagerung und das Eindringen in die Wirtszelle notwendig sind (Abbildung 1.1 B) (Connolly, Jackson, Jardetzky, & Longnecker, 2011).

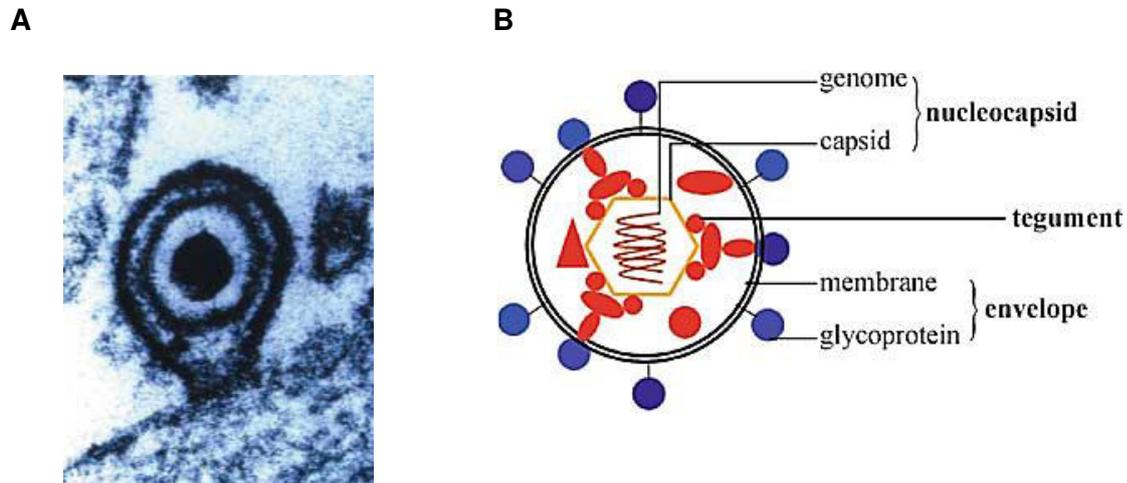


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme (A) und schematische Darstellung (B) eines Epstein-Barr Virions (Guo, Shen, Wang, & Deng, 2010; Young & Rickinson, 2004). Das lineare, doppelsträngige Genom (*genome*) bildet zusammen mit dem ikosaedrischen Kapsid (*capsid*) das Nukleokapsid. Das Tegument, welches viele virale Proteine beinhaltet, bildet die Schicht zwischen dem Kapsid und der inneren Hüllmembran. Die Virushülle (*envelope*) ist eine Lipiddoppelschicht, in welche virale Glykoproteine (*glycoprotein*) eingelagert sind.

1.1.3 Genomaufbau

Das doppelsträngige, lineare Genom des EBV umfasst 172 kbp und wurde als erstes Herpesvirus-Genom 1984 vollständig sequenziert (Baer et al., 1984; Cohen, 2000). An beiden Enden flankieren 0,5 kbp große terminale Sequenzwiederholungen (TR, *terminal repeats*) das Genom und umschließen eine singuläre kurze (U_s , *unique short*) und eine singuläre lange (U_L) Sequenzdomäne. Die U_s -Domäne besteht aus einer einzigen Sequenzdomäne (U_1) und ist durch eine interne Sequenzwiederholung (IR1) (IR, *internal repeats*) von der U_L -Domäne getrennt. Diese setzt sich aus vier verschiedenen Sequenzen ($U_2 - U_5$), die durch interne Sequenzwiederholungen (IR2 - 4) voneinander getrennt werden, zusammen (Abbildung 1.2) (Straus, Cohen, Tosato, & Meier, 1993).

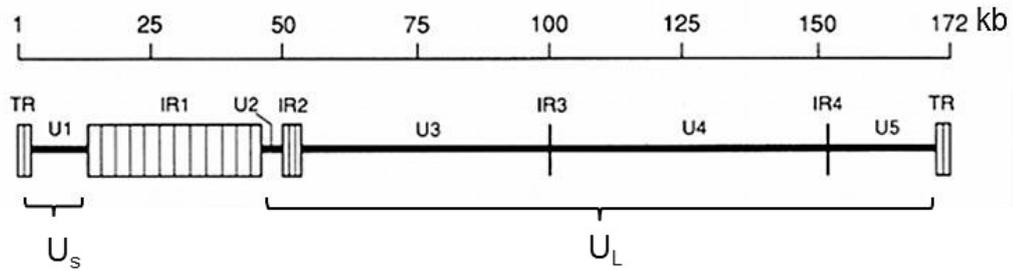


Abbildung 1.2: Die Struktur des linearen EBV-Genoms. Dargestellt ist die Struktur des linearen EBV-Genoms modifiziert nach Strauss et al. (Strauss et al., 1993). IR (1-4) = *internal repeat*; U_L (U2-5) = *unique long domain*; U_s (U1) = *unique short domain*.

Nach der Primärinfektion und während des latenten Infektionszyklus liegt das EBV-Genom zumeist in episomaler Form im Kern der Wirtszelle vor (Klein et al., 1974). Hierzu fusionieren die freien Enden der linearen DNS durch homologe Rekombination der TR (Abbildung 1.3) (Young & Rickinson, 2004).

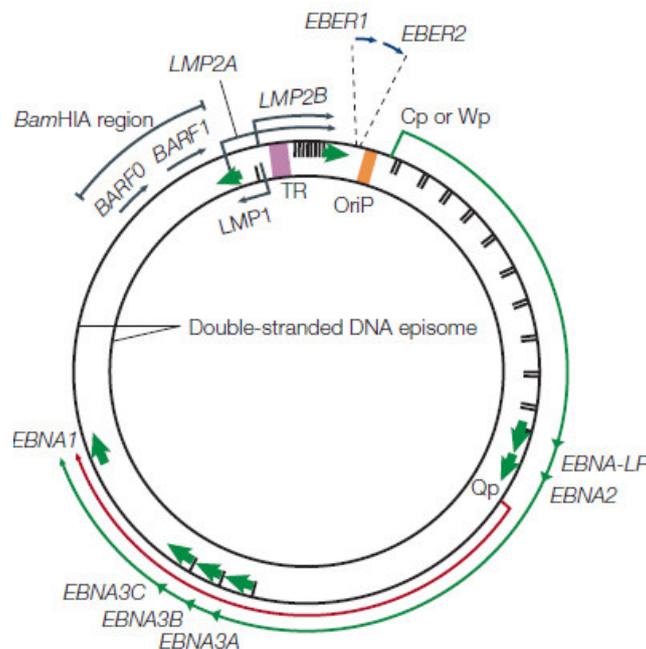


Abbildung 1.3: Die Struktur des episomalen EBV-Genoms. Dargestellt ist die Lage und Transkriptionsrichtung der latenten EBV-Gene auf dem episomalen EBV-Genom. Der Replikationsursprung (OriP, *origin of replication*) ist in orange dargestellt. Die grünen Pfeile zeigen die Exons und die Transkriptionsrichtung der latenten Proteine an. (Young & Rickinson, 2004)

In seltenen Fällen liegt das EBV-Genom in das Wirtsgenom integriert vor (Henderson, Ripley, Heller, & Kieff, 1983). Das EBV-Genom codiert eine Vielzahl an Genprodukten, welche aus sich z.T. überlappenden Leserahmen abgelesen werden. Die Nomenklatur dieser Genprodukte wurde anhand der Größe und Orientierung der erhaltenen Fragmente nach dem Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Bam*H1 vorgenommen. Das größte Fragment wurde demnach als A-

Fragment, das zweitgrößte als B-Fragment und die weiteren Fragmente der Größe nach alphabetisch absteigend bezeichnet. Die einzelnen Leserahmen, werden den Fragmenten auf denen sie liegen zugeordnet und durchnummeriert, wobei in der Bezeichnung darauf eingegangen wird, ob sie in rechter (RF, *right frame*) oder linker (LF, *left frame*) Leserichtung orientiert sind. So liegt zum Beispiel das Gen von BALF-1 in dem ersten nach links orientierten offenen Leserahmen des nach *Bam*H1 Verdau entstandenen A-Fragments (BamHI A Leftward open reading Frame 1).

1.2 Die Epstein-Barr Virusinfektion

1.2.1 Epidemiologie und Übertragung

Der Mensch gilt als der einzige natürliche Wirt des EBV und weltweit wird eine Durchseuchungsrate von 90 - 95 % in der adulten Bevölkerung angenommen (Beltran et al., 2009; Cohen, 2000). Die Primärinfektion mit EBV findet überwiegend im Kleinkindalter statt und verläuft zumeist asymptomatisch oder es kommt zu unspezifischen Symptomen einer Atemwegserkrankung (Kutok & Wang, 2006). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt über Speichel auf Epithelzellen der Mund- und Rachenschleimhaut, wo das Virus repliziert und nachfolgend zuerst naive B-Lymphozyten infiziert und später im B-Gedächtniszellpool lebenslang persistiert (Babcock, Decker, Volk, & Thorley-Lawson, 1998). Darüber hinaus ist eine EBV-Infektion von Mesenchym-, NK-, T-Zellen und Monozyten von verschiedenen Autoren beschrieben worden (Guerreiro-Cacais et al., 2004; Hutt-Fletcher, 2007; Kutok & Wang, 2006; Savard et al., 2000). Eine mögliche Übertragung des EBV durch Sexualkontakte (Enbom, Strand, Falk, & Linde, 2001; Woodman et al., 2005) und Blutprodukte (Scheenstra et al., 2004) kann bis heute nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Derzeit werden mehr als acht verschiedene EBV-Glykoproteine (gp) mit der Bindung an B- oder Epithelzellen in Verbindung gebracht (Hutt-Fletcher, 2007). Die Bindung des EBV an B-Zellen erfolgt jedoch hauptsächlich über das virale Hüllprotein gp350/220 (BLLF-1) und den zellulären Rezeptor CD21 (CR2, *complement receptor type 2*) (Fingeroth et al., 1984; Hutt-Fletcher, 2007; Tanner, Whang, Sample, Sears, & Kieff, 1988). Durch den Kontakt von gp350/220 mit CR2 und gp42 (BZLF-2) mit dem HLA (humane Leukozyten-Antigen) -Klasse II-Molekül der Wirtszellmembran kommt es mittels Endozytose zur Infektion von B-Zellen mit EBV-Partikeln (Chesnokova & Hutt-Fletcher, 2014). Für diesen Vorgang ist eine Interaktion der viralen Glykoproteine gp110 und gp42 und des Glykoproteinkomplexes gp85gp25 notwendig (Hutt-Fletcher, 2007; Q. Li, Turk, & Hutt-Fletcher, 1995; Miller & Hutt-Fletcher, 1992). Mittlerweile ist bekannt, dass EBV auch über andere Rezeptoren als das CD21-Molekül an B-Zellen und Epithelzellen binden kann (Janz et al., 2000). Ogembo et al. konnten kürzlich CD35, welches

auf B-Zellen, Monozyten, Neutrophilen, dendritischen Zellen (DC, *dendritic cells*) und Subpopulationen von T-Zellen exprimiert wird, als einen weiteren zellulären Rezeptor für die Bindung von EBV-Partikeln ausmachen (Ogembo et al., 2013). Die Infektion von Epithelzellen erfolgt hauptsächlich über eine Bindung des viralen gp85gp25-Komplexes an zelluläre Integrin-Rezeptoren und einer Fusion mit der Zellmembran (Connolly et al., 2011).

1.2.2 Der EBV-Infektionszyklus

Das EBV weist wie alle Herpesviren zwei verschiedene Lebenszyklen auf: Einen lytischen und einen latenten Infektionszyklus. Während der EBV-Primärinfektion kommt es zu einer polyklonalen B-Zellaktivierung, welche mitunter von einer stark ausgeprägten humoralen und zellulären Immunantwort gefolgt wird. Nach erfolgter Primärinfektion und lytischer Virusvermehrung liegt das EBV in gesunden Individuen normalerweise im latenten Infektionszyklus in B-Lymphozyten vor (Tierney, Steven, Young, & Rickinson, 1994). Die meisten latent infizierten B-Zellen zeigen hierbei eine begrenzte virale Genexpression, welche dem EBV eine lebenslange Persistenz im Wirt ermöglicht.

1.2.2.1 Der lytische EBV-Infektionszyklus

Der lytische EBV-Infektionszyklus ist die Voraussetzung für die Produktion von Viruspartikeln und die Verbreitung des EBV an weitere Zellen und Individuen. Ein lytischer Infektionszyklus tritt initial während der EBV-Primärinfektion auf und führt zu einer massiven Virusvermehrung und -ausscheidung in den Rachenraum. In gesunden Virusträgern kommt es auch während des latenten EBV-Infektionszyklus temporär zu einer lytischen EBV-Replikation und einer Virusausscheidung über den Speichel. Vermutlich beruht dies auf latent infizierten B-Gedächtniszellen, welche in die Tonsillen einwandern, einer Differenzierung in Plasmazellen untergehen und so eine EBV-Produktion initiieren (Laichalk, Hochberg, Babcock, Freeman, & Thorley-Lawson, 2002). Des Weiteren kann es aus verschiedenen Gründen zu einer EBV-Reaktivierung und dem damit verbundenen Übergang in den lytischen Infektionszyklus und einer Virusvermehrung kommen. Da eine EBV-Replikation nur in sich teilenden B-Zellen möglich ist, kann z.B. durch andere auftretende Infektionen und dem damit verbundenen Vorhandensein von Fremdartigen eine Differenzierung der B-Zellen in Plasmazellen stattfinden und so eine EBV-Reaktivierung ausgelöst werden (Laichalk & Thorley-Lawson, 2005). Als weitere mögliche Auslöser einer EBV-Reaktivierung gelten psychischer und physischer Stress (Glaser et al., 1999; Reid, Gleeson, Williams, & Clancy, 2004) oder ein durch ärztliche Behandlung supprimiertes Immunsystem, welches einen Verlust der Immunkontrolle der EBV-Infektion zur Folge hat (Laichalk & Thorley-Lawson, 2005). Während des lytischen Infektionszyklus werden verschiedene EBV-Gene exprimiert, welche man nach dem Zeitpunkt ihrer Aktivierung drei verschiedenen Stadien zuordnen kann. Von den sehr früh aktivierten

Genen werden die sogenannten sehr frühen Antigene (IEA, *immediate early antigens*) kodiert. Zu diesen zählt man BZLF-1 und BRLF-1, deren Expression essenziell für den Wechsel vom latenten in den lytischen EBV-Infektionszyklus ist (Biggin, Bodescot, Perricaudet, & Farrell, 1987; Countryman & Miller, 1985; Rooney, Rowe, Ragot, & Farrell, 1989). Die Expression der nachfolgenden, sogenannten frühen Antigene (EA, *early antigens*), findet noch vor der Replikation des viralen Genoms statt und wird von den IEA durch Bindung an die entsprechenden Promotorbereiche induziert. Die sehr frühen und frühen Genprodukte sind in den Nukleotidmetabolismus und den DNS-Replikationsmechanismus involviert (Fixman, Hayward, & Hayward, 1992). Gegen Ende des lytischen Zyklus erfolgt die Expression der späten Gene, welche in erster Linie EBV-Strukturproteine für die Herstellung infektiöser EBV-Partikel kodieren.

1.2.2.2 Der latente EBV-Infektionszyklus

Trotz der Entwicklung einer robusten T-Zellantwort während der Primärinfektion etabliert das EBV, aufgrund einer Herunterregulierung der Genexpression, einen latenten Infektionsstatus in B-Gedächtniszellen (Hislop, Taylor, Sauce, & Rickinson, 2007; A. B. Rickinson & Moss, 1997). Lediglich die Expression von EBNA-1 ist für die Aufrechterhaltung des latenten Infektionszyklus des EBV in replizierenden B-Gedächtniszellen notwendig (Heslop, 2009). Da das EBNA-1 Protein aufgrund von Glycin-Alanin Wiederholungssequenzen die Initiation der mRNA-Translation verhindert und so dem MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex, *major histocompatibility complex*)-Klasse I-abhängigen Antigenpräsentationsweg entgeht und folglich kaum vom menschlichen Immunsystem erkannt wird, ist das EBV in der Lage eine lebenslange Persistenz im Menschen aufrecht zu halten (Apcher, Daskalogianni, Manoury, & Fahraeus, 2010; Levitskaya et al., 1995). Während des Latenzstadiums 0, welches in ruhenden, peripheren B-Gedächtniszellen auftritt, wird auch die Genexpression von EBNA-1 gestoppt und somit entgeht das Virus jeglicher Möglichkeit vom menschlichen Immunsystem erkannt zu werden (Babcock et al., 1998). Aufgrund der Expression verschiedener EBV-Gene unterscheidet man vier Latenzformen, welche unterschiedlichen EBV-assoziierten Krankheiten zugeordnet werden können (Hochberg et al., 2004; Tierney et al., 1994):

Latenzstadium 0: Expression von EBER (EBV-encoded RNA)-1 und -2 (ruhende B-Gedächtniszellen)

Latenzstadium I: Expression von EBNA-1 und EBER-1 und -2 (Burkitt-Lymphom)

Latenzstadium II: Expression von EBNA-1, EBER-1 und -2, LMP-1 und/oder LMP-2A, -2B (Hodgkin-Lymphom, Nasopharynxkarzinom)

Latenzstadium III: Expression von allen latenten Genprodukten (EBER-1 und -2, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP)
(naive und Keimzentrum-B-Zellen, PTLD, T-, NK-Zelllymphome)

1.3 EBV-spezifische Immunantworten

Die Häufigkeit und Schwere EBV-assoziiierter Erkrankungen in immungeschwächten Personen ist ein Hinweis auf die grundlegende Bedeutung der EBV-spezifischen Immunantwort bei der Kontrolle der EBV-Infektion. Abbildung 1.4 zeigt eine schematische Darstellung der EBV-Infektion und -Persistenz sowie der damit verbundenen EBV-spezifischen Immunantworten im gesunden Virusträger. Die symptomatische EBV-Primärinfektion (Infektiöse Mononukleose, IM) induziert eine NK-Zellaktivierung (NK = natürliche Killerzelle), eine massive Expansion EBV-spezifischer CD8 T-Zellen und eine geringe Expansion Virus-spezifischer CD4 T-Zellen. Nach Ablauf der IM verbleiben geringe Frequenzen EBV-spezifischer T-Gedächtniszellen im Blut gesunder EBV-Träger nachweisbar.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die innate und adaptive EBV-spezifische Immunantwort näher dargelegt.

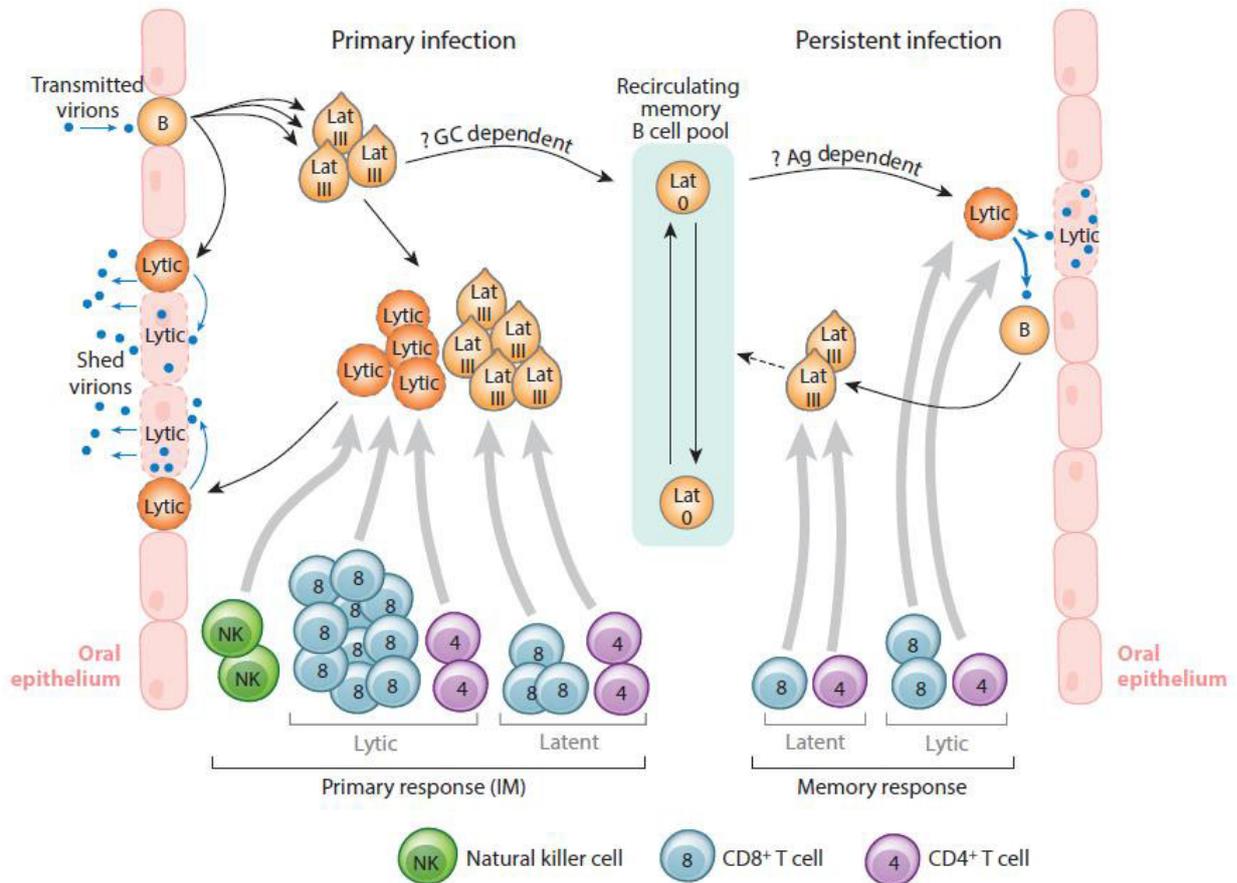


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der EBV-Primärinfektion und -Persistenz sowie der damit verbundenen EBV-spezifischen Immunantwort im gesunden Virusträger. Während der Primärinfektion (rechte Bildseite) etabliert über Speichel aufgenommenes EBV einen lytischen Infektionsstatus in Epithel- und B-Zellen des Rachenraumes. Nachfolgend erfolgt eine Infektion von B-Zellen des peripheren lymphoiden Gewebes (Latenzstadium III). Einige dieser B-Zellen regulieren die Genexpression herunter, entgehen so der Entdeckung durch das Immunsystem und bilden einen Pool von latent infizierten EBV-Antigen-negativen (Latenzstadium 0) B-Gedächtniszellen. Diese zirkulieren im Blut und im lymphatischen Gewebe des Oropharynx. Gelegentlich kommt es, womöglich durch Antigen-induzierte Differenzierung in B-Plasmazellen, zu einer lytischen Reaktivierung von zuvor latenten B-Gedächtniszellen und einer damit verbundenen Virusproduktion und Ausschüttung in das oropharyngeale Epithelium. Im immunkompetenten Menschen unterliegen viele dieser Vorgänge der Kontrolle des Immunsystems. Die symptomatische EBV-Primärinfektion (IM) induziert eine NK-Zellaktivierung, eine massive Expansion EBV-spezifischer CD8 T-Zellen und eine geringe Expansion Virus-spezifischer CD4 T-Zellen. Nach Ablauf der IM verbleiben geringe Frequenzen EBV-spezifischer T-Gedächtniszellen während der persistierenden EBV-Infektion (rechte Bildseite) im Blut von EBV-Trägern. Die blauen Pfeile zeigen die Bewegung von infektiösen Virionen, schwarze Pfeile zeigen den Verlauf infizierter Zellen und die breiten grauen Pfeile illustrieren die Interaktion der zellulären EBV-spezifischen Immunabwehr mit infizierten Zellen. Ag = Antigen; EBV = Epstein-Barr Virus; GC = Keimzentrum; IM = Infektiöse Mononukleose; Lat 0 = Latenzstadium 0; Lat III = Latenzstadium III; NK = NK-Zelle (Taylor, Long, Brooks, Rickinson, & Hislop, 2015).

1.3.1 Die innate Immunkontrolle der EBV-Infektion

In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, dass neben dem adaptiven auch das innate Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der EBV-Infektion einnimmt (Levitsky & Masucci, 2002; Martorelli et al., 2012; Savard & Gosselin, 2006). Direkte oder indirekte Interaktionen mit dem EBV sind bereits für NK-Zellen, Neutrophile, Monozyten und Dendritische Zellen (DC, *dendritic cells*) beschrieben worden (Martorelli et al., 2012).

Im Laufe einer EBV-Primärinfektion expandieren NK-Zellen und als Folge einer Aktivierung durch myeloide und plasmacytoide DC (pDC), produzieren NK-Zellen Zytokine (z.B. IFN (Interferon)- γ), proliferieren und erhöhen ihre zytotoxischen Kapazitäten (Azzi et al., 2014; Balfour et al., 2013; Degli-Esposti & Smyth, 2005; A. B. Rickinson, Long, Palendira, Munz, & Hislop, 2014; Williams et al., 2005). Azzi et al. zeigten, dass vor allem eine bestimmte Subpopulation von NK-Zellen ($CD56^{\text{dim}}CD16^-$) während einer IM proliferiert und *in vitro* lytisch mit EBV infizierte Zellen erkennt (Azzi et al., 2014). Während des Säuglingsalters und im Verlauf der Kindheit nimmt die Frequenz und absolute Anzahl dieser $CD56^{\text{dim}}CD16^-$ NK-Zellen jedoch ab. Die altersabhängige Reduzierung dieser NK-Zellsubpopulation und die damit verbundene Einschränkung der Kontrolle der EBV-Primärinfektion durch NK-Zellen, könnte ein Grund dafür sein, dass in jugendlichen und erwachsenen Personen die CD8 T-Zellantwort diese Funktion übernimmt und zu einer starken Lymphozytose und den Symptomen einer IM führt (Azzi et al., 2014; Chijioke, Muller, et al., 2013). Studien in humanisierten Mäusen zeigten, dass eine Depletion von NK-Zellen zu einer Erhöhung der EBV-Last und einer Expansion EBV-spezifischer CD8 T-Zellen in Verbindung mit einer erhöhten Zytokin-Produktion führte (Leung et al., 2013; A. B. Rickinson et al., 2014). *In vitro* Studien zeigten eine starke IFN- γ -Sekretion DC-aktivierter NK-Zellen nach Restimulation mit EBV-Antigenen und eine daraus resultierende verzögerte Expression latenter EBV-Antigene sowie verzögerte B-Zellproliferation (Strowig et al., 2008). Neben einem antiviralen Effekt auf EBV-infizierte Zellen kann das von DC-aktivierten NK-Zellen sekretierte IFN- γ auch Einfluss auf die adaptive EBV-spezifische Immunantwort nehmen, indem diese in Richtung einer T_H1 Immunantwort gerichtet wird (Martorelli et al., 2012). Eine primäre Immunschwächekrankheit (PID, *primary immunodeficiency*), welche durch einen NK-Zell-Defekt gekennzeichnet und mit einer EBV-induzierten lymphoproliferativen Funktionsstörung in Verbindung gebracht wird (Eidenschenk et al., 2006), ist ein weiteres Indiz dafür, dass NK-Zellen eine erste Immunabwehr gegen das EBV stellen und eine ungehinderte Virusvermehrung eindämmen, bis Virus-spezifische T-Zellen des adaptiven Immunsystems eine lebenslange Kontrolle der EBV-Infektion etablieren.

Während der ersten Phase einer EBV-Primärinfektion kommt es zudem zu einem Anstieg neutrophiler Zellen, welcher jedoch häufig in eine vorübergehende Neutropenie während der dritten und vierten Woche der IM-Erkrankung übergeht (Kagoya, Hangaishi, Takahashi, Imai, &

Kurokawa, 2010). Durch eine EBV-Infektion aktivierte Neutrophile produzieren und sekretieren IL-1, IL-8, MIP-1 α , LTB $_4$, was wiederum eine aktivierende Wirkung auf die EBV-spezifische Immunantwort hat (McColl, Roberge, Larochelle, & Gosselin, 1997; Peters-Golden, Canetti, Mancuso, & Coffey, 2005; Savard & Gosselin, 2006). Im Gegensatz dazu wirkt die EBV-induzierte Hochregulierung des IL-1-Rezeptor-Antagonisten neutralisierend auf die pro-inflammatorische Aktivität von IL-1 und hat eine Hemmung der EBV-spezifischen Immunantwort zur Folge (Arend, Malyak, Guthridge, & Gabay, 1998; Levitsky & Masucci, 2002; Roberge, Poubelle, Beaulieu, Heitz, & Gosselin, 1996; Savard & Gosselin, 2006). Das EBV besitzt somit immunregulatorische Fähigkeiten, welche auf der einen Seite die EBV-spezifischen Immunität fördern, auf der anderen Seite jedoch spezifische Immunantworten unterdrücken, die Eliminierung des EBV somit verhindern und eine lebenslange Persistenz ermöglichen.

Auch für Monozyten ist beschrieben, dass sie zeitnah an den Ort einer viralen Infektion wandern und durch Antigen-Prozessierung, Aktivierung humoraler Immunantworten und der Etablierung von zytotoxischen T-Zellen (CTL, *cytotoxic T cells*) eine spezifische antivirale Immunantwort initiieren (Savard & Gosselin, 2006). Während der akuten Phase einer IM wurde jedoch von Monozytopenien berichtet und EBV-infizierte Monozyten zeigten eine verminderte phagozytische Aktivität (Savard et al., 2000). Die Tatsache, dass in Patienten mit einem EBV-assoziierten Hodgkin-Lymphom ein Defekt in der Monozyten-vermittelten Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) vorliegt, gibt einen Hinweis auf den Einfluss einer EBV-Infektion auf die Funktionalität von Monozyten (Savard & Gosselin, 2006; Svedmyr et al., 1984). Zum Zeitpunkt einer IM blockiert das EBV die Entwicklung von Monozyten-Vorläuferzellen in reife DC und führt somit zu einem Zustand verminderter EBV-spezifischer Immunaktivität und Zytokinsekretion (L. Li et al., 2002). Dadurch wird eine effiziente Virusvermehrung und -infektion von B-Lymphozyten und die Etablierung einer lebenslangen Latenz in B-Gedächtniszellen des Wirtes ermöglicht (Savard & Gosselin, 2006).

Eine weitere wichtige Komponente des innatens Immunsystems sind *pattern-recognition-receptors* (PRR), welche Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) erkennen. Eine der bekanntesten PRR, sind sogenannte *toll-like receptors* (TLR), deren Aktivierung während einer IM, sowohl antivirale, als auch die Virus-Latenz fördernde Eigenschaften hat. So ist für TLR7 beschrieben, dass dieser EBV-Partikel über eine Interaktion mit dem viralen Hüllprotein gp350 erkennt (Gaudreault, Fiola, Olivier, & Gosselin, 2007). pDC erkennen EBV über TLR9, was in Kombination mit einer TLR7-Aktivierung zur Produktion von Typ-I IFN und zur Aktivierung von NK- und IFN- γ -produzierenden CD3 $^+$ T-Zellen führt (Fiola, Gosselin, Takada, & Gosselin, 2010; Lim, Kireta, Russ, & Coates, 2007). EBV ist jedoch in der Lage auch dieser innatens Immunabwehr zu

entgehen, indem es die Funktionalität des TLR9-Signalweges beeinträchtigt und die TLR9-Transkription durch das virale Protein LMP-1 herunter reguliert (Fathallah et al., 2010). EBER, welche im Serum von Patienten mit IM, chronisch aktiver EBV-Infektion (CAEBV) und/oder EBV-assoziiertes hämophagozytisches Lymphohistiozytose (EBV-HLH) nachgewiesen werden können, induzieren die Produktion von Typ-I IFN und inflammatorischen Zytokinen über den TLR3-vermittelten Signalweg. Diese Prozesse könnten wesentlich zur Immunpathogenese dieser EBV-assoziierten Krankheitsbilder beitragen (Iwakiri et al., 2009).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die innate EBV-spezifische Immunantwort eine erste wichtige Abwehr- und Kontrolleinheit zum Zeitpunkt einer EBV-Primärinfektion darstellt. Sie ist jedoch nicht in der Lage eine EBV-Infektion und nachfolgende Persistenz des Virus zu verhindern, da das EBV über verschiedene Immunevasionsstrategien verfügt, um der innate EBV-spezifischen Immunantwort zu entgehen (Arend et al., 1998; Levitsky & Masucci, 2002; Roberge et al., 1996; Savard & Gosselin, 2006).

1.3.2 Die adaptive EBV-spezifische Immunantwort

Die bedeutende Rolle des adaptiven Immunsystems bei der Kontrolle der EBV-Infektion ist bekannt und detailliert untersucht. Man unterscheidet hierbei zwischen der humoralen und der zellulären EBV-spezifischen Immunantwort.

1.3.2.1 Die humorale EBV-spezifische Immunantwort

Die Rolle der humoralen EBV-spezifischen Immunantwort ist noch nicht vollständig verstanden. Die im zeitlichen Verlauf der EBV-Infektion nachgewiesene große Bandbreite von EBV-Antikörperspezifitäten, weist auf eine sehr interindividuelle humorale EBV-spezifische Immunantwort hin (Middeldorp, 2015). Bestimmte Krankheitsentitäten weisen jedoch meist sehr distinkte EBV-spezifische IgM-, IgG- und IgA-Antikörpermuster auf (Middeldorp, 2015). Die in der Literatur verfügbaren Informationen zur humoralen EBV-spezifischen Immunantwort wurden zumeist anhand von Studien mit IM-Patienten gewonnen. Die Antikörper-vermittelte EBV-spezifische Immunantwort bei länger zurückliegender IM scheint sich in ihrer Zusammensetzung jedoch nicht grundsätzlich von der in Individuen mit asymptomatischer EBV-Infektion zu unterscheiden (Middeldorp, 2015). Während einer IM kommt es zu einer polyklonalen Aktivierung von B-Zellen, was zu einem vorübergehenden Anstieg von heterophilen Immunglobulinen und Autoantikörpern, zumeist der IgM-Klasse, führt (Garzelli et al., 1984).

Im Verlauf der EBV-Primärinfektion werden EBV-spezifische IgM-, IgA- und IgG-Antikörper gegen frühe lytische EBV-Proteine (IEA, EA) und die Strukturproteine (vor allem gegen die immundominanten VCA-Proteine p18, p23 und gp350) gebildet (Middeldorp, 2015). Zu Beginn einer IM und mit dem Auftreten der ersten Symptome sind zumeist IgM-Antikörper gegen Virus-Kapsid-Antigene (VCA) nachweisbar, welche einen Gipfel nach vier Wochen erreichen und nach acht Wochen mit Beginn der rekonvaleszenten Phase meist nicht mehr nachweisbar sind (Abbildung 1.5). Anti-VCA IgG-Antikörper sind ebenfalls kurze Zeit nach dem Auftreten einer IM detektierbar, bleiben aber nach dem Übergang in den latenten EBV-Infektionszyklus zusammen mit den später auftretenden anti-EBNA IgG-Antikörpern zumeist lebenslang im Menschen nachweisbar (Luzuriaga & Sullivan, 2010) (Abbildung 1.5). Das relativ späte Auftreten von EBNA-1-Antikörpern am Ende der IM korreliert mit der späten Entwicklung von EBNA-1 spezifischen CD4 T-Zellantworten nach einer EBV-Primärinfektion (Henle et al., 1987; Long et al., 2013; Woodberry et al., 2005). IgG-Antikörper gegen EA (zumeist gegen die immundominanten p54- und p138-Proteine) sind oft kurz nach dem Auftreten von anti-VCA IgM-Antikörpern für drei bis sechs Monate nachweisbar (Middeldorp, 2015) (Abbildung 1.5).

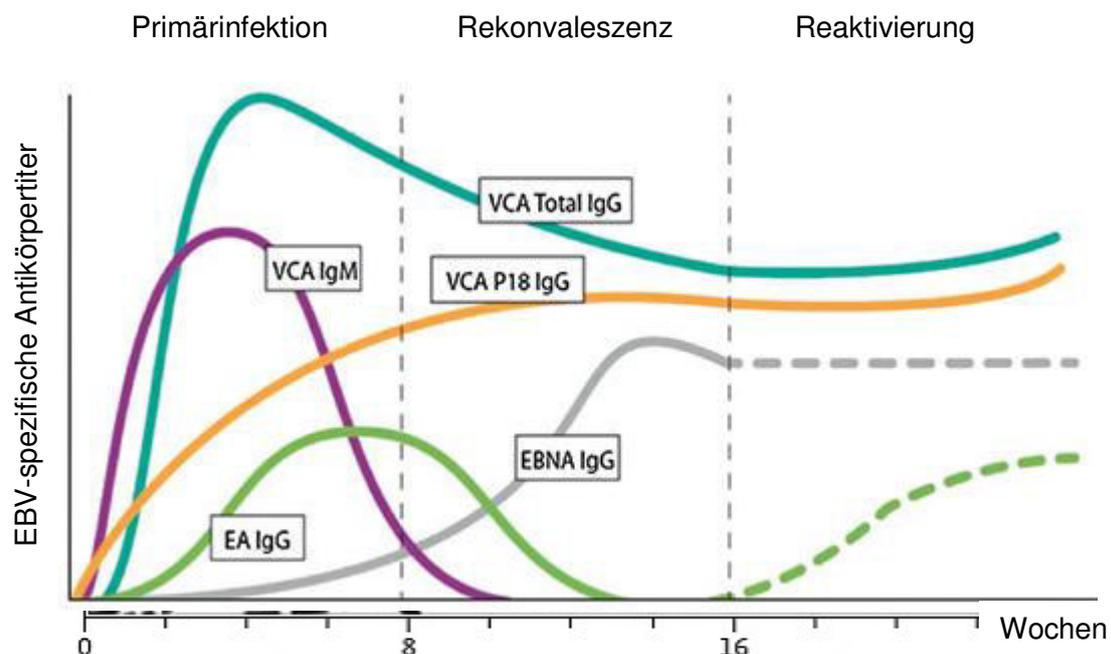


Abbildung 1.5: EBV-spezifische Antikörpertiter während der Primärinfektion, der rekonvaleszenten Phase und des Übergangs in eine EBV-Reaktivierung (Middeldorp, 2015). Frühe Antigene (EA, *early antigen*); Virus-Kapsid-Antigene (VCA, *virus capsid antigen*); EBV-nukleäres Antigen (EBNA; hier EBNA-1). Die gestrichelte grüne Linie für EA IgG-Antikörper zeigt einen möglichen Anstieg der Antikörpertiter während einer Reaktivierung an. Die gestrichelte graue Linie für EBNA1 IgG-Antikörper zeigt einen möglichen Anstieg (maligne Erkrankung) oder einen Verlust (Chronische EBV-Infektion) der EBNA-1-Antikörpertiter an. Modifiziert nach Middeldorp (Middeldorp, 2015).

Anti-gp350 IgM-Antikörper treten in geringen Mengen während einer IM auf. Neutralisierende anti-gp350 IgG-Antikörper treten dagegen spät im Verlauf einer IM in Erscheinung, sind dann aber lebenslang vorhanden (Middeldorp, 2015). Auch IgA-Antikörper gegen gp350 sind vorübergehend während einer IM nachweisbar (Sixbey & Yao, 1992). Anti-EBNA-2 IgG-Antikörper treten bald nach dem Krankheitshöhepunkt einer IM auf, nehmen danach schnell in ihrer Konzentration wieder ab und bleiben, wenn überhaupt, nur in geringen Mengen erhalten. Des Weiteren werden weniger häufig anti-EBNA-3c- und sehr selten anti-LMP-Antikörper in Seren gesunder, EBV-seropositiver Probanden gefunden (Leen et al., 2001). Generell scheint es so zu sein, dass mit Ausnahme von EBNA-1, gegen andere latente und Tumor-assoziierte EBV-Antigen wie LMP-1, LMP-2 und BARF-1 gar keine bzw. nur sehr schwache humorale Immunantworten in EBV-seropositiven Individuen bestehen (Middeldorp, 2015). Diese Tatsache beruht vermutlich auf einer fehlenden Präsentation von immunogenen Formen dieser Proteine, aufgrund ihrer hydrophoben Struktur und/oder ihrer Verbindung mit Wirtsproteinen und – Exosomen (Dukers et al., 2000; Verweij et al., 2011). Obwohl anti-VCA- und oft auch anti-EBNA-1 Antikörper lebenslang im Menschen vorhanden sind, scheinen sie keine alleinige protektive Rolle in der Immunabwehr zu spielen (A. B. Rickinson et al., 2014).

1.3.2.2 Die zelluläre EBV-spezifische Immunantwort

Die zelluläre EBV-spezifische Immunantwort spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der EBV-Infektion. Es ist bekannt, dass Patienten mit einer angeborenen oder iatrogenen T-Zell-Dysfunktion ein deutlich erhöhtes Risiko tragen eine EBV-assoziierte Tumorerkrankung zu entwickeln (A. Rickinson & Kieff, 2006). Des Weiteren stellt die Übertragung polyklonaler EBV-spezifischer T-Zelllinien eine oft erfolgreiche Therapiemöglichkeit Posttransplantations-Lymphoproliferativer Erkrankungen (PTLD) nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) dar, und ist somit ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung einer funktionalen zellulären EBV-spezifischen Immunantwort bei der Kontrolle einer EBV-Infektion (Rooney et al., 1998).

1.3.2.2.1 Die EBV-spezifische CD4 T-Zellantwort

Die EBV-spezifische CD4 T-Zellantwort ist weitaus weniger gut erforscht, als die CD8 T-Zellantwort, was unter anderem an den schwierigeren Verfahren zur Identifikation von MHC-II-verglichen mit MHC-I-restringierten Epitopen (Milosevic, Behrends, Adhikary, & Mautner, 2006) und den Schwierigkeiten bei der Herstellung von MHC-II Multimeren, welche wichtig für die Charakterisierung der CD4 T-Zellantwort sind (Amyes et al., 2003), liegt. Mittlerweile gibt es jedoch vermehrt Hinweise darauf, dass auch der EBV-spezifischen CD4 T-Zellantwort eine entscheidende Rolle in der EBV-spezifischen Immunantwort zukommt. So konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Anzahl an CD4 T-Zellen in immunsupprimierten Patienten nach solider Organtransplantation (SOT, *solid organ transplantation*), mit einem steigenden Risiko für

die Entwicklung einer EBV-assoziierten PTLD korreliert (Sebelin-Wulf et al., 2007). Darüber hinaus zeigten Patienten mit einer PTLD einen besseren klinischen Verlauf, wenn die zur adoptiven Therapie eingesetzten T-Zelllinien einen höheren CD4 T-Zellanteil aufwiesen (Haque et al., 2007). Auch das Auftreten von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (LPD, *lymphoproliferative disease*) in AIDS-Patienten korreliert mit der krankheitsbedingten Depletion des CD4 T-Zellkompartiments. Das macht deutlich, dass die CD4 T-Zellantwort eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der EBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort einnimmt (Cardin, Brooks, Sarawar, & Doherty, 1996).

Während einer IM ist der CD4 T-Zellpool in seiner Frequenz im Gegensatz zum CD8 T-Zellpool nicht wesentlich expandiert (Balfour et al., 2013). Möglicherweise beruht diese Beobachtung auf der Tatsache, dass eine kurzlebige Expansion EBV-spezifischer CD4 T-Zellklone während der Inkubationszeit der IM auftritt, welche mit dem Einsetzen der Symptome jedoch verschwunden ist und deswegen nicht detektiert werden kann (Maini, Gudgeon, Wedderburn, Rickinson, & Beverley, 2000). Im Gegensatz zur CD8 T-Zellantwort ist die CD4 T-Zellantwort während einer IM und auch in der latenten Phase, vorwiegend gegen latente im Vergleich zu lytischen EBV-Epitope gerichtet, wobei es jedoch keine eindeutige Hierarchie der Immundominanz bestimmter EBV-Epitope gibt (Long et al., 2011; Mautner & Bornkamm, 2012; Ning, Xu, Chan, & Chiang, 2011). Die EBV-spezifische CD4 T-Zellantwort während einer IM ist meist sehr breit angelegt, aber häufig gegen die lytischen Antigene BZLF-1 und BMLF-1 und die latenten Antigene EBNA-3a und -3c und seltener gegen EBNA-1 gerichtet (Munz et al., 2000; Precopio, Sullivan, Willard, Somasundaran, & Luzuriaga, 2003; Woodberry et al., 2005). Verschiedene Autoren beobachteten eine Verschiebung der CD4 T-Zellantwort weg von EBNA-3a während der IM hin zu EBNA-1 während der persistierenden EBV-Infektion (Leen et al., 2001; Munz et al., 2000; Woodberry et al., 2005). In einer Studie mit Patienten mit akuter IM, konnten Frequenzen von 0,04 – 5,2 % EBV-spezifischer CD4 T-Zellen detektiert werden (Amyes et al., 2003). Nach einer IM kommt es zu einem deutlichen Absinken der Frequenz dieser EBV-spezifischer CD4 T-Zellen (Precopio et al., 2003). Zuvor genannte Studie konnte dementsprechend in einer Kohorte gesunder EBV-seropositiver Kontrollprobanden EBV-spezifische CD4 T-Zellen mit einer Frequenz von 0,05 – 1,26 % nachweisen.

Während des latenten EBV-Infektionszyklus wurden EBV-spezifische CD4 T-Gedächtniszellen gegen latente Epitope der EBNA- (EBNA-1, -2 > EBNA-3a, -b, -c) und LMP-Proteine (LMP1>LMP2) in EBV-seropositiven Probanden von verschiedenen Autoren beschrieben (Leen et al., 2001; Long et al., 2005; Munz et al., 2000) (s. auch Abbildung 3.13). CD4 T-Gedächtniszellen gegen lytische EBV-Antigene sind in gesunden EBV-seropositiven Probanden gegen BZLF-1, BZLF-2, BRLF-1, BHRF-1, BMLF-1, BMRF-1, BLLF-1, BKRF-2, BALF-4 und BXLF-2 detektiert worden (Adhikary et al., 2006; Amyes et al., 2003; Landais et al., 2004; Long

et al., 2011). In den einzelnen Arbeiten wurde jedoch immer nur ein bestimmter Anteil an lytischen oder latenten EBV-Proteinen auf ihre Immundominanz bezüglich der CD4 T-Zellantworten untersucht. Insgesamt ist davon auszugehen, dass verschiedene EBV-seropositive Probanden in Summe gegen die Mehrheit der mehr als 60 lytischen EBV-Antigene CD4 T-Zellantworten besitzen. CD4 T-Gedächtniszellen gegen lytische EBV-Proteine könnte eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle einer persistierenden EBV-Infektion zukommen, indem sie eine erneute Virusvermehrung eindämmen und verhindern (Adhikary et al., 2006). Ein Beleg hierfür könnte die Tatsache sein, dass in gesunden EBV-Trägern meist zeitlebens anti-EBV-IgG gegen lytische EBV-Antigene nachweisbar sind.

Einigen wenigen, gegen EBV-Glykoproteine oder latente EBV-Proteine gerichteten CD4 T-Zellen, konnte eine mögliche zytotoxische Funktion, verbunden mit einer Expression des Degranulationsmarkers CD107a nach *in vitro* Stimulation, nachgewiesen werden (Adhikary et al., 2006; Long et al., 2005; Ning et al., 2011). Ning et al. untersuchten die funktionale Hierarchie der CD4 T-Zellantwort gegen Peptidpools lytischer und latenter EBV-Proteine und zeigten eine Produktion von IFN- γ , IL-2, TNF- α und MIP1- α in absteigender Menge und variabler einzel- und polyfunktionaler Zusammensetzung (Ning et al., 2011).

Die Mehrheit der EBV-spezifischen CD4 T-Zellen scheint als unterstützende Komponente bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der EBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort zu fungieren. Aufgrund von Studien an eineiigen Zwillingen, von denen einer eine symptomatische (IM) und der andere eine asymptomatische EBV-Primärinfektion durchgemacht hatte, konnte gezeigt werden, dass die Manifestation einer IM keinen Einfluss auf die Zusammensetzung und Frequenz des EBV-Latenzantigen-spezifischen CD4 T-Gedächtniszellpools während der Viruspersistenz hat (Woodberry et al., 2005).

1.3.2.2 Die EBV-spezifische CD8 T-Zellantwort

Im Gegensatz zur EBV-spezifischen CD4 T-Zellantwort ist die CD8 T-Zellantwort weitaus besser untersucht und viele immundominante Epitope für verschiedene HLA-Typen sind beschrieben worden (Hislop et al., 2007; Landais, Saulquin, & Houssaint, 2005).

