

Aus dem Berliner Institut für Gesundheitsforschung – Zentrum für Regenerative
Therapien
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss löslicher Mediatoren auf die B-Zell-Homöostase und die Entwicklung von
EBV-assoziierten Lymphoproliferationen in nierentransplantierten Patient*innen

Influence of soluble mediators on B cell homeostasis and the development of EBV-
associated lymphoproliferation in kidney transplant patients

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Sharon Susanna Babel geb. Bajda
aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung und Abstract	4
1.1 Zusammenfassung	4
1.2 Abstract.....	5
2 Darstellung des Forschungsstandes	7
2.1 Das Immunsystem	7
2.2 Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen	8
2.3 Epstein-Barr-Virus (EBV).....	9
2.4 EBV und das Immunsystem	9
2.5 EBV nach Transplantation	11
2.6 Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung (PTLD).....	11
2.7 Entwicklung der Fragestellung.....	13
3 Vertiefte Schilderung der Methodik	14
3.1 Studiendesign	14
3.2 Bestimmung der Viruslast.....	15
3.3 Analyse der Zytokine mit beadbasiertem Immunoassay	17
3.4 Epigenetische B-Zell-Quantifizierung	20
3.5 Erzeugung lymphoblastischer Zelllinien, Quantifizierung von B-Zellen und Bestimmung der EBV-Last unter BAFF-Behandlung.....	22
3.6 Statistische Auswertung	22

4 Ergebnisse	24
4.1 Signifikante Assoziation von BAFF und EBV.....	24
4.2 Expansion und virale Replikation von EBV-infizierten B-Zellen während der BAFF-Behandlung (in-vitro).....	28
4.3 Keine B-Zell-Expansion bei BAFF-Expression und EBV-Reaktivierung.....	29
4.4 Signifikante Assoziation zwischen EBV und verändertem Zustand immunmodulierender Faktoren.....	31
5 Diskussion.....	34
5.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse.....	34
5.2 Interpretation der Ergebnisse	34
5.3 Weiterführende Fragestellungen, Limitationen und mögliche klinische Anwendungen.....	35
6 Literaturverzeichnis.....	38
7 Detaillierte Aufstellung der selbst erbrachten Leistungen.....	44
8 Eidesstattliche Versicherung	46
9 Journal Summary List	48
10 Druckexemplar der Publikation.....	49
11 Lebenslauf.....	62
12 Publikationsliste	63
13 Danksagung	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Studiendesign.....	15
Abbildung 2	Phasen der qPCR	16
Abbildung 3	Schematische Abbildung eines LEGENDplex™-Assays.....	19
Abbildung 4	Schematischer Ablauf der epigenetischen B-Zell-Quantifizierung	21
Abbildung 5	Konzentration der Zytokine und der B-Zell-Frequenz.....	25
Abbildung 6	BAFF-Konzentration im Serum für beide Subkohorten.....	26
Abbildung 7	BAFF-Konzentration im Serum in der EBV ⁺ Kohorte	27
Abbildung 8	BAFF-Behandlung von EBV-infizierten LCL.....	28
Abbildung 9	B-Zell-Frequenz in Abhängigkeit von der EBV-Reaktivierung.....	30
Abbildung 10	Korrelationsmatrizen von Zytokinen und B-Zellen für die Subkohorten	32
Abbildung 11	Differenz der Korrelationsmatrizen der Subkohorten.....	33

1 Zusammenfassung und Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) stellt eine schwerwiegende Komplikation bei Nierentransplantierten dar.

PTLD kann in jeder Phase nach Organtransplantation auftreten. Insbesondere im ersten Jahr ist die PTLD eng mit der Reaktivierung des Epstein-Barr-Virus (EBV) verbunden. Immunsuppression ist ein wichtiger Risikofaktor, der die EBV-Reaktivierung fördert, die wiederum zu einer B-Zell-Transformation und schließlich zur Entwicklung von Lymphomen führen kann.

In dieser Studie wurden die potenziellen Auswirkungen der EBV-Reaktivierung auf die B-Zell-Homöostase sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene untersucht. Zuvor wurde ein Zusammenhang zwischen bestimmten löslichen Mediatoren (Zytokinen) und der Entwicklung von PTLD nachgewiesen. Ob diese und andere Zytokine die B-Zell-Homöostase beeinflussen, war bisher unbekannt. In einer multizentrischen Studie mit 540 Nierentransplantierten wurden 3715 Blutproben zu acht verschiedenen Zeitpunkten während des ersten Jahres nach Transplantation entnommen und auf EBV-Prävalenz untersucht. Bei 109 Patient*innen (20,1 %) wurde bei mindestens einem Zeitpunkt eine EBV-Last festgestellt.

Die Konzentration von Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21, TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor α), BAFF (B-Zell-aktivierender Faktor) und APRIL (proliferationsinduzierender Ligand) sowie die B-Zell-Frequenz wurden bei EBV⁺ Patient*innen (N=54) vor, während und nach der EBV-Reaktivierung analysiert und mit einer Kontrollgruppe (N=50) ohne nachweisbare Viruslast verglichen.

BAFF – ein wesentlicher Regulator der B-Zell-Homöostase – wies bei EBV⁺ Patient*innen vor und nach der Reaktivierung einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Für keines der anderen Zytokine wurde ein Zusammenhang mit EBV festgestellt. Es wurde beobachtet, dass BAFF die in-vitro-Proliferation von EBV-infizierten B-Zellen sowie die Virusreplikation fördern kann.

Überraschenderweise waren die höheren BAFF-Konzentrationen bei EBV⁺ Patient*innen in-vivo nicht mit der erwarteten B-Zell-Expansion verbunden. Daher wurde untersucht, ob die Wirkung von BAFF durch andere Zytokine aufgehoben werden könnte. In der Tat

wurden signifikante Unterschiede in den Interkorrelationen der Zytokine zwischen den Subkohorten beobachtet: Die Reaktivierung ging mit verminderten Interkorrelationen und Veränderungen in ihrem Zusammenspiel mit B-Zellen einher. Diese Veränderungen wurden sowohl während als auch nach der Reaktivierung beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die immunologischen Interkorrelationen möglicherweise den Auswirkungen erhöhter BAFF-Konzentrationen entgegenwirken und so eine B-Zell-Expansion verhindern könnten.

Zusammenfassend liefert diese Studie vorläufige Beweise für eine Wechselwirkung zwischen EBV-Reaktivierung, B-Zell-Homöostase-assoziierten Faktoren und B-Zell-Frequenz.

Weitere Studien sind erforderlich, um die zugrundeliegenden Mechanismen der EBV-Reaktivierung und der Lymphomentwicklung zu identifizieren.

1.2 Abstract

Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) is a serious complication in kidney transplant patients. PTLD can occur at any stage after organ transplantation. In particular, when it occurs within the first year, PTLD is closely associated with reactivation of the Epstein-Barr virus (EBV). Immunosuppression is a key risk factor promoting EBV reactivation, which can lead to B cell transformation and eventually to the development of lymphomas.

In this study, the potential effects of EBV reactivation on the B-cell homeostasis were assessed and characterized both from the cellular and the humoral level. Previously, an association between certain soluble mediators (cytokines) and the development of PTLD was demonstrated. Whether these and other cytokines influence B-cell homeostasis was previously unknown. In a multicenter study of 540 kidney transplant patients, 3715 blood samples were collected at eight different time points during the first year after transplantation and were analyzed for EBV prevalence. EBV viral load for at least one time point was observed in 109 patients (20.1%).

Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21, TNF α (tumor necrosis factor α), BAFF (B cell activating factor), and APRIL (a proliferation inducing ligand) levels and B cell frequencies were analyzed in EBV⁺ patients (N=54) before, during, and after EBV reactivation and compared with a control group (N=50) that had no detectable viral load.

BAFF – an essential regulator of B cell homeostasis – exhibited a significant increase in EBV⁺ patients before and after reactivation, when compared to the control group. No association with EBV was found for any of the other cytokines. Interestingly, it was observed that BAFF can promote *in vitro* proliferation of EBV-infected B cells, as well as viral replication.

Surprisingly, the higher levels of BAFF in EBV⁺ patients were not associated *in vivo* with the expected B cell expansion. Therefore, it was investigated whether the action of BAFF could be counteracted by other cytokines during and after EBV reactivation. Indeed, significant differences in the intercorrelations of cytokines between EBV⁺ and control patients were observed: reactivation was associated with decreased intercorrelations of cytokines and alterations in their interplay with B cells. These alterations were observed during and after reactivation. This suggests that the observed change in immunological intercorrelations could potentially counteract the effects of increased BAFF concentrations, preventing B cell expansion.

In summary, this study provides preliminary evidence for an interaction of EBV reactivation, B-cell homeostasis-associated factors and B-cell frequency. Further studies are needed to identify the underlying mechanisms of EBV reactivation and lymphoma development.

2 Darstellung des Forschungsstandes

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem, welche den Wirt vor Krankheitserregern schützen und fremde Erreger vom eigenen gesunden Gewebe des Wirts bzw. auch wirtseigene entartete Zellen unterscheiden.¹

Für die Immunantwort (humorale und/oder zellvermittelte) wirken diese Teilsysteme eng zusammen: Die humorale Immunantwort wird aus Komplementproteinen, sekretierten Antikörpern und anderen Makromolekülen gebildet, die sich in zellfreien Körperflüssigkeiten oder im Serum befinden.¹ Die zellvermittelte Antwort besteht aus aktivierten Immunzellen wie u.a. Phagozyten und T-Zellen, die durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen wirken. So wird am Infektionsort z.B. eine Entzündungsreaktion hervorgerufen und Pathogene erkannt und zerstört.^{1,2} Das angeborene Immunsystem bildet die erste Abwehrstufe gegen Infektionen und umfasst anatomische, chemische sowie physikalische Barrieren wie z.B. die Haut oder Atemwege und bereitet auch adaptive Reaktionen vor.^{1,3} Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses aus, welches aus hochspezialisierten Lymphozyten (weißen Blutkörperchen, u. a. B- und T-Zellen) besteht und zu einer verstärkten Immunantwort bei einem erneuten Kontakt mit diesem Erreger führt.¹

Zur Ausübung ihrer Funktion müssen Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert werden: Dendritische Zellen (DC) stellen die Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem her, indem sie Pathogene aufnehmen, sie in Antigene zerlegen und sie mit Hilfe des MHC-Moleküls (*engl. major histocompatibility complex*) auf ihrer Zelloberfläche den T-Zellen präsentieren.^{1,2}

Die hier in dieser Studie ausgewählten löslichen Mediatoren IL-10, IL-6, BAFF, APRIL und TNF α sind u.a. an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt.⁴⁻⁸ BAFF ist wichtig für die Erhaltung, Reifung und das Überleben reifer B-Zellen. Modelle mit BAFF $^{-/-}$ Mäusen haben zum Beispiel gezeigt, dass dieser Mangel zu einem Verlust an reifen B-Zellen führt, während eine übermäßige BAFF-Signalisierung zum Überleben zusätzlicher B-Zellen führt.⁹ Des Weiteren unterstützen sowohl BAFF als auch APRIL, die beide zur Tumor-Nekrose-Faktor-Familie gehören, das Überleben von antikörperproduzierenden

Plasmazellen.^{8,9} Darüber hinaus kann beispielsweise IL-10 die Proliferation dieser Zellen verstärken.⁸

T-Zellen lassen sich u.a. in CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen einteilen. Nach Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen expandieren diese schnell und sezernieren Zytokine, die die Immunantwort regulieren oder unterstützen. Das in dieser Studie untersuchte Zytokin IL-4 wird z.B. von aktivierten CD4⁺ T-Zellen sezerniert und wirkt u.a. auf Teilung, Überleben und Differenzierung von B-Zellen.¹⁰ CD8⁺ zytotoxische T-Zellen enthalten Zytotoxine (u.a. Granzyme, Perforin), die zur Apoptose führen.¹

2.2 Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen

Es gibt zwei verschiedene Arten der Aktivierung von B-Zellen: Die T-Zell-abhängige und die T-Zell-unabhängige.

Eine durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) aktivierte T-Helferzelle kann mit B-Zellen interagieren. Zu den APCs gehören u.a. B-Zellen, DCs oder Makrophagen. Von der T-Helferzelle werden Zytokine ausgeschüttet, was eine B-Zell-Stimulation und eine Differenzierung in Plasma- und Gedächtniszellen unterstützt. Zu solchen Zytokinen zählt z.B. IL-10, welches die Proliferation von B-Zellen stimuliert und ihre Differenzierung zu Plasmazellen fördert.¹¹

Die Immunantwort kann aber auch ohne eine Beteiligung von T-Helferzellen oder APC erfolgen. Diese T-unabhängigen Antigene wie z.B. das unmethylierte Cytosin-Guanosin-Dinukleotid (CpG), welches eine immunstimulierende Komponente der bakteriellen DNA darstellt, wirkt über den von B-Zellen exprimierten Toll-like Rezeptor 9 (TLR9).¹²

Sobald eine B-Zelle durch ein T-abhängiges oder -unabhängiges Antigen aktiviert ist, führt dies zu klonaler Expansion und Differenzierung zu Plasmazellen. Diese bilden einen für das bestimmte Antigen spezifischen Antikörpertyp (Immunglobulinklassen IgA, IgG, IgD, IgM und IgE). Der Antikörperklassenwechsel (z.B. von IgM zu IgG, IgA oder IgE) erfordert u.a. eine Zytokin- Mitwirkung. An diesem Prozess sind die in dieser Studie untersuchten Zytokine IL-4, IL-21, APRIL und BAFF beteiligt.^{5,6,13-17} Abnormaler Klassenwechsel kann z.B. bei immunsupprimierten Personen mit EBV-assoziiierter PTLD beobachtet werden, jedoch ist zum heutigen Zeitpunkt noch unklar, wie genau die Immunantwort gegen EBV dysreguliert wird.¹³ Die eben genannten Zytokine (IL-4, IL-21, APRIL und BAFF) und das oben schon beschriebene IL-10 sind auch an der B-Zell-Differenzierung beteiligt.^{11,15-19}

Die Antwort auf T-abhängige Antigene erzeugt langlebige Gedächtniszellen, welche bei erneutem Kontakt mit diesem Antigen zu Plasmazellen werden und so das immunologische Gedächtnis bilden.¹

