

Funktionelle Aspekte  
von CD4+ T-Zellen bei Sportlern  
nach akuter Belastung und SARS-CoV-2-Infektion

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Fachbereich Psychologie und Sportwissenschaft (FB06)

Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von

Jana Palmowski

Präsident der Universität: Prof. Dr. Joybrato Mukherjee

Dekan des Fachbereichs: Prof. Dr. Christiane Hermann

Gießen, Dezember 2023

## Erstgutachter:

Prof. Dr. Karsten Krüger

Justus-Liebig-Universität Gießen

FB06 - Psychologie und Sportwissenschaft

Institut für Sportwissenschaft

Arbeitsbereich Leistungsphysiologie und Sporttherapie

Kugelberg 62

35394 Gießen

E-Mail: [Karsten.Krueger@sport.uni-giessen.de](mailto:Karsten.Krueger@sport.uni-giessen.de)

## Zweitgutachter:

Prof. Dr. Dr. Philipp Zimmer

Technische Universität Dortmund

Fakultät Kunst- und Sportwissenschaften

Institut für Sport und Sportwissenschaft

Arbeitsbereich Sport und Gesundheit

Otto-Hahn-Straße 3

44227 Dortmund

E-Mail: [philipp.zimmer@tu-dortmund.de](mailto:philipp.zimmer@tu-dortmund.de)

## Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und urheberschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Datum

---

Unterschrift

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich in meiner Promotionszeit unterstützt haben, bedanken. Besonders danke ich Prof. Dr. Karsten Krüger für die Einführung in die Thematik „Immunsystem im Sport“, die gute Betreuung und die angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner gesamten Arbeitszeit in Hannover und Gießen. Dazu geht der Dank auch an alle Kollegen und Mitdoktoranden der Leistungsphysiologie in Gießen und des Sportinstituts in Hannover. Insbesondere danke ich meinen Bürokollegen Dr. Thomas Reichel und Dr. Katharina Alack. Thomas für den kollegialen Austausch und Katharina für die Beantwortung von Laborfragen sowie jeglichen anderen Lebensfragen. Ohne die hilfsbereiten Probanden und engagierten studentischen Hilfskräfte an beiden Standorten wäre diese Promotion nicht möglich gewesen - danke.

Ein Dank gilt außerdem denjenigen, die mir die Laborwelt nähergebracht haben, die für einen Sportwissenschaftler normalerweise fremd ist. Danke an PD Dr. Antonina Lavrentieva, die in Hannover erste Eindrücke in steriles Arbeiten mit Zellen vermittelt hat, und an die Arbeitsgruppe um PD Dr. rer. nat. Kathrin Renner-Sattler in Regensburg, die mir Einblicke in ihre Laborabläufe der Immunstoffwechsel-Studien gegeben hat.

Mein Dank gilt auch den Menschen, die mir die Fähigkeiten beigebracht haben dieses mehrjährige Projekt Doktorarbeit durchzustehen. Dem Laufsport und allen voran meinem zu früh verstorbenen Trainer Andre Wollherr, verdanke ich mir zuvor unbekannte Ausdauer und Durchhaltevermögen geweckt hat. Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die in jeder Lebenslage für mich da ist und zu mir steht: Meinen Eltern, meiner Schwester Kira Röhr und meinem Mann Matthias Böning, der mich motiviert hat dieses Projekt zu beenden, meinen Horizont über den Sport hinaus zu erweitern und mir jederzeit alle Freiräume lässt, die ich brauche.

## Zusammenfassung

Regelmäßiges körperliches Training ist eine Möglichkeit der Prävention von COVID-19 und anderen Atemwegserkrankungen, da die Immunfunktion durch Training positiv beeinflusst wird. Wie CD4+ T-Zellen bei Sportlern nach einer SARS-CoV-2-Infektion reagieren, ist jedoch noch unklar. Bei der gesteigerten Immunfunktion durch Sport spielen vermutlich adaptive Immunzellen, wie z. B. CD4+ T-Zellen eine wichtige Rolle. CD4+ T-Zellen reagieren auf regelmäßiges sportliches Training langfristig mit anti-inflammatorischen Prozessen. Ob es als Adaptationsmechanismus kurzfristig zu einem „Open Window“ mit einer reduzierten CD4+ T-Zell-Funktion nach akuter sportlicher Belastung kommt, muss noch geklärt werden. Um diese beiden Fragen besser beantworten zu können, wurde im ersten Studienabschnitt untersucht, ob und wie sich eine CD4+ T-Zell-Aktivierung nach einer akuten sportlichen Belastung auf Stoffwechselfparameter auswirkt. Im zweiten Studienabschnitt sollte dann festgestellt werden, ob die Funktion der CD4+ T-Zellen nach einer SARS-CoV-2-Infektion verändert ist. Dafür wurde der Fokus im ersten Studienabschnitt auf den Immunmetabolismus und im zweiten Studienabschnitt auf die Zytokinausschüttung gelegt.

Zunächst wurden CD4+ T-Zellen und Zellkulturüberstände vor und nach der anti-CD3/CD28-Aktivierung in autologem Serum mittels Sauerstoffsensor, Amperometrie, Durchflusszytometrie, PCR und Multiplex-ELISA gemessen. Das autologe Serum wurde als Vorbelastungsserum in Ruhe und Nachbelastungsserum nach einer 30-minütigen intensiven Laufbelastung über Blutentnahmen gewonnen. 48 Stunden nach der Zellkultur waren Glukosekonzentrationen und der lösliche IFN- $\gamma$ -Rezeptor in den Überständen erhöht und die HK1-mRNA der CD4+ reduziert, wenn das Belastungsserum im Vergleich zu Ruheserum supplementiert wurde ( $p=0,033$ ). Darüber hinaus gab es keine signifikanten Unterschiede.

Danach wurden professionelle Sportlern nach einer SARS-CoV-2-Infektion im Anschluss an die Quarantäne rekrutiert und mit nicht-infizierten Teamkollegen nach der Saisonpause verglichen. Neben serologischen, klinischen und leistungsbezogenen Daten, wurden Überstände und CD4+ T-Zellen nach 72h aktivierter Zellkultur gewonnen. Die Zellkulturdaten wurden mittels Durchflusszytometrie und Multiplex-ELISA gemessen. Die genesenen Athleten wiesen keine immunologische Dysregulation mehr auf, doch CD4+ T-Zellen von genesenen Sportler sekretierten höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Vergleich zu nicht-infizierten, geimpften Sportlern ( $p<0,001$ ).

CD4+ T-Zellen von Sportler scheinen eine SARS-CoV-2-Infektion gut zu bewältigen, die Reaktion auf eine Aktivierung mit der Ausschüttung von TNF- $\alpha$  ist sogar gesteigert. Die genauen adaptiven Mechanismen, wie das Immunsystem durch Sport gestärkt wird, sind und bleiben bis heute ungeklärt. Erste Hinweise, dass das CD4+-T-Zellen über eine akute sportliche Belastung epigenetisch reguliert werden könnte, zeigt die Reduktion der HK1 mRNA. Ein „Open Window“ in Bezug auf den oxidativen Stoffwechsel nach einer 30-minütigen Ausdauerbelastung war bei CD4+ T-Zellen nicht gegeben.

## Abstract

Exercise can prevent COVID-19 and other upper respiratory tract infections as exercise training is a potent enhancer of immune function. The context between the CD4+ T cell response against SARS-CoV-2 infection and professional athletes remains unknown. Adaptive immune cells, such as CD4+ T cells, are likely important modulators of immune function after exercise. CD4+ T-cells are known to react to exercise training by anti-inflammatory processes. If there is a short-time „open Window“, known as a mechanism of adaptation with CD4+ T cells showing reduced functionality, will yet be clarified. For clarification, first, the immunometabolism of CD4+ T cells after acute exercise and, second, the function of CD4+ T cells after SARS-CoV-2 infection was analyzed by cell culture experiments.

First, CD4+ T cells and supernatants after anti-CD3/CD28 activation in autologous serum were measured by oxygen sensor, amperometry, flow cytometry, PCR, and multiplex ELISA. Autologous serum was sampled via blood collection at rest and after 30 minutes of intense running exercise. Glucose concentration and soluble IFN- $\gamma$  receptor were increased in supernatants after 48 h cell culture with exercise serum. HK1 mRNA of CD4+ was reduced when CD4+ were cultured with exercise serum ( $p=0.033$ ). No other significant differences were found.

Second, professional athletes were recruited after quarantine following SARS-CoV-2 infection and compared with non-infected team colleagues after the off-season. Next to serologic, fitness, and fitness data, supernatants and CD4+ T cells were measured after 72h cell culture. Cell culture was measured by flow cytometry and multiplex ELISA. CD4+ T cells of convalescent athletes did not show any immunological dysfunction, though CD4+ T cells secreted higher TNF- $\alpha$  levels after activation compared to non-infected, vaccinated athletes ( $p<0.001$ ).

Athlete's CD4+ T cells seem to cope well with SARS-CoV-2 infections. The exact mechanism of immune adaptation by exercise remains unclear. Reduction of HK1 mRNA indicates there may be some epigenetic regulation of CD4+ T cells by exercise stimuli. However, an „open window“ after 30 minutes of intensive endurance exercise was not found.

## Vorwort

Die vorliegende kumulative Dissertation zeigt funktionelle Aspekte von CD4+ T-Zellen bei Sportlern nach akuter Belastung und nach SARS-CoV-2-Virusinfektionen auf. Das Immunsystem hat zuletzt aufgrund der Corona-Pandemie in allen Lebensbereichen, sowie auch in der Sportwissenschaft große Aufmerksamkeit erhalten. Der Einfluss von akuter sportlicher Belastung auf funktionelle Aspekte, wie auf den T-Zell-Stoffwechsel nach Antigen-Aktivierung oder auf T-Zell-Zytokinen nach einer SARS-CoV-2-Infektion, ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden. Ursprünglich zielte das Promotionsthema ausschließlich auf Aspekte des Immunmetabolismus von CD4+ T-Zellen bei Trainierten und Untrainierten ab.

Mit dem Beginn der Corona-Pandemie erschwerte sich die Planung für die zweite Zellkulturstudie. Durch die Einschränkungen im Breitensport erschien die Rekrutierung von Profisportlern sinnvoller, da Sportanlagen und Wettkämpfe zu dieser Zeit nur noch Berufssportlern zugänglich waren. Zugleich zeigten T-Zell-Studien, dass bei einer Coronavirus-Erkrankung 2019 (COVID) der Stoffwechsel von T-Zellen aus dem Gleichgewicht gebracht wird [1]. Infolgedessen ergab sich die neue Fragestellung zur Immunfunktion von CD4+ T-Zellen. Wie würden diese nach COVID auf eine Aktivierung bei professionellen Sportlern reagieren? Darauf basiert die zweite Fragestellung dieser Arbeit. Die zwei Original-Publikationen sind dieser Dissertation beigelegt. Wesentliche Ergebnisse werden im Kumulus verkürzt diskutiert, da die Einordnung in das übergeordnete Forschungsgebiet im Mittelpunkt dieser Arbeit steht. Die erste Publikation geht auf den T-Zell-Stoffwechsel und die Zweite auf die Zytokin-Expression von T-Zellen nach einer COVID Infektion ein [2,3].

Verzeichnis der eingereichten Publikationen:

1. **Palmowski, J.,** Gebhardt, K., Reichel, T., Frech, T., Ringseis, R., Eder, K., Renner-Sattler, K. & Krüger, K. (2021). *The impact of exercise serum on selected parameters of CD4+ T cell metabolism. Immuno, 1(3), 119-131.* DOI: 10.3390/immuno1030008
2. **Palmowski, J.,** Kohnhorst, S., Bauer, P., Puta, C., Haunhorst, S., Gebhardt, K., Reichel, T., Keller, C. A., Huber, M., Hartmann, R. & Krüger, K. (2023). T-cell-derived TNF- $\alpha$  and a cluster of immunological parameters from plasma allow a separation between SARS-CoV-2 convalescent versus vaccinated elite athletes. *Frontiers in Physiology, 14,* 1203983. DOI: 10.3389/fphys.2023.1203983

## Abkürzungsverzeichnis

ACE-2	Angiotensin-2-konvertierendes Enzym
ATP	Adenosintriphosphat
B-Zelle	B-Lymphozyt
CD	immunphänotypischer Oberflächenrezeptor
COVID	Coronavirus-Erkrankung 2019; Erkrankung durch das SARS-CoV-2-Virus
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
GLYC	Glykolyse
hCoV	humane Coronaviren
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HK1	Hexokinase 1
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte-chemoattractant-protein-1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
PMBC	periphere mononukleare Blutzellen
SARS-CoV-2	akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus-2
T <sub>CM</sub>	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor
T <sub>EM</sub>	Effektorgedächtnis-T-Zelle
T <sub>fh</sub>	follikuläre T-Helferzellen
TGF- $\beta$	Tumorstromungsfaktor- $\beta$
Th	T-Helferzelle
T <sub>Mem</sub>	Gedächtnis-T-Zelle
T <sub>N</sub>	naive T-Zelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub>	anti-inflammatorische regulatorische T-Zelle
T <sub>SCM</sub>	Stammzellgedächtnis-T-Zelle
T <sub>TE</sub>	Terminal-differenzierte erschöpfte Gedächtnis-T-Zelle
T <sub>TM</sub>	Terminal-differenzierte Gedächtniszelle
T-Zelle	T-Lymphozyt
URTI	Infektion der oberen Atemwege

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	V
Abstract .....	VI
Vorwort.....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
Inhaltsverzeichnis .....	IX
1. Einleitung.....	- 1 -
2. Theoretischer Hintergrund: Die CD4+ T-Zellimmunität und Sport.....	- 2 -
2.1. Die T-Zell-Aktivierung als Teil des adaptiven Immunsystems .....	- 2 -
2.1.1. Allgemeine Vorstellung der CD4+ T-Zell-Familie.....	- 2 -
1.1.1. CD3/CD28-TCR-Aktivierung.....	- 5 -
1.1.2. T-Zell-Aktivierung durch spezifische Viren wie SARS-CoV-2.....	- 6 -
1.2. Der Lebenszyklus von T-Zellen und ihre Funktion.....	- 8 -
1.2.1. T-Zellaktivierung und T-Zellmetabolismus.....	- 8 -
1.2.2. T-Zellaktivierung und Zytokinausschüttung .....	- 10 -
2. Zielstellungen und Hypothesen .....	- 12 -
2.1. Studienabschnitt 1: Palmowski et al., 2021 .....	- 12 -
2.2. Studienabschnitt 2: Palmowski et al., 2023 .....	- 12 -
3. Methodik und Studiendesign.....	- 13 -
3.1. Studiendesign: Palmowski et al., 2021.....	- 13 -
3.2. Studiendesign: Palmowski et al., 2023.....	- 13 -
3.3. Zellkulturmethoden: Palmowski et al. 2021 und 2023 .....	- 14 -
4. Publikationen.....	- 17 -
4.1. The impact of exercise serum on selected parameters of CD4+ T cell metabolism.....	- 17 -
4.2. T-cell derived TNF- $\alpha$ and a cluster of immunological parameters from plasma allow a separation between SARS-CoV-2 convalescent versus vaccinated athletes .....	- 31 -
5. Diskussion und Ausblick.....	- 41 -
5.1. Kein Einfluss des Nachbelastungsserum auf CD4+ T-Zellen in vitro.....	- 41 -
5.2. Spuren einer erhöhten T-Zellaktivierung im Belastungsserum.....	- 41 -
5.3. Veränderte HK1 mRNA Expression nach CD4+-Aktivierung durch eine akute Laufbelastung .....	- 42 -
5.4. Keine Dysregulation der CD4+ nach einer SARS-CoV-2-Infektion .....	- 42 -
5.5. Erhöhte TNF- $\alpha$ Zytokinkonzentrationen nach CD4+ Aktivierung bei genesenen Sportlern ...	- 43 -
6. Fazit .....	- 44 -
Abbildungsverzeichnis .....	- 45 -
Literaturverzeichnis .....	- 45 -
Liste aller Publikationen.....	- 52 -

## 1. Einleitung

Sport ist Medizin! Das hat sich auf allen Ebenen der Prävention gezeigt und gilt auch für die Immunfunktion. Es ist bekannt, dass körperlich aktive Menschen ein geringeres Risiko für eine schwere Coronavirus-Erkrankung 2019 (COVID), eine verbesserte Impfeffektivität und ein verringertes Mortalitätsrisiko bei einer Infektion durch das akute respiratorische Syndrom Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) und anderen Erkrankungen der oberen Atemwege (URTI) haben [4]. URTI sind für junge, gesunde Athleten selten eine schwerwiegende Erkrankung, aber für Leistungssportler können Ausfallzeiten finanziell und trainingsmethodisch problematisch sein [5]. Kehren Sportler zu früh in Training und Wettkampf zurück, sind Langzeitfolgen, wie eine Myokarditis, nicht auszuschließen [6]. Nach COVID liegt die Prävalenz bei Sportlern für eine Myokarditis zwischen 1-4% [7]. Auch T-Lymphozyten (T-Zellen) werden nach viralen Erkrankungen, wie bei COVID, bisweilen in ihrer T-Zell-Aktivierung und -Funktion fehlreguliert, sodass langfristige Folgen möglich sind. Dies kann z. B. das Post-COVID-Syndrom sein, das als persistierende COVID-Symptome länger als 3 Monaten nach der Erkrankung definiert ist. Es geht mit einer Reduzierung spezifischer CD4+ T-Zellen und erhöhten Expressierung von Rezeptoren einher [8].

Die Stärkung der Immunfunktion hat einen hohen gesellschaftlichen Stellenwert z. B. hinsichtlich der Prävention von Immunseneszenz bis hin zu chronischen Erkrankungen [9]. CD4+ T-Zellen sind bei vielen Erkrankungen, von Autoimmun- bis hin zu Tumorerkrankungen, entscheidend, da sie in ihrer Funktion und Anteilen der Subpopulationen verändert werden. Über pharmakologische Interventionen wird häufig eine Einflussnahme auf diese Zellen versucht [10]. Dabei gibt es einige Anzeichen, dass akute sportliche Belastung sich positiv auf die Funktion der CD4+ auswirkt. So hat sich u.a. gezeigt, dass regelmäßiges intensives Training den Anteil eines pro-inflammatorischen CD4+ T-Zell-Subtypen reduzieren kann [11]. Deshalb soll diese Arbeit genauer auf die Funktion von CD4+ T-Zellen bei Sportlern eingehen.

Das Thema Immunfunktion ist nicht neu. Mehrere Jahrzehnte der Forschung konnten zeigen, dass das Immunsystem intensiv auf akutes und langfristiges sportliches Training reagiert [9]. Forschende haben sich bereits mit der Funktion von Lymphozyten vor oder nach sportlicher Aktivität beschäftigt. Dabei wurden zumeist nicht-spezifische Mitogene für die Aktivierung peripherer Lymphozyten genutzt. Bisher zeigt sich eine kurzfristige Reduktion der Proliferationsfähigkeit, die nach langer Trainingsdauer verstärkt wird [12]. Innerhalb der Sportimmunologie wird diskutiert, ob diese Ergebnisse auf die Mobilisierung von Zellen in die Peripherie oder eine echte Immunsuppression durch die akute sportliche Aktivität, als sogenanntes „Open Window“, zurückzuführen sind. Das „Open Window“ ist als ein kurzes Zeitfenster nach dem Sport mit erhöhter Anfälligkeit für Infektionskrankheiten definiert [13].

Für einen besseren Diskurs sollten einzelne T-Zell-Subtypen genauer erforscht werden [12]. CD4+ T-Zellen als eine Subpopulation sind von besonderem Interesse, da sich gezeigt hat, dass sie an neue Umgebungsbedingungen adaptieren [14,15]. Die Muskulatur schüttet bei sportlicher Aktivität Myokine aus, was Umgebungsbedingungen verändert und Einfluss auf die Stoffwechselsituation von Immunzellen hat [9]. Daher stellt sich, die Frage, ob es ein echtes „Open Window“ gibt, wenn die unterschiedlichen Subtypen und ihre Funktion betrachtet werden. Dafür wurde im ersten Studienabschnitt dieser Dissertation untersucht, ob sich eine CD4+ T-Zell-Aktivierung nach einer akuten sportlichen Belastung auf Stoffwechselformparameter auswirkt [3]. Weiter bleibt unklar, ob sportliches Training die CD4+ so fördert, dass nach einer SARS-CoV-2-Infektion keine Dysregulation zurückbleibt. Im zweiten Studienabschnitt sollte daher festgestellt werden, ob die Aktivierung von CD4+ nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 verändert ist [2].

## 2. Theoretischer Hintergrund: Die CD4+ T-Zellimmunität und Sport

### 2.1. Die T-Zell-Aktivierung als Teil des adaptiven Immunsystems

T-Zellen sind der zelluläre Teil der adaptiven Immunantwort und interagieren in enger Zusammenarbeit mit anderen adaptiven Zellen, der angeborenen Immunantwort und humoralen Anteilen des Immunsystems, um Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten zu bekämpfen. [16]. Dabei ist die adaptive Immunantwort über Zellen mit Oberflächenrezeptoren definiert, die sich neu anordnen können und die angeborene Immunantwort über Zellen, die bereits über die Keimbahn definiert werden [17]. Ein Vorteil adaptiver Immunzellen ist, dass sie, sobald sie polarisiert sind, hochspezifisch reagieren und eine Gedächtnisfunktion entwickeln können. Über diese Funktion schaffen sie eine Langzeitimmunität gegen das jeweilige spezifische Pathogen, mit dem sie aktiviert worden sind. Adaptive Immunzellen, auch als Lymphozyten bekannt, werden in B- und T-Zellen kategorisiert. Erstere sind dafür bekannt, Antikörper zu bilden, die Viren neutralisieren können und Letztere dafür, dass sie fremde Antigene auf der Zellmembran erkennen, um die Zelle dann entweder direkt abzutöten oder Zytokine auszuschütten, die Makrophagen anlocken, welche die Zelle phagozytieren [16]. Heutzutage ist ein breites Spektrum von T-Zellen bekannt, welches in CD4+ und CD8+ T-Zellen eingeteilt wird. Dabei steht die Bezeichnung CD für „Cluster of differentiation“, den immunphänotypischen Oberflächenrezeptor. CD4+ binden sich mit ihren T-Zell-Antigen-Rezeptoren (TCR) an den Haupthistokompatibilitätskomplex 2 (MHC-2) und CD8+ an den Haupthistokompatibilitätskomplex 1 (MHC-1) von antigen-präsentierenden Zellen [18]. Ein Sonderfall sind natürliche Killer-T-Zellen (NK-Zellen), die einen CD4+-Rezeptor und NK-Zell-Rezeptoren aufweisen. Sie werden sowohl zur angeborenen als auch zur erworbenen Immunität gezählt, denn sie können sich u.a. an MHC-1 binden [19].

Sowohl CD4+ als auch CD8+ werden im Thymus aus doppelt-positiven CD4+/CD8+ T-Zellen geprägt und verlassen diesen als entweder CD4+ oder CD8+ T-Zellen in Richtung der sekundären lymphatischen Organe. Im Blut sind selten doppelt-positive T-Zellen zu finden. Der Lymphozytenanteil doppelt-positiver T-Zellen im peripheren Blut kann während viraler Infekte allerdings auf 20 % ansteigen und wird im Gewebe bei viralen Infektionen nachgewiesen [18]. Doppelt positive T-Zellen scheinen im Lebensverlauf einen immunologischen Vorteil zu bringen, denn es findet sich ein höherer Anteil von doppelt-positiven T-Zellen im Blut von „Supercentenarians“, also mindestens 110-Jährigen [20]. Höhere Konzentrationen von Perforin und Granzyme A dieser doppelt-positiven T-Zellen sind vergleichbar mit den zytotoxischen CD8+ T-Zellen und deuten auf die Fähigkeit hin, dass sie infizierte Zellen direkt lysieren. [18]. Nach einer allgemeinen Vorstellung des Spektrums der CD4+-T-Zell-Subtypen, werden im Folgenden die Mechanismen der T-Zell-Aktivierung und im Anschluss T-Zell-spezifische Aspekte der viralen SARS-CoV-2-Infektion als Grundlage für die Studien in dieser kumulativen Dissertation genauer erklärt.

#### 2.1.1. Allgemeine Vorstellung der CD4+ T-Zell-Familie

Vorläufer-T-Zellen entstehen aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und werden anschließend im Thymus geprägt, selektiert und in die Peripherie geschickt [15]. CD4+ T-Zellen befinden sich dann in jedem Gewebe des Körpers und zirkulieren zwischen peripherem Blut und lymphatischen Organen. Einige T-Zellen sind gewebeständig d.h. dauerhaft in bestimmten Geweben, wie der Schleimhaut und dem Epithelgewebe [21]. Für die bessere Übersicht dieser Arbeit, werden hier nur konventionelle T-Zellen besprochen, welche einen  $\alpha\beta$ -TCR besitzen und damit antigen-spezifisch sind [16]. Für die Zellkulturstudien der vorliegenden Arbeit wurden zudem ausschließlich periphere T-

Zellen verwendet, da peripheres Blut minimalinvasiv und leicht zugängliches Gewebe. T-Zellen haben die wichtige Aufgabe Zytokine zu sezernieren, welche die B-Zelldifferenzierung über dendritische Zellen fördern, die bakterizide Aktivität von Phagozyten zu steigern, Neutrophile zu rekrutieren, die Angiogenese zu initiieren und die zytotoxische Wirkung von CD8+ zu fördern [22]. Allerdings werden diese Funktionen nicht jeweils von ein und derselben T-Zell-Subgruppe ausgeführt, denn unterschiedliche Subgruppen schütten unterschiedliche Zytokine aus. Eine CD4+ ist oft anders als die Nächste. Die Subtypen unterscheiden sich durch ihren Phänotyp, die Transkriptionsfaktoren, die Stoffwechselwege und die Funktion, die von der charakteristischen Zytokin-Ausschüttung abhängt [14]. Der Stoffwechsel wird in einem der Folgekapitel ausführlicher beschrieben, da er im ersten Studienteil und für die generelle Funktion von CD4+ eine wichtige Rolle spielt [3].

Hinsichtlich des Phänotyps lassen sich T-Zellen grob in Naïve-, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{MEM}$ ) unterscheiden. Naive CD4+ T-Zellen (CD45RO-, CCR7+, CD28+ und CD95-,  $T_N$ ) differenzieren in verschiedene Subtypen nach dem Antigenkontakt [21]. Für gewöhnlich präsentieren T-Zellen verschiedene TCR an ihrer Oberfläche und schütten noch keine Effektor-Zytokine aus. Allerdings gibt es auch einige  $T_N$ , die schon als ein spezifischer T-Zell-Subtyp ausgebildet sind, wie anti-entzündliche natürliche regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) oder pro-inflammatorische  $Th_{17}$ -Zellen (Th: T-Helferzelle), und wiederum andere Zellen, die über periphere Expansion den reduzierten Thymus-Output während des Alterungsprozesses kompensieren. Alle diese Zellarten können Bias in Studien mit erwachsenen Probanden verursachen [23]. Der Phänotyp ändert sich nach der Antigen-Bindung an den TCR zu Effektor-T-Zellen. Dies ist stark abhängig vom umgebenden Milieu [24]. Durch die Weiterentwicklung von Forschungsmethoden, wie Einzel-T-Zellanalysen und Mehrfarb-Durchflusszytometrie, hat sich die Zahl von Effektor-T-Zell-Subtypen in den letzten Jahren gesteigert. Aktuell kategorisiert man in die folgenden humanen Subtypen: Pro-inflammatorische  $Th_1$ ,  $Th_2$ ,  $Th_9$ ,  $Th_{17}$ ,  $Th_{22}$ , folliculäre T-Helferzellen ( $T_{fh}$ ) und anti-inflammatorische induzierte  $T_{reg}$  [25]. Allerdings sind diese Zelltypen unter Umständen instabil, da sie die Plastizität besitzen ihre Eigenschaften zu wechseln, wenn sie erneut stimuliert werden oder unter dem Einfluss bestimmter Zytokine stehen, z. B. werden in chronisch entzündeten Geweben  $Th_{17}$  zu  $Th_1$ -ähnlichen Zellen und  $Th_1$  zu  $T_{reg}$ . Insgesamt ist diese Plastizität noch nicht mechanistisch verstanden [14]. Die folgenden Transkriptionsfaktoren sind mit den spezifischen Subtypen assoziiert:  $Th_1$  mit T-bet,  $Th_2$  mit GATA3,  $Th_9$  mit PU.1,  $Th_{17}$  mit ROR $\gamma$ , induzierte  $T_{reg}$  mit AHR und/oder FoxP3,  $Th_{22}$  mit FOXO4 und  $T_{fh}$  mit Bcl6 [14,23]. Mit dem spezifischen Subtyp sind spezifische Funktionen assoziiert, welche mit der Ausschüttung spezifischer Zytokine einher gehen. Eine zusammenfassende Übersicht der T-Zell-Subtypen ist in Abbildung 1 zu finden. Im Folgenden werden periphere T-Zell-Subtypen mit ihren klassischen Schlüsselzytokinen vorgestellt:

- **$Th_1$**  können über die Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) intrazelluläre Pathogene bekämpfen, indem sie Makrophagen aktivieren sowie einen B-Zellkassenwechsel initiieren [26–28]. Sie produzieren außerdem Interleukin-2 (IL-2), IL-10 und Lymphotoxin [26].
- **$Th_2$**  sekretieren klassisch IL-4, IL-5 und IL-13, um Helminthen (Würmer) zu bekämpfen und eine IgE-Antwort von B-Zellen zu induzieren [26,27].
- **$Th_9$**  sind benannt nach ihrer Ausschüttung von IL-9 und bekämpfen damit extrazelluläre Parasiten [27,28].
- **$Th_{17}$**  sind nach ihrem Zytokin IL-17 benannt und bekämpfen als inflammatorischer Subtyp extrazelluläre Bakterien und Pilze [27,28]. Sie produzieren IL-17A, IL-17F, IL-22 und TNF- $\alpha$  [26].