Eine symptomatische EBV-Primärinfektion (IM) ist durch eine gleichzeitig auftretende massive Expansion EBV-spezifischer CD8 T-Zellen gekennzeichnet (Balfour et al., 2013; Pudney, Leese, Rickinson, & Hislop, 2005; Tischer et al., 2014) (Abbildung 1.4). Ein Anteil von bis zu 50 % EBV-spezifischer CD8 T-Zellen ist hierbei durchaus üblich und gilt zusammen mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine der CD8 T-Zellen als Ursache der klinischen Symptome einer IM (Callan et al., 2000; Chen, 2011; Pudney et al., 2005; Silins et al., 2001). Die EBV-spezifische CD8 T-Zellantwort während der IM ist zumeist gegen die lytischen Proteine BZLF-1, BRLF-1, BMLF-1, BMRF-1 und BALF-2 oder BALF-5 gerichtet (s. auch Abbildung 3.13)

(Catalina, Sullivan, Bak, & Luzuriaga, 2001; Hislop, Annels, Gudgeon, Leese, & Rickinson, 2002; Hislop et al., 2007; Woodberry et al., 2005). Einzelne Epitop-spezifische CD8 T-Zellen können zum Zeitpunkt einer IM einen Anteil von 1 - 40 % an der gesamten CD8 T-Zellpopulation ausmachen (Hislop et al., 2007). Die EBV-spezifische CD8 T-Zellantwort gegen lytische EBV-Antigene nimmt nach einer überstandenen IM in ihrer Frequenz deutlich ab, bleibt jedoch auch während der Latenz zumeist erhalten (Precopio et al., 2003). Die EBV-spezifische CD8 T-Zellantwort gegen latente EBV-Proteine (zumeist gegen EBNA-3a, -b, -c, aber auch gegen EBNA-1, -2,-LP und LMP2) während einer IM ist im Gegensatz dazu in ihrer Frequenz wesentlich geringer (< 5 %). Gegen Ende der symptomatischen Periode einer EBV-Primärinfektion nimmt sie in ihrer Frequenz jedoch wieder zu, was darauf hindeutet, dass zytotoxische CD8 T-Zellen gegen latente EBV-Antigene entscheidend für die Kontrolle der EBV-Infektion während der Rekonvaleszenz einer IM sind (Blake, Haigh, Shaka'a, Croom-Carter, & Rickinson, 2000; Callan et al., 1998; Hislop et al., 2007; Precopio et al., 2003; Pudney et al., 2005; Taylor et al., 2015).

In vitro Experimente haben gezeigt, dass die während einer IM generierten CD8 T-Zellen rapide nach Wegfall des antigenen Stimulus in Apoptose übergehen und sterben (Callan et al., 2000). Das erklärt den schnellen Wegfall der hochfrequenten CD8 T-Zellen nach einer akuten IM, bedingt durch die verminderte Antigenverfügbarkeit. Eine asymptomatische EBV-Primärinfektion ist trotz hoher EBV-Last nicht mit einer Expansion des CD8 T-Zellkompartiments verbunden (Silins et al., 2001).

Während der latenten EBV-Infektion dämmen EBV-spezifische CD8 T-Gedächtniszellen die EBV-Infektion in gesunden Virusträgern ein und verhindern einen Übergang des EBV in den lytischen Vermehrungszyklus (Hislop et al., 2007; A. B. Rickinson & Moss, 1997; Torti & Oxenius, 2012) (Abbildung 1.4). Dieser CD8 T-Gedächtniszellpool ist in seiner Zusammensetzung sehr heterogen und besteht aus einer Vielzahl von T-Zell-Subpopulationen, welche sich in ihrem Phänotyp, ihrer Funktion und ihrer Lokalisation unterscheiden (Obar & Lefrancois, 2010; Wiesel, Walton, Richter, & Oxenius, 2009). Eine funktionelle Hierarchie der CD8 T-Gedächtniszellantwort gegen Peptidpools lytischer und latenter EBV-Proteine in gesunden Virusträgern wurde mit der Produktion von IFN- γ , CD107a, MIP1- α , TNF- α und IL-2 in absteigender Reihenfolge von Ning et al. beschrieben (Ning et al., 2011). Die einzel- oder polyfunktionale Zusammensetzung der CD8 T-Zellantwort scheint von der jeweiligen Immundominanz einzelner EBV-Proteine bzw. Epitope abhängig zu sein, wobei immundominante EBV-Proteine eine vermehrt polyfunktionale CD8 T-Zellantwort generieren (Ning et al., 2011). Einmal entstandene EBV-spezifische CD8 T-Zellklone bleiben in gesunden EBV-Trägern meist über Jahre hinweg stabil vorhanden (Iancu et al., 2013; Levitsky, de Campos-Lima, Frisan, & Masucci, 1998; Neller, Burrows, Rist, Miles, & Burrows, 2013). Klarenbeek et al. bestätigen diese Erkenntnis, indem sie herausgefunden haben, dass das

klonale T-Zellrepertoire, welches während der frühen Phase der EBV-Infektion entstanden ist, über mehr als fünf Jahre hinweg stabil bestehen bleibt (Klarenbeek et al., 2012). So existiert in gesunden EBV-Trägern während der Latenz ein zirkulierender CD8 T-Gedächtniszellpool, welcher in seiner Frequenz 0,2 - 2 % CD8 T-Zellen gegen lytische und 0,05 – 1 % CD8 T-Zellen gegen latente Epitope, gemessen an der gesamten CD8 T-Gedächtniszellpopulation, ausmacht (Benninger-Doring et al., 1999; Bihl et al., 2006; Saulquin et al., 2000). Die höchsten Frequenzen an EBV-spezifischen CD8 T-Gedächtniszellen in gesunden EBV-Trägern wurden in absteigender Immundominanz gegen EBNA-3-a, -b, -c > EBNA-1 > LMP-2 >> EBNA-2, EBNA-LP und LMP-1 beobachtet (Leen et al., 2001; A. B. Rickinson & Moss, 1997). Die meisten CD8 T-Gedächtniszellen besitzen einen ruhenden (*resting*-) Phänotyp mit fehlenden Aktivierungsmarkern CD38 und/oder CD69 (Catalina, Sullivan, Brody, & Luzuriaga, 2002).

Im Laufe des Lebens EBV-seropositiver Virusträger kann mit zunehmendem Alter eine Frequenzzunahme des EBV-spezifischen CD8 T-Gedächtniszellpools beobachtet werden. In gesunden EBV-Trägern mit einem Alter von mehr als 60 Jahren sind demnach EBV-spezifische CD8 T-Zellen in einer Frequenz von bis zu 14 % der gesamten T-Zellpopulation beschrieben worden (Khan et al., 2004). Die Effektor-Funktion dieser hochfrequenten EBV-spezifischen CD8 T-Zellen scheint jedoch, aufgrund des Alters, ineffizienter und dysfunktional in Bezug auf die IFN- γ Produktion im Vergleich zu EBV-spezifischen CD8 T-Zellen jüngerer EBV-Träger zu sein (Ouyang et al., 2003). EBV-Träger dieser Altersgruppe, welche zugleich mit dem Cytomegalovirus (CMV) infiziert sind, besitzen überraschenderweise nicht diese altersbedingte Expansion EBV-spezifischer CD8 T-Zellen, sondern weisen eine deutliche Expansion CMV-spezifischer CD8 T-Zellen auf. Somit scheint die CMV-spezifische CD8 T-Zellantwort eine favorisierte Rolle im CD8 T-Gedächtniszellpool einzunehmen und den Anteil der EBV-spezifischen CD8 T-Gedächtniszellen in CMV-seropositiven EBV-Trägern zu vermindern (Khan et al., 2004).

Wie bereits zuvor für EBV-spezifische CD4 T-Zellantworten beschrieben, konnten Studien an eineiigen Zwillingen und einer durchgemachten symptomatischen bzw. asymptomatischen EBV-Primärinfektion zeigen, dass eine symptomatische Primärinfektion keinen Einfluss auf die Zusammensetzung und Frequenz des latenten EBV-spezifischen CD8 T-Gedächtniszellpools während der Viruspersistenz hat (Woodberry et al., 2005). Darüber hinaus haben Woodberry et al. in einer Studie an IM-Patienten und gesunden EBV-seropositiven Kontrollprobanden herausgefunden, dass zwischen beiden Kohorten kein signifikanter Unterschied in der Bandbreite der CD8 T-Zellantworten gegen lytische und latente EBV-Antigene besteht. Demnach können CD8 T-Zellantworten gegen latente EBV-Antigene bereits während einer IM detektiert werden und CD8 T-Zellantworten gegen lytische EBV-Antigene bleiben auch während der persistierenden EBV-Infektion erhalten (Woodberry et al., 2005). Letzteres kann unter

Umständen dadurch begründet werden, dass sporadisch auftretende asymptomatische EBV-Reaktivierungen zu einer Aufrechthaltung der CD8 T-Zellantworten gegen lytische EBV-Antigene beitragen (Gonnella et al., 1997; Prang et al., 1997).

1.3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen

Die Krankheitsbilder der Infektiösen Mononukleose (IM), der chronisch aktiven EBV-Infektion (CAEBV) und der X-chromosomalen lymphoproliferativen Erkrankung (XLP) schließen sich in der Regel direkt an eine EBV-Primärinfektion an (Vouloumanou, Rafailidis, & Falagas, 2012). Andere mit EBV-assoziierte lymphoproliferative und Tumor-Erkrankungen, treten im Gegensatz dazu erst nach einer bereits bestehenden latenten EBV-Infektion auf. Darüber hinaus gibt es einige Autoimmunerkrankungen, welche mit einer durchlaufenen IM bzw. einer EBV-Seropositivität im Allgemeinen in Verbindung gebracht werden (Lossius, Johansen, Torkildsen, Vartdal, & Holmoy, 2012).

1.3.3.1 Infektiöse Mononukleose (IM)

Aufgrund einer deutlichen Verbesserung der hygienischen Zustände, vor allem in Industrieländern, kommt es zunehmend zu einer Verschiebung der Primärinfektion mit EBV in das jugendliche oder Erwachsenenalter, was in 30 – 70 % der Fälle zur Manifestation der IM, einer selbst-limitierenden lymphoproliferativen Erkrankung führt. Diese ist klassischerweise durch einen ausgeprägtes Krankheitsgefühl mit Fieber, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, starken Halsschmerzen sowie einer Tonsillen- und Lymphknotenschwellung gekennzeichnet (Kutok & Wang, 2006; Vouloumanou et al., 2012). Im Blutbild zeigen sich in der Regel vermehrt mononukleäre Zellen (Lymphomonozytose), welche namensgebend für diese Krankheit sind, meist in Verbindung mit einer Leukozytose. Während einer IM kommt es außerdem regelhaft zu einem Anschwellen der Milz und in einigen Fällen zu einem Anschwellen der Leber, wobei erstere so stark geschwollen sein kann, dass es zu einer lebensbedrohlichen Ruptur des Organs kommt. Die meisten Symptome einer IM sind die Folge einer massiven Proliferation von CD8 T-Zellen, als Immunantwort auf die Primärinfektion mit EBV. Die IM ist eine selbstlimitierende Erkrankung, welche in der Regel innerhalb von 4 - 6 Wochen abklingt (Vouloumanou et al., 2012). Weshalb die Manifestation einer IM selten im Kleinkindalter, jedoch häufiger bei Jugendlichen und Erwachsenen auftritt, bleibt weitestgehend ungeklärt. Eine mögliche Erklärung liegt in der oben erwähnten altersabhängigen Fluktuation der natürlichen Immunität (Azzi et al., 2014; Chijioke, Azzi, Nadal, & Munz, 2013). Eine weitere mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die massive Expansion von CD8 T-Zellen auf dem Vorhandensein von Kreuz-reaktiven CD8 T-Gedächtniszellen beruht, welche im Lauf des Lebens aufgrund des Ausbaus einer Pathogen-spezifischen Immunität zunehmen und welche während einer EBV-Primärinfektion proliferieren (Clute et al., 2005; Odumade et al., 2012).

Dass erklärt jedoch nicht, warum manche Jugendliche bzw. Erwachsene eine asymptomatische EBV-Primärinfektion durchlaufen, obwohl in dieser Personengruppe vergleichbar hohe EBV-Lasten, aber keine Expansion des CD8 T-Zellkompartiments detektiert wurden (Jayasooriya et al., 2015; Silins et al., 2001).

Während der IM zeigen EBV-infizierte B-Zellen ein Latenztyp III-Expressionsmuster, in welchem typischerweise EBERs, EBNA-1, EBNA-2 und LMP-1 exprimiert werden (Martorelli et al., 2012).

1.3.3.2 Chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV)

Bei der Chronisch Aktiven EBV-Infektion (CAEBV) handelt es sich um eine sehr selten auftretende Erkrankung. Sie beginnt meist als IM, geht mit hohen Antikörpertitern gegen VCA und andere lytische Proteine des EBV einher und ist durch schwere Krankheitssymptome gekennzeichnet, welche länger als sechs Monate anhalten. Das EBV infiziert in dieser Krankheitsentität in der Regel auch NK- oder T-Zellen, welche proliferieren und ähnlich dem Hodgkin-Lymphom (HL) oder Nasopharynxkarzinom (NPC) den Latenztyp II aufweisen, mit selektiver Expression von EBNA-1, LMP-1 und LMP-2 (Fox, Shannon-Lowe, & Rowe, 2011; Kimura et al., 2012). Die kontinuierliche Expansion dieser EBV-transformierten NK- oder T-Zellen kann entweder zu einer Aktivierung von Makrophagen und infolgedessen einer Haemophagozytose oder dem Auftreten monoklonaler EBV-positiver NK- oder T-Zelllymphome führen. Auf organischer Ebene kann es zu einer Pneumonie, persistierenden Hepatitis, Knochenmarkshypoplasie und/oder einer Uveitis kommen, wobei oft eine erhöhte Viruslast in den betroffenen Organen auftritt (Cohen, 2000).

1.3.3.3 X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung (XLP)

Die XLP (Synonym: Purtilo- Syndrom oder *Duncan's disease*) ist eine schwerwiegende Komplikation der IM, welche nur bei männlichen Patienten auftritt und in 60 % der Fälle zum Tod führt. Eine Mutation in dem für die Signalübertragung zwischen Immunzellen wichtigen Gen SAP (*signaling lymphocyte activation molecule [SLAM]-associated protein*) führt zu einer Störung der Interaktion der an der Immunantwort beteiligten B- und T-Zellen (Cohen, 2000). Bei XLP-Patienten kommt es aufgrund des Fehlens eines funktionierenden SAP-Proteins und der damit beeinträchtigten B- und T-Zellinteraktion zu einer nicht regulierten Vermehrung von EBV-infizierten B-Zellen (Cohen, 2000).

1.3.3.4 EBV-assoziierte Tumorerkrankungen

Zahlreiche Lymphome und einige nicht-hämatopoetische Tumorerkrankungen, wie das Burkitt Lymphom (BL), das Hodgkin-Lymphom (HL), extranodale NK/T-Zelllymphome, das Nasopharynxkarzinom (NPC) und ein Subtyp des Magenkarzinoms, sowie seltene mesenchymale Malignome, werden mit dem EBV in Verbindung gebracht.

Das EBV-assoziierte BL ist ein monoklonales, schnell-wachsendes B-Zelllymphom (Latenzstadium I), welches in drei unterschiedliche Formen unterteilt wird. Die endemische Form des BL ist immer EBV-assoziiert und kommt zumeist bei Kindern und mit einer Häufigkeit von 50 - 100 Fällen pro 100.000 Einwohner in Gebieten mit einer hohen Anzahl an Malariainfektionen, wie Zentralafrika und Neu-Guinea vor (Cohen, 2000; Kutok & Wang, 2006). Die sporadisch auftretende Form von BL tritt meist bei Kindern und jungen Erwachsenen auf, folgt keiner bestimmten geographischen Zuordnung und ist in 15 - 20 % der Fälle EBV-assoziiert (Kutok & Wang, 2006; Young & Rickinson, 2004). Die Häufigkeit dieser Art von BL liegt bei 2 - 3 Fällen pro einer Million Einwohner (A. Rickinson & Kieff, 2006). Die dritte Form des BL ist mit einer geschwächten Immunabwehr, welche zumeist auf HIV-Infektionen zurück zu führen ist, verbunden und ist zu 30 - 40 % EBV-assoziiert (Rochford, Cannon, & Moormann, 2005; Young & Rickinson, 2004).

Als Hodgkin-Lymphome (HL), benannt nach dem englischen Arzt Thomas Hodgkin welcher diese 1832 entdeckte, bezeichnet man bösartige Tumoren des Lymphsystems mit B-oder T-Zellphänotyp, welche sich durch schmerzlose Schwellungen von Lymphknoten, häufig begleitet von einer typischen „B-Symptomatik“ (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß), bemerkbar machen. HL sind mit ca. 40 % EBV-positiven Fällen das häufigste EBV-assoziierte Lymphom in Europa (Kuppers, 2003). Entsprechend der WHO unterscheidet man klassische und lymphozytenprädominante HL, wobei es sich lediglich bei den klassischen HL um eine typische EBV-assoziierte Tumorerkrankung handelt (Harris et al., 1999). Im mikroskopischen Gewebebild sind HL durch das Vorhandensein von wenigen EBV-transformierten malignen Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) -Zellen inmitten von nicht-neoplastischen B- und T-Lymphozyten gekennzeichnet (Kapatai & Murray, 2007). EBV positive HRS-Zellen sind durch ein EBV-Latenzstadium II, mit Expression der latenten Genprodukte EBNA-1, EBER-1 und -2, LMP-1, LMP-2A und/oder LMP-2B, gekennzeichnet (Tierney et al., 1994).

Das Nasopharynxkarzinom (NPC) (Latenzstadium II) ist ein stark zur Metastasierung neigendes Plattenepithelkarzinom des Nasen-Rachen-Raumes. Es handelt sich um eine in Südchina, Nordafrika und Südostasien mit 50 Fällen unter 100.000 Einwohnern endemisch, in Westeuropa und den USA nur sporadisch auftretende EBV-assoziierte Tumorerkrankung (Pathmanathan, Prasad, Sadler, Flynn, & Raab-Traub, 1995). Als wichtige Faktoren, die zur Entstehung eines NPC beitragen, werden sowohl genetische Faktoren, als auch Umwelteinflüsse, wie über die Nahrung aufgenommen flüchtige Nitrosamine, diskutiert (Poirier et al., 1989). Nahezu 100 % der anaplastischen oder nur sehr gering differenzierten NPC enthalten EBV-Genome und exprimieren EBV-Proteine (Cohen, 2000). Inwieweit unterschiedlich prädominante EBV-Stämme zur unterschiedlichen Inzidenz von NPC weltweit beitragen, ist noch unklar (Tsai et al., 2013).

1.3.3.5 Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD)

Eine PTLD ist in ca. 80 % der Fälle EBV-assoziiert und zumeist die Folge einer iatrogenen immunsuppressiven Behandlung aufgrund einer hämatopoetischen Stammzellentransplantation (HSCT) oder einer soliden Organtransplantation (SOT) (Martorelli et al., 2012; Pickhardt & Siegel, 1999). Die heterogene Gruppe der PTLD-Erkrankungen entsteht durch eine mangelhafte Kontrolle der EBV-Infektion nach Transplantation, die durch ein Ungleichgewicht zwischen proliferierenden, EBV-transformierten Zellen lymphozytären Ursprungs und der durch die medikamentöse Immunsuppression verminderten EBV-spezifischen T-Zellantwort charakterisiert ist (Mynarek, Schober, Behrends, & Maecker-Kolhoff, 2013). Therapeutisch wird, soweit möglich, eine Reduktion der Immunsuppression angestrebt und unter anderem der B-Zell-depletierende Antikörper Rituximab eingesetzt (Dierickx, Tousseyn, & Gheysens, 2015). Zukunftsweisend sind verschiedene Therapieansätze auf der Basis von adoptiv transferierten, autologen oder allogenen EBV-spezifischen T-Zellen. Diese werden durch verschiedene Verfahren gewonnen, darunter klassischerweise die Expansion durch repetitive Stimulation mit EBV-transformierten lymphoblastoiden B-Zellen (LCL), inzwischen auch durch Zytokin-basierte Isolation nach Kurzzeitstimulation mit EBV-Peptiden und in experimentellen Protokollen auch durch Isolation mittels EBV-spezifischen Multimeren (Gottschalk & Rooney, 2015).

1.3.3.6 EBV-assoziierte Autoimmunkrankheiten

Es existieren vielfältige Hinweise für einen Zusammenhang zwischen einer EBV-Infektion und dem Auftreten zahlreicher Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose (MS), dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) und der rheumatoiden Arthritis (RA) (Lossius et al., 2012).

Das Risiko an einer MS zu erkranken ist in EBV-seropositiven Individuen statistisch höher als in EBV-seronegativen Individuen (Pakpoor et al., 2013; Pohl et al., 2006). MS-Patienten haben bereits mehrere Jahre vor der Manifestation einer MS erhöhte anti-EBV IgG-Titer, vor allem gegen EBNA-1, aber auch gegen die anderen EBV-Proteine der EBNA-Familie, was darauf hindeutet, dass die Höhe der anti-EBV IgG-Titer mit dem Risiko an MS zu erkranken korrelieren könnte (Munger, Levin, O'Reilly, Falk, & Ascherio, 2011). Des Weiteren ist das Durchlaufen einer IM mit einem zwei- bis dreifachen Risiko später an einer MS zu erkranken, verbunden (Thacker, Mirzaei, & Ascherio, 2006). Eine mögliche Ursache für den Zusammenhang zwischen einer EBV-Infektion und der MS könnten Kreuz-reaktive T-Zellen sein, welche mit körpereigenen Peptiden von ZNS (Zentralnervensystem) -assoziierten Proteinen reagieren (Lang et al., 2002; Lunemann et al., 2006; Lunemann et al., 2008).

Im Falle des SLE und der RA konnte von einer Krankheits-spezifischen Aktivierung des B-Zellsystems bzw. erhöhten anti-EBV Antikörpern, einer beeinträchtigten EBV-spezifischen T-

Zellantwort und einer erhöhten EBV-Last in PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) berichtet werden (James et al., 2001; Moon et al., 2004). Möglicherweise ist eine genetische Prädisposition im Zusammenspiel mit Kreuz-reaktiven Autoantikörpern an der Entstehung der beiden Autoimmunkrankheiten beteiligt (Poole, Scofield, Harley, & James, 2006; Toussiroit & Roudier, 2008). Zusätzlich wurde berichtet, dass nahezu alle pädiatrischen und erwachsenen SLE-Patienten EBV-seropositiv sind (James et al., 1997; James et al., 2001).

1.4 Die Epstein-Barr Virusinfektion im Kontext des Hochleistungssports

Eine abnehmende Leistungsfähigkeit von Hochleistungssportlern während des Trainings und Wettkämpfen wird immer wieder mit frischen oder reaktivierten EBV-Infektionen in Verbindung gebracht. Aufgrund der teilweise nicht eindeutigen Ergebnisse serologischer Testverfahren und einer eher unspezifischen Symptomatik herrscht bei Hochleistungssportlern, Trainern und betreuenden Ärzten häufig Unsicherheit darüber, inwieweit eine EBV-Primärinfektion bzw. eine EBV-Reaktivierung für auftretende Leistungsschwäche und/oder Symptome einer Infektion der oberen Atemwege (URTI, *upper respiratory tract infection*) verantwortlich gemacht werden kann (Pottgießer T, 2008; Yamauchi et al., 2011). Athleten, Trainer und Sportmediziner (in der gesamten Arbeit wurde für alle Personenbezeichnungen stets die männliche Bezeichnung mit geschlechtsneutraler Bedeutung verwendet) berichten häufig davon, dass während Phasen intensiven Trainings und Wettkämpfen ein erhöhtes Risiko an einer URTI zu erkranken besteht (Peters, 1997). In einer Kohorte von Hochleistungs-Schwimmern, -Hockey- und -Squashspielern wurde nach längeren intensiven Trainingszeiten ein um 40 % häufigeres Vorkommen von URTIs beobachtet (Mackinnon, 2000a; Mackinnon & Hooper, 1996).

Das gehäufte Auftreten von URTIs bei Athleten initiierte die Hypothese, dass eine andauernde starke körperliche Belastung, wie sie im Rahmen des Hochleistungssport gegeben ist, dauerhaft eine immunschwächende Wirkung auf das Immunsystem eines Hochleistungssportlers ausübt. Einige Studien scheinen diese Hypothese zu bestätigen, wengleich zu beachten ist, dass Athleten in keiner Weise als immuninkompetent gelten und URTIs als relativ milde Erkrankung anzusehen sind, auch wenn sie bei gehäuften Auftreten eine starke Beeinträchtigung für den einzelnen Athleten bedeuten (Gleeson et al., 1995; Gleeson et al., 1999; Pyne et al., 1995). Auf der anderen Seite scheinen Freizeitsportler mit einem moderaten Trainingsumfang von der sportlichen körperlichen Betätigung zu profitieren und seltener an URTIs zu erkranken, als nicht sportlich aktive Vergleichspersonen (Heath et al., 1991). Zahlreiche Studien bestätigen, dass moderate sportliche Tätigkeit förderlich für das Immunsystem ist, intensive körperliche Belastung, wie sie im Rahmen des Hochleistungssports vorliegt, hingegen eher das Risiko, an einer URTI zu erkranken, erhöht (Heath et al., 1991; Mackinnon, 2000a; Nieman, Johanssen, Lee, & Arabatzis, 1990).

Ob ein Zusammenhang zwischen URTIs und einer EBV-Infektion besteht ist meist schwierig zu beurteilen, da bei URTIs nicht immer ein verantwortliches Pathogen nachgewiesen werden kann, und die Symptome auch bei fehlendem Zusammenhang mit EBV ähnlich einer EBV-Reaktivierung sein können. Reid et al. berichteten in diesem Zusammenhang von auftretenden EBV-Reaktivierungen bei Athleten, welche anhand einer PCR-basierten Detektion von EBV in Speichel nachgewiesen wurden und zeitgleich wiederkehrenden URTI-Symptome bei diesen Athleten (Reid et al., 2004). Andere Autoren beschrieben ebenfalls eine direkte Korrelation von zunehmenden URTI-Symptomen bei Athleten und einer Zunahme von EBV-DNS Nachweis und einer Reduktion der anti-EBV IgA-Spiegel im Speichel (Gleeson et al., 2002; Yamauchi et al., 2011). Zudem wurde von einer signifikant positiven Korrelation zwischen einem seropositiven EBV-Status und dem Auftreten von URTI-Symptomen bei elf Leistungsschwimmern berichtet (Gleeson et al., 2002). He et al. hingegen beobachteten in einer Kohorte von 267 Athleten keinen Unterschied in der Häufigkeit von URTIs in Abhängigkeit vom EBV-Serostatus (He, Handzlik, Muhamad, & Gleeson, 2013). Cox et al. zeigten, dass eine Behandlung von Langstreckenläufer (n = 20) mit dem Virostatikum ValtrexTM (Valaciclovir) in 82 % der behandelten Athleten eine Reduktion der detektierbaren EBV-Last im Speichel, verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe erbrachte, damit jedoch kein Rückgang der URTI-Symptome verbunden war (A. J. Cox et al., 2004).

Im Hinblick auf die EBV-spezifische Immunantwort im Zusammenhang mit dem Hochleistungssport, berichteten Hoffmann et al. von einer erhöhten EBV-Last in Verbindung mit niedrigeren anti-EBV IgG-Titern bei Athleten, verglichen mit einer Kontrollgruppe. Im Rahmen dieser Studie wurden in einer kleinen Subgruppe von Athleten die anti-EBV IgG-Titer longitudinal (im Mittel 191 Tage) erfasst und hierbei ein tendenziell leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der anti-EBV IgG-Titer während der Wettkampfsaison beobachtet. Die Autoren diskutierten in diesem Zusammenhang eine durch das Ausüben des Hochleistungssports möglicherweise geschwächte Immunfunktion und eine daraus resultierende verminderte Kontrolle der EBV-Infektion bei Athleten. Die detektierte höhere EBV-Last der Athleten könnte nach Hoffmann et al. durch teilweise auftretende langwierige bzw. chronische EBV-Primärinfektionen und EBV-Reaktivierungen in der Athletengruppe begründet sein (Hoffmann et al., 2010). Pottgiesser et al. dokumentierten hingegen über einen Zeitraum von einem Jahr stabil bleibende anti-EBV Antikörpertiter bei Athleten während einer Wettkampfsaison (T. Pottgiesser, Schumacher, Wolfarth, Schmidt-Trucksass, & Bauer, 2012).

Eine durch das Ausüben des Hochleistungssports geschwächte zellvermittelte Immunantwort (CMI, *cell-mediated immunity*), könnte die Ursache für eine verminderte Kontrolle der EBV-Infektion bei Athleten sein. Die Leukozyten betreffend, wurde für kurzfristige hohe sportliche Belastungen beschrieben, dass es zu kurzzeitigen Veränderungen der Anzahl und relativen Verteilung von Lymphozyten (Lymphozytose) kommen kann, welche sich nach einer

Ruhephase jedoch schnell wieder normalisiert und auch über den Verlauf von Monaten wiederkehrenden intensiven Trainings stabil bleibt (Gleeson et al., 1995; Nieman et al., 1995). Wiederholtes intensives Training kann zu sinkenden Leukozytenzahlen und einer Abnahme der Funktionalität von Leukozyten aufgrund von steigenden Mengen an Stress-induzierten Hormonen und einem Austreten von weniger gereiften Leukozyten aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation führen (Gleeson, 2007). Zusätzlich kommt es während intensiven körperlichen Trainings zu einem Anstieg von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) und freien Radikalen, welche einen hemmenden Einfluss auf die Funktionalität von Immunzellen haben können (Niess, Dickhuth, Northoff, & Fehrenbach, 1999). Weiter gibt es mehrere Hinweise darauf, dass intensives Training bei Hochleistungssportlern eine kurzfristige Suppression von zytotoxischen T-Zellen (CTL) und Regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) (Gabriel & Kindermann, 1997), eine Verminderung der T-Zellfunktion (Fry, Morton, Crawford, & Keast, 1992; Lancaster et al., 2004) und der humoralen mukosalen Immunabwehr (Gleeson & Pyne, 2000) zur Folge hat. Bei wiederholter intensiver Trainings- oder Wettkampfbelastung über einen längeren Zeitraum hinweg, kann es folglich zu einer eingeschränkten Erholung des Immunsystems und letztendlich zu einer immunschwächenden Wirkung des Hochleistungssports kommen (Gleeson, 2006). Zusätzlich wurde berichtet, dass die Anzahl an zirkulierenden T-Helferzellen Typ 1 (T_H1 -Zellen), die T-Zell Proliferationskapazität und die IgG-Syntheseaktivität in stimulierten B-Zellen bei Athleten unter ständiger Trainings- und Wettkampfbelastung abnimmt. Die Ursache hierfür scheint eine Trainings-induzierte Erhöhung von zirkulierenden Stresshormonen und Veränderungen im Verhältnis pro- und anti-inflammatorischer Zytokine zu sein (Walsh et al., 2011). Lancaster et al. beschrieben eine Abnahme der Anzahl an T_H1 -Zellen, aber unveränderte T_H2 -Zellzahlen und somit einer Verschiebung des T_H1/T_H2 –Zellverhältnisses in Hochleistungsradfahrern während Phasen längerer intensiven Trainings (Lancaster et al., 2004).

In Bezug auf die EBV-spezifische CMI berichteten Faulkner et al. im Zusammenhang von intensivem Training bei Athleten von einem vermehrten Auftreten von EBV-DNS bei gleichzeitig verminderter T-Zellfunktion (Faulkner, Krajewski, & Crawford, 2000). Diese verminderte T-Zellfunktion könnte ein Grund für die reduzierte IgA-Sekretion im Speichel und eine daraus resultierende EBV-Reaktivierung sein. EBV-Reaktivierungen und erhöhte EBV-Last im Speichel aufgrund einer verminderten CMI, wurden ebenso in anderen Personengruppen (Astronauten, Antarktis-Forscher) mit physischen, psychischen und umweltbedingten Stressoren in Verbindung gebracht (Mehta, Pierson, Cooley, Dubow, & Lugg, 2000). Dass eine andauernde psychische Belastung, welche während einer Examenzeit sicherlich gegeben ist, zu vermehrten EBV-Reaktivierungen und erhöhten anti-EBV IgG-Titern führen kann, zeigten Glaser et al. in einer Kohorte von Kadetten der US-Militärakademie, welche sich in der Examensphase befanden. Im Gegensatz dazu zeigten die gleichen Kadetten, während eines

sechswöchigen intensiven körperlichen Trainings, keine erhöhten anti-EBV IgG-Titer und keine messbaren EBV-Reaktivierungen (Glaser et al., 1999).

Hinsichtlich des Einflusses des Hochleistungssports auf die Funktionalität der innatens Immunantwort berichteten Lancaster et al., dass nach längerem intensiven Training die Expression von TLR 1, 2 und 4 auf Monozyten über mehrere Stunden hinweg abgenommen hatte, was einen Einfluss auf das Erkennen und Präsentieren von Pathogenen durch Antigen-präsentierende Zellen (APC, *antigen presenting cell*) vermuten lässt (Lancaster et al., 2005). Andere Studien detektierten einen Rückgang der Anzahl an NK-Zellen in Athleten, nach längeren Zeiten sehr intensiven Trainings (Fry et al., 1994; M. Lehmann et al., 1996). Rama et al. fanden in Leistungsschwimmern eine Abnahme der Frequenz und der absoluten Zahlen der NK-Zellpopulation, in Abhängigkeit von der Trainingsintensität, über eine Trainings- und Wettkampfsaison hinweg (Rama et al., 2013).

Aufgrund der Tatsache, dass keine der zuvor genannten Studien über einen längeren Zeitraum und unterschiedlichen Trainingsintensitäten hinweg, eine Analyse der EBV-spezifischen Antikörpertiter und der EBV-Last in Verbindung mit der EBV-spezifischen CMI vorgenommen hatte, bleibt die Hypothese des immunschwächenden Einflusses der intensiven körperlichen und psychischen Belastung des Hochleistungssports, auf die EBV-spezifische Immunantwort bezogen, bisher weitgehend unbestätigt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Bereich des Hochleistungssports wird immer wieder darüber diskutiert, ob eine EBV-Infektion *per se* bzw. neu auftretende EBV-Primärinfektionen und/oder EBV-Reaktivierungen für Phasen andauernder Leistungsschwäche bei Athleten verantwortlich gemacht werden können. Hoffmann et al. berichteten, in einer ebenfalls am Institut für Virologie der Technischen Universität München (TUM) durchgeführten Studie mit erwachsenen Hochleistungssportlern, von einer erhöhten EBV-Last und niedrigeren anti-EBV IgG-Titern der Athleten, verglichen mit einer Kontrollgruppe (Hoffmann et al., 2010). Auf der Basis dieser Studie, wurde die durch das Bundesinstitut für Sportwissenschaften finanzierte Folgestudie „Belastbarkeit und Trainierbarkeit aus internistischer Sicht unter besonderer Berücksichtigung des Immunsystems bei NachwuchsleistungssportlerInnen“ (Leitung: Dr. Bernd Wohlfarth, Lehrstuhl für Präventive und Rehabilitative Sportmedizin der Technischen Universität München (TUM)) initiiert.

Im Rahmen dieser Studie sollte in dieser vorliegenden Dissertation der Einfluss des Hochleistungssports auf den EBV-spezifischen Immunstatus (EBV-Serologie, EBV-Last, EBV-spezifische zellvermittelte Immunantworten) in einem Kollektiv von 296 Nachwuchsleistungssportlern (11 - 20 Jahre), im Vergleich zu einer gleichaltrigen Kontrollgruppe (288 Schüler), in einer vier Jahre dauernden klinischen Längsschnittstudie

analysiert werden. Anhand der erhaltenen Ergebnisse sollte die Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports, bezogen auf die EBV-spezifische Immunantwort, in diesem speziellen Kollektiv von Nachwuchsleistungssportlern, geprüft werden. Des Weiteren sollten anhand der erhaltenen Ergebnisse überprüft werden, ob die individuelle EBV-spezifische Immunantwort als eine Art funktioneller Biomarker genutzt werden kann, welcher den allgemeinen Immunstatus der Nachwuchsleistungssportler widerspiegelt und somit als Grad der Belastbarkeit in der Praxis genutzt werden kann. Da besonders in diesem Kollektiv an jungen Leistungssportlern ein gehäuftes Auftreten gesundheitlicher Probleme wegweisend für die weitere sportliche Karriere sein könnte, sollten die Ergebnisse dieser Arbeit zudem dazu beitragen, einzelne Fälle von EBV-spezifischer oder allgemeiner Immunschwäche zu erkennen, um gegebenenfalls aus sportärztlicher Sicht intervenierend einzugreifen bzw. ein Beenden der leistungssportlichen Karriere zu empfehlen.

Hierfür sollten in dieser Arbeit der individuelle EBV-Serostatus, die Höhe der EBV-spezifischen Antikörpertiter, die EBV-Last und die zellvermittelte EBV-spezifische Immunantwort in beiden Kollektiven bestimmt und analysiert werden. Um den Einfluss von verschiedenen Belastungsintensitäten des Hochleistungssport auf die EBV-spezifische Immunantwort zu überprüfen, wurden die genannten serologischen und immunologischen Parameter der Nachwuchsleistungssportler zu Zeitpunkten verschiedener Belastungsintensitäten (Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase) detektiert und ausgewertet.

Die Analyse der zellvermittelten EBV-spezifischen Immunantwort erforderte initial die Etablierung und Validierung eines geeigneten Testsystems (IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays), welche im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurde.

Aufgrund der Größe des getesteten Nachwuchsleistungssportler- und Kontroll-Kollektivs und der umfangreichen erhobenen serologischen und immunologischen Parameter, ermöglichte diese Studie eine bisher nicht in diesem Umfang vorhandene Bewertung des Einflusses des Hochleistungssports auf die EBV-spezifische Immunantwort.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien

Name	Zusatz	Hersteller
RPMI 1640		Life Technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
RPMI-10	RPMI 1640 mit 10 % FCS und 1 % (P/S)	
Einfríermedium	90 % FCS + 10 % DMSO	

2.1.2 Medienzusätze

Name	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Life Technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)

2.1.3 Reagenzien und Lösungen

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
human Pancoll-Lösung		PAN-BIOTECH, Aidenbach, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7,4): 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄	PBS	Life Technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau		Life Technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Türksche Lösung		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Einmalpipetten (5 - 25 ml)	Greiner, Nürtingen, Deutschland
ELISpot-Platten, MSIPS4510	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 - 50 ml)	B&D, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kryotubes (1,8 ml)	Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark
Leucosep®-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Li-Heparin Röhrchen	Sarstedt, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (10 - 1000 µl)	Sarstedt, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 - 2 ml)	Sarstedt, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Primer und Sonde für die real-time PCR (Taqman)

Primer / Sonde	Hersteller
EBV Primer und Sonde	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Humanes Prionprotein Primer und Sonde	Microsynth AG, Balgach, Schweiz

2.1.6 Kits

Kits	Hersteller
Enzygnost® Anti - EBV/IgG/IgM ELISA®	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland
human IFN-γ ELISpot Kit, with pre-coated plates	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden
human IL-2 ELISpot Kit, with pre-coated plates	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden
human IFN-γ/IL-2 FluoroSpot Kit, with pre-coated plates	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden
mSample Preparation Systems DNS	Abbott Laboratories, Illinois, USA
recomLine® EBV IgG	Mikrogen GmbH, Neuried, Deutschland

2.1.7 EBV-Peptidpools

Die verwendeten Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 und EBNA-3a sind aus 15 Aminosäuren (AS) langen Peptiden zusammengesetzt, welche mit einer Überlappung von 11 AS das jeweilige EBV-Protein umspannen (JPT Peptide Technologies, Berlin, Deutschland). Der BZLF-1-Peptidpool setzt sich aus insgesamt 59 und der EBNA-3a-Peptidpool aus 234

einzelnen Peptiden zusammen. Das jeweilige Lyophilisat der beiden Pools enthält ca. 25 µg pro Peptid und wurde in 210 µl PBS und 40 µl DMSO gelöst und in einer Stock-Konzentration von 100 µg/ml bis zur Verwendung im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Wenn nicht anders im Text angegeben, wurden die Peptidpools im Assay in einer Konzentration von 1 µg/ml (\cong einer DMSO-Konzentration von weniger als 1 % im Assay) eingesetzt.

2.1.8 Andere Antigene

Antigen	Konzentration im Assay	Hersteller
Phytohämagglutinin (PHA-L)	2 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie, Schnellendorf, Deutschland

2.1.9 Geräte

Gerät	Modell / Typ	Hersteller
ELISA Reader	BEP 2000 Advance® System	Siemens AG, Erlangen, Deutschland
ELISpot-/FluoroSpot Reader	CTL-ImmunoSpot® S6 Ultra-V Analyzer	Cellular Technology Limited (CTL) Europe, Bonn, Deutschland
Extraktionsgerät	m2000sp	Abbott Laboratories, Illinois, USA
Immunoblot Reader	ProfiBlot™ 48	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
PCR-Gerät, „Taqman“	7500 SDS Sequence Detector System	Life Technologies, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.10 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
ImmunoSpot 5.1 Professional DC Software	CTL Europe, Bonn, Deutschland
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
R version 3.0.2 (2013-09-25)	The R Foundation for Statistical Computing
Statistical calculators (http://www.niwa.co.nz)	NIWA, National Institute of Water and Atmospheric Research, Auckland, Neuseeland

2.2 Methoden

2.2.1 Diagnostisch-serologische Methoden zur Analyse EBV-spezifischer Immunantworten und der Epstein-Barr Viruslast

2.2.1.1 *recomLine* EBV IgG Immunoblot

Der *recomLine*[®] EBV IgG Immunoblot Assay wurde zum differenzierten Nachweis von IgG-Antikörpern gegen verschiedene Antigene (EBNA-1, p18, p23, BZLF-1, p138 und p54) des Epstein-Barr-Virus verwendet. Der Assay wurde nach Herstellerangaben in Verbindung mit einem Tecan ProfiBlot™ 48 Gerät durchgeführt, um den individuellen EBV-Serostatus eines jeden Nachwuchssportlers und Kontrollprobanden zu bestimmen. Im Detail wurden die in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A eingelegten Nitrocellulose Teststreifen mit 20 µl Serumprobe eines Probanden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Serum vorhandene spezifische Antikörper binden an die entsprechenden Antigene des Teststreifens. Durch Zugabe von 2 ml eines mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-human IgG Antikörpers kommt es nach einer 45 minütigen Inkubationszeit und anschließender Zugabe von 1,5 ml Substratlösung zu einer Färbereaktion und eine dunkle Bande wird auf dem Teststreifen sichtbar. Die Intensität der einzelnen Banden wird in Bezug zur *Cutoff*-Kontrollbande nach den Herstellerangaben bewertet und für die Testinterpretation herangezogen (s. Abbildung 2.1 und Tabelle 2.1).

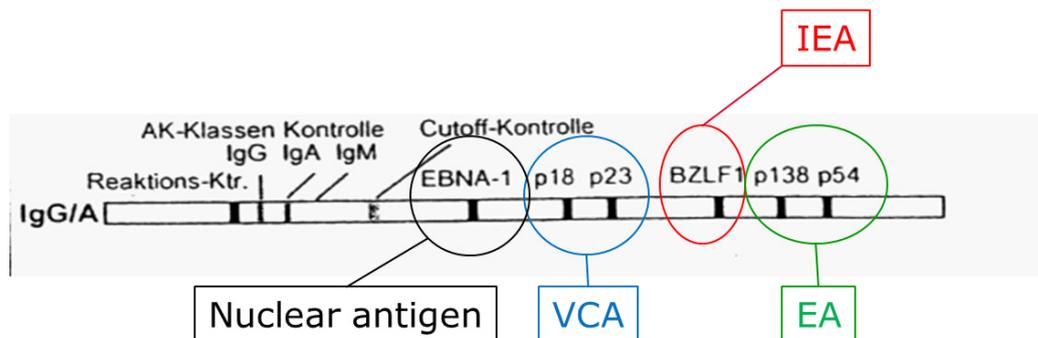


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines *recomLine*[®] EBV IgG Immunoblot Teststreifens. Jeder Teststreifen besteht aus einer mit rekombinanten, hochgereinigten EBV-Proteinen (EBNA-1, p18 (BFRF-3), p23 (BLRF-2), BZLF-1, p138 (BALF-2) und p54 (BMRF-1)) beschichteten Nitrozellulose-Membran. *Nuclear antigen* = nukleäres Antigen, *VCA* (*v*irus *c*apsid *a*ntigen) = Virus-Kapsid-Antigen, *IEA* (*i*mmediate-*e*arly *a*ntigen) = sehr frühes Antigen, *EA* (*e*arly *a*ntigen) = frühes Antigen.

Tabelle 2.1: Bewertung der Bandenintensität in Bezug zur *Cutoff*-Bande (recomLine® EBV IgG, Mikrogen GmbH)

Banden	Intensitätsbewertung
keine Reaktion	-
sehr schwache Intensität (geringer als <i>Cutoff</i> -Bande)	+/-
schwache Intensität (entspricht der <i>Cutoff</i> -Bande)	+
starke Intensität (stärker als <i>Cutoff</i> -Bande)	2+
sehr starke Intensität	3+

Ein Probandenserum wurde als EBV-reaktiv bezeichnet, sobald mindestens eine Antigenbande in der Intensität „+“ auf dem Streifen sichtbar war. Ein negatives Ergebnis lag vor, falls keine Bande in der Intensität „+“ oder darüber sichtbar war. Die Interpretation des individuellen EBV-Serostatus eines Probanden wurde anhand der in Tabelle 2.2 angegebenen Einteilung vorgenommen. EBNA-1 ist hierbei ein Marker für eine Abgelaufene Infektion (EBV-Durchseuchung). Eine Primärinfektion kann mit dem Vorliegen von IgG Antikörpern gegen EBNA-1 ausgeschlossen werden. IgG Antikörper gegen die Virus-Kapsid-Antigene (VCA) sind üblicherweise lebenslang nach einer bestehenden EBV-Infektion nachweisbar, wobei IgG Antikörper gegen p18 während einer Primärinfektion meist nicht detektierbar sind. BZLF-1, p23, p38 und p154 IgG Antikörper sind bei einer Primärinfektion häufig vorhanden. Bei einer EBV-Reaktivierung, kommt es zu einer starken Reaktion mit allen Antigenen auf dem Teststreifen. Lediglich anti-EBNA-1 Antikörper können in ca. 10 % der Bevölkerung verloren gehen.

Tabelle 2.2: Interpretation der Reaktivitätsmuster (recomLine® EBV IgG, Mikrogen GmbH)

Reaktivitätsmuster	EBV-Serostatus
Keine EBV-spezifischen Banden in der IgG-Bestimmung	EBV-seronegativ
EBNA-1 und p18 negativ (p23, BZLF-1 und EAs möglich)	Primärinfektion – Infektiöse Mononukleose (IM)
EBNA-1 und/oder p18 positiv; p23 und BZLF-1 häufig positiv; schwache EA-Titer möglich	Abgelaufene Infektion
Starke Reaktion mit allen Antigenen, in Ausnahmen anti-EBNA-1 Verlust	Reaktivierung

2.2.1.2 Enzygnost® Anti-EBV/IgG bzw. IgM *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Der Enzygnost® Anti-EBV/IgG bzw. IgM Enzymimmunoassay wurde in Verbindung mit dem ELISA Prozessor BEP® 2000 zum quantitativen Nachweis von EBV-spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern in humanem Plasma verwendet und gemäß den Herstellerangaben ausgeführt. Das Prinzip des verwendeten Enzymimmunoassays beruht auf einer Bindung der im Probandenmaterial vorhandenen EBV-spezifischen IgG-/IgM-Antikörper gegen die in den Reaktionsvertiefungen der Testplatten befindlichen EBV-Antigene (EA, VCA und EBNA-1 in gleichen Anteilen). An diese EBV-spezifischen Antikörper bindet sich ein zugegebenes anti-Human-IgG-/IgM/POD (Meerrettichperoxidase)-Konjugat. Durch anschließende Zugabe einer Chromogen-Gebrauchslösung (TMB plus Wasserstoffperoxid) wird der Enzymanteil des Konjugates unter Bildung einer blauen Farbe umgesetzt. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung POD beendet, wodurch die bei 405 nm zu messende gelbe Farbe entsteht. Die Intensität der gebildeten gelben Farbe ist der in der Probe enthaltenen Aktivität an EBV-spezifischen IgG-/IgM-Antikörpern proportional. Die Quantifizierung in Einheiten (U/ml) erfolgt automatisch, wobei das Detektionslimit bei 25 U/ml liegt.

2.2.1.3 Quantitativer EBV DNS-Nachweis mittels *real-time* Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für den quantitativen Nachweis der Epstein-Barr virusspezifischen Nukleinsäure (EBV-Last) mittels *real-time* PCR wurde die virale Nukleinsäure aus 500 µl Vollblut extrahiert. Die Nukleinsäure Extraktion erfolgte unter Verwendung des *DNS Sample Preparation Reagent Kits* (Abbott GmbH & Co. KG) und eines Extraktionsgerätes (Abbott GmbH & Co. KG, m2000sp) nach Herstellerangaben. Hierzu werden Magnetpartikel eingesetzt, welche die Nukleinsäure binden und eine Übertragung in eine *deep-well*-Platte und eine anschließende Amplifikation ermöglichen.