Darüber hinaus setzt die B-Zelle immunmodulatorische Zytokine frei, die die Funktion von Immunzellen wie T-Zellen und DCs regulieren.^{1,10,20} Abhängig von den sezernierten Zytokinen kann die Immunantwort entweder verstärkt (z.B. durch TNF α) oder unterdrückt werden (z.B. durch IL-10).¹⁰

2.3 Epstein-Barr-Virus (EBV)

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein γ -1-Herpesvirus, welches ca. 90% der Menschen weltweit infiziert. Die primäre EBV-Infektion tritt im Allgemeinen im Kindesalter auf und verläuft in der Regel asymptomatisch, kann jedoch im Jugendalter und im frühen Erwachsenenalter in 35-50% der Fälle zu einer infektiösen Mononukleose führen.^{21,22} Die Übertragung erfolgt in der Regel durch Kontakt mit infektiösem Speichel, der über Epithelzellen oder B-Zellen in den Oropharynx gelangt. Darüber hinaus kann das Virus durch Blut oder über Organ- und Stammzelltransplantationen übertragen werden.²³ Ähnlich wie bei anderen Herpesviren führt EBV zu einer lebenslangen Latenz in den B-Zellen des Wirtes.^{21,23} Die meisten EBV⁺ Individuen zeigen keine Symptomatik, da die EBV-Infektion vom Immunsystem kontrolliert wird.^{21,22} Unter immunsupprimierten Bedingungen, beispielsweise bei einem angeboren Immundefekt, im Zusammenhang mit HIV-Infektionen und dem Einsatz immunmodulatorischer Therapien bei Autoimmunerkrankungen oder zur Verhinderung von Organabstoßungen kann eine EBV-Infektion jedoch auch schwere akute Symptome sowie eine Reihe von lebensbedrohlichen malignen Erkrankungen verursachen.²¹ EBV ist unter anderem mit der Entwicklung von B-Zell-Malignomen wie z.B. Burkitt-Lymphomen und anderen Non-Hodgkin-Lymphomen, Hodgkin-Lymphomen und PTLD assoziiert.²¹

2.4 EBV und das Immunsystem

Das Virus infiziert naive B-Zellen in der oropharyngealen Mukosa über den CD21-Rezeptor.^{5,23,24} Die Infektion durch EBV wird sowohl durch zelluläre als auch humorale Immunmechanismen kontrolliert. Eine akute (auch lytisch genannt, siehe unten) EBV-

Infektion unterliegt i.d.R. einer intakten T-Zell-Überwachung durch EBV-spezialisierte CD4⁺ - und CD8⁺ T-Gedächtnis-Zellen, welche nach Reaktivierung innerhalb von Stunden reagieren können und virusinfizierte Zellen zerstören.^{22,23,25,26} Eine kleine Zahl EBV-infizierter B-Zellen wird vom Immunsystem jedoch nicht erfasst, so dass die virusinfizierten Zellen lebenslang auf einem sehr niedrigen Niveau in einem latenten Zustand bleiben (nur 1 infizierte B-Zelle auf 10-100.000 B-Gedächtnis-Zellen).²² Während dieser sogenannten Latenzphase exprimiert EBV nur wenige Proteine, wodurch u.a. die Erkennung der Antigene durch das Immunsystem umgangen wird.^{21,27} Die EBV-Latenz wird durch unterschiedliche Genexpressionsprogramme definiert und in vier Latenztypen (Latenz 0-III) eingeteilt.²⁵ Es wurde beispielsweise gezeigt, dass das EBV Nuklear Antigen 1 (EBNA1) u.a. für die Förderung und Aufrechterhaltung der Latenz verantwortlich ist und im Vergleich zu anderen EBV-Genprodukten schlecht von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden kann.²⁵ Das latent membrane protein 1 (LMP1) ist notwendig für die B-Zell-Wachstumstransformation und für das Überleben von EBV-transformierten B-Zellen und kann so eine Hyperproliferation induzieren.^{25,26,28} Darüber hinaus ist LMP1 in-vitro mit einer Hochregulierung von anti-apoptotischen Proteinen verbunden.²⁵ Außerdem moduliert LMP1 z.B. auch IL-10 hoch, welches auf B-Zellen als Wachstumsfaktor wirkt.⁵ Obwohl EBV in infizierten Zellen i.d.R. latent ist, tritt das Virus periodisch in den lytischen Zyklus ein und infiziert neue Zellen innerhalb des Wirts und neue Zellen außerhalb des Wirts, was ggf. mit einer neuen akuten EBV-Infektion einhergeht. In-vivo geht man davon aus, dass der lytische Zyklus in terminal differenzierten Plasma- und Epithelzellen stattfindet.^{21,29} In der lytischen Phase beginnt EBV alle lytisch viralen Proteine und Genprodukte zu exprimieren, welche u.a. immunsuppressive Wirkung haben und z.B. der T-Zell-Antwort entgegen wirken.^{27,28} Die Expression von BNLF2a verhindert beispielsweise die Peptidpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle durch direkte Hemmung der Antigenprozessierung.²⁵ Darüber hinaus können einige Produkte die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine unterdrücken und so die angeborene Immunantwort abschwächen.²⁵

EBV produziert z.B. ein virales IL-10 Homolog (vIL-10), welches durch seine entzündungshemmenden Eigenschaften der Immunüberwachung des Wirtes entgeht, indem es z.B. vor der NK-Zell-vermittelten Eliminierung schützt.^{4,11,30}

2.5 EBV nach Transplantation

Das oben beschriebene empfindliche Gleichgewichtssystem zwischen EBV und dem Immunsystem ist bei Transplantationspatient*innen aufgrund ihrer immunsuppressiven Therapie gestört.²⁶ Im Vergleich zur gesunden Bevölkerung kann die Anzahl der virusinfizierten B-Gedächtnis-Zellen bei immunsupprimierten Patient*innen wegen der gesteigerten Virusreplikation bis zu 50-mal höher sein.²³

EBV-infizierte Zellen (Lymphoblastoidzellen) können nur überleben und sich zu einem Lymphom entwickeln, wenn unter anderem zwei Voraussetzungen gegeben sind: Erstens muss die EBV-infizierte Zelle nicht in der Lage sein, den Zellzyklus zu verlassen (und kann somit z.B. keine ruhende B-Gedächtnis-Zelle mehr werden). Zweitens muss die zytotoxische T-Zellantwort gehemmt werden, sodass es zum ungehinderten Wachstum kommen kann.^{22,31} Es entstehen aufgrund von z.B. Mutationen stark entartete B-Zell-Subklone, die zu Beginn der PTLD-Entstehung stark mit EBV zusammenhängen.²⁶ Durch eine Häufung von Mutationen, die z.B. die Apoptose hemmen oder proliferationsfördernd wirken, entstehen stark maligne Läsionen, für die die EBV-Infektion letztlich nicht mehr ausschlaggebend ist.²⁶ Diese inkomplett kontrollierte, durch eine EBV-Infektion getriebene B-Zell-Proliferation ist oftmals Ausgangspunkt der PTLD.^{26,32} Dieses Ereignis ist jedoch sehr selten, was die Hypothese der engen Regulation der EBV-stimulierten Proliferation auch unter immunsupprimierten Bedingungen bestätigt.²² Es lässt sich dadurch erklären, warum EBV in über 90% der Bevölkerung ein Leben lang gutartig fortbestehen kann und auch, warum nicht jede*r EBV-seropositive*r Patient*in unter Immunsuppression an PTLD erkrankt.^{5,23} Darüber hinaus können ggf. der genetische Hintergrund und das unmittelbare Umfeld der transformierten Zellen zur Lymphom-Entstehung beitragen.⁵

Insgesamt ist die Pathogenese aufgrund des Zusammenspiels vieler unterschiedlicher (patient*innen-abhängiger) Gesichtspunkte sehr vielfältig und unzureichend verstanden.⁵

2.6 Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung (PTLD)

Die Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung (*engl. posttransplant lymphoproliferative disorder, PTLD*) ist aufgrund hoher Mortalitätsraten eine der schwersten Komplikationen nach allogener Organ- oder Stammzelltransplantation.⁵ Die Mortalitätsraten von PTLD reichen von 25 bis 60% und auch die Überlebensrate ist

insgesamt aufgrund der Variabilität der Erkrankung und der hohen Rate nicht PTLD-bedingter Todesfälle (Infektionen, Begleiterkrankungen o.ä.) sehr unterschiedlich.⁵

PTLD umfasst eine heterogene Gruppe von lymphoproliferativen Erkrankungen und reicht von gutartigen Lymphoproliferationen bis hin zu Lymphomen.^{5,33} Lymphome machen ca. 21% aller Krebserkrankungen nach Solider Organtransplantation (SOT) aus. Die Inzidenz von PTLD nach SOT ist in der Literatur nicht einheitlich beschrieben und unter anderem abhängig von der Art des transplantierten Organs. Die geringste Inzidenz von PTLD besteht bei Nierentransplantationen (0,8 bis 2,5%), gefolgt von Pankreastransplantationen (0,5 bis 5,0%), Lebertransplantationen (1,0 bis 5,5%), Herztransplantationen (2,0 bis 8,0%), Lungentransplantationen (3,0 bis 10,0%) und schließlich Multiorgan- und Darmtransplantationen ($\leq 20\%$) mit der höchsten Inzidenz.³²

PTLD kann sich zu jedem Zeitpunkt nach einer Organtransplantation entwickeln, wobei eine frühe (< 1 Jahr) und späte (> 1 Jahr) PTLD unterschieden werden. Das Auftreten von PTLD ist innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation am höchsten (22/10.000/Jahr) und sinkt dann massiv ab (5/10.000/Jahr).⁵ Frühe PTLD ist z.B. charakteristisch für Herz- und Lungentransplantationen, wobei fast die Hälfte der Fälle innerhalb des ersten Jahres auftreten. Allerdings liegt die Inzidenz der frühen PTLD bei nur 20% bei nierentransplantierten Patient*innen.³⁴ Dieser Unterschied kann u.a. auf die höher dosierte Immunsuppression nach Herz- und Lungentransplantation zurück geführt werden.³⁵ Dabei sind die Gründe für das frühe bzw. späte Auftreten von PTLD nicht bekannt.⁵ Eine mögliche Erklärung für das späte Auftreten von PTLD wäre, dass früh einsetzende PTLD-Läsionen lange Zeit unentdeckt bleiben.⁵ Auch wenn die Inzidenz bei Nierentransplantationen vergleichsweise sehr niedrig ist, stellt PTLD jedoch eine der häufigsten Krebsarten bei Empfängern von Nierentransplantaten dar.³³

Derzeit ist die Ätiologie der PTLD nicht absolut geklärt, wobei 60-80% der Fälle mit der Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) in Verbindung gebracht werden können. Insbesondere die frühe PTLD ist eng mit einer EBV-Infektion assoziiert.^{21,32} Obwohl eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert wurden, ist eine gezielte Vorhersage über das Auftreten von PTLD bisher nicht möglich.⁵ Zu den Risikofaktoren gehören u.a. Dauer, Art, Intensität und Nettozustand der Immunsuppression, wobei man hochdosierte Cyclosporin-A-haltige Protokolle in hochdosierter Form als Beispiel anführen kann.^{5,26} Darüber hinaus sind Virusinfektionen, das Alter (< 10 und > 60 Jahren), genetische Faktoren und EBV-Seronegativität weitere Risikofaktoren. Die EBV- Infektion gilt jedoch als einer der Hauptfaktoren für die Entwicklung der PTLD.⁵

2.7 Entwicklung der Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen Einfluss von im Serum vorkommenden löslichen Mediatoren bzw. Zytokinen, die direkt auf B-Zellen wirken können, auf die Entwicklung von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen zu untersuchen. Die Hypothese dabei war, dass sich durch die EBV-Reaktivierung das Muster von Zytokinen im Blut ändert und dadurch die Entstehung von lymphoproliferativen Erkrankungen gefördert werden könnte.

Dafür wurde in dieser Studie der Einfluss der EBV-Reaktivierung auf die B-Zell-Homöostase bei einer Patient*innenkohorte, die anhand der EBV-Last ausgewählt wurde, im ersten Jahr nach Nierentransplantation untersucht.

Im zweiten Schritt wurde analysiert, ob die B-Zell-beeinflussenden Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL 21, TNF α , BAFF und APRIL der EBV-Reaktivierung vorausgehen. Zusätzlich wurde analysiert, ob die EBV-Reaktivierung selbst zu Veränderungen im Expressionsmuster des Zytokins führen kann bzw. ob es auf die EBV-Last ankommt.

Faktoren, die in EBV-infizierten Patient*innen im Vergleich zu nicht infizierten als unterschiedlich identifiziert werden konnten, sollten anschließend in in-vitro Experimenten auf ihr Potential untersucht werden, die Proliferation und die Virusfreisetzung von EBV-infizierten B-Zellen zu beeinflussen.

3 Vertiefte Schilderung der Methodik

3.1 Studiendesign

Das virale Monitoring gehörte einer Teilstudie der multizentrischen, offenen (open-label), randomisierten und kontrollierten Harmony-Studie (NCT 00724022) an.^{36,37} Es wurden von anfangs 615 Patient*innen 540 (3.715 Blutproben) während acht vordefinierter Visiten im ersten Jahr nach Nierentransplantation zentral auf die EBV-Last sowie auf das Zytomegalievirus (CMV) und das BK-Virus überwacht.³⁷

Die Patient*innen-Subkohorten wurden entsprechend ihrer EBV- Last definiert. Alle Patient*innen mit nachweisbarer Viruslast zu mindestens einem Zeitpunkt und verfügbaren Blut- und Serumproben zu den drei ausgewählten Zeitpunkten (vor Beginn der Virämie, zum Peak und nach dem Abklingen) wurden in die Studie eingeschlossen und der EBV⁺ Gruppe zugeordnet. Das Detektionslimit lag bei 250 Kopien/ml Blut. Die Kontrollgruppe wurde nach dem Zufallsprinzip unter den Patient*innen mit keiner nachweisbaren EBV-Last ausgewählt.