- **T<sub>fh</sub>** sekretieren IL-21, um als Helferzellen B-Lymphozyten (B-Zellen) zu aktivieren und den Isotypenklassenwechsel zu initiieren [27,28]. Je nach den Zytokinen, IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10, welche sie dominant sezernieren, können sie unterteilt werden in T<sub>fh1</sub>, T<sub>fh2</sub> und T<sub>fh10</sub> [26].
- **Th<sub>22</sub>** sekretieren IL-22 und dienen der Immunabwehr der Haut, des Darms und sind häufig in Autoimmunerkrankungen involviert [26].
- **T<sub>reg</sub>** erhalten die Immuntoleranz über Ausschüttung von Tumorstromafaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und IL-10 aufrecht, wobei sie der einzige anti-inflammatorische Subtyp sind [27].

Die Differenzierung der CD4+ T-Zellen geht unter dem Einfluss regelmäßiger körperlicher Aktivität eher in Richtung der anti-entzündlichen T<sub>reg</sub>. Dies scheint durch das Wachstumshormon TGF- $\beta$ , das im Belastungsserum erhöht ist, vermittelt zu werden [29]. Eine erhöhte Ausdauerleistungsfähigkeit, gemessen über die maximale Sauerstoffaufnahme, geht mit einem erhöhten prozentualen T<sub>reg</sub>-Anteil in Ruhe einher [15]. Nach dem unterschiedlichen akuten Trainingsbelastungen dagegen wurden erhöhte Th<sub>17</sub>, Th<sub>17</sub><sup>-</sup> und T<sub>reg</sub>-Konzentrationen gemessen, wobei Th<sub>17</sub> noch in der Regenerationsphase erhöht blieben. Th<sub>2</sub> scheinen durch eine akute sportliche Belastung nicht beeinflusst zu werden. Zu anderen Effektor-Subtypen fehlen bisher sportimmunologische Daten [15].

Ein geringer Anteil der differenzierten Effektor-Zellen stirbt keinen programmierten Zelltod nach dem Antigenkontakt, sondern wird zum Phänotyp der Gedächtniszellen mit einer verbesserten Funktion bei einem weiteren Antigenkontakt. T<sub>MEM</sub> im peripheren Blut unterscheiden sich ebenfalls. Sie können genauer mittels vier Oberflächenmarkern bestimmt werden: CD45RO, ein Gedächtniszellmarker (oder alternativ und hier nicht weiter beschrieben: CD45RA als Marker von T<sub>N</sub>), C-C-Chemokinrezeptor 7 (CCR7), ein Marker der Homing an den Lymphknoten anzeigt, CD28, ein für die Proliferationsfähigkeit entscheidender Co-Faktor, und CD95, ein Aktivierungsmarker, der anzeigt, ob die Zelle proliferiert [21]. Es wird in fünf verschiedene Gedächtniszellarten unterschieden, bei denen der Differenzierungsgrad ansteigt.

- **Stammzellgedächtniszellen (T<sub>SCM</sub>)** zeigen einen naiven Phänotyp (CD45RA+) bei einer hohen Expression des Aktivierungsmarkers CD95 und haben stammzellähnliche Eigenschaften.
- **Zentrale Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub>)** sind hinsichtlich aller genannten Marker positiv und klassische Gedächtniszellen mit einer verbliebenen stammzellähnlichen Funktion.
- **Terminal-differenzierte Gedächtniszellen (T<sub>TM</sub>)** verlieren das Homing an den Lymphknoten (CCR7-) und sie sind spezifischer differenziert.
- **Effektor-differenzierte Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>)** verlieren zusätzlich die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor (CD28- und CCR7-).
- **Terminal-differenzierte erschöpfte Gedächtniszellen (T<sub>TE</sub>, oder TEMRA-Zellen)** sind terminal-differenziert und können nicht mehr proliferieren (CD95-) [21].

Nach dieser Einteilung der Gedächtniszellen, steigt mit jeder weiteren Stufe der Differenzierung das Homing in der Peripherie, die Effektorfunktion und die Antigenpezifität [21]. Bei erschöpften CD4+ T-Zellen, ist die Proliferationsfähigkeit und Zytokinproduktion reduziert, da zusätzlich eine Hochregulation von Checkpoint-Inhibitoren, wie z. B. CD366 und CD279, die T-Zellaktivierung herunterregulieren [22]. Wie diese T-Zellaktivierung abläuft, ist im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

Akute sportliche Aktivität mobilisiert hochdifferenzierte T-Zell-Subtypen mit Antigenpezifität, Zytotoxizität, Migrationsfähigkeit und spezifischer Zytokinausschüttung. Ein höherer Anteil Zellen mit monoklonalen TCR wird durch submaximale Ausdaueraktivität ins periphere Blut mobilisiert und fällt

eine Stunde nach dem Training auf die Ausgangswerte zurück. Dabei ist der Anteil der polyklonalen TCR in diesem Zeitraum reduziert [30]. CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden durch Ausdauerbelastung im peripheren Blut signifikant erhöht und kehren eine Stunde nach der Belastung wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Nicht nur die Anzahl der Zellen, sondern auch die proportionalen Anteile der Subtypen verändern sich, wobei Anteile der T<sub>EM</sub> und T<sub>TE</sub> ansteigen und erst eine Stunde nach der Belastung auf das Ausgangsniveau zurückkehren, T<sub>TM</sub> prozentual erhöht bleiben [31].

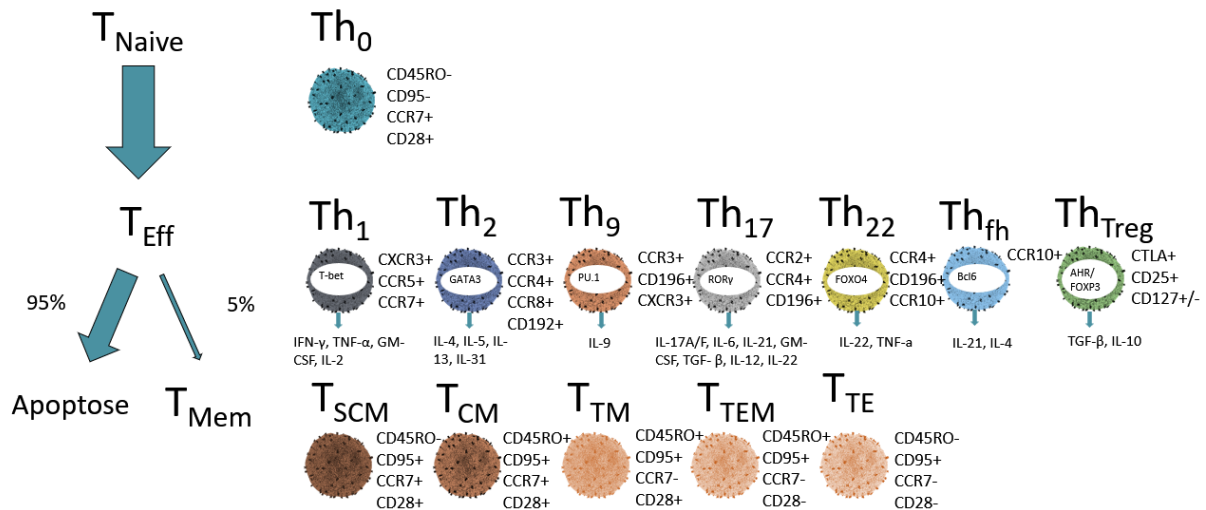


Abbildung 1. Eigene Übersicht der verschiedenen T-Zell-Subtypen mit ihren Transkriptionsfaktoren, Schlüsselzytokinen und Oberflächenmarkern [21,28,32].

### 1.1.1. CD3/CD28-TCR-Aktivierung

Damit die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert werden, binden sie sich über den TCR an Peptidfragmente, die an den MHC-2 gebunden sind. Damit beginnt eine komplexe Signalkaskade aus circa 100 Schlüsselfaktoren (Kinasen, wie ZAP70, Phosphatasen, wie Phospholipase C, Transportern usw.) [33]. In Zellkulturstudien werden als Simulation MHC-2-Tetramere mit Antigenen bestückt, um die Antigenbindung an die T-Zellen zu imitieren [25]. Die Intensität der TCR-Aktivierung wird über die Stärke des Aktivierungssignals als Bead-Zell-Ratio bestimmt und über den Calciumeintritt durch ORAI1-Transporter nach der Aktivierung von Phospholipase C gemessen. Calcium moduliert die Immunantwort über calciumabhängige Kinasen und beeinflusst damit die Transkriptionsfaktoren [33]. In vivo fördert ein starkes Aktivierungssignal die Th<sub>1</sub>-Differenzierung, wogegen schwächere Signale die Th<sub>2</sub>-Differenzierung begünstigen. Bei starker Aktivierung und langer Dauer wird die Expression von Zytokin-Rezeptoren hochreguliert [34]. Welche Transkriptionsfaktoren bei den jeweiligen CD4<sup>+</sup> Subtypen durch die Aktivierung und das Mikromilieu hochreguliert werden, wurde bereits oben besprochen [14,23]. Koinhibierende und -stimulierende Rezeptoren haben ebenfalls einen starken Einfluss auf die Aktivierung [33]. Im Gegensatz zu Mauszellen ist die Bindung an den kostimulierenden Antigenrezeptor CD28 ein notwendiges Signal für die funktionelle Aktivierung [35]. Reduziert werden kann die Aktivierung über koinhibitorische Liganden, die bereits oben erwähnten Checkpoint-Inhibitoren, wie CD279, CD366 oder CD152 [6]. Eine funktionierende TCR-Aktivierung von CD4<sup>+</sup> wird in humanen T-Zellen von einem Anstieg der OXPHOS und GLYC begleitet [35–37]. Der Einfluss des Stoffwechsels auf die T-Zell-Funktionalität wird im nächsten Kapitel genauer beschrieben.

Anhand von peripheren mononukleären Blutzellen (PMBC) konnte gezeigt werden, dass regelmäßiges Ausdauertraining die TCR-Aktivierung über eine erhöhte Expression von Zap70 steigert [38]. Weiterhin ist bei trainierten Mäusen der intrazelluläre Kalziumspeicher erhöht und eine erhöhte Proliferationsfähigkeit von T-Zellen vorhanden [39]. Es könnte auch sein, dass eine sportliche Belastung direkt eine milde T-Zell-Aktivierung auslöst, da der Aktivierungsmarker CD25 sowohl nach einem kombinierten Ausdauer- und Krafttraining als auch nach reinem Krafttraining erhöht war [12]. Ein weiterer Faktor, welcher die T-Zell-Aktivierung beeinflusst, ist eine leicht erhöhte Körpertemperatur [40]. Dies könnte ebenfalls ein Einflussfaktor auf die T-Zelle beim Sport sein, da während intensiver sportlicher Belastung die Körperkerntemperatur um wenige Grad ansteigen kann, sofern die Wärmeproduktion 1000 Watt übersteigt [41].

### 1.1.2. T-Zell-Aktivierung durch spezifische Viren wie SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 wurde erstmals 2019 als neues Beta-Coronavirus beschrieben [42]. Das Virus kann COVID auslösen, welches milde Erkältungssymptome bis akute Atemnot oder eine Myokarditis mit fulminantem Verlauf auslösen kann [43]. SARS-CoV-2 hat einige Gemeinsamkeiten mit anderen humanen Coronaviren (hCoV), wie SARS-CoV-1 oder dem Nahost-Atemwegssyndrom-Coronavirus. Wobei ein besonderes Charakteristikum des SARS-CoV-2 das Spikeglykoprotein mit einer Furin-Spaltstelle ist, welche das Spikeprotein nach dem Eindringen in die Wirtszelle in zwei Untereinheiten, S1 und S2, spaltet. Die S1-Einheit kann sich an Rezeptoren des Angiotensin-konvertierenden Enzym-2 (ACE-2) binden, die S2-Einheit sorgt für die virale Membranfusion. Zu Beginn ging die Forschung davon aus, dass sich SARS-CoV-2 im Menschen ausschließlich mit Hilfe des ACE-2 Rezeptors verbreitet. Heute wird auch von einer Verbreitung über Zell-Zell-Kontakte ausgegangen [42]. Wie bei anderen viralen Infektionen der Atemwege nimmt die virale T-Zell-Immunantwort bei einer SARS-CoV-2 Infektion eine wichtige Rolle ein [44]. Am stärksten dabei ist die T-Zellantwort gegen das Spikeprotein, bei der CD4+ T-Zellen eine wichtige Rolle spielen [45].

Die zelluläre Immunität von T-Zellen ist schon bei früheren hCoV als essenziell für die Kontrolle und Eliminierung der Viren bekannt. Die humorale Immunität über hohe Antikörper-Level, hatte dagegen bei SARS-CoV-1 einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Die T-Zell-Antwort ist über die Gedächtnisfunktion stärker und länger anhaltend als die Antikörperantwort. Sie konnte noch 17 Jahre nach der SARS-CoV-1 Infektion nachgewiesen werden, wobei die B-Zellantwort nach 4 Jahren nicht mehr nachweisbar war [46]. Bei SARS-CoV-2 wurde früh eine Gedächtnisimmunantwort auf 19 verschiedene Virusepitope nachgewiesen. Diese machen etwa 0,05 % des gesamten T-Zell-Repertoires aus. So waren nicht nur in Infizierten, sondern teilweise auch in Nicht-Infizierten SARS-CoV-2-reaktive T-Zellen vorhanden. Jedoch zeigten diese eine geringere Wiedererkennung und Polyfunktionalität [47]. In den verschiedenen Studien hatten etwa 20-35% der nicht-Infizierten bereits spike-reaktive CD4+ T-Zellen [45,48]. Es sind bei Nicht-Infizierten 140 solcher T-Zell-Epitope nachgewiesen, gegen die T-Zellen über eine Kreuzimmunität durch Kontakt mit bereits zirkulierenden hCoV reagieren [49]. Auch andere Anteile von SARS-CoV-2 werden von T-Zellen erkannt, wie das Nukleokapsidprotein, die Membran und Nichtstrukturproteine [50]. Eine T-Zell-Antwort gegen das Nukleokapsid ist in Nicht-Infizierten selten zu finden [51]. Weiterhin zeigen aktuellere Studien, dass die natürliche T-Zellantwort auf SARS-CoV-2 langfristig stabil bleibt, während die Antikörperantwort abnimmt [46,52].

CD4+ von SARS-CoV-2-Infizierten zeigen eine verstärkte Th<sub>1</sub>-Antwort mit Ausschüttung von IL-2, IFN- $\gamma$  und TFN- $\alpha$ , aber auch inflammatorische Zytokine von Th<sub>2</sub>- und Th<sub>17</sub>-Zellen sind nach spikespezifischer T-

Zellaktivierung nachweisbar [45]. Es konnten verschiedene Typen der T-Zell-Immunantwort bei COVID - Patienten im peripheren Blut beobachtet werden. Hinsichtlich der CD4+ T-Zellen hat sich gezeigt, dass ein Th<sub>1</sub>-Phänotyp eher bei leichteren und Th<sub>2</sub>-Phänotyp eher bei schweren COVID-Krankheitsverläufen zu finden ist [46]. Hochregulierte Co-Inhibitoren, wie CD279 und CD366, dagegen, sind mit einem längeren Krankheitsverlauf assoziiert. Eine milde COVID-Erkrankung ist somit positiv mit hoher IL-2-Ausschüttung und einem hohen polyfunktionalen T-Zellanteil korreliert [50]. Es konnte gezeigt werden, dass eine frühzeitige Interferon-Antwort für das passende Milieu sorgt und im Bedarfsfall eine rechtzeitige T-Zellantwort auslöst [46]. Die B-Zellantwort scheint für die Elimination von SARS-CoV-2 weniger relevant zu sein, da ein milder Verlauf negativ mit geringen Konzentrationen des IgG anti-Spikeprotein korreliert [50]. Bei asymptomatisch SARS-CoV-2 positiv-getesteten Probanden polarisieren virusspezifische T-Zellen so, dass ein Gleichgewicht zwischen inflammatorischen Zytokinen und IL-10 hergestellt wird [53]. Bei Symptomlosen mit SARS-CoV-2-Kontakt trat keine T- und B-Zell-Aktivierung im peripheren Blut auf [53]. Dies spricht für eine frühe Viruselimination über die Schleimhautimmunität, sodass SARS-CoV-2 die Schleimhautbarriere nicht überwindet. Dazu passt, dass COVID eine Erkrankung des oberen Respirationstraktes ist, bei denen Viren über Tröpfcheninfektion oder Aerosole aufgenommen werden. Erst wenn die Viren den unteren Respirationstrakt und die Lunge erreichen, verursachen sie bei schwacher Immunfunktion eine schwere COVID-Erkrankung [54].

Fest steht, nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 treten Veränderungen im peripheren Blut auf. Das Zytokinprofil von kürzlich genesenen Patienten ist durch erhöhte Konzentrationen von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, geprägt [55]. Nach einem milden COVID-Verlauf, wurden im Blut hauptsächlich SARS-CoV-2-spezifische CD4+ Gedächtnis-T-Zellen nachgewiesen, die eine erhöhte Th<sub>1</sub>-Antwort bei erneuter Infektion zeigen [55,56]. Die T-Zell-Funktion kann nach viralen Erkrankungen gestört sein. Es ist möglich, dass eine systemische Entzündung noch längere Zeit zurückbleibt. Dies könnte eine Ursache des viel diskutierten Long-COVID-Syndroms sein [57]. Kommt es nach einer mild-verlaufenden COVID-Erkrankung zu langfristigen Folgen wie Long-COVID, geht dies mit einer Reduzierung der T<sub>EM</sub> und einer erhöhten Expressierung von CD279-Rezeptoren auf T<sub>CM</sub> einher -also einer eingeschränkten T-Zell-Funktion [8].

Zu Sport und SARS-CoV-2 und peripheren T-Zellen ist noch wenig bekannt. Fest steht, dass erhöhte körperliche Aktivität mit einem geringen Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf korreliert [58]. Körperlich aktive Menschen haben ein geringeres Erkrankungsrisiko, eine verbesserte Impfeffektivität und ein verringertes Mortalitätsrisiko bei einer SARS-CoV-2-Infektion [4]. Akute sportliche Aktivität bei Sportlern mit natürlicher SARS-CoV-2-Immunität konnte spezifische T-Zellen ins Blut mobilisieren, die auf das Spikeprotein, die Virusmembran und das Nukleokapsid reagieren. Zudem wurden die SARS-CoV-2 neutralisierenden Antikörper im Blut erhöht. In diesem Zusammenhang war die IFN- $\gamma$ -Antwort jeweils am Höchsten für die spikespezifische Zellen. [59]. Die Toxizität des Spikeprotein, unabhängig davon, ob durch eine SARS-CoV-2-Infektion oder durch die neuen COVID-Boten-Ribonukleinsäure(mRNA)- und Adenovector-Impfstoffe in den Körper gelangt, ist gut untersucht. Die Schäden, die durch das Spikeprotein entstehen könnten, werden daher mit der Wortneubildung „Spikopathie“ gewürdigt. Spikopathie beschreibt, dass die mit SARS-CoV-2 zusammenhängenden Krankheitssymptome durch die Bindung des Spikeprotein systemisch in unterschiedlichsten Geweben auftreten können [60]. Zur physiologischen Wirkung der Impfung bei Sportlern ist wenig bekannt. Hinsichtlich akuter Belastung nach der Impfung konnte gezeigt werden, dass es 21 Tage nach der Impfung noch immer zu leicht veränderten Reaktionen auf hochintensive sportliche Belastungen kam. Die Herzfrequenz und Noradrenalin waren durch eine akute Belastung nach der Impfung im Vergleich zu Nicht-Geimpften

signifikant erhöht[61]. Ein Vergleich mit Genesenen fehlte hier und Daten zu CD4+ T-Zellen stehen noch aus.

## 1.2. Der Lebenszyklus von T-Zellen und ihre Funktion

Lymphozyten in sekundären Lymphorganen sind lang lebende Zellen, die aus kurzlebigen lymphatischen Vorläuferzellen in den primären Lymphorganen entstanden sind. Die meisten T-Zellen sind  $T_N$  und verbleiben für längere Zeit in der Interphase der Zellteilung. Erst nach dem spezifischen Antigenkontakt wechseln sie in die Mitosephase, um zu proliferieren und in Effektor-Zellen mit kurzer Lebensdauer zu differenzieren [62]. Die Funktion von T-Zellen lässt sich über verschiedene Prozesse messen. Dazu gehört die Zytokinausschüttung, die Migration, die Proliferation, die Apoptose, die Phagozytose und der Redoxstatus [63]. All diesen Funktionen liegt ein funktionierender Stoffwechsel zugrunde [64]. Da diese kumulative Dissertation insbesondere Bezug zum Stoffwechsel und der Zytokinausschüttung nach der T-Zellaktivierung nimmt, werden im Folgenden diese beiden funktionellen Aspekte genauer beschrieben.

### 1.2.1. T-Zellaktivierung und T-Zellmetabolismus

Der Stoffwechsel ist ein zentraler Regulator der T-Zell-Funktion und steht mit der TCR-Aktivierung in Zusammenhang. T-Zellen haben insgesamt sechs ineinandergreifende übergeordnete Stoffwechselwege: die Glykolyse (GLYC), den Tricarbonsäurezyklus, den Pentose-Phosphat-Weg, die Fettoxidation, die Fettsynthese und den Aminosäure-Stoffwechsel [64]. Durch die Aktivierung des T-Zellrezeptors und Ko-Rezeptors CD28 ändern die Zellen ihre Energiebereitstellung. War die Zelle vorher in einem Ruhezustand, geht sie nach der Aktivierung dazu über anabole Stoffwechselwege zu nutzen, welche die Proliferation unterstützen [65]. Dies geht einher mit einer Hochregulierung von Transportern, Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen einher [66]. Zugleich steigt der Bedarf für Adenosintriphosphat (ATP), Phospholipide, Nukleotide und Koenzyme wie Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), damit Wachstum, Proliferation und die Effektor-Zytokinproduktion möglich werden [65,67–69].

$T_N$  nehmen hauptsächlich freie Fettsäuren auf und nutzen eine hohe mitochondriale oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) und geringe GLYC [36]. Während  $T_N$  metabolisch gering aktiv sind und wenig ATP produzieren, erfolgt nach dem Antigenkontakt ein sogenannter „metabolischer Switch“ auf die schnellere glykolytische ATP-Produktion [65,70]. Es hat sich gezeigt, dass gleichzeitig die OXPHOS erhöht wird, wenn T-Zellen eine Umstellung vom aeroben Stoffwechsel auf die GLYC durchführen [36]. Neben der erhöhten Energieproduktion erhöht sich der Gewinn von Stoffwechselzwischenprodukten, um den Bedarf an Biomaterial für die Zellteilung zu decken [71]. Wenn z. B. das TCR-Signal reduziert ist, wie bei  $T_{TE}$ , ist der Stoffwechselumsatz geringer.  $T_{TE}$  mit ihren Co-Inhibitoren zeigen daher im Gegensatz zu  $T_N$  eine erhöhte GLYC und eine reduzierte OXPHOS in Ruhe und damit eine geringere Fähigkeit zur Proliferation [67]. Unterschiedliche T-Effektorsubtypen weisen ebenfalls teils spezifische Stoffwechselprofile auf. Anti-inflammatorische  $T_{reg}$  regulieren nach der Aktivierung die Fettoxidation und OXPHOS hoch [15]. Andere Effektorzellen, wie  $Th_1$ ,  $Th_2$ ,  $T_{fh}$  oder  $Th_{17}$  zeigen erhöhte Glykolyseraten. Von diesen Zellen weisen  $Th_{17}$  zusätzlich eine erhöhte oxidative Kapazität auf und haben neben hochregulierter GLYC ebenfalls eine erhöhte Fettsyntheserate [72]. Langlebige  $T_{Mem}$  zeigen im Vergleich zu  $T_N$  eine erhöhte basale mitochondriale Atmung und eine erhöhte glykolytische Kapazität. Diese geht einher mit einer höheren Mitochondriendichte, GLUT1-Transportern und Enzymkonzentrationen z. B. Hexokinase 2, Phosphofruktokinase und Laktatdehydrogenase [35].  $T_{Mem}$  haben damit eine erhöhte OXPHOS und respiratorische Kapazität bei der Aktivierung durch den TCR [35,73]. Hinsichtlich der  $T_{Mem}$ -

Subtypen haben  $T_{SCM}$  eine erhöhte proliferative Kapazität und einen erhöhten Fettstoffwechsel,  $T_{EM}$  sind eher glykolytisch aktiv [74].

Es ist möglich, dass Stoffwechselwege wichtig sind, um transkriptionale und epigenetische Programme im Rahmen der T-Zelldifferenzierung zu organisieren. Dabei werden über DNA-Methylierung, post-translationalen Modifikationen von Histonen, Chromatin-Remodellierung und nicht-codierte RNAs die Chromatinstrukturen und Genexpressionen beeinflusst, ohne dass die DNA-Sequenzen selbst verändert werden. Einerseits können Metabolite selbst, andererseits Enzyme oder Cofaktoren epigenetische Veränderungen auslösen [75]. Zum Beispiel wird über nicht-translatierte mRNA, die den GLUT1 encodiert, der TCR von  $T_N$  aktiviert. So wird die GLUT1-Synthese und damit der Glukoseeintritt in die Zelle erleichtert. Die Translation von ACC mRNA vervollständigt den metabolischen Wechsel in Richtung des Effektor-Phänotyps mit erhöhter Fettsäuresynthese und höherer OXPHOS [37]. Weiterhin wirkt eine reduzierte Ratio der Kofaktoren  $NAD^+/NADPH$  der GLYC auf die Sirtuin Histon-Deacetylase und die SIRT1 Expression, sodass die GLYC reduziert wird [15]. Auch Stoffwechselsubstrate können die T-Zell-Funktion beeinflussen. Erhöhtes Laktat erhöht reaktive Sauerstoffspezies und destabilisiert damit den Hypoxie-induzierten Faktor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) ähnlich, als wenn eine hypoxische Umgebung besteht. Somit erhöht sich die mTORC1-PPAR $\gamma$ -STAT3-Aktivität und eine Polarisation in Richtung  $Th_{17}$ -Zellen. In dieser Umgebung reduzieren die Zellen ihre Motilität und regulieren den Laktattransporter SLC5A12 hoch [76]. Bei hochintensivem Ausdauer- oder Krafttraining haben erhöhte Laktatwerte einen Zusammenhang von erhöhter STAT3-Aktivität und höheren Anteilen von  $Th_{17}$ -Subtypen gezeigt. Ausdauertraining konnte damit das Gleichgewicht zwischen  $Th_{17}/T_{reg}$  in Richtung  $Th_{17}$  verändern [77]. Eine reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit kann die gleichen Folgen haben und HIF- $1\alpha$  der  $CD4^+$  destabilisieren [78]. Andere Metabolite wie Aminosäuren [79], kurzkettige Fettsäuren [80] und Omega-3-Fettsäuren [81] und ihre Immunfunktion wurden bereits in Übersichtsarbeiten aufbereitet.