Die quantitative *real-time* PCR am Taqman ist am Institut für Virologie (TUM) als *in house* Verfahren etabliert und validiert. Aus der Probandenprobe extrahierte virale Nukleinsäure wurde mittels Zugabe von für die Zielsequenz spezifischen Primern, einer Fluoreszenz-markierten Sonde und einer DNS-Polymerase nach dem in Tabelle 2.3. angegebenen Schema amplifiziert.

Primer (Microsynth AG):

- T-EBV-POL-01 (F): 5' CCA GCT GCT GCT TGT CGA 3'
- T-EBV-POL-02 (R): 5' TCT TGG CTA GTC TGT TGA CCT CC 3'

Sonde (Microsynth AG):

- EBV: 5' FAM-TTT GGC GCG GAT CCT CGC A-TAMRA 3'

Im Taqman-Cycler wurde nachfolgendes Temperaturprofil (s. Tabelle 2.3) gefahren, das mehrere Zyklen von DNS-Aufspaltung (95°C), Primer Anlagerung und Strangverlängerung (60°C) durchläuft.

Tabelle 2.3: Temperaturprofil des Taqman-Cyclers

1 mal	Hold I:	50°C	2 Minuten
1 mal	Hold II:	95°C	10 Minuten
45 Zyklen	Denaturierung	95°C	15 Sekunden
	Annealing/Extension	60°C	1 Minute

Bei der Polymerisation wird die an den *template* Strang gebundene Sonde unter Emission eines Fluoreszenzsignales gespalten. Dieses Signal wird während eines jeden Zyklus gemessen und dient der Quantifizierung der Amplifikation und damit der virusspezifischen Nukleinsäure. Die EBV-Last wurde anhand einer Standardkurve aus mitgeführten Verdünnungen von 1×10^6 , 1×10^4 , 1×10^2 und 1×10^1 Genomäquivalenten eines EBV-Plasmids (PT-EBV Nr. 03/2-G – 6-G) pro Reaktion quantifiziert.

Positive Ergebnisse wurden auf die Anzahl der PBMC bezogen angegeben, indem die Anzahl an Genen des humanen Prion Proteins (*single copy* Gen) in jeder Probandenprobe bestimmt wurde. Hierzu wurden jeweils 5 µl extrahierte Nukleinsäure in einem *in house* Verfahren unter Verwendung folgender Primer und Sonde in einer Taqman *real-time* PCR amplifiziert.

Primer (Microsynth AG):

- pRp-T-F (F): 5' TGC TGG GAA GTG CCA TGA G 3'
- pRp-T-R (R): 5' CGG TGC ATG TTT TCA CGA TAG TA 3'

Sonde (Microsynth AG):

- 5' FAM-CAT CAT ACA TTT CGG CAG TGA CTA TGA GGA CC-TAMRA 3'

2.2.2 Immunologische Methoden zur Detektion von EBV-spezifischen zellvermittelten Immunantworten (CMI)

2.2.2.1 Festlegung der Transportbedingungen des Probenmaterials

Aus früheren Versuchen der AG Klinische Kooperationsgruppe „Immunmonitoring“ (Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München) war bekannt, dass die maximale Lagerzeit einer Blutprobe bis zur Isolation von PBMC acht Stunden nicht überschreiten sollte. Innerhalb dieses Zeitraumes kann gewährleistet werden, dass die detektierten Antigen-spezifischen CMI eines Spenders konstant bleiben. Auf diesen Erkenntnissen basierend, wurde für diese Studie festgelegt, dass das Blut der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden innerhalb von acht Stunden am Institut für Virologie in München eintreffen musste.

2.2.2.2 Isolierung und Kryokonservierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Die PBMC der Studienteilnehmer wurden innerhalb von acht Stunden nach der Blutentnahme aus heparinisiertem, bei Raumtemperatur gelagertem Blut, mittels Pancoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und zweimalig mit RPMI1640 Medium (mit 1 % P/S) gewaschen (250g, 10 min, 21°C). Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die PBMC mit Türkscher Lösung gefärbt, um eine Diskrimination von lebenden und toten Zellen zu ermöglichen und Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde die Anzahl an lebenden PBMC unter dem Mikroskop bestimmt. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bei 250g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und in FCS mit einem Zusatz von 10 % DMSO (1×10^7 PBMC/ml) aufgenommen und in einer Einfrierhilfe schrittweise auf -80 °C herunter gekühlt. Nach 24 Stunden wurden die PBMC zur Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.2.2.3 Auftauen und „Resten“ von PBMC

Kryokonservierte PBMC wurden bei 37°C aufgetaut und zweimal mit RPMI-10 gewaschen. Lebende Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung unter dem Mikroskop gezählt. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle für diese Arbeit verwendeten PBMC einem sogenannten „Resting“ Schritt unterzogen. Hierfür wurden PBMC für 18 Stunden in einem Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) in einer Konzentration von 2×10^6 PBMC/ml RPMI-10 in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit nur leicht zugedrehtem Deckel gelagert.

2.2.2.4 IFN- γ ELISpot Assay

Alle IFN- γ ELISpot Assays (*human IFN- γ ELISpot Kit with pre-coated plates*, Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden) wurden konform den Herstellerangaben durchgeführt. Lediglich die

im Protokoll angegebenen Waschschriffe wurden jeweils um zwei Schritte erhöht. Demnach wurden die bereits gecoateten ELISpot-Platten viermal mit sterilem PBS (200 $\mu\text{l/well}$) gewaschen und anschließend mit 200 $\mu\text{l/well}$ RPMI-10 Medium für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurde die Zellsuspension (100 $\mu\text{l/well}$) in einer Konzentration von 2×10^5 PBMC/*well* ausplattiert und 50 $\mu\text{l/well}$ des BZLF-1 oder EBNA-3a Peptidpools (1 $\mu\text{g/ml}$) als Stimulatorantigen hinzugegeben. Anschließend wurde die ELISpot-Platte für 20 Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Am nächsten Tag wurden die Platten sieben Mal mit PBS (200 $\mu\text{l/well}$) gewaschen und für zwei Stunden mit 100 $\mu\text{l/well}$ Biotin-konjugiertem IFN- γ Detektionsantikörper (in PBS mit Zusatz von 0,5 % FCS zu 1 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein siebenmaliger Waschschriff mit PBS (200 $\mu\text{l/well}$) und eine einstündige Inkubation mit 100 $\mu\text{l/well}$ Streptavidin-Alkaliner-Phosphatase (1:1000 Verdünnung in 0,5 % FCS). Abschließend wurde die Platte erneut sieben Mal mit PBS (200 $\mu\text{l/well}$) gewaschen, bevor 100 $\mu\text{l/well}$ Substratlösung hinzugegeben wurden. Sobald deutlich erkennbare Spots zu sehen waren, wurde die Reaktion durch ein Waschen der ELISpot-Platte unter Leitungswasser gestoppt. Zum Trocknen wurden die Platten über Nacht in Papiertücher gewickelt und im Dunklen aufbewahrt. Ein Scannen der Platten erfolgte innerhalb von 72 Stunden nach Entwicklung (s. 2.2.2.6).

2.2.2.5 IL-2 ELISpot Assay

Die IL-2 ELISpot Assays (*human IL-2 ELISpot Kit with pre-coated plates*, Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden) wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt, jedoch wurden die im Protokoll angegebenen Waschschriffe jeweils um zwei Schritte erhöht. Die bereits gecoateten ELISpot-Platten wurden viermal mit sterilem PBS (200 $\mu\text{l/well}$) gewaschen und mit RPMI-10 Medium (200 $\mu\text{l/well}$) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen (100 $\mu\text{l/well}$) in einer Konzentration von 2×10^5 PBMC/*well* ausplattiert und mit 50 $\mu\text{l/well}$ des BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools (1 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Im Falle einer PHA-L Stimulation (2 $\mu\text{g/ml}$) wurden 5×10^4 PBMC/*well* eingesetzt. Die Platten wurden für 20 Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Nach einem siebenmaligen Waschschriff mit PBS (200 $\mu\text{l/well}$) wurden die Platten zwei Stunden mit 100 $\mu\text{l/well}$ biotinyliertem IL-2 Detektionsantikörper (zu 0,5 $\mu\text{g/ml}$ mit PBS verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneutes siebenmaliges Waschen mit PBS (200 $\mu\text{l/well}$) und ein einstündiger Inkubationsschriff mit 100 $\mu\text{l/well}$ Streptavidin-Alkaliner-Phosphatase (1:1000 in PBS verdünnt) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Platten sieben Mal mit PBS (200 $\mu\text{l/well}$) gewaschen und mit 100 $\mu\text{l/well}$ Substratlösung inkubiert, bis deutlich sichtbare Spots erkennbar waren. Die Reaktion wurde durch intensives Waschen der Platte unter Leitungswasser gestoppt. Die Platten wurden über Nacht zum Trocknen in Papiertücher gewickelt und im Dunklen

aufbewahrt. Ein Scannen der Platten erfolgte innerhalb von 72 Stunden nach Entwicklung (s. 2.2.2.6).

2.2.2.6 IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay

Der IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay (*human IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Kit with pre-coated plates*, Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden) wurde laut Herstellerangaben ausgeführt. Lediglich die im Protokoll angegebenen Waschschrte wurden jeweils um zwei Schritte erhöht. Die in Abbildung 2.2 dargestellte Graphik verdeutlicht das methodische Vorgehen bei der Durchführung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays. Die bereits gecoateten FluoroSpot-Platten wurden vier Mal mit sterilem PBS (200 μ l/well) gewaschen und mit sterilem PBS mit einem Zusatz von 10 % FCS (200 μ l/well) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des PBS wurde die Zellsuspension (100 μ l/well) inklusive des co-stimulierenden Antikörpers anti-CD28 (0,1 μ g/ml) in einer Konzentration von entweder 2×10^5 PBMC/well für BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpool (50 μ l je Antigen, c = 1 μ g/ml) stimulierte PBMC oder 5×10^4 PBMC/well für PHA-L (50 μ l, c = 2 μ g/ml) stimulierte PBMC ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für 20 Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Nach siebenmaligem Waschen mit sterilem PBS (200 μ l/well) wurde die Platte für zwei Stunden mit 100 μ l FITC-konjugiertem IFN- γ Detektionsantikörper (1:200 in PBS verdünnt) und 100 μ l biotinyliertem IL-2 Detektionsantikörper (mit PBS zu 1 μ g/ml verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein siebenmaliges Waschen mit PBS (200 μ l/well) und eine einstündige Inkubation mit 100 μ l/well anti-FITC-Green Antikörpern (1:100 in PBS verdünnt) und 100 μ l/well Streptavidin-Rot (1:200 in PBS verdünnt). Nach der Inkubation wurden die Platten erneut sieben Mal mit PBS (200 μ l/well) gewaschen und mit 100 μ l/well eines Fluoreszenzverstärkers für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Kunststoffunterlage entfernt und die Membran beidseitig mit Leitungswasser gewaschen. Die Platten wurden über Nacht zum Trocknen in Papiertücher gewickelt und im Dunklen aufbewahrt. Ein Scannen der Platten erfolgte innerhalb von 72 Stunden nach Entwicklung (s. 2.2.2.6).

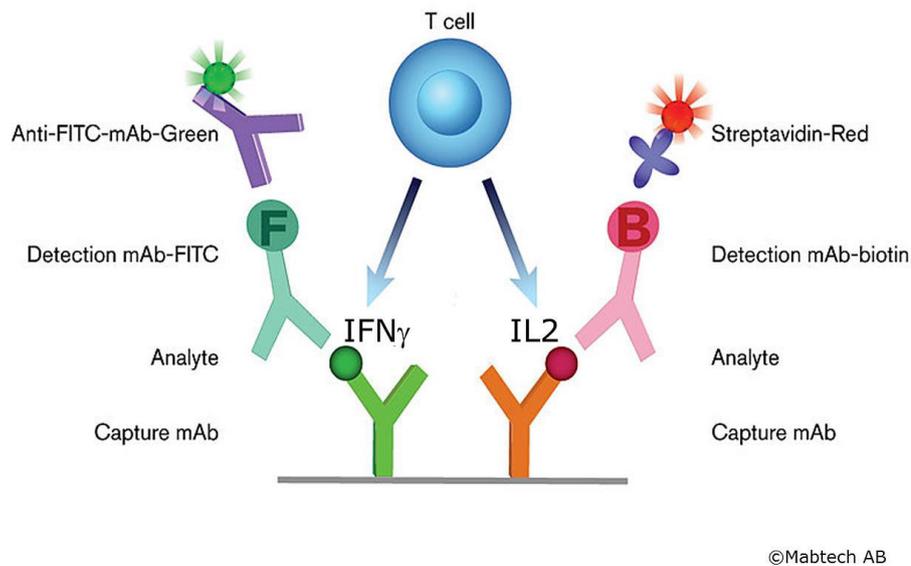


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays (Mabtech AB, Schweden).

2.2.2.7 Erfassung der Daten der ELISpot- und FluoroSpot Assays

Alle ELI- und FluoroSpot-Platten wurden innerhalb von drei Tagen nach Fertigstellung des Assays mit Hilfe eines automatisierten Analysegerätes (CTL-ImmunoSpot® S6 Ultra-V Analyzer/CTL ImmunoSpot 5.1 Professional DC Software, CTL Europe, Bonn, Deutschland) gescannt und zeitnah ausgewertet. Dieses Gerät ermöglicht sowohl die Auswertung herkömmlicher enzymatischer ELISpot Assays, als auch ein Analysieren von auf fluoreszenzmarkierten Antikörpern basierenden FluoroSpot Assays. Das Scannen der ELISpot-Platten erfolgte durch automatisch festgelegte Einstellungen des Lesegerätes. Die FluoroSpot-Platten wurden mit manuell festgelegten Einstellungen für die Belichtungsstärke und –zeit des UV-Lichts für beide Fluorochrom-Filter (FITC und PE) gescannt. Das Zählen von Zytokinsekretierenden Zellen (SFC, *spot forming cells*) wurde sowohl für den ELISpot- als auch den FluoroSpot Assay manuell durchgeführt. Hierbei wurden die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Erfahrungen bei der Etablierung und Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays in einer Labor-internen SOP (*standard operating procedure*) zusammengefasst und für alle Analysen angewendet. Im Detail wurde standardmäßig für alle Assays auf eine bestmögliche Separation der einzelnen Spots geachtet. Die Sensitivität mit der die einzelnen Spots der verschiedenen Assays gezählt wurden, wurde für jede Platte Spender- und Antigen-abhängig eingestellt. Soweit praktikabel wurde darauf geachtet, möglichst einheitliche Zählparameter für verschiedene Spender und Antigene zu finden. Einheitlich wurden 90 % der Fläche eines *wells* zum Auszählen verwendet, um eventuell unsaubere Randbereiche auszuschließen. Sämtliche Ergebnisse der einzelnen *wells* wurden auf 100 % normalisiert. Alle ausgeführten ELI- und

FluoroSpot Assays wurden durch eine zweite Person einer Qualitätskontrolle unterzogen, welche ebenso ein Entfernen von Artefakten als auch ein Ausschließen von defekten *wells* beinhaltet.

2.2.2.8 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Abbildung 2.3 zeigt ein während dieser Arbeit entstandenes Bild eines repräsentativen IFN- γ (A) und IL-2 (B) FluoroSpot *wells*. Abbildung 2.3C zeigt eine Überlagerung der Aufnahmen des IFN- γ (A) und IL-2 (B) *wells* und die daraus resultierende Darstellung von doppelt-positiven IFN- γ /IL-2 sekretierenden Zellen (gelb). Grüne Spots (Abbildung 2.3A) definieren IFN- γ sekretierende und rote Spots (Abbildung 2.3B) IL-2 sekretierende Zellen. Durch eine Überlagerung der Aufnahmen beider *wells* ergaben sich für doppelt-positive, also sowohl IFN- γ als auch IL-2 sekretierende Zellen, gelbgefärbte Spots.

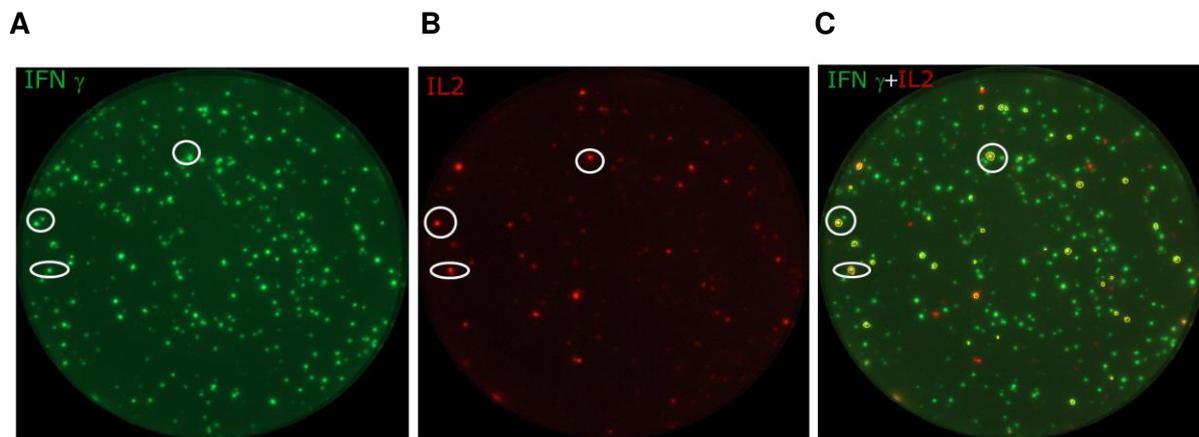


Abbildung 2.3: Aufnahmen eines IFN- γ (A), IL-2 (B) und doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 FluoroSpot *wells* (CTL-ImmunoSpot® S6 Ultra-V Analyzer, Cellular Technology Limited (CTL), Deutschland). Die weißen Kreise markieren grüne (A), rote (B) und gelbe (C) Spots, welche durch IFN- γ (A), IL-2 (B) oder doppelt-positive IFN- γ und IL-2 (C) sekretierende Zellen an dieser Stelle des *wells* entstanden sind.

Die in dieser Arbeit detektierten Ergebnisse wurden als IFN- γ , IL-2 bzw. doppelt-positive IFN- γ +IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC für BZLF-1 und EBNA-3a restimulierte PBMC und IFN- γ , IL-2 bzw. doppelt-positive IFN- γ +IL-2 SFC/ 5×10^4 PBMC für PHA-L restimulierte PBMC angegeben.

Ob es sich bei den nach *in vitro* Restimulation von PBMC detektierten CMI um eine statistisch signifikant von der unstimulierten PBMC Kontrolle abgrenzbaren positiven Reaktivität handelte, wurde anhand des frei verfügbaren online-basierten statistischen Tests DFR(2x) (<http://www.scharp.org/zoe/runDFR/>) (Moodie et al., 2010) überprüft. Diese Methode wurde ausgewählt, da sie im Vergleich zu anderen statistischen und empirischen Methoden eine hohe Detektionsrate bei sehr niedriger falsch-positiv Rate (2 %) (Moodie et al., 2010) liefert. Die Vereinigung für Krebsimmuntherapie („Association for Cancer Immunotherapy“, CIMT) empfiehlt zudem im Rahmen der Harmonisierung von Immun-Assays diese Vorgehensweise.

Als weiteres Kriterium wurden nach Anwendung des DFR(2x) Tests nur die antigenspezifischen CMI als valide gewertet, welche größer als 10 antigenspezifische SFC/ 2×10^5 PBMC (BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpool stimulierte PBMC) bzw. 10 antigenspezifische SFC/ 2×10^4 PBMC (PHA-L stimulierte PBMC) waren.

Alle detektierten FluoroSpot Ergebnisse wurden einer separaten Qualitätskontrolle unterzogen und von mindestens einer weiteren Person gesichtet und auf ihre Gültigkeit hin kontrolliert.

2.3 Datenverarbeitung und Statistik

Die Administration der erzielten Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2010. Die graphische Aufarbeitung der Daten wurde mit den Programmen Graph Pad Prism und Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Bei allen Box-Whisker Graphiken wurde eine Darstellung vom 5 %-Quartil bis zum 95 %-Quartil gewählt. Hierbei entspricht das untere Whisker dem Bereich in dem 5 % und das obere Whisker dem Bereich in dem 95 % der detektierten Werte liegen. Der Boxplot zeigt das untere Quartil (25 %), den Median (50 %) und das obere Quartil (75 %) an. Die außerhalb dieses Wertebereichs liegenden Werte, werden als Punkte dargestellt.

Eine statistische Auswertung der Daten wurde mit den Programmen Graph Pad Prism und R (für die Berechnung des Konkordanz-Korrelationskoeffizienten nach Lin) vorgenommen. In allen Fällen wurden nichtparametrische Tests verwendet. Erhaltene p -Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. Ein Konfidenzintervall von 95 % wurde für alle statistischen Betrachtungen gewählt.

Für den Vergleich von Ergebnissen der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und der Kontrollprobanden wurde der Mann-Whitney Test angewendet. Gab es bei den zugrundeliegenden Daten mehrere Einzelergebnisse aus verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden, wurden für jeden einzelnen Probanden der Mittelwert aus diesen Einzelwerten berechnet und für die statistische Analyse verwendet.

Für die statistische Auswertung der detektierten Ergebnisse der Nachwuchsleistungssportler während der verschiedenen Belastungsphasen (Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase) wurde ein verbundener One-Way Anova Test (Friedman Test) mit einem angeschlossenen Dunn's multiple Comparison Test angewendet. Eine Rangkorrelation nach Spearman wurde für die Überprüfung des Zusammenhanges der detektierten anti-EBV IgG-Titer und der EBV-Last angewendet.

Die Variationskoeffizienten (% CV) wurden aus dem Quotienten der Standardabweichung und dem arithmetischen Mittelwert gebildet. Die Bewertung der Vergleichbarkeit der ELISpot- und FluoroSpot Assay Methode erfolgte anhand der Bland-Altman Methode (Bland & Altman, 1986).

Diese Methode berücksichtigt die Verzerrung und Streuung der Daten und ermöglicht eine Beurteilung der Höhe und der Muster der Abweichungen zwischen den Messmethoden. Für die graphische Darstellung der Vergleichbarkeit beider Assay Methoden wurde die Differenz (FluoroSpot-ELISpot) der anhand der verschiedenen Assay Methoden ermittelten IFN- γ oder IL-2 SFC eines jeden Spenders berechnet und gegen den Mittelwert der Messungen der beiden Assay Methoden aufgetragen (Grouven, Bender, Ziegler, & Lange, 2007). Nach Grouven et al. (2007) liegen bei einer hinreichend symmetrischen Verteilung der Differenzen 95 % der Werte im Bereich $d \pm 1,96 \times s$, wobei d die durchschnittliche Differenz (Verzerrung) der Messwerte der beiden Assay Methoden und s die Standardabweichung der Differenzen darstellt. Die Grenzen ($d \pm 1,96 \times s$) werden als Übereinstimmungsgrenzen („*limits of agreement*“) bezeichnet. Zusätzlich wurde der Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin (ρ_c) (Lin, 1989) für die Bewertung der Vergleichbarkeit beider Assay Methoden berechnet. Dieser misst die Streuung der Messwerte um die Winkelhalbierende und somit die Verzerrung, d.h. die durchschnittliche Differenz der detektierten Anzahl an SFC beider Assay Methoden. Liegt der Konkordanz-Korrelationskoeffizient bei $\rho_c = 1$ spricht man von einer perfekten Übereinstimmung der erbrachten Ergebnisse beider Assay Methoden.

Ob es sich bei den nach Antigen-Restimulation von PBMC detektierten CMI um eine statistisch signifikant von der unstimulierten PBMC Kontrolle abgrenzbaren positiven Reaktivität handelte, wurde anhand des frei verfügbaren online-basierten statistischen Tests DFR(2x) (<http://www.scharp.org/zoe/runDFR/>) (Moodie et al., 2010) überprüft.

2.4 Studiendesign

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Longitudinalstudie „Belastbarkeit und Trainierbarkeit aus internistischer Sicht unter besonderer Berücksichtigung des Immunsystems bei NachwuchsleistungssportlerInnen“ (gefördert durch das Bundesinstitut für Sportwissenschaften, BISp,) wurde auf der Grundlage einer Studie an Hochleistungssportlern (Hoffmann et al., 2010), welche am Institut für Virologie der Technischen Universität München (TUM) in Kooperation mit dem Institut für Präventive und Rehabilitative Sportmedizin (TUM) durchgeführt wurde, ins Leben gerufen. Hoffmann et al. detektierten in einer Gruppe von erwachsenen Hochleistungssportlern eine erhöhte EBV-Last, bei zugleich verminderten anti-EBV IgG-Titern im Vergleich zu einer altersadäquaten Kontrollgruppe (Abb. 2.4).

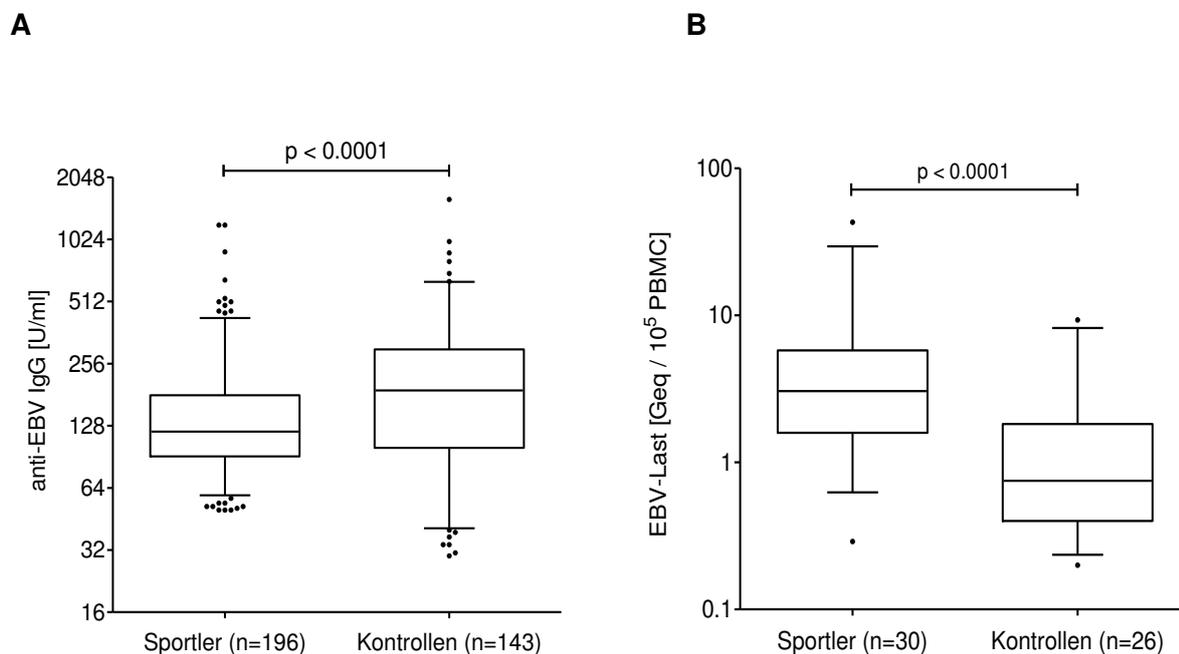


Abbildung 2.4: Anti-EBV IgG-Titer (A) und EBV-Last (B) in einer Kohorte von erwachsenen Hochleistungssportlern verglichen mit einer altersadäquaten Kontrollgruppe. Dargestellt sind die detektierbaren anti-EBV IgG-Titer (A) und die EBV-Last (B) in einer Gruppe von erwachsenen Hochleistungssportlern und Kontrollprobanden. Die Daten stammen aus einer früheren Publikation des Instituts für Virologie, TUM (Hoffmann et al., 2010).

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von intensivem physischem Training auf die EBV-spezifische Immunantwort in einer Gruppe aus jugendlichen Nachwuchsleistungssportlern (diese Bezeichnung wird in der gesamten nachfolgenden Arbeit geschlechtsneutral anstatt dem Begriff „NachwuchsleistungssportlerInnen“ verwendet) im Vergleich zu einer altersadäquaten Kontrollgruppe zu analysieren. Diese Studie wurde in Kooperation mit dem Institut für Präventive und Rehabilitative Sportmedizin (TUM) und dem Lehrstuhl für Sportpsychologie (TUM) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden in beiden Kohorten diagnostisch-serologische EBV-spezifische Parameter (EBV-Serostatus, anti-EBV IgG-Titer, EBV-Last) und EBV-spezifische CMI über vier Jahre hinweg bestimmt und analysiert. In der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler fanden innerhalb von vier Jahren mehrere Blutentnahmen zu festgelegten Zeitpunkten statt. Soweit möglich, wurden von jedem Nachwuchsleistungssportler drei Blutentnahmen pro Jahr durchgeführt. Es wurde versucht diese jeweils in einer Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase stattfinden zu lassen, um den Einfluss der Trainings- und Wettkampfbelastung auf die EBV-spezifische Immunantwort besser beurteilen zu können (Abbildung 2.5).

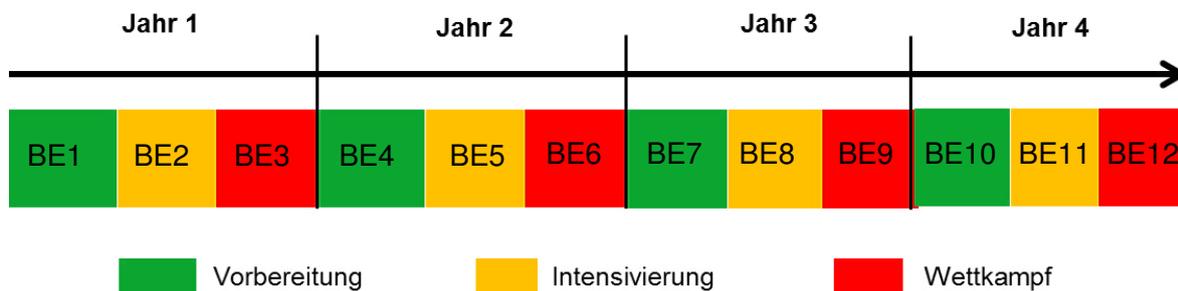


Abbildung 2.5: Studiendesign und Blutentnahmezeitpunkte in der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler. BE = Blutentnahmezeitpunkt

Da die Rekrutierung der Nachwuchsleistungssportler erst mit dem Studienbeginn einsetzte, konnte die Probandenzahl erst nach und nach erhöht werden. Das führte dazu, dass die einzelnen Nachwuchsleistungssportler unterschiedlich häufig an Blutentnahmen teilgenommen haben.

In der Kontrollkohorte fanden bei den meisten Probanden einmalige Blutentnahmen ($n = 238$) statt und nur von einem Teil der Probanden ($n = 50$) konnte eine zweite Blutentnahme zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden

Innerhalb der vierjährigen Studiendauer wurden 296 Nachwuchsleistungssportler mit einem Alter zwischen neun und 20 Jahren (105 weiblich, 191 männlich) und 288 Kontrollprobanden (164 weiblich, 124 männlich) zwischen elf und 20 Jahren in das Studienkollektiv aufgenommen. Das Kollektiv der Nachwuchsleistungssportler setzte sich aus Sportlern zehn verschiedener Sportarten zusammen (Tabelle 3.1). Die Rekrutierung der Probanden und die Blutentnahmen wurden durch das Zentrum für Prävention und Sportmedizin der TUM durchgeführt.

Tabelle 3.1: Kollektiv der Nachwuchsleistungssportler

Sportarten	Standort
Eiskunstlauf (n = 6)	Dresden
Eisschnelllauf (n = 11)	Dresden
Fußball (n = 77)	(TSV 1860) München
Radrennfahren (n = 14)	Irschenberg
Radrennfahren (n = 21)	Leipzig
Radrennfahren (n = 31)	München
Schwimmen (n = 6)	Dresden
Schwimmen (n = 24)	München
Skilanglauf (n = 55)	Oberstdorf
Tennis (n = 7)	Dresden, Leipzig
Turnen (n = 4)	Dresden
Volleyball (n = 9)	Dresden
Volleyball (n = 25)	Kempfenhausen
Wasserspringen (n = 6)	Dresden

Das Kontrollkollektiv (n = 288) wurde aus Schülern bayerischer Gymnasien alters- und geschlechtspassend zum Nachwuchsleistungssportlerkollektiv aufgebaut. Hierbei fanden Blutentnahmen einmalig bei 238 Kontrollprobanden und zweimalig bei 50 Kontrollprobanden statt.

3.2 Humorale EBV-spezifische Immunantwort

3.2.1 Bestimmung des EBV-Serostatus in beiden Kohorten

3.2.1.1 Verteilung der EBV-Seroprävalenz in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden

Eine hinreichend große EBV-Seroprävalenz ist die Voraussetzung, um die EBV-spezifische Immunantwort als potenziellen prognostischen Biomarker für die individuelle Belastbarkeit im Nachwuchsleistungssport zu validieren. In einem ersten Schritt wurde daher der EBV-Serostatus der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden mittels des EBV-Immunoblot Assays bestimmt. Abbildung 3.1 stellt den prozentualen Anteil an EBV-seropositiven und -seronegativen Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden am Ende der vierjährigen Studie dar.

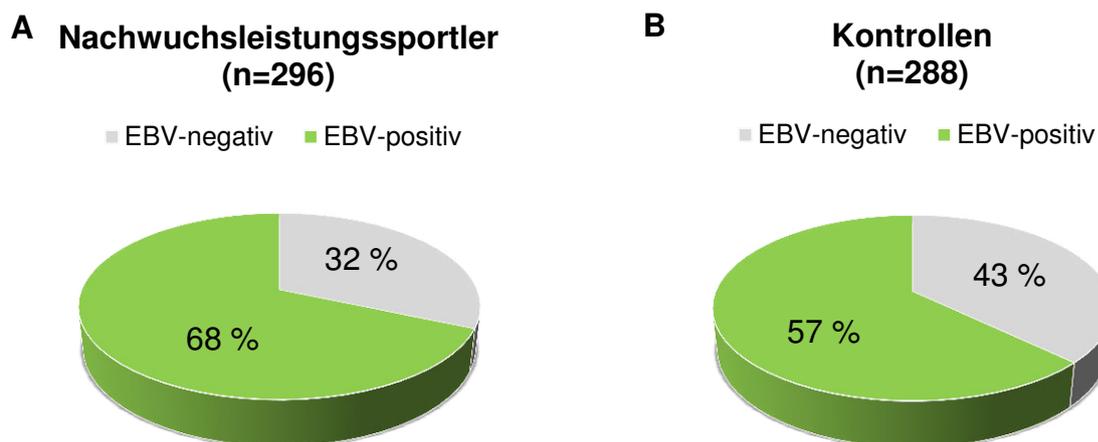


Abbildung 3.1: EBV-Seroprävalenz in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler (A) und Kontrollprobanden (B). Dargestellt ist der prozentuale Anteil EBV-seropositiver und -seronegativer Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden am Ende der vierjährigen Studie.

In der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler ist mit einem Anteil von 68 % (n = 201) EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern (Abbildung 3.1A) eine ausreichend hohe EBV-Seroprävalenz gegeben, um die EBV-spezifische Immunantwort als einen prognostischen Biomarker für die individuelle Belastbarkeit im Nachwuchsleistungssport in Betracht zu ziehen. Auch in der Kontrollgruppe lag ein ausreichend hoher Anteil an EBV-seropositiven Probanden (57 %; n = 164) vor (Abbildung 3.1B). Die detaillierte Verteilung der EBV-Seroprävalenz in den einzelnen Altersstufen wird im nachfolgenden Abschnitt näher betrachtet.

3.2.1.2 EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler

Des Weiteren stellt sich die Frage, wie der Anteil an EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern in den verschiedenen Jahrgangsstufen verteilt ist und ob der Anteil EBV-seropositiver Nachwuchsleistungssportler auch in den jüngeren Jahrgängen für eine Beurteilung ausreichend groß ist. Um das zu analysieren, wurden zu jedem Blutentnahmezeitpunkt eines Nachwuchsleistungssportlers das Alter und der entsprechende EBV-Serostatus dokumentiert. Änderte sich der EBV-Serostatus eines Nachwuchsleistungssportlers innerhalb eines Lebensjahres, wurde der zuletzt bestimmte EBV-Serostatus für die Analyse verwendet. Abbildung 3.2 zeigt den Anteil EBV-seronegativer und -seropositiver Nachwuchsleistungssportler in Abhängigkeit von der Altersstufe. Die geringste EBV-Seroprävalenz lag in der Gruppe der 13-jährigen Nachwuchsleistungssportler vor, welche mit einem Anteil von 52 % EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern aber als ausreichend hoch zu betrachten ist. Im Einzelnen war ein 9-jähriger Nachwuchsleistungssportler EBV-seropositiv (100 %). In den nachfolgenden Altersstufen waren 67 % der 10- (n = 6) und 11-jährigen (n = 9) Nachwuchsleistungssportler und 70 % der 12-jährigen (n = 44) Nachwuchsleistungssportler EBV-seropositiv. In der Gruppe der 13-jährigen (n = 88) und 14-jährigen (n = 141) Nachwuchsleistungssportler waren 52 % bzw. 57 % EBV-seropositiv. Bei den 15- (n = 171), 16- (n = 170) und 17-jährigen (n = 141) Nachwuchsleistungssportlern lag der Anteil an EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern bei je 62 und 68 %. 75 % der 18-jährigen (n = 75), 82 % der 19-jährigen (n = 28) und 89 % der 20-jährigen Nachwuchsleistungssportler waren EBV-seropositiv (Abbildung 3.2).

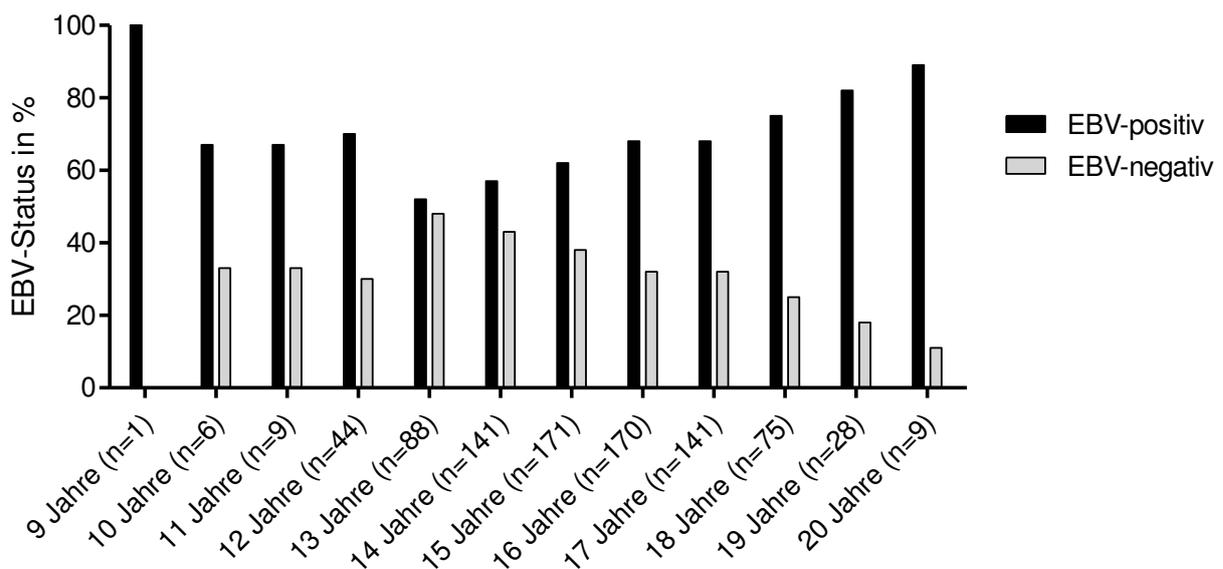


Abbildung 3.2: EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter der Nachwuchsleistungssportler. Dargestellt ist der prozentuale Anteil EBV-seronegativer (grau) und -positiver (schwarz) Nachwuchsleistungssportler in verschiedenen Jahrgangsstufen.

Zusammenfassend war somit eine ausreichend hohe EBV-Seroprävalenz in allen Jahrgangsstufen gegeben und das gesamte Kollektiv an Nachwuchsleistungssportlern konnte in die weitere Analyse einbezogen werden.

3.2.1.3 EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter in der Gruppe der Kontrollprobanden

In der Kontrollgruppe standen Probanden mit einem Alter zwischen elf und 20 Jahren für die Bestimmung der EBV-Seroprävalenz zur Verfügung. In der Gruppe der 11-jährigen Kontrollprobanden (n = 9) waren 66 % im Vergleich zu lediglich 38 % der 12-jährigen (n = 21) Kontrollprobanden EBV-seropositiv. In den nachfolgenden Altersgruppen waren bei den 13-jährigen (n = 35) 37 % EBV-seropositiv, bei den 14-jährigen (n = 57) 61 % und bei den 15-jährigen (n = 65) 66 % EBV-seropositiv. Unter den 16-jährigen (n = 60) Kontrollprobanden waren 58 % EBV-seropositiv und in der Gruppe der 17-jährigen Kontrollprobanden (n = 51) lag die EBV-Seroprävalenz bei 65 % EBV-seropositiven Probanden. Die 18-jährigen (n = 25) Kontrollprobanden waren zu 84 % und die 19- (n = 5) und 20-jährigen Kontrollprobanden (n = 1) jeweils zu 40 bzw. 100 % EBV-seropositiv (Abbildung 3.3). Im Vergleich zur Gruppe der Nachwuchsleistungssportler war somit auch in der Gruppe der Kontrollprobanden eine ausreichend hohe EBV-Seroprävalenz gegeben.

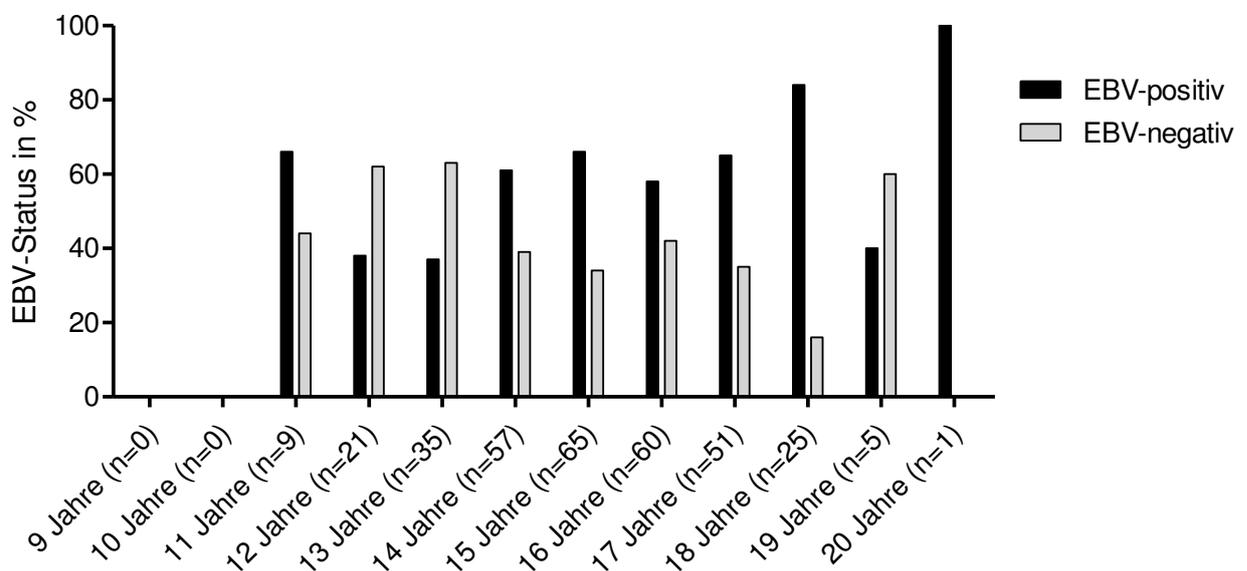


Abbildung 3.3: EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter in der Gruppe der Kontrollprobanden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an EBV-seronegativen (grau) und -positiven (schwarz) Kontrollprobanden in verschiedenen Jahrgangsstufen.

3.2.1.4 EBV-Reaktivierungen als ein möglicher Indikator für eine erhöhte physische oder psychische Belastung bei Nachwuchsleistungssportlern

Sollte die physische und psychische Belastung des Trainings- und Wettkampfumfanga eine immunschwächende Auswirkung auf Nachwuchsleistungssportler haben, könnte das in einem gehäuftem Auftreten von EBV-Reaktivierungen in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler im Vergleich zur Kontrollgruppe resultieren. Um dies zu analysieren wurde in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und der Kontrollprobanden der Anteil an Probanden mit mindestens einmaligem Auftreten eines EBV-Reaktivierungsstatus bestimmt. Abbildung 3.4 zeigt, dass 9 % (n = 18) der Nachwuchsleistungssportler im Vergleich zu 3 % (n = 5) der Kontrollprobanden mindestens einmal während der Studiendauer einen EBV-Reaktivierungsstatus zeigten.

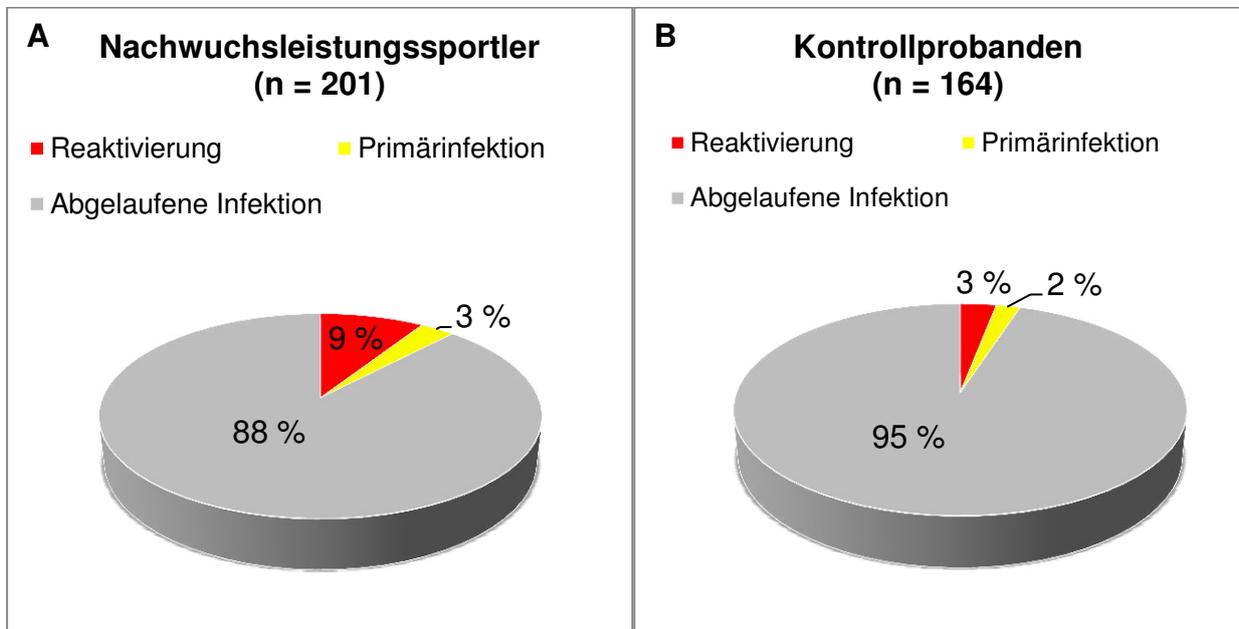


Abbildung 3.4: Prozentualer Anteil an EBV-Reaktivierungen, -Primärinfektionen und abgelaufenen EBV-Infektionen in der Gruppe der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler (A) und der EBV-seropositiven Kontrollprobanden (B). Der prozentuale Anteil an EBV-Reaktivierungen (rot), -Primärinfektionen (gelb) und abgelaufenen EBV-Infektionen (grau) wurde in Bezug auf die Gesamtzahl an EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern (n = 201) und Kontrollprobanden (n = 164) berechnet. Ein mehrfaches Auftreten eines EBV-Reaktivierungsstatus an verschiedenen Untersuchungszeitpunkten eines Nachwuchsleistungssportler oder Kontrollprobanden wurde nicht gewichtet.

3.2.1.5 Auftretende EBV-Primärinfektionen in beiden Kohorten

Da neben EBV-Reaktivierungen auch symptomatische EBV-Primärinfektionen (Infektiöse Mononukleose, IM) ein Problem im Hochleistungssport darstellen, wurde der Anteil an EBV-Primärinfektionen in beiden Kohorten bestimmt (Abbildung 3.4). Wurde bei einem Nachwuchsleistungssportler bzw. einem Kontrollprobanden eine EBV-Primärinfektion mit Hilfe des Immunoblots diagnostiziert, wurde dieser Proband in Abbildung 3.4 ausschließlich der Gruppe der EBV-Primärinfektionen zugeordnet, unabhängig davon, ob er zu einem früheren Zeitpunkt einen negativen EBV-Serostatus oder zu einem späteren Zeitpunkt den Status einer abgelaufenen EBV-Infektion aufwies. Aus Abbildung 3.4 wird ersichtlich, dass mit einem Anteil von 3 % (n = 8) in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und 2 % (n = 4) in der Gruppe der Kontrollprobanden nur bei sehr wenigen Probanden eine EBV-Primärinfektion während der Studiendauer stattgefunden hat. Keiner dieser Nachwuchsleistungssportler mit einer detektierten EBV-Primärinfektion zeigte Symptome oder Leistungsbeeinträchtigungen und somit trat die zuvor dargelegte Problematik einer symptomatischen EBV-Primärinfektion in dem vorliegenden Kollektiv nicht auf.