Die Zeitpunkte wurden entsprechend dem Verlauf der EBV-Infektion definiert: EBV⁺ Patient*innen wurden vor, während und nach der Reaktivierung analysiert, wobei die Zeitpunkte vor und nach der Reaktivierung ohne nachweisbare Viruslast gewählt wurden. Für die Kontrollgruppe wurden die Zeitpunkte entsprechend derjenigen der EBV⁺ Patient*innen abgestimmt. Sowohl die Viruslast, die B-Zell-Frequenz als auch die Konzentration der oben beschriebenen Zytokine wurde zu diesen drei Zeitpunkten bestimmt. Nachfolgend werden die Zeitpunkte als vor der Reaktivierung, während der Reaktivierung bzw. des Peaks und nach der Reaktivierung bezeichnet.

Einzelheiten zu den demographischen Merkmalen, der angewandten Behandlung, den Transplantationsergebnissen und dem Screening-Schema der Gruppen sind in Tabelle 1 der Publikation zu finden. Die Patient*innen beider Gruppen wurden nach demographischen Merkmalen (Geschlecht, Alter von Spender und Empfänger, Body-Mass-Index und Ausgangs-Blutzellzahl sowie C-reaktiver Proteinkonzentration, Therapiearm und Anti-CMV Prophylaxe sowie Zeitpunkten gematched. Bei keinem dieser Merkmale gab es signifikante Unterschiede zwischen den beiden Subkohorten.³⁸

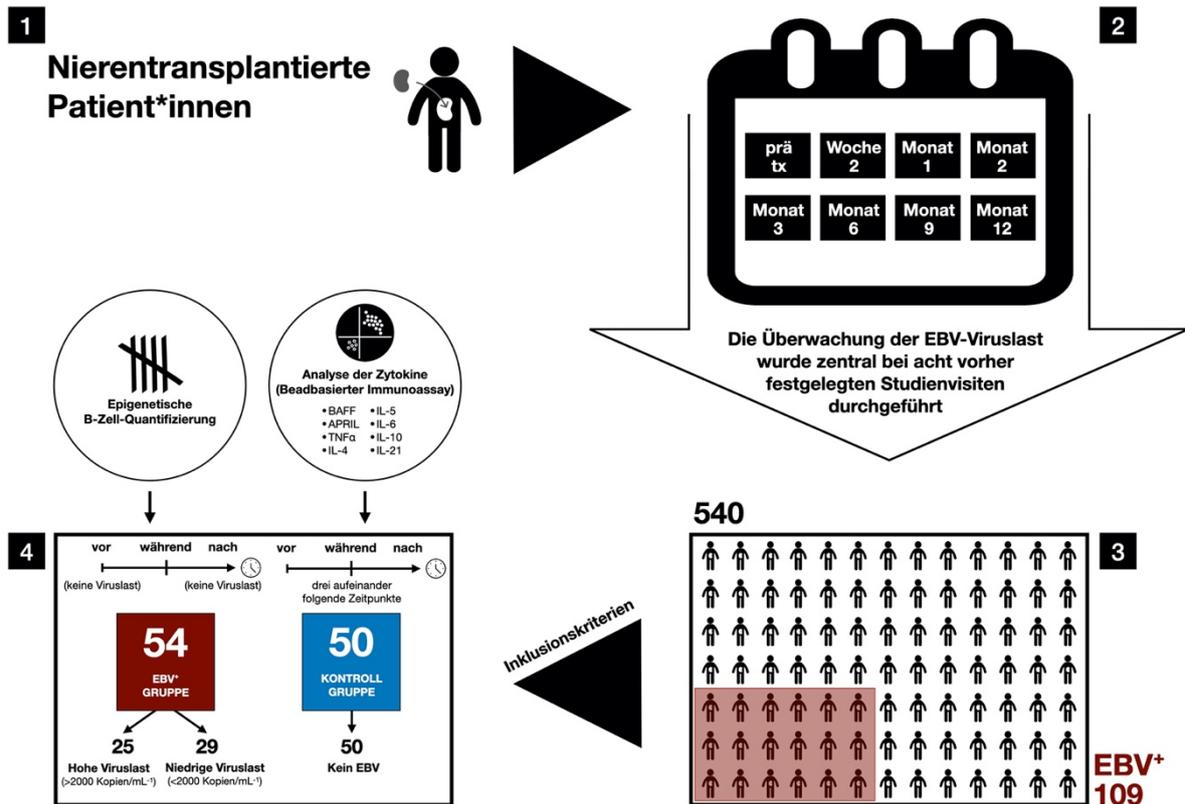


Abbildung 1. Studiendesign. Während acht vordefinierter Visiten wurden im Rahmen einer multizentrischen, open-label, randomisierten und kontrollierten Studie Patient*innen auf EBV-Last untersucht. Von 540 Patient*innen wurden 109 anhand ihrer Viruslast der EBV⁺ Subkohorte zugeordnet. Entsprechend der Verfügbarkeit der Blutproben wurden 54 Patient*innen der EBV⁺ Subkohorte zugeordnet und somit in diese Studie eingeschlossen. In die Kontrollgruppe wurden nach dem Zufallsprinzip unter den Patient*innen ohne nachweisbare EBV-Last 50 Patient*innen ausgewählt. Die drei Zeitpunkte wurden entsprechend dem Verlauf der EBV-Infektion definiert (vor, während und nach EBV-Reaktivierung bzw. drei aufeinanderfolgende Zeitpunkte). Sowohl die Viruslast, die B-Zell-Frequenz als auch die Konzentration der oben beschriebenen Zytokine wurden zu diesen Zeitpunkten bestimmt. (Verändert nach Bajda et al. Abbildung 1).³⁸

3.2 Bestimmung der Viruslast

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung für Nukleinsäuren, die im Vergleich zur klassischen PCR eine zusätzliche Quantifizierung der gewonnenen Nukleinsäuren ermöglicht. Je höher die anfängliche Viruslast und somit die Kopienzahl der Nukleinsäuren, desto frühzeitiger kann ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz festgestellt werden.

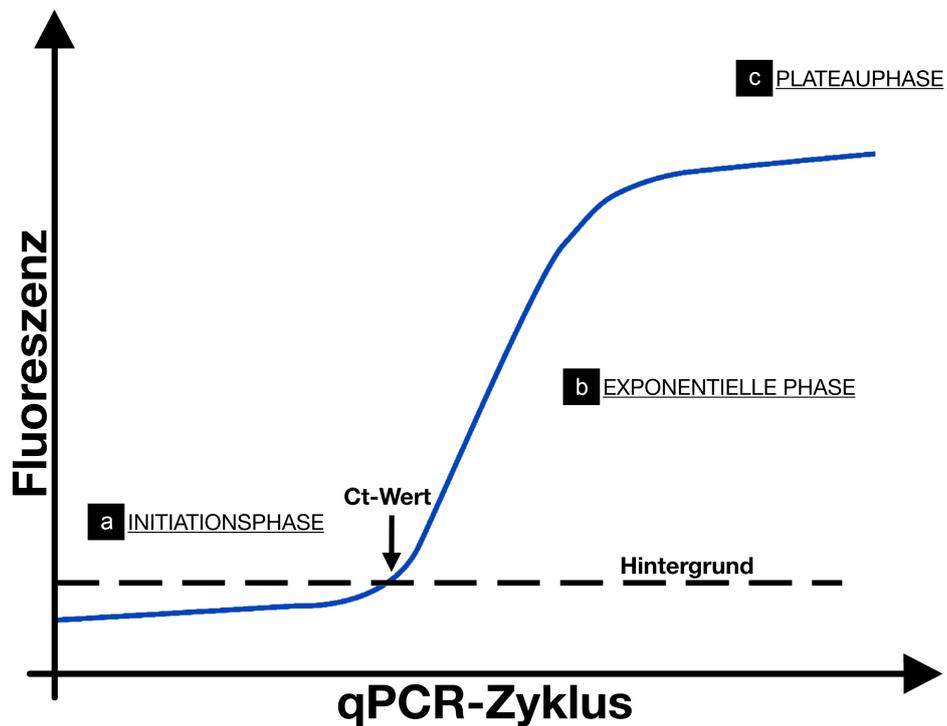


Abbildung 2. Phasen der qPCR. In der ersten Phase beginnt die PCR gerade und das Fluoreszenzsignal steigt noch nicht an (a). Anschließend steigt dieses ein wenig über den Ct- Wert (engl. Cycle threshold). In der exponentiellen Phase kann eine korrekte Quantifizierung vorgenommen werden (b). Aufgrund der Erschöpfung der Substrate nimmt das Fluoreszenzsignal nicht mehr zu und es wird ein Plateau erreicht (c).

Die verwendete sequenzspezifische TaqMan-Sonde (Oligonukleotid) ist eine DNA-Polymerase mit 5'-3' Exonukleaseaktivität, welche an dem einen Ende (5') einen Reporter- Fluoreszenzfarbstoff und an dem anderen Ende (3') einen Quencher-Farbstoff (Löschfarbstoff) besitzt. Wird die Sonde nicht durch die Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert, wird das vom Reporterfarbstoff emittierte Fluoreszenzlicht vom Löschfarbstoff aufgrund der Fluoreszenzresonanzenergieübertragung (fluorescent resonance energy transfer- FRET) absorbiert. Dies wird als Quenching-Effekt bezeichnet. Wird die Sonde jedoch durch die Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert, wird der Reporterfarbstoff am 5'-Ende vom Löschfarbstoff am 3'-Ende getrennt. Die Sonde ist nun vom Zielstrang entfernt und die DNA-Strangverlängerung kann bis zum Ende fortgesetzt werden. Der PCR-Prozess wird infolgedessen nicht durch die Einbeziehung der Sonde behindert. Wenn dieser gerade beschriebene Quenching-Effekt ausfällt, so wird das

fluoreszierende Licht des Reporterfarbstoffs vom Real-time-PCR-Gerät erfasst. Das freigegebene Reporterfarbstoffsignal ist proportional zur Menge der PCR-Produkte. Das Fluoreszenzsignal ändert sich während der ersten Anfangszyklen kaum. Dies bestimmt die Basislinie der Amplifikation für die graphische Darstellung. Steigt die Fluoreszenz über die Basislinie an, so kann man daraus schlussfolgern, dass eine Anreicherung der DNA stattgefunden hat. Die Zyklusnummer, bei der der festgesetzte Schwellenwert überschritten wird, wird als Ct-Wert bezeichnet.^{1,39–41}

Für die absolute Quantifizierung wurden in der vorliegenden Studie verdünnte Standards bekannter Konzentrationen verwendet, um eine Standardkurve zu erstellen. In der vorliegenden Studie entspricht der höchste Standard 100.000.000 EBV-Kopien/ml und der niedrigste Standard 1.000 EBV-Kopien/ml Vollblut.

Vollblutproben wurden nach Herstellerangaben mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Corp, Hilden, Deutschland) verarbeitet. DNA wurde aus Vollblut isoliert und die PCR wurde mit Prism 7500 Real Time Per System (ABI) durchgeführt. Die PCR-Amplifikation wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µL mit Primer und Sonde bei Endkonzentrationen von 900 nM und 5 µM aufgebaut. Die folgenden Bedingungen wurden für die qPCR verwendet: Der erste Schritt begann bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute.³⁸

3.3 Analyse der Zytokine mit beadbasiertem Immunoassay

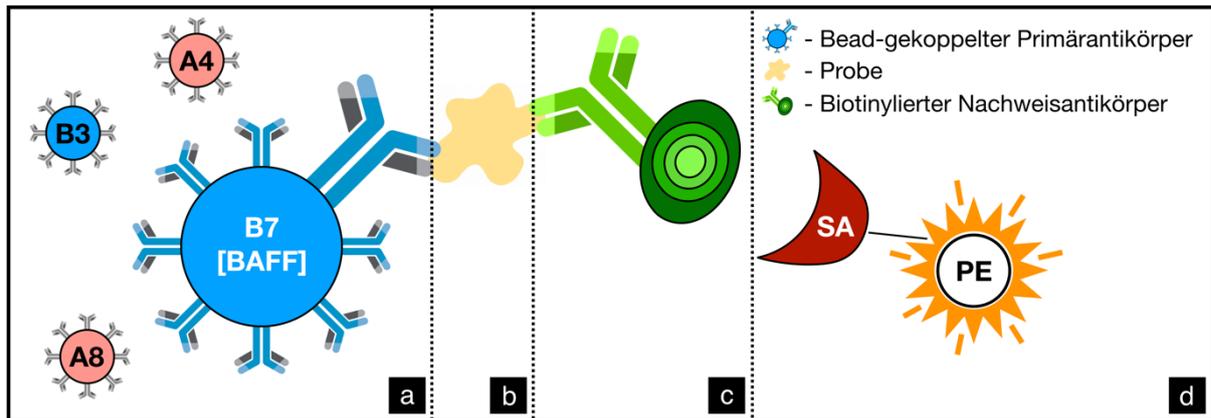
Die Analyse der Zytokine wurde mit LEGENDplex™-Assay von der Firma BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt, welcher das Prinzip eines Sandwich-Immunoassay (ELISA) mit dem der Durchflusszytometrie kombiniert.

Ein Durchflusszytometer ermöglicht die Multiparameter-Analyse von Einzelzellen oder Partikeln unter Verwendung von Lasern verschiedener Wellenlängen, eines komplexen Filter- und Spiegelsystems und Sensoren. Die Zellen oder Partikel können nach ihrer relativen Größe, Granularität, Oberflächeneigenschaften sowie Fluoreszenz analysiert werden. Vor der Analyse können die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder wie in dieser Studie fluorochromgekoppelten Antikörpern angefärbt werden. Das Prinzip der Messung basiert auf der Erfassung von Streulichteigenschaften und spezifischen Fluoreszenzsignalen, die durch Bindung von Antikörper-Fluoreszenz-Konjugaten an Zellstrukturen emittiert werden.⁴⁰

Beadbasierter Immunoassay

Der verwendete LEGENDplex™-Assay von der Firma BioLegend (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA) ist ein bead-basierter Immunoassay, welcher dasselbe Grundprinzip verwendet wie ein ELISA. Dabei ist ein löslicher Analyt zwischen zwei Antikörpern gebunden. Der gesamte Immunkomplex haftet an einer Matrix. Die Beads unterscheiden sich in ihrer Größe und ihrer internen Fluoreszenzintensität. Jeder Beadsatz ist mit einem spezifischen Antikörper auf seiner Oberfläche konjugiert (bead-gekoppelter Primärantikörper, Abbildung 3a). Wenn diese bead-gekoppelten Primärantikörper dann mit einer Probe gemischt werden, welche Zielanalyten enthält, wird jeder Analyt von seinem spezifischen Primärantikörper gebunden (Abbildung 3b). Nach dem Waschen wird ein biotinylierter Nachweisantikörper (sekundärer Antikörper) hinzugefügt und es bindet jeder Nachweisantikörper wiederum an seinen spezifischen Analyten, welcher selbst an die bead-gekoppelten Primärantikörper gebunden ist. Dadurch entstehen viele Primärantikörper-Analyt-Nachweisantikörper-Komplexe, analog zu einem Sandwich-ELISA (Abbildungen 3a-c). Anschließend wird Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) zugesetzt (Abbildung 3d), das das Biotin der Nachweisantikörper bindet, wodurch Fluoreszenzsignalintensitäten im Verhältnis zur Menge der gebundenen Analyten entstehen.