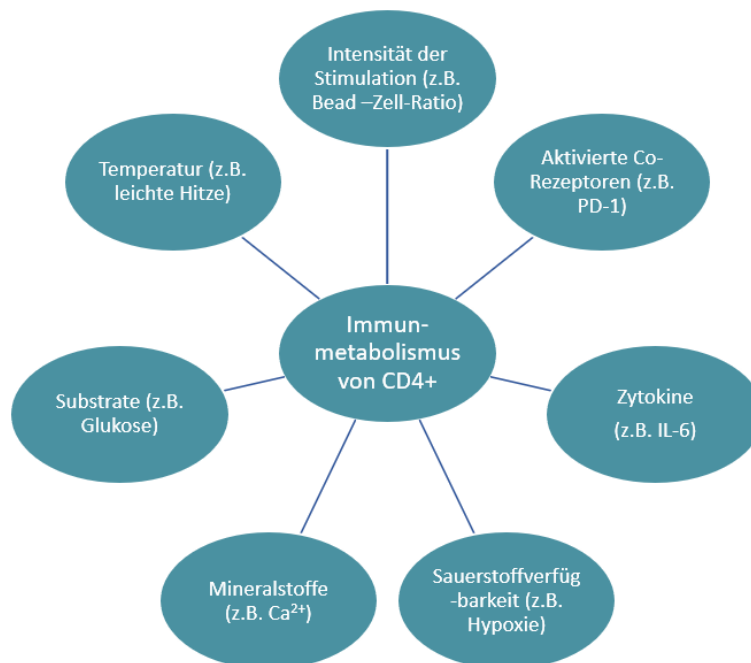


Abbildung 2. Eigene Abbildung der verschiedenen Einflussfaktoren auf den T-Zellmetabolismus durch Veränderungen im peripheren Blut bei akuter sportlicher Belastung [77].

Wie Multi-Omic-Analysen nahelegen, gibt es eine Interaktion zwischen Immunsystem, Stoffwechsel und Stressbelastung nach akuter Laufbelastung [82]. Bei akuter sportlicher Aktivität verändern sich die Proportionen von 1000 verschiedenen Molekülen, worunter neben Zytokinen ebenfalls Substrate sind [83]. Die Hauptenergiequelle für T-Zellen für die Ausübungen der TCR-Funktion ist Glukose.  $T_N$  und  $T_{CM}$

verringern die Ausschüttung von IFN- $\gamma$ , wenn die Glukoseverfügbarkeit reduziert ist. Als alternativen Stoffwechselweg erhöhen T-Zellen dann die OXPHOS und den Fettstoffwechsel, was mit einer Erhöhung des CD36-Transporters, einer erhöhten Autophagozytose und der Einschleusung von Glutamin für die Biosynthese einhergeht [84]. Die Energieverfügbarkeit ist während des Sporttreibens weitestgehend sichergestellt. Solange die Sportler nicht nüchtern sind oder bei langandauernden Belastungen keine Kohlenhydrate zuführen, ist die Verfügbarkeit von Glukose im Sport ausreichend und freie Fettsäuren werden sogar erhöht [82,85]. Einzig bei Athleten im Übertraining, reduziert sich das Glutamin im Blutplasma, wie z. B. nach acht Wochen hochintensivem Intervalltraining, sodass bei diesen Athleten das Risiko einer Immunsuppression erhöht ist [86].

### 1.2.2. T-Zellaktivierung und Zytokinausschüttung

Wie nach der Aktivierung unterschiedliche T-Zell-Subtypen polarisieren, wurde bereits im vorherigen Kapitel beschrieben. Die Ausbildung dieser Subtypen ist neben den bisher beschriebenen Faktoren vom umgebenden Zytokinmilieu abhängig. So konnte gezeigt werden, dass sich spezifische T-Zell-Subtypen durch den Einfluss spezifischer Schlüsselzytokine ausbilden:

- Th<sub>1</sub> durch IL-2, IL-12 und IFN- $\gamma$  oder durch IL-18 und IL-12 [24,87]
- Th<sub>2</sub> durch IL-2 und IL-4 [24]
- Th<sub>9</sub> durch TGF- $\beta$  und IL-4 [23]
- Th<sub>17</sub> durch IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23 und TGF- $\beta$  [24]
- Th<sub>22</sub> durch IL-6 und IL-23 [23]
- T<sub>fh</sub> durch IL-2, TGF- $\beta$ , IL-12, IL-23 und Activin A [26]
- T<sub>reg</sub> durch IL-2 und TGF- $\beta$  [24,88]

Die Effekte von T-Zell-Zytokinen sind pleiotrop und teilweise kaum verstanden. Als Beispiel dafür werden hier die Wirkung von IL-6 und IL-18 auf die Differenzierung dargestellt. IL-6 ist schon seit dem Jahr 1986 bekannt. Trotzdem sind die unterschiedlichen Funktionen noch nicht vollständig verstanden. IL-6 wird von antigen-präsentierenden Zellen und verschiedenen anderen Zellarten, z. B. Fibroblasten, ausgeschüttet. Neben der bekannten pro-inflammatorischen Wirkung als Wachstumsfaktor für B-Zellen und deren Antikörperproduktion, wirkt IL-6 auf die CD4+ T-Zellen. IL-6 inhibiert die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung von Th<sub>1</sub>-Zellen und TGF- $\beta$ -Ausschüttung von T<sub>reg</sub>. Dagegen verstärkt es die IL-4-Ausschüttung von Th<sub>2</sub> und die Ausschüttung von IL-17 von Th<sub>17</sub> - letzteres unterstützt von TGF- $\beta$ . Seit bekannt ist, dass IL-6 die Fähigkeit von T<sub>fh</sub> IL-21 auszuschütten beeinflusst, ist möglicherweise davon auszugehen, dass IL-6 nur indirekt über die IL-21-Ausschüttung auf die CD4+ einwirkt [89].

IL-18 dagegen wurde erstmals 1989 in Mäusen als IFN- $\gamma$  induzierender Faktor beschrieben und die pleiotrope Wirkung ist weniger gut erforscht. Durch ein Milieu mit IL-12, IL-15 und IL-18 werden Th<sub>1</sub> und damit die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung induziert. In Abwesenheit von IL-12 zeigte sich ebenfalls eine Wirkung von IL-18 auf die Th<sub>2</sub>-Differenzierung, einhergehend mit erhöhten IL-4-Konzentrationen und erhöhten Immunglobulin-E. Weiterhin erhöht IL-18 die Zytokinausschüttung von Th<sub>17</sub>, wenn Th<sub>17</sub> bereits differenziert sind. Ein Großteil dieser Ergebnisse zu IL-18 bezieht sich bisher auf Mausstudien [90]. Es ist zudem zu beachten, dass die Wirkung von Zytokinen, wie u.a. IL-18, jeweils von der Expressierung des Rezeptors auf anderen Zellenarten und von den Bindungsproteinen im Plasma mit einer inhibierenden Wirkung abhängig ist [90]. Aufgrund der besseren Übersicht wurde in dieser Arbeit jedoch weder auf die inhibierenden Proteine, noch auf die Wirkung inhibierende Zytokine eingegangen.

Myokine aus der Muskulatur sezernieren ebenfalls Zytokine und erlauben die Kommunikation zwischen dem Muskel und anderen Gewebearten. An dieser Stelle nimmt sportliche Aktivität potenziell auf CD4+ T-Zellen Einfluss, da durch akute sportliche Belastung und Training Zytokine aus dem Muskelgewebe ins periphere Blut gelangen [77]. In den unterschiedlichen Muskelfasertypen sind in Ruhe spezifische Zytokine exprimiert. In anaeroben Muskelfasern konnte eine erhöhte Genexpression von IL-6 gegenüber aeroben Fasern nachgewiesen werden. Dagegen ist die Expressierung von TNF- $\alpha$  und IL-18 in schnell-zuckenden, anaeroben Fasern erhöht [91]. Nach akuter sportlicher Belastung, wie einem Radmarathon, zeigten sich reduzierte IL-18-Konzentrationen im peripheren Blut bei einer gleichzeitigen Hochregulation von inhibierenden IL-18-Bindungsprotein. Ob dies eine regulatorische Funktion hat bleibt unklar [92]. Auch langfristiges Ausdauertraining über sechs Monate reduzierte die IL-18 Konzentration im Serum bei gesunden Männern [93].

Die Konzentration von IL-6 nach akuter Belastung ist abhängig von Intensität und Dauer der Aktivität, weniger von der Trainingsform [94]. Die IL-6-Ausschüttung der Muskulatur scheint dabei hauptsächlich mit dem Stoffwechsel zusammenzuhängen. Ein höherer Glykogengehalt der Muskulatur vor der Ausdauerbelastung und eine kontinuierliche Zufuhr von Glucose währenddessen verringern die Ausschüttung von IL-6 ins Plasma [95,96]. Eine Übersicht weiterer inflammatorischer Zytokine, die durch Ausdauersport beeinflusst werden, ist bei Barros et al. ausführlicher zu finden [97]. Abschließend sind alle genannten Einflüsse durch Sport auf die T-Zell-Funktion durch Veränderungen im peripheren Blut als Übersicht nochmals in Abbildung 2 zusammengefasst.

## 2. Zielstellungen und Hypothesen

Im Rahmen dieser kumulativen Dissertation werden funktionelle Aspekte nach sportlicher Belastung und nach SARS-CoV-2-Infektion von CD4+ T-Zellen analysiert. Dabei steht im Mittelpunkt, wie sich eine akute sportliche Belastung oder kontinuierliches Training auf die Funktion von CD4+ bei anti-CD3/CD28-Aktivierung auswirkt [2,3]. Für die untergeordneten Studienabschnitte ergeben sich damit die folgenden Zielstellungen und Hypothesen:

### 2.1. Studienabschnitt 1: Palmowski et al., 2021

Das Beeinflussen des Stoffwechsels von T-Zellen ist eine der vielversprechendsten pharmakologischen Interventionen, um Übergewicht, die Zellalterung und andere Komorbiditäten zu reduzieren [10]. Dass Laufbelastungen einen Einfluss auf den CD4+ T-Zell-Stoffwechsel haben, ist wahrscheinlich, da die systemische Zytokinantwort auf eine sportliche Belastung die Immunmodulation begünstigt [98]. Zudem konnte bei PBMC von Trainierten nach einer akuten sportlichen Belastung ein um 13 % erhöhter Sauerstoffverbrauch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Für die einzelnen T-Zell-Subtypen und den Einfluss einer T-Zell-Stimulation fehlen bisher Studiendaten [99].

**Zielstellung:** Es soll gezeigt werden, ob sich eine CD4+ T-Zell-Aktivierung nach einer akuten sportlichen Laufbelastung auf Stoffwechselfparameter auswirkt [3].

**Hypothese:** Nachbelastungsserum setzt den T-Zell-Immunmetabolismus nach der T-Zell-Aktivierung herab. Die Glykolyserate ist reduziert, der Sauerstoffverbrauch vermindert, die Viabilität geringer, das Wachstum in der G1 -Phase kleiner und der T-Zell-Phänotyp verändert.

### 2.2. Studienabschnitt 2: Palmowski et al., 2023

CD4+ T-Zellen sind ein wichtiger Teil der viralen zellulären Immunabwehr, wobei insbesondere spikespezifische T-Zellen einen wichtigen Beitrag zur SARS-CoV-2-Immunabwehr leisten [45]. Sowohl nach der Infektion als auch nach der Impfung sind spikespezifische T-Zellen im peripheren Blut nachweisbar, welche bei der Aktivierung, insbesondere TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sezernieren [45,100]. Zum Zeitpunkt der Studie gab es keine Daten zur T-Zell-Aktivierung von T-Zell-Subtypen nach einer SARS-CoV-2-Infektion bei Sportlern [101]. Es stellte sich die Frage, ob die T-Zell-Funktion zum Zeitpunkt des Wiedereinstiegs ins Training unverändert bleibt [2]. Eine Rückkehr des Immunsystems zur Homöostase ist entscheidend für die langfristige Gesundheit der Sportler, da es nach Virusinfektionen selten zu autoreaktiven T-Zellen als häufiger Auslöser einer Myokarditis kommt [102]. Eine Myokarditis ist die Hauptursache des plötzlichen Herztod bei Sportlern in Deutschland [103].

**Zielstellung:** Es soll festgestellt werden, ob die T-Zell-Funktion nach einer SARS-CoV-2-Infektion bei Sportlern verändert ist. Dazu sollen T-Zell-Zytokine, welche eine Relevanz für die Subtyp-Differenzierung haben und Schlüsselzytokine von T-Zell-Subtypen sind, vor und nach der in vitro Aktivierung von CD4+ T-Zellen von genesenen und nicht-infizierten Profisportlern gemessen werden. Da diese Studie einen explorativen Ansatz verfolgt, wurden viele zusätzliche klinische Daten in Bezug zu den Zytokinen analysiert.

**Hypothese:** Die T-Zell-Funktion (hier das Zytokinprofil) von SARS-CoV-2-infizierten Sportlern im Vergleich zu SARS-CoV-2-naiven Sportlern geht mit einer erhöhten Zytokinkonzentration von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  einher.

### 3. Methodik und Studiendesign

#### 3.1. Studiendesign: Palmowski et al., 2021

Der erste Studienabschnitt hatte den Charakter einer Pilotstudie und sollte gleichzeitig die PreSens-Sauerstoffmessung im Labor etablieren. Er teilt sich aufgrund des Laborwechsels von Hannover nach Gießen in zwei Studienteile. Dazu durchliefen im ersten Studienteil fünf und im zweiten Studienteil sieben gesunde Probanden zunächst eine grundlegende Leistungsdiagnostik. Darauf Bezug nehmend wurde eine Woche später eine auf die Leistungsfähigkeit abgestimmte Laufbelastung bei 70 % der maximalen Sauerstoffaufnahme für 25 Minuten und 95 % der maximalen Sauerstoffaufnahme für die abschließenden fünf Minuten durchgeführt. Blutentnahmen wurden vor und nach dieser Laufbelastung durchgeführt, um autologes Serum für die Zellkultur zu gewinnen. Zuletzt wurde bei einem Abschlusstermin frisches peripheres Blut für die Zellkulturexperimente abgenommen (siehe Abbildung 3, Studienteil 1) und die Zellkulturversuche durchgeführt. Zur Standardisierung wurde:

- die Laufbelastung und Blutentnahmen immer zu gleichen Zeit zwischen 8 und 11 Uhr durchgeführt
- kein Koffein und Alkohol am Tag der Blutentnahme aufgenommen
- die letzten 24 Stunden kein Training durchgeführt
- die letzten 48h kein intensives Training durchgeführt
- vor jeder Laufbelastung das gleiche individuell-verträgliche Frühstück gegessen
- ein Infekt-Tagebuch geführt, um Infekte im Rahmen des Studienzeitraums ausschließen zu können

Mittels PreSens-Messung wurde alle zwei Minuten die Sauerstoffkonzentration der Zellkultur im Medium gemessen. Im ersten Teil über 72 und im zweiten Teil über 48 Stunden. Nach der 48 Stunden Zellkultur wurden folgende Analysen durchgeführt:

- Zellzahl-, Viabilität- und Zellgrößenbestimmung mittels CASY® Zellzähler
- Messung der T-Zell-Zytokine mittels Multiplex enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) aus Überständen: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-23, IL-27, IFN- $\gamma$ -R1
- Messung der mRNA gewonnen aus den Zelllysaten mittels Polymerase-Kettenreaktion: Primer HK1, LDHA, ATP5J, COX4I1, NDUFA12, IDH1, ODGH, FOXP3, RPS6KB1 und PRKAA1
- Messung des T-Zell-Phänotyps und Aktivierungsstatus mittels Durchflusszytometrie: CD95, CD45RA, CCR7, CD4 und Lebend-Tod-Färbung
- Messung der Laktat und Glukosekonzentration mittels Amperometrie aus den Überständen [3]

#### 3.2. Studiendesign: Palmowski et al., 2023

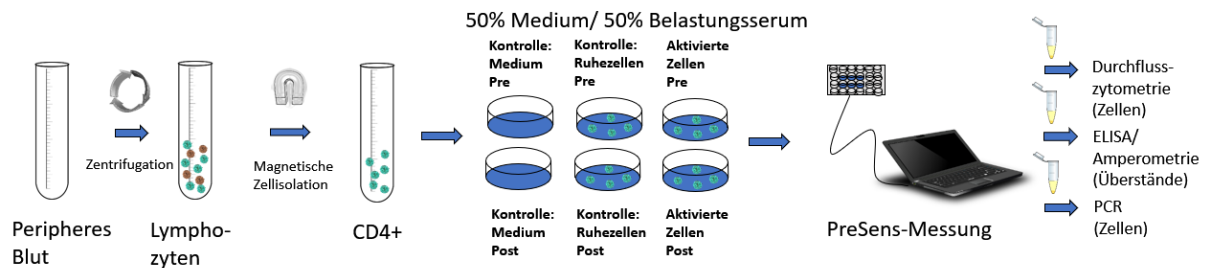
Der zweite Studienabschnitt hatte einen explorativen Charakter und wurde in Zusammenarbeit mit der Angiologie des Uniklinikum Giessen und dem Zentrum für Tumor- und Immunbiologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Alle Probanden sind Teil einer kontrollierten Registerstudie, bei der hämatologische und kardiovaskuläre Daten von Profimannschafts-Sportlern im Rahmen der Sporttauglichkeitsuntersuchung vor dem Saisonstart erhoben wurden. Während des Saisonverlaufs wurden insgesamt sieben SARS-CoV-2-infizierte Leistungssportler in die Studie eingeschlossen. Die Datenerhebung erfolgte zum Zeitpunkt der medizinischen Leistungsdiagnostik vor dem Wiedereinstieg

ins Training und nach Ablauf der Quarantäne. Beim Wiedereinstieg ins Training nach der Saisonpause wurden zusätzlich acht bisher nicht-infizierte Leistungssportler in die Studie eingeschlossen. Zu den Messzeitpunkten wurde jeweils in Ruhe frisches peripheres Blut abgenommen, das für die Zellkulturexperimente genutzt wurde. Nach der 72 Stunden Zellkultur wurden folgende Analysen durchgeführt:

- Zellzahl-, Viabilität- und Zellgrößenbestimmung mittels CASY® Zellzähler
- Messung der T-Zell-Zytokine mittels Multiplex ELISA aus Überständen: IL-2, IL-4, IL-5, IL-1β, IFN-α, IFN-γ, TNF-α, Monocyte-chemoattractant-protein-1 (MCP-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-12p70, IL17A, IL-18, IL-23 und IL-33
- Intrazelluläre Messung der Zytokine mittels Durchflusszytometrie: IFN- γ und TNF- α
- Messung der Antikörper mittels Elektrochemiluminescence: Spikeprotein und Nukleokapsidprotein [2]

Details zu beiden Studienabschnitten sind in den veröffentlichten Publikationen beschrieben. Das Studiendesign ist hier zur besseren Übersicht in Abbildung 3 dargestellt.

**Studienteil 1**



**Studienteil 2**

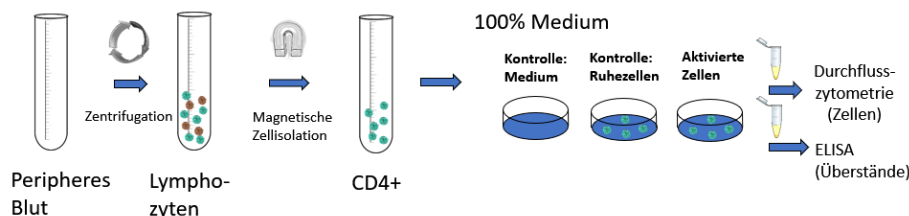


Abbildung 3. Eigene Abbildung des Studiendesigns [2,3].

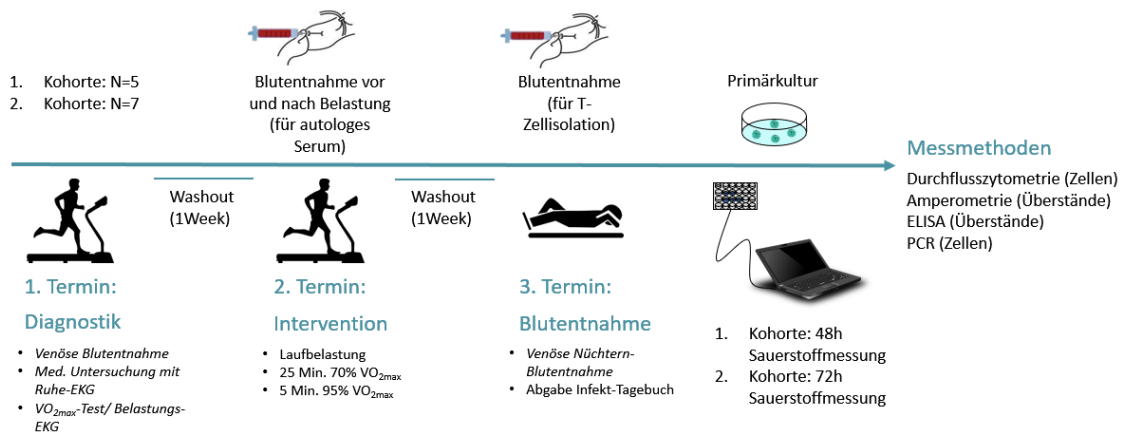
### 3.3. Zellkulturmethoden: Palmowski et al. 2021 und 2023

Das Kernstück dieser kumulativen Dissertation waren die Zellkultur-Experimente. Es wurden je nach Studiendesign jeweils aus frischem peripherem Blut von Läufern, Nichtsportlern und Profimannschaftssportlern Lymphozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation und CD4+ T-Zellen über negative Selektion mittels Beads isoliert, um diese später mit anti-CD3/CD28-Tetrameren unter Zugabe von IL-2 zu aktivieren. Die Blutentnahmen fanden vor und nach einer akuten Laufbelastung oder nach einer SARS-CoV-2-Virusinfektion statt und waren standardisiert [2,3]. Die Zeit bis zum Beginn der Experimente betrug maximal 30 Minuten, sodass die Proliferation nach CD28-Stimulation nicht durch Lagerungszeit beeinträchtigt sein konnte [104].

Im ersten Studienteil wurden dafür die Zellen ( $1 \times 10^6$  pro Well) entweder in Ruheserum oder in Zellkulturmedium mit anteilig 50% autologem Belastungsserum supplementiert, um die Unterschiede zwischen den Milieus vor und nach dem Ausdauersport auf die T-Zell Aktivierung zu testen [3]. Im zweiten Studienteil wurden die Zellen ausschließlich in Medium kultiviert, um Einflüsse durch die

sportliche Aktivität auszuschließen [2]. Das Medium war abgestimmt auf die speziellen Bedürfnisse der T-Zellen. Es bestand aus Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium mit Glutamin, essentiellen und nicht-essentiellen Vitaminen, Pyruvate,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Penicillin und Streptomycin [2,3]. Für die Aktivierung wurden anti-CD3/CD28 Tetramere ausgewählt, da für humane T-Zellen eine Aktivierung des Co-Rezeptors CD28 physiologisch relevant ist. Wird eine Stimulation mittels Phytohemagglutinin oder Concavalin A durchgeführt, erfolgt ausschließlich eine Bildung an Glykoproteine der Zellmembran und den CD3-Rezeptor, nicht an CD28 [105]. Im ersten Studienabschnitt wurde anteilig zusätzlich der Sauerstoffgehalt mittels Sensor durch das PreSens-Gerät durchgehend gemessen [3]. Dies war für den zweiten Teil des ersten Studienabschnitts ebenfalls angedacht. Jedoch waren die Sauerstoff-Messergebnisse aufgrund von Vibrationen der Lüftungsanlage in den neuen Laborräumlichkeiten in Gießen über alle Vorversuche hinweg konstant, da es zu einer konstanten Diffusion des Sauerstoffs ins Medium kam. Weil die Lüftungsanlage aus arbeitssicherheitstechnischen Gründen dauerhaft eingeschaltet sein musste, konnte die Messung im neuen Labor nicht etabliert werden. Der methodische Ablauf der Zellkulturmethoden ist in Abbildung 4 dargestellt.

**Studienteil 1**



**Studienteil 2**

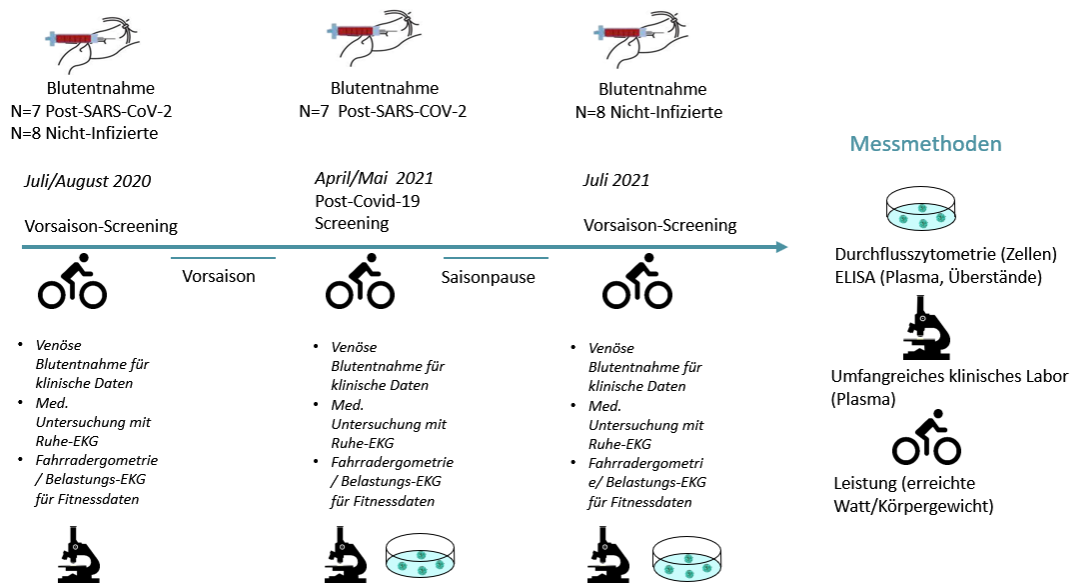


Abbildung 4. Eigene Abbildungen des methodischer Ablaufs der Labormethoden der beiden Studienteile 1 und 2 [2,3].

Für die Studiendurchführung mit Sauerstoffmessung wurden die Bedingungen der Zellkultur so standardisiert, dass während des Experiments nur die veränderte Zellzahl und der veränderte Sauerstoffverbrauch der Zellen einen Einfluss auf die Sauerstoff-Messung haben kann. Einflüsse auf den Sauerstoffgehalt einer Zellkultur haben neben Zellzahl und Sauerstoffverbrauch: der Partialdruck, die Löslichkeit, die Temperatur, das Diffusionspotential und das Höhenvolumen des Mediums [3,106]. Als zusätzliche Kontrollen wurden im ersten Studienteil reines Medium mit Ruhe- oder Belastungsserum mitgeführt [3]. Die Temperatur lag jeweils bei 37°C und der CO<sub>2</sub>-Gehalt bei 5%. Diese Bedingungen wurden in den Versuchen ohne Sauerstoffmessung ebenfalls konstant gehalten [2,3]. Eine Übersicht zu den Zellkulturbedingungen siehe Abbildung 5.

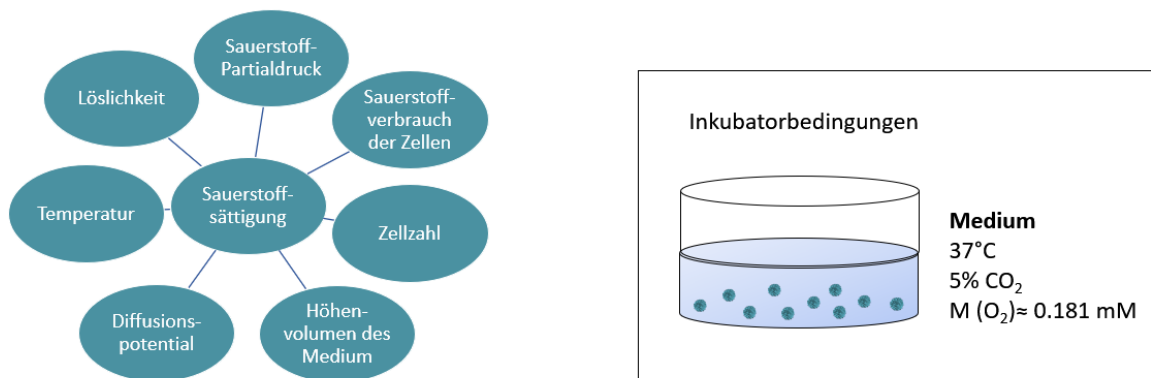


Abbildung 5. Eigene Abbildung zu Einflüssen auf die Sauerstoffsättigung und Zellkulturbedingungen der beiden Studienabschnitte [2,3,106].

## 4. Publikationen

Die Ergebnisse der jeweiligen Studienabschnitte wurden in zwei Originalarbeiten veröffentlicht, die nachfolgend in diesem Kapitel eingebunden sind. Die Ergebnisse des ersten Studienabschnitts wurden in der Fachzeitschrift *Immuno* [3], die des zweiten Studienabschnitts in *Frontiers of Physiology* veröffentlicht [2].

### 4.1. The impact of exercise serum on selected parameters of CD4+ T cell metabolism

**Palmowski, J.,** Gebhardt, K., Reichel, T., Frech, T., Ringseis, R., Eder, K., Renner-Sattler, K. & Krüger, K. (2021). The impact of exercise serum on selected parameters of CD4+ T cell metabolism. *Immuno*, 1(3), 119-131.