3.2.2 Quantifizierung der anti-EBV IgG-Titer in beiden Kohorten

3.2.2.1 Quantitativer Vergleich der anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden

In einem ersten Schritt wurden die anti-EBV IgG-Titer der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler und der EBV-seropositiven Kontrollprobanden verglichen. Insgesamt konnte bei 194 EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern (97 %) und 151 EBV-seropositiven Kontrollprobanden (92 %) ein über dem Detektionslimit von 25 U/ml liegender anti-EBV IgG-Titer nachgewiesen werden. Abbildung 3.5 zeigt, dass kein signifikanter Unterschied ($p = 0,127$) in der Höhe der anti-EBV IgG-Titer zwischen der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler (Median: 116,5 U/ml / Wertebereich: 28,0 – 586,0 U/ml) und der Kontrollgruppe (Median: 100,0 U/ml / Wertebereich: 26,0 – 878,0 U/ml) vorlag.

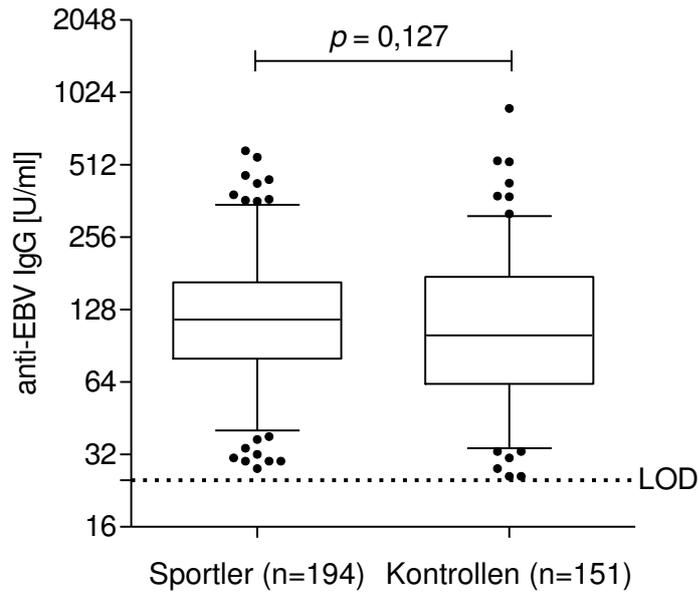


Abbildung 3.5: Anti-EBV IgG-Titer (U/ml) in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden. Dargestellt sind die anti-EBV IgG-Titer der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler und der EBV-seropositiven Kontrollprobanden. Hierfür wurde für jeden einzelnen Nachwuchsleistungssportler der Mittelwert seiner detektierten anti-EBV IgG-Titer aus den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten ermittelt und für die Analyse verwendet. Innerhalb der Kontrollgruppe wurde identisch vorgegangen, falls ein Kontrollproband häufiger als einmal an einer Blutentnahme im Rahmen der Studie teilgenommen hat. Die statistische Signifikanz der erzielten Ergebnisse beider Kohorten wurde mithilfe des Mann-Whitney Tests überprüft. LOD = Detektionslimit.

3.2.2.2 Anti-EBV IgM-Titer in beiden Kohorten

Beim Nachweis einer EBV-Primärinfektion wurde in beiden Kohorten die Höhe der anti-EBV IgM-Titer mittels ELISA bestimmt. Lediglich bei einem Nachwuchsleistungssportler konnten anti-EBV IgM Antikörper in einer Höhe von 181 U/ml nachgewiesen werden. Die restlichen getesteten Probanden mit Primärinfektionen zeigten ein negatives Ergebnis im ELISA.

3.2.2.3 Anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen

Das Ziel dieser Studie war, den Einfluss von intensiver physischer und psychischer Belastung auf die EBV-spezifische Immunantwort näher zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde das Studiendesign so angelegt, dass die Blutentnahmen der Nachwuchsleistungssportler mehrmals im Jahr und wenn möglich, innerhalb verschiedener Belastungsphasen (Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase) stattfanden. Für einen Vergleich der aus verschiedenen Belastungsphasen stammenden anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler wurden nur jene Probanden einbezogen, welche mindestens einmal zu jeder Belastungsphase an einer Blutentnahme teilgenommen hatten (n = 117). Abbildung 3.6 zeigt einen signifikanten

Unterschied der detektierten anti-EBV IgG-Titer während der Intensivierungs- und Wettkampfphase ($p < 0,001$) der Nachwuchsleistungssportler. Die während der Vorbereitungsphase gemessenen anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler wiesen keinen signifikanten Unterschied zu den anti-EBV IgG-Titern der Intensivierungs- und Wettkampfphase auf. Im Einzelnen wurden im Median 118,0 U/ml (Wertebereich: 27,0 – 647,0 U/ml) während der Vorbereitungsphase, 113,0 U/ml (Wertebereich: 28,0 – 599,0 U/ml) während der Intensivierungsphase und 124,0 U/ml (Wertebereich: 26,0 – 573,0 U/ml) während der Wettkampfphase detektiert (Abbildung 3.6).

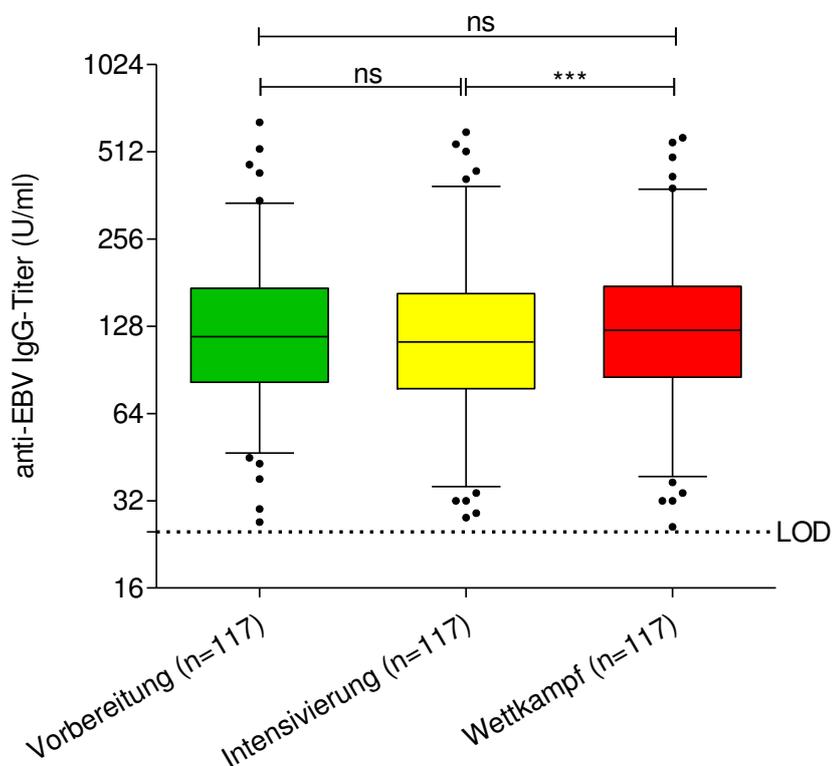


Abbildung 3.6: Anti-EBV IgG-Titer (U/ml) der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen. Dargestellt ist die Höhe der über dem Detektionslimit liegenden anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase. Gab es pro Nachwuchsleistungssportler mehrere Werte aus einer der drei Belastungsphasen, wurde von diesen Einzelwerten der Mittelwert gebildet und für die weitere Analyse verwendet. Als statistischer Test wurde ein verbundener One-Way Anova Test (Friedman Test, $p < 0,001$) mit angeschlossenen Dunn's multiple Comparison Test durchgeführt. LOD = Detektionslimit; ns = nicht signifikant; *** = $p < 0,001$.

3.2.2.4 Anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen verglichen mit der Kontrollgruppe

In einem weiteren Schritt wurden die detektierten anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler zum Zeitpunkt verschiedener Belastungsphasen den anti-EBV IgG-Titern der Kontrollprobanden gegenübergestellt. Wie in Abbildung 3.7 ersichtlich, ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Wettkampfphase (Median: 124,0 U/ml / Wertebereich: 26,0 – 573,0 U/ml) verglichen mit den anti-EBV IgG-Titern der Kontrollprobanden (Median: 100,0 U/ml / Wertebereich: 26,0 – 878,0 U/ml). Ein Vergleich der anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs- (Median: 118,0 U/ml / Wertebereich: 27,0 – 647,0 U/ml) und Intensivierungsphase (Median: 113,0 U/ml / Wertebereich: 28,0 – 599,0 U/ml) mit den anti-EBV IgG-Titern der Kontrollgruppe (Median: 100,0 U/ml / Wertebereich: 26,0 – 878,0 U/ml) erbrachte keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 3.7).

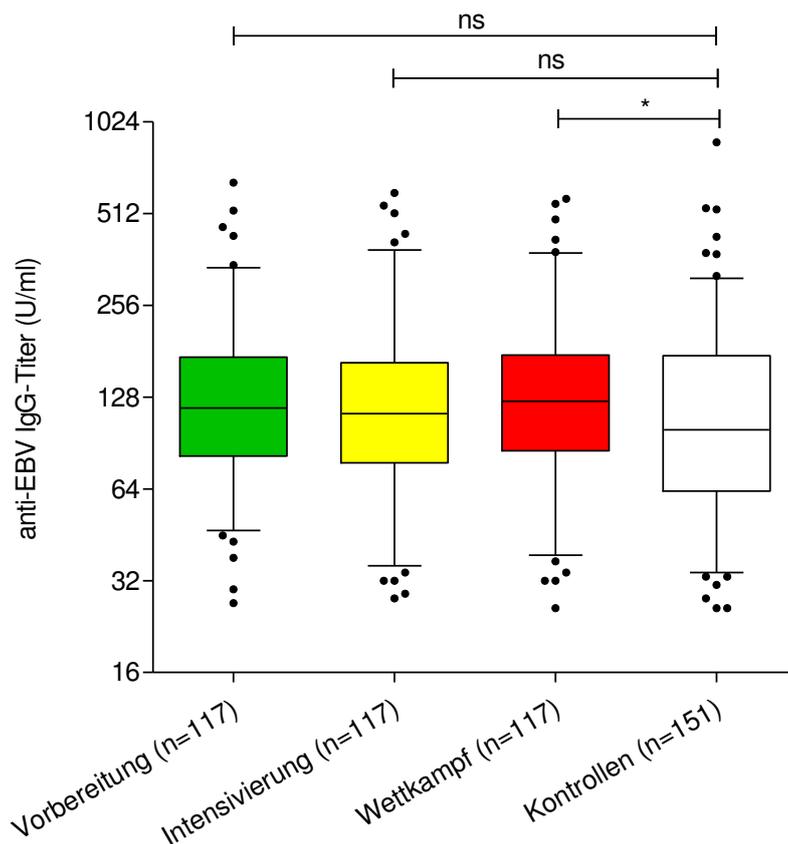


Abbildung 3.7: Anti-EBV IgG-Titer (U/ml) der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen verglichen mit der Kontrollgruppe. Dargestellt ist die Höhe der über dem Detektionslimit liegenden anti-EBV IgG-Titer der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase verglichen mit den anti-EBV IgG-Titern EBV-seropositiver Kontrollprobanden. Die statistische Signifikanz der erzielten Ergebnisse der verschiedenen Belastungsphasen der

Nachwuchsleistungssportler und der Kontrollgruppe wurde mithilfe des Mann-Whitney Tests überprüft. ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$.

3.2.2.5 Anti-EBV IgG-Titer der einzelnen Trainingskollektive der Nachwuchsleistungssportler verglichen mit der Kontrollgruppe

Insgesamt haben Nachwuchsleistungssportler aus zehn verschiedenen Sportarten an der Longitudinalstudie teilgenommen. Das Gesamtkollektiv an Nachwuchsleistungssportlern setzte sich aus 14 einzelnen Trainingskollektiven zusammen, deren jeweilige Nachwuchsleistungssportler unter vergleichbaren Bedingungen trainierten und einzeln oder als Team an Wettkämpfen teilnahmen. Tabelle 3.2 und Abbildung 3.8 zeigen die Höhe der gemessenen anti-EBV IgG-Titer dieser einzelnen Trainingskollektive verglichen mit der Kontrollgruppe.

Tabelle 3.2: Anti-EBV IgG-Titer (U/ml) der Nachwuchsleistungssportler verschiedener Trainingskollektive und der Kontrollgruppe.

Sportart	Median anti-EBV IgG-Titer (U/ml)	Wertebereich anti-EBV IgG-Titer (U/ml)
Eiskunstlauf (n = 3)	151,0	120,0 – 210,0
Eisschnelllauf (n = 8)	91,0	37,0 – 194,0
Fußball (n = 48)	110,0	30,0 – 445,0
Radfahrer Irschenberg (n = 6)	148,0	69,0 – 280,0
Radfahrer Leipzig (n = 13)	99,0	28,0 – 586,0
Radfahrer München (n = 17)	127,0	41,0 – 368,0
Schwimmen Dresden (n = 2)	Mittelwert: 118,0	61,0 – 175,0
Schwimmen München (n = 17)	110,0	42,0 – 249,0
Skilanglauf (n = 41)	103,0	30,0 – 362,0
Tennis (n = 3)	265,0	120,0 – 384,0
Turnen (n = 4)	163,5	58,0 – 305,0
Volleyball Dresden (n = 9)	140,0	31,0 – 550,0
Volleyball München (n = 15)	139,0	32,0 – 463,0
Wasserspringen (n = 5)	129,0	80,0 – 284,0
Kontrollen (n = 151)	100,0	26,0 – 878,0

Die detektierten anti-EBV IgG-Titer der probandenstärkeren Kollektive zeigten in der Höhe keinen signifikanten Unterschied zu den detektierten anti-EBV IgG-Titern der Kontrollgruppe

(Abbildung 3.8). Für die weiteren Trainingskollektive wurde, aufgrund der geringen Anzahl an Nachwuchsleistungssportlern in diesen Kollektiven, kein statistischer Vergleich vorgenommen.

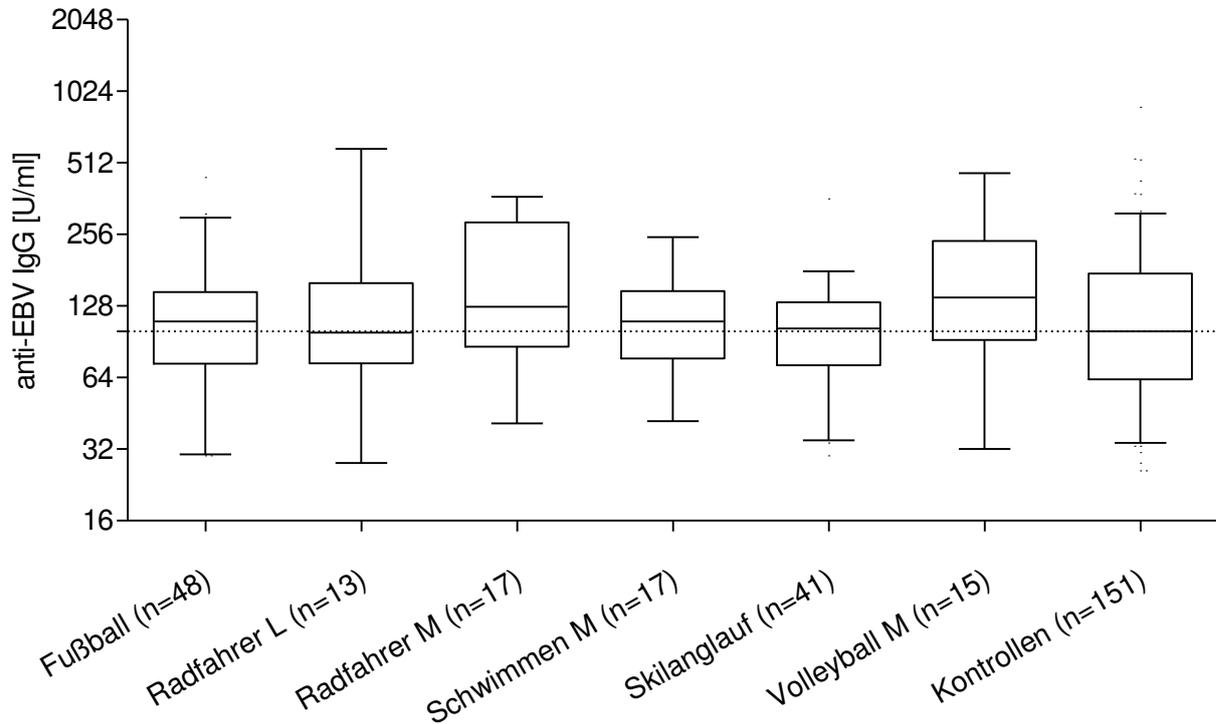


Abbildung 3.8: Anti-EBV IgG-Titer (U/ml) der Nachwuchsleistungssportler verschiedener Trainingskollektive und der Kontrollgruppe. Dargestellt ist die Höhe der über dem Detektionslimit liegenden anti-EBV IgG-Titer der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler der Kollektive mit mehr als zehn Probanden und der EBV-seropositiven Kontrollprobanden. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Median der gemessenen EBV IgG-Titer der Kontrollgruppe.

3.2.2.6 Anti-EBV IgG-Titer verschiedener interdisziplinärer Sportartprofile der Nachwuchsleistungssportler

Wie in Tabelle 3.3 dargestellt, können die einzelnen in dieser Studie vertretenen Sportarten in von Sportmedizinern speziell definierte interdisziplinäre Sportartprofile kategorisiert werden. Dabei unterscheidet man zwischen Ausdauer-, Kraft-Ausdauer-, Spielsport- und Sonstigen-Sportartprofilen.

Tabelle 3.3: Einteilung der einzelnen Sportarten in verschiedene interdisziplinäre Sportartprofile.

Ausdauer	Kraft-Ausdauer	Spielsport	Sonstige
Radsport	Eisschnelllauf	Fußball	Eiskunstlauf
Schwimmen		Tennis	Turnen
Skilanglauf		Volleyball	Wasserspringen

Da sich das Trainings- und Belastungsprofil der einzelnen Sportartprofile aufgrund von unterschiedlichen Trainingsschwerpunkten und -umfängen unterscheidet, wurde die anti-EBV IgG-Titer zwischen den einzelnen Sportartprofilen und der Kontrollgruppe verglichen. Ein Vergleich der detektierten anti-EBV IgG-Titer der einzelnen Sportartprofile untereinander und der einzelnen Sportartprofile mit der Kontrollgruppe, ergab keinen signifikanten Unterschied in der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer (Abbildung 3.9). Hierbei wurde in der Gruppe der Kraft-Ausdauer Sportler ein im Median (91,0 U/ml / Wertebereich: 37,0 – 194,0 U/ml) geringfügig niedrigerer anti-EBV IgG-Titer als in der Kontrollgruppe (100,0 U/ml / Wertebereich: 26,0 – 878,0 U/ml) detektiert. Die Sportler der Ausdauer-Gruppe hatten im Median (110,0 U/ml / Wertebereich: 28,0 – 586,0 U/ml) einen vergleichbaren und die Nachwuchsleistungssportler der Spielsport- (120,0 U/ml / Wertebereich: 30,0 – 550,0 U/ml) und Sonstige-Gruppe (140,0 U/ml / Wertebereich: 58,0 – 305,0 U/ml) einen im Median höheren detektierten anti-EBV IgG-Titer als die Kontrollprobanden (100,0 U/ml / Wertebereich: 26,0 – 878,0 U/ml) (Abbildung 3.9).

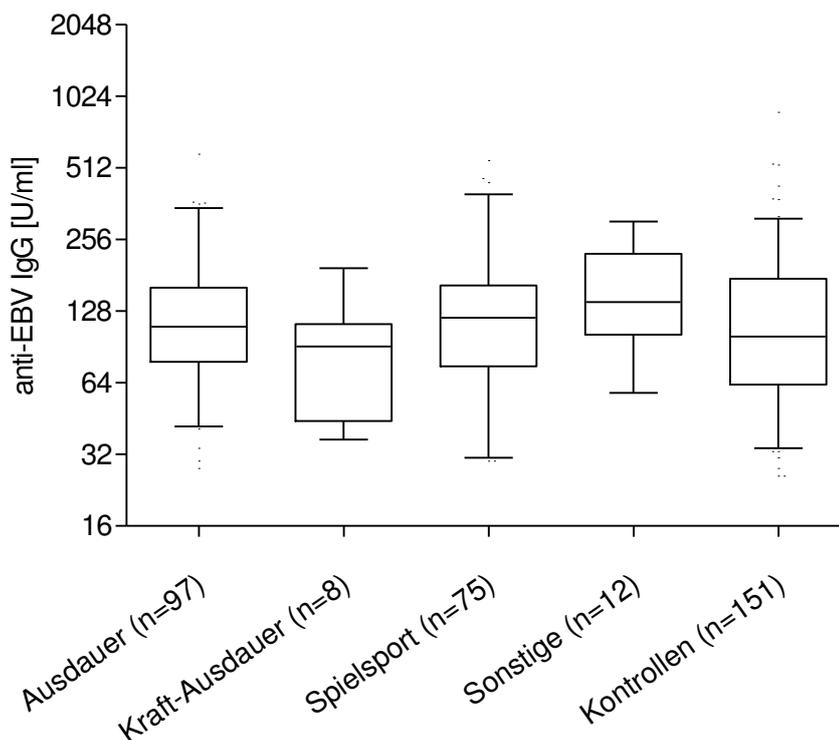


Abbildung 3.9: Anti-EBV IgG-Titer (U/ml) der verschiedenen interdisziplinären Sportartprofile der Nachwuchsleistungssportler und der Kontrollgruppe. Dargestellt ist die Höhe der über dem Detektionslimit liegenden anti-EBV IgG-Titer der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler, aufgeteilt nach Ausdauer-, Kraft-Ausdauer-, Spielsport- und Sonstige-Sportgruppen verglichen mit den EBV-seropositiven Kontrollprobanden. Die statistische Signifikanz der erzielten Ergebnisse der verschiedenen Sportgruppen der Nachwuchsleistungssportler wurde mit einem unverbundenen One-Way Anova Test (Kruskal-Wallis Test; $p = 0,153$) überprüft und ein angeschlossener Dunn's Multiple Comparison Test diente dem Vergleich der einzelnen Sportgruppen untereinander. Ein statistischer Unterschied der detektierten Ergebnisse der verschiedenen Sportgruppen der Nachwuchsleistungssportler und der Kontrollgruppe wurde mithilfe eines Mann-Whitney Tests überprüft.

3.3 Nachweis der Epstein-Barr Virus-Last in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden

Die Epstein-Barr Virus-Last (EBV-Last) wurde zu allen Blutentnahmezeitpunkten der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden mittels *real-time* PCR quantifiziert und in Genomäquivalenten (Geq) pro 10^5 PBMC angegeben. EBV-DNS war insgesamt in 33 Nachwuchsleistungssportlern (\cong 16 % aller EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler) und fünf Kontrollprobanden (\cong 3 % aller EBV-seropositiven Kontrollprobanden) nachweisbar.

In der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler lag die mediane EBV-Last bei $1,99 \text{ Geq}/10^5 \text{ PBMC}$ (Wertebereich: $0,02 - 83,35 \text{ Geq}/10^5 \text{ PBMC}$), verglichen mit einer medianen EBV-Last der Kontrollprobanden von $1,59 \text{ Geq}/10^5 \text{ PBMC}$ (Wertebereich: $0,16 - 13,96 \text{ Geq}/10^5 \text{ PBMC}$), was in keinem signifikanten Unterschied ($p = 0,863$) in der Höhe der EBV-Last der Nachwuchsleistungssportler- und der Kontrollgruppe resultierte (Abbildung 3.10).

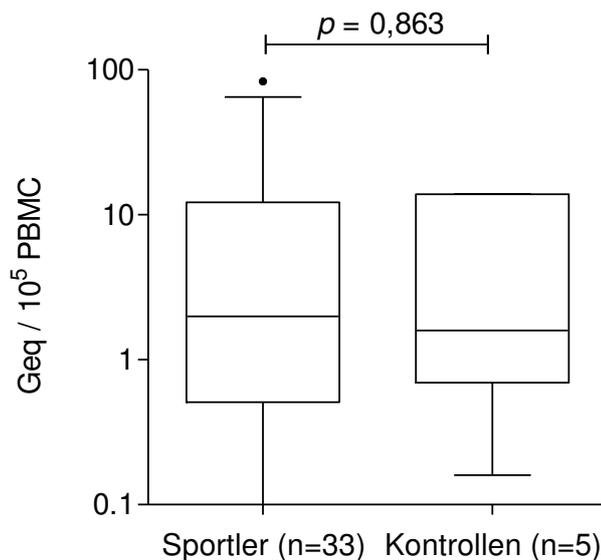


Abbildung 3.10: EBV-Last ($\text{Geq}/10^5 \text{ PBMC}$) der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden. Dargestellt ist die Höhe der detektierten EBV-Last in PBMC (Genomäquivalente $\text{Geq}/10^5 \text{ PBMC}$) in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden. Wurde bei einem Nachwuchsleistungssportler oder Kontrollprobanden im Verlauf der Studie mehr als einmal EBV-DNS nachgewiesen, wurde der Mittelwert an EBV-Genomäquivalenten aus den Einzelwerten bestimmt und für die weitere Analyse verwendet. Die statistische Signifikanz der erzielten Ergebnisse wurde mithilfe des Mann-Whitney Tests überprüft.

3.3.1 Korrelation der EBV-Last mit dem EBV-Serostatus und der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer

Auf die gesamte Studiendauer bezogen wurde bei 33 Nachwuchsleistungssportlern eine detektierbare EBV-DNS nachgewiesen. 24 dieser Nachwuchsleistungssportler (73 %) hatten zu diesem Zeitpunkt den Status einer abgelaufenen EBV-Infektion, fünf Probanden (15 %) einen EBV-Reaktivierungsstatus und vier Probanden (12 %) zeigten eine EBV-Primärinfektion (Abbildung 3.11A).

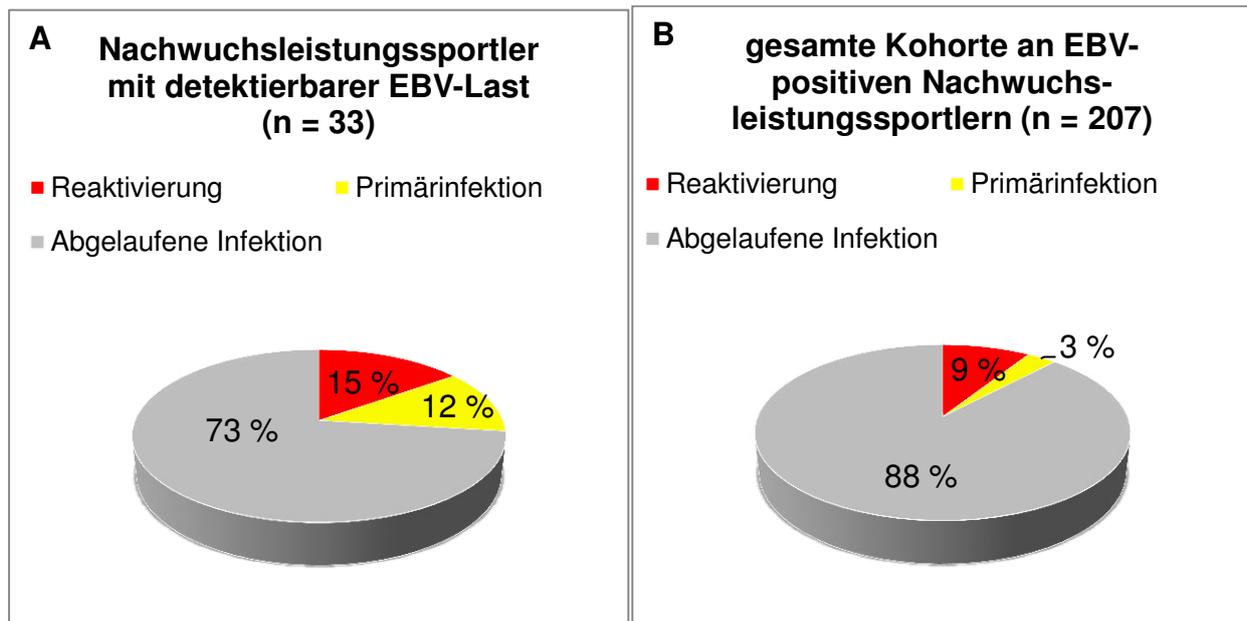


Abbildung 3.11: Prozentualer Anteil an EBV-Reaktivierungen, -Primärinfektionen und abgelaufenen EBV-Infektionen in der Gruppe der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler mit nachweisbarer EBV-Last (A) und auf die gesamte Kohorte an EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern bezogen (B). Der prozentuale Anteil an EBV-Reaktivierungen (rot), -Primärinfektionen (gelb) und abgelaufenen EBV-Infektionen (grau) wurde in Bezug auf die Anzahl an Nachwuchsleistungssportlern mit einer detektierbaren EBV-Last (A) bzw. in Bezug auf die Gesamtzahl an EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern (B) berechnet.

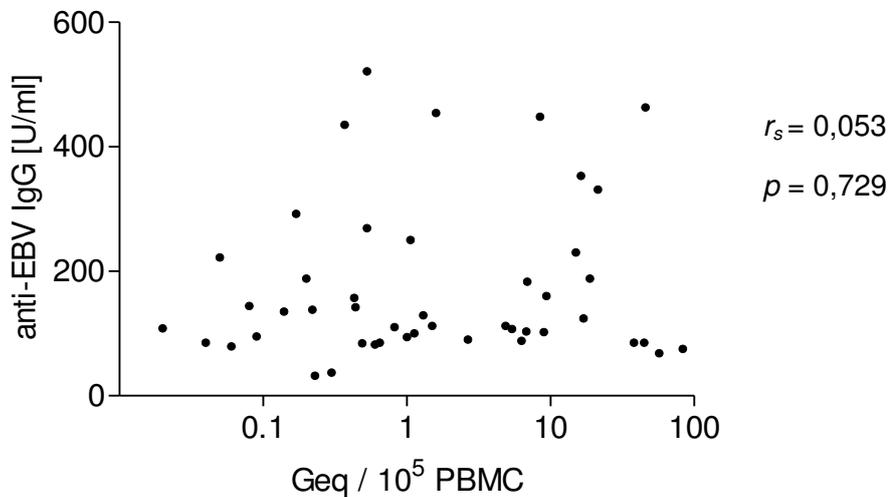
Somit waren unter den Nachwuchsleistungssportlern mit einer nachweisbaren EBV-Last mit einem prozentualen Anteil von 15 % mehr Probanden mit einem EBV-Reaktivierungsstatus, als in der gesamten Kohorte der Nachwuchsleistungssportler (9 %). Deutlicher fällt der Unterschied bei den Nachwuchsleistungssportlern mit einer nachgewiesenen EBV-Primärinfektion aus. Hier hatten 12 % der 33 Nachwuchsleistungssportler mit einer nachweisbaren EBV-Last den Status einer EBV-Primärinfektion, wohingegen auf die gesamte Kohorte bezogen nur 3 % aller EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler den Status einer EBV-Primärinfektion zeigten. Der Anteil der Nachwuchsleistungssportler mit einer nachweisbaren EBV-Last und gleichzeitigem Status einer abgelaufenen EBV-Infektion ist mit einem Anteil von 73 % geringer als in der gesamten Kohorte EBV-seropositiver Nachwuchsleistungssportler (88 %) (Abbildung 3.11).

Unter den 33 Nachwuchsleistungssportlern mit nachweisbarer EBV-DNS, zeigten diejenigen Probanden mit einer EBV-Primärinfektion eine deutlich höhere mediane EBV-Last von 51,80 Geq/10⁵ PBMC (Wertebereich: 0,44 – 57,00 Geq/10⁵ PBMC), als Nachwuchsleistungssportler mit einer EBV-Reaktivierung (0,19 Geq/10⁵ PBMC / Wertebereich: 0,04 – 23,90 Geq/10⁵ PBMC) oder einer abgelaufenen EBV-Infektion (1,32 Geq/10⁵ PBMC / Wertebereich: 0,02 – 83,35 Geq/10⁵ PBMC).

Abbildung 3.12A macht deutlich, dass nur eine sehr geringe Korrelation nach Spearman ($r_s = 0,053$; $p = 0,729$) zwischen der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer und der EBV-Last in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler vorlag. Dass spiegelte sich in der vergleichbaren Höhe der detektierten anti-EBV IgG Titer der Nachwuchsleistungssportler mit einer nachweisbaren EBV-Last (Median 112,0 U/ml / Wertebereich: 32,0 – 521,0 U/ml) und der gesamten Kohorte an Nachwuchsleistungssportlern (Median 116,5 U/ml / Wertebereich: 28,0 – 586,0 U/ml) wider.

Bezogen auf die drei verschiedenen Belastungsphasen (Vorbereitung, Intensivierung, Wettkampf) der Nachwuchsleistungssportler, konnte zu keiner der Phasen ein gehäuftes Auftreten von EBV-DNS bei Nachwuchsleistungssportlern festgestellt werden.

A



B

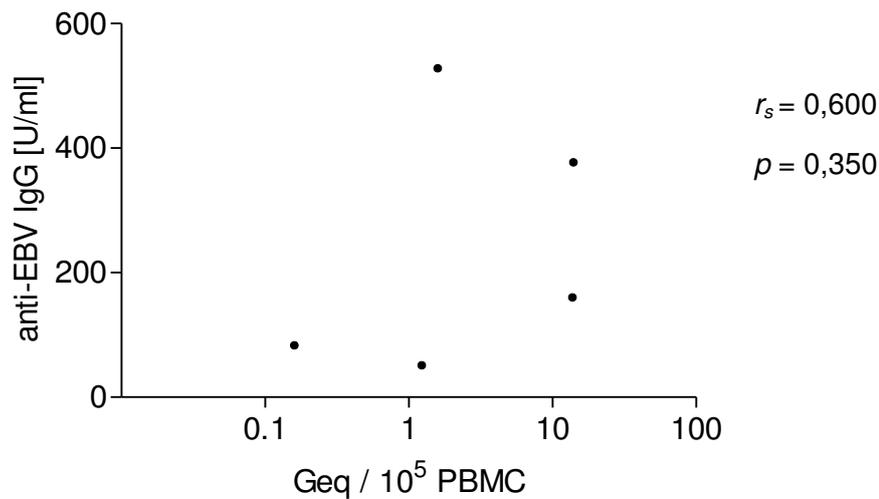


Abbildung 3.12: Korrelation der EBV-Last (Geq/10⁵ PBMC) und der anti-EBV IgG-Titer (U/ml) in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler (A) und Kontrollprobanden (B) nach Spearman. Dargestellt ist die Höhe der detektierten EBV-Last in PBMC (Geq/10⁵ PBMC) der Nachwuchsleistungssportler (n = 27) (A) und der Kontrollprobanden (n = 5) (B) in Korrelation zur Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer zum gleichen Blutentnahmezeitpunkt. r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman.

Die fünf Kontrollprobanden mit einer nachweisbaren EBV-Last hatten mit im Median 160,0 U/ml (Wertebereich: 51,0 – 528,0 U/ml) höhere anti-EBV IgG-Titer als die gesamte Kohorte der Kontrollprobanden (Median: 100,0 U/ml / Wertebereich: 26,0 – 878,0 U/ml). Der Kontrollproband mit der höchsten EBV-Last (13,96 Geq/10⁵ PBMC) hatte zu diesem Blutentnahmezeitpunkt den Status einer EBV-Reaktivierung. Die restlichen vier Kontrollprobanden mit einer nachweisbaren EBV-Last zeigten den Status einer abgelaufenen EBV-Infektion. Abbildung 3.12B zeigt einen deutlichen Zusammenhang ($r_s = 0,600$; $p = 0,350$) zwischen der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer und der EBV-Last der fünf Kontrollprobanden. Allerdings ist die Anzahl an fünf Kontrollprobanden mit einer detektierbaren EBV-Last zu gering, um diesen Zusammenhang als valide zu betrachten.

3.4 Zelluläre EBV-spezifische Immunantwort

Die Analyse der EBV-spezifischen CMI stellt neben der Analyse der humoralen Immunantwort eine weitere wichtige Methode dar, um eine Aussage über eine mögliche immunschwächende Auswirkung intensiver physischer Trainings- und Wettkampfbelastung in dem vorliegenden Kollektiv von Nachwuchsleistungssportlern zu treffen. Die Analyse EBV-spezifischer CMI wurde unter Verwendung von kryokonservierten PBMC, welche mit überlappenden Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 und EBNA-3a *in vitro* restimuliert wurden, durchgeführt.

3.4.1 Etablierung und Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

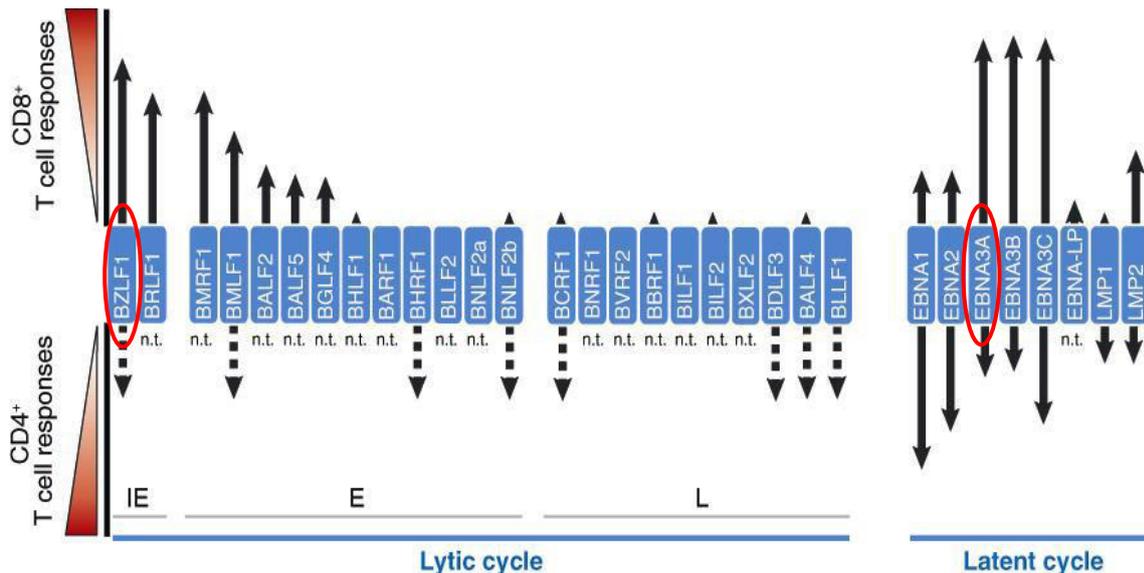
Die während dieser Arbeit generierten Ergebnisse bezüglich der Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays wurden als Artikel zur Publikation im *Journal of Translational Medicine* eingereicht (N. Körber, U. Behrends, A. Hapfelmeier, U. Protzer, T. Bauer. *Validation of an IFN γ /IL2 FluoroSpot assay for clinical trial monitoring*).

Entsprechend dem Studienprotokoll und Ethikantrag konnten die für die Analyse der EBV-spezifischen CMI notwendigen PBMC lediglich aus einer geringen Menge Blut (ca. 10 ml pro Proband) isoliert werden. Um aus diesem begrenzt zur Verfügung stehenden Material eine möglichst umfassende Aussage über die zellvermittelte EBV-spezifische Immunantwort treffen zu können, wurde für die Detektion EBV-spezifischer CMI eine vergleichsweise neue Methode, der IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay, eingesetzt. Dieser FluoroSpot Assay hat jedoch bisher noch keine breite Anwendung in klinischen Studien zur Detektion von CMI gefunden und aufgrund der Tatsache, dass dieser IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay in unserem Labor bisher nicht angewendet wurde, ergab sich die Notwendigkeit einer umfassenden Etablierung und Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays. Diese wurde im Rahmen dieser Dissertation mit kryokonservierten PBMC von 30 gesunden Spendern durchgeführt. Das Prozedere und die Ergebnisse dieser Etablierung und Validierung sind in den nachfolgenden Punkten dargestellt.

3.4.1.1 Bestimmung geeigneter Stimulatorantigene für den Nachweis zellvermittelter EBV-spezifischer Immunantworten (CMI)

Für die Analyse EBV-spezifischer CMI ist eine *in vitro* Restimulation von PBMC mit geeigneten Stimulator-Antigenen notwendig. Zu Beginn dieser Dissertation wurde eine ausführliche Literaturrecherche betrieben, um immunogene EBV-spezifische Stimulatorantigene zu identifizieren, welche eine Detektion EBV-spezifischer CMI in einem breiten Probandenkollektiv ermöglichen (Hislop et al., 2007; Hoffmeister et al., 2003; Maecker, Dunn, et al., 2001; Tischer et al., 2014). Letztlich wurden überlappende Peptidpools zweier EBV-Proteine des lytischen bzw. latenten EBV-Infektionszyklus, BZLF-1 bzw. EBNA-3a, ausgewählt, da eine *in vitro*

Restimulation von PBMC mit diesen EBV-Proteinen sowohl CD4- als auch CD8 T-Zellantworten in gesunden EBV-seropositiven Spendern hervorruft (Abbildung 3.13). Die Peptidpools beider EBV-Proteine bestehen aus einzelnen Peptiden des jeweiligen Proteins, welche eine Länge von 15 Aminosäuren und eine überlappende Sequenz der einzelnen Peptide von 11 Aminosäuren aufweisen. Durch die Überlappung der Einzelpeptide ist ein großes Spektrum an potenziell immunogenen Epitopen eines Proteins im Peptidpool enthalten (Han et al., 2009). Der verwendete BZLF-1-Peptidpool beinhaltet 59, der EBNA-3a-Peptidpool 234 Peptide.



modifiziert nach Hislop et al., 2007

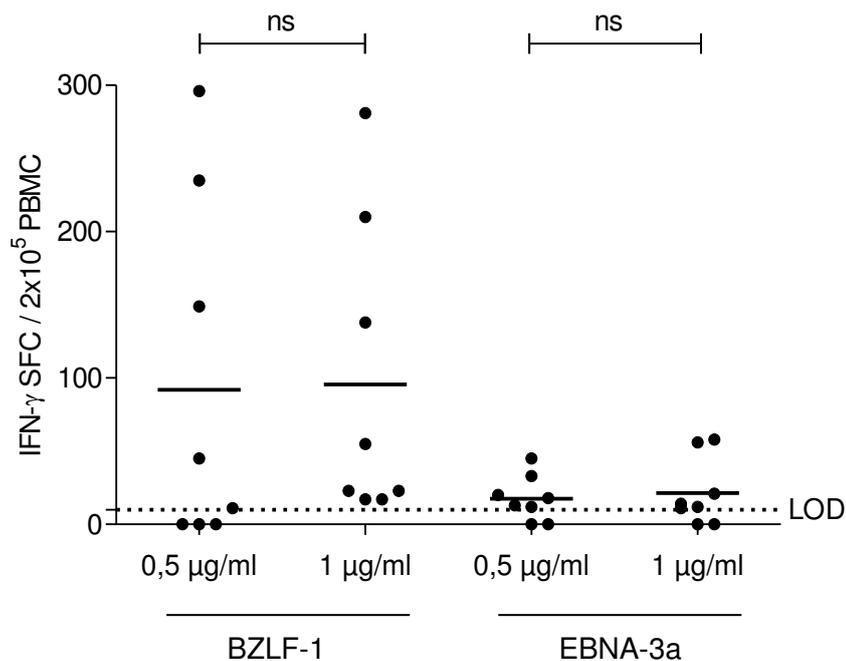
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der relativen Immundominanz repräsentativer sehr früher (IE, *immediate early*), früher (E, *early*) und später (L, *late*) EBV-Proteine des lytischen (*lytic cycle*) und des latenten (*latent cycle*) Vermehrungszyklus in gesunden Virusträgern (modifiziert nach Hislop (Hislop et al., 2007)). Hervorgehoben sind die für diese Arbeit ausgewählten EBV-Stimulatorantigene BZLF-1 und EBNA-3a (rote Ellipsen). Unterbrochene Pfeile bedeuten, dass hier CD4 T-Zellantworten detektiert wurden, deren relative Immundominanz jedoch bisher nicht bestimmt wurde. n.t. = nicht getestet.

3.4.1.2 Festlegung der Stimulatorantigenkonzentration für die *in vitro* Restimulation von kryokonservierten PBMC

Aus früheren Durchflusszytometrie-basierten Versuchen der AG Klinische Kooperationsgruppe „Immunmonitoring“ (Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München) war bekannt, dass eine Konzentration von 1 µg/ml der EBV-Peptidpools BZLF-1 und EBNA-3a optimal für die *in vitro* Restimulation von PBMC ist. Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde überprüft, ob diese Konzentration der beiden EBV-Peptidpools BZLF-1 und EBNA-3a auch zur *in vitro* Restimulation von PBMC im IFN-γ/IL-2 FluoroSpot Assay verwendet werden kann. Hierzu wurden PBMC von acht gesunden, EBV-seropositiven Spendern mit Konzentrationen von 0,5 und 1,0 µg/ml der Peptidpools BZLF-1 und EBNA-3a *in vitro* restimuliert und die

entsprechenden CMI mit Hilfe des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays bestimmt. Abbildung 3.14 zeigt, dass nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ der Peptidpools BZLF-1 und EBNA-3a im Mittel höhere Zahlen an IFN- γ und IL-2 -sekretierenden Zellen (SFC, *spot forming cells*) detektiert wurden, als mit einer eingesetzten Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ je Peptidpool. Im Detail wurden nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem BZLF-1 Peptidpool in einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ im Median 39 / Wertebereich: 17 - 281 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC im Vergleich zu 28 / Wertebereich: 0 - 296 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC mit einer eingesetzten Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ detektiert (Abbildung 3.14A). Von besonderer Bedeutung ist, dass bei drei Spendern nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ des BZLF-1 Peptidpools keine IFN- γ sekretierenden Zellen detektierbar waren und die IFN- γ CMI dieser Spender somit verloren gingen.

A



B

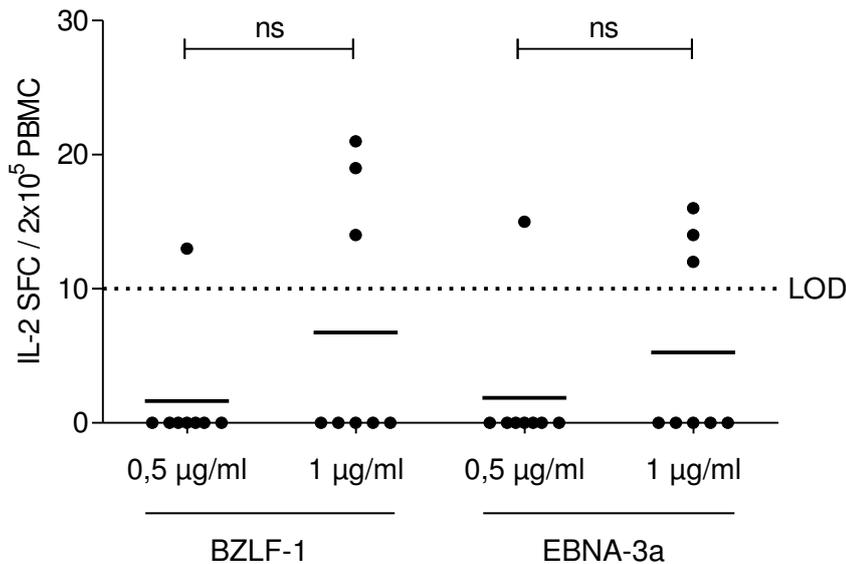


Abbildung 3.14: Anzahl an IFN- γ (A) und IL-2 (B) SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit 0,5 bzw. 1,0 μ g/ml der Peptidpools BZLF-1 und EBNA-3a. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten IFN- γ (A) und IL-2 (B) SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver, gesunder Spender (n = 8) mit 0,5 μ g/ml bzw. 1,0 μ g/ml der überlappenden Peptidpools BZLF-1 und EBNA-3a. Die durchgezogene horizontale Linie zeigt das arithmetische Mittel der Anzahl an Zytokin-sekretierenden Zellen. Die gestrichelte horizontale Linie stellt die Nachweisgrenze (LOD, *Limit of Detection*) von 10 SFC/2x10⁵ PBMC des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays dar. Die statistische Analyse des Vergleichs der beiden Antigenkonzentrationen erfolgte mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. ns = nicht signifikant.

Nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit 1,0 μ g/ml des EBNA-3a Peptidpools wurden im Median 13 / Wertebereich: 0 - 58 IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC im Vergleich zu 16 / Wertebereich: 0 - 45 IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit 0,5 μ g/ml des EBNA-3a Peptidpools gezählt (Abbildung 3.14A). Wie in Abbildung 3.14B ersichtlich ist, konnten nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit 0,5 μ g/ml des BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools jeweils nur bei einem Spender IL-2 SFC (13 bzw. 15 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC) detektiert werden. Nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit 1,0 μ g/ml des BZLF-1 bzw. EBNA-3a Peptidpools wurden bei jeweils drei Spendern im Mittel 18 bzw. 14 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC gezählt.

Auf den oben beschriebenen Ergebnissen basierend, wurde für die Verwendung der EBV-Peptidpools BZLF-1 und EBNA-3a eine einzusetzende Konzentration von 1 μ g/ml für die *in vitro* Restimulation von kryokonservierten PBMC im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay festgesetzt.

3.4.1.3 Antigen-spezifität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Um die Antigen-spezifität der mit dem IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay detektierten CMI zu belegen, wurden PBMC von sechs EBV-seronegativen Spendern (S02-S07) mit spezifischen Antigenen (BZLF-1, EBNA-3a) und ohne spezifischen Stimulus (Negativkontrolle) *in vitro* restimuliert. Die erzielten Daten belegen die Antigen-spezifität der detektierten Ergebnisse des verwendeten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays, da keinerlei IFN- γ (Wertebereich: 0 - 2 IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC) (Tabelle 3.4A) und IL-2 sekretierende Zellen (Wertebereich: 0 - 5 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC) (Tabelle 3.4B) nach *in vitro* Restimulation von PBMC von sechs EBV-seronegativen Spendern (S02-S07) mit BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools detektiert werden konnten. Eine parallel in dieser FluoroSpot-Platte durchgeführte *in vitro* Restimulation von PBMC eines EBV-seropositiven Spenders (S01) mit BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools, belegte mit im Mittel 103 bzw. 61 IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC und 25 bzw. 15 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC, die Möglichkeit der Detektion Antigen-spezifischer IFN- γ und IL-2 SFC mit diesem IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay (Tabelle 3.4A und B).

Tabelle 3.4A: Antigen-spezifität der mit dem IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay detektierten zellvermittelten IFN- γ Immunantworten^a.

Spender	Antigen	Replikant 1	Replikant 2	Replikant 3	Mittelwert	SD
S02 (EBV-)	NK	1	1	4	2	1,73
	BZLF-1	0	0	1	0	0,58
	EBNA-3a	0	1	0	0	0,58
S03 (EBV-)	NK	9	1	0	3	4,93
	BZLF-1	0	1	0	0	0,58
	EBNA-3a	2	0	0	1	1,15
S04 (EBV-)	NK	1	0	1	1	0,58
	BZLF-1	0	1	0	0	0,58
	EBNA-3a	0	2	0	1	1,15
S05 (EBV-)	NK	1	0	0	0	0,58
	BZLF-1	0	2	1	1	1,00
	EBNA-3a	1	1	0	1	0,58
S06 (EBV-)	NK	1	1	2	1	0,58
	BZLF-1	3	1	1	2	1,15
	EBNA-3a	0	0	2	1	1,15
S07 (EBV-)	NK	2	0	0	1	1,15
	BZLF-1	4	1	0	2	2,08
	EBNA-3a	0	0	0	0	0,00
S01 (EBV+)	NK	5	0	3	3	2,52
	BZLF-1	107	103	98	103	4,51
	EBNA-3a	49	70	63	61	10,69

^aDargestellt ist die Anzahl an IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC von EBV-seronegativen (EBV-) (S02–S07) oder EBV-seropositiven (EBV+) Spendern (S01) mit BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools. Alle Assay-Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. NK = Negativkontrolle; SD = Standardabweichung.

Tabelle 3.4B: Antigenspezifität der mit dem IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay detektierten zellvermittelten IL-2 Immunantworten^b.

Spender	Antigen	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Mittelwert	SD
S02 (EBV-)	NK	1	4	5	3	2,08
	BZLF-1	0	4	1	2	2,08
	EBNA-3a	5	3	6	5	1,53
S03 (EBV-)	NK	5	2	4	4	1,53
	BZLF-1	1	2	3	2	1,00
	EBNA-3a	0	2	1	1	1,00
S04 (EBV-)	NK	2	2	1	2	0,58
	BZLF-1	0	3	4	2	2,08
	EBNA-3a	1	1	3	2	1,15
S05 (EBV-)	NK	2	0	0	1	1,15
	BZLF-1	0	1	1	1	0,58
	EBNA-3a	0	1	1	1	0,58
S06 (EBV-)	NK	0	5	5	3	2,89
	BZLF-1	2	1	1	1	0,58
	EBNA-3a	2	2	0	1	1,15
S07 (EBV-)	NK	1	2	0	1	1,00
	BZLF-1	1	0	0	0	0,58
	EBNA-3a	1	1	0	1	0,58
S01 (EBV+)	NK	5	3	2	3	1,53
	BZLF-1	25	28	21	25	3,51
	EBNA-3a	13	15	16	15	1,53

^bDargestellt ist die Anzahl an IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC von EBV-seronegativen (EBV-) (S02–S07) oder EBV-seropositiven (EBV+) Spendern (S01) mit BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools. Alle Assay-Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. NK = Negativkontrolle; SD = Standardabweichung.

3.4.1.4 Detektionslimit des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Das Detektionslimit (LOD, *Limit of Detection*) definiert die geringste Konzentration eines Analytes, welches eine bioanalytischen Methode verlässlich vom unspezifischen Hintergrund unterscheiden kann (gemäß den Richtlinien der FDA, *U.S. Food and Drug Association*). Für den ELISpot Assay wird in der Regel das Detektionslimit als der Wert definiert, welcher sich aus dem Mittelwert der Replikate der unstimulierten Probe, addiert mit dem Zwei- bis Dreifachen der Standardabweichung ergibt. Für die Bestimmung des Detektionslimits des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays wurde in dieser Arbeit der unspezifische Hintergrund an IFN- γ und IL-2 SFC unstimulierter PBMC von 20 EBV-seropositiven Spendern detektiert. Im Mittel wurde ein unspezifischer Hintergrund von 2 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC (Wertebereich: 0 – 4 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC), 5 IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC (Wertebereich: 1 - 10 IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC) und 1 IFN- γ +IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC (Wertebereich: 0 - 2 IFN- γ +IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC) detektiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Detektionslimit des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays auf

10 SFC/2x10⁵ PBMC festgesetzt und Ergebnisse < 10 SFC/2x10⁵ PBMC als nicht valide definiert und gleich Null gesetzt.

3.4.1.5 Untere Nachweisgrenze des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Neben dem Detektionslimit ist entscheidend, ab welcher unteren Nachweisgrenze ein Assay valide, also präzise und repetierbare Ergebnisse liefert. Um diese untere Nachweisgrenze des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays zu verifizieren, wurden die Variationskoeffizienten (CV, *coefficient of variation*) der zwischen 1 und 10 SFC/2x10⁵ PBMC detektierten IFN- γ (n = 7), IL-2 (n = 2) und doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 (n = 12) CMI nach Antigen-Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender in Triplikaten (Intra-Assay Variabilität) bestimmt. In diese Analyse wurden lediglich Ergebnisse einbezogen, welche zuvor mit der DFR (2x) – Methode auf ihre statistische Validität geprüft wurden. Es ergab sich ein gemittelter CV von 45,49 % (Wertebereich: 28,39 - 68,63 %) für IFN- γ CMI, 43,48 % (Wertebereich: 24,98 - 61,97 %) für IL-2 CMI und 69,93 % (Wertebereich: 40,75 - 115,47 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI, was darauf schließen lässt, dass Spotzahlen unter 10 SFC/2x10⁵ PBMC keine validen Ergebnisse darstellen. Die untere Nachweisgrenze für Antigen-spezifische CMI des hier eingesetzten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays wurde demzufolge auf 11 SFC/2x10⁵ PBMC festgelegt. Im Gegensatz dazu lag die Intra-Assay Variabilität der detektierten Spotzahlen von mehr als 10 SFC/2x10⁵ PBMC deutlich unter dem allgemein gültigen Industriestandard (CV = 20 %).

3.4.1.6 Obere Nachweisgrenze des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

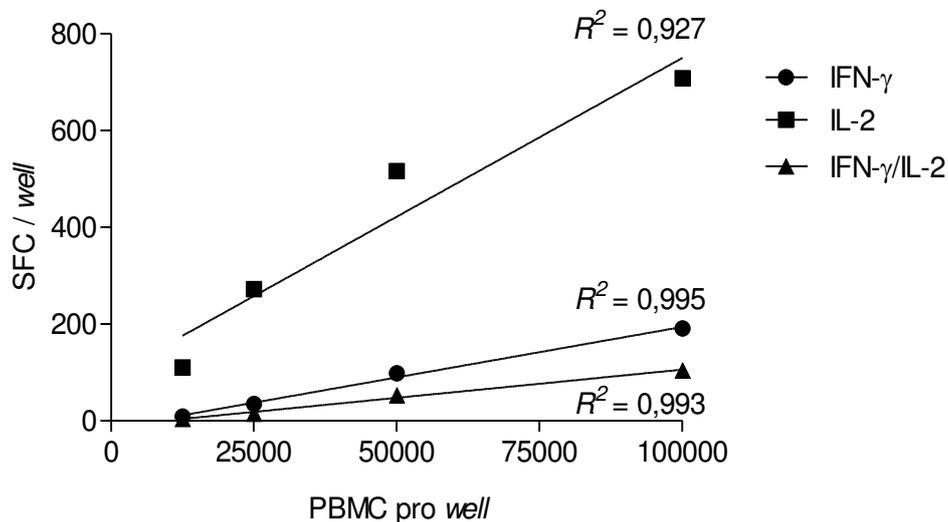
Zusätzlich zur unteren Nachweisgrenze sollte auch die obere Nachweisgrenze eines Assays bestimmt werden. Diese spiegelt den maximalen Wert, bis zu welchem ein Assay präzise und repetierbare Ergebnisse liefern kann, wider. Durch *in vitro* Restimulation der aus dem gesunden Spenderkollektiv verfügbaren PBMC mit EBV-Antigenen, konnten keine ausreichend hohen IFN- γ bzw. IL-2 Spotzahlen im Wertebereich der oberen Nachweisgrenze des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays erreicht werden. Aus diesem Grund wurden die PBMC zusätzlich mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA-L; c = 2 μ g/ml) *in vitro* restimuliert, da bekannt ist, dass eine Mitogen Stimulation hohe zellvermittelte Immunantworten hervorruft. Generell können mit dem verwendeten ELISpot-/FluoroSpot Reader (CTL ImmunoSpot® S6 Ultra-V Analyzer) Spotzahlen von ca. 1000 Spots pro *well* detektiert und gezählt werden. Allerdings ist in diesem Wertebereich keine präzise Festlegung der Zählparameter möglich, da die einzelnen Spots sehr dicht nebeneinander liegen oder sich sogar teilweise überlappen. Aus diesem Grund wurde festgelegt, dass die zu verwendende Zelldichte im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay jeweils abhängig vom Stimulatorantigen angepasst werden muss. Im Falle einer *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem Mitogen PHA-L, wurde anhand der detektierten Spotzahlen eine obere

Nachweisgrenze von 700 Spots/well für den hier verwendeten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay festgelegt. Bis zu dieser Grenze konnte garantiert werden, dass die detektierten Spotzahlen valide gezählt und ausgewertet werden können.

3.4.1.7 Linearität und optimale Zelldichte des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Der Nachweis der Linearität der detektierten Ergebnisse in Abhängigkeit von der Zelldichte ist ein wesentlicher Bestandteil einer Assay Validierung. Um die Linearität der detektierten Spotzahlen des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays in Abhängigkeit von der verwendeten Zelldichte zu bestimmen, wurden jeweils $1,25 \times 10^4$, $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 und 1×10^5 PBMC von zwei verschiedenen Spendern (S25, S26) in sechsfach Replikaten eingesetzt. Als Stimulatorantigen wurde wiederum das Mitogen PHA-L ($c = 2 \mu\text{g/ml}$) verwendet, da mit den EBV Peptidpools Zellzahlen von mindestens 2×10^5 PBMC/well nötig waren, um eine ausreichend hohe, Anzahl an detektierbaren IL-2 SFC zu bekommen. Abbildung 3.15 zeigt, dass für beide Spender eine hohe Linearität der detektierten Anzahl an IFN- γ SFC ($R^2 = 0,999$ bzw. $0,995$), IL-2 SFC ($R^2 = 0,980$ bzw. $0,927$) und doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 SFC ($R^2 = 0,996$ bzw. $0,993$) auf Basis der zuvor genannten Zelldichten erzielt wurde.

A



B

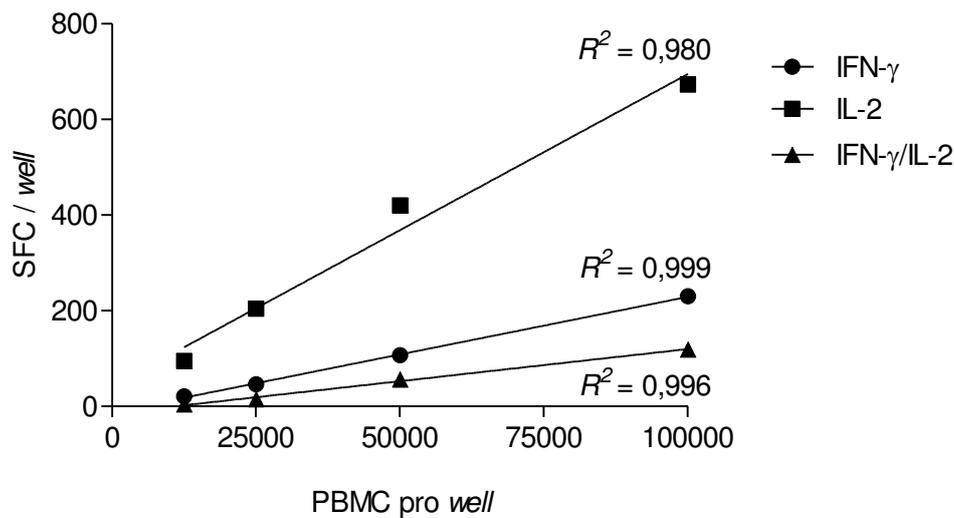


Abbildung 3.15: Magnitude der IFN- γ , IL-2 und doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 CMI der Spender S25 (A) und S26 (B) in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelldichte. Dargestellt ist die Anzahl an Mitogen-spezifischen (PHA-L) IFN- γ (●), IL-2 (■) und doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 (▲) SFC/well nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Spender S25 und S26 in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelldichte ($1,25 \times 10^4$, $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 und 1×10^5 PBMC). R^2 = Korrelationskoeffizient.

Aus Tabelle 3.5 wird ersichtlich, dass die optimale Zelldichte für die Detektion von PHA-L induzierten CMI bei 5×10^4 PBMC/well für beide Spender lag. Eine höhere Zelldichte führte zu sehr hohen IL-2 Spotzahlen und machte eine eindeutige Trennung der einzelnen Spots und somit eine valide Festlegung der Zählparameter unmöglich. Geringere Zelldichten bewirkten einen deutlichen Anstieg der Intra-Assay Variabilität, insbesondere für IFN- γ (gemittelter CV für beide Spender: 39,28 %) und doppelt-positive IFN- γ +IL-2 SFC (gemittelter CV für beide Spender: 51,41 %).

Tabelle 3.5A: Magnitude der zellvermittelten IFN- γ Immunantworten der Spender S25 und S26 in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelldichte^a.

Spender	Antigen	PBMC/well	IFN- γ SFC (Mittelwert)	SD	% CV	SFC/10 ⁶ PBMC	Frequenz
S25	PHA-L	1,25 x 10 ⁴	9	5,01	48,45	720	1/1389
		2,5 x 10 ⁴	35	9,62	26,60	1400	1/714
		5,0 x 10 ⁴	98	12,22	12,37	1960	1/510
		1,0 x 10 ⁵	191	27,30	13,97	1910	1/514
S26	PHA-L	1,25 x 10 ⁴	21	6,26	30,10	1680	1/595
		2,5 x 10 ⁴	46	17,41	36,14	1840	1/543
		5,0 x 10 ⁴	107	19,77	18,22	2140	1/467
		1,0 x 10 ⁵	230	38,06	16,05	2300	1/435

Tabelle 3.5B: Magnitude der zellvermittelten IL-2 Immunantworten der Spender S25 und S26 in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelldichte^b.

Spender	Antigen	PBMC/well	IL-2 SFC (Mittelwert)	SD	% CV	SFC/10 ⁶ PBMC	Frequenz
S25	PHA-L	1,25 x 10 ⁴	110	15,66	14,08	8800	1/114
		2,5 x 10 ⁴	272	11,67	4,27	10880	1/92
		5,0 x 10 ⁴	516	35,50	6,82	10320	1/97
		1,0 x 10 ⁵	708	47,54	6,59	7080	1/141
S26	PHA-L	1,25 x 10 ⁴	95	12,10	12,65	7600	1/132
		2,5 x 10 ⁴	204	19,60	9,41	8160	1/123
		5,0 x 10 ⁴	420	35,53	8,39	8400	1/119
		1,0 x 10 ⁵	673	31,85	4,72	6730	1/149

Tabelle 3.5C: Magnitude der zellvermittelten doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 Immunantworten der Spender S25 und S26 in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelldichte^c.

Spender	Antigen	PBMC/ well	IFN- γ +IL-2 SFC (Mittelwert)	SD	% CV	SFC/ 10 ⁶ PBMC	Frequenz
S25	PHA-L	1,25 x 10 ⁴	4	2,19	49,79	320	1/3125
		2,5 x 10 ⁴	15	4,72	32,34	600	1/1667
		5,0 x 10 ⁴	53	9,53	18,12	1060	1/943
		1,0 x 10 ⁵	104	13,41	12,79	1040	1/962
S26	PHA-L	1,25 x 10 ⁴	4	2,12	53,03	320	1/3125
		2,5 x 10 ⁴	15	5,26	35,56	600	1/1667
		5,0 x 10 ⁴	56	21,15	37,50	1120	1/893
		1,0 x 10 ⁵	119	6,46	5,37	1190	1/840

^{a,b,c} Dargestellt ist die Anzahl an Mitogen-spezifischen (PHA-L; c = 2 μ g/ml) ^aIFN- γ , ^bIL-2 und ^c IFN- γ +IL-2 SFC/well nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Spender S25 und S26 in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelldichte (1,25 x 10⁴, 2,5 x 10⁴, 5 x 10⁴ und 1 x 10⁵ PBMC). SFC (Mittelwert der detektierten Spitzzahlen in sechsfach Replikaten); SD = Standardabweichung; % CV = Variationskoeffizient in Prozent.

3.4.1.8 Präzision des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Die Validierung einer neuen Assay Methode soll den Nachweis der Exaktheit und Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse erbringen. Bei der Bewertung der Präzision des ELISpot-Assays unterscheidet man zwischen der Intra-Assay Variabilität (Variabilität der einzelnen Replikate eines Spenders), der Inter-Assay Variabilität (Variabilität der auf verschiedenen Assay-Platten erzielten Ergebnisse eines Spenders) und der Inter-Day Variabilität (Variabilität der an verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse eines Spenders). Die in der Industrie anerkannte Richtlinie für den akzeptablen Variationskoeffizienten von zellbasierten Immunassays liegt bei einem CV von 20 %. Bei der in dieser Arbeit vorliegenden Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays wurde ebenfalls ein CV von 20 % als Grenzwert verwendet, um die erzielten Ergebnisse auf ihre Exaktheit und Reproduzierbarkeit zu prüfen.

Für die Bestimmung der Intra-, Inter-, und Inter-Day Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays wurden von jedem Spender jeweils PBMC eines Isolationszeitpunktes eingesetzt. Alle eingesetzten Assay-Reagenzien des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays stammten aus identischen Chargen des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Kits.

3.4.1.8.1 Intra-Assay Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Die Intra-Assay Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays spiegelt die Variabilität der durch Antigen-Restimulation von PBMC erzielten CMI eines einzelnen Spenders in verschiedenen Replikaten (*wells*) innerhalb eines Ansatzes wider. Für die Bestimmung der Intra-Assay Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays, wurden PBMC von zehn gesunden EBV-seropositiven Spendern mit EBV-Antigenen (BZLF-1-, EBNA-3a Peptidpool) in Triplikaten und PBMC von weiteren sechs gesunden Spendern mit PHA-L in sechsfach Replikaten *in vitro* restimuliert. Für die Auswertung der Intra-Assay Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays wurde der Variationskoeffizient (CV) für jeden einzelnen Spender und jedes stimulierende Antigen bzw. Mitogen bestimmt, indem die Standardabweichung (SD) der Replikate durch den Mittelwert der Replikate dividiert und mit 100% multipliziert wurde.

Zusammenfassend wurden nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit EBV-Antigenen und dem Mitogen PHA-L sehr geringe Intra-Assay Variabilitäten in der Anzahl der detektierten IFN- γ , IL-2 und doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 SFC erzielt. Nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit den drei Stimulatorantigenen BZLF-1, EBNA-3a und PHA-L wurde ein gemittelter Intra-Assay CV von 9,96 % (Wertebereich: 3,07 – 20,12 %) für IFN- γ , 8,85 % (Wertebereich: 2,29 – 22,08 %) für IL-2 und 13,05 % (Wertebereich: 4,66 – 30,31 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI ermittelt (Tabelle 3.6A-C). Im Detail wurde nach *in vitro* Restimulation von PBMC von zehn EBV-seropositiven Spendern mit dem BZLF-1-Peptidpool in Triplikaten ein mittlerer Intra-Assay CV von 9,27 % (Wertebereich: 3,07 - 20,12 %) für IFN- γ CMI, 8,18 % (Wertebereich: 5,39 - 12,80%) für IL-2 CMI und 10,43 % (Wertebereich: 6,93-17,32 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI erzielt (Tabelle 3.6A-C). Nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem EBNA-3a-Peptidpool ergab sich ein mittlerer Intra-Assay CV von 10,00 % (Wertebereich: 5,77 - 15,21 %) für IFN- γ CMI, 13,45 % (Wertebereich: 5,87 - 22,08 %) für IL-2 CMI und 20,04 % (Wertebereich: 8,00 - 30,31 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.6A-C). Die *in vitro* Restimulation von PBMC von sechs Spendern mit dem Mitogen PHA-L ergab einen mittleren Intra-Assay CV von 10,51 % (Wertebereich: 6,00 - 17,70 %) für IFN- γ CMI, 5,57 % (Wertebereich: 2,29 - 10,49 %) für IL-2 CMI und 8,68 % (Wertebereich: 4,66 - 14,75 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.6A-C).

Tabelle 3.6A: Intra-Assay Variabilität der detektierten zellvermittelten IFN- γ Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^a.

Spender	Antigen	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Replik 4	Replik 5	Replik 6	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	283	267	280	nb	nb	nb	277	8,50	3,07
S11	BZLF-1	432	440	493	nb	nb	nb	455	33,15	7,29
S14	BZLF-1	438	452	479	nb	nb	nb	456	20,84	4,57
S16	BZLF-1	458	374	384	nb	nb	nb	405	45,88	11,32
S18	BZLF-1	110	148	103	nb	nb	nb	120	24,21	20,12
S01	EBNA-3a	30	26	31	nb	nb	nb	29	2,65	9,12
S10	EBNA-3a	28	31	31	nb	nb	nb	30	1,73	5,77
S12	EBNA-3a	38	43	46	nb	nb	nb	42	4,04	9,55
S20	EBNA-3a	68	60	81	nb	nb	nb	70	10,60	15,21
S21	EBNA-3a	166	158	192	nb	nb	nb	172	17,78	10,34
S12	PHA-L	35	35	45	44	nb	38	39	4,83	12,25
S15	PHA-L	718	659	774	685	679	nb	703	45,01	6,40
S21	PHA-L	nb	715	836	740	786	771	770	46,20	6,00
S25	PHA-L	293	326	391	250	276	nb	307	54,37	17,70
S26	PHA-L	98	120	123	nb	98	123	112	13,20	11,75
S27	PHA-L	253	280	284	264	226	nb	261	23,38	8,95
Mittelwert									22,27	9,96

^a Dargestellt ist die Anzahl an Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a)- und Mitogen- (PHA-L) spezifischen IFN- γ SFC/well in Triplikaten bzw. sechsfach Replikaten nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 16). nb = nicht bestimmt; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

Tabelle 3.6B: Intra-Assay Variabilität der detektierten zellvermittelten IL-2 Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^b.

Spender	Antigen	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Replik 4	Replik 5	Replik 6	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	63	67	52	nb	nb	nb	61	7,77	12,80
S11	BZLF-1	28	27	30	nb	nb	nb	28	1,53	5,39
S14	BZLF-1	37	31	34	nb	nb	nb	34	3,00	8,82
S16	BZLF-1	39	39	43	nb	nb	nb	40	2,31	5,73
S18	BZLF-1	32	37	37	nb	nb	nb	35	2,89	8,17
S01	EBNA-3a	33	29	21	nb	nb	nb	28	6,11	22,08
S10	EBNA-3a	26	26	20	nb	nb	nb	24	3,46	14,43
S12	EBNA-3a	47	44	51	nb	nb	nb	47	3,51	7,42
S20	EBNA-3a	41	32	nb	nb	nb	nb	37	6,36	17,44
S21	EBNA-3a	42	38	38	nb	nb	nb	39	2,31	5,87
S12	PHA-L	142	148	143	142	112	nb	137	14,42	10,49
S15	PHA-L	718	645	647	718	652	nb	676	38,43	5,68
S21	PHA-L	nb	685	688	693	725	700	698	16,02	2,29
S25	PHA-L	413	410	408	382	Nb	412	405	13,00	3,21
S26	PHA-L	488	505	511	554	501	524	514	22,96	4,47
S27	PHA-L	374	423	430	445	385	383	407	29,59	7,28
Mittelwert									10,85	8,85

^b Dargestellt ist die Anzahl an Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a)- und Mitogen- (PHA-L) spezifischen IL-2 SFC/*well* in Triplikaten bzw. sechsfach Replikaten nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 16). nb = nicht bestimmt; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

Tabelle 3.6C: Intra-Assay Variabilität der detektierten zellvermittelten doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^c.

Spender	Antigen	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Replik 4	Replik 5	Replik 6	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	50	51	57	nb	nb	nb	53	3,79	7,19
S11	BZLF-1	19	18	21	nb	nb	nb	19	1,53	7,90
S14	BZLF-1	24	18	18	nb	nb	nb	20	3,46	17,32
S16	BZLF-1	26	23	26	nb	nb	nb	25	1,73	6,93
S18	BZLF1	23	29	29	nb	nb	nb	27	3,46	12,83
S01	EBNA-3a	18	11	11	nb	nb	nb	13	4,04	30,31
S10	EBNA-3a	13	18	11	nb	nb	nb	14	3,61	25,75
S12	EBNA-3a	23	25	27	nb	nb	nb	25	2,00	8,00
S20	EBNA-3a	10	14	16	nb	nb	nb	13	3,06	22,91
S21	EBNA-3a	22	17	21	nb	nb	nb	20	2,65	13,23
S15	PHA-L	nb	317	372	345	363	nb	349	24,25	6,94
S21	PHA-L	454	460	nb	437	nb	489	460	21,65	4,71
S25	PHA-L	113	118	124	nb	125	nb	120	5,60	4,66
S26	PHA-L	66	79	89	68	70	93	78	11,43	14,75
S27	PHA-L	175	181	200	189	142	nb	177	21,89	12,34
Mittelwert									7,61	13,05

^cDargestellt ist die Anzahl an Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a)- und Mitogen- (PHA-L) spezifischen IFN- γ +IL-2 SFC/well in Triplikaten bzw. sechsfach Replikaten nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 16). nb = nicht bestimmt; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

3.4.1.8.2 Inter-Assay Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Für die Bestimmung der Inter-Assay Variabilität wurden zwei unabhängige IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays in einem parallelen Ansatz durchgeführt und der Variationskoeffizient bestimmt. Hierzu wurden PBMC gesunder EBV-positiver Spender parallel auf zwei IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Platten ausplattiert und mit BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools in Triplikaten ($n = 4$) oder PHA-L in sechsfach Replikaten ($n = 4$) *in vitro* restimuliert.

Der Mittelwert der Inter-Assay Variationskoeffizienten der durchgeführten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays lag bei 6,48 % (Wertebereich: 1,52 - 14,39 %) für IFN- γ CMI, 10,20 % (Wertebereich: 0,71 - 34,84 %) für IL-2 CMI und 12,97 % (Wertebereich: 0,93 - 27,08 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.7A-C). Im Einzelnen betrug der mittlere Inter-Assay Variationskoeffizient nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem BZLF-1 Peptidpool 6,71 % (Wertebereich: 1,98 - 11,44 %) für IFN- γ CMI, 23,60 % (Wertebereich: 12,36 - 34,84 %) für IL-2 CMI und 13,72 % (Wertebereich: 4,20 - 23,25 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.7A-C). Nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem EBNA-3a Peptidpool ergab sich ein Mittelwert für den Inter-Assay CV von 1,87 % (Wertebereich: 1,52 - 2,21 %) für IFN- γ CMI. Lediglich einer der beiden Spender (S12) hatte eine detektierbare IL-2 und doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI, welche zu einem Inter-Assay Variationskoeffizienten von 4,16 % bzw. 27,08 % führte (Tabelle 3.7A-C). Für PHA-L *in vitro* restimulierte PBMC lag der durchschnittliche Inter-Assay Variationskoeffizient der beiden FluoroSpot Platten bei 8,67 % (Wertebereich: 3,74 - 14,39 %) für IFN- γ CMI, 5,01 % (Wertebereich: 0,71 - 9,41 %) für IL-2 CMI und 9,06 % (Wertebereich: 0,93 - 17,07 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.7A-C).

Tabelle 3.7A: Inter-Assay Variabilität der detektierten zellvermittelten IFN- γ Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^a.

Spender	Antigen	Platte 1	Platte 2	Platte 1 und Platte 2		
		Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	274	233	254	28,99	11,44
S11	BZLF-1	317	326	322	6,36	1,98
S12	EBNA-3a	92	94	93	1,41	1,52
S13	EBNA-3a	65	63	64	1,41	2,21
S15	PHA-L	645	680	663	24,75	3,74
S21	PHA-L	668	753	711	60,10	8,46
S25	PHA-L	234	287	261	37,48	14,39
S26	PHA-L	214	240	227	18,38	8,10
Mittelwert					22,36	6,48

^a Dargestellt ist die Anzahl an detektierten Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a)- und Mitogen- (PHA-L) spezifischen IFN- γ SFC/well nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 8) auf zwei parallel durchgeführten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Platten. SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

Tabelle 3.7B: Inter-Assay Variabilität der detektierten zellvermittelten IL-2 Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^b.

Spender	Antigen	Platte 1	Platte 2	Platte 1 und Platte 2		
		Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	56	47	52	6,36	12,36
S11	BZLF-1	52	86	69	24,04	34,84
S12	EBNA-3a	33	35	34	1,41	4,16
S15	PHA-L	575	657	616	57,98	9,41
S21	PHA-L	698	691	695	4,95	0,71
S25	PHA-L	411	403	407	5,66	1,39
S26	PHA-L	547	617	582	49,50	8,50
Mittelwert					21,42	10,20

^b Dargestellt ist die Anzahl an detektierten Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a)- und Mitogen- (PHA-L) spezifischen IL-2 SFC/well nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 7) auf zwei parallel durchgeführten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Platten. SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

Tabelle 3.7C: Inter-Assay Variabilität der detektierten zellvermittelten doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^c.

Spender	Antigen	Platte 1	Platte 2	Platte 1 und Platte 2		
		Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	52	49	51	2,12	4,20
S11	BZLF-1	61	85	73	16,97	23,25
S12	EBNA-3a	19	28	24	6,36	27,08
S15	PHA-L	329	349	339	14,14	4,17
S21	PHA-L	453	459	456	4,24	0,93
S25	PHA-L	86	105	96	13,44	14,07
S26	PHA-L	102	130	116	19,80	17,07
Mittelwert					11,01	12,97

^c Dargestellt ist die Anzahl an detektierten Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a)- und Mitogen- (PHA-L) spezifischen IFN- γ +IL-2 SFC/*well* nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 7) auf zwei parallel durchgeführten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Platten. SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

3.4.1.8.3 Inter-Day Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Eine neue Assay-Methode soll valide Ergebnisse der einzelnen Replikatmessungen eines Assays und verschiedener parallel ausgeführter Assay-Ansätze ermöglichen. Zusätzlich müssen aber auch Assays, welche an verschiedenen Tagen durchgeführt werden, ebenfalls zu validen Ergebnissen führen. Um die Inter-Day Variabilität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays zu bestimmen, wurden die CMI von zehn verschiedenen Spendern, welche mit drei IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays an drei verschiedenen Tagen detektiert wurden, gegenübergestellt und der Variationskoeffizient bestimmt. Von jedem individuellen Spender wurden PBMC eines Isolationszeitpunktes verwendet und in Triplikaten mit BZLF-1 (n = 4) und EBNA-3a (n = 3) bzw. in sechsfach Replikaten (n = 3) mit PHA-L *in vitro* restimuliert.

Hieraus ergab sich für alle ausgeführten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays unter Berücksichtigung der drei Stimulatorantigene ein durchschnittlicher Inter-Day Variationskoeffizient von 20,81 % (Wertebereich: 3,79 - 53,67 %) für IFN- γ CMI, 12,75 % (Wertebereich: 2,22 - 33,43 %) für IL-2 CMI und 12,07 % (Wertebereich: 4,33 - 23,79 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.8A-C). Im Detail wurde nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem BZLF-1 Peptidpool ein durchschnittlicher CV von 13,69 % (Wertebereich: 3,79 - 17,77 %) für IFN- γ CMI, 14,99 % (Wertebereich: 5,46 - 33,43 %) für IL-2 CMI und 9,54 % (Wertebereich: 5,26 - 16,34 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.8A-C) erreicht. Die *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem EBNA-3a Peptidpool resultierte in einem durchschnittlichen Inter-Day Variationskoeffizienten von 36,22 % (Wertebereich: 18,98 - 53,76 %) für IFN- γ CMI, 14,06 % (Wertebereich: 8,27 - 24,74 %) für IL-2 CMI und 11,40 % (Wertebereich: 4,33 - 17,47 %) für

doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.8A-C). Nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit PHA-L, lag der durchschnittliche Inter-Day Variationskoeffizient bei 14,90 % (Wertebereich: 9,05 - 18,81 %) für IFN- γ CMI, 8,46 % (Wertebereich: 2,22 - 12,00 %) für IL-2 CMI und 16,12 % (Wertebereich: 12,01 - 23,79 %) für doppelt-positive IFN- γ +IL-2 CMI (Tabelle 3.8A-C).

Tabelle 3.8A: Inter-Day Variabilität der detektierten zellvermittelten IFN- γ Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^a.

Spender	Antigen	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	191	145	149	162	25,48	15,76
S11	BZLF-1	326	344	351	340	12,90	3,79
S14	BZLF-1	223	161	175	186	32,52	17,45
S18	BZLF-1	257	194	189	213	37,90	17,77
S10	EBNA-3a	27	27	19	24	4,62	18,98
S12	EBNA-3a	92	44	35	57	30,64	53,76
S19	EBNA-3a	144	127	67	113	40,45	35,90
S15	PHA-L	304	358	311	324	29,37	9,05
S25	PHA-L	77	88	60	75	14,11	18,81
S26	PHA-L	214	242	297	251	42,23	16,82
Mittelwert						27,02	20,81

^a Dargestellt ist die Anzahl der an drei verschiedenen Tagen detektierten Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a) und Mitogen- (PHA-L) spezifischen IFN- γ SFC/*well* nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 10) im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay. SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

Tabelle 3.8B: Inter-Day Variabilität der detektierten zellvermittelten IL-2 Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^b.

Spender	Antigen	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	69	62	67	66	3,61	5,46
S11	BZLF-1	18	20	17	18	1,53	8,33
S14	BZLF-1	48	57	62	56	7,09	12,74
S18	BZLF-1	27	29	48	35	11,59	33,43
S10	EBNA-3a	17	18	15	17	1,53	9,17
S12	EBNA-3a	33	34	29	32	2,65	8,27
S19	EBNA-3a	17	12	20	16	4,04	24,74
S15	PHA-L	492	615	572	560	62,42	11,15
S25	PHA-L	344	359	348	350	7,77	2,22
S26	PHA-L	521	617	662	600	72,02	12,00
Mittelwert						17,42	12,75

^b Dargestellt ist die Anzahl der an drei verschiedenen Tagen detektierten Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a) und Mitogen- (PHA-L) spezifischen IL-2 SFC/*well* nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 10) im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay. SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

Tabelle 3.8C: Inter-Day Variabilität der detektierten zellvermittelten doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 Immunantworten im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay^c.

Spender	Antigen	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Mittelwert	SD	% CV
S09	BZLF-1	69	56	63	63	6,51	10,38
S11	BZLF-1	20	19	18	19	1,00	5,26
S14	BZLF-1	54	60	54	56	3,46	6,19
S18	BZLF-1	32	32	42	35	5,77	16,34
S10	EBNA-3a	14	13	13	13	0,58	4,33
S12	EBNA-3a	19	26	20	22	3,79	17,47
S19	EBNA-3a	12	11	14	12	1,53	12,39
S15	PHA-L	215	276	258	250	31,34	12,55
S25	PHA-L	50	59	47	52	6,24	12,01
S26	PHA-L	95	130	155	127	30,14	23,79
Mittelwert						9,04	12,07

^c Dargestellt ist die Anzahl der an drei verschiedenen Tagen detektierten Antigen- (BZLF-1, EBNA-3a) und Mitogen- (PHA-L) spezifischen doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 SFC/*well* nach *in vitro* Restimulation von PBMC EBV-seropositiver Spender (n = 10) im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay. SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

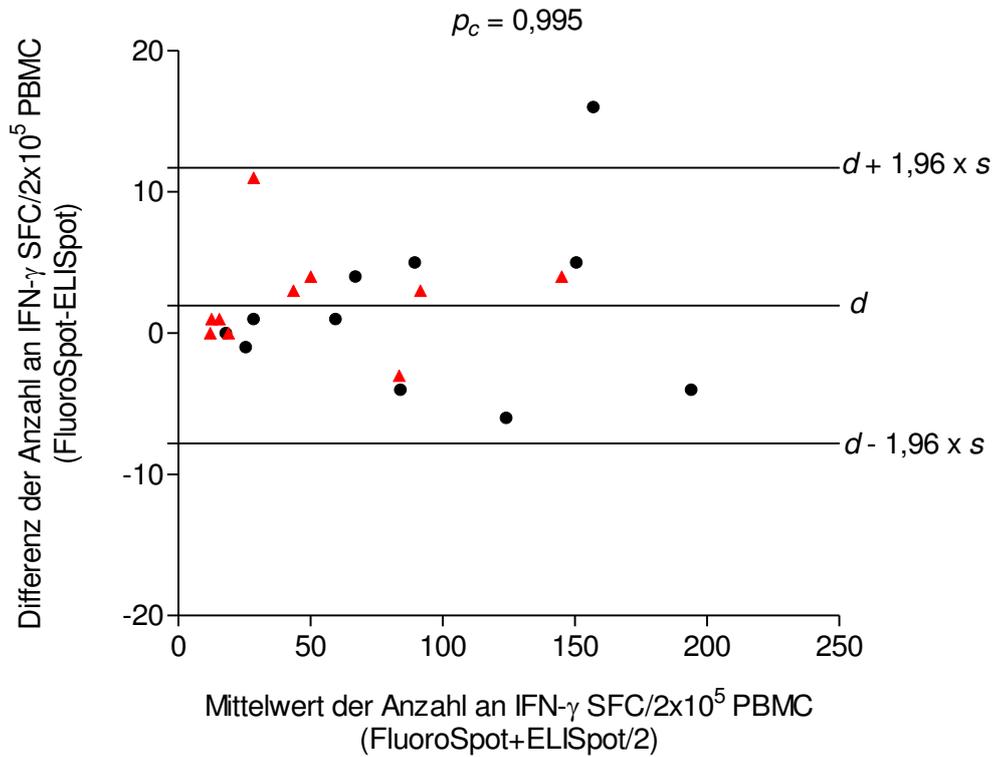
3.4.1.9 Vergleichbarkeit der detektierten Ergebnisse des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays und dem IFN- γ - und IL-2 ELISpot Assay

Abschließend wurde im Zuge der Etablierung und Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays ein Vergleich der Übereinstimmung der erzielten Ergebnisse dieses Assays mit den Ergebnissen von enzymatischen IFN- γ und IL-2 ELISpot Assays durchgeführt. Hierzu wurden PBMC von gesunden Spendern (n = 21 im IFN- γ /IL-2 FluoroSpot und IFN- γ ELISpot Assay; n = 8 im IL-2 ELISpot Assay) mit BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools *in vitro* restimuliert und die CMI unter Verwendung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays und einem IFN- γ und einem IL-2 ELISpot Assay detektiert. Für jeden Spender wurden jeweils zwei FluoroSpot- und zwei IFN- γ und IL-2 ELISpot Assays durchgeführt. In die Analyse flossen für jeden Spender die jeweiligen Mittelwerte der detektierten CMI einer jeden Assay Methode ein.

Beim Vergleich der Übereinstimmung der beiden Assay Methoden lag die durchschnittliche Differenz d der detektierten Anzahl an IFN- γ SFC der beiden Assay Methoden bei $d = 1,95$ IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC und die Übereinstimmungsgrenzen ($d \pm 1,96 \times s$) betragen -7,80 bzw. 11,70 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC (Abbildung 3.16A). Für detektierte IFN- γ SFC beider Assay Methoden ergab sich ein Konkordanz-Korrelationskoeffizient von $\rho_c = 0,995$, was einer sehr großen Übereinstimmung der beiden Assay Methoden entspricht (Abbildung 3.16A). Die durchschnittliche Differenz d der Anzahl an detektierten IL-2 SFC der beiden Assay Methoden betrug $d = -0,13$ IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC und die Übereinstimmungsgrenzen ($d \pm 1,96 \times s$) waren

-9,10 bzw. 8,85 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC (Abbildung 3.16B). Somit wurde auch bei der Detektion von IL-2 CMI eine große Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Assay Methoden beobachtet, was durch einen Konkordanz-Korrelationskoeffizienten von $\rho_c = 0,930$ bestätigt wurde (Abbildung 3.16B).

A



B

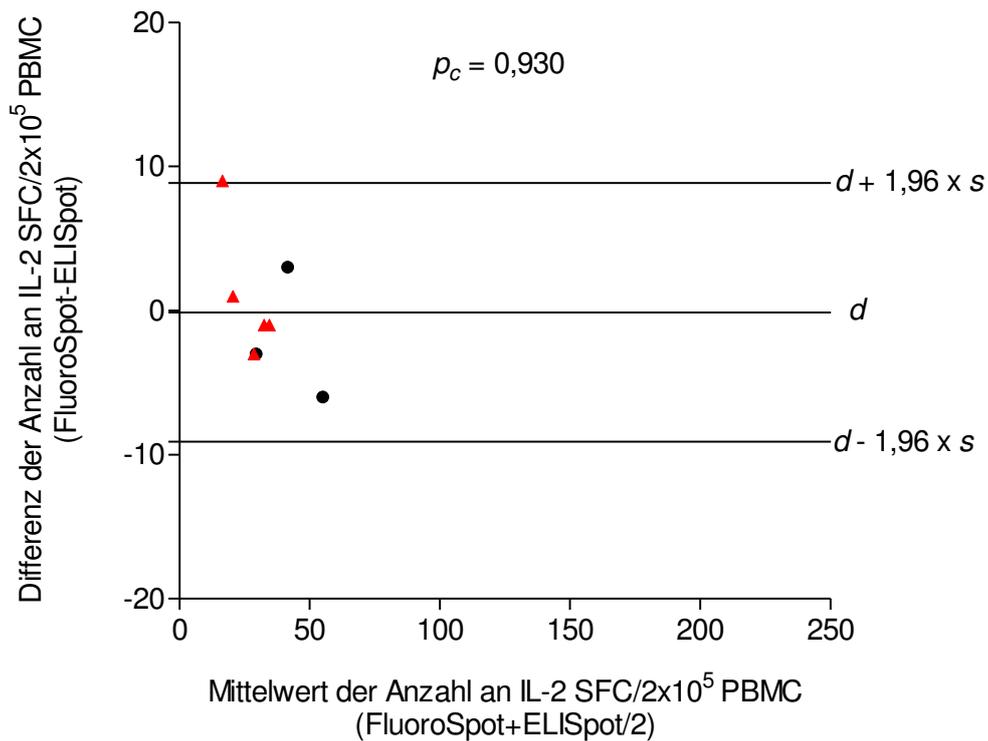


Abbildung 3.16: Bland-Altman Diagramm zur Beurteilung der Übereinstimmung der detektierten Ergebnisse des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays mit dem IFN- γ (A) und IL-2 (B) ELISpot Assay. Aufgetragen ist die Differenz der Anzahl an detektierten IFN- γ (A) bzw. IL-2 (B) SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC (n = 21 im IFN- γ ELI- und FluoroSpot Assay; n = 8 im IL-2 ELI- und FluoroSpot Assay) mit BZLF-1 (●) und EBNA-3a (▲) Peptidpools im FluoroSpot- und ELISpot Assay, gegenüber dem Mittelwert der Anzahl an IFN- γ bzw. IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC aus beiden Assay Methoden. Die horizontalen durchgezogenen Linien zeigen die Übereinstimmungsgrenzen ($d \pm 1,96 \times s$) und die durchschnittliche Differenz d (Verzerrung) der detektierten CMI beider Assay Methoden. p_c = Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin.

3.4.2 Analyse der Quantität und Qualität EBV-spezifischer zellvermittelter Immunantworten in der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden

Zusätzlich zu den zuvor gezeigten diagnostisch-serologischen Parametern wurden auch EBV-spezifische CMI in einer Gruppe von EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern ($n = 31$) und Kontrollprobanden ($n = 36$) mittels des validierten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays bestimmt. Hierfür wurden kryokonservierte PBMC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden mit Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 und EBNA-3a *in vitro* restimuliert. Anschließend wurde die Quantität, welche die Anzahl an spezifischen Zytokin-sekretierenden Zellen widerspiegelt, und die Qualität, das Zytokin Expressionsmuster (mono-, bifunktionale CMI) der EBV-spezifischen CMI in beiden Gruppen bestimmt und analysiert.

3.4.2.1 Vergleich der Quantität der detektierten EBV-spezifischen CMI von Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden

Insgesamt konnte bei 27 bzw. 14 Nachwuchsleistungssportlern und 17 bzw. 12 Kontrollprobanden eine zellvermittelte BZLF-1- bzw. EBNA-3a-spezifische IFN- γ Immunantwort detektiert werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,237$ bzw. $p = 0,738$) in der Anzahl an detektierten BZLF-1- und EBNA-3a-spezifischen IFN- γ SFC zwischen der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler (Median: 49 / Wertebereich: 16 - 371 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC bzw. Median: 41 / Wertebereich: 23 - 85 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC) und den Kontrollprobanden (Median: 33 / Wertebereich: 13 - 146 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC bzw. Median: 42 / Wertebereich: 11 - 131 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC) (Abbildung 3.17).