In diesem Panel wurden zwei verschiedene Beadarten verwendet (Bead-Satz A und Bead-Satz B). Jeder dieser Sätze kann auf der Grundlage seiner Größe bzw. Vorwärtsstreuung (forward scatter, FSC) und seiner intrazellulären Zusammensetzung bzw. Seitenstreuung (side scatter, SSC) differenziert werden (Abbildung 3e). In diesem Panel besteht der kleinere Satz A aus fünf Beadpopulationen und der größere Satz B aus drei Beadpopulationen. Jeder Bead-Satz kann auf der Grundlage seiner internen Fluoreszenzintensitäten weiter aufgeschlüsselt werden. Analytspezifische Populationen können mit dieser Methode mittels Durchflusszytometer aufgetrennt und das PE-Fluoreszenzsignal quantifiziert werden (Abbildung 3e). Die Konzentration eines bestimmten Analyten wird unter Verwendung einer auf die gleiche Weise erzeugten Standardkurve bestimmt. Mit dieser Methode wurden acht verschiedene Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL 21, TNF α , BAFF und APRIL) gleichzeitig analysiert.⁴²



Durchflusszytometrie

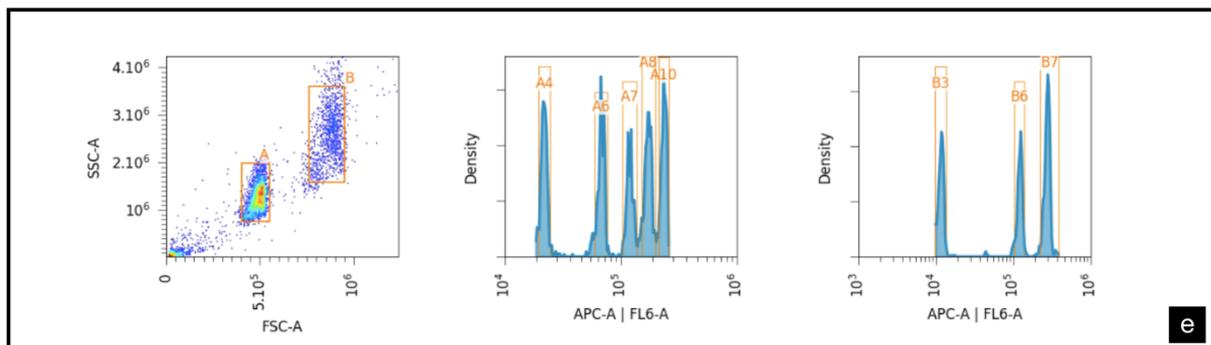


Abbildung 3. Schematische Abbildung eines LEGENDplex™-Assays. Jeder Beadsatz ist mit einem spezifischen Antikörper auf seiner Oberfläche konjugiert (bead-gekoppelter Primärantikörper). (a) Jede/Probe bzw. Analyt wird von ihrem/seinem Primärantikörper gebunden (b). Jeder biotinylierte Nachweisantikörper bindet an seinen spezifischen Analyten, welcher selbst an den bead-gekoppelten Primärantikörper gebunden ist. Es entstehen Primärantikörper-Analyt-Nachweisantikörper-Komplexe (c). Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) bindet das Biotin der Nachweisantikörper. Dadurch entstehen Fluoreszenzsignalintensitäten im Verhältnis zur Menge der gebundenen Analyte (d). Jeder Beadsatz kann auf der Grundlage seiner Größe und seiner intrazellulären Zusammensetzung differenziert und auf der Grundlage seiner internen Fluoreszenzintensitäten weiter aufgeschlüsselt werden. Analytspezifische Populationen können mit dieser Methode mittels Durchflusszytometer aufgetrennt und das Fluoreszenzsignal quantifiziert werden (e). (Eigene Abbildung a-d angelehnt an das Herstellerprotokoll von LEGENDplex™).

Die Proben wurden nach Herstellerprotokoll verarbeitet. 1:2 verdünnte Serumproben wurden mit Beads, die mit einem Capture-Antikörper gekoppelt sind, in einer V-bottom-Mikrotiterplatte gemischt und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen und

Zentrifugieren wurden biotinylierte Nachweisantikörper zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 600 U/min bei Raumtemperatur wurde SA-PE zugegeben und erneut 30 Minuten bei 600 U/min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei aufeinander folgenden Waschschritten wurden die Proben gemessen. Die Quantifizierung der SA-PE Signalfluoreszenzintensität erfolgte unter Verwendung eines Durchflusszytometers (CytoFlex S, Beckman Coulter, Deutschland). Die Konzentration der einzelnen Zytokine wurde mit Hilfe der Datenanalyse-Software von LEGENDplex™ über Interpolation mit der Standardkurve ermittelt.³⁸

3.4 Epigenetische B-Zell-Quantifizierung

Die verwendete Methode der B-Zell-Quantifizierung der Firma Epimune (Berlin, Deutschland) beruht auf epigenetischen, zelltypspezifischen Biomarkern (Abbildung 4). Im Gegensatz zu allen anderen Zelltypen, die eine vollständige Methylierung im LRP5-Gen haben, sind B-Zellen durch das Fehlen einer sogenannten CG-Methylierung in dieser spezifischen genomischen Region gekennzeichnet. Gibt man (nach der Zelllyse) Bisulfit hinzu, reagieren alle Cytosine mit dem Bisulfit, jedoch nicht die methylierten Cytosine. An jeder Stelle, wo die Konversion stattgefunden hat, befindet sich in der Folge ein Uracil statt einem Cytosin. Diese spezifische Region im LRP5-Gen in B-Zellen unterliegt einer epigenetischen Regulierung und zeigt eine vollständige Demethylierung. Bei der PCR kann das Demethyl-spezifische System nur da binden, wo sich ein Uracil befindet. Diese Region kann dann durch die Echtzeit-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) amplifiziert werden. Bei allen anderen Zelltypen ist diese Region epigenetisch inaktiv bzw. methyliert, sodass keine Amplifizierung stattfinden kann. Die Anzahl der epigenetisch aktiven Genkopien entspricht direkt der Anzahl der B-Zellen in der Probe, welche anhand eines parallel mitgeführten Plasmidstandards quantifiziert werden können. Das Standardplasmid enthält zum einen die B-Zell-spezifische Region und zum anderen die unmethylierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-spezifische Region. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und ist somit in allen kernhaltigen Zellen vorhanden, sodass man alle Zelltypen gleichzeitig quantifizieren kann. Von der Gesamtzellzahl kann schließlich mit Hilfe der Standardkurve das Verhältnis an B-Zell-spezifischen Sequenzen gebildet werden, welches dem prozentualen Anteil der B-Zellen entspricht (B-Zell-Frequenz).^{43,44}

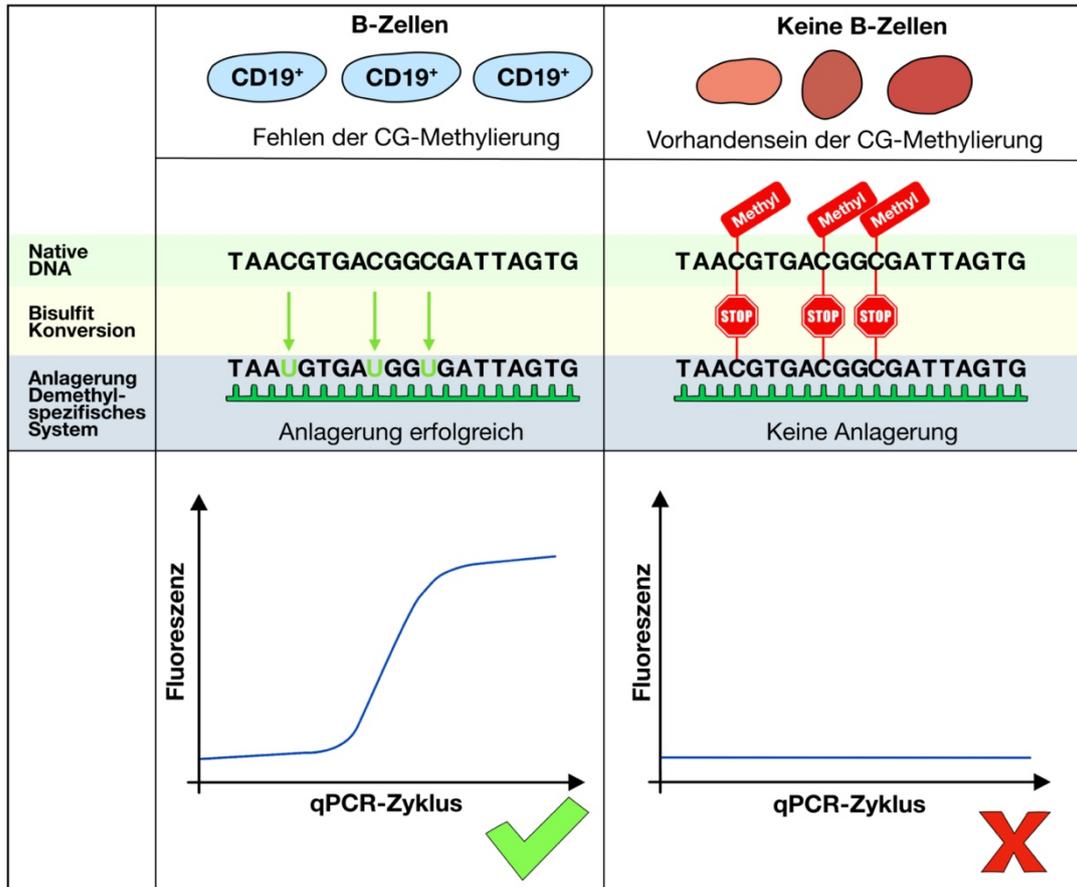


Abbildung 4. Schematischer Ablauf der epigenetischen B-Zell-Quantifizierung. B-Zellen besitzen keine vollständige Methylierung im LRP5-Gen (Fehlen der CG-Mehtylierung). Nach Zugabe von Bisulfit reagieren alle Cytosine mit Bisulfit (und es befindet sich in Folge ein Uracil an dieser Stelle). Bei der PCR bindet das Demethyl-spezifische System nur an Stellen, wo sich Uracil befindet. Diese Region wird mit der qPCR amplifiziert. Im Gegensatz dazu weisen alle anderen Zelltypen eine vollständige Methylierung im LRP5-Gen auf. Dadurch kommt es nach Zugabe von Bisulfit nicht zur Konversion von Cytosin zu Uracil und das Demethyl-spezifische System kann nicht binden. Es findet keine Amplifizierung statt. (Eigene Abbildung angelehnt an die Darstellung der Firma Epiontis; https://www.epiontis.com/technology/EpiontisID_infosheet_v1.pdf; letzter Zugriff: 15.06.2019, 17:38 Uhr).

Die Proben wurden gemäß Herstellerangaben verarbeitet. Citratblut wurde durch Zugabe von AL-Puffer und Protease (QIAamp DNA MiniKit, Qiagen) bei 56°C für 1 Stunde lysiert. Nach der Lyse wurde abs. Ethanol zu dem Lysat gegeben, gefolgt von Wasch- und Elutionsschritten. Zur Umwandlung und Reinigung von Bisulfit wurde genomische DNA in Gegenwart von Ammoniumbisulfit und Tetrahydrofurylalkohol für 45 Minuten bei 80°C umgewandelt. Die umgewandelte DNA wurde mit Magnetkügelchen (Mag-Bind® Blood & Tissue DNA HDQ 96 Kit) und angepassten Puffern gereinigt. Für die epigenetische qPCR

wurden die folgenden Bedingungen angewendet: Der erste Schritt begann bei 95°C für 35 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 61°C für 1 Minute in 10 µl-Reaktionen unter Verwendung der Roche LightCycler 480-Probes Master.³⁸

3.5 Erzeugung lymphoblastischer Zelllinien, Quantifizierung von B-Zellen und Bestimmung der EBV-Last unter BAFF-Behandlung

Von Nierentransplantationspatient*innen gespendete, aus PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) erzeugte lymphoblastische Zelllinien (LCL) wurden von der Arbeitsgruppe Schmück-Henneresse (Berliner Institut für Gesundheitsforschung) zur Verfügung gestellt.⁴⁵

PBMC wurden mit B95-8 EBV mit viralen Überständen in Gegenwart von CpG OND2006 (2,5 µg/ml) und Cyclosporin A (1 mg/ml) behandelt. Um die Wirkung von BAFF auf die LCL zu untersuchen, wurden 5×10^5 Zellen in einer 96 well Platte kultiviert und mit drei verschiedenen BAFF- Konzentrationen (1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml) in Gegenwart oder Abwesenheit von Mycophenolsäure (MPA) (2,5 µg/ml) und Tacrolimus (Tac) (6 ng/ml) behandelt. Die Arzneimittelkonzentrationen in Zellkultur entsprachen dem therapeutischen Niveau. Die Zellzahlen der lebenden LCL wurden mittels Durchflusszytometrie (Cytoflex LX, Beckman Coulter) bestimmt. Die Viruslast wurde in Pools des Zelllysats und der Zellkulturüberstände mittels Echtzeit-PCR bestimmt.³⁸

3.6 Statistische Auswertung

Die Unterschiede zwischen den Gruppen für kategoriale Variablen wurden mit Hilfe von Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Kontinuitätskorrektur berechnet. Unterschiede in quantitativen Variablen zwischen den Gruppen wurden mit dem zweiseitigen Mann-Whitney U-Test analysiert; die Expansion der B-Zellen wurde mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit $\mu=0$ getestet.³⁸

Korrelationsgröße und Signifikanz wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Die Gleichheit zwischen zwei Korrelationsmatrizen wurde unter Verwendung des Jennrich-Tests getestet.^{38,46}

Die Auswirkungen von BAFF auf die in-vitro-Virusreplikation und die B-Zell-Frequenz wurden univariat durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und multivariat durch

lineare Regression bewertet, wobei die Wirkung der Immunsuppression und patient*innenspezifische Effekte kontrolliert wurden. Die normalisierte LCL-B-Zellzahl wurde für jede*n Patient*in berechnet, indem die B-Zellzahlen für jeden Zustand durch die B-Zellzahl für unbehandelte Zellen (kein BAFF und keine Immunsuppression) geteilt wurden. Echtzeitdaten zur EBV-Last wurden als Kehrwert des Ct-Werts berechnet, normalisiert unter Verwendung des unbehandelten Zustands (kein BAFF, keine Immunsuppression) als Kontrolle. In allen Fällen wurden P-Werte unter 0,050 als signifikant betrachtet. Die P-Werte wurden nicht für Mehrfachtests korrigiert, da diese Studie explorativen Charakter hat.^{38,47-49}

Kategorische Variablen werden als Zahlen und Häufigkeiten zusammengefasst und quantitative Variablen als Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Box-Plots stellen den Median, das erste und dritte Quartil einer Variablen dar und die maximale Länge der Whisker entspricht dem 1,5-fachen des IQR.³⁸

4 Ergebnisse

Es wurde die EBV-Last in insgesamt 3.715 Blutproben, die 540 Patient*innen im ersten Jahr nach der Transplantation entnommen wurden, getestet. Wie bereits beschrieben, wurde die EBV-Last bei 109 (20,2 %) Patient*innen festgestellt; 37 (6,9 %) Patient*innen litten unter einer erhöhten Viruslast (>2.000 Kopien/ml), während bei 11 Patient*innen (2,0 %) eine hochgradige Virämie (>10.000 Kopien/ml) beobachtet wurde. Es gab nur einen Fall von schwerer PTLD in der gesamten Kohorte.