DOI: 10.3390/immuno1030008

URL: <https://www.mdpi.com/2673-5601/1/3/8>

**Ergebnis:** Nachbelastungsserum allein setzt den T-Zell-Immunmetabolismus nach der T-Zell-Aktivierung nicht herab. Die Glykolyserate ist nicht reduziert, der Sauerstoffverbrauch nicht signifikant vermindert. Unverändert bleiben die Viabilität, das Wachstum in der G1 -Phase und der T-Zell-Phänotyp. Die Expression der HK1-mRNA war durch das Belastungsserum signifikant reduziert ( $p=0,033$ ).

## Article

# The Impact of Exercise Serum on Selected Parameters of CD4+ T Cell Metabolism

Jana Palmowski <sup>1</sup> , Kristina Gebhardt <sup>1</sup>, Thomas Reichel <sup>1</sup>, Torsten Frech <sup>1</sup>, Robert Ringseis <sup>2</sup> , Klaus Eder <sup>2</sup> , Kathrin Renner-Sattler <sup>3</sup> and Karsten Krüger <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Exercise Physiology and Sports Therapy, Institute of Sports Science, Justus-Liebig University Giessen, 35394 Giessen, Germany; jana.palmowski@sport.uni-giessen.de (J.P.); kristina.gebhardt@sport.uni-giessen.de (K.G.); thomas.reichel@sport.uni-giessen.de (T.R.); torsten.frech@sport.uni-giessen.de (T.F.)

<sup>2</sup> Institute of Animal Nutrition and Nutrition Physiology, Justus-Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany; robert.ringseis@ernaehrung.uni-giessen.de (R.R.); Klaus.Eder@ernaehrung.uni-giessen.de (K.E.)

<sup>3</sup> Regensburg Center for Interventional Immunology (RCI), 93053 Regensburg, Germany; Kathrin.Renner-Sattler@klinik.uni-regensburg.de

\* Correspondence: Karsten.Krueger@sport.uni-giessen.de



**Citation:** Palmowski, J.; Gebhardt, K.; Reichel, T.; Frech, T.; Ringseis, R.; Eder, K.; Renner-Sattler, K.; Krüger, K. The Impact of Exercise Serum on Selected Parameters of CD4+ T Cell Metabolism. *Immuno* **2021**, *1*, 119–131. <https://doi.org/10.3390/immuno1030008>

Academic Editor: Juan Bautista De Sanctis

Received: 18 May 2021

Accepted: 18 June 2021

Published: 22 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** CD4+ T cells are sensitive to peripheral changes of cytokine levels and metabolic substrates such as glucose and lactate. This study aimed to analyze whether factors released after exercise alter parameters of human T cell metabolism, specifically glycolysis and oxidative phosphorylation. We used primary human CD4+ T cells activated in the presence of autologous serum, which was collected before (CO) and after a 30-min exercise intervention (EX). In the course of activation, cells and supernatants were analyzed for cell viability and diameter, real-time oxygen consumption by using PreSens Technology, mRNA expression of glycolytic enzymes and complexes of the electron transport chain by real-time PCR, glucose, and lactate levels in supernatants, and in vitro differentiation by flow cytometry. EX did not alter T cell phenotype, viability, or on-blast formation. Similarly, no difference between CO and EX were found for CD4+ T cell activation and cellular oxygen consumption. In contrast, higher levels of glucose were found after 48 h activation in EX conditions. T cells activated in autologous exercise serum expressed lower HK1 mRNA and higher IFN- $\gamma$  receptor 1. We suggest that the exercise protocol used was not sufficient to destabilize the immune metabolism of T cells. Therefore, more intense and prolonged exercise should be used in future studies.

**Keywords:** energy metabolism; T cell; exercise bout; glycolysis; oxidative phosphorylation; T cell receptor; Warburg effect; primary cell culture

## 1. Introduction

Obesity, aging, and associated co-morbidities commonly lead to metabolic reprogramming of human cells [1]. It becomes more and more evident that metabolism tightly controls T cell effector function [2]. Therefore, targeting metabolic pathways of T cells is a promising therapeutic intervention [3]. The main focus lies on drugs that inhibit or enhance metabolic pathways to restore cellular homeostasis [4]. However, exercise interventions may be more economically and equally promising. First, exercise is known as an acute metabolic stressor for the human body that counteracts factors leading to metabolic reprogramming [5,6]. For instance, exercise regulates glycolysis by increasing insulin sensitivity and improves glucose control [7]. Second, exercise-induced changes such as increased production of reactive oxygen species or changes of the metabolic environment are also known to modulate immune cell function, in particular those of CD4+ T cell [8–11].

CD4+ T cells have a remarkable metabolic plasticity using six intertwined metabolic pathways: glycolysis, tricarboxylic acid (TCA) cycle, pentose phosphate pathway, fatty acid oxidation, fatty acid synthesis, and amino acid metabolism [12]. Antigen-activation by

major histocompatibility complex-2 class antigens initiates metabolic reprogramming to support biosynthesis of phospholipids, nucleotides, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate for proliferation, and provide adenosine triphosphate for energy demand [13,14]. Quiescent human CD4<sup>+</sup> T cells increase glycolysis but also oxidative phosphorylation upon activation [15–17]. The increase in glycolysis is associated with the upregulation of substrate transporters and transcription factors as well as increased Akt activity [15]. Basal metabolism shifts to glucose metabolism fueling the pentose phosphate pathway, serine biosynthetic pathway, and pyruvate for the TCA by its intermediates and finally T cells can display the Warburg phenotype, converting glucose primarily into lactate. This way a proper proliferation is established [12]. Simultaneously, there is an increase in oxidative phosphorylation and, finally, metabolic reprogramming towards an increased fatty acid synthesis allowing proper T cell polarization [17].

Many studies have examined human peripheral lymphocyte proliferation after acute exercise using non-specific mitogen activation and showing inconsistent findings for different duration of aerobic exercise. A small tendency towards a reduced proliferative function after acute exercise intervention lasting longer duration exercise was found [18]. The question remains if these results account for proportional shifts of T cells within the circulatory system or exercise-induced suppression of certain T cell functions [19]. In contrast, data on the impact of exercise on metabolism of CD4<sup>+</sup> T cells is scarce. Only a few studies have analyzed the activation of isolated CD4<sup>+</sup> T cells so far. These studies suggest a higher activation status of CD4<sup>+</sup> T cells after exercise [20,21]. It is known that many molecules including metabolites are affected by an acute bout of exercise [22] and T cells are sensitive to their microenvironment such as available substrates, e.g., glucose and amino acids [16,23]. To understand the effect of exercise on CD4<sup>+</sup> immunometabolism, we need investigations on how CD4<sup>+</sup> T cells react to the exercise-induced environment. Perry et al. found higher inflammatory Th17 cell numbers after lymphocyte incubation in exercise serum from trained athletes after a half marathon [24]. In contrast, Dorneles et al. found a higher number of immunosuppressive CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>/CD39<sup>+</sup> T cells when incubating lymphocytes with serum after acute exhaustive exercise from obese men [25,26]. However, the metabolic function of CD4<sup>+</sup> T cells after activation in the context of exercise remains unknown independent of exercise duration.

Our study aims to close this knowledge gap by studying the metabolic phenotype of CD4<sup>+</sup> T cells cultured in autologous sera taken before and after an exercise intervention. The hypothesis of this study was that exercise serum suppresses various parameters of immunometabolism in CD4<sup>+</sup> T cell following T cell receptor activation. We expected not just glycolysis and basal oxygen consumption to be reduced, but also a lower viability, reduced on blast-formation, and an altered T cell phenotype.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Participants

We recruited five males as cohort 1. All participants were preliminarily screened for health and cardiovascular fitness. Characteristics of these participants were young age ( $25.3 \pm 3.3$  years), health, and a normal body mass index (BMI,  $22.3 \pm 1.9$  kg/m<sup>2</sup>). Their maximal oxygen consumption (VO<sub>2max</sub>) ranged from 45 to 64.1 mL·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. The study protocol for cohort 1 was approved by the Ethics Commission of the Medical Chamber of Lower Saxony (Hannover, Germany, Bo/06/2018). For a second study arm, we recruited seven healthy, non-smoking voluntary males as cohort 2. They had a normal BMI ( $22.6 \pm 2.5$  kg/m<sup>2</sup>), were young ( $23.43 \pm 2.0$  years), and all passed the medical examination. VO<sub>2max</sub> ranged from 43.6 to 75 mL/kg/min ( $55.94 \pm 10.4$  mL·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>). None of the participants reported taking any performance-enhancing drugs and supplements, despite one participant who reported taking plant-based supplements on a regular basis. To assure no interference with infections throughout the whole study period participants logged their health status as described elsewhere [27]. All participants reported being free of any infection symptoms two weeks before each blood sampling. The study protocol of cohort 2

was approved by the local ethics committee of the University Giessen (Giessen, Germany, No. 2020-0007).

### 2.2. Exercise Intervention and Blood Sampling

At least one week after the screening, the exercise intervention took place including blood sampling for autologous sera before and after. Participants ran 30 min straight on the treadmill. For the first 25 min, the participants ran at an intensity corresponding to 70% of their  $VO_{2max}$ . For the last 5 min, the intensity was increased up to 95% of  $VO_{2max}$  to ensure exhaustion. At 10 min before and 10 min after exercise we sampled blood serum from the antecubital vein in a lying position. This protocol was feasible for trained and untrained subjects in our preliminary trials without an early termination due to exhaustion. A total of 30 mL of peripheral blood was collected in serum gel vacutainers (Sarstedt, Nuembrecht, Germany). Sera were processed after 30 min of clotting in an upright position. Vacutainers were then centrifuged at  $2000 \times g$  for 10 min for serum separation. Serum before (for control condition) and after exercise was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further analysis or cell culture experiments. At least one week after, another blood sample was taken after overnight fasting for isolating T cells. For standardization of the blood sampling, participants refrained from caffeine, alcohol, high-intensity exercise within the past 48 h, and exercise in general within the past 24 h. The cohort 1 protocol differed slightly due to different logistics. Running intensity during the intervention was heart-rate guided using similar intensity and duration to perform the cell culture experiments with cells from fresh blood.

### 2.3. Isolation, Activation, and Cell Culture Experiments

To isolate lymphocytes, fresh peripheral blood was 1:1 diluted by PBS and layered onto Lymphoprep using SepMate 50 mL tubes. After 10 min of centrifugation at  $1200 \times g$  the upper layer was poured off. Cells were washed and centrifuged for 8 min at  $300 \times g$ . CD4+ T cells were isolated by magnetic beads via negative selection using EasySep<sup>TM</sup> magnetic particles following the manufacture's protocol (all Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Following five minutes of magnetic incubation, the supernatant containing CD4+ T cells was poured off. After washing, cells were resuspended in cell culture media. The culture medium consisted of RPMI 1640 medium with glutamine supplemented by essential and nonessential vitamins, pyruvate,  $\beta$ -mercaptoethanol, penicillin and streptomycin (all Gibco, Fisher Scientific<sup>TM</sup>, Waltham, MA, USA), and 100 IU/mL recombinant human Interleukin-2 (IL-2, Immunotools, Friesoythe, Germany). Serum samples were thawed, and we seeded  $10^6$  cells/mL per well in cell culture medium 1:1 mixed with either serum before (control condition, CO) or serum after exercise (exercise condition, EX) from the same donor. We activated cells with anti-CD3/anti-CD28 tetramers (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Cells were cultured for 48 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , and 95% humidity (ICOMed incubator, Memmert, Germany). Methods of cohort 1 were slightly different: Isolation was done by common density gradient centrifugation using Biocoll (Merck, Darmstadt, Germany), incubation lasted 72 h using a different cell culture hood (Midi 40, Thermo Fisher Scientific<sup>TM</sup>, Waltham, MA, USA), RPMI1640 media with stable glutamine from a different manufacturer was used (Cellpure, Roth, Karlsruhe, Germany), and cells from the same donor cultured in pure medium without any stimulation (quiescent cells) were seeded.

### 2.4. Real-Time Measurement of Oxygen Concentration

Real-time measurement of oxygen concentration was performed using the PreSens Technology (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany) as described elsewhere [16]. We performed this analysis for cohort 1 over 72 h and for cohort 2 over 48 h. In more detail, cells were seeded onto OD24-plates and placed onto the Presens sensor dish reader (SDR v4, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany) for the cell culture duration. The oxygen concentration in the culture medium was measured via oxygen sensors at the bottom of the 24-well plate. Data were collected every two minutes.

### 2.5. Analysis of Initial Cell Culture Condition and Supernatants

Supernatants from 48 h cultures (t<sub>48</sub>), were frozen and stored at −20 °C for later analysis. To analyze cell culture conditions before and after the experiments, the supernatants, as well as the aliquoted sera, were thawed and analyzed for glucose and lactate concentrations using enzymatic-amperometric sensor technology (BioSen C-line, EKF-diagnostic, Barleben, Germany). The concentration of glucose before the experiments was calculated taking into consideration that serum and cell culture medium were mixed 1:1. Cytokine concentration of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL21, IL-23, IL-27, and soluble receptor Interferon- $\gamma$  Receptor 1 (IFN- $\gamma$  R1) were determined by commercially available human 13-plex enzyme-linked immunosorbent assays (Human Magnetic Luminex Assay, Bio-technie Ltd., Abbingdon, Oxon, UK) in all serum supernatants at t<sub>48</sub> and IFN- $\gamma$ -R1 at t<sub>0</sub> and t<sub>48</sub>. For analysis, we used the Luminex MAGPIX System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) and followed the manufacturer's instructions.

### 2.6. RNA Extraction and Real-Time Reverse Transcription PCR

Immediately after cell culture at t<sub>48</sub> and t<sub>72</sub>, CD4+ T cells were counted and centrifuged. For cohort 2, a pellet of  $2 \times 10^6$  cells was frozen until further analysis at −80 °C. Total RNA was isolated from CD4+ T cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's protocol and subsequently analyzed for quantity and quality using an Infinite 200 M microplate reader equipped with a NanoQuant plate (both from Tecan, Mainz, Germany). The cDNA was synthesized as described recently in detail [28]. The qPCR analysis of target and reference genes was carried out with a Rotor-Gene Q system (Qiagen, Hilden, Germany) using gene-specific primer pairs from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) as described recently in detail [28]. Characteristics of primers for target (HK1, LDHA, ATP5J, COX4I1, NDUFA12, IDH1, ODGH, FOXP3, RPS6KB1, PRKAA1) and reference genes (SDHA, YWHAZ, ATP5B) designed using Primer3 and Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) are shown in Table 1. All primer pairs were designed to span an exon–exon junction. Normalization of real-time PCR data was carried out by calculating a normalization factor based on geometric averaging of the three reference genes according to Vandesompele et al. [29]. The mean of the control condition cells was set to 1, and the mean and SEM of the treated cells were scaled proportionally.

**Table 1.** Characteristics of gene-specific primer pairs used for qPCR.

Gene	Forward Primer (from 5' to 3') Reverse Primer (from 5' to 3')	PCR Product Size (bp)	NCBI GenBank Accession Number	Primer Efficiency
Reference genes				
ATP5B	TCGCGTGCCATTGCTGAGCT CGTGCACGGGACACGGTCAA	218	NM_001686	1.72
SDHA	CCAAGCCCATCCAGGGGCAAC TCCAGAGTGACCTTCCCAGTGCCAA	100	NM_004168	1.91
YWHAZ	TGGGGACTACGACGTCCCTCAA CATAICGCTCAGCCTGCTCGG	115	NM_003406	2.01
Target genes				
ATP5J	TCGGGACTGAGTGCAAGAAT AACACCAATGTTCCCTCCGCA	105	NM_001003703	1.89
COX4I1	GTGGCGGCAGAATGTTGG GGCAGACAGGTGCTTGACAT	182	NM_001861	2.05
FOXP3	CACTTACAGGCACTCCTCCA CAGCCGAAAGGGTGCTGTC	286	NM_014009	1.78
HK1	GCCTATTACTTCACGGAGCTGA TGAAATCTCCCTTTTCAGAGCCA	220	NM_000188	1.95

Table 1. Cont.

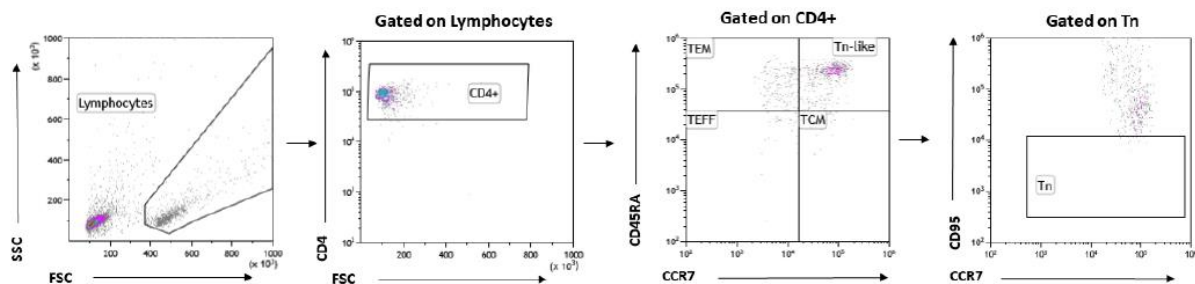
Gene	Forward Primer (from 5' to 3') Reverse Primer (from 5' to 3')	PCR Product Size (bp)	NCBI GenBank Accession Number	Primer Efficiency
IDH1	TACTTCAGAAGCGGAGGCAC GTAGTTATCGCCTGCCGGG	129	NM_005896	2.04
LDHA	ACGTGCATTCCCGATTCTT GGAAAAGGCTGCCATGTTGG	251	NM_005566	2.07
NDUFA12	TAGTGCAGGTCCTGAAACGC CCATCGGTGACGGCCAAAAA	176	NM_018838	2.12
ODGH	CTGTGCTTGGCTGGAAAACC CATGGTGCCCTCGTATCTGA	245	NM_002541	2.36
PRKAA1	CGGCAAAGTGAAGGTTGGC CTGTTGGAACAGACGCCGA	286	NM_006251	1.98
RPS6KB1	CTGAGGACATGGCAGGAGTG ACAATGTTCCATGCCAAGTTCA	146	NM_003161	1.93

### 2.7. Cell Phenotyping by Flow Cytometry

After  $t_{48}$ ,  $10^6$  cells were centrifuged and resuspended with 1ml freezing medium (Bambanker, Nippon Genetics Europe, Dueren, Germany), and frozen at  $-80$  °C for further analysis. To analyze T cell subsets, cells were thawed and prepared for evaluation by flow cytometry. Phenotyping included a live/dead-staining using Zombie aqua and measurement of purity of CD4+ cells (CD4+/alive of all lymphocytes). Briefly, cells were stained with monoclonal antibodies (all anti-human) for T cell subsets, 20% of the cells remained unstained, and 20% were stained as fluorescence minus CD95 of T cell subsets. Antibodies and vendors used are listed in Table 2. 10,000 events were acquired by 488 nm, 638 nm, and 408 nm lasers (Cytotflex, Beckman Coulter, Germany). To identify T cell subsets, naïve (CD4+/alive/CD45RA+/CCR7+/CD95-), central memory (CD4+/alive/CD45RA-/CCR7+/CD95+), effector memory (CD4+/alive/CD45RA-/CCR7-/CD95+), and stem memory T cells (CD4+/alive/CD45RA+/CCR7+/CD95+) CD4+ T cells were gated and proportions quantified using the Kaluza software (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). A fluorescence minus one for CD95 was used to increase accuracy for gating naïve and stem memory T cells. We followed the flow cytometry guidelines of Mousset et al. for T cell subset differentiation [30]. The gating strategy is shown in Figure 1. The antibodies used are listed in Table 2.

**Table 2.** Antibodies used for flow cytometry to phenotype T cell subsets. PE: Phycoerythrin, APC: Allophycocyanin, BV: Brilliant violet.

Antibody	Fluorochrome	Vendor/Cat. No./Clone	Isotype
CD95	PE	Biologend/305608/DX2	Mouse IgG1, $\kappa$
CD45RA	APC	Biologend/304111/HI100	Mouse IgG2b, $\kappa$
CD197/CCR7	BV421	Biologend/353207/G043H7	Mouse IgG2a, $\kappa$
CD4	Alexa Fluor 700	Biologend/344621/SK3	Mouse IgG1, $\kappa$
Live/Dead	Zombie Aqua	Biologend/423101/-	-



**Figure 1.** Gating strategy for T cell phenotyping. Subsets were gated based on CCR7 and CD45RA expression. In the next step Tn-like cells were differentiated by gating and the percentage of stem cell like memory cells was calculated. TEM: effector T memory cells, TEFF: T effector cells, TCM: central T memory cells, Tn: naive T cells, SSC: side scatter, FSC: Forward sideward scatter.

### 2.8. Cell Count and Cell Growth

Cell number, viability, and diameter of isolated CD4<sup>+</sup> T cells were measured before and after cell culture by CASY<sup>®</sup> Cell Counter via electric current exclusion method (OLS Omni Life Science, Bremen, Germany). Cell viability after cell culture was then calculated using the formula: Viability = (100 – viability before culture) + viability after cell culture.

Total cell count and viability of the preliminary experiments were counted using a two-chambered Neubauer hemocytometer and trypan blue dye for the exclusion of dead cells.

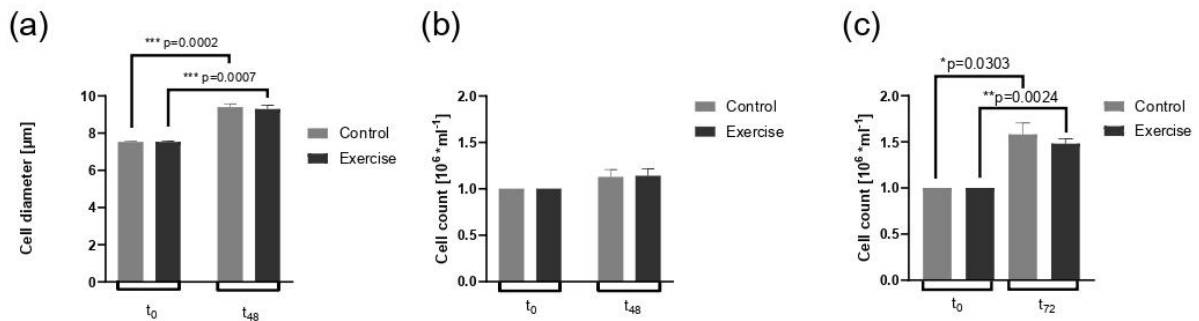
### 2.9. Statistical Analysis

Normality was tested using the Shapiro–Wilk test. We commonly determined significance by one-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc comparison or mixed-effect analysis with Geisser–Greenhouse correction followed by multiple comparisons, except for supernatant and viability data. For all soluble factors, the Student’s *t*-test paired was used. Effects of activation (t0 and t48) and exercise serum (Control × Exercise) were analyzed for IFN- $\gamma$ R1, glucose, and lactate using a two-way ANOVA and Bonferroni posthoc comparison. Statistics and the visualization of data were done by using GraphPad Prism version 8 (San Diego, CA, USA). The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Cell Growth and Cell Counts Are Not Altered by Exercise Serum

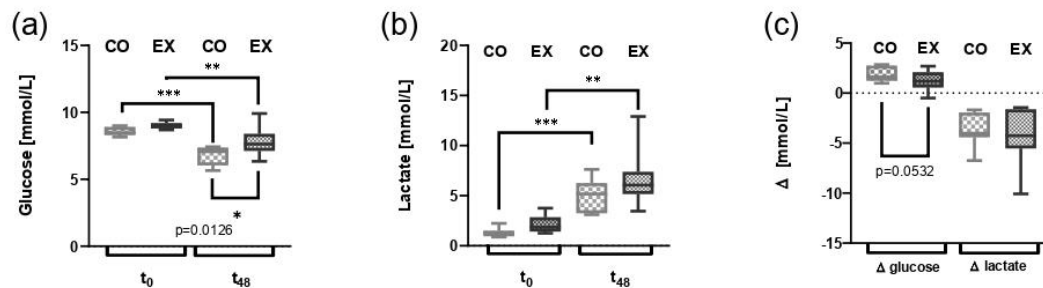
First, we analyzed cell parameters before and after culture. Cell viability after cell culture was high (>95%) and not significantly different between control (CO) serum and exercise (EX) serum culture in all experimental conditions (data not shown). Cell diameter was increased at 48 h after activation (t48) compared to the untreated condition (t0), whereas cell diameter was not significantly different between the CO and EX groups at each time point (Figure 2a). Cell count did not vary between conditions, neither at t48 after activation of CD4<sup>+</sup> T cells ( $p = 0.14$ ) nor at 72 h after activation (t72,  $p = 0.14$ ) (Figure 2b,c).



**Figure 2.** Effects of control and exercise serum on cell parameters. Cell diameter at the beginning (t<sub>0</sub>) and after 48 h cell culture (t<sub>48</sub>, a, n = 7) from cohort 2, cell count at t<sub>0</sub> and t<sub>48</sub>, (b, n = 7), and cell count at t<sub>0</sub> and 72 h after cell culture from cohort 1 (t<sub>72</sub>, c, n = 5) are shown with mean and ± SEM. We used one-way ANOVA with Geisser–Greenhouse correction followed by Bonferroni’s post hoc; \*  $p < 0.5$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . ANOVA: analysis of the variance.

### 3.2. Glucose Consumption Is Altered by Exercise Serum

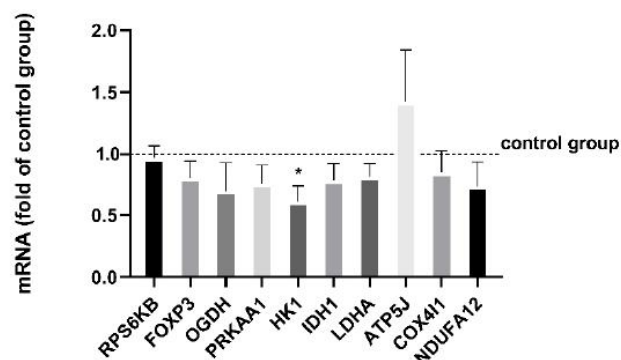
Solely looking at t<sub>0</sub>, we observed a trend for higher lactate levels ( $p = 0.061$ ) and glucose levels ( $p = 0.073$ ) in EX serum compared to CO serum. Lactate levels were at  $1.4 \pm 0.17$  mmol/l in CO serum compared to  $2.1 \pm 0.33$  mmol/L in EX serum. Glucose levels were at  $8.5 \pm 0.12$  mmol/L at CO serum compared to  $9.0 \pm 0.092$  mmol/L in EX serum. Beyond 48 h of culture, glucose levels significantly decreased, while lactate levels increased independent of the condition (Figure 3a,b). A significant difference between culture conditions was found at t<sub>48</sub>, glucose levels were significantly higher at t<sub>48</sub> in EX serum (Figure 3a). However, the net change of glucose and lactate over the culture time was not statistically different, we only observed a trend ( $t$ -test,  $p = 0.053$ ) for a higher reduction in glucose in EX serum (Figure 3c).



**Figure 3.** Changes in lactate and glucose levels after 48 h of cell culture following incubation of CD4+ T cells from cohort 2 with 50% control serum (CO) or exercise serum (EX). T cells were activated with anti-CD3/anti-CD28. Glucose level (a), lactate level (b), and changes (Δ) before to after cell culture (c) are shown as box and whiskers min to max (n = 7 per group), (a,b) two-way ANOVA followed by multiple comparisons; (c) Student’s  $t$ -test \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . ANOVA: analysis of the variance.

### 3.3. mRNA Expression of HK1 Is Reduced by Exercise Serum

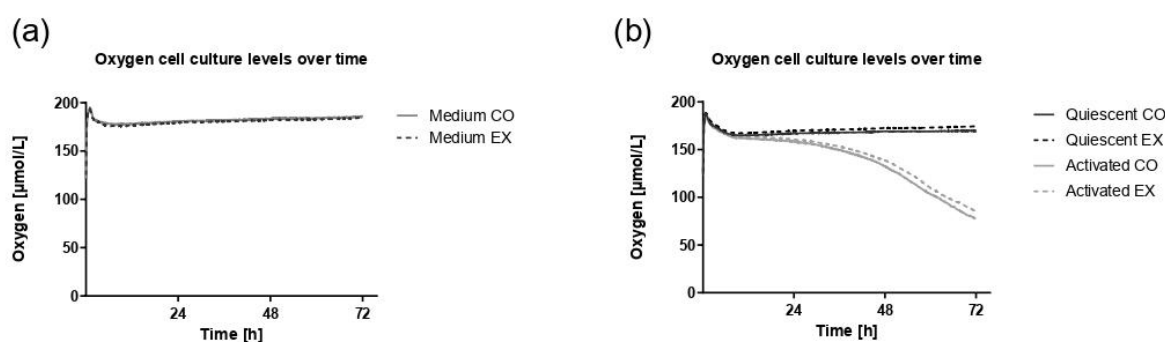
Normalized mRNA levels of HK1 were significantly reduced after cell culture in EX compared to CO ( $p = 0.033$ ). All other mRNA levels were not significantly affected by exercise serum, neither those encoding proteins of the electron transport chain (ATP5J,  $p = 0.48$ ; COX4I1,  $p = 0.40$ ; NDUFA12,  $p = 0.20$ ), lactate dehydrogenase (LDH,  $p = 0.16$ ) nor enzymes involved in the citric acid cycle (IDH1,  $p = 0.19$ ; ODGH,  $p = 0.12$ ) (Figure 4), activation marker FOXP3 ( $p = 0.19$ ), ribosomal protein S6 kinase downstream the mammalian target of rapamycin mTOR (RPS6KB,  $p = 0.81$ ), or 5’ AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2 of 5’ AMP-activated protein kinase (PRKAA,  $p = 0.21$ ). The fold change of the control group is displayed in Figure 4.