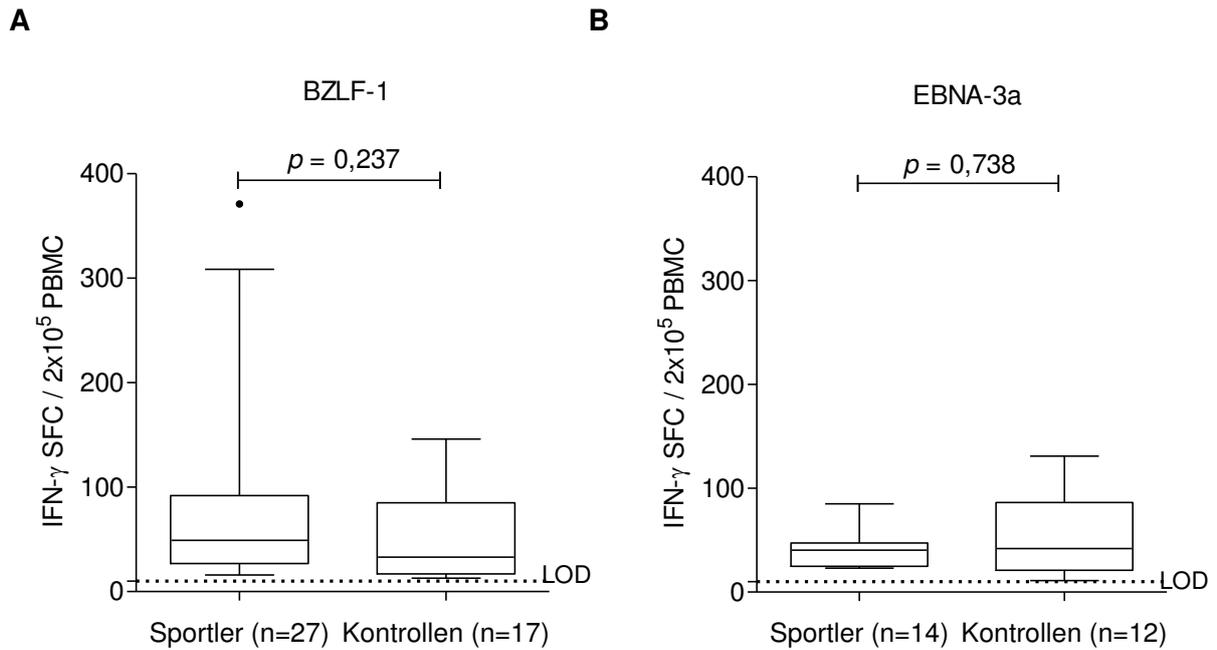


Abbildung 3.17: Anzahl an detektierten IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Für diese Gegenüberstellung wurde für jeden Nachwuchsleistungssportler der Mittelwert der detektierten CMI der einzelnen Belastungsphasen gebildet. Die statistische Signifikanz des Vergleichs der detektierten Ergebnisse beider Kohorten wurde mithilfe des Mann-Whitney Tests überprüft. LOD = Detektionslimit.

Da lediglich zwei der Kontrollprobanden eine BZLF-1-spezifische IL-2 CMI aufwiesen (18 bzw. 28 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC), konnte kein statistischer Vergleich mit der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler (Median: 16 / Wertebereich: 12 - 27 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC) vorgenommen werden (Abbildung 3.18A). Die Anzahl der detektierten EBNA-3a-spezifische IL-2 SFC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden waren vergleichbar (Nachwuchsleistungssportler: Median: 14 / Wertebereich: 11 - 22 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC; Kontrollprobanden: Median: 25 / Wertebereich: 11 - 27 IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC; (Abbildung 3.18B).

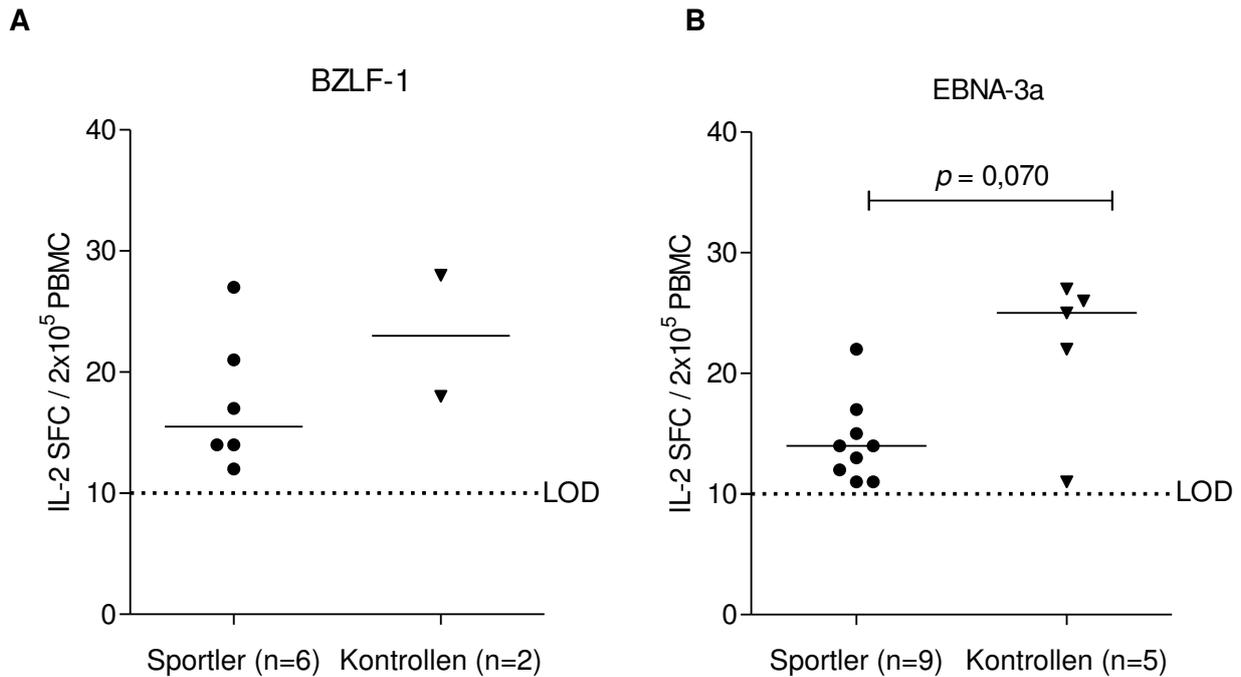
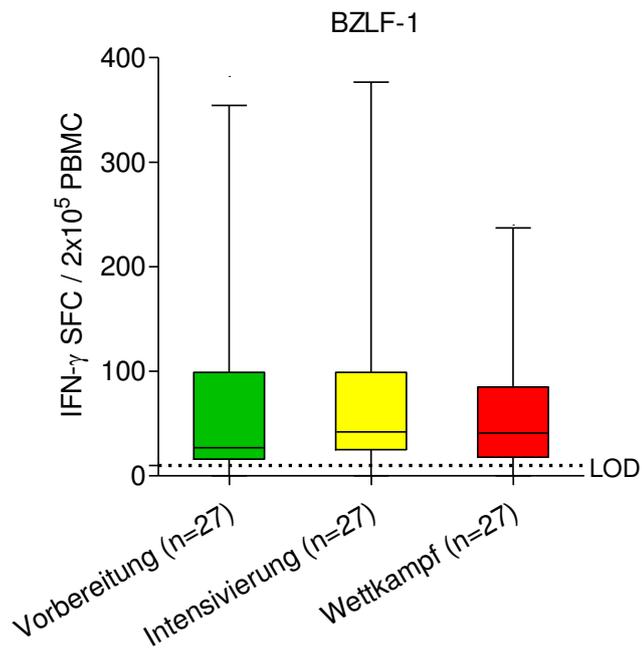


Abbildung 3.18: Anzahl an detektierten IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Die eingezeichneten horizontalen Linien geben jeweils den Median an. Die statistische Signifikanz des Vergleichs der detektierten Ergebnisse beider Kohorten wurde mithilfe des Mann-Whitney Tests überprüft. LOD = Detektionslimit.

3.4.2.2 Quantität der EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase

Verschiedene Anforderungen und Belastungsintensitäten während einer Vorbereitungs-, Intensivierungs- oder Wettkampfphase können einen Einfluss auf die individuelle EBV-spezifische CMI der Nachwuchsleistungssportler haben. Für die Bestimmung und den Vergleich der Quantität der EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase, wurden während der verschiedenen Belastungsphasen PBMC isoliert, *in vitro* restimuliert und die Anzahl an EBV-spezifischen IFN- γ und IL-2 SFC bestimmt. Bei 27 bzw. 14 von 31 Nachwuchsleistungssportlern konnte nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem BZLF-1 bzw. EBNA-3a Peptidpool eine IFN- γ CMI während mindestens einer der drei Belastungsphasen detektiert werden. Zusammenfassend zeigte sich für beide Stimulatorantigene kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an detektierten IFN- γ SFC in Abhängigkeit von der Belastungsphase (Abbildung 3.19). Während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase wurden im Median 27, 42, bzw. 41 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach Restimulation mit dem BZLF-1 Peptidpool (Abbildung 3.19A) und 34, 29, bzw. 30 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach Restimulation mit dem EBNA-3a Peptidpool detektiert (Abbildung 3.19B).

A



B

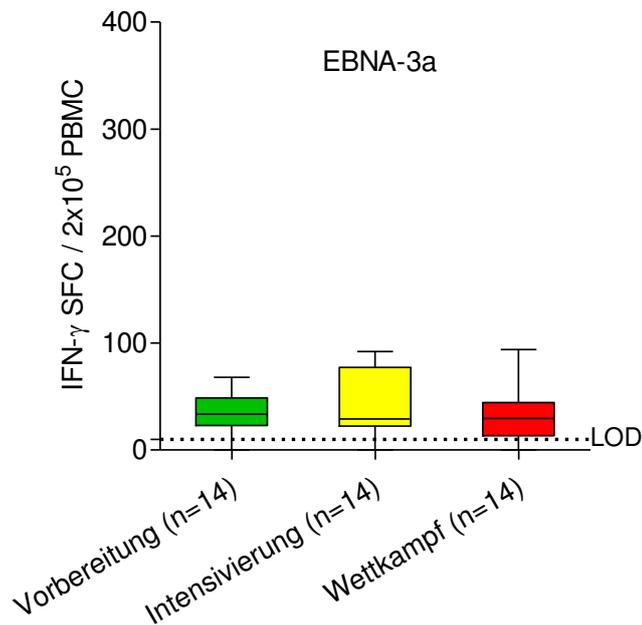
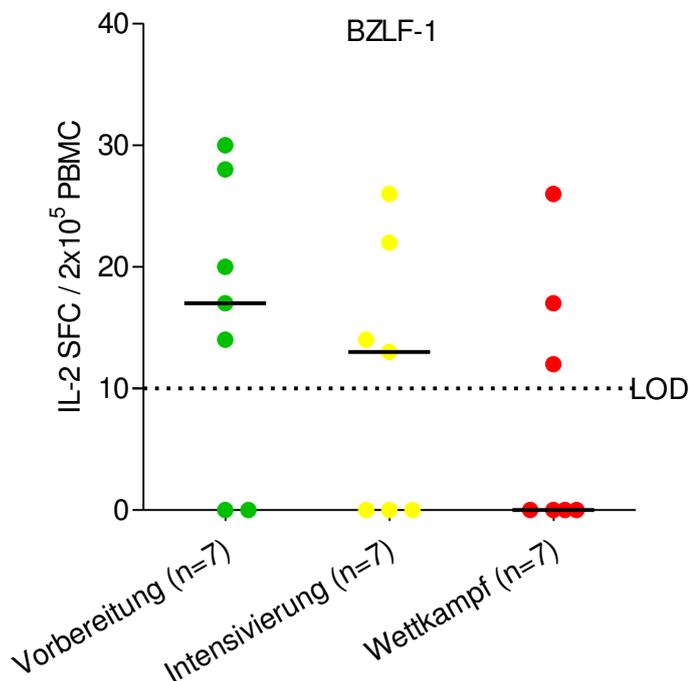


Abbildung 3.19: Anzahl der detektierten IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler aus der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B). Als statistischer Test wurde ein verbundener One-Way Anova Test (Friedman Test, $p = 0,935$ für BZLF-1 und $p = 0,612$ für EBNA-3a) mit angeschlossenen Dunn's multiple Comparison Test angewendet. LOD = Detektionslimit.

Auch in Bezug auf die Anzahl an detektierten EBV-spezifischen IL-2 SFC konnte nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an detektierten IL-2 SFC während der verschiedenen Belastungsphasen nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase wurden bei sieben Nachwuchsleistungssportlern im Median 17, 13, bzw. 0 IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC nach Restimulation mit dem BZLF-1 Peptidpool (Abbildung 3.20A) und bei neun Nachwuchsleistungssportlern im Median 12, 11, bzw. 0 IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC nach Restimulation mit dem EBNA-3a Peptidpool detektiert (Abbildung 3.20B).

A



B

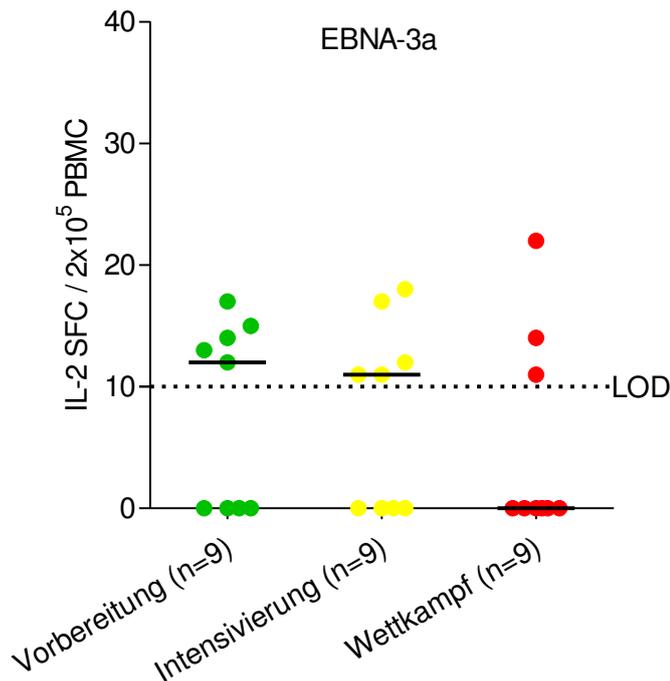
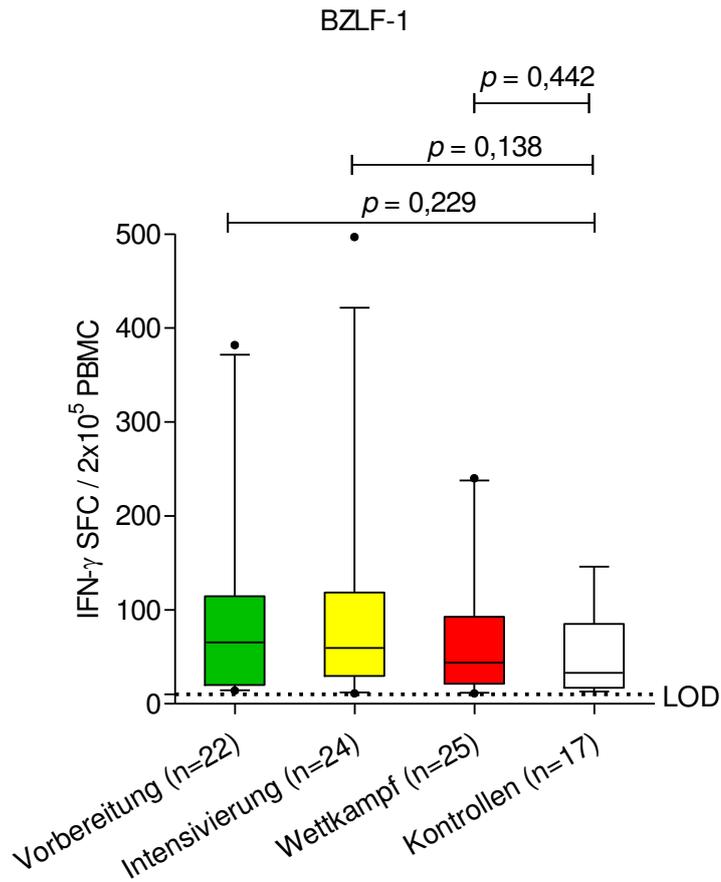


Abbildung 3.20: Anzahl an detektierten IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B). Die eingezeichneten horizontalen Linien geben jeweils den Median an. Als statistischer Test wurde ein verbundener One-Way Anova Test (Friedman Test, $p = 0,305$ für BZLF-1 und $p = 0,569$ für EBNA-3a) mit angeschlossenen Dunn's multiple Comparison Test angewendet. LOD = Detektionslimit.

3.4.2.3 Vergleich der Quantität der detektierten EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler während der verschiedenen Belastungsphasen und den Kontrollprobanden

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sich die während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase detektierten EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler quantitativ von denen der Kontrollprobanden unterscheiden. Zusammenfassend wurde kein signifikanter Unterschied der detektierten BZLF-1- und EBNA-3a-spezifischen IFN- γ CMI zwischen den Kontrollprobanden und den Nachwuchsleistungssportlern während verschiedener Belastungsphasen detektiert. (Abbildung 3.21).

A



B

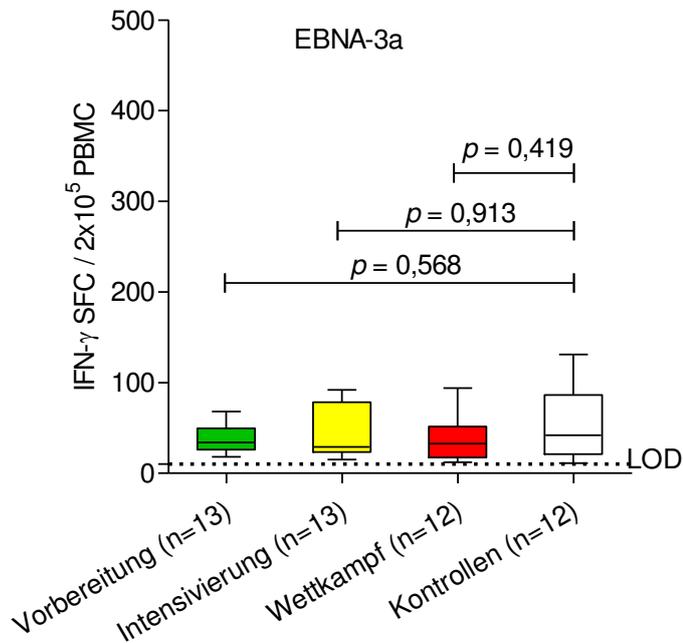


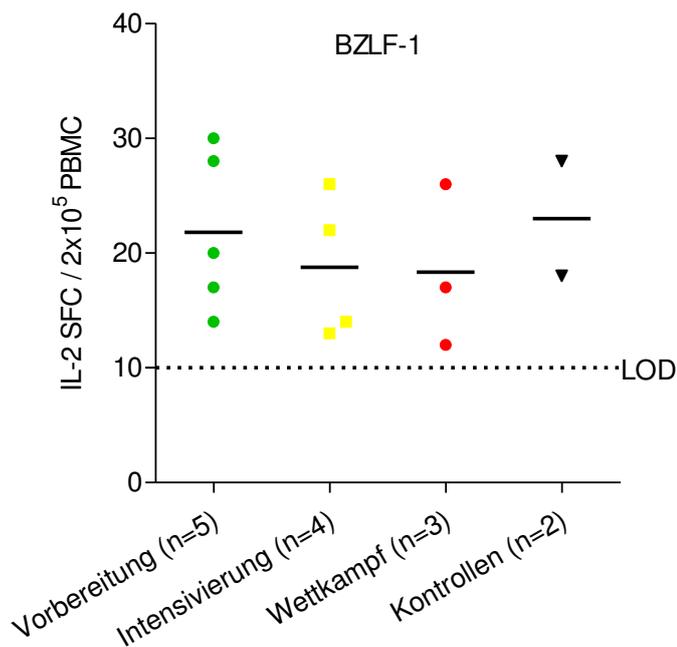
Abbildung 3.21: Anzahl an detektierten IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase und der Kontrollprobanden mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC

nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B). Die statistische Analyse des Vergleichs der erzielten IFN- γ SFC während der einzelnen Belastungsphasen der Nachwuchsleistungssportler und der Kontrollprobanden erfolgte anhand eines Mann-Whitney Tests. LOD = Detektionslimit.

Im Einzelnen wurden während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase der Nachwuchsleistungssportler im Median 66, 60, bzw. 44 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach Restimulation mit dem BZLF-1 Peptidpool (Abbildung 3.21A) und 34, 29, bzw. 33 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach Restimulation mit dem EBNA-3a Peptidpool detektiert (Abbildung 3.21B). Die Kontrollprobanden zeigten im Median 33 bzw. 42 IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation mit dem BZLF-1 bzw. EBNA-3a Peptidpool (Abbildung 3.21).

Angesichts der geringen Anzahl an Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden mit einer detektierbaren BZLF-1- und EBNA-3a-spezifischen IL-2 CMI konnte keine statistische Analyse der beiden Gruppen durchgeführt werden. Lediglich zwei Kontrollprobanden zeigten eine detektierbare IL-2 CMI nach *in vitro* Restimulation der PBMC mit dem BZLF-1 Peptidpool von 18 bzw. 28 IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC im Vergleich zu einer medianen IL-2 CMI der Nachwuchsleistungssportler von 20, 18 bzw. 12 IL-2 SFC/ 2×10^5 während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase (Abbildung 3.22A). Nach *in vitro* Restimulation der PBMC mit dem EBNA-3a Peptidpool waren bei fünf Kontrollprobanden IL-2 SFC von im Median 25 IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC im Vergleich zu im Median 14, 12 bzw. 14 IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase nachweisbar (Abbildung 3.22B).

A



B

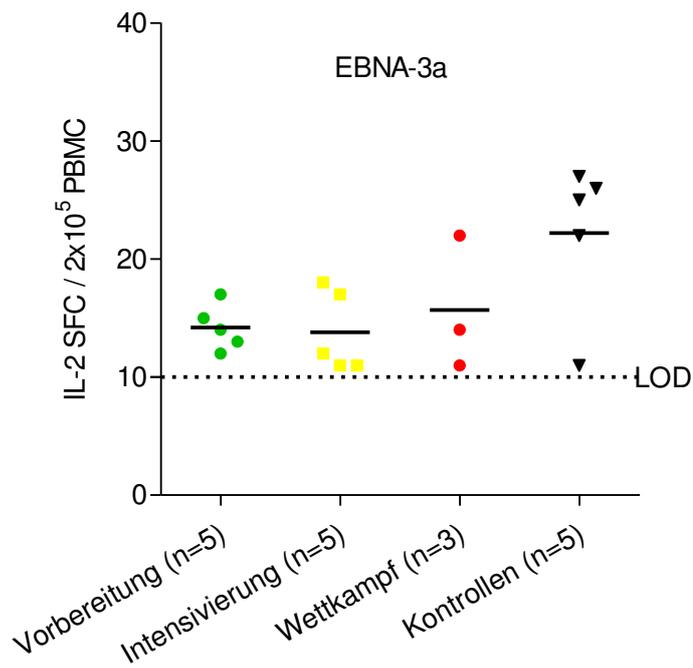


Abbildung 3.22: Anzahl der detektierten IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase und der Kontrollprobanden mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden mit Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B). Die eingezeichneten horizontalen Linien geben jeweils den Median an. LOD = Detektionslimit.

Zusammenfassend war in Bezug auf die Quantität der EBV-spezifischen zellvermittelten IFN- γ und IL-2 Immunantwort kein signifikanter Unterschied zwischen der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler und den Kontrollprobanden detektierbar. Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Quantität der EBV-spezifischen zellvermittelten IFN- γ und IL-2 Immunantworten während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase der Nachwuchsleistungssportler.

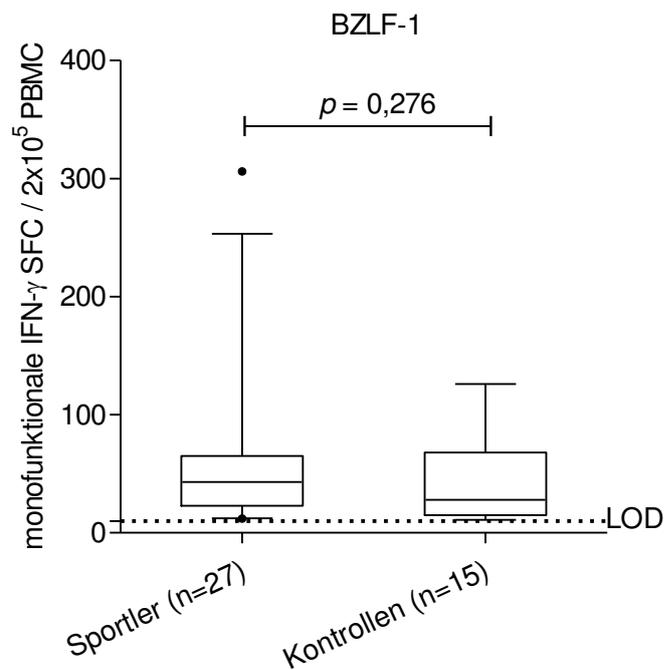
3.4.2.4 Qualität der EBV-spezifischen T-Zellantwort der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden

Die zuvor gezeigten Daten der EBV-spezifischen CMI bezogen sich auf die Gesamtzahl (Quantität) der detektierten IFN- γ und IL-2 sekretierenden Zellen, ohne eine Unterscheidung zwischen monofunktionalen- (nur ein Zytokin sekretierenden Zellen) und bifunktionalen CMI (IFN- γ und IL-2 sekretierenden Zellen) zu treffen. Nachfolgend wurde ein möglicher Einfluss des Trainings- und Belastungsumfanges des Hochleistungssports auf das Zytokin-Expressionsprofil (Qualität) der detektierten EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler untersucht und mit dem Expressionsprofil der Kontrollprobanden verglichen.

3.4.2.4.1 Monofunktionale EBV-spezifische CMI der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden

Bei 27 bzw. 14 der 31 getesteten Nachwuchsleistungssportler und 15 bzw. 9 der 36 getesteten Kontrollprobanden waren monofunktionale IFN- γ sekretierende Zellen nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem BZLF-1 bzw. EBNA-3a Peptidpool nachweisbar. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,276$ bzw. $p = 0,077$) in der Anzahl an detektierten BZLF-1- und EBNA-3a-spezifischen monofunktionalen IFN- γ SFC zwischen der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler (Median: 43 / Wertebereich: 12 – 306 monofunktionale IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC bzw. Median: 29 / Wertebereich: 13 – 67 monofunktionale IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC) und den Kontrollprobanden (Median: 28 / Wertebereich: 11 – 126 monofunktionale IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC bzw. Median: 38 / Wertebereich: 11 – 115 monofunktionale IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC) (Abbildung 3.23).

A



B

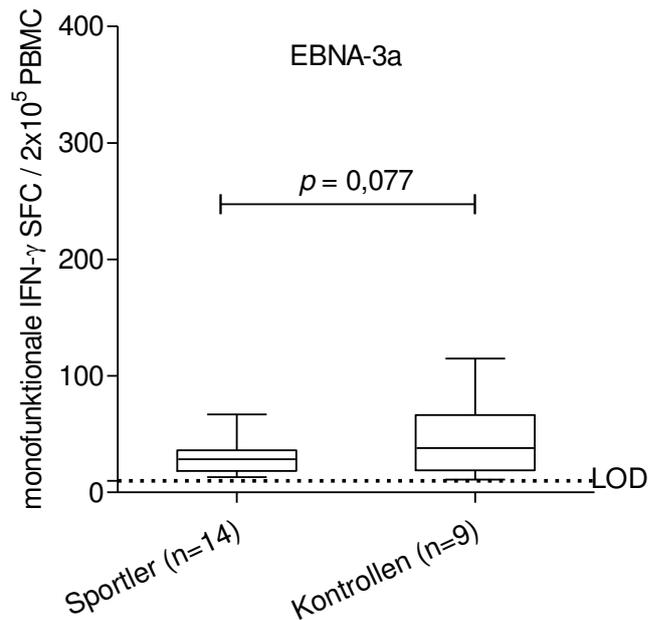


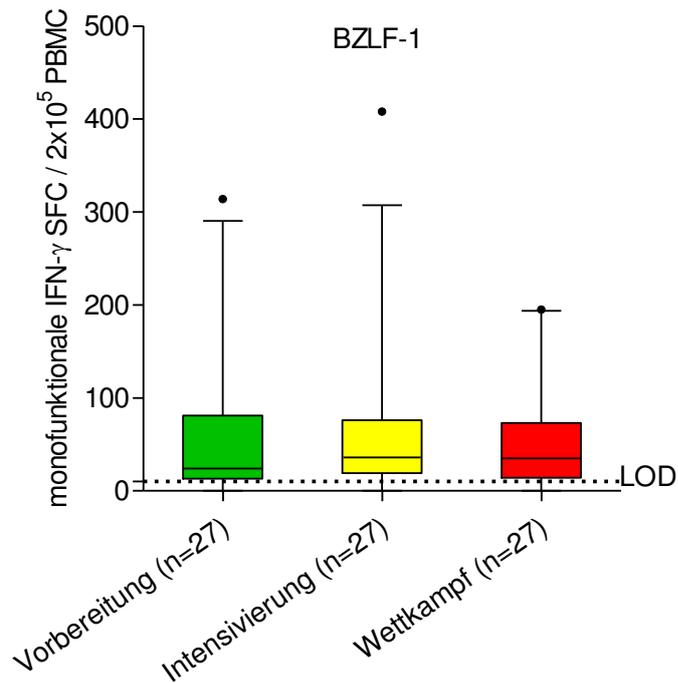
Abbildung 3.23: Anzahl der detektierten monofunktionalen IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten monofunktionalen IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B). Die statistische Analyse des Vergleichs der detektierten monofunktionalen IFN- γ SFC der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden erfolgte anhand eines Mann-Whitney Tests. LOD = Detektionslimit

Nach *in vitro* Restimulation der PBMC mit BZLF-1 und EBNA-3a Peptidpools konnten bei keinem der 31 getesteten Nachwuchsleistungssportler monofunktionale IL-2 SFC nachgewiesen werden. Zwei der Kontrollprobanden zeigten eine monofunktionale IL-2 CMI nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem EBNA-3a Peptidpool von jeweils 13 monofunktionalen IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC. Nach *in vitro* Restimulation mit dem BZLF-1 Peptidpool waren in der Gruppe der Kontrollprobanden keine monofunktionalen IL-2 SFC detektierbar.

3.4.2.4.2 Monofunktionale EBV-spezifische IFN- γ SFC der Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an detektierten BZLF-1 und EBNA-3a-spezifischen monofunktionalen IFN- γ SFC zwischen den verschiedenen Belastungsphasen der Nachwuchsleistungssportler detektiert werden. Während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase wurden im Median 24, 36 bzw. 35 BZLF-1-spezifische und 26, 19 bzw. 19 EBNA-3a-spezifische monofunktionale IFN- γ SFC/2x10⁵ PBMC detektiert (Abbildung 3.24).

A



B

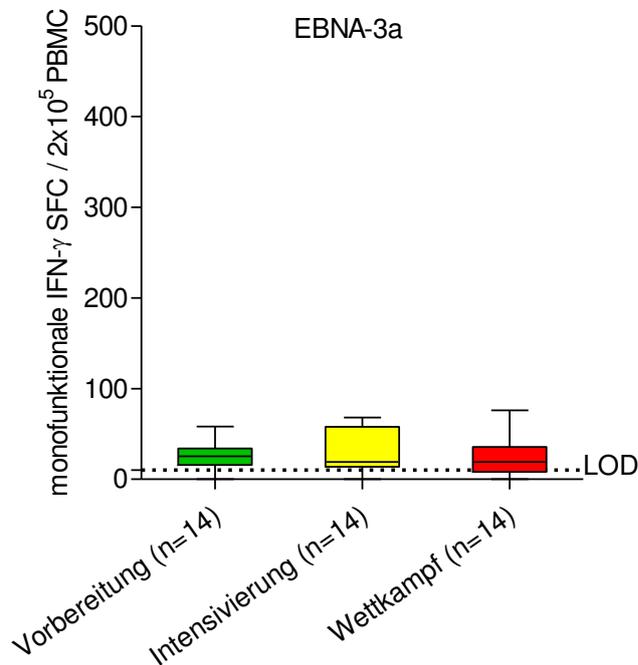


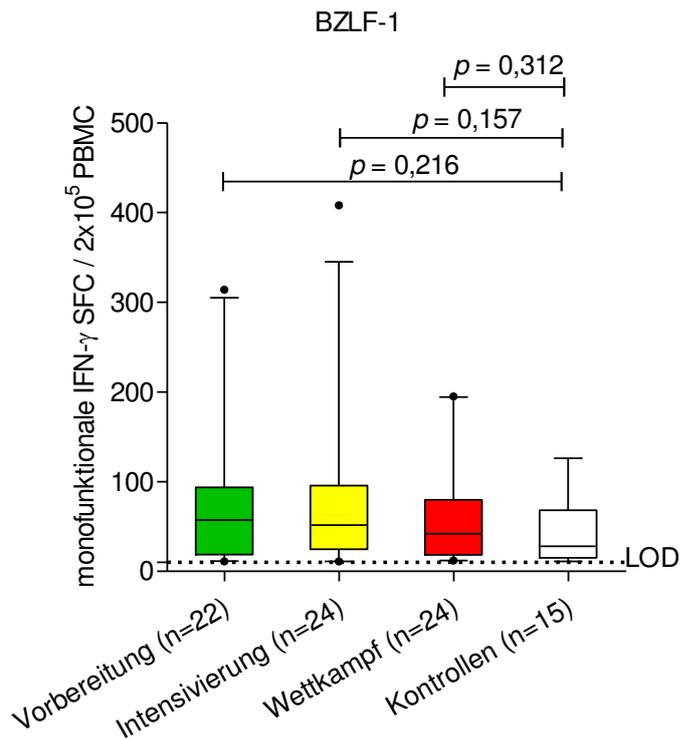
Abbildung 3.24: Anzahl an monofunktionalen IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten monofunktionalen IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B). Als statistischer Test wurde ein verbundener One-Way Anova Test (Friedman Test; $p = 0,7659$ für BZLF-1 und $p =$

0,5954 für EBNA-3a) mit angeschlossenenem Dunn's multiple Comparison Test angewendet. LOD = Detektionslimit.

3.4.2.4.3 Vergleich monofunktionaler EBV-spezifischer IFN- γ SFC der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen und der Kontrollprobanden

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an detektierten BZLF-1- und EBNA-3a-spezifischen monofunktionalen IFN- γ SFC während der Vorbereitungs- ($p = 0,216$ bzw. $p = 0,055$), Intensivierungs- ($p = 0,157$ bzw. $p = 0,214$) und Wettkampfphase ($p = 0,312$ bzw. $p = 0,205$) der Nachwuchsleistungssportler verglichen mit den Kontrollprobanden (Abbildung 3.25). Im Detail wurden während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase der Nachwuchsleistungssportler im Median 57, 52 bzw. 42 BZLF-1-spezifische und 28, 29 bzw. 24 EBNA-3a spezifische monofunktionale IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC verglichen mit 28 bzw. 38 monofunktionalen IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC der Kontrollprobanden detektiert (Abbildung 3.25).

A



B

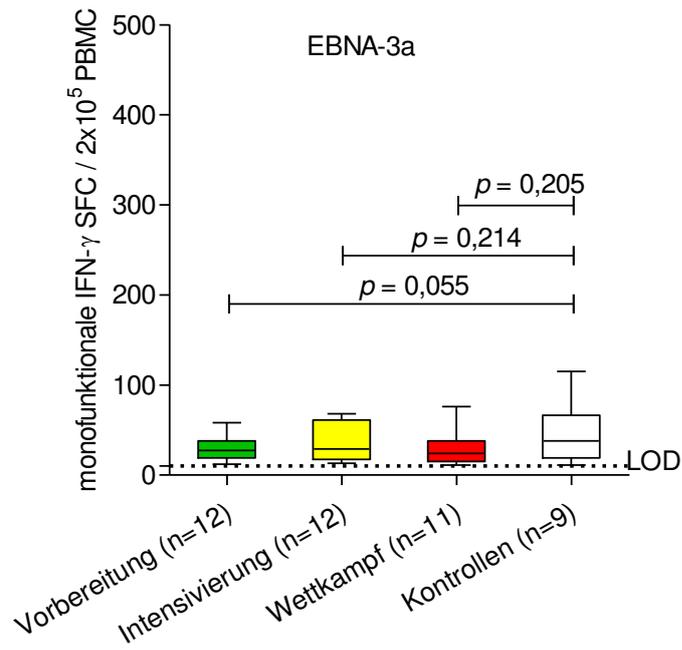


Abbildung 3.25: Anzahl an monofunktionalen IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen und der Kontrollprobanden mit BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B) Peptidpools. Dargestellt ist die Anzahl an detektierten monofunktionalen IFN- γ SFC/ 2×10^5 PBMC nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 (A) und EBNA-3a (B). Aufgrund des für diese Analyse angewendeten Mann-Whitney Tests unterscheiden sich die Werte der detektierten monofunktionalen IFN- γ SFC der Nachwuchsleistungssportler während der verschiedenen Belastungsphasen von den Werten in Abb. 3.24, da für den Vergleich mit den Kontrollprobanden nur SFC > 0 und über dem LOD verwendet wurden. LOD = Detektionslimit.

3.4.2.4.4 Bifunktionale EBV-spezifische CMI der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, waren nur bei wenigen Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden EBV-spezifische IL-2 sekretierende Zellen detektierbar, welche zumeist ein bifunktionales Profil (doppelt-positive IFN- γ +IL-2 SFC) aufwiesen (vgl. 3.4.2.4.1). Nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem BZLF-1 Peptidpool wurden während der Vorbereitungs- und Intensivierungsphase im Median 16 und 17 doppelt-positive IFN- γ +IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC detektiert und zwei Nachwuchsleistungssportler zeigten 20 bzw. 24 doppelt-positive IFN- γ +IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC während der Wettkampfphase, verglichen mit 11 bzw. 24 doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC der Kontrollprobanden. Nach *in vitro* Restimulation von PBMC mit dem EBNA-3a Peptidpool wurden 14 IFN- γ +IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC bei einem Nachwuchsleistungssportler während der Vorbereitungsphase, im Median 15 IFN- γ +IL-2 SFC/ 2×10^5 PBMC bei drei Nachwuchsleistungssportlern während der Intensivierungsphase und je 12 doppelt-positive

IFN- γ +IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC bei zwei Nachwuchsleistungssportlern während der Wettkampfphase verglichen mit im Median 12 doppelt-positiven IFN- γ +IL-2 SFC/2x10⁵ PBMC bei drei Kontrollprobanden detektiert.

Zusammenfassend zeigte sich in Bezug auf die Qualität der EBV-spezifischen IFN- γ und IL-2 Immunantwort kein signifikanter Unterschied zwischen der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler und den Kontrollprobanden. Darüber hinaus wurde kein signifikanter Unterschied in der Qualität der EBV-spezifischen IFN- γ und IL-2 Immunantwort während der Vorbereitungs-, Intensivierungs- und Wettkampfphase der Nachwuchsleistungssportler detektiert.

3.5 Korrelation der EBV-spezifischen CMI mit den anti-EBV IgG-Titern und der EBV-Last bei Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden

In der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden zeigten sich keine Auffälligkeiten bzw. Korrelationen in Bezug auf die Höhe der detektierten CMI und dem jeweiligen EBV-Serostatus, den anti-EBV IgG-Titern und der EBV-Last der Probanden. Einzelne über oder unter dem Mittelwert der jeweiligen Kohorte liegende zellvermittelte EBV-spezifische IFN- γ oder IL-2 Immunantworten, waren nicht mit einem bestimmten EBV-Serostatus, vom Mittelwert abweichenden anti-EBV IgG-Titern oder einer detektierbaren EBV-Last in Zusammenhang zu bringen.

4 Diskussion

Das gehäufte Auftreten von Infektionen der oberen Atemwege (URTI) bei Athleten unterstützte die Hypothese, dass eine andauernde starke körperliche Belastung, wie sie im Rahmen des Hochleistungssport gegeben ist, dauerhaft eine immunschwächende Wirkung auf das Immunsystem eines Hochleistungssportlers ausübt (MacKinnon, 2000b; Mackinnon & Hooper, 1996). Inwieweit die berichteten URTIs bei Hochleistungssportlern im Zusammenhang mit einer EBV-Infektion stehen ist schwer zu prüfen, da selten ein verantwortliches Pathogen nachgewiesen werden kann. Es gibt einerseits Berichte, welche einen Zusammenhang von URTIs bei Athleten mit einer EBV-Infektion bzw. einer -Reaktivierung zu belegen scheinen (Gleeson et al., 2002; Reid et al., 2004; Yamauchi et al., 2011). Andere Studien widersprechen jedoch diesen Ergebnissen und detektierten keinen Zusammenhang zwischen dem EBV-Serostatus und der EBV-Last und der Häufigkeit von URTIs bei Hochleistungssportlern (A. J. Cox et al., 2004; He et al., 2013).

Hoffmann et al. konnten in einem Kollektiv erwachsener Hochleistungssportler eine erhöhte EBV-Last mit zugleich niedrigeren anti-EBV IgG-Titern detektieren und diskutierten eine möglicherweise geschwächte Immunfunktion als Folge des Hochleistungssports und eine daraus resultierende verminderte Kontrolle der EBV-Infektion als Ursache hierfür (Hoffmann et al., 2010). Alle zuvor genannten Ergebnisse und Rückschlüsse wurden jedoch ausschließlich in erwachsenen Kollektiven von Hochleistungssportlern gewonnen und es gibt keine Hinweise, ob diese Beobachtungen auch auf den Nachwuchsleistungssport übertragen werden können. Die meisten zuvor genannten Studien hatten zudem die Schwäche, dass sie den Einfluss verschiedener Belastungsphasen, welche im Laufe eines Jahres trainings- und wettkampfbedingt auftreten, nicht in Betracht gezogen haben.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wurde die Hypothese einer immunschwächenden Wirkung des Hochleistungssports, durch eine Bestimmung der EBV-spezifischen Immunfunktion in einem Kollektiv von Nachwuchsleistungssportlern im Detail geprüft und diskutiert. Zusätzlich wurde analysiert, ob der individuelle EBV-spezifische Immunstatus als ein möglicher Biomarker genutzt werden kann, welcher den allgemeinen Immunstatus eines Nachwuchsleistungssportlers widerspiegelt. Dieser Biomarker könnte den Grad der individuellen Belastbarkeit eines Nachwuchsleistungssportlers in der Praxis des Hochleistungssports aufzeigen und ein rechtzeitiges Intervenieren und gegebenenfalls eine Reduktion der Belastung ermöglichen.

4.1 Bestimmung des EBV-Serostatus in beiden Kohorten

Um eine Aussage über den Einfluss des Hochleistungssports auf die EBV-spezifische Immunantwort in Nachwuchsleistungssportlern treffen zu können und um zu prüfen, ob die EBV-spezifische Immunantwort als Biomarker dienen kann, musste initial bestimmt werden, ob eine ausreichend große Anzahl an EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden in den vorliegenden Kollektiven vorhanden war.

Es konnte gezeigt werden, dass zum Ende der vierjährigen Studie 68 % der Nachwuchsleistungssportler EBV-seropositiv waren. Erwartungsgemäß lag der EBV-Durchseuchungsstatus damit unter dem Wert der erwachsenen Bevölkerung, bei der von einem Anteil von 90 – 95 % EBV-seropositiven Personen ausgegangen wird (Beltran et al., 2009; Cohen, 2000). In der Gruppe der Kontrollprobanden lag mit einem Anteil von 57 % EBV-seropositiven Probanden ebenfalls ein ausreichend großes Kollektiv vor, um einen Vergleich der EBV-spezifischen Immunantwort der beiden Kohorten vorzunehmen. Warum die Durchseuchungsrate in der Kontrollgruppe um elf Prozent unter dem Anteil in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler lag, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine mögliche Erklärung könnte darin begründet liegen, dass sportlich aktive Kinder und Jugendliche, häufigeren Kontakt zu EBV-seropositiven Mannschaftskameraden hatten und sich zum Beispiel durch ein gemeinsames Benutzen von ein und derselben Trinkflasche, während Trainings- und Wettkampfeinheiten, mit dem EBV infizierten. Neben der Bezeichnung „*kissing disease*“ wurde auch die Formulierung „*bottle disease*“, welche eine Übertragung des EBV durch das Benutzen ein und derselben Trinkflasche impliziert, im Rahmen von Mannschaftssportarten mit einer EBV-(Primär-) Infektion in Verbindung gebracht (Klassen, Heinz, & Siebert, 2000).

4.1.1 Bestimmung der EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter

Ein weiterer Schritt war die Analyse der EBV-Seroprävalenz in Abhängigkeit vom Alter der Probanden. Erstaunlicherweise konnte in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler kein stetiger Anstieg der EBV-Seropositivität in Abhängigkeit vom Alter erfasst werden. So zeigten die neun- bis 12-jährigen Probanden eine ähnlich hohe EBV-Durchseuchungsrate wie die 16- und 17-jährigen Nachwuchsleistungssportler, im Gegensatz zu den 13- bis 15-jährigen, deren EBV-Seropositivität darunter lag. Ein Grund für diese Beobachtung könnte die geringere Anzahl an neun bis 12-jährigen Probanden sein, wodurch eine mögliche Verzerrung der Ergebnisse vorlag. Nimmt man diese Altersgruppe aus der Analyse heraus, zeigt sich ein stetiger Anstieg des Anteils EBV-seropositiver Nachwuchsleistungssportler mit zunehmendem Alter ab. Diese Beobachtung könnte mit der beginnenden Pubertät und dem steigenden sexuellen Interesse und somit der höheren Wahrscheinlichkeit einer Übertragung des EBV in dieser Altersgruppe einhergehen (Odumade, Hogquist, & Balfour, 2011). In der Kontrollgruppe war mit Ausnahme

der elf- und 19-jährigen Probanden ein Anstieg der EBV-Durchseuchungsrate in Abhängigkeit vom Alter zu beobachten. Beim Vergleich der beiden Kohorten war auffallend, dass sich die EBV-Seroprävalenz bei den 12- und 13-jährigen Probanden zwischen den Kohorten deutlich unterschied. Hier waren 70 bzw. 52% der Nachwuchsleistungssportler verglichen mit lediglich 38 bzw. 37% der Kontrollprobanden EBV-seropositiv. Dieser deutliche Unterschied könnte mit der zuvor beschriebenen Tatsache, dass im Trainings- und Wettkampfalltag häufig dieselben Trinkflaschen von mehreren Nachwuchsleistungssportlern genutzt werden, zusammenhängen.

4.1.2 Detektion von EBV-Reaktivierungen in beiden Kohorten

Falls die weitverbreitete Annahme einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports auch auf das hier vorliegende Kollektiv von Nachwuchsleistungssportlern zutreffen sollte, könnte das Vorliegen von gehäuft auftretenden EBV-Reaktivierungen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Hinweis auf die Richtigkeit dieser Annahme sein (Hoffmann et al., 2010; Reid et al., 2004). Die Analyse der Anzahl an EBV-Reaktivierungen während der vierjährigen Studie erbrachte eine geringfügige Häufung von EBV-Reaktivierungen in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler (9 %), verglichen mit den Kontrollprobanden (3 %). Dieser etwas höhere Anteil in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler lässt sich vermutlich durch die Tatsache erklären, dass bei den Nachwuchsleistungssportlern durch häufigere Blutentnahmen der EBV-Serostatus öfter bestimmt wurde und eine Detektion einer EBV-Reaktivierung in dieser Kohorte statistisch wahrscheinlicher war. Zusätzlich zeigten nicht alle Nachwuchsleistungssportler mit einer detektierten EBV-Reaktivierung klinische Symptome, was konform mit der Beobachtung von sporadisch auftretenden asymptomatischen EBV-Reaktivierungen in gesunden EBV-Trägern ist (Laichalk et al., 2002; Vogl et al., 2012). Sollte das Auftreten von EBV-Reaktivierungen wirklich im Zusammenhang mit der intensiven Belastung und einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports stehen, hätten im Laufe der Studie viel häufiger symptomatische EBV-Reaktivierungen, begleitet von deutlichen Einschränkungen hinsichtlich der Leistungsfähigkeit der einzelnen Nachwuchsleistungssportler auftreten müssen. Die Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports, in dem untersuchten Kollektiv von Nachwuchsleistungssportlern, konnte daher mit den vorliegenden Daten bezüglich des EBV-Serostatus und dem Auftreten von EBV-Reaktivierungen nicht verifiziert werden.

4.1.3 Detektion von EBV-Primärinfektionen in beiden Kohorten

Neben dem Auftreten von EBV-Reaktivierungen als ein möglicher Grund für Leistungseinbußen ist auch für symptomatische EBV-Primärinfektionen (IM) beschrieben, dass diese einzelne Hochleistungssportler für Wochen oder Monate, aufgrund von abnormer Müdigkeit und Erkältungssymptomen, stark in ihrem Allgemeinbefinden und in ihrer Leistungsstärke

einschränken können (Pottgiesser, Wolfarth, Schumacher, & Bauer, 2006; Pottgießer T, 2008). Mit einem Anteil von lediglich 68 % EBV-seropositiven Probanden in dem vorliegenden Kollektiv an Nachwuchsleistungssportlern war mit zunehmendem Alter und der beginnenden Pubertät eine gehäufte EBV-Serokonversion der bis dahin EBV-seronegativen Probanden zu erwarten. Überraschenderweise konnten bei lediglich 3 % der Nachwuchsleistungssportler EBV-Primärinfektionen detektiert werden, welche jedoch asymptomatisch verliefen und zu keinen Leistungsbeeinträchtigungen führten. Des Weiteren wurde unabhängig von turnusmäßigen Untersuchungszeitpunkten bei jedem Verdacht auf eine IM bzw. IM-ähnlichen Symptomen oder anderweitig unerklärbarer plötzlicher Leistungsschwäche eines Nachwuchsleistungssportlers der EBV-Serostatus bestimmt. Allerdings konnte hier nie der Verdacht einer IM bestätigt werden und als Erklärung für vorliegende Symptome bzw. verminderte Leistungsstärke dienen. Die vorliegenden Daten stützen daher die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen symptomatischen EBV-Primärinfektion und reduzierter Leistungsfähigkeit von Nachwuchsleistungssportlern nicht.