4.1 Signifikante Assoziation von BAFF und EBV

Insgesamt wurden von 104 Patient*innen zu drei verschiedenen Zeitpunkten 312 Proben auf die B-Zell-Frequenz und die Konzentrationen von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21, TNF α , APRIL und BAFF gemessen (Abbildung 5). Die einzig signifikante Assoziation zwischen EBV-Positivität und veränderten Zytokinkonzentrationen lag bei BAFF vor (Abbildung 5f, mit Sternchen markiert).³⁸

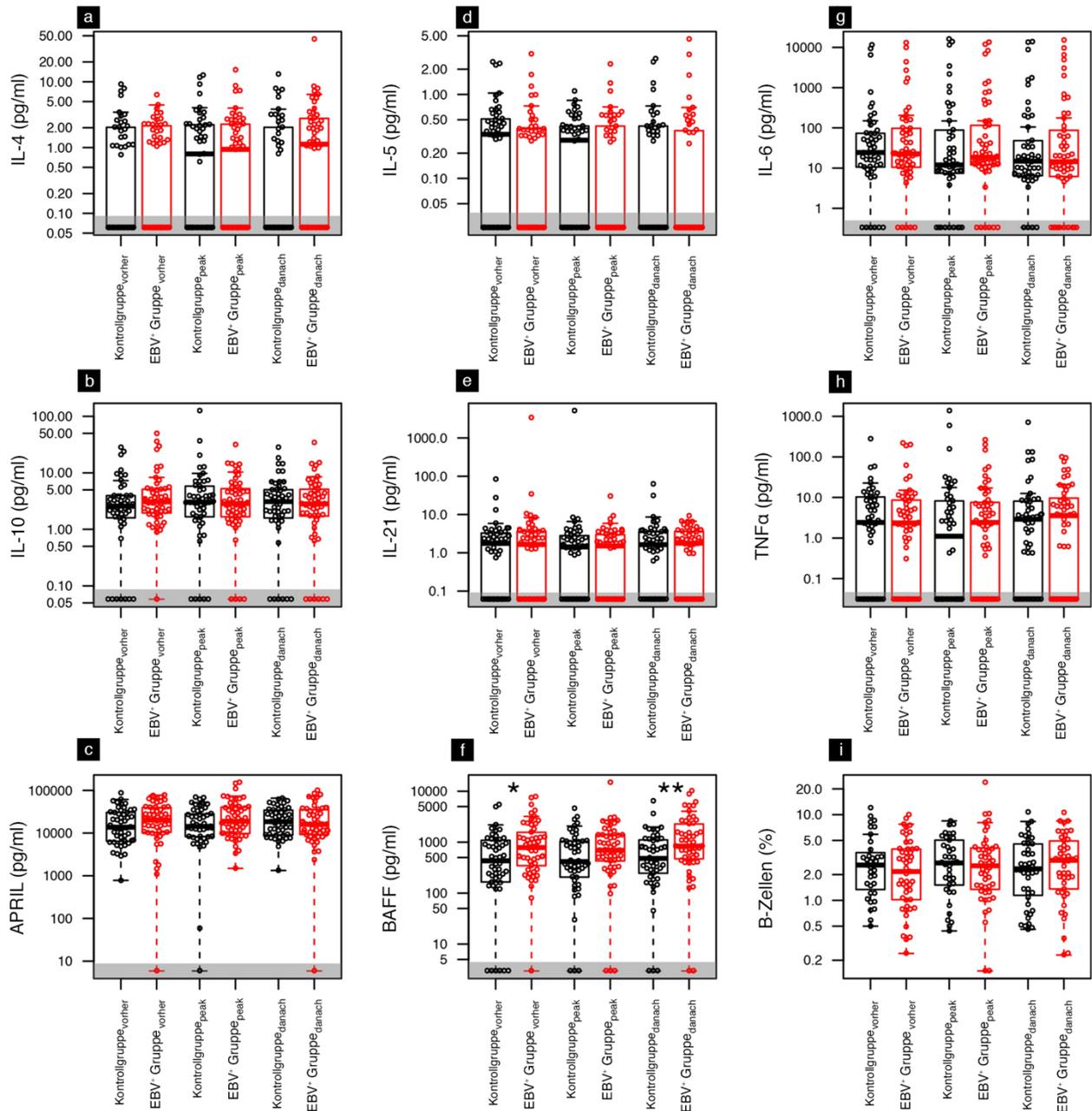


Abbildung 5. Konzentration der Zytokine und der B-Zell-Frequenz zu den drei Zeitpunkten. Patient*innen der Kontrollgruppe sind in schwarz und EBV+ Patient*innen sind in rot abgebildet. Signifikante Unterschiede ($P < 0,050$) zwischen den Subkohorten sind mit einem Sternchen gekennzeichnet, hochsignifikante Unterschiede ($P < 0,010$) mit zwei Sternchen. Die y-Achse ist in logarithmischer Skala dargestellt. Messungen unterhalb der Nachweisgrenze sind mit einem willkürlich definierten niedrigen Wert innerhalb des grau schattierten Bereichs dargestellt. Für die Berechnung der Signifikanz wurden diese Messungen mit einem Wert von 0 berücksichtigt. (Abbildung verändert nach Bajda et al. Abbildung 2).³⁸

Es konnte eine signifikante Assoziation zwischen EBV-Positivität und erhöhten BAFF-Spiegeln im Serum sowohl vor (784 [355-1482] vs. 433 [173-1053] pg/ml; $P=0,016$) als auch nach der Reaktivierung (836 [478-2094] vs. 480 [253-1100] pg/ml; $P=0,006$) beobachtet werden, wohingegen während des Peaks nur ein grenzwertig signifikanter Unterschied beobachtet wurde (694 [432-1393] vs. 416 [222-1045] pg/ml; $P=0,080$) (Abbildung 6).³⁸

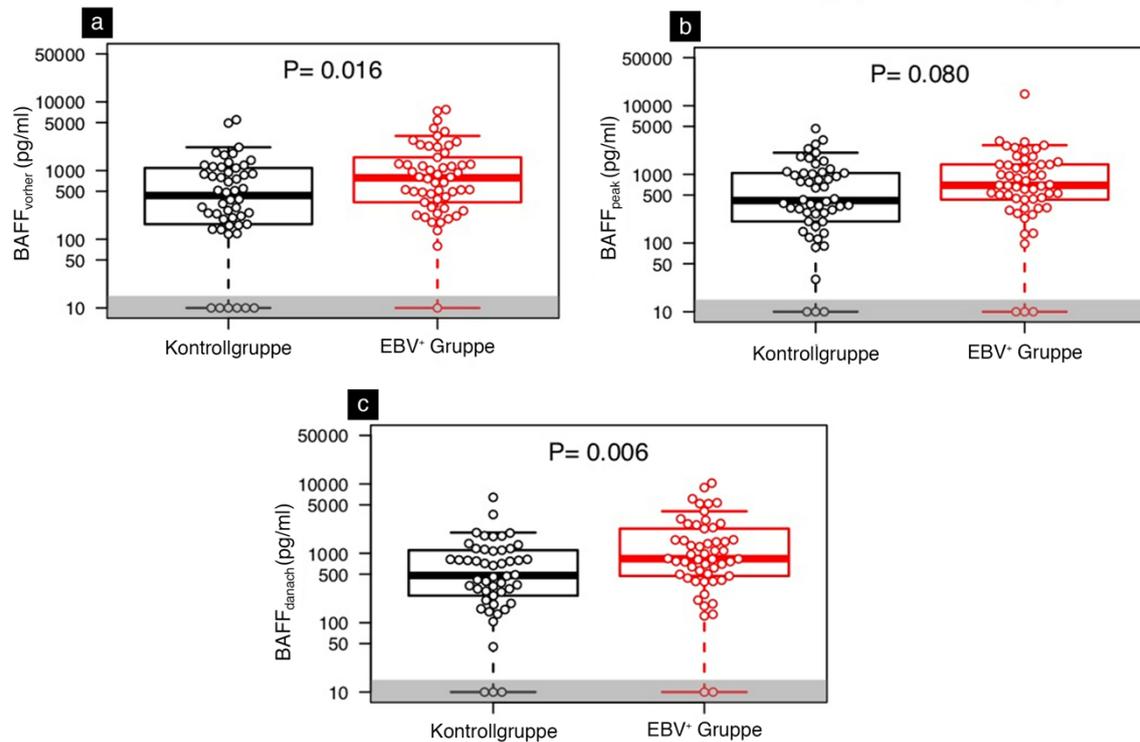


Abbildung 6. BAFF-Konzentration im Serum in Abhängigkeit der EBV-Reaktivierung. Gemessene BAFF-Konzentration für beide Subkohorten zu den Zeitpunkten vor (a), während (b) und nach (c) der Reaktivierung. Proben mit einer BAFF-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze sind im grauen Bereich dargestellt. Für die Berechnung der Signifikanz wurden diese Konzentrationen mit einem Wert von 0 berücksichtigt. Beide Achsen sind in logarithmischer Skala dargestellt. (Abbildung verändert nach Bajda et al. Abbildung 3).³⁸

Darüber hinaus wurde keine Korrelation zwischen der EBV-Last und den BAFF-Werten gefunden (Abb. 7a-c).³⁸

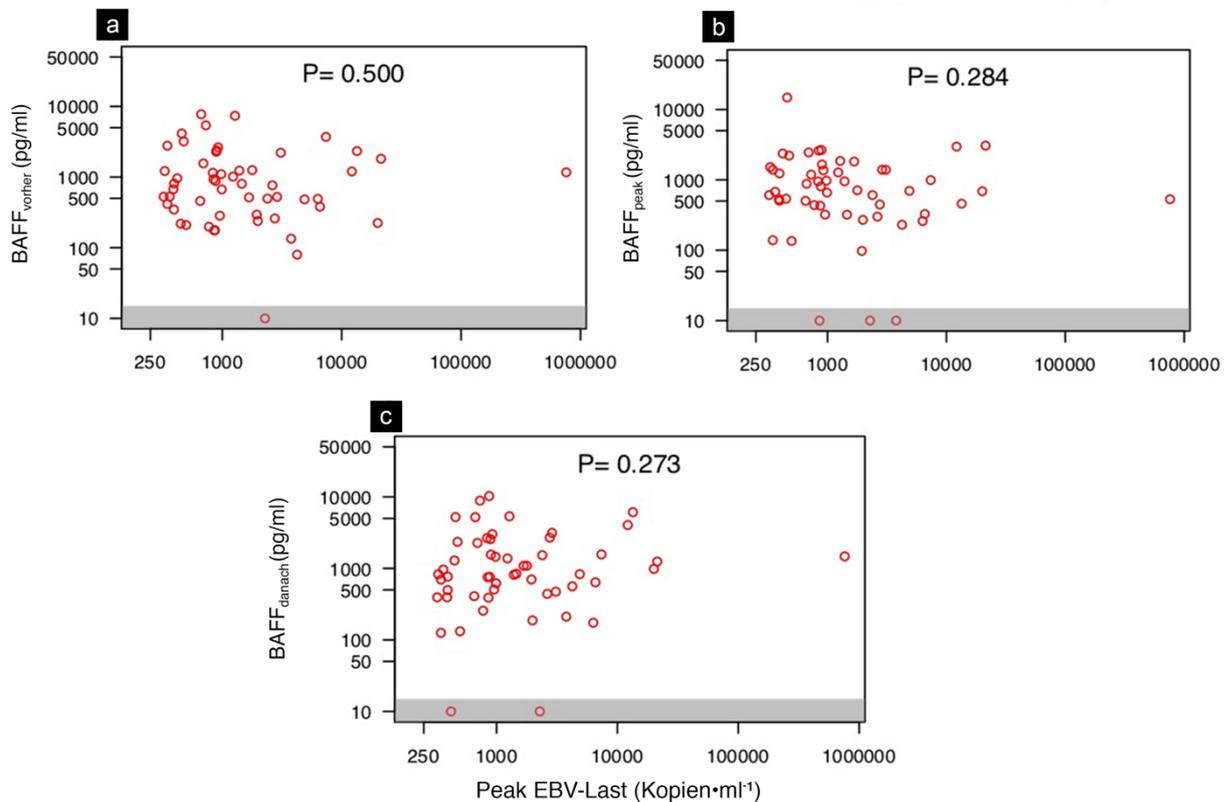


Abbildung 7. BAFF-Konzentration im Serum in Abhängigkeit von der EBV-Reaktivierung. Gemessene BAFF-Konzentrationen in der EBV⁺ Gruppe zu den Zeitpunkten vor (a), während (b) und nach (c) der Reaktivierung werden gegen die Peak EBV-Last dargestellt. Proben mit einer BAFF-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze sind im grauen Bereich dargestellt. Für die Berechnung der Signifikanz wurden diese Konzentrationen mit einem Wert von 0 berücksichtigt. Beide Achsen sind in logarithmischer Skala dargestellt. (Abbildung verändert nach Bajda et al. Abbildung 3).³⁸

Durch den Nachweis eines erhöhten BAFF-Niveaus in der EBV⁺ Gruppe wurde ein möglicher Effekt der EBV-Reaktivierung auf die B-Zell-Homöostase gezeigt, welcher sogar nach der Reaktivierung noch signifikanter war.