**Figure 4.** Normalized mRNA levels of CD4<sup>+</sup> T cells from cohort 2 after 48 h in the exercise cell culture measured by real-time PCR are displayed as fold of the control group (=1.0). Human CD4<sup>+</sup> T cells were activated in culture with 50% serum before exercise (control group) or after exercise. Both were activated with anti-CD3/anti-CD28. mRNA levels were normalized using the geometric mean of expression data of the reference genes SDHA, YWHAZ, and ATP5B. Data are shown with mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Significance was determined by two-tailed Student's *t*-test using the normalized mRNA data. \*  $p < 0.05$ .

### 3.4. Cell Culture Oxygen Levels Following Activation Are Not Altered by Exercise Serum

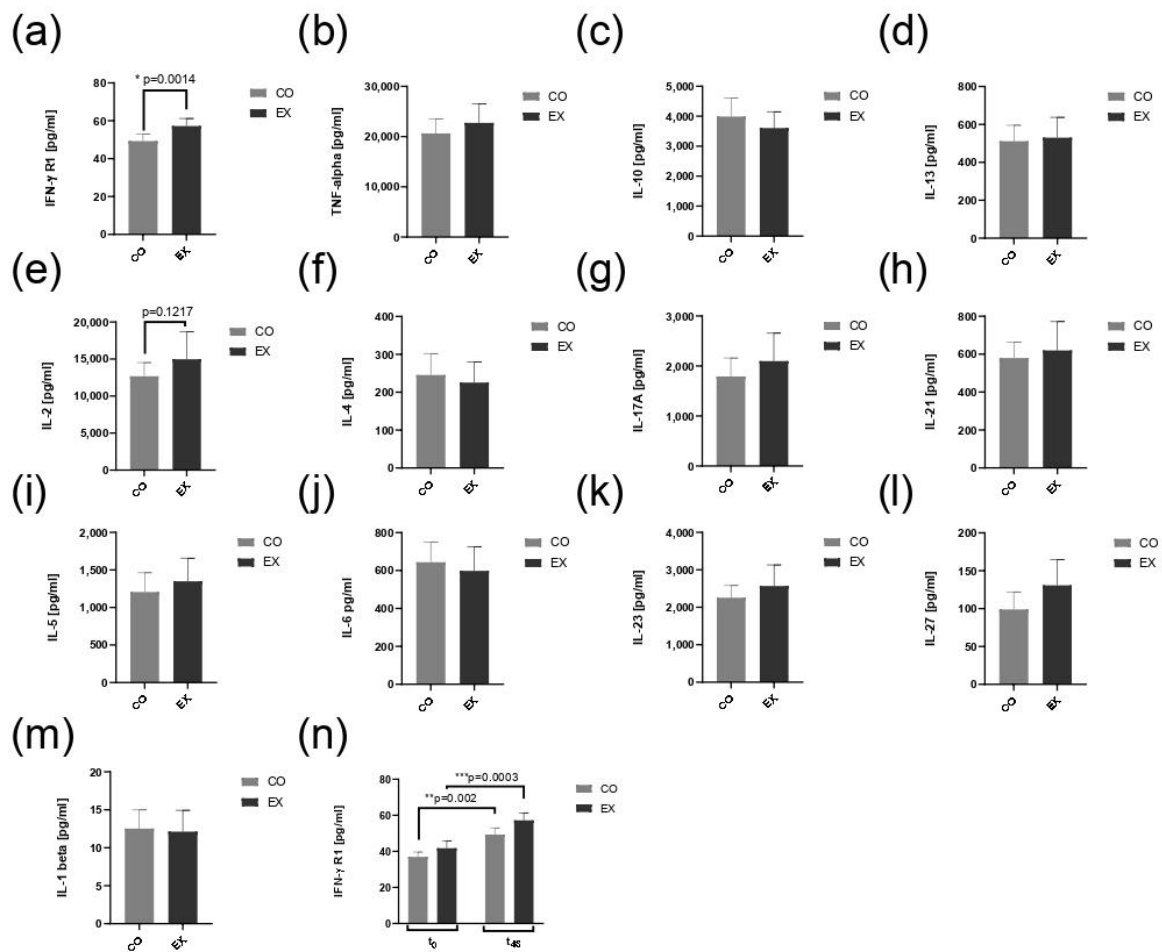
We found no significant difference between CO and EX cell culture conditions 24 h, 48 h, or 72 h after activation with regard to oxygen consumption independent of the culture condition (Figure 5). Over time, the oxygen level of culture with quiescent CD4<sup>+</sup> T cells remained stable. Shortly after activation, oxygen levels were continuously reduced.



**Figure 5.** Oxygen cell culture levels of culture medium, non-activated quiescent T cells, and activated T cells over time. Human CD4<sup>+</sup> T cells from cohort 1 were activated supplemented by serum before exercise (CO) or after exercise (EX) and activated with anti-CD3/anti-CD28. Oxygen concentration during 72 h of cell culture measured by PreSens oxygen reader (SDR v4, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany) is shown by the mean of  $n = 5$ . CO: control condition, EX: exercise condition. Mean oxygen levels of the culture medium including serum before or after exercise (Medium) overlap (a), while mean oxygen levels of quiescent and activated cells are higher when serum after exercise was supplemented (b).

### 3.5. IFN- $\gamma$ R1 Levels Are Increased by Exercise Condition

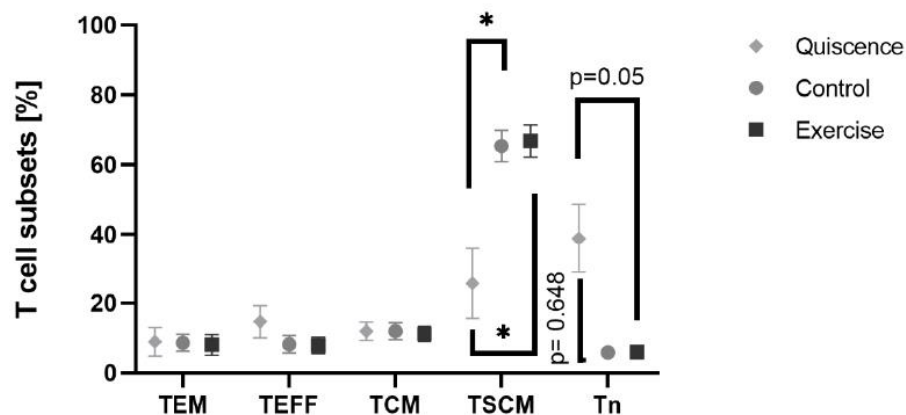
The results on cytokine levels at t48 for relevant T cell cytokines and IFN- $\gamma$  R1 are shown in Figure 6a–m. All cytokines determined either influencing CD4<sup>+</sup> T cell differentiation or known as signature cytokines expressed by CD4<sup>+</sup> were not affected by EX serum. The only significant finding was higher IFN- $\gamma$  R1 levels in EX compared to CO. After analysis of mRNA IFN- $\gamma$  R1 levels at t48 compared to t0 the difference was influenced by culture conditions at t0 (Figure 6n).



**Figure 6.** Interferon- $\gamma$  receptor 1 (a) and cytokine (b–m) levels in supernatants after 48 h cell culture. Human CD4<sup>+</sup> T cells from cohort 2 were activated supplemented by serum taken at resting conditions (CO) or after exercise (EX) and activated with anti-CD3/anti-CD28. IFN- $\gamma$  R1 (a) and T cell interleukins TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-13, IL-2, IL-4, IL-17A, IL-21, IL-5, IL-6, IL-23, IL-27, and IL-1 $\beta$  were measured by commercial multiplex ELISA assays after 48 h cell culture for CO and EX condition. Beyond, IFN- $\gamma$  R1 (n) was measured before and after 48 h of cell culture. All data are shown with mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Significance was determined by Student's  $t$ -test for a-m. Significance was determined by two-way ANOVA followed by multiple comparison tests for n. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . ANOVA: analysis of the variance. CO: control group, EX: Exercise group, IL: Interleukin, IFN- $\gamma$  R1: Interferon- $\gamma$  Receptor 1, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

### 3.6. Exercise Serum Does Not Influence T Cell Phenotype and Activation Markers

The analysis of T cell subsets by flow cytometry did not reveal any significant differences between CO and EX cell culture. A significant effect due to anti-CD3/anti-CD28 activation was found. The percentage of stem cell-like memory T cells (TSCM) significantly increased (Mixed-effect analysis,  $p = 0.0019$ ) at CO (Tukey's multiple comparison,  $p = 0.01$ ) and EX (Tukey's multiple comparison,  $p = 0.01$ ). The number of naïve T cells (Tn) was significantly different (Mixed-effect analysis,  $p = 0.01$ ) but Tukey's multiple comparison test revealed a non-significantly reduction at t48 compared to t0 (Figure 7). The increase in TSCM cells was associated with the higher percentage of CD95<sup>+</sup>, a marker for activation induced cell death.



**Figure 7.** Percentage change in T effector memory cells, T effector cells, T central memory cells, stem cell-like memory T cells, and naive T cells with SEM before activation, at quiescence, and after activation at control and exercise condition. Human CD4+ T cells from cohort 2 were activated in serum before exercise (CO) or after exercise (EX) with anti-CD3/anti-CD28. Quiescent cells remained non-activated. Data are shown with mean  $\pm$  SEM (Control N = 6, Exercise N = 6, Quiescence N = 4). Significance was determined by Mixed-effect analysis and Tukey's multiple comparisons. \*  $p < 0.05$ . TEM: T effector memory cells, TEFF: T effector cells, TCM: T central memory cells, TSCM: stem cell-like memory T cells (TSCM), Tn: naive T cells.

#### 4. Discussion

We had to withdraw our hypothesis that exercise serum suppresses the selected parameters of CD4+ T cell metabolism following T cell receptor activation, although existing literature on lymphocytes has shown some evidence for a reduced function of T cells after acute exercise interventions [18]. Meanwhile a reduced metabolism is underlying a suppressed proliferative capacity [12]. However, one can hardly eliminate the side-effects of T cell redistribution in these studies as fresh CD4+ T cells are sampled immediately after exercise. To ensure shifts in T-cell proportions after exercise did not influence our results, subjects were well-rested at the day fresh blood for CD4+ T cell isolation was drawn. Similar to our study, few in vitro studies incubated T cells with exercise serum [24,25]. To our knowledge, no study has investigated the effects of exercise serum on the immunometabolism of CD4+ T cells so far.

No significant effect of exercise serum on CD4+ T cell viability and phenotype was found, irrespectively of the culture condition. CD4+ T cells left the G0-phase initiating on-blast formation towards a cell diameter as described by earlier published studies [16]. Viability, cell count, T cell growth factor IL-2, and phenotype after activation were not significantly different from resting conditions. Both glycolysis and basal oxygen consumption were only marginally affected by EX serum. Glucose flux and lactate accumulation are not significantly different in EX serum compared to CO serum when acknowledging the net change of glucose and lactate from t0 to t48. However, the trend for a lower glucose consumption of CD4+ T cells and expression of mRNA of HK1 in EX serum indicates substrate phosphorylation of CD4+ T cell was downregulated by EX post-activation. A potential hexokinase 1 reduction, which represents the first rate-limiting enzyme of glycolysis, might indicate a temporary suppression of T cell metabolism after exercise, which does not reach the dimension of a real impairment of the cell function in parameters we measured. Other in vitro studies using activated CD4+ from healthy donors found an increased mRNA level of HK1 48 h after activation as a sign of the metabolic shift towards Warburg metabolism [16]. Reduced HK1 mRNA may indicate a less pronounced activation, signal transduction, or the ability for glucose uptake of CD4+ T cells triggered by EX. Future studies may measure these parameters, e.g., the ability of CD4+ T-cell for glucose uptake measuring the expression of glucose transporters 1 and 3 or utilizing fluorescent analogues of 2-deoxyglucose to unravel if glucose uptake is reduced by EX [31].

For basal oxygen consumption, we have seen a non-significant higher oxygen concentration in EX serum compared to CO serum. Similarly, our PCR-analysis did not find any significant differences in mRNA levels linked to the electron transport chain. However, the method we have used will likely not detect the full changes in basal oxygen consumption that might be relevant to induce exercise adaptation. New oxygen will gradually resolve in culture media when oxygen levels fall [32]. Other methods, such as high-resolution respirometry could be used in future studies to measure mitochondrial respiration [16].

In line with our findings for metabolic changes, we did not find any significant differences for cytokine levels after cell incubation. Other exercise studies using a similar exercise duration found a suppressive effect of 10% exercise serum on IL-2 and TNF-alpha production. However, these results come from experiments using Jurkat T cells, and not from primary isolated T cells [33]. Beyond cytokines, soluble IFN- $\gamma$  R1 level was significantly higher in EX serum compared to CO serum. Increased levels of soluble IFN- $\gamma$  R1 might indicate an increased T cell activation during EX conditions. T cells are known to transiently lose IFN- $\gamma$  R1 after TCR engagement as the sole result of T-cell-receptor activation [34]. However, this assumption has to be verified by the additional measurement of cellular activation markers. Skrenta et al. proposed this mechanism to be a self-protective strategy of CD4+ to protect themselves from apoptosis and negative effects on proliferation [34]. Studies analyzing peripheral blood or CD4+ T cells immediately after exercise have found increased activation markers of T cells and higher signals downstream the T cell receptor, such as increased levels of Zap70 after exercise [20,35]. These findings may result from dissimilar levels between exercise and control media at t0.

There are some limitations of our in vitro study. First, we diluted factors released by exercise with 50% cell culture media. We recommend future studies that supplement some factors defining exercise microenvironment to mimic in vivo conditions better and do not mask changes by the content of media. One of those factors could be lactate as it is known as a metabolic signal for T cells and contributes to fatigue and acidosis in exercise [36,37]. Second, 30 min endurance exercise, despite its subjectively exhaustive properties for the subjects, likely does not suppress the immune metabolism of CD4 cells significantly. Future studies examining T cells in the context of exercise should investigate immunometabolism after aerobic exercise lasting longer duration, as the effect on cytokines level, such as IL-6, is greater when muscle glycogen levels are low [38].

## 5. Conclusions

Overall, the selected parameters of CD4+ metabolism are marginally affected by incubation in exercise serum. We found no difference in on-blast formation, T cell phenotype, glycolysis, and respiration. Only HK1 mRNA levels of CD4+ T cells were significantly reduced after activation in EX serum. Differences were found only at the level of mRNA expression, glucose uptake, and IFN- $\gamma$  R1 concentration. We assume the duration and intensity of the exercise protocol were not sufficient to affect the immune metabolism of CD4+ T cell significantly. Future studies are needed to verify whether alteration of HK1 mRNA causes any adaptation in immunometabolism of CD4+ T cells after repetitive exercise bouts, following re-stimulation, and longer-duration exercise interventions.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.P. and K.K.; investigation, J.P., K.G., T.R., T.F., R.R., and K.E.; formal analysis, J.P., T.R., K.G., and R.R.; writing—original draft preparation, J.P. and K.K.; writing—review and editing, J.P., T.R., R.R., K.E., K.R.-S., and K.K.; visualization, J.P.; supervision, K.K.; project administration, J.P. and K.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the approved by the local ethics committee of the University Giessen (Giessen, Germany, No. 2020-0007, 21 April 2020) and the Ethics Commission of the Medical Chamber of Lower Saxony (Hannover, Germany, Bo/06/2018, 23 March 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank all participants who took part in the T cell immunometabolism studies. We thank Rosalie Hausner, Narcisse Nagale, Rike Paulmann, Sina Rilling, and Gerald Schneider for their technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Mobasheri, A.; Rayman, M.P.; Gualillo, O.; Sellam, J.; van der Kraan, P.; Fearon, U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 302–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kolan, S.S.; Li, G.; Wik, J.A.; Malachin, G.; Guo, S.; Kolan, P.; Skålhegg, B.S. Cellular metabolism dictates T cell effector function in health and disease. *Scand. J. Immunol.* **2020**, *92*, e12956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bantug, G.R.; Galluzzi, L.; Kroemer, G.; Hess, C. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 19–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Patel, C.H.; Leone, R.D.; Horton, M.R.; Powell, J.D. Targeting metabolism to regulate immune responses in autoimmunity and cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 669–688. [[CrossRef](#)]
5. Coyle, E.F. Physical activity as a metabolic stressor. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 512s–520s. [[CrossRef](#)]
6. Pedersen, B.K.; Saltin, B. Exercise as medicine—Evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2015**, *25*, 1–72. [[CrossRef](#)]
7. Thompson, P.D.; Crouse, S.F.; Goodpaster, B.; Kelley, D.; Moyna, N.; Pescatello, L. The acute versus the chronic response to exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2001**, *33*, S438–S445. [[CrossRef](#)]
8. Phan, A.T.; Goldrath, A.W. Hypoxia-inducible factors regulate T cell metabolism and function. *Mol. Immunol.* **2015**, *68*, 527–535. [[CrossRef](#)]
9. Pucino, V.; Certo, M.; Bulusu, V.; Cucchi, D.; Goldmann, K.; Pontarini, E.; Haas, R.; Smith, J.; Headland, S.E.; Blighe, K.; et al. Lactate Buildup at the Site of Chronic Inflammation Promotes Disease by Inducing CD4(+) T Cell Metabolic Rewiring. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 1055–1074.e8. [[CrossRef](#)]
10. Thirupathi, A.; Pinho, R.A.; Ugbohue, U.C.; He, Y.; Meng, Y.; Gu, Y. Effect of Running Exercise on Oxidative Stress Biomarkers: A Systematic Review. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 610112. [[CrossRef](#)]
11. Nalbandian, M.; Takeda, M. Lactate as a Signaling Molecule That Regulates Exercise-Induced Adaptations. *Biology* **2016**, *5*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. O'Neill, L.A.; Kishton, R.J.; Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 553–565. [[CrossRef](#)]
13. Pearce, E.L.; Poffenberger, M.C.; Chang, C.H.; Jones, R.G. Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* **2013**, *342*, 1242454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cretenet, G.; Clerc, I.; Matias, M.; Loisel, S.; Craveiro, M.; Oburoglu, L.; Kinet, S.; Mongellaz, C.; Dardalhon, V.; Taylor, N. Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24129. [[CrossRef](#)]
15. Jones, N.; Vincent, E.E.; Cronin, J.G.; Panetti, S.; Chambers, M.; Holm, S.R.; Owens, S.E.; Francis, N.J.; Finlay, D.K.; Thornton, C.A. Akt and STAT5 mediate naïve human CD4+ T-cell early metabolic response to TCR stimulation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2042. [[CrossRef](#)]
16. Renner, K.; Geiselhöringer, A.-L.; Fante, M.; Bruss, C.; Färber, S.; Schönhammer, G.; Peter, K.; Singer, K.; Andreesen, R.; Hoffmann, P.; et al. Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 2504–2516. [[CrossRef](#)]
17. Ricciardi, S.; Manfrini, N.; Alfieri, R.; Calamita, P.; Crosti, M.C.; Gallo, S.; Müller, R.; Pagani, M.; Abrignani, S.; Biffo, S. The Translational Machinery of Human CD4(+) T Cells Is Poised for Activation and Controls the Switch from Quiescence to Metabolic Remodeling. *Cell Metab.* **2018**, *28*, 895–906.e5. [[CrossRef](#)]
18. Siedlik, J.A.; Benedict, S.H.; Landes, E.J.; Weir, J.P.; Vardiman, J.P.; Gallagher, P.M. Acute bouts of exercise induce a suppressive effect on lymphocyte proliferation in human subjects: A meta-analysis. *Brain Behav. Immun.* **2016**, *56*, 343–351. [[CrossRef](#)]
19. Simpson, R.J.; Campbell, J.P.; Gleeson, M.; Krüger, K.; Nieman, D.C.; Pyne, D.B.; Turner, J.E.; Walsh, N.P. Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection? *Exerc. Immunol. Rev.* **2020**, *26*, 8–22. [[PubMed](#)]
20. Siedlik, J.A.; Deckert, J.A.; Benedict, S.H.; Bhatta, A.; Dunbar, A.J.; Vardiman, J.P.; Gallagher, P.M. T cell activation and proliferation following acute exercise in human subjects is altered by storage conditions and mitogen selection. *J. Immunol. Methods* **2017**, *446*, 7–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Holbrook, A.K.; Peterson, H.D.; Bianchi, S.A.; Macdonald, B.W.; Bredahl, E.C.; Belshan, M.; Siedlik, J.A. CD4(+) T cell activation and associated susceptibility to HIV-1 infection in vitro increased following acute resistance exercise in human subjects. *Physiol. Rep.* **2019**, *7*, e14234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Contrepois, K.; Wu, S.; Moneghetti, K.J.; Hornburg, D.; Ahadi, S.; Tsai, M.S.; Metwally, A.A.; Wei, E.; Lee-McMullen, B.; Quijada, J.V.; et al. Molecular Choreography of Acute Exercise. *Cell* **2020**, *181*, 1112–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Renner, K.; Singer, K.; Koehl, G.E.; Geissler, E.K.; Peter, K.; Siska, P.J.; Kreutz, M. Metabolic Hallmarks of Tumor and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 248. [[CrossRef](#)]
24. Perry, C.; Pick, M.; Bdoiach, N.; Hazan-Halevi, I.; Kay, S.; Berr, I.; Reches, A.; Harishanu, Y.; Grisaru, D. Endurance exercise diverts the balance between Th17 cells and regulatory T cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dorneles, G.P.; da Silva, I.M.; Santos, M.A.; Elsner, V.R.; Fonseca, S.G.; Peres, A.; Romão, P.R.T. Immunoregulation induced by autologous serum collected after acute exercise in obese men: A randomized cross-over trial. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21735. [[CrossRef](#)]
26. Takenaka, M.C.; Robson, S.; Quintana, F.J. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trend. Immunol.* **2016**, *37*, 427–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Nieman, D.C.; Henson, D.A.; Gross, S.J.; Jenkins, D.P.; Davis, J.M.; Murphy, E.A.; Carmichael, M.D.; Dumke, C.L.; Utter, A.C.; McAnulty, S.R.; et al. Quercetin reduces illness but not immune perturbations after intensive exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2007**, *39*, 1561–1569. [[CrossRef](#)]
28. Chiappisi, E.; Ringseis, R.; Eder, K.; Gessner, D.K. Effect of endoplasmic reticulum stress on metabolic and stress signaling and kidney-specific functions in Madin-Darby bovine kidney cells. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 6689–6706. [[CrossRef](#)]
29. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, Research0034. [[CrossRef](#)]
30. Mousset, C.M.; Hobo, W.; Woestenenk, R.; Preijers, F.; Dolstra, H.; van der Waart, A.B. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry A* **2019**, *95*, 647–654. [[CrossRef](#)]
31. Sinclair, L.V.; Barthelemy, C.; Cantrell, D.A. Single Cell Glucose Uptake Assays: A Cautionary Tale. *Immunometabolism* **2020**, *2*, e200029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Al-Ani, A.; Toms, D.; Kondro, D.; Thundathil, J.; Yu, Y.; Ungrin, M. Oxygenation in cell culture: Critical parameters for reproducibility are routinely not reported. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Radom-Aizik, S.; Leu, S.Y.; Cooper, D.M.; Zaldivar, F., Jr. Serum from exercising humans suppresses t-cell cytokine production. *Cytokine* **2007**, *40*, 75–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Skrenta, H.; Yang, Y.; Pestka, S.; Fathman, C.G. Ligand-independent down-regulation of IFN-gamma receptor 1 following TCR engagement. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 3506–3511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Alack, K.; Weiss, A.; Krüger, K.; Höret, M.; Schermuly, R.; Frech, T.; Eggert, M.; Mooren, F.C. Profiling of human lymphocytes reveals a specific network of protein kinases modulated by endurance training status. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Haas, R.; Cucchi, D.; Smith, J.; Pucino, V.; Macdougall, C.E.; Mauro, C. Intermediates of Metabolism: From Bystanders to Signalling Molecules. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 460–471. [[CrossRef](#)]
37. Hall, M.M.; Rajasekaran, S.; Thomsen, T.W.; Peterson, A.R. Lactate: Friend or Foe. *PM R* **2016**, *8*, S8–S15. [[CrossRef](#)]
38. Pedersen, B.K.; Steensberg, A.; Fischer, C.; Keller, C.; Keller, P.; Plomgaard, P.; Wolsk-Petersen, E.; Febbraio, M. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: Is IL-6 an exercise factor? *Proc. Nutr. Soc.* **2004**, *63*, 263–267. [[CrossRef](#)]

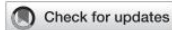
## 4.2. T-cell derived TNF- $\alpha$ and a cluster of immunological parameters from plasma allow a separation between SARS-CoV-2 convalescent versus vaccinated athletes

**Palmowski, J.,** Kohnhorst, S., Bauer, P., Puta, C., Haunhorst, S., Gebhardt, K., Reichel, T., Keller, C., Huber, M., Raifer, H. & Krüger, K. (2023). T-cell-derived TNF- $\alpha$  and a cluster of immunological parameters from plasma allow a separation between SARS-CoV-2 convalescent versus vaccinated elite athletes. *Frontiers in Physiology*, 14, 1203983.

DOI: 10.3389/fphys.2023.1203983

URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2023.1203983/full>

**Ergebnis:** Die T-Zell-Funktion (hier das Zytokinprofil) ist nach der SARS-CoV-2 Infektion nicht verändert und geht nicht mit einer erhöhten Zytokinkonzentration von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  einher. TNF- $\alpha$  ist in der Zellkultur der nicht-infizierten Sportler höher als bei den Genesenen ( $p < 0,001$ ).



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Tarak Driss,  
Université Paris Nanterre, France

REVIEWED BY  
Elmo Neuberger,  
Johannes Gutenberg University Mainz,  
Germany  
Erik D. Hanson,  
University of North Carolina at Chapel  
Hill, United States

\*CORRESPONDENCE  
Karsten Krüger,  
✉ karsten.krueger@sport.uni-giessen.de

<sup>†</sup>These authors have contributed equally  
to this work

RECEIVED 11 April 2023  
ACCEPTED 09 June 2023  
PUBLISHED 22 June 2023

## CITATION

Palmowski J, Kohnhorst S, Bauer P,  
Putz C, Haunhorst S, Gebhardt K,  
Reichel T, Keller C, Huber M, Raifer H and  
Krüger K (2023), T-cell-derived TNF- $\alpha$   
and a cluster of immunological  
parameters from plasma allow a  
separation between SARS-CoV-  
2 convalescent versus vaccinated  
elite athletes.  
*Front. Physiol.* 14:1203983.  
doi: 10.3389/fphys.2023.1203983

## COPYRIGHT

© 2023 Palmowski, Kohnhorst, Bauer,  
Putz, Haunhorst, Gebhardt, Reichel,  
Keller, Huber, Raifer and Krüger. This is an  
open-access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication  
in this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# T-cell-derived TNF- $\alpha$ and a cluster of immunological parameters from plasma allow a separation between SARS-CoV-2 convalescent versus vaccinated elite athletes

Jana Palmowski<sup>1</sup>, Sarah Kohnhorst<sup>2</sup>, Pascal Bauer<sup>3</sup>,  
Christian Putz<sup>4,5,6</sup>, Simon Haunhorst<sup>4</sup>, Kristina Gebhardt<sup>1</sup>,  
Thomas Reichel<sup>1</sup>, Christian Keller<sup>7</sup>, Magdalena Huber<sup>2</sup>,  
Hartmann Raifer<sup>2†</sup> and Karsten Krüger<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup>Department of Exercise Physiology and Sports Therapy, Institute of Sports Science, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, <sup>2</sup>Center for Tumor and Immunology, Institute for Systems Immunology, Marburg, Germany, <sup>3</sup>Department of Cardiology and Angiology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, <sup>4</sup>Department of Sports Medicine and Health Promotion, Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany, <sup>5</sup>Center for Sepsis Control and Care (CSCC), Jena University Hospital, Friedrich-Schiller-University Jena, Jena, Germany, <sup>6</sup>Center for Interdisciplinary Prevention of Diseases Related to Professional Activities, Jena, Germany, <sup>7</sup>Institute of Virology, Philipps University Marburg, Marburg, Germany

Guidelines for medical clearing after SARS-CoV-2 infection in elite athletes do not include T-cell immunity aspects despite its relevance in the course of COVID-19 disease. Therefore, we aimed to analyze T-cell-related cytokines before and after *in-vitro* activation of CD4<sup>+</sup> T-cells. We sampled professional indoor sports athletes at medical clearing after SARS-CoV-2 infection obtaining clinical, fitness data, and serological data including CD4<sup>+</sup> T-cell cytokines. All data were analyzed by principal component analysis and 2 × 2 repeated measures ANOVA. CD4<sup>+</sup> T-cells were sampled for cell culture activation with anti-CD3/anti-CD28 tetramers. At medical clearing, CD4<sup>+</sup> T-cells from convalescent athletes secreted increased levels of TNF- $\alpha$  72 h after *in-vitro* activation compared to vaccinated athletes. IL-18 levels in plasma were elevated and a cluster of parameters differentiated convalescent from vaccinated athletes by 13 parameters at the timepoint of medical clearing. All clinical data indicate infection is resolved, while increased TNF- $\alpha$  may reflect altered proportions of peripheral T-cells as a hangover of infection.