Zusammengefasst zeigte sich der EBV-Serostatus, während dieser Studie, nicht als geeigneter Biomarker für die Beurteilung des allgemeinen Immunstatus der Nachwuchsleistungssportler. Zusätzlich konnten beobachtete Erkältungssymptome, wie sie bei URIs auftreten, in diesem Kollektiv nicht mit EBV-Infektionen und –Reaktivierungen in Verbindung gebracht werden.

4.2 Quantifizierung der anti-EBV IgG-Titer in beiden Kohorten

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob in der Kohorte der Nachwuchsleistungssportler ein Einfluss des Hochleistungssports auf die Höhe der EBV-spezifischen IgG-Titer im Vergleich mit den Kontrollprobanden nachweisbar war. Eine für diesen Vergleich ausreichend hohe Sensitivität lag mit jeweils 97 bzw. 92 % detektierbaren anti-EBV IgG-Titern in der Gruppe der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden vor.

Entgegen der Beobachtung von Hoffmann et al. wurde kein signifikanter Unterschied in der Höhe der anti-EBV IgG-Titer zwischen der gesamten Kohorte der Nachwuchsleistungssportler und der Kontrollprobanden detektiert (Hoffmann et al., 2010). Der wesentliche Unterschied der beiden Studien war das Alter der teilnehmenden Probanden. Hoffmann et al. beschrieben ihre Beobachtungen für erwachsene Hochleistungssportler. Unter Umständen lag in diesem Kollektiv an erwachsenen Hochleistungssportlern bereits eine immunschwächende Auswirkung des Hochleistungssports vor, welche zu niedrigeren anti-EBV IgG-Titern im Vergleich zur Kontrollkohorte geführt hatte. Des Weiteren könnte ein verfrüht einsetzender Alterungsprozess des Immunsystems, aufgrund der mit dem Hochleistungssport verbundenen langandauernden psychischen und physischen Belastungen in dem Kollektiv von Hoffmann et al. vorgelegen

haben (Simpson & Bosch, 2014) und als eine mögliche Ursache, für die infolge der geschwächten EBV-spezifischen zellvermittelten Immunantwort (CMI) in erwachsenen Hochleistungssportlern niedrigeren anti-EBV IgG-Titer diskutiert werden. Nach heutigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass auch das Immunsystem einer Art Alterungsprozess unterliegt (Kohut & Senchina, 2004) und mit zunehmendem Alter an Leistungsfähigkeit hinsichtlich der Kontrolle von Virusinfektionen verliert (Ouyang et al., 2003; Powers, 1993; Powers & Belshe, 1993). Kontrovers dazu gibt es jedoch auch Studien, die keine altersbedingte Reduktion der Frequenz und Funktionalität der EBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort in gesunden älteren EBV-seropositiven Probanden (> 60 Jahre alt) im Vergleich zu jüngeren Probanden (< 40 und 41 - 59 Jahre) beobachten konnten (Lelic et al., 2012).

Vergleicht man die Höhe der anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden dieser Studie, mit den Werten der anti-EBV IgG-Titer der Studie von Hoffmann et al. fällt auf, dass die Werte der erwachsenen Kontrollprobanden deutlich von den Werten beider Kohorten dieser Studie abweichen. Das könnte daran liegen, dass mit zunehmendem Alter das Immunsystem eine spezifischere antivirale Immunantwort, mit höheren Virus-spezifischen Antikörpertitern ausbilden konnte (Lelic et al., 2012). Die erwachsenen Hochleistungssportler zeigten diese „Reifung“ des Immunsystems aufgrund des geschwächten Immunsystems möglicherweise nicht in diesem deutlichen Rahmen. Vor allem für CMV-spezifische zellvermittelte Immunantworten ist dieser altersbedingte Effekt beschrieben (Lelic et al., 2012), jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass das in einer eher verminderten EBV-spezifischen Immunantwort in Co-infizierten CMV- und EBV-seropositiven Personen resultiert (Burrows, Khanna, Burrows, & Moss, 1994). Um diese Vermutung zu bestätigen bzw. zu widerlegen müsste in zukünftigen Studien z.B. die CMV-spezifische Immunantwort zusätzlich bestimmt werden.

4.2.1 Anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen und im Vergleich mit der Kontrollgruppe

Ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Studie lag in der Tatsache, dass die EBV-spezifischen immunologischen Parameter der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen bestimmt wurden. Das erlaubte eine weitaus detailliertere Beurteilung der Frage, ob die intensive körperliche und psychische Belastung des Hochleistungssports einen Einfluss auf die EBV-spezifische Immunantwort hat. Hierbei wurden signifikant höhere anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Wettkampfphase, verglichen mit der Intensivierungsphase detektiert. Der Grund hierfür könnte eine durch den Stress und die Belastung der Wettkampfphase induzierte geschwächte CMI sein (Lancaster et al., 2004; Walsh et al., 2011), welche zu einer unerschwelligen und daher im Immunoblot nicht detektierbaren EBV-Reaktivierung einzelner Probanden führte. Durch die geschwächte CMI trat

möglicherweise eine Erhöhung der EBV-Replikationsrate und damit verbunden eine vermehrte EBV-Proteinexpression auf, was wiederum zu den signifikant erhöhten anti-EBV IgG-Titern der Nachwuchsleistungssportler während der Wettkampfphase verglichen mit der Intensivierungsphase geführt haben könnte (Stowe et al., 2007). Ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme könnte darin begründet sein, dass zumeist ein EBV-Reaktivierungsstatus mit erhöhten EBV-spezifischen Antikörpertitern einhergeht (Glaser et al., 1999; Glaser, Pearl, Kiecolt-Glaser, & Malarkey, 1994; Stowe, Pierson, Feedback, & Barrett, 2000). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde beim Auftreten einer EBV-Reaktivierung bei einzelnen Nachwuchsleistungssportlern eine gleichzeitige Erhöhung der anti-EBV IgG-Titer beobachtet. Pottgiesser et al. beobachteten hingegen stabil bleibende EBV-spezifische Antikörpertiter in Abhängigkeit von verschiedenen Belastungsphasen in einer Kohorte von Leistungssportlern, wobei der Unterschied dieser Studie zu der hier vorliegenden Arbeit hauptsächlich in der Größe der eingeschlossenen Kohorte (n = 15) und dem einseitigen Kollektiv an Biathleten lag (T. Pottgiesser et al., 2012).

Betrachtet man die physische Belastung der einzelnen Phasen scheint es so zu sein, dass auch während der Intensivierungsphase bereits eine intensive körperliche Belastung, begründet durch den erhöhten Trainingsumfang, vorlag. Folglich scheint der in dieser Arbeit festgestellte Unterschied in der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer während der Intensivierungs- und Wettkampfphase nicht auf einer ausschließlich physisch bedingten stärkeren Belastung während der Wettkampfphase zu beruhen. Vielmehr könnte eine in der Wettkampfsituation definitiv vorliegende Zunahme der psychischen Belastung als Ursache für die zuvor diskutierte verminderte EBV-spezifische CMI und einer damit leicht erhöhten EBV-Last und signifikant erhöhten anti-EBV IgG-Titern gesehen werden (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005; Glaser et al., 2005; Payne, Mehta, Tying, Stowe, & Pierson, 1999). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass Kadetten während der Examensphase häufiger EBV-Reaktivierungen und erhöhte anti-EBV IgG-Titer aufwiesen, als während eines sechswöchigen körperlich anstrengenden Training-Camps (Glaser et al., 1999).

Dass der beobachtete signifikante Unterschied in der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer auf einer natürlichen Fluktuation der EBV-spezifischen Antikörpertiter beruht, ist aufgrund des ausreichend großen Kollektivs an getesteten Nachwuchsleistungssportlern (n = 117) nahezu auszuschließen, da von Pottgiesser et al. beobachtet wurde, dass gesunde EBV-seropositive Kontrollprobanden stabil bleibende anti-EBV IgG-Titer über einen Zeitraum von neun bis 15 Monaten hinweg zeigten (T. Pottgiesser et al., 2012).

Der Vergleich der anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen und den Kontrollprobanden zeigte signifikant höhere EBV-spezifische IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Wettkampfphase verglichen mit den Kontrollprobanden. Diese Beobachtung unterstützt die zuvor diskutierte Annahme, dass die

Kombination aus erhöhter psychischer und physischer Belastung, wie sie während einer Wettkampfsaison vorliegt, zu einer verminderten EBV-spezifischen Immunfunktion in Nachwuchsleistungssportlern führte und in erhöhten anti-EBV IgG-Titern resultierte.

4.2.2 Quantifizierung der anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler in Abhängigkeit verschiedener Anforderungs- und Belastungsprofile

Neben der Tatsache, dass die Anforderungen verschiedener Belastungsphasen einen Einfluss auf die EBV-spezifische Immunantwort haben können, ist auch denkbar, dass ein Unterschied hinsichtlich der EBV-spezifischen Immunantwort in verschiedenen Trainingskollektiven, aufgrund verschiedener Anforderungsprofile, vorhanden ist. Eine Aufteilung aller Nachwuchsleistungssportler in die 14 unterschiedlichen Leistungskollektive zeigte durchaus Unterschiede in der Höhe der detektierten anti-EBV IgG-Titer. Allerdings war die Größe der getesteten Kollektive zu heterogen, um statistisch haltbare Analysen anzustellen. Konform zu der eingangs beschriebenen Feststellung vergleichbarer anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden, wurden jedoch in den beiden größten Kollektiven der Skilangläufer (n = 41) und Fußballer (n = 48) im Median vergleichbare EBV-spezifische Antikörpertiter wie bei den Kontrollprobanden detektiert. Größere einzelne Trainingskollektive könnten hier genauere Analysen ermöglichen. Für die Validierung der EBV-spezifischen Immunantwort als ein möglicher Biomarker für den allgemeinen Immunstatus war es zudem nötig, ein möglichst breites und damit auch heterogenes Kollektiv zu testen.

Die im Rahmen dieser Studie vorgenommene Einteilung der einzelnen Trainingskollektive in interdisziplinäre Sportartprofile (Ausdauer, Kraft-Ausdauer, Spilsport und Sonstige Sportartprofile) entspricht einer Unterteilung aufgrund verschiedener Anforderungs- bzw. Belastungsprofile. Hinsichtlich der Höhe der anti-EBV IgG-Titer wurde in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen den vier verschiedenen Sportartprofilen detektiert. In dem vorliegenden Kollektiv der Nachwuchsleistungssportler lagen, den Trainingsumfang betreffend, keine gravierenden Unterschiede zwischen den einzelnen Sportgruppen vor. Vielmehr ist gemäß den Leitlinien zur Weiterentwicklung des Nachwuchsleistungssports ("Deutscher Sportbund Bereich Leistungssport; Nachwuchsleistungssport-Konzept 2012. Leitlinien zur Weiterentwicklung des Nachwuchsleistungssports.", 2006) davon auszugehen, dass in dieser Altersgruppe ein gewisser Grundstein an Ausdauer und speziellen Fertigkeiten gelegt wird, um den späteren Anforderungen des Hochleistungssports gewachsen zu sein.

Zusammenfassend wurden während der vorliegenden Studie signifikant höhere anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Wettkampfphase verglichen mit der Intensivierungsphase detektiert. Ebenso war die Höhe der anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Wettkampfphase im Vergleich zu den Kontrollprobanden signifikant erhöht. Ob diese Beobachtungen allein durch die psychische und physische Belastung des Hochleistungssports und einer daraus resultierenden immunschwächenden Wirkung zu begründen sind, konnte durch diese vorliegende Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Da in Bezug auf die CMI kein Unterschied in der Anzahl an IFN- γ sekretierenden Zellen zwischen den einzelnen Belastungsphasen der Nachwuchsleistungssportler und verglichen mit den Kontrollprobanden detektiert werden konnte, scheint es so zu sein, dass in dem vorliegenden Kollektiv nicht von einer grundlegenden Einschränkung der EBV-spezifischen Immunantwort als Auswirkung des Hochleistungssports auszugehen ist. Folglich sollte die Bestimmung von anti-EBV IgG-Titern in dem vorliegenden Kollektiv nicht separat als Biomarker für den allgemeinen Immunstatus eines Nachwuchsleistungssportlers verwendet werden. Um diesen Beobachtungen konkreter nachzugehen, sollte in zukünftigen Studien das Kollektiv hinsichtlich der Analyse der EBV-spezifischen CMI erweitert werden, um einen direkten und statistisch validen Vergleich zwischen den Ergebnissen der Bestimmung der anti-EBV IgG-Titer und der EBV-spezifischen CMI zu ermöglichen.

4.3 Nachweis der Epstein-Barr Virus-Last in beiden Kohorten

In 16 bzw. 3 % aller EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler bzw. Kontrollprobanden war während der vierjährigen Studiendauer eine EBV-Last nachweisbar, die sich in ihrer Höhe nicht signifikant zwischen den beiden Kohorten unterschied. Der Nachweis einer medianen EBV-Last von 1,99 bzw. 1,59 Geq/10⁵ PBMC in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler bzw. Kontrollprobanden ist vergleichbar mit Werten von weniger als 5 Geq/10⁵ PBMC, die andere Autoren von gesunden, immunkompetenten EBV-Trägern berichteten (Babcock, Decker, Freeman, & Thorley-Lawson, 1999; Gartner et al., 2000; Kimura et al., 1999). Eine Begründung für den deutlich höheren Anteil an EBV-Last positiven Nachwuchsleistungssportlern könnte sein, dass aufgrund der mit bis zu elf Blutentnahmen pro Proband viel zahlreicheren Einzelerhebungen in der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler, eine deutlich größere Wahrscheinlichkeit vorlag, auf einen Probanden mit einer nachweisbaren EBV-Last zu stoßen.

Die Mehrheit der Nachwuchsleistungssportler mit einer nachweisbaren EBV-Last hatte den Status einer abgelaufenen EBV-Infektion (73 %). Der Anteil der Nachwuchsleistungssportler mit einer EBV-Primärinfektion (12 %) oder -Reaktivierung (15 %) war allerdings deutlich höher, als im gesamten Kollektiv der EBV-seropositiven Nachwuchsleistungssportler. Es gibt zahlreiche

Studien, die von einer Korrelation der Höhe der EBV-Last und dem Vorliegen einer symptomatischen EBV-Primärinfektion oder -Reaktivierung berichten (Lay et al., 2010; Vogl et al., 2012; Vouloumanou et al., 2012). Im vorliegenden Kollektiv hatten die Nachwuchsleistungssportler mit einer detektierbaren EBV-Last und gleichzeitig vorliegender EBV-Primärinfektion konform dazu eine höhere Anzahl an Genomäquivalenten/ 10^5 PBMC als die Nachwuchsleistungssportler mit einer abgelaufenen EBV-Infektion. Bei diesen Probanden wurde allerdings von Seiten der Sportmedizin in keinem Fall von symptomatisch schweren oder langandauernden Verläufen berichtet. Die Nachwuchsleistungssportler mit einer EBV-Reaktivierung hatten im Gegensatz dazu eine geringere mediane EBV-Last, als die Nachwuchsleistungssportler mit einer abgelaufenen EBV-Infektion.

Da in dieser Arbeit insgesamt kein signifikanter Unterschied in der Höhe der EBV-Last zwischen beiden Kohorten detektiert werden konnte, scheint die häufigere Detektion einer EBV-Last bei Nachwuchsleistungssportlern in der häufigeren Viruslast-Bestimmung, im Vergleich zum Kontrollkollektiv, begründet zu sein. Die Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports auf die EBV-spezifische Immunantwort konnte anhand der Bestimmung der EBV-Last, in diesem vorliegenden Kollektiv, nicht belegt werden. Folglich ist die alleinige Bestimmung der EBV-Last kein geeigneter Biomarker für die Bewertung des allgemeinen Immunstatus von Nachwuchsleistungssportlern.

4.4 Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Ein wesentlicher Bestandteil dieser vorliegenden Arbeit war neben der Bestimmung der diagnostisch-serologischen EBV-spezifischen Parameter, die Analyse der zellvermittelten EBV-spezifischen Immunantworten. Entsprechend dem Studienprotokoll und Ethikantrag stand von den Probanden beider Kohorten nur begrenzt Probenmaterial zur Verfügung. Deswegen galt es für die Bestimmung und Analyse der CMI initial die für die Fragestellung effektivste Assay-Methode auszuwählen. Aufgrund des begrenzt vorhandenen Probenmaterials und der breiten und robusten Anwendung des Assays als „Goldstandard“ für die Detektion von CMI im Feld der Virusinfektions-, Impfstoff- und Krebsforschung, fiel die Entscheidung auf eine ELISpot-basierte Methode (J. H. Cox, Ferrari, & Janetzki, 2006; P. V. Lehmann & Zhang, 2012; Slota, Lim, Dang, & Disis, 2011). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine polyfunktionale zellvermittelte Immunantwort, besser mit einer Viruskontrolle korreliert, als monofunktionale Virus-spezifische Immunantworten (Betts et al., 2006; Caccamo et al., 2010; Duvall et al., 2008; Harari et al., 2006; Harari, Petitpierre, Vallelian, & Pantaleo, 2004; Harari, Vallelian, Meylan, & Pantaleo, 2005; Younes et al., 2003; Zimmerli et al., 2005). Aus diesem Grund wurde die verhältnismäßig neue Methode des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays für die Bestimmung der EBV-spezifischen CMI ausgewählt. Dieser Assay stellt eine Weiterentwicklung des ELISpot Assays dar und beruht auf

der Verwendung von Fluorochrom-markierten Antikörpern zur Detektion von sekretierten Zytokinen, womit eine simultane Bestimmung von IFN- γ - und IL-2-sekretierenden Zellen ermöglicht wird (Gazagne et al., 2003; Janetzki, Rueger, & Dillenbeck, 2014). Im Vergleich zu Durchflusszytometrie-basierten Assays ist die Methode des FluoroSpot Assays weniger zeitintensiv und kann zudem leichter standardisiert und validiert werden. Bisher hat die Methode des FluoroSpot Assays noch keine breite Anwendung zur Detektion von CMI gefunden, was sich in der bis dato geringen Anzahl von lediglich 34, mit der wissenschaftlichen Suchmaschine PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) gefundenen Publikationen, widerspiegelt. Des Weiteren ist aus speziellen Programmen (sogenannten „Proficiency Panels“) bekannt, dass es zu erheblichen Abweichungen der detektierten ELISpot-Ergebnisse kommen kann, wenn verschiedene Labore den gleichen Assay mit den gleichen Ausgangsmaterialien durchführen (J. H. Cox et al., 2005; Janetzki et al., 2008). Aus oben genannten Gründen und der Tatsache, dass dieser IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay in unserem Labor bisher nicht angewendet wurde, ergab sich die Notwendigkeit einer umfassenden Etablierung und Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays.

4.4.1 Festlegung geeigneter Stimulatorantigene für den Nachweis EBV-spezifischer CMI

Eine zentrale Fragestellung bei der Etablierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays war die Festlegung der Stimulatorantigene für die *in vitro* Restimulation von PBMC. Zahlreiche Publikationen berichteten über die unterschiedliche Immunogenität verschiedener EBV-Proteine bzw. Epitope (Hislop et al., 2007; Hoffmeister et al., 2003; Maecker, Ghanekar, et al., 2001; Tischer et al., 2014). Im Rahmen dieser Arbeit sollte in einer breiten Kohorte HLA-unabhängig die zellvermittelte EBV-spezifische Immunantwort bestimmt werden. Aufgrund der Erkenntnisse aus der Literatur und der Testung verschiedener EBV-Proteine in der Arbeitsgruppe AG Klinische Kooperationsgruppe „Immunmonitoring“ (Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München), fiel die Auswahl auf Peptidpools der beiden EBV-Proteine BZLF-1 und EBNA-3a. Für beide Antigene war bekannt, dass sie in einer Vielzahl von EBV-seropositiven Probanden sowohl CD4, als auch CD8 T-Zellantworten hervorrufen (Hislop et al., 2007; Ning et al., 2011). Zudem wurde mit der Auswahl von BZLF-1 und EBNA-3a jeweils ein Antigen des lytischen und des latenten Antigen-Spektrums des EBV-Infektionszyklus verwendet (Hislop et al., 2007; Taylor et al., 2015).

Da exogene Antigene, wie z.B. Proteine über den MHC-Klasse-II Weg aufgenommen, prozessiert und somit fast ausschließlich CD4 T-Zellen präsentiert werden, sind sie nicht in der Lage CD8 T-Zellantworten hervorzurufen (Murphy, Travers, & Walport, 2007). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit, für die *in vitro* Restimulation von PBMC, sogenannte überlappende Peptidpools mit einer Länge von je 15 Aminosäuren (AS) verwendet, die jeweils

die komplette Sequenz der beiden EBV-Proteine BZLF-1 und EBNA-3a beinhalten. Durch die Überlappung der Einzelpeptide um 11 AS ist ein großes Spektrum an potenziell immunogenen Epitopen eines Proteins im Peptidpool abgedeckt (Han et al., 2009). Die Peptide dieser Pools werden nicht intrazellulär prozessiert, sondern binden, vermutlich durch eine Art Verdrängungsreaktion, direkt an auf der Zelloberfläche von APC befindliche MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle und werden somit CD4- und CD8 T-Zellen präsentiert (Maecker, Dunn, et al., 2001). Die Antigenpezifität des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays konnte mit den verwendeten EBV-Peptidpools belegt werden.

4.4.2 Bestimmung des Detektionslimits, der Nachweisgrenzen, der Linearität und der Präzision des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays

Die Validierung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays erfolgte nach den allgemein anerkannten Richtlinien der Assay Validierung und beinhaltete die Festlegung des Detektionslimits, der unteren und oberen Nachweisgrenze des Assays und den Nachweis der Linearität und der Präzision der detektierten Ergebnisse (Butterfield et al., 2011).

Die Evaluierung der Detektionsgrenzen ist entscheidend, um die Parameter für eine akzeptable, positive Immunantwort festzulegen (Lathey, 2003). Das Detektionslimit des ELI-/FluoroSpot Assays liegt bei einer detektierbaren spezifischen Zelle aus 100.000 Zellen. (Asai, Storkus, & Whiteside, 2000). Allerdings zeigten die in dieser Arbeit detektierten Zahlen an spezifischen IFN- γ und IL-2 sekretierten Zellen im Bereich des Detektionslimits sehr hohe Variationskoeffizienten. Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) stellt die unterste Konzentration, welche mit höchster Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann dar. Für den IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay wurde in dieser Arbeit ein Detektionslimit von 0,005 %, was auch dem Wert von früheren ELISpot- und ICS-Validierungen entspricht (Moodie et al., 2010), gesetzt. Der Nachweis der Linearität eines Assays ist ein wichtiger Bestandteil der Validierung eines zellbasierten Assays (Maecker et al., 2008). Der in dieser Arbeit verwendete IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay zeigte eine hohe Linearität. Folglich kann unter bestimmten Umständen die eingesetzte Zellzahl pro *well* reduziert werden, sofern ein ausreichend großer Zell-Zell-Kontakt mit z.B. Antigen-präsentierenden Zellen sichergestellt werden kann und die Anzahl an detektierten SFC nicht unter dem Detektionslimit liegt.

Weiter wurde in dieser Arbeit die Intra-, Inter- und Inter-Day-Assay Präzision, also der Nachweis der Exaktheit und Reproduzierbarkeit der mit dem IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays erzielten Ergebnisse untersucht und erbracht. Es konnte belegt werden, dass der FluoroSpot Assay valide und vergleichbare Ergebnisse liefert, auch wenn die IFN- γ und IL-2 Zytokinsekretion unter Verwendung verschiedener Assay-Platten bzw. an verschiedenen Tagen bestimmt wurde. Der Intra-, Inter- und Inter-Day-Assay Variationskoeffizient des verwendeten IFN- γ /IL-2

FluoroSpot Assays lag jeweils deutlich unterhalb des von der Industrie verwendeten Grenzwertes von 20 % für den CV im Rahmen von Assay-Validierungen. Nichtsdestotrotz wurde die Bestimmung der CMI der Nachwuchsleistungssportler während der verschiedenen Belastungsphasen in einer Assay-Platte vorgenommen, um die Variabilität der Ergebnisse möglichst gering zu halten.

Die diagnostische Spezifität und Sensitivität, deren Erfüllung als Grundlage für die Verwendung eines Assays in klinischen Studien gilt, wurde für die Detektion von EBV-spezifischen Immunantworten unter Verwendung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays in dieser Arbeit belegt.

4.4.3 Vergleichbarkeit der detektierten Ergebnisse des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays und dem IFN- γ - und IL-2 ELISpot Assay

Abschließend wurde geprüft, inwieweit die detektierten Ergebnisse des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays mit den detektierten IFN- γ und IL-2 CMI enzymatischer ELISpot Assays vergleichbar sind. Aufgrund der Tatsache, dass beim Vergleich der beiden Assay-Methoden niemals der „wahre“ Messwert bekannt war, konnte hier keine Aussage getroffen werden, welche der beiden Methoden die richtigen Werte lieferte (Grouven et al., 2007). Statistisch gesehen ist für die Beurteilung der Übereinstimmung von zwei unabhängigen Messmethoden die Berücksichtigung der durchschnittlichen Differenz der Messwerte allein nicht ausreichend (Grouven et al., 2007). Aussagekräftiger ist die Betrachtung der Streuung der Differenzen der einzelnen Messwertepaare der beiden Assay Methoden (Grouven et al., 2007). Das sogenannte Bland-Altman Diagramm (Bland & Altman, 1986) ist ein graphisches Verfahren, das die Verzerrung und die Streuung der Daten berücksichtigt und eine Beurteilung der Höhe und der Muster der Abweichungen zwischen den Messmethoden zulässt. Die anhand der Bland-Altman Methode ermittelten Übereinstimmungsgrenzen können nach Grouven et al. an Gültigkeit verlieren, wenn die Differenzen zwischen den Messmethoden systematische Veränderungen zeigen (Grouven et al., 2007). In Bezug auf den ELISpot und FluoroSpot Assay ist in diesem Zusammenhang jedoch nicht von einer zwingenden Erhöhung der Differenzen auszugehen, wenn die Höhe der Messwerte, in dem Fall die Anzahl der Zytokin-sekretierenden Zellen, steigt. Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurde eine hohe Vergleichbarkeit der detektierten Anzahl an IFN- γ und IL-2 SFC beider Assay-Methoden festgestellt. Somit kann für zukünftige Studien in Betracht gezogen werden, die Methode des ELISpot Assays durch den FluoroSpot Assay zu ersetzen. Aufgrund der hohen Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Methoden ist zusätzlich vorstellbar, dass in Folgestudien, der FluoroSpot Assay zur Detektion von CMI eingesetzt wird und die erhaltenen Ergebnisse mit bereits bekannten ELISpot-basierten Ergebnissen früherer Studien verglichen werden können. Eine breite Anwendung des FluoroSpot Assays in klinischen Studien könnte folglich einen deutlichen Mehrwert des erhaltenen Ergebnisspektrums

bedeuten. Mit Hilfe des FluoroSpot Assays könnten polyfunktionale Immunantworten bestimmt werden und die daraus erhaltenen Ergebnisse sind trotzdem mit IFN- γ ELISpot-basierten Ergebnissen früherer Studien vergleichbar. Die alternativ zum ELISpot/FluoroSpot Assay eingesetzte Durchflusszytometrie-basierte Bestimmung von polyfunktionalen Immunantworten ist im Gegensatz dazu nicht vergleichbar, da diese Methode lediglich die Produktion, nicht aber die Sekretion eines Zytokins, wie im ELISpot-Verfahren gemessen, detektiert (Vogl et al., 2012). Vor kurzem wurde von Seiten verschiedener Herstellerfirmen eine nächste Generation von FluoroSpot Assays auf den Markt gebracht, die durch die Verwendung von drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen die simultane Detektion von drei Zytokinen ermöglicht. Diese Weiterentwicklung des FluoroSpot Assays stellt somit eine adäquate Alternative zur Durchflusszytometrie-basierten Bestimmung von polyfunktionalen Immunantworten dar, die mit weniger Probenmaterial auskommt und zudem zeitsparender in der Auswertearbeit ist.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit belegt, dass der verwendete IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay nach eingehender Etablierung und Validierung für das Monitoring von zellvermittelten EBV-spezifischen IFN- γ und IL-2 Immunantworten in der Kohorte der Nachwuchsleistungswissenschaftler und Kontrollprobanden eingesetzt werden konnte.

4.5 Analyse der zellvermittelten EBV-spezifischen Immunantworten

Zusätzlich zu den diagnostisch-serologischen EBV-spezifischen Parametern wurde in dieser Arbeit auch die zellvermittelte EBV-spezifische Immunantwort unter Verwendung des validierten IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays bestimmt. Es ist bekannt, dass neben der humoralen Immunantwort vor allem die zellvermittelte antivirale Immunantwort eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von persistierenden Virusinfektionen einnimmt (Bunde et al., 2005; Hislop et al., 2007; Klenerman & Hill, 2005; A. B. Rickinson et al., 2014; Sester et al., 2001; Vogl et al., 2012). Unter Verwendung des IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assays konnte in dieser Arbeit in einem ausgewählten Kollektiv überprüft werden, ob die EBV-spezifische CMI durch die Belastungen des Hochleistungssports bei Nachwuchsleistungssportlern beeinflusst wurde.

4.5.1 Vergleich der Quantität der detektierten EBV-spezifischen CMI von Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden

Mit der zuvor beschriebenen Auswahl der EBV-Peptidpools BZLF-1 und EBNA-3a als Stimulatorantigene, konnten in einer ausreichend großen Anzahl von Probanden beider Kohorten EBV-spezifische IFN- γ sekretierende Zellen detektiert werden, um statistische Vergleiche vorzunehmen. Hierbei zeigte sich für beide Stimulatorantigene kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an detektierten IFN- γ SFC zwischen der Gruppe der

Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden. EBV-spezifische IL-2 SFC konnten nur in wenigen Nachwuchsleistungssportlern und Kontrollprobanden detektiert werden. In der Gruppe der Kontrollprobanden konnte eine tendenziell, aber nicht signifikant höhere Anzahl an IL-2 sekretierenden Zellen, verglichen mit der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler, detektiert werden. Eine mögliche Folge der geringeren Anzahl an EBV-spezifischen IL-2 sekretierenden Zellen der Nachwuchsleistungssportler, könnte eine verminderte Proliferationskapazität der EBV-spezifischen CMI in Nachwuchsleistungssportlern sein, welche eine verminderte Kontrolle der EBV-Infektion zur Folge haben könnte (Harari et al., 2005). Aufgrund der geringen Anzahl an Probanden mit EBV-reaktiven IL-2 sekretierenden Zellen sind diese Ergebnisse allerdings mit Vorbehalt zu sehen, da größere Fallzahlen nötig wären, um eine valide Aussage zu treffen.

4.5.2 Quantität der EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war die Analyse und Beurteilung der EBV-spezifischen CMI der Nachwuchsleistungssportler während verschiedener Belastungsphasen. Hierbei zeigte sich für BZLF-1- und EBNA-3a-spezifische CMI kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an detektierten IFN- γ und IL-2 SFC, sowohl zwischen den einzelnen Belastungsphasen, als auch im Vergleich der Belastungsphasen mit den Kontrollprobanden. Wie bereits zuvor diskutiert, spiegeln sich die während der Wettkampfphase beobachteten erhöhten anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler nicht in den detektierten EBV-spezifischen CMI wider. Geht man als Ursache für den Anstieg der anti-EBV IgG-Titer von einer vermehrt stattfindenden EBV-Replikation aufgrund einer geschwächten EBV-spezifischen CMI aus, so müsste das eigentlich in verminderten EBV-spezifischen CMI während der Wettkampfphase zu sehen gewesen sein. Die Anzahl der detektierten BZLF-1- und EBNA-3a-spezifischen IFN- γ SFC zeigte jedoch keinen deutlichen Unterschied während der verschiedenen Belastungsphasen der Nachwuchsleistungssportler. Die Anzahl an detektierten BZLF-1- und EBNA-3a-spezifischen IL-2 SFC war jedoch jeweils während der Wettkampfphase tendenziell, aber nicht signifikant niedriger als während der beiden anderen Phasen.

Da nicht bei allen Nachwuchsleistungssportlern, deren Ergebnisse in die Analyse der EBV-spezifischen Antikörpertiter einfließen, parallel dazu auch die EBV-spezifische CMI während der verschiedenen Belastungsphasen bestimmt wurde, sind die Ergebnisse der Bestimmung der EBV-spezifischen Antikörpertiter und der CMI nicht direkt in Korrelation zu setzen. Andererseits wäre denkbar, dass eine leicht geschwächte EBV-spezifische CMI aufgrund der Belastungen während der Wettkampfphase vorgelegen hat, welche sich in der verminderten Anzahl an EBV-spezifischen IL-2 sekretierenden Zellen gezeigt hat. Diese möglicherweise geschwächte EBV-spezifische CMI während der Wettkampfphase, war eventuell nicht deutlich genug, um signifikante Unterschiede zu erbringen, könnte aber nichtsdestotrotz ausgereicht

haben, um eine erhöhte EBV-Vermehrung und in Folge erhöhte anti-EBV IgG-Titer während der Wettkampfphase verursacht zu haben (Vogl et al., 2012). Um eine umfassendere Aussage hierzu treffen zu können, sollten in zukünftigen Studien die anti-EBV IgG-Titer und die EBV-spezifische CMI parallel und während verschiedener Belastungsphasen in einem ausreichend großen Kollektiv bestimmt werden.

4.5.3 Qualität der detektierten EBV-spezifischen CMI

Aufgrund der in dieser Arbeit geringen Anzahl an detektierten IL-2 SFC war die EBV-spezifische CMI in beiden Kohorten weitgehend von monofunktionalen IFN- γ sekretierenden Zellen dominiert, welche der Subpopulation der voll differenzierten Effektor-Gedächtnis T-Zellen (T_{EM} ; *effector memory T cells*) zugeordnet werden können (Harari, Vallelian, & Pantaleo, 2004; Pantaleo & Harari, 2006). Erwartungsgemäß zeigte sich auch beim differenzierten Vergleich der monofunktionalen EBV-spezifischen IFN- γ Immunantworten kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden.

Detektierte IL-2 sekretierende EBV-spezifische Zellen hatten in beiden Kohorten zumeist ein bifunktionales Profil und sekretierten zusätzlich IFN- γ . Doppelt-positive IFN- γ +IL-2 sekretierende Zellen gehören ebenfalls der Subpopulation der Effektor-Gedächtnis T-Zellen an (Pantaleo & Harari, 2006; Zimmerli et al., 2005). Die Autoren postulierten, dass diese IFN- γ +IL-2 sekretierenden Zellen möglicherweise eine Übergangspopulation von zentralen Gedächtnis T-Zellen (T_{CM} ; *central memory T cells*) in Effektor-Gedächtnis T-Zellen (T_{EM}) darstellen (Harari et al., 2005). Die Fähigkeit der IL-2 Produktion gibt diesen Zellen die Möglichkeit zu expandieren und durch IFN- γ Produktion in monofunktionale IFN- γ produzierende T_{EM} zu reifen (Harari et al., 2005).

Monofunktionale IL-2 sekretierende Zellen, welche zum zentralen Gedächtnis T-Zellkompartiment gezählt werden, konnten bei keinem Nachwuchsleistungssportler und lediglich zwei Kontrollprobanden detektiert werden (Pantaleo & Harari, 2006). Harari et al. detektierten monofunktionale IL-2 produzierende CD4 T-Zellen im Zusammenhang von ausgeheilten Virusinfektionen, nach denen kein Antigen mehr vorliegt (Harari et al., 2005). Diese monofunktionalen IL-2 sekretierenden Zellen gehören der Population der langlebenden Gedächtnis-Zellen an, die über Jahre hinweg nach einer überstandenen Virusinfektion persistieren (Harari et al., 2005). Lelic et al. zeigten, dass die Virus-spezifische CD8 T-Zellantwort in persistierenden Virusinfektionen multifunktional ist und sie detektierten keine CD8 T-Zellen die nur IL-2 produzierten (Lelic et al., 2012). Ning et al. hingegen detektierten monofunktionale IL-2 produzierende BZLF-1 spezifische CD4 und CD8 T-Zellantworten in einer Kohorte von gesunden EBV-seropositiven Probanden (Ning et al., 2011). Inwieweit die in der vorliegenden Arbeit detektierten Ergebnisse die Beobachtung von Lelic et al. bestätigen, kann

mit der verwendeten Methode des FluoroSpot-Assays nicht verifiziert werden, da hiermit keine Unterscheidung von CD4- und CD8 T-Zellen möglich ist (Lelic et al., 2012).

Eine Bestimmung der EBV-spezifischen CMI bei einzelnen Probanden, nach dem Auftreten einer EBV-Reaktivierung und im weiteren zeitlichen Verlauf, hätte hier weitere Erkenntnisse liefern können. Der Literatur folgend hätte bei diesen Probanden im Vergleich zum Status einer abgelaufenen EBV-Infektion eine Verschiebung von einer multifunktionalen hin zu einer IFN- γ dominierten CMI detektiert werden müssen (Doherty & Christensen, 2000; Pantaleo & Harari, 2006; Sprent & Surh, 2002). Lediglich ein Nachwuchssportler, bei dem die EBV-spezifische CMI bestimmt wurde, hatte den Status einer EBV-Reaktivierung während zwei der drei verschiedenen Belastungsphasen. Hier zeigte sich jedoch kein deutlicher Unterschied in der Anzahl und dem funktionalen Profil der detektierten EBV-spezifischen CMI in Abhängigkeit vom EBV-Serostatus.

Zusammenfassend entsprach das in dieser Arbeit detektierte Zytokin-Expressionsprofil der zellulären EBV-spezifischen Immunantwort der Probanden beider Kohorten im Wesentlichen den in anderen Studien beobachteten Profilen der CMI gegen persistierende Virusinfektionen, welche durch ein ständiges Vorhandensein von sehr geringen Antigenmengen gekennzeichnet sind (Fafi-Kremer et al., 2005; Harari et al., 2005; Ning et al., 2011; Pantaleo & Harari, 2006).

4.5.4 Beurteilung der Auswahl der Stimulatorantigene und der Assay-Methode hinsichtlich der Detektion von EBV-spezifischen CMI

Kritisch betrachtet bleibt bezüglich dieser Studie die Frage, ob mit der verwendeten Assay-Methode und den eingesetzten Stimulatorantigenen eine ausreichend hohe Aussagekraft aufgrund der erzielten Ergebnisse vorlag. Hervorzuheben ist, dass die in dieser Arbeit vorgenommene Analyse der EBV-spezifischen CMI mit dem IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay, trotz des geringen zur Verfügung stehenden Probenmaterials eine Erhöhung des Ergebnisumfangs, verglichen mit der Verwendung eines ELISpot-basierten IFN- γ Assays, ermöglichte. Des Weiteren postulierten Pantaleo et al., dass die Bestimmung von IFN- γ und IL-2 CMI als das nötige Minimum an analysierten T-Zellfunktionen für das klinische Monitoren von Virus-assoziierten Krankheiten ausreicht (Pantaleo & Harari, 2006).

Ein Grund für die fehlende Detektion von EBV-spezifischen CMI in einem Teil der getesteten Probanden könnte sein, dass ein Teil der EBV-spezifischen CMI nicht auf der Produktion und Sekretion von IFN- γ basiert, wie es Ning et al. in ihrer Arbeit bereits beschrieben haben (Ning et al., 2011). Aufgrund der geringen Anzahl an detektierten IL-2 sekretierenden EBV-spezifischen Zellen in nur wenigen Probanden beider Kohorten ist anzunehmen, dass ein Teil der in den Probanden vorhandenen EBV-spezifischen Immunantworten mit den gewählten

Stimulatorantigenen und dem IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay nicht detektiert werden konnte. Alternativ zu IL-2 wäre die Bestimmung der Anzahl an EBV-spezifischen TNF- α sekretierenden Zellen denkbar. Ning et al. detektierten in einer Kohorte von gesunden EBV-seropositiven Probanden BZLF-1 und EBNA-3a spezifische TNF- α T-Zellantworten (Ning et al., 2011). Das Zytokin-Expressionsprofil betrachtend, wurden hierbei für polyfunktionale CD4 T-Zellantworten IFN- γ , IL-2 und TNF- α und für polyfunktionale CD8 T-Zellantworten IFN- γ , TNF- α und IL-2 in absteigender Hierarchie detektiert (Ning et al., 2011). Bei ausreichend vorhandenem Probenmaterial, wäre sicherlich die Verwendung einer Durchflusszytometrie-basierten Methode, verbunden mit der Analyse von IFN- γ , TNF- α und IL-2 Immunantworten alternativ zum FluoroSpot interessant gewesen. Ein seit kurzem auf dem Markt befindlicher dreifarbiger IFN- γ / IL-2 / TNF- α FluoroSpot Assay, könnte aufgrund der Bedeutung der Polyfunktionalität von zellulären Immunantworten bei der Kontrolle von Virusinfektionen und aufgrund der Eignung des FluoroSpot Assays als *high-throughput* Assay, eine interessante Alternative zur intrazellulären Durchflusszytometrie in zukünftigen klinischen Studien darstellen (Betts et al., 2006; Makedonas & Betts, 2006).

Neben der Assay-Methode ist auch die Auswahl der für die *in vitro* Restimulation und Detektion von EBV-spezifischen Immunzellen eingesetzten Stimulatorantigene entscheidend. Die Verwendung von immunogenen, auf den HLA-Typ des Probanden passenden Peptide bzw. Epitope einzelner EBV-Proteine, würde sicherlich die Sensitivität der Detektion EBV-spezifischer CMI in beiden Kohorten erhöhen (Currier et al., 2002; Khanna & Burrows, 2000). Ning et al. fanden in diesem Kontext bei der Analyse von EBV-spezifischen T-Zellantworten in gesunden EBV-seropositiven Probanden heraus, dass die *in vitro* Restimulation mit immundominanten EBV-Proteinen einen größeren Anteil an polyfunktionalen T-Zellantworten hervorruft als eine Restimulation mit subdominanten EBV-Proteinen (Ning et al., 2011). Allerdings umfasste der dieser Arbeit zugrundeliegende Ethikantrag nicht die HLA-Typisierung der Probanden und der Erwerb vieler verschiedener Einzelpeptide wäre mit erheblichen Kosten verbunden gewesen. Inwieweit die in dieser Arbeit verwendeten Peptidpools der EBV-Proteine BZLF-1 und EBNA-3a in dem getesteten Kollektiv immundominant bzw. subdominant waren, lässt sich nicht eindeutig klären. Verschiedene Arbeiten zeigten jedoch, dass beide verwendeten EBV-Peptidpools sowohl CD4, als auch CD8 T-Zellantworten in einem breiten Spektrum von Probanden hervorrufen können (Hislop et al., 2007; Ning et al., 2011).

Als Alternative zu Peptidpools einzelner EBV-Proteine, könnten auch rekombinante EBV-Proteine für die *in vitro* Restimulation von PBMC verwendet werden. Allerdings ist bekannt, dass exogene Antigene über den MHC-Klasse-II-Weg aufgenommen, prozessiert und Zellen präsentiert werden und somit nicht in der Lage sind CD8 T-Zellantworten hervorzurufen (Murphy et al., 2007). Folglich hätte die Verwendung von EBV-Proteinen als Stimulatorantigene

eine weitere Einschränkung in der Ergebnistiefe im Vergleich zur Verwendung von EBV-Peptidpools bedeutet.

Kürzlich wurden innovative Stimulatorantigene (*T-activated[®] proteins*) in Kooperation mit der Lophius Biosciences GmbH (Regensburg) in unserer Arbeitsgruppe, im Rahmen eines durch die bayerische Forschungstiftung geförderten Verbundprojektes („ForBIMed - Biomarker in der Infektionsmedizin“; Teilprojekt D6: „T-Zell Diagnostik zur individuellen Therapie-Steuerung nach Transplantationen“) validiert. Die in diesem Projekt generierten Daten zeigten eine Aufnahme, Prozessierung und Präsentation dieser *T-activated[®] proteins* über den MHC-Klasse-I- (Kreuzpräsentation) und –II –Weg, verbunden mit einer Aktivierung von allen klinisch relevanten Effektorzellen, wie CD4- und CD8 T-Zellen und NK- und NKT-ähnlichen Zellen (N. Körber, U. Behrends, J. Mautner, L. Deml, S. Barabas, U. Protzer, T. Bauer. Arbeitstitel: „*Evaluation of T-activated[®] proteins for monitoring of Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus specific T cells*“, Manuskript in Vorbereitung). Diese neue Technologie von Stimulatorantigenen stellt für zukünftige Studien somit eine gewinnbringende Alternative der *in vitro* Restimulation von Immunzellen dar, welche die Funktion der APC bei der Analyse von Virus-spezifischen Immunantworten berücksichtigt.

Zusammenfassend spiegeln die detektierten Ergebnisse der EBV-spezifischen CMI die zuvor gemachten Beobachtungen vergleichbarer anti-EBV IgG-Titer und EBV-Lasten zwischen beiden Kohorten wider. Eine immunschwächende Auswirkung des Hochleistungssports kann somit auch anhand der detektierten EBV-spezifischen CMI nicht bestätigt werden. Zusätzlich sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob die individuelle EBV-spezifische Immunantwort als eine Art funktioneller Biomarker genutzt werden kann, welcher den allgemeinen Immunstatus der Nachwuchsleistungssportler widerspiegelt und somit als Grad der Belastbarkeit in der Praxis genutzt werden kann. Aufgrund der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen an dem vorliegenden Kollektiv, ist davon auszugehen, dass die Detektion und Analyse von EBV-spezifischen CMI mit dem IFN- γ /IL-2 FluoroSpot Assay nicht als Biomarker in diesem Kollektiv verwendet werden kann.

4.6 Verifikation der Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports? – Die EBV-spezifische Immunantwort als ein funktioneller Biomarker für den Grad der Belastbarkeit?

Mit dem hier vorliegenden Studiendesign, der Kollektivgröße und den in dieser Arbeit eingesetzten immunologischen und virologisch-diagnostischen Methoden wurden beste Voraussetzungen geschaffen, um die Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports im Bereich des Nachwuchsleistungssports umfassend zu prüfen, zu beurteilen und zu diskutieren. Vor allem die Analyse der EBV-spezifischen Immunantworten zu verschiedenen Belastungsphasen der Nachwuchsleistungssportler, gab die Möglichkeit, eine tiefgreifende Analyse vorzunehmen und verschiedene Belastungsprofile der Nachwuchsleistungssportler differenziert zu betrachten. Auf den erhaltenen Ergebnissen aufbauend sollte zudem überprüft werden, ob die individuelle EBV-spezifische Immunantwort als funktioneller Biomarker genutzt werden kann, welcher den allgemeinen Immunstatus der Nachwuchsleistungssportler widerspiegelt und somit als Grad der Belastbarkeit in der Praxis genutzt werden kann.

Die in dieser Arbeit detektierten Ergebnisse hinsichtlich der Höhe der EBV-spezifischen IgG-Titer, der EBV-Last und der EBV-spezifischen zellvermittelten Immunantworten waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen der Gruppe der Nachwuchsleistungssportler und Kontrollprobanden. In Bezug auf die verschiedenen Belastungsphasen, wurden signifikant erhöhte anti-EBV IgG-Titer der Nachwuchsleistungssportler während der Wettkampfphase, verglichen mit der Intensivierungsphase und im Vergleich zu den Kontrollprobanden detektiert.

Zusammenfassend wurde in Anbetracht der in dieser Arbeit detektierten und diskutierten Ergebnisse, auf das hier vorliegende Kollektiv von Nachwuchsleistungssportlern bezogen, die Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports auf die EBV-spezifische Immunantwort nicht bestätigt. Darüber hinaus konnte anhand der erhaltenen Ergebnisse nicht bestätigt werden, dass die individuelle EBV-spezifische Immunantwort als funktioneller Biomarker genutzt werden kann, welcher den allgemeinen Immunstatus der Nachwuchsleistungssportler widerspiegelt und somit als Grad der Belastbarkeit in der Praxis genutzt werden kann.

Aufgrund des Studiendesigns, der Kollektivgröße und des erhaltenen Datenumfangs, lieferte diese Arbeit einen in diesem Umfang vermutlich noch nicht vorhandenen Einblick in die Thematik der Auswirkung des Hochleistungssports auf die EBV-spezifische Immunantwort bei Nachwuchsleistungssportlern. Die erhaltenen Ergebnisse und die Nichtbestätigung der

Hypothese einer immunschwächenden Auswirkung des Hochleistungssports auf die EBV-spezifische Immunantwort in dem untersuchten Kollektiv, können darüber hinaus dazu beitragen, die in diesem Zusammenhang auftretenden Unsicherheiten und Spekulationen neu zu beurteilen und zu bewerten.