Da keiner der anderen gemessenen Zytokine eine signifikante Assoziation mit der EBV-Reaktivierung oder eine Korrelation mit der Virusspitzenlast gezeigt hatte, wurde der weitere Fokus nur auf BAFF gelegt (Abbildung 8).³⁸

4.2 Expansion und virale Replikation von EBV-infizierten B-Zellen während der BAFF-Behandlung (in-vitro)

Verglichen mit unbehandelten Kontrollen zeigen die Daten eine höhere EBV-Last bei LCL, die mit BAFF behandelt wurden. Mittels Multi-Parameter-Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass dieser Unterschied signifikant war (0.13 ± 0.06 , $P = 0.041$) (Abbildung 8a). Die Behandlung mit BAFF war signifikant mit einer erhöhten LCL Anzahl (verglichen mit unbehandelten Zellen) assoziiert, wie die Multiparameter-Regression zeigte ($0,36 \pm 0,14$, $P = 0,017$) (Abbildung 8b). Ein dosisabhängiger Effekt von BAFF konnte jedoch nicht beobachtet werden.³⁸

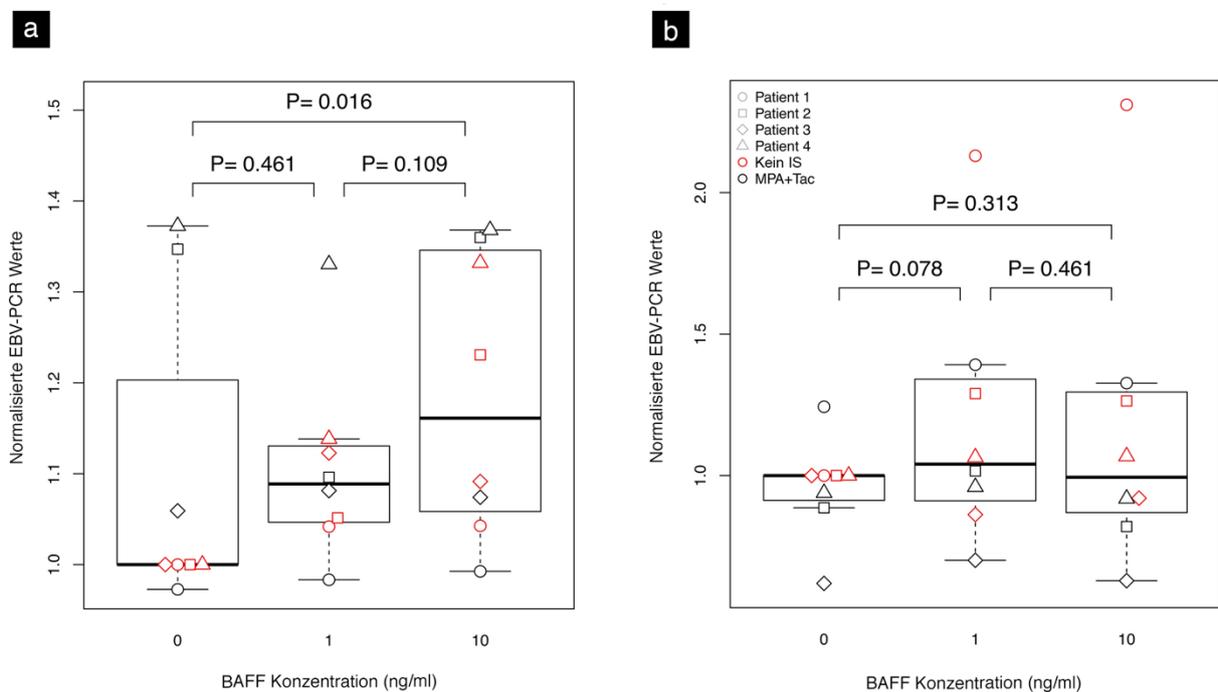


Abbildung 8. BAFF-Behandlung von EBV-infizierten LCL führt zu erhöhter EBV-Replikation und Zellexpansion. LCL-B-Zellen von vier verschiedenen Nierentransplantationspatient*innen wurden mit steigenden BAFF-Konzentrationen (x-Achse), mit (schwarze Symbole) oder ohne (rote Symbole) MPA + Tac kultiviert. Die EBV-Last unter BAFF-Behandlung wurde durch Normalisierung der EBV-PCR-Daten, die nach der BAFF-Behandlung erhalten wurden, auf unbehandelte Proben (a) bewertet. Die normalisierte LCL-B-Zellzahl (b) stellt das Verhältnis der B-Zellzahl zu den unbehandelten (BAFF = 0 und keine IS) LCL-B-Zellen dar. (Abbildung verändert nach Bajda et al. Abbildung 4).³⁸

4.3 Keine B-Zell-Expansion bei BAFF-Expression und EBV-Reaktivierung

Es wurde zu keinem der drei gewählten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der B-Zell-Frequenz zwischen den EBV⁺ Patient*innen und der Kontrollgruppe beobachtet (Abbildungen 9a-c). Ebenso wurde innerhalb der EBV⁺ Gruppe keine Korrelation zwischen der Kinetik der EBV-Last und der Kinetik der B-Zell-Frequenz gefunden (Abbildung 9d-f). Es gab keinen signifikanten Anstieg der B-Zell-Frequenz unter den EBV⁺ Patient*innen, weder während ($P=0,739$) noch nach der Reaktivierung ($P=0,543$), verglichen mit dem Zeitpunkt vor der Reaktivierung. Darüber hinaus wurde kein signifikanter Unterschied in der B-Zell-Kinetik zwischen den EBV⁺ Patient*innen und der Kontrollgruppe beobachtet.³⁸

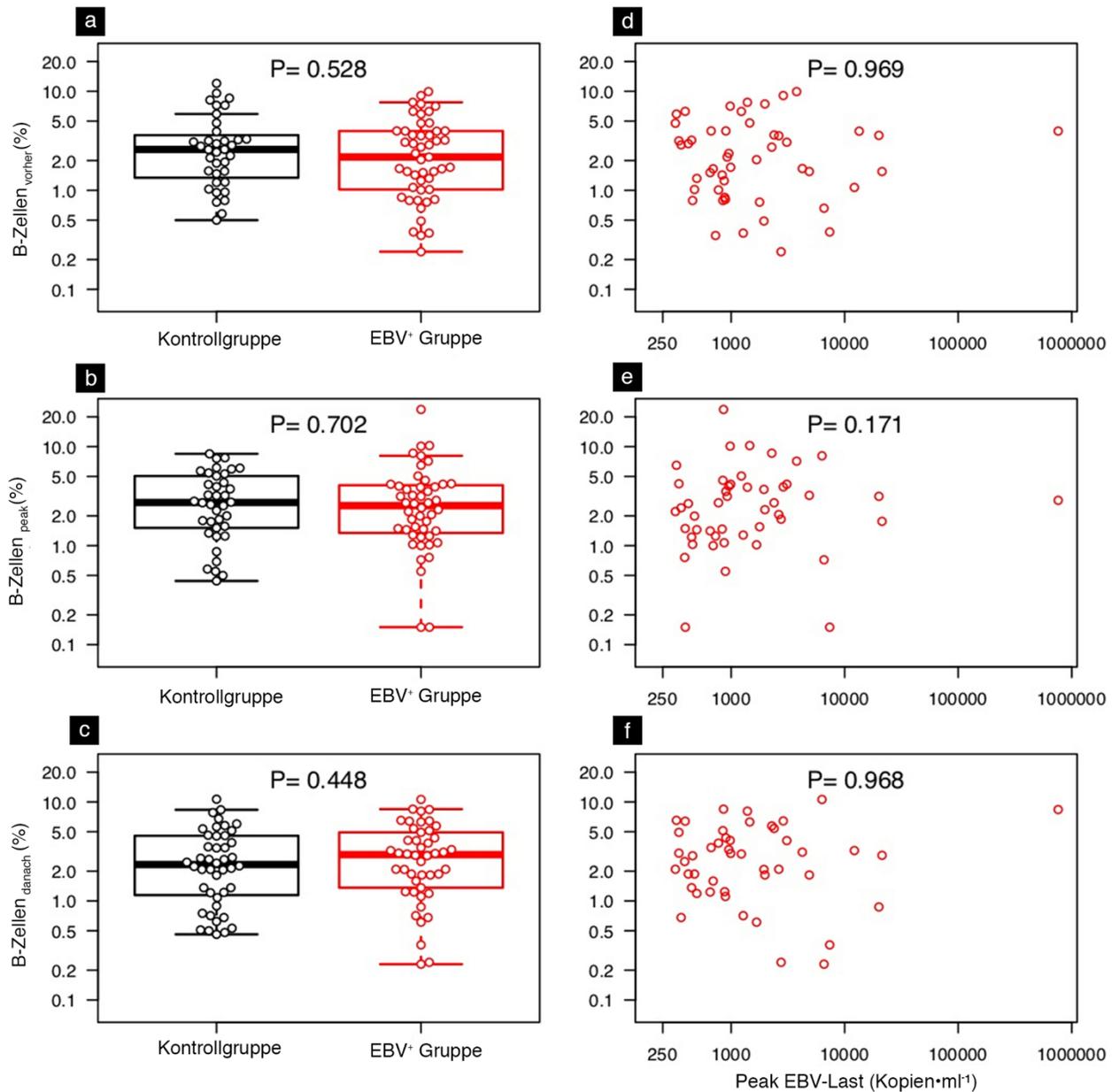


Abbildung 9. B-Zell-Frequenz in Abhängigkeit von der EBV-Reaktivierung. Die linke Spalte zeigt die gemessenen B-Zell-Frequenzen für beide Subkohorten zu den Zeitpunkten vor (a), während (b) und nach (c) Reaktivierung. Die rechte Spalte stellt die gemessenen B-Zell-Frequenzen in der EBV⁺ Gruppe zu den Zeitpunkten vor (d), während (e) und nach (f) Reaktivierung in Abhängigkeit der EBV-Last zum Peak dar. Beide Achsen sind in logarithmischer Skala dargestellt. (Abbildung verändert nach Bajda et al. Abbildung 5).³⁸

4.4 Signifikante Assoziation zwischen EBV und verändertem Zustand immunmodulierender Faktoren

Es wurden Korrelationsanalysen mit allen Zytokinen und B-Zell-Frequenzen zu allen Zeitpunkten durchgeführt. Bei der Analyse der Auswirkungen der EBV-Reaktivierung auf die Interkorrelationen aller gemessenen Zytokine wurde festgestellt, dass die Patient*innen in der EBV⁺ Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auffallende Unterschiede in ihrer Korrelationsmatrix zeigten. Der Unterschied zwischen den beiden Korrelationsmatrizen war signifikant ($P < 0,001$) (Abbildungen 10 und 11).³⁸

Im Detail war die EBV-Reaktivierung mit einer allgemeinen Schwächung der Korrelationen zwischen Zytokinen verbunden: Während die gemessenen Interleukine und TNF α in der Kontrollgruppe zu fast allen Zeitpunkten positiv miteinander korreliert waren (90,8%), war das Verhältnis der positiven Korrelationen in der EBV⁺ Gruppe wesentlich geringer (66,0%).³⁸

Diese Unterschiede beeinflussten auch das Zusammenspiel zwischen Zytokinen und B-Zellen. So waren IL-5 und IL-21 in der EBV⁺ Gruppe positiv mit der B-Zell-Frequenz korreliert, während in der Kontrollgruppe sowohl positive als auch negative Korrelationen beobachtet werden konnten. Interessanterweise war im Fall von BAFF die Korrelation mit der B-Zell-Frequenz bei den EBV⁺ Patient*innen negativ, während dies bei der Kontrollgruppe nicht der Fall war. Infolgedessen waren die Korrelationskoeffizienten für die EBV⁺ Gruppe niedriger als für die Kontrollgruppe (Abbildung 11).³⁸