## KEYWORDS

T-lymphocyte, SARS-CoV-2, vaccination, convalescence, elite athletes

## 1 Introduction

Indoor team sports players have a high transmission risk for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Jones et al., 2021; Pauser et al., 2021) as indoor facilities ameliorate inhalation of respiratory droplets (and thus SARS-CoV-2), which are emitted by talking, coughing, sneezing, and breathing, contributing to viral spread (Tang et al., 2021; Mutsch et al., 2022). Acute coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by SARS-CoV-2 can be characterized by classical respiratory symptoms such as

cough and fever in the mild course of the disease in young patients (Leung, 2021). The severity of acute coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by SARS-CoV-2 is mostly mild in young professional athletes and physically active adults (Sallis et al., 2021; Krzywański et al., 2022). However, the infection itself poses a risk, especially for athletes, if they return to sport too early without the infection being completely resolved. For instance, the incidence of cardiac complications such as myocarditis after COVID-19 ranges internationally from 1.1%–2.3% among competitive athletes (Halle et al., 2021). Myocarditis is difficult to diagnose as symptoms are non-specific (Daniels et al., 2021). Moreover, dysregulation of T-cell subsets is a key factor in myocardial inflammation (Wang and Han, 2020). The rate itself is relatively low, but myocarditis is one of the leading causes of sports-related sudden cardiac arrest in Germany (Bohm et al., 2021). Therefore, medical clearing after infection is given a special clinical focus in competitive sports (Phelan et al., 2020). The analysis of T-cell immunology may strengthen sufficient medical clearing.

Mild courses of disease in young elite athletes are influenced by CD4<sup>+</sup> T-cell type 1 (Th1) immune response protecting the infected from developing severe COVID-19 disease (Chen et al., 2022; Krzywański et al., 2022; Moss, 2022). Th1 differentiation is associated with the secretion of the signature cytokines, such as Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (Raphael et al., 2015). SARS-CoV-2-specific T-cells of previously infected patients predominantly produce Th1 cytokines (Weiskopf et al., 2020). Higher polyfunctional TNF- $\alpha$ + IFN- $\gamma$ + T-cell frequency was also found after vaccination, but it is transient decreasing significantly after 6 months (Guerrera et al., 2021).

While expert guidelines for medical clearing after SARS-CoV-2 infection have been established based on subjective psychological and cardio-pulmonary examinations, objective immunological aspects other than typical clinical blood markers have not yet been considered as parameters for medical clearance and are currently unknown (Elliott et al., 2020; Wilson et al., 2020). The relevance of T-cell immunity implies the need for analyzing the athletes for T-cell-related cytokines in plasma and T-cell-activation cytokines within the context of other common clinical parameters. Therefore, the aim of our study was to analyze T-cell-related cytokines before and after *in-vitro* activation of CD4<sup>+</sup> T-cells sampled from convalescent and vaccinated indoor sports athletes at medical clearing.

## 2 Methods

### 2.1 Participants

All professional athletes are part of the cross-sectional, single-center pilot study obtaining clinical and fitness data from athletes in the handball and ice-hockey pre-seasons (Bauer et al., 2022). Inclusion criteria were participation in professional indoor sports, no chronic diseases, age between 18 and 30 years, and full physical fitness at the immunological

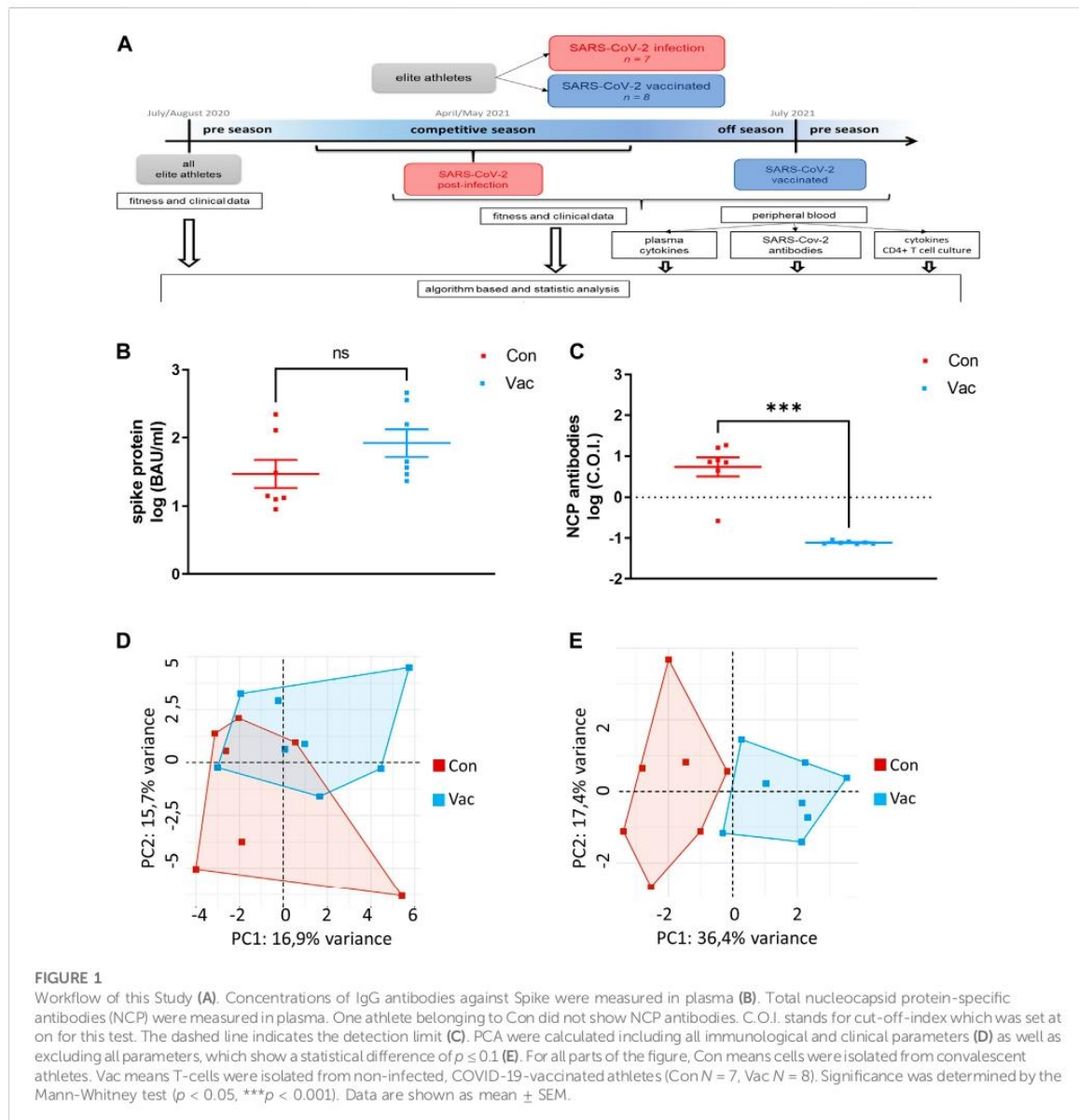
testing. All participants were part of the mentioned single-center pilot study and gave additional consent to their participation in this study. Either COVID-19 convalescent athletes (Con) at the time of medical clearing or non-infected controls (Vac) at the time of medical clearing pre-season were included. Due to the high vaccination rates in professional sports, all non-infected athletes were fully vaccinated. Participating athletes were  $28.2 \pm 6$  years with a height of  $189.4 \pm 5.4$  cm and a weight of  $95.1 \pm 9.3$  kg. Their body mass index was  $26.5 \pm 1.8$  kg/m<sup>2</sup>. Subjects were experienced professional athletes with a mean training time of 1,152 min per week.

### 2.2 Study-design

We used an experimental study design performing cell culture analysis to obtain immunological data. This study arm was integrated into an observational controlled single-center pilot study design obtaining a broad panel of hematological and cardiovascular parameters as part of pre-season medical clearing (Bauer et al., 2022). This data was integrated into our systemic analysis of the immunological study arm. This additional study arm was approved by the Institutional Review Board of the Justus-Liebig-University Giessen (AZ183/20, 16 March 21) following the ethical guidelines of the declaration of Helsinki. Written informed consent was provided by all participants. Convalescent athletes were invited to the laboratory 14 days after the positive polymerase chain reaction (PCR) test result following the German quarantine regulations and available guidelines for medical clearing (Schellhorn et al., 2020). Control athletes were investigated following the same procedure after their off-season to not interfere with exercise-related immune disruption by high-intensive exercise training. For an overview of our workflow see Figure 1A.

### 2.3 Immunological data

For immunological analysis, CD4<sup>+</sup> T-cells, serum, and plasma were obtained from seven convalescent and eight non-infected fully vaccinated men. Fully vaccinated refers to the German definition at the time from May to August 2022; meaning two doses for BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), two doses for ChAdOx1-S (Oxford-AstraZeneca), and one dose for Ad26.COV2.S COVID-19 (Johnson and Johnson/Janssen). T-cells were isolated from peripheral blood via density gradient centrifugation and subsequent negative selection using EasySep<sup>™</sup> magnetic particles (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) as described by our group before (Palmowski et al., 2021). Isolated CD4<sup>+</sup> were activated with anti-CD3/anti-CD28 stimulating tetramers (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) or remained non-stimulated as controls. Cultures were maintained in IL-2 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) containing medium supplemented by 10% human AB-serum (Pan-Biotech, Aidenbach, Germany) for 72 h until harvest. Cell number, viability, and cell diameter were measured by CASY<sup>®</sup> Cell Counter (OLSOMni Life Science, Bremen, Germany).



Frozen plasma was thawed, labeled using LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay kit "Human Inflammation Panel 1" (BioLegend, San Diego, CA), and measured by flow cytometry (BD FACSAria™ III flow cytometer). Raw data were analyzed by LEGENDplex™ data analysis software (BioLegend, San Diego, CA). Antibody titers were analyzed using the Elecsys anti-SARS-CoV-2 assay on the cobas 601 (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Frozen supernatants were thawed and labeled for IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, and TNF- $\alpha$  using a Luminex assay (Bio-Techne Ltd., Abingdon, Oxon, United Kingdom) and following the manufacturer's instructions. Plasma was analyzed by the Luminex MAGPIX system (Luminex Corporation, Austin, TX, United States).

## 2.4 Clinical and fitness data

All athletes completed the pre-participation questionnaire of the European Federation of Sports Medicine Associations including questions related to health, medication, supplementation, exercise history, and exercise volume. Clinical and fitness data was sampled during the pre-season of handball and ice hockey, and return-to-sport as described before (Bauer et al., 2022). As athletes completed electrocardiographic examinations including a stress test on the bike until subjective exhaustion as part of the medical clearing. Performance was calculated as the participants' wattage at exhaustion in relation to their body weight. As part of the

**TABLE 1** Pro-inflammatory cytokines in plasma at the time point of immunological analysis. Plasma was measured using LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay kit “Human Inflammation Panel 1” (BioLegend, San Diego, CA) and flow cytometry (BD FACSAria™ III flow cytometer). Wilcoxon signed-rank tests were conducted. ( $p < 0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  SD. Significant findings are highlighted in bold letters.

	Con		Vac		p-value
	Mean [pg/ml]	SD [pg/m]	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	
IL-1 $\beta$	12.57	5.54	13.62	4.44	0.424
IFN- $\alpha$ 2	18.42	12.37	21.25	17.47	0.897
IFN- $\gamma$	7.07	5.43	6.30	4.17	1.000
TNF- $\alpha$	25.39	23.71	34.75	34.08	0.523
MCP-1	20.23	17.63	24.11	23.28	0.698
IL-6	8.87	3.87	11.15	7.45	0.436
IL-8	38.70	11.95	60.39	35.22	0.369
IL-10	10.09	7.65	13.50	9.04	0.513
IL-12p70	7.22	4.13	6.64	1.84	0.887
IL-17A	2.98	1.93	2.87	1.41	0.796
IL-18	244.70	64.58	368.75	100.38	<b>0.030</b>
IL-23	9.66	8.05	20.26	25.59	0.887
IL-33	190.34	166.67	160.58	105.87	0.898

clinical examination laboratory blood parameters, such as blood sugar, HbA1c, electrolyte, iron metabolism, coagulation, liver, kidney, muscular enzyme, lipid, and thyroid hormone status were collected. All participants were attested with full physical fitness at the immunological testing.

## 2.5 Statistical analysis

Bioinformatics analysis was performed using RStudio running R software (4.1.2). All data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Data were tested for normal distribution by the Shapiro-Wilk test. To determine the effect of SARS-CoV-2 infection at the time of immunological testing, Wilcoxon signed-rank tests were conducted with all pre- and post-clinical, immunological, and fitness data of all 15 athletes after infection or vaccination. To visualize the differences between the SARS-CoV-2 infected and SARS-CoV-2 vaccinated group we performed a PCA (package factextra) with 59 clinical and immunological parameters and one with clinical and immunological parameters that had a statistical difference of  $p \leq 0.1$ . R-based graphs were created with packages ggplot2 3.4.1 and ggpvr 0.6.0.

Cell culture results were analyzed by a 2-by-2 repeated-measures ANOVA with activation status as the within factor (control cells vs. activated cells) and group (Con vs. Vac) as the between factor. Bonferroni post-hoc test was used. For analysis and visualization we used GraphPad Prism version 5 (San Diego, CA, United States). Data were shown as mean  $\pm$  standard deviation. The same statistics were also applied for the comparison between baseline and follow-up clinical parameters changing the within factor to time. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## 3 Results

### 3.1 Immunological parameters

Analysis of SARS-CoV-2 specific antibodies show no significant differences between Con and Vac in spike-specific plasma IgG antibody titers (Figure 1B). However, in contrast to Con, Vac are non-reactive against the nucleocapsid protein (NCP) (Figure 1C). One athlete belonging to Con did not show NCP antibodies. At the time point of our immunological analysis, there was no significant difference in pro-inflammatory plasma cytokines except for IL-18 (Table 1). IL-18 plasma level was increased in Vac compared to Con.

### 3.2 Principal component analysis

Principal component analysis revealed that all immunological and clinical parameters allow a slight separation between Con and Vac by systemic analysis at the time of immunological testing, while 13 parameters separated infected from vaccinated samples significantly (Figures 1D, E). These were: Creatinine, glomerular filtration rate (GFR), glutamic oxaloacetic transaminase, potassium, creatine kinase, glycated hemoglobin (HbA1c), triiodothyronine, ferritin, myoglobin, cardiovascular parameters (diastolic aortic pressure, mean aortic pressure, and diastolic brachial blood pressure), and TNF- $\alpha$  derived from activated T-cell culture (Table 2).

### 3.3 Activated cell culture

A significant activation-driven effect was detectable for total cell count and cell diameter of the *in vitro* experiments, but not for

**TABLE 2** Selected parameters at the time point of immunological testing that were identified by PCA. All parameters are measured in plasma despite TNF- $\alpha$  that was measured in cell culture supernatants. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Significant findings are highlighted in bold letters.

	Con		Vac		p (post)
	Mean	SD	Mean	SD	
Diastolic aortic pressure	74.43	8.89	64.63	6.65	<b>0.036</b>
Mean aortic pressure	85.86	7.66	77.33	6.26	<b>0.028</b>
Creatinine	0.90	0.08	1.03	0.07	<b>0.015</b>
Glomerular filtration rate	105.81	9.24	94.49	8.64	<b>0.049</b>
Ferritin	206.14	52.27	126.25	92.03	<b>0.032</b>
Triiodothyronine	3.53	0.20	3.21	0.31	<b>0.040</b>
Creatine kinase	117.29	41.05	371.13	305.08	<b>0.013</b>
Myoglobin	65.29	92.10	50.00	27.09	<b>0.042</b>
TNF- $\alpha$	6083.75	122.94	5845.88	127.15	<b>0.007</b>
Diastolic brachial blood pressure	72.86	9.25	64.13	5.84	0.064
Glycated hemoglobin	5.43	0.27	5.13	0.35	0.071
Potassium	4.16	0.26	3.85	0.33	0.080
Glutamic oxaloacetic transaminase	19.00	5.00	28.13	12.24	0.091

viability and survival. We calculated cell survival via the formula: Viability = (100%– viability before culture) + viability after cell culture. Con and Vac measurements were comparable 72-h post-activation (Figures 2A–D; Supplementary Table S1). Likewise, a significant effect for all measured T-cell signature cytokines was found after activation, namely, for IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, and TNF- $\alpha$  (Supplementary Table S1). However, only the levels for TNF- $\alpha$  significantly differed between Vac vs. Con. Supernatants from Con CD4<sup>+</sup> T-cells showed increased TNF- $\alpha$  levels compared to the Vac after the Bonferroni posttest with  $p > 0.001$  (Figure 2E).

### 3.4 Clinical parameters

All laboratory parameters were within the physiologic range. Two-way ANOVA showed a significant effect for time for aortic diastolic and systolic aortic blood pressure for all athletes, Vac and Con, at return-to-sport. Blood pressure was higher at immunological sampling. An effect for time was also found for lactate dehydrogenase with significantly lower mean values both at immunological sampling. A significant effect for the condition was found on HbA1c and free triiodothyronine and a significant interaction of time and condition was shown for potassium, magnesium, and creatinine (Supplementary Table S2).

### 3.5 Fitness parameters

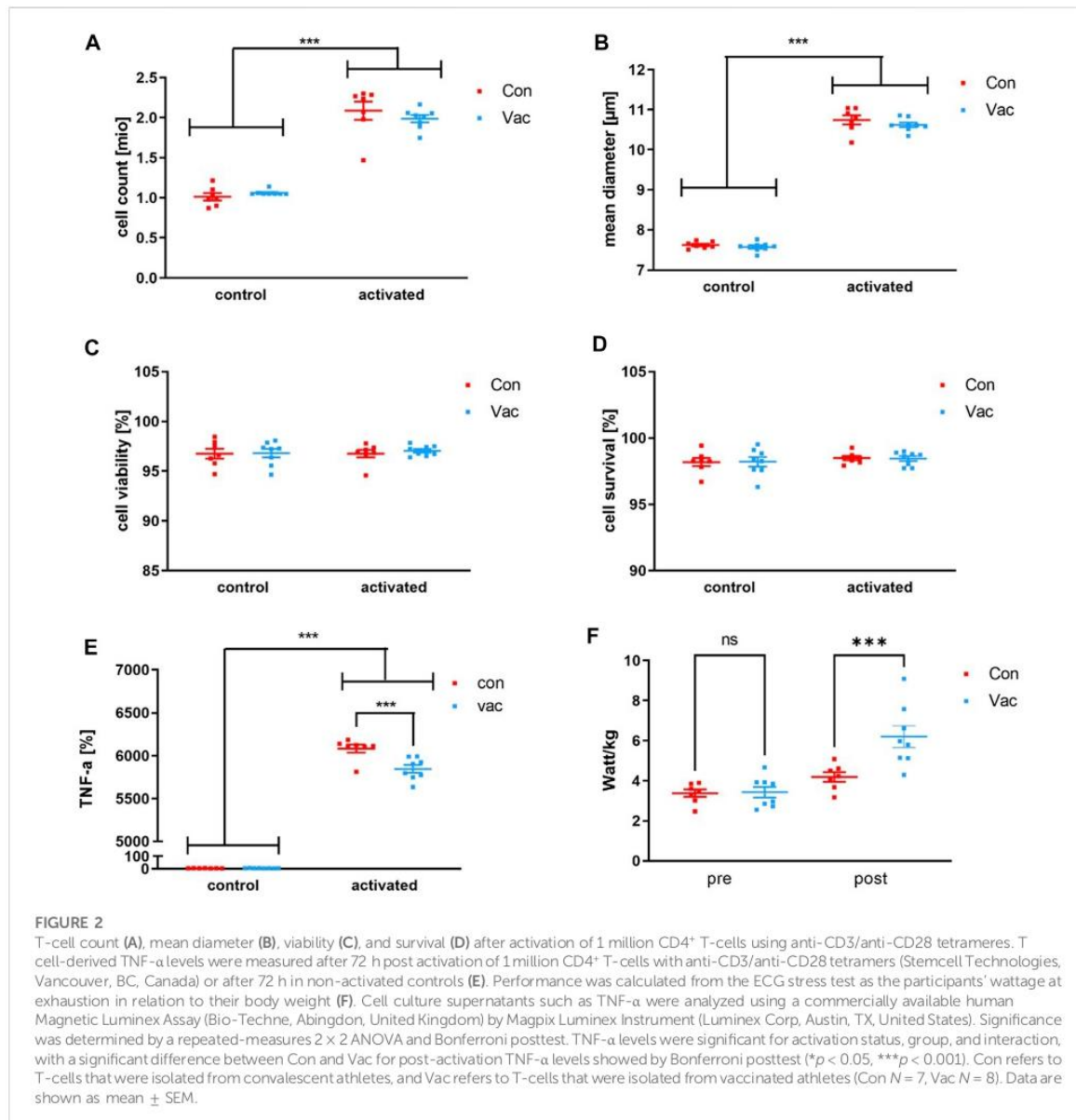
Exercise testing revealed a lower performance/weight ratio for Con compared to Vac. Of note, the individual performance does not fall below pre-season performance after quarantine (Figure 2F).

## 4 Discussion

The present work evaluated T-cell-related cytokines before and after *in-vitro* activation of CD4<sup>+</sup> T-cells sampled from convalescent and vaccinated indoor sports athletes to assess signatures of clinical and immunological parameters in elite athletes who have passed a SARS-CoV-2 infection. There were no elevated levels of inflammatory cytokines in the plasma of Con compared to Vac. Also, no immune disturbance in Con T-cells in terms of activation with anti-CD3/anti-CD28 tetrameres was found. *In vitro* cultivated CD4<sup>+</sup> T-cells showed the expected signs of T-cell activation such as increased cell number, cell diameter, and increased production of T-cell signature cytokines. However, there are indications that can be interpreted as residual infection indicators, such as an increased TNF- $\alpha$  production in activated T-cells and reduced performance.

### 4.1 Increased TNF- $\alpha$ production of CD4<sup>+</sup> T-cells in Con athletes after activation

After T-cell activation, TNF- $\alpha$  production was significantly increased by cells of Con compared to Vac, whereby overall T-cell number, mean cell viability, total cell count, and cell diameter in the *in vitro* experiments were comparable between both groups. Mobilization of peripheral T-cells may have influenced our *in vitro* cell culture results. Increased TNF- $\alpha$  level in Con after activation may be biased by a type 1 differentiation as TNF- $\alpha$  is a classical type 1 cytokine and indicates a higher pro-inflammatory response (Mahnke et al., 2013). TNF- $\alpha$  is produced by type 1 cells, which are possibly still present in greater numbers in peripheral blood after an effective immune response and release



TNF- $\alpha$  after activation (Rosendahl Huber et al., 2014). In line with that, it was shown for other convalescent patients that SARS-CoV-2-specific T-cells predominantly produce Th1 cytokines (Weiskopf et al., 2020). At the same time, the difference in TNF- $\alpha$  level could also be caused by metabolic disturbance of T-cell glycolysis in Vac. *In vitro* studies with isolated CD4<sup>+</sup> have shown, glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose reduces TNF- $\alpha$  production (Renner et al., 2015). Overall, the function of CD4<sup>+</sup> T-cells after activation is not reduced after SARS-CoV-2 infection in athletes. Their peripheral cells react to tetramere activation more sensitively than Vac CD4<sup>+</sup> T-cells.

## 4.2 Increased pro-inflammatory IL-18 in Vac

An elevated level of pro-inflammatory plasma cytokine was found for IL-18 in Vac participants compared to Con. IL-18 is secreted by various cell types such as macrophages, B cells, dendritic cells, keratinocytes, and even type 2 muscle fiber (Mee et al., 2000; Plomgaard et al., 2005; Dinarello et al., 2013). The cytokine is known for its pro-inflammatory properties. It is activated in an NLRP3 inflammasome-dependent manner and enhances Th1 cell activation (Mantovani et al., 2019). We measured similar IL-18 levels for Con athletes compared to other studies that measured IL-18 in healthy young men (Leick et al., 2007; Khakroo Abkenar et al.,

2019). So, we conclude, Con are fully recovered in terms of inflammatory mediators available in plasma. The elevated plasma IL-18 level in Vac could be exercise-related because this cytokine is highly sensitive to resistance exercise training and detraining (Nikseresht et al., 2016; Khakroo Abkenar et al., 2019). Young men showed significantly higher plasma IL-18 accompanied by higher IL-1 $\beta$  levels immediately after acute high-intensity exercise and after 12 weeks of high-intensity exercise training (Khakroo Abkenar et al., 2019). As we found no increase in IL-1 $\beta$  plasma levels and Vac were included after the off-season, an effect of high-intensity exercise training on IL-18 level is unlikely. There may be an effect of detraining on Vac that were included after their full off-season and not merely 14 days post-quarantine. Type 2 muscle fiber number can be maintained within the first initial weeks of detraining. However, a shift to more oxidative fibers in strength athletes is found after 8 weeks of detraining (Bruton, 2002). Potentially this loss of type-2 muscle fiber is attributed to higher IL-18 levels in Vac (Nikseresht et al., 2016). Of note, IL-18 levels were also increased in mRNA-vaccinated patients that acquired myopericarditis and psychiatric disorders such as major depression and panic disorder (Kokai et al., 2002; Won et al., 2022).

### 4.3 Residual infection markers within normal range differentiate Con and Vac athletes

While systemic inflammation of Con athletes based on pro-inflammatory cytokines was resolved, there may still be other residual signs of infection, as indicated by the systemic analysis at medical clearing for ferritin, GFR, and blood pressure. Increased ferritin is common for viral infections (Slaats et al., 2016). Ferritin represents an acute phase protein that is elevated both generally in viral infections and specifically in COVID-19 (Vlahakos et al., 2021). Most likely, residual ferritin may be caused by the physiological apoptosis of iron-depleted immune cells (Arigony et al., 2013). GFR might be attributed to increased blood pressure. In context, the other study arm including professional athletes has found an increased heart rate-corrected augmentation index for Con reflecting lower arterial stiffness (Bauer et al., 2022). Interpreting blood pressure results, one should include emotional adrenergic-related distress caused by quarantine (di Cagno et al., 2020) and its influence on T-cells. Immunologically, sympathetic stress also regulates T-cell function via the beta2-adrenergic receptor ( $\beta$ 2AR) with a potential to alter T-cell activation (Fan and Wang, 2009). Under psychological stressors, humans mobilize particularly peripheral T-cells expressing CXCR3 and CCR5 that sensitively react to chemotactic signals of inflamed endothelial cells (Bosch et al., 2003). However, this mobilization likely is not able to solely explain differences in T-cell activation as blood pressure of Con and Vac both increased across time as indicated by the 2-by-2 ANOVA results.

### 4.4 Lower cardiovascular fitness level in Con

Our data shows the Con's cardiopulmonary performance in watt/kg was lower compared to Vac, though still higher than at pre-season. The COVID-19 detraining effect was not below baseline levels at pre-season. Lower performance levels come as no surprise, as performance-limiting factors, for instance, muscular

capillarization, are known to decrease in only 2 weeks of detraining even in healthy athletes (Bruton, 2002). Performance decline has been mainly attributed to changes in hemodynamics and neuromuscular adaptations, such as maximal oxygen consumption or muscle strength at maintained muscle mass (Chen et al., 2022). In line, a recent COVID-19 study including soccer players also found a decline in high-intensity acceleration performance indicating a lower anaerobic threshold (Savicevic et al., 2021).

### 4.5 Limitations

Current vaccines use the spike protein as a target antigen structure, consequently, a spike-specific immunity is induced. After the infection, the immune response is directed against all viral proteins and not only against the spike protein. Thus, only people who were infected with the virus should have NCP-specific antibodies (Jalkanen et al., 2021). We assumed no unknown infection in the vaccinated control group. However, one Con was non-reactive against NCP, therefore it cannot be ruled out there may be also Vac who had an infection with COVID-19 earlier without building NCP. Further, we cannot exclude, that differences between Con and Vac result from a selection bias. Athletes for this study were selected from the same teams indicating that naturally infected athletes (Con) may have lower immune competence compared to non-infected athletes playing on the same team (Vac).