5 Literaturverzeichnis

- Adhikary, D., Behrends, U., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G. W., & Mautner, J. (2006). Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med*, 203(4), 995-1006.
- Amyes, E., Hatton, C., Montamat-Sicotte, D., Gudgeon, N., Rickinson, A. B., McMichael, A. J., & Callan, M. F. (2003). Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med*, 198(6), 903-911.
- Apcher, S., Daskalogianni, C., Manoury, B., & Fahraeus, R. (2010). Epstein Barr virus-encoded EBNA1 interference with MHC class I antigen presentation reveals a close correlation between mRNA translation initiation and antigen presentation. *PLoS Pathog*, 6(10), e1001151.
- Arend, W. P., Malyak, M., Guthridge, C. J., & Gabay, C. (1998). Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*, 16, 27-55.
- Asai, T., Storkus, W. J., & Whiteside, T. L. (2000). Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon production in cancer patients receiving antitumor vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7(2), 145-154.
- Azzi, T., Lunemann, A., Murer, A., Ueda, S., Beziat, V., Malmberg, K. J., . . . Nadal, D. (2014). Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood*.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B., & Thorley-Lawson, D. A. (1999). Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med*, 190(4), 567-576.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., & Thorley-Lawson, D. A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, 9(3), 395-404.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., . . . et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310(5974), 207-211.
- Balfour, H. H., Jr., Odumade, O. A., Schmeling, D. O., Mullan, B. D., Ed, J. A., Knight, J. A., . . . Hogquist, K. A. (2013). Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *J Infect Dis*, 207(1), 80-88.
- Beltran, B., Salas, R., Quinones, P., Morales, D., Hurtado, F., Cotrina, E., . . . Castillo, J. (2009). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma in a human T-lymphotropic virus type 1 carrier. *Infect Agent Cancer*, 4, 10.
- Benninger-Doring, G., Pepperl, S., Deml, L., Modrow, S., Wolf, H., & Jilg, W. (1999). Frequency of CD8(+) T lymphocytes specific for lytic and latent antigens of Epstein-Barr virus in healthy virus carriers. *Virology*, 264(2), 289-297.
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., . . . Koup, R. A. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, 107(12), 4781-4789.
- Biggin, M., Bodescot, M., Perricaudet, M., & Farrell, P. (1987). Epstein-Barr virus gene expression in P3HR1-superinfected Raji cells. *J Virol*, 61(10), 3120-3132.
- Bihl, F., Frahm, N., Di Giammarino, L., Sidney, J., John, M., Yusim, K., . . . Brander, C. (2006). Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses. *J Immunol*, 176(7), 4094-4101.
- Blake, N., Haigh, T., Shaka'a, G., Croom-Carter, D., & Rickinson, A. (2000). The importance of exogenous antigen in priming the human CD8+ T cell response: lessons from the EBV nuclear antigen EBNA1. *J Immunol*, 165(12), 7078-7087.
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1(8476), 307-310.
- Bunde, T., Kirchner, A., Hoffmeister, B., Habedank, D., Hetzer, R., Cherepnev, G., . . . Kern, F. (2005). Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med*, 201(7), 1031-1036.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*, 46(197), 218-223.

- Burkitt, D., & O'Connor, G. T. (1961). Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer*, *14*, 258-269.
- Burrows, S. R., Khanna, R., Burrows, J. M., & Moss, D. J. (1994). An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J Exp Med*, *179*(4), 1155-1161.
- Butterfield, L. H., Palucka, A. K., Britten, C. M., Dhodapkar, M. V., Hakansson, L., Janetzki, S., . . . Disis, M. L. (2011). Recommendations from the iSBTc-SITC/FDA/NCI Workshop on Immunotherapy Biomarkers. *Clin Cancer Res*, *17*(10), 3064-3076.
- Caccamo, N., Guggino, G., Joosten, S. A., Gelsomino, G., Di Carlo, P., Titone, L., . . . Dieli, F. (2010). Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol*, *40*(8), 2211-2220.
- Callan, M. F., Fazou, C., Yang, H., Rostron, T., Poon, K., Hatton, C., & McMichael, A. J. (2000). CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest*, *106*(10), 1251-1261.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., . . . Rickinson, A. B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med*, *187*(9), 1395-1402.
- Cardin, R. D., Brooks, J. W., Sarawar, S. R., & Doherty, P. C. (1996). Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med*, *184*(3), 863-871.
- Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Bak, K. R., & Luzuriaga, K. (2001). Differential evolution and stability of epitope-specific CD8(+) T cell responses in EBV infection. *J Immunol*, *167*(8), 4450-4457.
- Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Brody, R. M., & Luzuriaga, K. (2002). Phenotypic and functional heterogeneity of EBV epitope-specific CD8+ T cells. *J Immunol*, *168*(8), 4184-4191.
- Chen, M. R. (2011). Epstein-barr virus, the immune system, and associated diseases. *Front Microbiol*, *2*, 5.
- Chesnokova, L. S., & Hutt-Fletcher, L. M. (2014). Epstein-Barr virus infection mechanisms. *Chin J Cancer*, *33*(11), 545-548.
- Chijioko, O., Azzi, T., Nadal, D., & Munz, C. (2013). Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *J Leukoc Biol*, *94*(6), 1185-1190.
- Chijioko, O., Muller, A., Feederle, R., Barros, M. H., Krieg, C., Emmel, V., . . . Munz, C. (2013). Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. *Cell Rep*, *5*(6), 1489-1498.
- Clute, S. C., Watkin, L. B., Cornberg, M., Naumov, Y. N., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., . . . Selin, L. K. (2005). Cross-reactive influenza virus-specific CD8+ T cells contribute to lymphoproliferation in Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis. *J Clin Invest*, *115*(12), 3602-3612.
- Cohen, J. I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, *343*(7), 481-492.
- Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2011). Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol*, *9*(5), 369-381.
- Countryman, J., & Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *82*(12), 4085-4089.
- Cox, A. J., Gleeson, M., Pyne, D. B., Saunders, P. U., Clancy, R. L., & Fricker, P. A. (2004). Valtrex therapy for Epstein-Barr virus reactivation and upper respiratory symptoms in elite runners. *Med Sci Sports Exerc*, *36*(7), 1104-1110.
- Cox, J. H., Ferrari, G., & Janetzki, S. (2006). Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay. *Methods*, *38*(4), 274-282.
- Cox, J. H., Ferrari, G., Kalams, S. A., Lopaczynski, W., Oden, N., & D'Souza M, P. (2005). Results of an ELISPOT proficiency panel conducted in 11 laboratories participating in international human immunodeficiency virus type 1 vaccine trials. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *21*(1), 68-81.

- Currier, J. R., Kuta, E. G., Turk, E., Earhart, L. B., Loomis-Price, L., Janetzki, S., . . . Cox, J. H. (2002). A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J Immunol Methods*, 260(1-2), 157-172.
- Degli-Esposti, M. A., & Smyth, M. J. (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol*, 5(2), 112-124.
- Deutscher Sportbund Bereich Leistungssport; Nachwuchsleistungssport-Konzept 2012. Leitlinien zur Weiterentwicklung des Nachwuchsleistungssports. (2006). Retrieved Accessed 27 November 2015, from https://www.dosb.de/fileadmin/fm-dsb/arbeitsfelder/leistungssport/Konzepte/Nachwuchsleistungssport-Konzept2012_ENDFASSUNG.pdf
- Dierickx, D., Tousseyn, T., & Gheysens, O. (2015). How we diagnose and treat posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood*.
- Doherty, P. C., & Christensen, J. P. (2000). Accessing complexity: the dynamics of virus-specific T cell responses. *Annu Rev Immunol*, 18, 561-592.
- Dukers, D. F., Meij, P., Vervoort, M. B., Vos, W., Scheper, R. J., Meijer, C. J., . . . Middeldorp, J. M. (2000). Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol*, 165(2), 663-670.
- Duvall, M. G., Precopio, M. L., Ambrozak, D. A., Jaye, A., McMichael, A. J., Whittle, H. C., . . . Koup, R. A. (2008). Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol*, 38(2), 350-363.
- Eidenschenk, C., Dunne, J., Jouanguy, E., Fourlinnie, C., Gineau, L., Bacq, D., . . . Feighery, C. (2006). A novel primary immunodeficiency with specific natural-killer cell deficiency maps to the centromeric region of chromosome 8. *Am J Hum Genet*, 78(4), 721-727.
- Enbom, M., Strand, A., Falk, K. I., & Linde, A. (2001). Detection of Epstein-Barr virus, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis*, 28(5), 300-306.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, 1(7335), 702-703.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Brion, J. P., Pavese, P., Baccard, M., Germi, R., . . . Seigneurin, J. M. (2005). Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, 191(6), 985-989.
- Fathallah, I., Parroche, P., Gruffat, H., Zannetti, C., Johansson, H., Yue, J., . . . Hasan, U. A. (2010). EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunol*, 185(11), 6439-6447.
- Faulkner, G. C., Krajewski, A. S., & Crawford, D. H. (2000). The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol*, 8(4), 185-189.
- Fingerroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A., & Fearon, D. T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(14), 4510-4514.
- Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K., & Gosselin, J. (2010). TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 185(6), 3620-3631.
- Fixman, E. D., Hayward, G. S., & Hayward, S. D. (1992). trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol*, 66(8), 5030-5039.
- Fox, C. P., Shannon-Lowe, C., & Rowe, M. (2011). Deciphering the role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of T and NK cell lymphoproliferations. *Herpesviridae*, 2, 8.
- Fry, R. W., Grove, J. R., Morton, A. R., Zeroni, P. M., Gaudieri, S., & Keast, D. (1994). Psychological and immunological correlates of acute overtraining. *Br J Sports Med*, 28(4), 241-246.
- Fry, R. W., Morton, A. R., Crawford, G. P., & Keast, D. (1992). Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 64(3), 218-227.
- Gabriel, H., & Kindermann, W. (1997). The acute immune response to exercise: what does it mean? *Int J Sports Med*, 18 Suppl 1, S28-45.

- Gartner, B. C., Kortmann, K., Schafer, M., Mueller-Lantzsch, N., Sester, U., Kaul, H., & Pees, H. (2000). No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. *J Clin Microbiol*, 38(6), 2458.
- Garzelli, C., Taub, F. E., Scharff, J. E., Prabhakar, B. S., Ginsberg-Fellner, F., & Notkins, A. L. (1984). Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes produce monoclonal autoantibodies that react with antigens in multiple organs. *J Virol*, 52(2), 722-725.
- Gaudreault, E., Fiola, S., Olivier, M., & Gosselin, J. (2007). Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J Virol*, 81(15), 8016-8024.
- Gazagne, A., Claret, E., Wijdenes, J., Yssel, H., Bousquet, F., Levy, E., . . . Tartour, E. (2003). A Fluorospot assay to detect single T lymphocytes simultaneously producing multiple cytokines. *J Immunol Methods*, 283(1-2), 91-98.
- Glaser, R., Friedman, S. B., Smyth, J., Ader, R., Bijur, P., Brunell, P., . . . Toffler, P. (1999). The differential impact of training stress and final examination stress on herpesvirus latency at the United States Military Academy at West Point. *Brain Behav Immun*, 13(3), 240-251.
- Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 243-251.
- Glaser, R., Padgett, D. A., Litsky, M. L., Baiocchi, R. A., Yang, E. V., Chen, M., . . . Williams, M. V. (2005). Stress-associated changes in the steady-state expression of latent Epstein-Barr virus: implications for chronic fatigue syndrome and cancer. *Brain Behav Immun*, 19(2), 91-103.
- Glaser, R., Pearl, D. K., Kiecolt-Glaser, J. K., & Malarkey, W. B. (1994). Plasma cortisol levels and reactivation of latent Epstein-Barr virus in response to examination stress. *Psychoneuroendocrinology*, 19(8), 765-772.
- Gleeson, M. (2006). Immune system adaptation in elite athletes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(6), 659-665.
- Gleeson, M. (2007). Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol*, 103(2), 693-699.
- Gleeson, M., McDonald, W. A., Cripps, A. W., Pyne, D. B., Clancy, R. L., & Fricker, P. A. (1995). The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin Exp Immunol*, 102(1), 210-216.
- Gleeson, M., McDonald, W. A., Pyne, D. B., Cripps, A. W., Francis, J. L., Fricker, P. A., & Clancy, R. L. (1999). Salivary IgA levels and infection risk in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, 31(1), 67-73.
- Gleeson, M., & Pyne, D. B. (2000). Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on mucosal immunity. *Immunol Cell Biol*, 78(5), 536-544.
- Gleeson, M., Pyne, D. B., Austin, J. P., Lynn Francis, J., Clancy, R. L., McDonald, W. A., & Fricker, P. A. (2002). Epstein-Barr virus reactivation and upper-respiratory illness in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, 34(3), 411-417.
- Gonnella, R., Angeloni, A., Calogero, A., Farina, A., Santarelli, R., Gentile, G., . . . Ragona, G. (1997). Transcription of latent and replicative Epstein-Barr-virus genes in bone-marrow and peripheral-blood mononuclear cells of healthy donors. *Int J Cancer*, 70(5), 524-529.
- Gottschalk, S., & Rooney, C. M. (2015). Adoptive T-Cell Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 391, 427-454.
- Grouven, U., Bender, R., Ziegler, A., & Lange, S. (2007). [Comparing methods of measurement]. *Dtsch Med Wochenschr*, 132 Suppl 1, e69-73.
- Guerreiro-Cacais, A. O., Li, L., Donati, D., Bejarano, M. T., Morgan, A., Masucci, M. G., . . . Levitsky, V. (2004). Capacity of Epstein-Barr virus to infect monocytes and inhibit their development into dendritic cells is affected by the cell type supporting virus replication. *J Gen Virol*, 85(Pt 10), 2767-2778.
- Guo, H., Shen, S., Wang, L., & Deng, H. (2010). Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell*, 1(11), 987-998. doi: 10.1007/s13238-010-0120-0
- Han, S., Huang, Y., Liang, Y., Ho, Y., Wang, Y., & Chang, L. J. (2009). Phenotype and functional evaluation of ex vivo generated antigen-specific immune effector cells with potential for therapeutic applications. *J Hematol Oncol*, 2, 34.

- Haque, T., Wilkie, G. M., Jones, M. M., Higgins, C. D., Urquhart, G., Wingate, P., . . . Crawford, D. H. (2007). Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood*, *110*(4), 1123-1131.
- Harari, A., Dutoit, V., Cellerai, C., Bart, P. A., Du Pasquier, R. A., & Pantaleo, G. (2006). Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev*, *211*, 236-254.
- Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F., & Pantaleo, G. (2004). Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood*, *103*(3), 966-972.
- Harari, A., Vallelian, F., Meylan, P. R., & Pantaleo, G. (2005). Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol*, *174*(2), 1037-1045.
- Harari, A., Vallelian, F., & Pantaleo, G. (2004). Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol*, *34*(12), 3525-3533.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., . . . Bloomfield, C. D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, *17*(12), 3835-3849.
- He, C. S., Handzlik, M., Muhamad, A., & Gleeson, M. (2013). Influence of CMV/EBV serostatus on respiratory infection incidence during 4 months of winter training in a student cohort of endurance athletes. *Eur J Appl Physiol*, *113*(10), 2613-2619.
- Heath, G. W., Ford, E. S., Craven, T. E., Macera, C. A., Jackson, K. L., & Pate, R. R. (1991). Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. *Med Sci Sports Exerc*, *23*(2), 152-157.
- Henderson, A., Ripley, S., Heller, M., & Kieff, E. (1983). Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *80*(7), 1987-1991.
- Henle, W., Henle, G., Andersson, J., Ernberg, I., Klein, G., Horwitz, C. A., . . . Straus, S. E. (1987). Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(2), 570-574.
- Heslop, H. E. (2009). How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*, *114*(19), 4002-4008.
- Hislop, A. D., Annels, N. E., Gudgeon, N. H., Leese, A. M., & Rickinson, A. B. (2002). Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med*, *195*(7), 893-905.
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., & Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*, *25*, 587-617.
- Hochberg, D., Middeldorp, J. M., Catalina, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., & Thorley-Lawson, D. A. (2004). Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(1), 239-244.
- Hoffmann, D., Wolfarth, B., Horterer, H. G., Halle, M., Reichhuber, C., Nadas, K., . . . Schatzl, H. M. (2010). Elevated Epstein-Barr virus loads and lower antibody titers in competitive athletes. *J Med Virol*, *82*(3), 446-451.
- Hoffmeister, B., Kiecker, F., Tesfa, L., Volk, H. D., Picker, L. J., & Kern, F. (2003). Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods*, *29*(3), 270-281.
- Hutt-Fletcher, L. M. (2007). Epstein-Barr virus entry. *J Virol*, *81*(15), 7825-7832.
- Iancu, E. M., Gannon, P. O., Laurent, J., Gupta, B., Romero, P., Michielin, O., . . . Rufer, N. (2013). Persistence of EBV Antigen-Specific CD8 T Cell Clonotypes during Homeostatic Immune Reconstitution in Cancer Patients. *PLoS One*, *8*(10), e78686.
- Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., . . . Takada, K. (2009). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med*, *206*(10), 2091-2099.

- James, J. A., Kaufman, K. M., Farris, A. D., Taylor-Albert, E., Lehman, T. J., & Harley, J. B. (1997). An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, *100*(12), 3019-3026.
- James, J. A., Neas, B. R., Moser, K. L., Hall, T., Bruner, G. R., Sestak, A. L., & Harley, J. B. (2001). Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. *Arthritis Rheum*, *44*(5), 1122-1126.
- Janetzki, S., Panageas, K. S., Ben-Porat, L., Boyer, J., Britten, C. M., Clay, T. M., . . . Elispot Proficiency Panel of the, C. V. C. I. A. W. G. (2008). Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother*, *57*(3), 303-315.
- Janetzki, S., Rueger, M., & Dillenbeck, T. (2014). Stepping up ELISpot: Multi-Level Analysis in FluoroSpot Assays. *Cells*, *3*(4), 1102-1115.
- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., . . . Delecluse, H. J. (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol*, *74*(21), 10142-10152.
- Jayasooriya, S., de Silva, T. I., Njie-jobe, J., Sanyang, C., Leese, A. M., Bell, A. I., . . . Flanagan, K. L. (2015). Early virological and immunological events in asymptomatic Epstein-Barr virus infection in African children. *PLoS Pathog*, *11*(3), e1004746.
- Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M. R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., . . . Kieff, E. (2004). Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(46), 16286-16291.
- Kagoya, Y., Hangaishi, A., Takahashi, T., Imai, Y., & Kurokawa, M. (2010). High-dose dexamethasone therapy for severe thrombocytopenia and neutropenia induced by EBV infectious mononucleosis. *Int J Hematol*, *91*(2), 326-327.
- Kapatai, G., & Murray, P. (2007). Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol*, *60*(12), 1342-1349.
- Khan, N., Hislop, A., Gudgeon, N., Cobbold, M., Khanna, R., Nayak, L., . . . Moss, P. A. (2004). Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol*, *173*(12), 7481-7489.
- Khanna, R., & Burrows, S. R. (2000). Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Microbiol*, *54*, 19-48.
- Kimura, H., Ito, Y., Kawabe, S., Gotoh, K., Takahashi, Y., Kojima, S., . . . Nakamura, S. (2012). EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative diseases in nonimmunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood*, *119*(3), 673-686.
- Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., . . . Morishima, T. (1999). Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, *37*(1), 132-136.
- Klarenbeek, P. L., Remmerswaal, E. B., ten Berge, I. J., Doorenspleet, M. E., van Schaik, B. D., Esveldt, R. E., . . . van Lier, R. A. (2012). Deep sequencing of antiviral T-cell responses to HCMV and EBV in humans reveals a stable repertoire that is maintained for many years. *PLoS Pathog*, *8*(9), e1002889.
- Klassen, P.-M., Heinz, B. C., & Siebert, C. H. (2000). Erfahrungen mit dem Epstein-Barr-Virus im Leistungssport: Kann ein kleines Virus die Basketball Bundesliga lahm legen? *DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR SPORTMEDIZIN*, *51*(1), 26-29.
- Klein, G., Lindahl, T., Jondal, M., Leibold, W., Menezes, J., Nilsson, K., & Sundstrom, C. (1974). Continuous lymphoid cell lines with characteristics of B cells (bone-marrow-derived), lacking the Epstein-Barr virus genome and derived from three human lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *71*(8), 3283-3286.
- Klenerman, P., & Hill, A. (2005). T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol*, *6*(9), 873-879.
- Kohut, M. L., & Senchina, D. S. (2004). Reversing age-associated immunosenescence via exercise. *Exerc Immunol Rev*, *10*, 6-41.
- Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, *3*(10), 801-812.

- Kutok, J. L., & Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 375-404.
- Laichalk, L. L., Hochberg, D., Babcock, G. J., Freeman, R. B., & Thorley-Lawson, D. A. (2002). The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity*, 16(5), 745-754.
- Laichalk, L. L., & Thorley-Lawson, D. A. (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol*, 79(2), 1296-1307.
- Lancaster, G. I., Halson, S. L., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., . . . Gleeson, M. (2004). Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev*, 10, 91-106.
- Lancaster, G. I., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., Drayson, M. T., & Gleeson, M. (2005). The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J Physiol*, 563(Pt 3), 945-955.
- Landais, E., Saulquin, X., & Houssaint, E. (2005). The human T cell immune response to Epstein-Barr virus. *Int J Dev Biol*, 49(2-3), 285-292.
- Landais, E., Saulquin, X., Scotet, E., Trautmann, L., Peyrat, M. A., Yates, J. L., . . . Houssaint, E. (2004). Direct killing of Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells by CD4 T cells directed against the EBV lytic protein BHRF1. *Blood*, 103(4), 1408-1416.
- Lang, H. L., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., . . . Fugger, L. (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol*, 3(10), 940-943.
- Lathey, J. (2003). Preliminary Steps Toward Validating a Clinical Bioassay. *BioPharm International*, 16(Issue 3), 42-50.
- Lay, M. L., Lucas, R. M., Ratnamohan, M., Taylor, J., Ponsonby, A. L., Dwyer, D. E., & Ausimmune Investigator, G. (2010). Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye. *Virology*, 7, 252.
- Leen, A., Meij, P., Redchenko, I., Middeldorp, J., Bloemena, E., Rickinson, A., & Blake, N. (2001). Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses. *J Virol*, 75(18), 8649-8659.
- Lehmann, M., Mann, H., Gastmann, U., Keul, J., Vetter, D., Steinacker, J. M., & Haussinger, D. (1996). Unaccustomed high-mileage vs intensity training-related changes in performance and serum amino acid levels. *International Journal of Sports Medicine*, 17(3), 187-192.
- Lehmann, P. V., & Zhang, W. (2012). Unique strengths of ELISPOT for T cell diagnostics. [Review]. *Methods Mol Biol*, 792, 3-23.
- Lelic, A., Verschoor, C. P., Ventresca, M., Parsons, R., Eveleigh, C., Bowdish, D., . . . Bramson, J. L. (2012). The polyfunctionality of human memory CD8+ T cells elicited by acute and chronic virus infections is not influenced by age. *PLoS Pathog*, 8(12), e1003076.
- Leung, C., Chijioke, O., Gujer, C., Chatterjee, B., Antsiferova, O., Landtwing, V., . . . Munz, C. (2013). Infectious diseases in humanized mice. *Eur J Immunol*, 43(9), 2246-2254.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., . . . Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, 375(6533), 685-688.
- Levitsky, V., de Campos-Lima, P. O., Frisan, T., & Masucci, M. G. (1998). The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. *J Immunol*, 161(2), 594-601.
- Levitsky, V., & Masucci, M. G. (2002). Manipulation of immune responses by Epstein-Barr virus. *Virus Res*, 88(1-2), 71-86.
- Li, L., Liu, D., Hutt-Fletcher, L., Morgan, A., Masucci, M. G., & Levitsky, V. (2002). Epstein-Barr virus inhibits the development of dendritic cells by promoting apoptosis of their monocyte precursors in the presence of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood*, 99(10), 3725-3734.
- Li, Q., Turk, S. M., & Hutt-Fletcher, L. M. (1995). The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol*, 69(7), 3987-3994.

- Lim, W. H., Kireta, S., Russ, G. R., & Coates, P. T. (2007). Human plasmacytoid dendritic cells regulate immune responses to Epstein-Barr virus (EBV) infection and delay EBV-related mortality in humanized NOD-SCID mice. *Blood*, *109*(3), 1043-1050.
- Lin, L. I. (1989). A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, *45*(1), 255-268.
- Long, H. M., Chagoury, O. L., Leese, A. M., Ryan, G. B., James, E., Morton, L. T., . . . Rickinson, A. B. (2013). MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J Exp Med*.
- Long, H. M., Haigh, T. A., Gudgeon, N. H., Leen, A. M., Tsang, C. W., Brooks, J., . . . Taylor, G. S. (2005). CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol*, *79*(8), 4896-4907.
- Long, H. M., Leese, A. M., Chagoury, O. L., Connerty, S. R., Quarcoopome, J., Quinn, L. L., . . . Rickinson, A. B. (2011). Cytotoxic CD4+ T cell responses to EBV contrast with CD8 responses in breadth of lytic cycle antigen choice and in lytic cycle recognition. *J Immunol*, *187*(1), 92-101.
- Lossius, A., Johansen, J. N., Torkildsen, O., Vartdal, F., & Holmoy, T. (2012). Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis-association and causation. *Viruses*, *4*(12), 3701-3730.
- Lunemann, J. D., Edwards, N., Muraro, P. A., Hayashi, S., Cohen, J. I., Munz, C., & Martin, R. (2006). Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain*, *129*(Pt 6), 1493-1506.
- Lunemann, J. D., Jelcic, I., Roberts, S., Lutterotti, A., Tackenberg, B., Martin, R., & Munz, C. (2008). EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med*, *205*(8), 1763-1773.
- Luzuriaga, K., & Sullivan, J. L. (2010). Infectious mononucleosis. *N Engl J Med*, *362*(21), 1993-2000.
- Mackinnon, L. T. (2000a). Chronic exercise training effects on immune function. [Review]. *Med Sci Sports Exerc*, *32*(7 Suppl), S369-376.
- MacKinnon, L. T. (2000b). Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunol Cell Biol*, *78*(5), 502-509.
- Mackinnon, L. T., & Hooper, S. L. (1996). Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during intensified training in swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, *28*(3), 285-290.
- Maecker, H. T., Dunn, H. S., Suni, M. A., Khatamzas, E., Pitcher, C. J., Bunde, T., . . . Picker, L. J. (2001). Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods*, *255*(1-2), 27-40.
- Maecker, H. T., Ghanekar, S. A., Suni, M. A., He, X. S., Picker, L. J., & Maino, V. C. (2001). Factors affecting the efficiency of CD8+ T cell cross-priming with exogenous antigens. *J Immunol*, *166*(12), 7268-7275.
- Maecker, H. T., Hassler, J., Payne, J. K., Summers, A., Comatas, K., Ghanayem, M., . . . Disis, M. L. (2008). Precision and linearity targets for validation of an IFN-gamma ELISPOT, cytokine flow cytometry, and tetramer assay using CMV peptides. *BMC Immunol*, *9*, 9.
- Maini, M. K., Gudgeon, N., Wedderburn, L. R., Rickinson, A. B., & Beverley, P. C. (2000). Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol*, *165*(10), 5729-5737.
- Makedonas, G., & Betts, M. R. (2006). Polyfunctional analysis of human t cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. *Springer Semin Immunopathol*, *28*(3), 209-219.
- Martorelli, D., Muraro, E., Merlo, A., Turrini, R., Fae, D. A., Rosato, A., & Dolcetti, R. (2012). Exploiting the interplay between innate and adaptive immunity to improve immunotherapeutic strategies for Epstein-Barr-virus-driven disorders. *Clin Dev Immunol*, *2012*, 931952.
- Mautner, J., & Bornkamm, G. W. (2012). The role of virus-specific CD4+ T cells in the control of Epstein-Barr virus infection. *Eur J Cell Biol*, *91*(1), 31-35.

- McColl, S. R., Roberge, C. J., Larochelle, B., & Gosselin, J. (1997). EBV induces the production and release of IL-8 and macrophage inflammatory protein-1 alpha in human neutrophils. *J Immunol*, *159*(12), 6164-6168.
- Mehta, S. K., Pierson, D. L., Cooley, H., Dubow, R., & Lugg, D. (2000). Epstein-Barr virus reactivation associated with diminished cell-mediated immunity in antarctic expeditioners. *J Med Virol*, *61*(2), 235-240.
- Middeldorp, J. M. (2015). Epstein-Barr Virus-Specific Humoral Immune Responses in Health and Disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, *391*, 289-323.
- Miller, N., & Hutt-Fletcher, L. M. (1992). Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes. *J Virol*, *66*(6), 3409-3414.
- Milosevic, S., Behrends, U., Adhikary, D., & Mautner, J. (2006). Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach. *J Virol*, *80*(21), 10357-10364.
- Moodie, Z., Price, L., Gouttefangeas, C., Mander, A., Janetzki, S., Lower, M., . . . Britten, C. M. (2010). Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. *Cancer Immunol Immunother*, *59*(10), 1489-1501.
- Moon, U. Y., Park, S. J., Oh, S. T., Kim, W. U., Park, S. H., Lee, S. H., . . . Lee, S. K. (2004). Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein-Barr virus load in blood. *Arthritis Res Ther*, *6*(4), R295-302.
- Munger, K. L., Levin, L. I., O'Reilly, E. J., Falk, K. I., & Ascherio, A. (2011). Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult Scler*, *17*(10), 1185-1193.
- Munz, C., Bickham, K. L., Subklewe, M., Tsang, M. L., Chahroudi, A., Kurilla, M. G., . . . Steinman, R. M. (2000). Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J Exp Med*, *191*(10), 1649-1660.
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2007). *Janeway's Immunobiology* (7th ed.): Garland Science Taylor & Francis Group.
- Mynarek, M., Schober, T., Behrends, U., & Maecker-Kolhoff, B. (2013). Posttransplant lymphoproliferative disease after pediatric solid organ transplantation. *Clin Dev Immunol*, *2013*, 814973.
- Neller, M. A., Burrows, J. M., Rist, M. J., Miles, J. J., & Burrows, S. R. (2013). High frequency of herpesvirus-specific clonotypes in the human T cell repertoire can remain stable over decades with minimal turnover. *J Virol*, *87*(1), 697-700.
- Nieman, D. C., Brendle, D., Henson, D. A., Suttles, J., Cook, V. D., Warren, B. J., . . . Nehlsen-Cannarella, S. L. (1995). Immune function in athletes versus nonathletes. *Int J Sports Med*, *16*(5), 329-333.
- Nieman, D. C., Johanssen, L. M., Lee, J. W., & Arabatzis, K. (1990). Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J Sports Med Phys Fitness*, *30*(3), 316-328.
- Niess, A. M., Dickhuth, H. H., Northoff, H., & Fehrenbach, E. (1999). Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc Immunol Rev*, *5*, 22-56.
- Ning, R. J., Xu, X. Q., Chan, K. H., & Chiang, A. K. (2011). Long-term carriers generate Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4(+) and CD8(+) polyfunctional T-cell responses which show immunodominance hierarchies of EBV proteins. *Immunology*, *134*(2), 161-171.
- Obar, J. J., & Lefrancois, L. (2010). Memory CD8+ T cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci*, *1183*, 251-266.
- Odumade, O. A., Hogquist, K. A., & Balfour, H. H., Jr. (2011). Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev*, *24*(1), 193-209.
- Odumade, O. A., Knight, J. A., Schmeling, D. O., Masopust, D., Balfour, H. H., Jr., & Hogquist, K. A. (2012). Primary Epstein-Barr virus infection does not erode preexisting CD8(+) T cell memory in humans. *J Exp Med*, *209*(3), 471-478.
- Ogembo, J. G., Kannan, L., Ghiran, I., Nicholson-Weller, A., Finberg, R. W., Tsokos, G. C., & Fingerhuth, J. D. (2013). Human complement receptor type 1/CD35 is an Epstein-Barr Virus receptor. *Cell Rep*, *3*(2), 371-385.

- Ouyang, Q., Wagner, W. M., Walter, S., Muller, C. A., Wikby, A., Aubert, G., . . . Pawelec, G. (2003). An age-related increase in the number of CD8+ T cells carrying receptors for an immunodominant Epstein-Barr virus (EBV) epitope is counteracted by a decreased frequency of their antigen-specific responsiveness. *Mech Ageing Dev*, 124(4), 477-485.
- Pakpoor, J., Disanto, G., Gerber, J. E., Dobson, R., Meier, U. C., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2013). The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler*, 19(2), 162-166.
- Pantaleo, G., & Harari, A. (2006). Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol*, 6(5), 417-423.
- Payne, D. A., Mehta, S. K., Tyring, S. K., Stowe, R. P., & Pierson, D. L. (1999). Incidence of Epstein-Barr virus in astronaut saliva during spaceflight. *Aviat Space Environ Med*, 70(12), 1211-1213.
- Peters-Golden, M., Canetti, C., Mancuso, P., & Coffey, M. J. (2005). Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol*, 174(2), 589-594.
- Peters, E. M. (1997). Exercise, immunology and upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med*, 18 Suppl 1, S69-77.
- Pickhardt, P. J., & Siegel, M. J. (1999). Posttransplantation lymphoproliferative disorder of the abdomen: CT evaluation in 51 patients. *Radiology*, 213(1), 73-78.
- Pohl, D., Krone, B., Rostasy, K., Kahler, E., Brunner, E., Lehnert, M., . . . Hanefeld, F. (2006). High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology*, 67(11), 2063-2065.
- Poirier, S., Bouvier, G., Malaveille, C., Ohshima, H., Shao, Y. M., Hubert, A., . . . Bartsch, H. (1989). Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation. *Int J Cancer*, 44(6), 1088-1094.
- Poole, B. D., Scofield, R. H., Harley, J. B., & James, J. A. (2006). Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 39(1), 63-70.
- Pottgiesser, Wolfarth, B., Schumacher, Y. O., & Bauer, G. (2006). Epstein-Barr virus serostatus: no difference despite aberrant patterns in athletes and control group. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Med Sci Sports Exerc*, 38(10), 1782-1791.
- Pottgiesser, T., Schumacher, Y. O., Wolfarth, B., Schmidt-Trucksass, A., & Bauer, G. (2012). Longitudinal observation of Epstein-Barr virus antibodies in athletes during a competitive season. *J Med Virol*, 84(9), 1415-1422.
- Pottgießer T, S. Y., Wolfarth B, Bauer G. (2008). Epstein-Barr Virus Infektionen Diagnostik und Serologie. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 59* (Nr. 5), 126-127.
- Powers, D. C. (1993). Influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity declines with advancing age. *J Am Geriatr Soc*, 41(1), 1-5.
- Powers, D. C., & Belshe, R. B. (1993). Effect of age on cytotoxic T lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. *J Infect Dis*, 167(3), 584-592.
- Prang, N. S., Hornef, M. W., Jager, M., Wagner, H. J., Wolf, H., & Schwarzmann, F. M. (1997). Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state. *Blood*, 89(5), 1665-1677.
- Precopio, M. L., Sullivan, J. L., Willard, C., Somasundaran, M., & Luzuriaga, K. (2003). Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J Immunol*, 170(5), 2590-2598.
- Pudney, V. A., Leese, A. M., Rickinson, A. B., & Hislop, A. D. (2005). CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med*, 201(3), 349-360.
- Pyne, D. B., Baker, M. S., Fricker, P. A., McDonald, W. A., Telford, R. D., & Weidemann, M. J. (1995). Effects of an intensive 12-wk training program by elite swimmers on neutrophil oxidative activity. *Med Sci Sports Exerc*, 27(4), 536-542.
- Rama, L., Teixeira, A. M., Matos, A., Borges, G., Henriques, A., Gleeson, M., . . . Paiva, A. (2013). Changes in natural killer cell subpopulations over a winter training season in elite swimmers. *Eur J Appl Physiol*, 113(4), 859-868.

- Reid, V. L., Gleeson, M., Williams, N., & Clancy, R. L. (2004). Clinical investigation of athletes with persistent fatigue and/or recurrent infections. *Br J Sports Med*, *38*(1), 42-45.
- Rickinson, A., & Kieff, E. (2006). Epstein Barr Virus. In *Fields Virology*, ed. B Fields, D Knipe, P Howley, Philadelphia: Lippincot-Raven, pp. 2655–2700.
- Rickinson, A. B., Long, H. M., Palendira, U., Munz, C., & Hislop, A. D. (2014). Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol*, *35*(4), 159-169.
- Rickinson, A. B., & Moss, D. J. (1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol*, *15*, 405-431.
- Roberge, C. J., Poubelle, P. E., Beaulieu, A. D., Heitz, D., & Gosselin, J. (1996). The IL-1 and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) response of human neutrophils to EBV stimulation. Preponderance of IL-1Ra detection. *J Immunol*, *156*(12), 4884-4891.
- Rochford, R., Cannon, M. J., & Moormann, A. M. (2005). Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nat Rev Microbiol*, *3*(2), 182-187.
- Rooney, C. M., Rowe, D. T., Ragot, T., & Farrell, P. J. (1989). The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *J Virol*, *63*(7), 3109-3116.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., . . . Heslop, H. E. (1998). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*, *92*(5), 1549-1555.
- Saulquin, X., Ibsch, C., Peyrat, M. A., Scotet, E., Hourmant, M., Vie, H., . . . Houssaint, E. (2000). A global appraisal of immunodominant CD8 T cell responses to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus by bulk screening. *Eur J Immunol*, *30*(9), 2531-2539.
- Savard, M., Belanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L., & Gosselin, J. (2000). Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol*, *74*(6), 2612-2619.
- Savard, M., & Gosselin, J. (2006). Epstein-Barr virus immunosuppression of innate immunity mediated by phagocytes. *Virus Res*, *119*(2), 134-145.
- Scheenstra, R., Verschuuren, E. A., de Haan, A., Slooff, M. J., The, T. H., Bijleveld, C. M., & Verkade, H. J. (2004). The value of prospective monitoring of Epstein-Barr virus DNA in blood samples of pediatric liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, *6*(1), 15-22.
- Sebelin-Wulf, K., Nguyen, T. D., Oertel, S., Papp-Vary, M., Trappe, R. U., Schulzki, A., . . . Subklewe, M. (2007). Quantitative analysis of EBV-specific CD4/CD8 T cell numbers, absolute CD4/CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PLTD. *Transpl Immunol*, *17*(3), 203-210.
- Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Heine, G., Girndt, M., Mueller-Lantsch, N., . . . Kohler, H. (2001). Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*, *71*(9), 1287-1294.
- Silins, S. L., Sherritt, M. A., Silleri, J. M., Cross, S. M., Elliott, S. L., Bharadwaj, M., . . . Misko, I. S. (2001). Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. *Blood*, *98*(13), 3739-3744.
- Simpson, R. J., & Bosch, J. A. (2014). Special issue on exercise immunology: current perspectives on aging, health and extreme performance. *Brain Behav Immun*, *39*, 1-7.
- Sixbey, J. W., & Yao, Q. Y. (1992). Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science*, *255*(5051), 1578-1580.
- Slota, M., Lim, J. B., Dang, Y., & Disis, M. L. (2011). ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines*, *10*(3), 299-306.
- Sprent, J., & Surh, C. D. (2002). T cell memory. *Annu Rev Immunol*, *20*, 551-579.
- Stowe, R. P., Kozlova, E. V., Yetman, D. L., Walling, D. M., Goodwin, J. S., & Glaser, R. (2007). Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging. *Exp Gerontol*, *42*(6), 563-570.
- Stowe, R. P., Pierson, D. L., Feeback, D. L., & Barrett, A. D. (2000). Stress-induced reactivation of Epstein-Barr virus in astronauts. *Neuroimmunomodulation*, *8*(2), 51-58.
- Straus, S. E., Cohen, J. I., Tosato, G., & Meier, J. (1993). NIH conference. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med*, *118*(1), 45-58.

- Strowig, T., Brilot, F., Arrey, F., Bougras, G., Thomas, D., Muller, W. A., & Munz, C. (2008). Tonsillar NK cells restrict B cell transformation by the Epstein-Barr virus via IFN-gamma. *PLoS Pathog*, *4*(2), e27.
- Svedmyr, E., Ernberg, I., Seeley, J., Weiland, O., Masucci, G., Tsukuda, K., . . . Berthold, W. (1984). Virologic, immunologic, and clinical observations on a patient during the incubation, acute, and convalescent phases of infectious mononucleosis. *Clin Immunol Immunopathol*, *30*(3), 437-450.
- Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A., & Kieff, E. (1988). Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol*, *62*(12), 4452-4464.
- Taylor, G. S., Long, H. M., Brooks, J. M., Rickinson, A. B., & Hislop, A. D. (2015). The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu Rev Immunol*, *33*, 787-821.
- Thacker, E. L., Mirzaei, F., & Ascherio, A. (2006). Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*, *59*(3), 499-503.
- Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., & Rickinson, A. B. (1994). Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol*, *68*(11), 7374-7385.
- Tischer, S., Dieks, D., Sukdolak, C., Bunse, C., Figueiredo, C., Immenschuh, S., . . . Eiz-Vesper, B. (2014). Evaluation of suitable target antigens and immunoassays for high-accuracy immune monitoring of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific T cells as targets of interest in immunotherapeutic approaches. *J Immunol Methods*, *408*, 101-113.
- Torti, N., & Oxenius, A. (2012). T cell memory in the context of persistent herpes viral infections. *Viruses*, *4*(7), 1116-1143.
- Toussiot, E., & Roudier, J. (2008). Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, *22*(5), 883-896.
- Tsai, M. H., Raykova, A., Klinke, O., Bernhardt, K., Gartner, K., Leung, C. S., . . . Decludt, H. J. (2013). Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas. *Cell Rep*, *5*(2), 458-470.
- Verweij, F. J., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Vendrig, T., Wurdinger, T., Cahir-McFarland, E., . . . Pegtel, D. M. (2011). LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF-kappaB activation. *EMBO J*, *30*(11), 2115-2129.
- Vogl, B. A., Fagin, U., Nerbas, L., Schlenke, P., Lamprecht, P., & Jabs, W. J. (2012). Longitudinal analysis of frequency and reactivity of Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes and their association with intermittent viral reactivation. *J Med Virol*, *84*(1), 119-131.
- Vouloumanou, E. K., Rafailidis, P. I., & Falagas, M. E. (2012). Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. *Curr Opin Hematol*, *19*(1), 14-20.
- Walsh, N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., Woods, J. A., Bishop, N. C., Fleshner, M., . . . Simon, P. (2011). Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*, *17*, 6-63.
- Wiesel, M., Walton, S., Richter, K., & Oxenius, A. (2009). Virus-specific CD8 T cells: activation, differentiation and memory formation. *APMIS*, *117*(5-6), 356-381.
- Williams, H., McAulay, K., Macsween, K. F., Gallacher, N. J., Higgins, C. D., Harrison, N., . . . Crawford, D. H. (2005). The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol*, *129*(2), 266-274.
- Woodberry, T., Suscovich, T. J., Henry, L. M., Davis, J. K., Frahm, N., Walker, B. D., . . . Brander, C. (2005). Differential targeting and shifts in the immunodominance of Epstein-Barr virus--specific CD8 and CD4 T cell responses during acute and persistent infection. *J Infect Dis*, *192*(9), 1513-1524.
- Woodman, C. B., Collins, S. I., Vavrusova, N., Rao, A., Middeldorp, J. M., Kolar, Z., . . . Murray, P. G. (2005). Role of sexual behavior in the acquisition of asymptomatic Epstein-Barr virus infection: a longitudinal study. *Pediatr Infect Dis J*, *24*(6), 498-502.

- Yamauchi, R., Shimizu, K., Kimura, F., Takemura, M., Suzuki, K., Akama, T., . . . Akimoto, T. (2011). Virus activation and immune function during intense training in rugby football players. *Int J Sports Med*, *32*(5), 393-398.
- Younes, S. A., Yassine-Diab, B., Dumont, A. R., Boulassel, M. R., Grossman, Z., Routy, J. P., & Sekaly, R. P. (2003). HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4⁺ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med*, *198*(12), 1909-1922.
- Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, *4*(10), 757-768.
- Zimmerli, S. C., Harari, A., Cellera, C., Vallelian, F., Bart, P. A., & Pantaleo, G. (2005). HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(20), 7239-7244.

6 Publikationen und Kongresse

6.1 Publikationen

N. Körber, U. Behrends, A. Hapfelmeier, U. Protzer, T. Bauer. *Validation of an IFN γ /IL2 FluoroSpot assay for clinical trial monitoring* (submitted to Journal of Translational Medicine)

N. Körber, U. Behrends, J. Mautner, L. Deml, S. Barabas, U. Protzer, T. Bauer. *Working title: Evaluation of T-activated[®] proteins for monitoring of Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus specific T cells* (manuscript in preparation)

S. Kutscher, C.J. Dembek, S. Deckert, C. Russo, **N. Körber**, J. R. Bogner, F. Geisler, A. Umgelter, M. Neuenhahn, J. Albrecht, A. Cosma, U. Protzer, T. Bauer, *Overnight resting of PBMC changes functional signatures of antigen specific T-cell responses: impact for immune monitoring within clinical trials*, PLoS One, October 2013

6.2 Kongresse

23th Annual Meeting of the Society for Virology

06. – 09. März 2013; Kiel, Deutschland

Mündliche Präsentation: *“Intensive exercise does not impair Epstein Barr Virus specific immunity in young competitive athletes”*

4th Munich Biomarker Conference

25. – 26. November 2014; München, Deutschland

Poster Präsentation: *“Different quality and functionality profile of antigen-specific T-cell responses upon stimulation with activated viral proteins and corresponding pools of overlapping peptides”*

25th Annual Meeting of the Society for Virology

18. – 21. März 2015; Bochum, Deutschland

Poster Präsentation: *“Suitability of T-activated proteins[®] as recall antigen for use in T-cell assays”*

7 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank geht an Ulla Protzer, die mir die Möglichkeit gab, an diesem spannenden Projekt zu forschen und die mich initial dazu ermutigt hat, die Herausforderung einer Promotion anzunehmen. Ohne Deine Begeisterungsfähigkeit und den Glauben an mich, hätte ich diesen Weg vielleicht niemals eingeschlagen und damit hätte ich definitiv eine großartige Chance verpasst!

Ein weiterer besonderer Dank geht an Tanja Bauer und Dieter Hoffmann, die mich über all die Jahre bestmöglich unterstützt haben und mir jederzeit für Diskussionen und Hilfestellungen zur Seite standen. Ich habe so viel von Euch gelernt und die tägliche Zusammenarbeit mit Dir, Tanja, hat mein Arbeitsleben sehr bereichert und mich einfach glücklich gemacht!

Die drei soeben genannten Personen verdienen meinen allerhöchsten Respekt und Dank, da Sie es geschafft haben, mir auch in schwierigen Zeiten über die Maßen unterstützend zur Seite zu stehen und alles Mögliche getan haben, um dieses „Projekt“ für mich machbar zu machen. Herzlichsten Dank dafür!

Herrn Prof. Dirk Haller möchte ich besonders dafür danken, dass er sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat und mich mit seiner Diskussionsbereitschaft während des Thesis Committee Meetings bei meiner Arbeit sehr unterstützt hat.

Ein weiterer sehr herzlicher Dank geht an all meine jetzigen und ehemaligen Kolleginnen der Virologie-Diagnostik- und der Immunmonitoring-Arbeitsgruppe. Ohne Eure Hilfe und die gute Zusammenarbeit wäre ein Projekt wie dieses nicht umsetzbar gewesen und Eure immerwährende Hilfsbereitschaft war wirklich einzigartig! Besonders danken möchte ich meinen ehemaligen Kolleginnen Carolina Russo, Claudia Dembek, Kim Dietrich und Mirjana Lekic für die schöne gemeinsame Zeit.

Ein ebenfalls besonderer Dank gilt Bernd Wohlfarth, dem Leiter der Studie, und dem ganzen Team des Lehrstuhls für Präventive und Rehabilitative Sportmedizin der Technischen Universität München, ohne dem die Rekrutierung der vielen Spender und das Daten- und Probenmanagement niemals so gut funktioniert hätten. Besonders danken möchte ich hier meiner Ansprechpartnerin Katharina Blume, für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis.

Ein großer Dank geht zudem an die Nachwuchsleistungssportler und deren Betreuer und die Probanden der Kontrollgruppe, ohne deren Teilnahmebereitschaft die Studie in diesem Umfang niemals möglich gewesen wäre!

Besonders danke ich meinem Bruder Simon, Angie und all meinen engsten Freunden für ihre fortwährende und vielseitige Unterstützung. Ich bin so glücklich, dass es Euch gibt!

Ein Dank der ganz anderen Art geht an Romeo und Louis – Ihr habt es immer wieder geschafft mich auf die Beine zu kriegen!

Meine Arbeit widme ich meinen Eltern, Sylvia und Johann, die mich immer bedingungslos unterstützt und stets an mich geglaubt haben. Vielen lieben Dank dafür! Ohne Euch wäre dies nicht möglich gewesen!