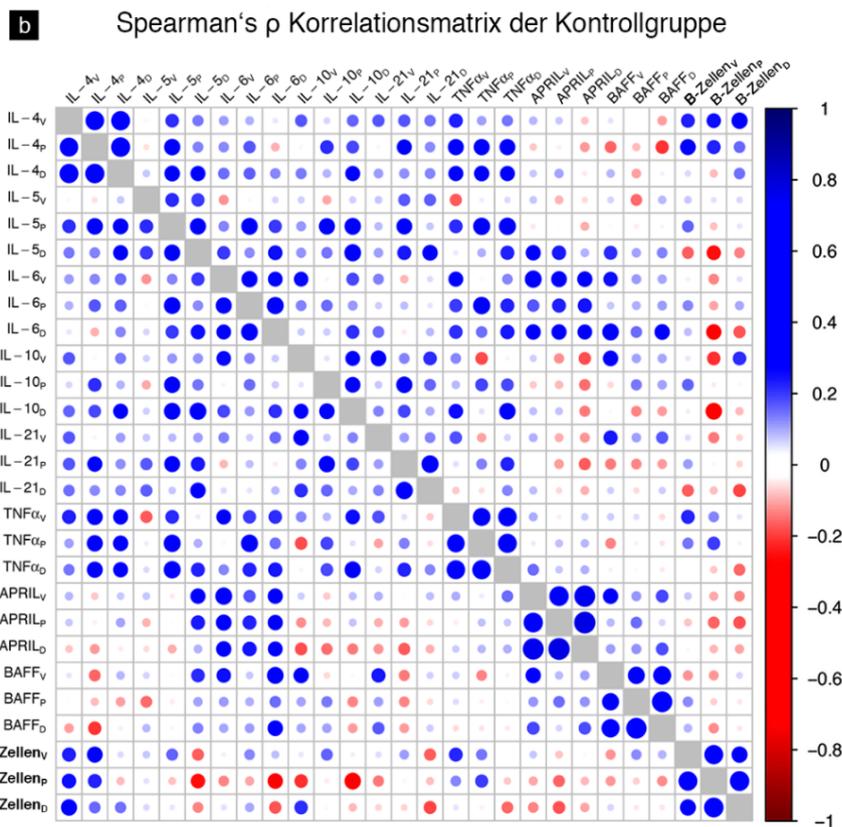
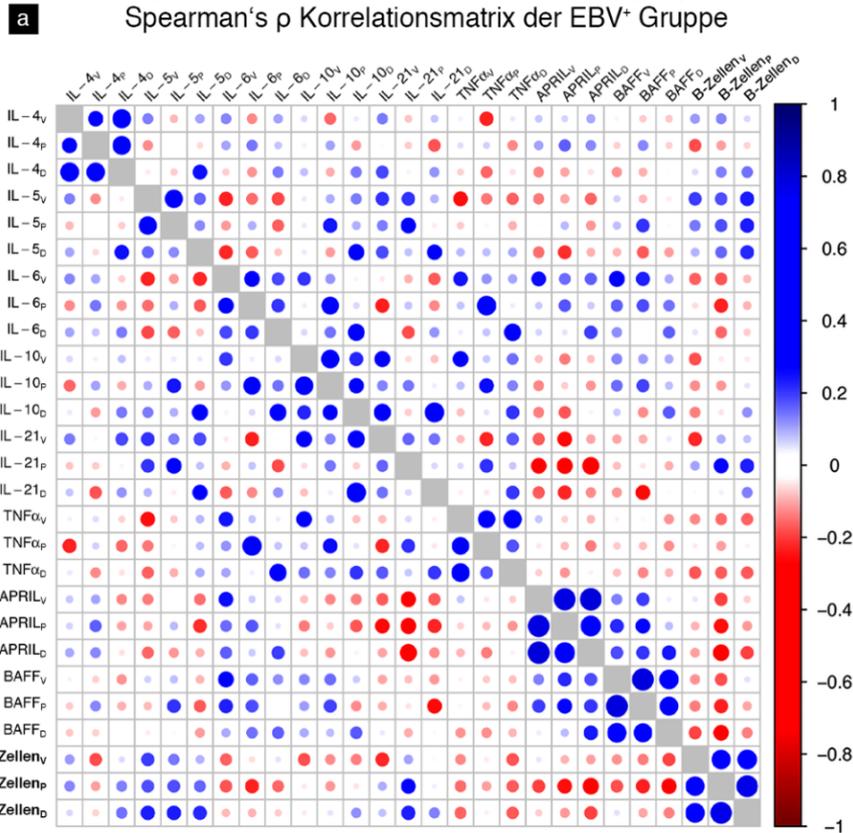


Abbildung 10. Korrelationsmatrizen von Zytokinen und B-Zellen für die Subkohorten. (a) Stellt die Korrelationsmatrix der EBV⁺ Gruppe dar, während (b) die Korrelationsmatrix der Kontrollgruppe zeigt. Die Korrelationsstärke wird sowohl durch die Größe der Kreise als auch durch die Farbintensität dargestellt, wobei (wie in der Legende dargestellt) blaue Farbtöne positive Korrelationen und rote Farbtöne negative Korrelationen darstellen. Tiefgestellte Beschriftungen bezeichnen den Zeitpunkt der Messung (V: vorher, P: peak, D: danach). (Abbildung verändert nach Bajda et al. Abbildung 6).³⁸

Matrix der Korrelationsdifferenzen

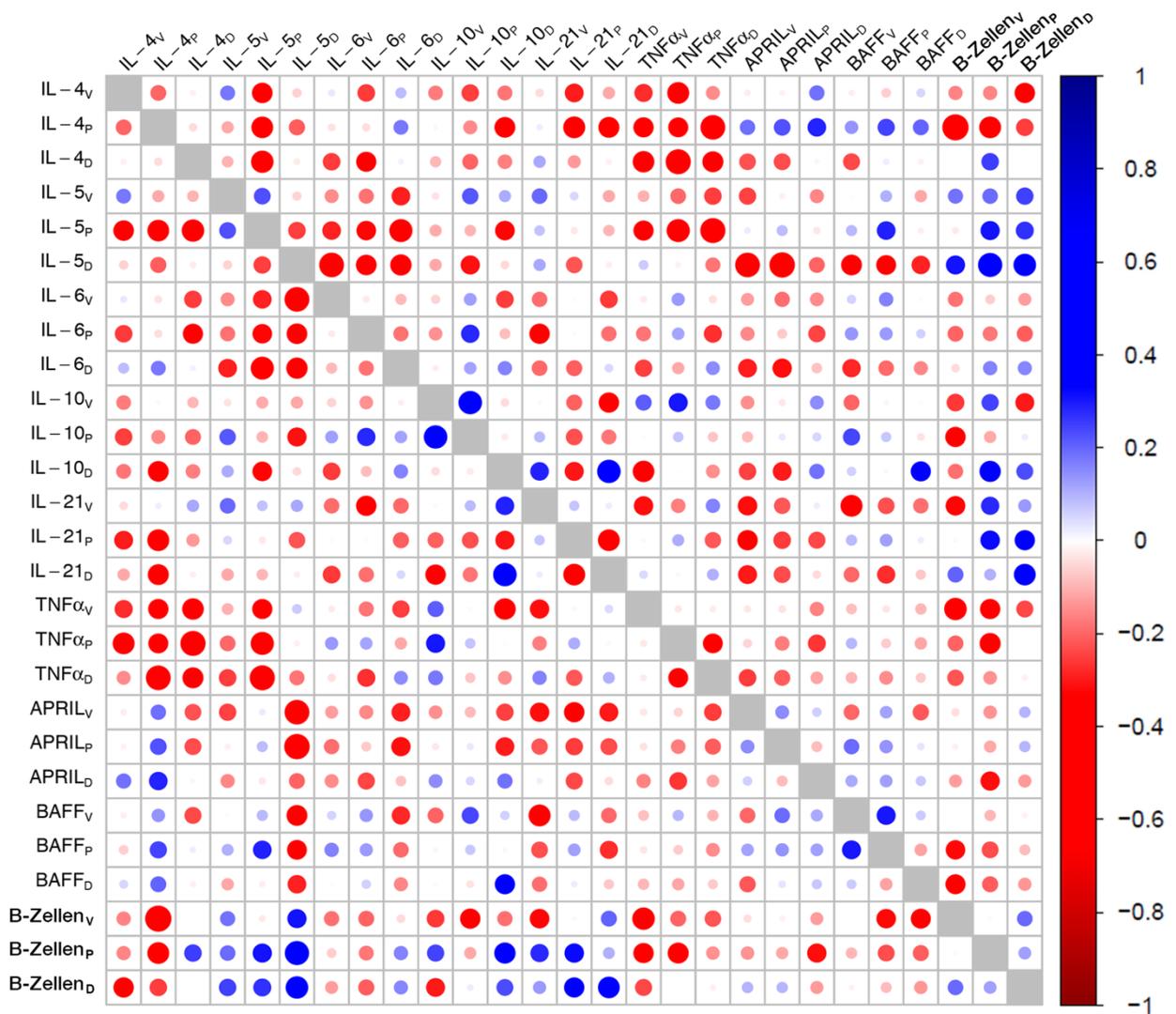


Abbildung 11. Differenz der Korrelationsmatrizen der EBV+ Gruppe und der Kontrollgruppe. Der absolute Wertunterschied zwischen den Korrelationen wird durch die Kreisgröße dargestellt. Blaue Töne bedeuten, dass die EBV+ Gruppe eine erhöhte Korrelation im Vergleich zur Kontrollgruppe hatte. Dies gilt umgekehrt für die roten Töne. Tiefgestellte bezeichnen den Zeitpunkt der Messung (V: vorher, P: peak, D: danach). (Abbildung verändert nach Bajda et al. Abbildung 7).³⁸

Um festzustellen, ob der veränderte Zustand des Immunsystems möglicherweise eher eine Folge als eine Ursache der EBV-Reaktivierung sein könnte, wurde die Zeitabhängigkeit dieses veränderten Zustands weiter analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Subkohorten vor der EBV-Reaktivierung beobachtet werden ($P=0,257$). Tatsächlich wurde bereits während des Peaks ein signifikanter Unterschied beobachtet ($P=0,010$). Nach der Reaktivierung war dieser Unterschied sogar noch größer ($P=<0,001$).³⁸

5 Diskussion

5.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie wurde das tri-direktionale Zusammenspiel zwischen EBV-Reaktivierung, B-Zell-Frequenz und B-Zell-assoziierten löslichen Serummediatoren (Zytokinen) analysiert. Die wichtigsten Ergebnisse umfassen Folgendes:

1. EBV⁺ Patienten zeigten sowohl vor als auch nach EBV-Reaktivierung signifikant erhöhte Konzentrationen von BAFF im Serum. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast und den BAFF-Konzentrationen gefunden.
2. BAFF-behandelte EBV-infizierte B-Zellen waren in-vitro mit einer erhöhten EBV-Replikation und B-Zell-Expansion assoziiert.
3. Trotz der erhöhten BAFF-Spiegel in der EBV⁺ Gruppe war die EBV-Reaktivierung in-vivo weder mit einer erhöhten B-Zell-Frequenz noch mit einer B-Zell-Expansion assoziiert.
4. Die EBV-Reaktivierung war mit einem signifikant veränderten Zustand immunmodulatorischer Faktoren assoziiert.³⁸

5.2 Interpretation der Ergebnisse

Durch den Nachweis einer erhöhten BAFF-Konzentration in der EBV⁺-Gruppe konnte erstmalig eine mögliche Auswirkung der EBV-Reaktivierung auf die B-Zell-Homöostase nachgewiesen werden. Somit könnte die EBV-Reaktivierung einen tiefgreifenden Einfluss auf die Immunantwort haben, indem sie das Zusammenspiel zwischen den gemessenen Zytokinen und der zellulären Immunität verändert.³⁸

Interessanterweise wurde kein ausgeprägtes Korrelationsprofil vor Beginn der Virämie beobachtet, obwohl erhöhte BAFF-Konzentrationen sowohl in-vitro als auch in-vivo mit der EBV-Reaktivierung in Verbindung gebracht wurden.³⁸

Anders als in der vorliegenden Studie, hat sich BAFF in einem immunsupprimierten Kontext wie AIDS als Lymphom-Marker erwiesen.⁵⁰ Die Unterschiede zwischen dieser

Studie und derjenigen über AIDS-Patienten könnten ggf. durch den Einfluss der EBV-Infektion erklärt werden, da die letztere in der AIDS-Studie nicht berücksichtigt wurde.

Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass die EBV-Reaktivierung mit einer starken Verringerung der BAFF-B-Zell-Korrelation verbunden war, was das Fehlen einer B-Zell-Expansion erklären könnte.

Die Veränderungen im Muster der Zytokine könnten hypothetisch als Teil einer „Anti-PTLD-Signatur“ betrachtet werden. Speziell die festgestellten erhöhten BAFF-Konzentrationen vor und während der EBV-Reaktivierung könnten möglicherweise ein Marker für diesen „Anti-PTLD-Zustand“ sein.

Im Einklang damit wurde BAFF in einer Studie bei Lebertransplantationspatient*innen nicht mit PTLD in Verbindung gebracht.⁵¹ Zusätzlich wurde gezeigt, dass BAFF sogar eine wichtige Rolle bei der antiviralen Immunantwort spielt.⁵²

Darüber hinaus könnte die BAFF-Hochregulierung als prädiktiver Marker für eine EBV-Reaktivierung dienen. So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es eine erhöhte BAFF-Konzentration vor einer EBV-Reaktivierung und eine Assoziation von BAFF mit einer erhöhten in vitro-Virusreplikation gibt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien über die Hochregulierung von BAFF sowohl in-vitro als auch in-vivo in EBV-infizierten B-Zellen.^{13,53}

5.3 Weiterführende Fragestellungen, Limitationen und mögliche klinische Anwendungen

Es muss aufgeklärt werden, aus welchen Gründen die erhöhte Sekretion von BAFF in-vivo, im Gegensatz zu den in-vitro-Versuchen, nicht zu einer B-Zell-Expansion bei EBV⁺ Patient*innen geführt hat. In einer nachfolgenden in-vitro-Analyse könnte z.B. untersucht werden, ob weitere Zytokine einen inhibierenden Effekt auf die Interaktion zwischen BAFF und B-Zellen haben. Dies wäre wichtig, um die in dieser Studie aufgestellten Hypothesen zu überprüfen. Dafür könnten die erarbeiteten Daten der Korrelationsmatrizen verwendet werden.

Eine Stärke dieser Studie ist die Analyse der Zytokine mittels genannter Korrelationsmatrizen. Diese sind ein leistungsfähiges Hilfsmittel, mit dem man über die bloßen Konzentrationsänderungen einzelner Faktoren hinausgehend das Netzwerk der Korrelationen als Ganzes betrachten kann.

Die Folgen der EBV-Reaktivierung konnten nur durch diesen Ansatz erkannt werden, da alle Wechselbeziehungen bzw. gegenseitigen Synergien der Zytokine berücksichtigt wurden.^{54–56}

Außerdem wurde in dieser Studie die Rolle der T-Zellen bei der Kontrolle der EBV-Reaktivierung und Expansion infizierter B-Zellen nicht analysiert. Dies könnte man in einer weiteren Studie noch untersuchen, da dies eine Erklärung für den beobachteten veränderten Zustand des Immunsystems im Sinne der oben beschriebenen hypothetischen Anti-PTLD-Signatur darstellen könnte.

Da die meisten PTLD in der erwachsenen Population erst mehrere Jahre nach Transplantation auftreten, wäre die Überprüfung der Ergebnisse in einer Kohorte der Patient*innen im späten Transplantationsverlauf sinnvoll. Aufgrund des angelegten Studiendesigns war die Beantwortung dieser Fragestellung in diesem Rahmen leider nicht möglich. Es wird jedoch aktuell eine follow-up-Studie durchgeführt, sodass weitere Untersuchungen in diese Richtung folgen könnten.