Unfortunately, our study lacks a control group of non-vaccinated elite athletes and the sample size is low due to the laborious experimental design. This suggests caution when interpreting the findings. Due to the high vaccination rate over the course of the study and a high number of early infected athletes in indoor sports, non-vaccinated elite athletes were not available at the time of sampling in 2021. Although all athletes participating had a reduced physical activity level before the immunological study part, groups may differ by activity level at least 14 days before measurement as convalescent athletes are more limited to physical activity due to quarantine regulations. Interpreting our result, one should take caution of the different training phases the athletes were at before their time off practice. This may have influenced the differences in IL-18 plasma levels. *In vivo*, activation of T-cells would likely be influenced by higher IL-18 levels, while our *in vitro* cell culture was supplemented by non-autologous human AB-serum causing cytokine-wise equal cell culture conditions. IL-18 would likely induce Th1 T-cells after activation (Robinson and O'Garra, 2002).

### 5 Conclusion

T-cell-related immunological aspects other than typical clinical blood markers have not been investigated at medical clearance in Con after COVID-19 yet. Overall, caution is needed in interpreting our results given the small sample size. Our data shows expert-guided medical clearing after COVID-19 is sufficient to bring immunological parameters back to baseline. Con even have a higher inflammatory response to T-cell activation compared to Vac, indicated by higher TNF- $\alpha$  levels. If this is caused by Th1 response and a transient residual sign of infection, should be investigated in future studies. Despite the resolution of

inflammation, athletes and coaches should take into account that athletes' T-cells may act more sensitive to immune activation after SARS-CoV-2 infection up to medical clearance.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Review Board of the Justus-Liebig-University Giessen (AZ183/20, 16th March 21). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

Conceptualization, PB, JP, KG, TR, MH, and KK; data collection, JP, KG, TR, MH SK, and PB, data analysis: SK, HR, MH, CK, and JP visualization, SK und JP, writing, SH, CP, JP, and KK; supervision KK and HR. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## References

- Arigony, A. L. V., de Oliveira, I. M., Machado, M., Bordin, D. L., Bergter, L., Prá, D., et al. (2013). The influence of micronutrients in cell culture: A reflection on viability and genomic stability. *Biomed. Res. Int.* 2013, 597282–597322. doi:10.1155/2013/597282
- Bauer, P., Kraushaar, L., Dörr, O., Keranov, S., Nef, H., Hamm, C. W., et al. (2022). Vascular alterations among male elite athletes recovering from SARS-CoV-2 infection. *Sci. Rep.* 12 (1), 8655. doi:10.1038/s41598-022-12734-z
- Bohm, P., Scharhag, J., Egger, F., Tischer, K. H., Niederseer, D., Schmied, C., et al. (2021). Sports-related sudden cardiac arrest in Germany. *Can. J. Cardiol.* 37 (1), 105–112. doi:10.1016/j.cjca.2020.03.021
- Bosch, J. A., Bemtson, G. G., Cacioppo, J. T., Dhabhar, F. S., and Marucha, P. T. (2003). Acute stress evokes selective mobilization of T cells that differ in chemokine receptor expression: A potential pathway linking immunologic reactivity to cardiovascular disease. *Brain Behav. Immun.* 17 (4), 251–259. doi:10.1016/s0889-1591(03)00054-0
- Bruton, A. (2002). Muscle plasticity. *Physiotherapy* 88 (7), 398–408. doi:10.1016/s0031-9406(05)61265-5
- Chen, Y. T., Hsieh, Y. Y., Ho, J. Y., Lin, T. Y., and Lin, J. C. (2022). Two weeks of detraining reduces cardiopulmonary function and muscular fitness in endurance athletes. *Eur. J. Sport Sci.* 22 (3), 399–406. doi:10.1080/17461391.2021.1880647
- Daniels, C. J., Rajpal, S., Greenshields, J. T., Rosenthal, G. L., Chung, E. H., Terrin, M., et al. (2021). Prevalence of clinical and subclinical myocarditis in competitive athletes with recent SARS-CoV-2 infection: Results from the big ten COVID-19 cardiac registry. *JAMA Cardiol.* 6 (9), 1078–1087. doi:10.1001/jamacardio.2021.2065
- di Cagno, A., Buonsenso, A., Baralla, F., Grazioli, E., Di Martino, G., Lecce, E., et al. (2020). Psychological impact of the quarantine-induced stress during the coronavirus (COVID-19) outbreak among Italian athletes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17 (23), 8867. doi:10.3390/ijerph17238867
- Dinarello, C. A., Novick, D., Kim, S., and Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front. Immunol.* 4, 289. doi:10.3389/fimmu.2013.00289
- Elliott, N., Martin, R., Heron, N., Elliott, J., Grimstead, D., and Biswas, A. (2020). Infographic. Graduated return to play guidance following COVID-19 infection. *Br. J. Sports Med.* 54 (19), 1174–1175. doi:10.1136/bjsports-2020-102637
- Fan, X., and Wang, Y. (2009).  $\beta_2$  Adrenergic receptor on T lymphocytes and its clinical implications. *Prog. Nat. Sci.* 19 (1), 17–23. doi:10.1016/j.pnsc.2008.10.001

## Acknowledgments

We thank all participants who took part in the immunological testing.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2023.1203983/full#supplementary-material>

- Guerrera, G., Picozza, M., D'Orso, S., Placido, R., Pirronello, M., Verdiani, A., et al. (2021). BNT162b2 vaccination induces durable SARS-CoV-2-specific T cells with a stem cell memory phenotype. *Sci. Immunol.* 6 (66), eabl5344. doi:10.1126/sciimmunol.abl5344
- Halle, M., Binzenhöfer, L., Mahrholdt, H., Johannes Schindler, M., Esefeld, K., and Tschöpe, C. (2021). Myocarditis in athletes: A clinical perspective. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 28 (10), 1050–1057. doi:10.1177/2047487320909670
- Jalkanen, P., Kolehmainen, P., Häkkinen, H. K., Huttunen, M., Tähtinen, P. A., Lundberg, R., et al. (2021). COVID-19 mRNA vaccine induced antibody responses against three SARS-CoV-2 variants. *Nat. Commun.* 12 (1), 3991. doi:10.1038/s41467-021-24285-4
- Jones, B., Phillips, G., Beggs, C., Calder, J., Cross, M., Pearce, N., et al. (2021). Team Sport Risk Exposure Framework-2 (TS-REF-2) to identify sports activities and contacts at increased SARS-CoV-2 transmission risk during the COVID-19 pandemic. *Br. J. Sports Med.* 55 (23), 1317–1318. doi:10.1136/bjsports-2021-104225
- Khakroo Abkenar, I., Rahmani-nia, F., and Lombardi, G. (2019). The effects of acute and chronic aerobic activity on the signaling pathway of the inflammasome NLRP3 complex in young men. *Med. Mex.* 55 (4), 105. doi:10.3390/medicina55040105
- Kokai, M., Kashiwamura, S. I., Okamura, H., Ohara, K., and Morita, Y. (2002). Plasma interleukin-18 levels in patients with psychiatric disorders. *J. Immunother.* 25, S68–S71. doi:10.1097/00002371-200203001-00011
- Krzywański, J., Mikulski, T., Krysztofiak, H., Pokrywka, A., Młyńczak, M., Małek, L. A., et al. (2022). Elite athletes with COVID-19 — predictors of the course of disease. *J. Sci. Med. Sport* 25 (1), 9–14. doi:10.1016/j.jsams.2021.07.003
- Leick, L., Lindegaard, B., Stensvold, D., Plomgaard, P., Saltin, B., and Pilegaard, H. (2007). Adipose tissue interleukin-18 mRNA and plasma interleukin-18: Effect of obesity and exercise. *Obesity* 15 (2), 356–363. doi:10.1038/oby.2007.528
- Leung, C. (2021). The younger the milder clinical course of COVID-19: Even in newborns? Genuneit J, editor. *Pediatr. Allergy Immunol.* 32 (2), 358–362. doi:10.1111/pai.13371
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M., and Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 43 (11), 2797–2809. doi:10.1002/eji.201343751

- Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., and Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immunity* 50 (4), 778–795. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.012
- Mee, J. B., Alam, Y., and Groves, R. W. (2000). Human keratinocytes constitutively produce but do not process interleukin-18. *Br. J. Dermatol* 143 (2), 330–336. doi:10.1046/j.1365-2133.2000.03759.x
- Moss, P. (2022). The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.* 23 (2), 186–193. doi:10.1038/s41590-021-01122-w
- Mutsch, B., Heiber, M., Grätz, F., Hain, R., Schönfelder, M., Kaps, S., et al. (2022). Aerosol particle emission increases exponentially above moderate exercise intensity resulting in superemission during maximal exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119 (22), e2202521119. doi:10.1073/pnas.2202521119
- Nikseresht, M., Hafezi Ahmadi, M. R., and Hedayati, M. (2016). Detraining-induced alterations in adipokines and cardiometabolic risk factors after nonlinear periodized resistance and aerobic interval training in obese men. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 41 (10), 1018–1025. doi:10.1139/apnm-2015-0693
- Palmowski, J., Gebhardt, K., Reichel, T., Frech, T., Ringseis, R., Eder, K., et al. (2021). The impact of exercise serum on selected parameters of CD4+ T cell metabolism. *Immuno* 1 (3), 119–131. doi:10.3390/immuno1030008
- Pauser, J., Schwarz, C., Morgan, J., Jantsch, J., and Brem, M. (2021). SARS-CoV-2 transmission during an indoor professional sporting event. *Sci. Rep.* 11 (1), 20723. doi:10.1038/s41598-021-99997-0
- Phelan, D., Kim, J. H., and Chung, E. H. (2020). A game plan for the resumption of sport and exercise after coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. *JAMA Cardiol.* 5 (10), 1085–1086. doi:10.1001/jamacardio.2020.2136
- Plomgaard, P., Penkowa, M., and Pedersen, B. K. (2005). Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles. *Exerc. Immunol. Rev.* 11, 53–63.
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., and Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74 (1), 5–17. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011
- Renner, K., Geiselhöringer, A. L., Fante, M., Bruss, C., Färber, S., Schönhammer, G., et al. (2015). Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions. *Eur. J. Immunol.* 45 (9), 2504–2516. doi:10.1002/eji.201545473
- Robinson, D. S., and O'Garra, A. (2002). Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* 16 (6), 755–758. doi:10.1016/s1074-7613(02)00331-x
- Rosendahl Huber, S., van Beek, J., de Jonge, J., Luytjes, W., and van Baarle, D. (2014). T cell responses to viral infections - opportunities for Peptide vaccination. *Front. Immunol.* 5, 171. doi:10.3389/fimmu.2014.00171
- Sallis, R., Young, D. R., Tartof, S. Y., Sallis, J. F., Sall, J., Li, Q., et al. (2021). Physical inactivity is associated with a higher risk for severe COVID-19 outcomes: A study in 48 440 adult patients. *Br. J. Sports Med.* 55 (19), 1099–1105. doi:10.1136/bjsports-2021-104080
- Savicevic, A. J., Nincevic, J., Versic, S., Cuschieri, S., Bandalovic, A., Turic, A., et al. (2021). Performance of professional soccer players before and after COVID-19 infection: observational study with an emphasis on graduated return to play. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (21), 11688. doi:10.3390/ijerph182111688
- Schellhorn, P., Klingel, K., and Burgstahler, C. (2020). Return to sports after COVID-19 infection. *Eur. Heart J.* 41 (46), 4382–4384. doi:10.1093/eurheartj/ehaa448
- Slaats, J., ten Oever, J., van de Veerdonk, F. L., and Netea, M. G. (2016). IL-1 $\beta$ /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct inflammatory programs in infections. *PLOS Pathog.* 12 (12), e1005973. doi:10.1371/journal.ppat.1005973
- Tang, J. W., Bahnfleth, W. P., Bluysen, P. M., Buonanno, G., Jimenez, J. L., Kurnitski, J., et al. (2021). Dismantling myths on the airborne transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J. Hosp. Infect.* 110, 89–96. doi:10.1016/j.jhin.2020.12.022
- Vlahakos, V. D., Marathias, K. P., Arkadopoulos, N., and Vlahakos, D. V. (2021). Hyperferritinemia in patients with COVID-19: An opportunity for iron chelation? *Artif. Organs* 45 (2), 163–167. doi:10.1111/aor.13812
- Wang, J., and Han, B. (2020). Dysregulated CD4+ T cells and microRNAs in myocarditis. *Front. Immunol.* 11, 539. doi:10.3389/fimmu.2020.00539
- Weiskopf, D., Schmitz, K. S., Raadsen, M. P., Grifoni, A., Okba, N. M. A., Endeman, H., et al. (2020). Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.* 5 (48), eabd2071. doi:10.1126/sciimmunol.abd2071
- Wilson, M. G., Hull, J. H., Rogers, J., Pollock, N., Dodd, M., Haines, J., et al. (2020). Cardiorespiratory considerations for return-to-play in elite athletes after COVID-19 infection: A practical guide for sport and exercise medicine physicians. *Br. J. Sports Med.* 54 (19), 1157–1161. doi:10.1136/bjsports-2020-102710
- Won, T., Gilotra, N. A., Wood, M. K., Hughes, D. M., Talor, M. V., Lovell, J., et al. (2022). Increased interleukin 18-dependent immune responses are associated with myopericarditis after COVID-19 mRNA vaccination. *Front. Immunol.* 13, 851620. doi:10.3389/fimmu.2022.851620

## 5. Diskussion und Ausblick

### 5.1. Kein Einfluss des Nachbelastungsserum auf CD4+ T-Zellen in vitro

Im Rahmen dieser kumulativen Dissertation stellte sich erstens die Frage, ob es ein echtes „Open Window“ der CD4+ T-Zellen, beeinflusst durch Serumfaktoren nach einer akuten Laufbelastung, gibt. Die Ergebnisse von Palmowski et al. (2019) zeigen, dass Nachbelastungsserum der gewählten 30-minütigen Belastung den T-Zell-Immunmetabolismus nicht herabsetzt. Der Immunmetabolismus zeigte sich weder in Bezug auf die Glykolyserate, noch den Sauerstoffverbrauch signifikant vermindert. Hinsichtlich mitochondrialen Respiration ergaben sich keine Unterschiede der mRNA-Level, die mit der Elektronentransportkette assoziiert sind. Erhöhte Kapazitäten der Elektronentransportkette von CD4+ T-Zellen durch das Belastungsserum sind unwahrscheinlich, da die erhobenen mRNA-Level von CD4+ T-Zellen keine Unterschiede der ATPase-codierenden mRNA zeigen. Auch Viabilität, Wachstum und T-Zellmemory-Subtypen, die mit Stoffwechseleränderungen assoziiert sind, waren nach der Aktivierung im Belastungsserum vergleichbar [3].

Durch die gewählte Studienmethodik sind diese Zellkulturergebnisse nicht durch die Mobilisierung von T-Zellen beeinflusst. Innerhalb der Studiendiskussion stellte sich allerdings die Frage, ob die verwendete Methodik der Sauerstoffmessung nicht sensitiv genug ist und eine hochauflösende Respirometrie zu signifikanten Ergebnissen führen würde [3]. Die neuere Studienlage zu einer 30-minütigen Ausdauerbelastung bei PMBC zeigt allerdings ebenfalls keine erhöhte OXPHOS auf der Zellebene [107]. Somit ist wahrscheinlich anzunehmen, dass eine intensive Laufbelastung von 30-Minuten tatsächlich keinen Einfluss auf die OXPHOS der CD4+ T-Zellen hat. Es konnte kürzlich für längere intensive Belastungen gezeigt werden, dass bei PMBC die OXPHOS ansteigt. Bei einer maximal-intensiven Schwimmbelastung von einer Stunde Dauer erhöhte sich die OXPHOS von PMBC auf Zellebene, wobei die Kapazitäten der Elektronentransportkette nicht beeinflusst wurden. Jedoch wurde die OXPHOS von T-Zell-Subtypen, wie CD4+, nach 60-minütigen Belastungen bis heute nicht mittels hochauflösender Respirometrie untersucht. Dies könnte ein Ansatz für zukünftige Studien zum Immunmetabolismus im Ausdauersport sein [99].

### 5.2. Spuren einer erhöhten T-Zellaktivierung im Belastungsserum

Es wurde vermutet, dass veränderte Zytokin-, Glukose- oder Laktatkonzentrationen im Belastungsserum zu veränderter Polarisierung der CD4+ nach der Aktivierung führen, was mit veränderten Konzentrationen von Effektor-Zytokinen nach der Aktivierung einhergeht [108]. Es ergaben sich bezüglich der gemessenen Effektor-Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21 und IL-23) keine Unterschiede nach der Aktivierung zwischen den Ansätzen mit Belastungs- und Ruheserum. Im Rahmen der Studie konnten jedoch nicht alle Effektor-Zytokine gemessen werden. TGF- $\beta$  wurde sowohl im ersten als auch im zweiten Studienabschnitt nicht gemessen, da Inkompatibilität mit den anderen Zytokinen des Multiplex-Panels bestand [2,3]. Dabei ist TGF- $\beta$  im Kontext Sport ein wichtiger Wachstumsfaktor, da er durch eine akute Belastung als Myokin ausgeschüttet wird und so die Subtypen Th<sub>17</sub> und T<sub>reg</sub> induzieren kann [24,88]. Epigenetisch wird Foxp3, der Transkriptionsfaktor von T<sub>reg</sub> hauptsächlich in einem Milieu mit hoher Laktat- und geringer Glukosekonzentration von CD4+ exprimiert, sodass bei hoher Laktat- und hoher Glukosekonzentration, wie im ersten Studienabschnitt

gemessen, eine Differenzierung in Richtung  $T_{reg}$  unwahrscheinlich ist [3,109]. Das Zytokin  $IFN-\gamma$  ist ein weiterer wichtiger Indikator für die funktionelle TCR-Aktivierung. Die höchsten Konzentrationen in Zellkulturüberständen wurden für  $CD4+$  T-Zellen 48 Stunden nach der Aktivierung gemessen. Dagegen bleibt die  $IFN-\gamma$  -Produktion nach der TCR-Aktivierung robust gegenüber einem Glukose- oder Glutaminmangel. Sie wird somit offenbar nicht vom Stoffwechsel beeinflusst [36]. Zukünftige Studien mit verändertem Belastungsprofil sollten daher insbesondere  $TGF-\beta$ -Konzentrationen nach Aktivierung von  $CD4+$  T-Zellen messen. Auffälligkeiten ergaben sich in den Konzentrationen des löslichen  $IFN-\gamma-R1$ , der im Belastungsserum unabhängig von Ruhe oder Aktivierung erhöht war. Diese könnten Spuren einer erhöhten T-Zellaktivierung der Immunzellen durch das Belastungsserum sein. Geht man von einer höheren Aktivierung der  $CD4+$  im Nachbelastungsserum aus, müsste dies allerdings einen Einfluss auf die Zytokinausschüttung haben. Es lässt sich lediglich spekulieren, dass mit der höheren Aktivierung eine geringere Zytokinausschüttung kompensiert wird, worüber zukünftig Einzelzellanalysen Aufschluss geben könnten. Zum Messzeitpunkt 72h nach der Aktivierung selbst, konnten darüber hinaus keine Unterschiede hinsichtlich des Aktivierungsmarkers  $CD95$  festgestellt werden [3].

### 5.3. Veränderte HK1 mRNA Expression nach $CD4+$ -Aktivierung durch eine akute Laufbelastung

Durch die Verdünnung der Seren mit 50 % T-Zellkulturmedium war der Einfluss aller Serumfaktoren, wie von Glukose, Laktat oder Zytokinen, im Belastungsserum reduziert. Von allen gemessenen Parametern war einzig die Expression der mRNA von Hexokinase 1 (HK1) durch das Belastungsserum signifikant reduziert ( $p=0,033$ ). Sie transliert das limitierende Enzym HK1 der Substratphosphorylierung [3]. Eine Erhöhung von HK1 ist mit dem Switch in Richtung des Warburg Stoffwechsel bei der Aktivierung assoziiert, sodass davon auszugehen ist, dass dieser Shift der  $CD4+$  im Ruheserum verstärkt wird. Zusammen mit dem Trend für eine geringere Glukoseaufnahme der  $CD4+$  im Belastungsserum ( $p=0,053$ ) und dem Trend zu einer erhöhten Laktatkonzentration ( $p=0,061$ ), welche HK1 ebenfalls herunterregulieren kann, ist dies wahrscheinlich [3,76]. Zukünftige Studien sollten besser Glukose und Laktat in physiologischen Konzentrationen entsprechend der gewählten sportlichen Belastung dem Zellkulturmedium zusetzen, um den Effekt auf die  $CD4+$  T-Zellen bestätigen oder ausschließen zu können. Weiterhin kann die Messung oder Blockierung von Zellmembrantransportern, mittels Durchflusszytometrie oder Glukosetransporter 2-Deoxyglukose, Klarheit über die Veränderung der GLYC von  $CD4+$  durch akute und regelmäßige Laufbelastungen bringen [3].

### 5.4. Keine Dysregulation der $CD4+$ nach einer SARS-CoV-2-Infektion

Zweitens stellte sich die Frage, ob regelmäßiges Training die Immunkompetenz von Sportlern so moduliert, sodass nach einer SARS-CoV-2-Infektion keine Dysregulation der T-Zellaktivierung zurückbleibt. Dazu wurden T-Zell-Zytokine in der Zellkultur vor und nach der Aktivierung von  $CD4+$  T-Zellen bei SARS-CoV-2-genesenen und -geimpften Profisportlern gemessen [2]. Die basal gemessenen Zytokinwerte deuten darauf hin, dass zwischen den Probandengruppen kein signifikanter Unterschied der pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine mit direktem Bezug zu  $CD4+$  T-Zellen besteht. Diese waren  $IL-2$ ,  $IL-4$ ,  $IL-5$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IFN-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $MCP-1$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-10$ ,  $IL-13$ ,  $IL-12p70$ ,  $IL17A$ ,  $IL-23$  und  $IL-33$  [2]. Nachwirkungen einer COVID-19-Erkrankung, wie beim Long-COVID-Syndrom scheinen bei den eingeschlossenen Probanden nicht vorzuliegen, da dies mit erniedrigten  $IL-6$  und erhöhten  $IL-10$ -Konzentrationen im Serum einhergehen müsste. Junge Männer mit Long-COVID, d.h. persistierenden COVID-Symptomen bis zu 3 Monaten, haben zudem eine geringere Konzentration peripherer  $T_{reg}$  und  $CD4+$  T-Zellen mit höherer  $CD279$ -Expressierung im Vergleich zur Kontrollgruppe

ohne bleibende Symptome und sind eher weniger körperlich aktiv [110]. Die gemessenen Schlüsselzytokine von  $T_{reg}$ , wie IL-10, waren in den beiden Gruppen sowohl vor als auch nach Aktivierung nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Daten für TGF- $\beta$  wurden aufgrund der Inkompatibilität mit den anderen Zytokinen des Multiplex-Panels ebenfalls nicht erhoben [2].

Das einzige signifikant auffällige Zytokin war IL-18, das allein nur in der geimpften Kontrollgruppe unphysiologisch erhöht war [2]. Als proinflammatorisches, pleiotropes Zytokin wirkt IL-18 in Kombination mit IL-12 auf aktivierte CD4+ T-Zellen erstens in Richtung einer Polarisation von Th<sub>1</sub>-Subtypen [87]. Die IL-12 Konzentrationen unterschieden sich in den Ergebnissen von Palmowski et al. 2023 jedoch nicht [2]. Zweitens kann IL-18 und eine Aktivierung des TCR über den Transkriptionsfaktor STAT6, die IL-4 Ausschüttung von CD4+ in vitro steigern. IL-18 wirkt somit auf die Höhe der IgE-Ausschüttung und kann Auslöser für Allergien sein [111]. In einer retrospektiven Studie mit 460 Sportlern wurde über allergische Reaktionen im zeitlichen Zusammenhang nach der Impfung aber nichts berichtet [112]. Außerdem unterschieden sich die IL-4 Konzentrationen zwischen den Probandengruppen nicht [2]. Eine plausible Schlussfolgerung war daher, dass die reduzierten IL-18-Werte durch einen Verlust von schnell-kontrahierenden Muskelfasern entstehen, der durch die Saisonpause der nicht-infizierten Sportler im Vergleich zur 14-tägigen Quarantäne bedingt ist [2]. Nicht auszuschließen ist ein Zusammenhang mit den neuartigen SARS-CoV-2-Impfungen durch Spikeprotein-mRNA, da nach impfassoziierter Myokarditis und Myoperikarditis bereits erhöhte IL-18-Konzentrationen als kardiotoxisch diskutiert worden sind [113].

## 5.5. Erhöhte TNF- $\alpha$ Zytokinkonzentrationen nach CD4+ Aktivierung bei genesenen Sportlern

TNF- $\alpha$ , als Schlüsselzytokin von Th1-Zellen, war in der Zellkultur 72 Stunden nach der Aktivierung bei den genesenen Sportlern im Vergleich zu Nicht-Infizierten signifikant erhöht [2]. Nach der T-Zell-Aktivierung mit anti-CD3/CD28-Tetrameren, wird die TNF- $\alpha$ -Produktion gewöhnlich hochreguliert [36]. Bei Long-COVID-Probanden, konnte dennoch eine geringere IL-6, IFN- $\gamma$ , und TNF- $\alpha$  Produktion von PMBC nach der Stimulation mit PMA und LPS aufgezeigt werden, die als vorübergehende Immunsuppression gedeutet wurden [110]. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die genesenen Probanden der Studie Palmowski et al. 2023 keine vorübergehende Immunsuppression aufweisen, denn die TNF- $\alpha$ -Level der Genesenen sind sogar signifikant erhöht [2]. Ein Zusammenhang mit dem T-Zellstoffwechsel ist möglich, denn CD4+ T-Zellen reduzieren in vitro ihre TNF- $\alpha$ -Ausschüttung, wenn die GLYC inhibitorisch herunterreguliert wird [36]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die CD4+ der genesenen Sportler auf der Stoffwechselebene zurückbleibende Veränderungen aufweisen. Ein Anstieg der Glykolyse mit erhöhte Expressierung von Glut1 durch den viralen Infekt könnte bei den Genesenen zu erhöhter TNF- $\alpha$ -Ausschüttung geführt haben, jedoch wurden diese Stoffwechseparameter im zweiten Studienabschnitt nicht untersucht [2]. Die Interpretation der physiologischen Bedeutung einer erhöhten TNF- $\alpha$  Ausschüttung lässt sich schwer bewerten, da Normwerte nach einer in vitro Aktivierung mit anti-CD3/CD28 von CD4+ T-Zellen bei Sportlern nicht bekannt sind. TNF- $\alpha$  ist ein wichtiger Regulator des Stoffwechsels, z. B. über die Inhibition des Fettstoffwechsels und die Regulation des Cholesterolfstoffwechsels [114]. Zudem ist die Wirkung von TNF- $\alpha$  pleiotrop und beispielsweise abhängig davon, an welchen Rezeptor TNF- $\alpha$  gebunden wird. So ist neben einer pro-inflammatorischen Wirkung auf CD4+ über NF- $\kappa$ B und MAPK mit folgender Apoptose eine anti-inflammatorische Wirkung über CD4+ T-Zellen möglich, bei der TNF- $\alpha$  die Proliferation von  $T_{reg}$  auslöst [115]. Weiterführende Studien könnten die TNF- $\alpha$ -Rezeptoren und die Stoffwechselebene stärker in den Fokus rücken.

## 6. Fazit

Körperliche Aktivität als Präventivmedizin zur Stärkung des Immunsystems ist eine allgemein anerkannte Intervention [4]. Nach einer SARS-CoV-2 Infektion zeigte sich, dass bei den in unserer Studie untersuchten männlichen Mannschafts-Sportlern keine immunologische Dysregulation der CD4+ T-Zellen zurückbleibt [2]. Unklar bleibt, ob dies ebenfalls für CD4+ von weiblichen Sportlern gilt, da Geschlechtsunterschiede der Immunfunktion besonders für CD4+ bekannt sind [116]. Die genauen adaptiven molekularen Mechanismen, die das Immunsystem durch Sport stärken, sind bis heute ungeklärt. CD4+ Subtypen wurden vorher nicht im Kontext einer akuten Laufbelastung auf den Immunmetabolismus untersucht [99]. Ein „Open Window“, das einer Adaptation vorhergehen könnte, konnte in dieser kumulativen Dissertation, in Bezug auf den oxidativen Stoffwechsel nach einer 30-minütigen Ausdauerbelastung, nicht aufgezeigt werden [3]. Möglicherweise können länger dauernde Belastungen, welche die Glykogenspeicher leeren, darauf Einfluss nehmen, was zukünftige Studien zeigen müssen. Falls es einen adaptiven Mechanismus der CD4+ nach 30-minütiger Laufbelastung gibt, könnte dieser auf Ebene der Epigenetik zu finden sein. Die Reduktion der HK1 mRNA gibt in der durchgeführten Studie erste Hinweise darauf [3]. MicroRNAs oder Exosomen sind ebenfalls vielversprechende epigenetische Modulatoren von CD4+, die in zukünftigen Studien untersucht werden könnten [117,118]. Die Forschungslücke zwischen den Erkenntnissen gilt es in zukünftigen Studien zu schließen. Dabei wird immer eine Problematik bleiben, dass die Diversität und Plastizität von CD4+ T-Zellen hinsichtlich Phänotyp und Funktion groß ist und die grundlegenden Mechanismen der Plastizität in der Grundlagenforschung kaum verstanden sind [15].

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Eigene Übersicht der verschiedenen T-Zell-Subtypen mit ihren Transkriptionsfaktoren, Schlüsselzytokinen und Oberflächenmarkern [21,28,32].	- 5 -
Abbildung 2. Eigene Abbildung der verschiedenen Einflussfaktoren auf den T-Zellmetabolismus durch Veränderungen im peripheren Blut bei akuter sportlicher Belastung [77].	- 9 -
Abbildung 3. Eigene Abbildung des Studiendesigns [2,3].	- 14 -
Abbildung 4. Eigene Abbildungen des methodischer Ablaufs der Labormethoden der beiden Studienteile 1 und 2 [2,3].	- 15 -
Abbildung 5. Eigene Abbildung zu Einflüssen auf die Sauerstoffsättigung und Zellkulturbedingungen der beiden Studienabschnitte [2,3,106].	- 16 -

## Literaturverzeichnis

- [1] Siska PJ, Decking S-M, Babl N, Matos C, Bruss C, Singer K, et al. Metabolic imbalance of T cells in COVID-19 is hallmarked by basigin and mitigated by dexamethasone. *Journal of Clinical Investigation* 2021;131:e148225. <https://doi.org/10.1172/JCI148225>.
- [2] Palmowski J, Kohnhorst S, Bauer P, Puta C, Haunhorst S, Gebhardt K, et al. T-cell-derived TNF- $\alpha$  and a cluster of immunological parameters from plasma allow a separation between SARS-CoV-2 convalescent versus vaccinated elite athletes. *Front Physiol* 2023;14:1203983. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1203983>.
- [3] Palmowski J, Gebhardt K, Reichel T, Frech T, Ringseis R, Eder K, et al. The Impact of Exercise Serum on Selected Parameters of CD4+ T Cell Metabolism. *Immuno* 2021;1:119–31. <https://doi.org/10.3390/immuno1030008>.
- [4] Nieman DC. Exercise Is Medicine for Immune Function: Implication for COVID-19. *Curr Sports Med Rep* 2021;20:395–401. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000867>.
- [5] Walsh NP, Gleeson M, Pyne DB, Nieman DC, Dhabhar FS, Shephard RJ, et al. Position statement. Part two: Maintaining immune health. *Exerc Immunol Rev* 2011;17:64–103.
- [6] Halle M, Binzenhöfer L, Mahrholdt H, Johannes Schindler M, Esefeld K, Tschöpe C. Myocarditis in athletes: A clinical perspective. *European Journal of Preventive Cardiology* 2021;28:1050–7. <https://doi.org/10.1177/2047487320909670>.
- [7] Modica G, Bianco M, Sollazzo F, Di Murro E, Monti R, Cammarano M, et al. Myocarditis in Athletes Recovering from COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *IJERPH* 2022;19:4279. <https://doi.org/10.3390/ijerph19074279>.
- [8] Glynne P, Tahmasebi N, Gant V, Gupta R. Long COVID following Mild SARS-CoV-2 Infection: Characteristic T Cell Alterations and Response to Antihistamines. *Journal of Investigative Medicine* 2022;70:61–7. <https://doi.org/10.1136/jim-2021-002051>.
- [9] Nieman DC, Pence BD. Exercise immunology: Future directions. *Journal of Sport and Health Science* 2020;9:432–45. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.12.003>.
- [10] Bantug GR, Galluzzi L, Kroemer G, Hess C. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;18:19–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.99>.
- [11] Zhao G, Zhou S, Davie A, Su Q. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *Exerc Immunol Rev* 2012;18:98–114.
- [12] Siedlik JA, Benedict SH, Landes EJ, Weir JP, Vardiman JP, Gallagher PM. Acute bouts of exercise induce a suppressive effect on lymphocyte proliferation in human subjects: A meta-analysis. *Brain, Behavior, and Immunity* 2016;56:343–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.008>.
- [13] Simpson RJ, Campbell JP, Gleeson M, Krüger K, Nieman DC, Pyne DB, et al. Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection? *Exerc Immunol Rev* 2020;26:8–22.
- [14] Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Guarini P, et al. Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Front Immunol* 2014;5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00630>.

- [15] Goldsmith CD, Donovan T, Vlahovich N, Pyne DB. Unlocking the Role of Exercise on CD4+ T Cell Plasticity. *Front Immunol* 2021;12:729366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.729366>.
- [16] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
- [17] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 2011;331:44–9. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>.
- [18] Nascimbeni M, Shin E-C, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4+CD8+ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 2004;104:478–86. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4395>.
- [19] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The Biology of NKT Cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711>.
- [20] Hashimoto K, Kouno T, Ikawa T, Hayatsu N, Miyajima Y, Yabukami H, et al. Single-cell transcriptomics reveals expansion of cytotoxic CD4 T cells in supercentenarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116:24242–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907883116>.
- [21] Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets: HIGHLIGHTS. *Eur J Immunol* 2013;43:2797–809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>.
- [22] Miggelbrink AM, Jackson JD, Lorrey SJ, Srinivasan ES, Waibl-Polania J, Wilkinson DS, et al. CD4 T-Cell Exhaustion: Does It Exist and What Are Its Roles in Cancer? *Clinical Cancer Research* 2021;27:5742–52. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0206>.
- [23] Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, et al. The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Seminars in Immunology* 2013;25:252–62. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.012>.
- [24] Kircher S, Merino-Wong M, Niemeyer BA, Alansary D. Profiling calcium signals of in vitro polarized human effector CD4 + T cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2018;1865:932–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.04.001>.
- [25] Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2020;17:387–401. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0352-5>.
- [26] Chatzileontiadou DSM, Sloane H, Nguyen AT, Gras S, Grant EJ. The Many Faces of CD4+ T Cells: Immunological and Structural Characteristics. *IJMS* 2020;22:73. <https://doi.org/10.3390/ijms22010073>.
- [27] Chemin K, Gerstner C, Malmström V. Effector Functions of CD4+ T Cells at the Site of Local Autoimmune Inflammation—Lessons From Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2019;10:353. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00353>.
- [28] Kortekaas Krohn I, Aerts JL, Breckpot K, Goyvaerts C, Knol E, Van Wijk F, et al. T-cell subsets in the skin and their role in inflammatory skin disorders. *Allergy* 2022;77:827–42. <https://doi.org/10.1111/all.15104>.
- [29] Weinhold M, Shimabukuro-Vornhagen A, Franke A, Theurich S, Wahl P, Hallek M, et al. Physical exercise modulates the homeostasis of human regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;137:1607-1610.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.035>.
- [30] Zúñiga TM, Baker FL, Smith KA, Batatinha H, Lau B, Burgess SC, et al. Clonal Kinetics and Single-Cell Transcriptional Profiles of T Cells Mobilized to Blood by Acute Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2023;55:991–1002. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000003130>.
- [31] Hunt RM, Elzayat MT, Markofski MM, Laughlin M, LaVoy EC. Characterization of transitional memory CD4+ and CD8+ T-cell mobilization during and after an acute bout of exercise. *Front Sports Act Living* 2023;5:1120454. <https://doi.org/10.3389/fspor.2023.1120454>.
- [32] Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, Van Der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry* 2019;95:647–54. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23724>.
- [33] Malissen B, Grégoire C, Malissen M, Roncagalli R. Integrative biology of T cell activation. *Nat Immunol* 2014;15:790–7. <https://doi.org/10.1038/ni.2959>.

- [34] van Panhuys N, Klauschen F, Germain RN. T-Cell-Receptor-Dependent Signal Intensity Dominantly Controls CD4<sup>+</sup> T Cell Polarization In Vivo. *Immunity* 2014;41:63–74. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.003>.
- [35] Jones N, Vincent EE, Cronin JG, Panetti S, Chambers M, Holm SR, et al. Akt and STAT5 mediate naïve human CD4<sup>+</sup> T-cell early metabolic response to TCR stimulation. *Nat Commun* 2019;10:2042. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10023-4>.
- [36] Renner K, Geiselhöringer A-L, Fante M, Bruss C, Färber S, Schönhammer G, et al. Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions: Cellular immune response. *Eur J Immunol* 2015;45:2504–16. <https://doi.org/10.1002/eji.201545473>.
- [37] Ricciardi S, Manfrini N, Alfieri R, Calamita P, Crosti MC, Gallo S, et al. The Translational Machinery of Human CD4<sup>+</sup> T Cells Is Poised for Activation and Controls the Switch from Quiescence to Metabolic Remodeling. *Cell Metabolism* 2018;28:895-906.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.009>.
- [38] Alack K, Weiss A, Krüger K, Höret M, Schermuly R, Frech T, et al. Profiling of human lymphocytes reveals a specific network of protein kinases modulated by endurance training status. *Sci Rep* 2020;10:888. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57676-6>.
- [39] Liu R, Fan W, Krüger K, Xiao Y, Pilat C, Seimetz M, et al. Exercise Affects T-Cell Function by Modifying Intracellular Calcium Homeostasis. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2017;49:29–39. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001080>.
- [40] Zynda ER, Grimm MJ, Yuan M, Zhong L, Mace TA, Capitano M, et al. A role for the thermal environment in defining co-stimulation requirements for CD4<sup>+</sup> T cell activation. *Cell Cycle* 2015;14:2340–54. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1049782>.
- [41] Gleeson M. Temperature Regulation During Exercise. *Int J Sports Med* 1998;19:S96–9. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971967>.
- [42] Zeng C, Evans JP, King T, Zheng Y-M, Oltz EM, Whelan SPJ, et al. SARS-CoV-2 spreads through cell-to-cell transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2022;119:e2111400119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111400119>.
- [43] Liang S, Bao C, Yang Z, Liu S, Sun Y, Cao W, et al. SARS-CoV-2 spike protein induces IL-18-mediated cardiopulmonary inflammation via reduced mitophagy. *Sig Transduct Target Ther* 2023;8:108. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01368-w>.
- [44] Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020;20:529–36. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>.
- [45] Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol* 2020;5:eabd2071. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>.
- [46] Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* 2022;23:186–93. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w>.
- [47] Steiner S, Sotzny F, Bauer S, Na I-K, Schmueck-Henneresse M, Corman VM, et al. HCoV- and SARS-CoV-2 Cross-Reactive T Cells in COVID Patients. *Front Immunol* 2020;11:607918. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.607918>.
- [48] Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature* 2020;587:270–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>.
- [49] Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science* 2020;370:89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>.
- [50] Sette A, Sidney J, Crotty S. T Cell Responses to SARS-CoV-2. *Annu Rev Immunol* 2023;41:343–73. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101721-061120>.
- [51] Woldemeskel BA, Kwaa AK, Garliss CC, Laeyendecker O, Ray SC, Blankson JN. Healthy donor T cell responses to common cold coronaviruses and SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Investigation* 2020;130:6631–8. <https://doi.org/10.1172/JCI143120>.

- [52] Bonifacius A, Tischer-Zimmermann S, Dragon AC, Gussarow D, Vogel A, Krettek U, et al. COVID-19 immune signatures reveal stable antiviral T cell function despite declining humoral responses. *Immunity* 2021;54:340-354.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.008>.
- [53] Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* 2020;369:eabc8511. <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>.
- [54] Russell MW, Mestecky J. Mucosal immunity: The missing link in comprehending SARS-CoV-2 infection and transmission. *Front Immunol* 2022;13:957107. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.957107>.
- [55] Gong F, Dai Y, Zheng T, Cheng L, Zhao D, Wang H, et al. Peripheral CD4+ T cell subsets and antibody response in COVID-19 convalescent individuals. *Journal of Clinical Investigation* 2020;130:6588–99. <https://doi.org/10.1172/JCI141054>.
- [56] Neidleman J, Luo X, Frouard J, Xie G, Gill G, Stein ES, et al. SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential. *Cell Reports Medicine* 2020;1:100081. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100081>.
- [57] Mahase E. Covid-19: What do we know about “long covid”? *BMJ* 2020;m2815. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2815>.
- [58] Sallis R, Young DR, Tartof SY, Sallis JF, Sall J, Li Q, et al. Physical inactivity is associated with a higher risk for severe COVID-19 outcomes: a study in 48 440 adult patients. *Br J Sports Med* 2021;55:1099–105. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2021-104080>.
- [59] Baker FL, Zúñiga TM, Smith KA, Batatinha H, Kulangara TS, Seckeler MD, et al. Exercise mobilizes diverse antigen specific T-cells and elevates neutralizing antibodies in humans with natural immunity to SARS CoV-2. *Brain, Behavior, & Immunity - Health* 2023;28:100600. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100600>.
- [60] Parry PI, Lefringhausen A, Turni C, Neil CJ, Cosford R, Hudson NJ, et al. ‘Spikeopathy’: COVID-19 Spike Protein Is Pathogenic, from Both Virus and Vaccine mRNA. *Biomedicines* 2023;11:2287. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082287>.
- [61] Batatinha H, Baker FL, Smith KA, Zúñiga TM, Pedlar CR, Burgess SC, et al. Recent COVID-19 vaccination has minimal effects on the physiological responses to graded exercise in physically active healthy people. *Journal of Applied Physiology* 2022;132:275–82. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00629.2021>.
- [62] Sprent J. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 1993;5:433–8. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90065-Z](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90065-Z).
- [63] Salimans L, Liberman K, Njemini R, Kortekaas Krohn I, Gutermuth J, Bautmans I. The effect of resistance exercise on the immune cell function in humans: A systematic review. *Experimental Gerontology* 2022;164:111822. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.111822>.
- [64] MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2013;31:259–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>.
- [65] Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity* 2013;38:633–43. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>.
- [66] O’Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 2016;16:553–65. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>.
- [67] Ando M, Ito M, Srirat T, Kondo T, Yoshimura A. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *Immunological Medicine* 2020;43:1–9. <https://doi.org/10.1080/25785826.2019.1698261>.
- [68] Domblides C, Lartigue L, Faustin B. Metabolic Stress in the Immune Function of T Cells, Macrophages and Dendritic Cells. *Cells* 2018;7:68. <https://doi.org/10.3390/cells7070068>.
- [69] Pearce EL, Poffenberger MC, Chang C-H, Jones RG. Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. *Science* 2013;342:1242454. <https://doi.org/10.1126/science.1242454>.
- [70] Schuster S, Boley D, Möller P, Stark H, Kaleta C. Mathematical models for explaining the Warburg effect: a review focussed on ATP and biomass production. *Biochemical Society Transactions* 2015;43:1187–94. <https://doi.org/10.1042/BST20150153>.

- [71] Mulukutla BC, Yongky A, Le T, Mashek DG, Hu W-S. Regulation of Glucose Metabolism – A Perspective From Cell Bioprocessing. *Trends in Biotechnology* 2016;34:638–51. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.012>.
- [72] Klein Geltink RI, Kyle RL, Pearce EL. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu Rev Immunol* 2018;36:461–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053019>.
- [73] Dimeloe S, Mehling M, Frick C, Loeliger J, Bantug GR, Sauder U, et al. The Immune-Metabolic Basis of Effector Memory CD4+ T Cell Function under Hypoxic Conditions. *The Journal of Immunology* 2016;196:106–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501766>.
- [74] Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med* 2017;23:18–27. <https://doi.org/10.1038/nm.4241>.
- [75] Zhang X, Liu J, Cao X. Metabolic control of T-cell immunity via epigenetic mechanisms. *Cell Mol Immunol* 2018;15:203–5. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.115>.
- [76] Pucino V, Certo M, Bulusu V, Cucchi D, Goldmann K, Pontarini E, et al. Lactate Buildup at the Site of Chronic Inflammation Promotes Disease by Inducing CD4+ T Cell Metabolic Rewiring. *Cell Metabolism* 2019;30:1055-1074.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.004>.
- [77] Rosa-Neto JC, Lira FS, Little JP, Landells G, Islam H, Chazaud B, et al. Immunometabolism-fit: How exercise and training can modify T cell and macrophage metabolism in health and disease. *Exerc Immunol Rev* 2022;28:29–46.
- [78] Phan AT, Goldrath AW. Hypoxia-inducible factors regulate T cell metabolism and function. *Molecular Immunology* 2015;68:527–35. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.08.004>.
- [79] Li P, Yin Y-L, Li D, Woo Kim S, Wu G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 2007;98:237–52. <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>.
- [80] Luu M, Visekruna A. Short-chain fatty acids: Bacterial messengers modulating the immunometabolism of T cells. *Eur J Immunol* 2019;49:842–8. <https://doi.org/10.1002/eji.201848009>.
- [81] Hou TY, McMurray DN, Chapkin RS. Omega-3 fatty acids, lipid rafts, and T cell signaling. *European Journal of Pharmacology* 2016;785:2–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.091>.
- [82] Nieman DC, Lila MA, Gillitt ND. Immunometabolism: A Multi-Omics Approach to Interpreting the Influence of Exercise and Diet on the Immune System. *Annu Rev Food Sci Technol* 2019;10:341–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121316>.
- [83] Contrepolis K, Wu S, Moneghetti KJ, Hornburg D, Ahadi S, Tsai M-S, et al. Molecular Choreography of Acute Exercise. *Cell* 2020;181:1112-1130.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.043>.
- [84] Ecker C, Guo L, Voicu S, Gil-de-Gómez L, Medvec A, Cortina L, et al. Differential Reliance on Lipid Metabolism as a Salvage Pathway Underlies Functional Differences of T Cell Subsets in Poor Nutrient Environments. *Cell Reports* 2018;23:741–55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.084>.
- [85] Von Ah Morano AE, Dorneles GP, Peres A, Lira FS. The role of glucose homeostasis on immune function in response to exercise: The impact of low or higher energetic conditions. *Journal Cellular Physiology* 2020;235:3169–88. <https://doi.org/10.1002/jcp.29228>.
- [86] Hack V, Weiss C, Friedmann B, Suttner S, Schykowski M, Erbe N, et al. Decreased plasma glutamine level and CD4+ T cell number in response to 8 wk of anaerobic training. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1997;272:E788–95. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.272.5.E788>.
- [87] Carroll RG, Carpenito C, Shan X, Danet-Desnoyers G, Liu R, Jiang S, et al. Distinct Effects of IL-18 on the Engraftment and Function of Human Effector CD8+ T Cells and Regulatory T Cells. *PLoS ONE* 2008;3:e3289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003289>.
- [88] Perry C, Pick M, Bdoiach N, Hazan-Halevi I, Kay S, Berr I, et al. Endurance Exercise Diverts the Balance between Th17 Cells and Regulatory T Cells. *PLoS ONE* 2013;8:e74722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074722>.

- [89] Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical Immunology* 2009;130:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.08.018>.
- [90] Wawrocki S, Druszczynska M, Kowalewicz-Kulbat M, Rudnicka W. Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. *Acta Biochim Pol* 2016;63. [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1153](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1153).
- [91] Plomgaard P, Penkowa M, Pedersen BK. Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles. *Exerc Immunol Rev* 2005;11:53–63.
- [92] Neumayr G, Ludwiczek O, Hoertnagl H, Pfister R, Mitterbauer G, Moschen A, et al. The Impact of Prolonged Strenuous Endurance Exercise on Interleukin 18 and Interleukin 18 Binding Protein in Recreational Cyclists. *Int J Sports Med* 2005;26:836–40. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837466>.
- [93] Oda K, Miyatake N, Sakano N, Saito T, Miyachi M, Tabata I, et al. Serum Interleukin-18 Levels Are Associated with Physical Activity in Japanese Men. *PLoS ONE* 2013;8:e81497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081497>.
- [94] Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 2006;12:6–33.
- [95] Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krstrup P, et al. Glucose Ingestion Attenuates Interleukin-6 Release from Contracting Skeletal Muscle in Humans. *The Journal of Physiology* 2003;549:607–12. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.042374>.
- [96] Steensberg A, Febbraio MA, Osada T, Schjerling P, Van Hall G, Saltin B, et al. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *The Journal of Physiology* 2001;537:633–9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00633.x>.
- [97] Barros ES, Nascimento DC, Prestes J, Nóbrega OT, Córdova C, Sousa F, et al. Acute and Chronic Effects of Endurance Running on Inflammatory Markers: A Systematic Review. *Front Physiol* 2017;8:779. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00779>.
- [98] Klarlund Pedersen B. Exercise-induced immune changes – an influence on metabolism? *Trends in Immunology* 2001;22:473–5. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02013-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02013-0).
- [99] Stampley JE, Cho E, Wang H, Theall B, Johannsen NM, Spielmann G, et al. Impact of maximal exercise on immune cell mobilization and bioenergetics. *Physiological Reports* 2023;11:e15753. <https://doi.org/10.14814/phy2.15753>.
- [100] Guerrera G, Picozza M, D’Orso S, Placido R, Pirronello M, Verdiani A, et al. BNT162b2 vaccination induces durable SARS-CoV-2-specific T cells with a stem cell memory phenotype. *Sci Immunol* 2021;6:eabl5344. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abl5344>.
- [101] Wilson MG, Hull JH, Rogers J, Pollock N, Dodd M, Haines J, et al. Cardiorespiratory considerations for return-to-play in elite athletes after COVID-19 infection: a practical guide for sport and exercise medicine physicians. *Br J Sports Med* 2020;54:1157–61. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2020-102710>.
- [102] Vdovenko D, Eriksson U. Regulatory Role of CD4<sup>+</sup> T Cells in Myocarditis. *Journal of Immunology Research* 2018;2018:1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/4396351>.
- [103] Bohm P, Scharhag J, Egger F, Tischer K-H, Niederseer D, Schmied C, et al. Sports-Related Sudden Cardiac Arrest in Germany. *Canadian Journal of Cardiology* 2021;37:105–12. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.03.021>.
- [104] Siedlik JA, Deckert JA, Benedict SH, Bhatta A, Dunbar AJ, Vardiman JP, et al. T cell activation and proliferation following acute exercise in human subjects is altered by storage conditions and mitogen selection. *Journal of Immunological Methods* 2017;446:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.03.017>.
- [105] Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods* 2003;275:251–5. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00010-3).
- [106] Al-Ani A, Toms D, Kondro D, Thundathil J, Yu Y, Ungrin M. Oxygenation in cell culture: Critical parameters for reproducibility are routinely not reported. *PLoS ONE* 2018;13:e0204269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204269>.

- [107] Theall B, Stampley J, Cho E, Granger J, Johannsen NM, Irving BA, et al. Impact of acute exercise on peripheral blood mononuclear cells nutrient sensing and mitochondrial oxidative capacity in healthy young adults. *Physiol Rep* 2021;9. <https://doi.org/10.14814/phy2.15147>.
- [108] Renaude E, Kroemer M, Borg C, Peixoto P, Hervouet E, Loyon R, et al. Epigenetic Reprogramming of CD4+ Helper T Cells as a Strategy to Improve Anticancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2021;12:669992. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669992>.
- [109] Angelin A, Gil-de-Gómez L, Dahiya S, Jiao J, Guo L, Levine MH, et al. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metabolism* 2017;25:1282-1293.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.018>.
- [110] Silva BSDA, Pereira T, Minuzzi LG, Padilha CS, Figueiredo C, Olean-Oliveira T, et al. Mild to moderate post-COVID-19 alters markers of lymphocyte activation, exhaustion, and immunometabolic responses that can be partially associated by physical activity level— an observational sub-analysis fit- COVID study. *Front Immunol* 2023;14:1212745. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1212745>.
- [111] Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol* 2000;1:132–7. <https://doi.org/10.1038/77811>.
- [112] Komici K, Verderosa S, D’Amico F, Guerra G. Self-reported side effects following COVID-19 vaccination in athletes: A retrospective study. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2023;19:2234788. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2234788>.
- [113] Won T, Gilotra NA, Wood MK, Hughes DM, Talor MV, Lovell J, et al. Increased Interleukin 18-Dependent Immune Responses Are Associated With Myopericarditis After COVID-19 mRNA Vaccination. *Front Immunol* 2022;13:851620. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.851620>.
- [114] Chen X, Xun K, Chen L, Wang Y. TNF- $\alpha$ , a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochem Funct* 2009;27:407–16. <https://doi.org/10.1002/cbf.1596>.
- [115] Skartsis N, Ferreira LMR, Tang Q. The dichotomous outcomes of TNF $\alpha$  signaling in CD4+ T cells. *Front Immunol* 2022;13:1042622. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1042622>.
- [116] Takahashi T, Iwasaki A. Sex differences in immune responses. *Science* 2021;371:347–8. <https://doi.org/10.1126/science.abe7199>.
- [117] Alack K, Krüger K, Weiss A, Schermuly R, Frech T, Eggert M, et al. Aerobic endurance training status affects lymphocyte apoptosis sensitivity by induction of molecular genetic adaptations. *Brain, Behavior, and Immunity* 2019;75:251–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.10.001>.
- [118] Sun P, Wang N, Zhao P, Wang C, Li H, Chen Q, et al. Circulating Exosomes Control CD4+ T Cell Immunometabolic Functions via the Transfer of miR-142 as a Novel Mediator in Myocarditis. *Molecular Therapy* 2020;28:2605–20. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.08.015>.

## Liste aller Publikationen

### 2023

- Palmowski J, Kohnhorst S, Bauer P, Puta C, Haunhorst S, Gebhardt K, et al. T-cell-derived TNF- $\alpha$  and a cluster of immunological parameters from plasma allow a separation between SARS-CoV-2 convalescent versus vaccinated elite athletes. *Front Physiol.* 2023 Jun 22;14:1203983.
- Boßlau TK, Wasserfurth P, Reichel T, Weyh C, Palmowski J, Nebl J, et al. 12-week combined strength and endurance exercise attenuates CD8+ T-cell differentiation and affects the kynurenine pathway in the elderly: a randomized controlled trial. *Immun Ageing.* 2023 May 9;20(1):19.

### 2022

- Palmowski J, Gebhardt K, Reichel T, Frech T, Ringseis R, Eder K, et al. The Impact of Exercise Serum on Selected Parameters of CD4+ T Cell Metabolism. *Immuno.* 2021 Jun 22;1(3):119–31.
- Rosa-Neto JC, Lira FS, Little JP, Landells G, Islam H, Chazaud B, et al. Immunometabolism-fit: How exercise and training can modify T cell and macrophage metabolism in health and disease. *Exerc Immunol Rev.* 2022;28:29–46.
- Palmowski J, Gebhardt K, Reichel T, Frech T, Ringseis R, Eder K, et al. The Impact of Exercise Serum on Selected Parameters of CD4+ T Cell Metabolism. *Immuno.* 2021 Jun 22;1(3):119–31.
- Reichel T, Hacker S, Palmowski J, Bosslau TK, Frech T, Tirekoglu P, et al. Neurophysiological Markers for Monitoring Exercise and Recovery Cycles in Endurance Sports. *jsportscimed.* 2022 Sep 1;446–57.

### 2021

- Boßlau TK, Wasserfurth P, Krüger B, Reichel T, Palmowski J, Nebl J, et al. Abdominal Obesity-Related Disturbance of Insulin Sensitivity Is Associated with CD8+ EMRA Cells in the Elderly. *Cells.* 2021 Apr 23;10(5):998.
- Proschinger S, Winker M, Joisten N, Bloch W, Palmowski J, Zimmer P. The effect of exercise on regulatory T cells: A systematic review of human and animal studies with future perspectives and methodological recommendations. *Exerc Immunol Rev.* 2021;27:142–66.

### 2020

- Palmowski J, Reichel T, Boßlau TK, Krüger K. The effect of acute running and cycling exercise on T cell apoptosis in humans: A systematic review. *Scand J Immunol*, 2020 Feb;91(2). Doi:/10.1111/sji.12834
- Wasserfurth P, Palmowski J, Hahn A, Krüger K. Reasons for and Consequences of Low Energy Availability in Female and Male Athletes: Social Environment, Adaptations, and Prevention. *Sports Med - Open.* 2020 Dec;6(1):44.
- Reichel T, Boßlau TK, Palmowski J, Eder K, Ringseis R, Mooren FC, et al. Reliability and suitability of physiological exercise response and recovery markers. *Sci Rep.* 2020 Jul 17;10(1):11924.

### 2019

- Palmowski J, Boßlau T, Ryl L, Krüger K, Reichel T. Managing immune health in sports – a practical guide for athletes and coaches. *Dtsch Z Sportmed.* 2019 Oct 1;70(10):219–26.