Zusätzliche wurde in dieser Studie der Einfluss der Virämie-Dauer nicht gesondert analysiert, obwohl es Hinweise auf eine Rolle einer anhaltenden EBV-Virämie bei der Entwicklung von PTLD gibt.⁵⁷ Der Grund dafür war die geringe Inzidenz einer anhaltenden EBV-Virämie, da nur bei zwei Patient*innen eine Viruslast bei mehr als zwei Visiten nachweisbar war. Außerdem wurden nur drei Zeitpunkte analysiert, so dass es keine Daten über die Persistenz der beobachteten Veränderungen des Immunsystems bei EBV⁺ Patient*innen gibt.

So könnte in einer langfristigen Studie festgestellt werden, ob die Unterschiede zwischen den EBV⁺/EBV⁻ Subkohorten zeitlich stabil sind. Sollte eine Identifizierung der Faktoren gelingen, die den inhibierenden Effekt auf die Proliferation von EBV⁺ B-Zellen haben, könnte dies gezielt als personalisierte Therapie eingesetzt werden.

Da PTLD nicht nur nierentransplantierte Patient*innen betrifft, wäre darüber hinaus eine Ausweitung auf andere transplantierte Organe sinnvoll.

Eine weitere Limitation dieser Studie ist, dass der einzige Patient, der während der Beobachtungszeit eine PTLD entwickelte, seine Zustimmung zurückgezogen hat, sodass für diesen Patienten leider keine weiteren Daten vorliegen.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Art und Persistenz der EBV-assoziierten Veränderungen in der B-Zell-Homöostase sowie ihre hypothetische Beziehung zur Entwicklung von PTLD zu bewerten.

Im Allgemeinen sollten jedoch alle folgenden Studien das Ziel haben, in einem Therapieansatz zu münden, damit PTLD zukünftig keine relevante Komplikation nach Transplantation mehr darstellt.

6 Literaturverzeichnis

1. Kenneth Murphy, C. W. *Janeway's Immunobiology*. (Garland Science, 2016).
2. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353 (2015).
3. Beutler, B. Innate immunity: An overview. *Mol. Immunol.* **40**, 845–859 (2004).
4. Hinrichs, C., Wendland, S., Zimmermann, H., Eurich, D., Neuhaus, R., Schlattmann, P., Babel, N., Riess, H., Gärtner, B., Anagnostopoulos, I., Reinke, P. & Trappe, R. U. IL-6 and IL-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders development and maintenance: A longitudinal study of cytokine plasma levels and T-cell subsets in 38 patients undergoing treatment. *Transpl. Int.* **24**, 892–903 (2011).
5. Morscio, J., Dierickx, D. & Tousseyn, T. Molecular pathogenesis of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorder: What do we know so far? *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, (2013).
6. Tafalla, C. & Granja, A. G. Novel insights on the regulation of B cell functionality by members of the tumor necrosis factor superfamily in jawed fish. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
7. Yang, M., Hase, H., Legarda-Addison, D., Varughese, L., Seed, B. & Ting, A. T. B Cell Maturation Antigen, the Receptor for a Proliferation-Inducing Ligand and B Cell-Activating Factor of the TNF Family, Induces Antigen Presentation in B Cells. *J. Immunol.* **175**, 2814–2824 (2005).
8. Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., Kastelein, R., Moore, K. W. & Banchereau, J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1890–1893 (1992).
9. Figgett, W. A., Vincent, F. B., Saulep-Easton, D. & Mackay, F. Roles of ligands from the TNF superfamily in B cell development, function, and regulation. *Semin. Immunol.* **26**, 191–202 (2014).
10. Vazquez, M. I., Catalan-Dibene, J. & Zlotnik, A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* **74**, 318–326 (2015).
11. Grütz, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 3–15 (2005).
12. Hofmann, C., Dunger, N., Doser, K., Lippert, E., Siller, S., Edinger, M., Falk, W. & Obermeier, F. Physiologic TLR9-CpG-DNA interaction is essential for the homeostasis of the intestinal immune system. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 136–143 (2014).

13. He, B., Raab-Traub, N., Casali, P. & Cerutti, A. EBV-Encoded Latent Membrane Protein 1 Cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to Induce T Cell-Independent Ig Heavy Chain Class Switching. *J. Immunol.* **171**, 5215–5224 (2003).
14. Xu, H., Dong, P., He, X., Ma, X., Xue, D., Zhang, Y. & Zhang, X. B-cell-activating factor code and human cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Microbiol. Immunol.* **58**, 439–448 (2014).
15. Konforte, D., Simard, N. & Paige, C. J. IL-21: An Executor of B Cell Fate. *J. Immunol.* **182**, 1781–1787 (2009).
16. Wang, X. Z., Wan, Z., Xue, W. J., Zheng, J., Li, Y. & Ding, C. G. B-cell activating factor predicts acute rejection risk in kidney transplant recipients: A 6-month follow-up study. *Front. Immunol.* **10**, 1–9 (2019).
17. Chu, V. T., Enghard, P., Riemekasten, G. & Berek, C. In Vitro and In Vivo Activation Induces BAFF and APRIL Expression in B Cells. *J. Immunol.* **179**, 5947–5957 (2007).
18. Wurster, A. L., Rodgers, V. L., White, M. F., Rothstein, T. L. & Grusby, M. J. Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* **277**, 27169–27175 (2002).
19. Maeda, K., Mehta, H., Drevets, D. A. & Coggeshall, K. M. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood* **115**, 4699–4706 (2010).
20. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
21. Andrei, G., Trompet, E. & Snoeck, R. Novel Therapeutics for Epstein – Barr Virus. *Molecules* **24**, (2019).
22. Thorley-Lawson, D. A. & Gross, A. Persistence of the Epstein-Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1328–1337 (2004).
23. Nijland, M. L., Kersten, M. J., Pals, S. T., Bemelman, F. J. & Ten Berge, I. J. M. Epstein-Barr Virus-Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplant. direct* **2**, e48 (2015).
24. Andrei, G., Trompet, E. & Snoeck, R. Novel therapeutics for Epstein–Barr virus. *Molecules* vol. 24 (2019).
25. Dugan, J. P., Coleman, C. B. & Haverkos, B. Opportunities to target the life cycle of Epstein-

- Barr Virus (EBV) in EBV-associated lymphoproliferative disorders. *Front. Oncol.* **9**, 1–10 (2019).
26. Trappe, R., Oertel, S. & Riess, H. Pathogenic, Clinical, Diagnostic and Therapeutic Aspects of Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders. *Dtsch. Arztebl. Int.* **48**, (2006).
 27. Buschle, A. & Hammerschmidt, W. Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Semin. Immunopathol.* **42**, 131–142 (2020).
 28. LIEBOWITZ, D. Epstein – Barr Virus and a Cellul Ar Signaling Pathway in Lymphomas From Immunosuppressed Patients Epstein – Barr Virus and a Cellular Signaling Pathway in Lymphomas From Imfile:///D:/Karolinska/SU Herpes study/Articles/Articles used for B-cell paper/Arti. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1413–1421 (1998).
 29. Fitzsimmons, L. & Kelly, G. L. EBV and apoptosis: The viral master regulator of cell fate? *Viruses* **9**, 1–34 (2017).
 30. Jochum, S., Moosmann, A., Lang, S., Hammerschmidt, W. & Zeidler, R. The EBV immunoevasins vIL-10 and BNLF2a protect newly infected B cells from immune recognition and elimination. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
 31. Nikiforow, S., Bottomly, K. & Miller, G. CD4+ T-Cell Effectors Inhibit Epstein-Barr Virus-Induced B-Cell Proliferation. *J. Virol.* **75**, 3740–3752 (2001).
 32. Dierickx, D. & Habermann, T. M. Post-transplantation lymphoproliferative disorders in adults. *N. Engl. J. Med.* **378**, 549–562 (2018).
 33. Cheung, C. Y., Ma, M. K. M., Chau, K. F., Chak, W. L. & Tang, S. C. W. Posttransplant lymphoproliferative disorders in kidney transplant recipients: A retrospective cohort analysis over two decades in Hong Kong. *Oncotarget* **8**, 96903–96912 (2017).
 34. Végső, G., Hajdu, M. & Sebestyén, A. Lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation- classification, incidence, risk factors, early detection and treatment options. *Pathol. Oncol. Res.* **17**, 443–454 (2011).
 35. Végso, G., Hajdu, M. & Sebestyén, A. Lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation-classification, incidence, risk factors, early detection and treatment options. *Pathol. Oncol. Res.* **17**, 443–454 (2011).
 36. Thomusch, O., Wiesener, M., Opgenoorth, M., Pascher, A., Woitas, R. P., Witzke, O., Jaenigen, B., Rentsch, M., Wolters, H., Rath, T., Cingöz, T., Benck, U., Banas, B. & Hugo, C. Rabbit-ATG or basiliximab induction for rapid steroid withdrawal after renal transplantation (Harmony): an open-label, multicentre, randomised controlled trial.

- Lancet* **388**, 3006–3016 (2016).
37. Blazquez-Navarro, A., Dang-Heine, C., Wittenbrink, N., Bauer, C., Wolk, K., Sabat, R., Westhoff, T. H., Sawitzki, B., Reinke, P., Thomusch, O., Hugo, C., Or-Guil, M. & Babel, N. BKV, CMV, and EBV Interactions and their Effect on Graft Function One Year Post-Renal Transplantation: Results from a Large Multi-Centre Study. *EBioMedicine* **34**, 113–121 (2018).
 38. Bajda, S., Blazquez-Navarro, A., Samans, B., Wehler, P., Kaliszczyk, S., Amini, L., Schmueck-Henneresse, M., Witzke, O., Dittmer, U., Westhoff, T. H., Viebahn, R., Reinke, P., Thomusch, O., Hugo, C., Olek, S., Roch, T. & Babel, N. The role of soluble mediators in the clinical course of EBV infection and B cell homeostasis after kidney transplantation. *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).
 39. Garibyan, L. & Avashia, N. Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1–4 (2013).
 40. Luttmann, W., Bratke, K., Krüpper, M. & Myrtek, D. *Der Experimentator Immunologie*. (2009).
 41. Herberger, S. Entwicklung einer hochauflösenden quantitativen Einzelzell-RT-PCR Methode im Echtzeitverfahren in akuten Hirnschnitten der Ratte. (2014).
 42. Vignali, D. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J. Immunol. Methods* **243**, 243–255 (2000).
 43. Baron, U., Werner, J., Schildknecht, K., Schulze, J. J., Mulu, A., Liebert, U.-G., Sack, U., Speckmann, C., Gossen, M., Wong, R. J., Stevenson, D. K., Babel, N., Schürmann, D., Baldinger, T., Bacchetta, R., Grützkau, A., Borte, S. & Olek, S. Epigenetic immune cell counting in human blood samples for immunodiagnostics. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaan3508 (2018).
 44. Wieczorek, G., Asemissen, A., Model, F., Turbachova, I., Floess, S., Liebenberg, V., Baron, U., Stauch, D., Kotsch, K., Pratschke, J., Hamann, A., Loddenkemper, C., Stein, H., Volk, H.D., Hoffmüller, U., Grützkau, A., Mustea, A., Huehn, J., Scheibenbogen, C., Olek, S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res.* **69**, 599–608 (2009).
 45. Amini, L., Vollmer, T., Wendering, D. J., Jurisch, A., Volk, H., Reinke, P. & Schmueck-henneresse, M. Comprehensive Characterization of a Next-Generation Antiviral T-Cell Product and Feasibility for Application in Immunosuppressed Transplant Patients. **10**, (2019).

46. Jennrich, R. I. An Asymptotic χ^2 Test for the Equality of Two Correlation Matrices. *J. Am. Stat. Assoc.* **65**, 904–912 (1970).
47. *Developing a Protocol for Observational Comparative Effectiveness Research: A User's Guide.* (2013).
48. Bender, R. & Lange, S. Adjusting for multiple testing - when and how? *J. Clin. Epidemiol.* **54**, 343–349 (2001).
49. Li, G., Taljaard, M., Van den Heuvel, E. R., Levine, M. A., Cook, D. J., Wells, G. A., Devereaux, P. J. & Thabane, L. An introduction to multiplicity issues in clinical trials: the what, why, when and how. *Int. J. Epidemiol.* **46**, 746–755 (2017).
50. Epeldegui, M., Magpantay, L., Guo, Y., Halec, G., Cumberland, W. G., Yen, P. K., Macatangay, B., Margolick, J. B., Rositch, A. F., Wolinsky, S., Martinez-Maza, O. & Hussain, S. K. A prospective study of serum microbial translocation biomarkers and risk of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *AIDS* **32**, 945–954 (2018).
51. Engels, E. A., Jennings, L. W., Everly, M. J., Landgren, O., Murata, K., Yanik, E. L., Pfeiffer, R. M., Onaca, N. & Klintmalm, G. B. Donor-specific antibodies, immunoglobulin-free light chains, and BAFF levels in relation to risk of late-onset PTLD in liver recipients. *Transplant. Direct* **4**, 1–5 (2018).
52. Vincent, F. B., Saulep-Easton, D., Figgett, W. A., Fairfax, K. A. & Mackay, F. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**, 203–215 (2013).
53. Serafini, B., Severa, M., Columba-Cabezas, S., Rosicarelli, B., Veroni, C., Chiappetta, G., Magliozzi, R., Reynolds, R., Coccia, E. M. & Aloisi, F. Epstein-barr virus latent infection and baff expression in B cells in the multiple sclerosis brain: Implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 677–693 (2010).
54. Bartee, E. & McFadden, G. Cytokine Synergy: an underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. *Cytokine* **63**, 237–240 (2013).
55. Wu, Y., Garmire, L. X. & Fan, R. Inter-cellular signaling network reveals a mechanistic transition in tumor microenvironment. *Integr Biol* **4**, (2012).
56. Schwartzbaum, J., Seweryn, M., Holloman, C., Harris, R., Handelman, S. K., Rempala, G. A., Huang, R. P., Burkholder, B., Brandemihl, A., Kallberg, H., Johannesen, T. B., Ahlbom, A., Feychting, M. & Grimsrud, T. K. Association between prediagnostic allergy-related serum cytokines and glioma. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).

57. Gärtner, B. C., Schäfer, H., Marggraff, K., Eisele, G., Schäfer, M., Dilloo, D., Roemer, K., Laws, H. J., Sester, M., Sester, U., Einsele, H. & Mueller-Lantzsch, N. Erratum: Evaluation of use of Epstein-Barr viral load in patients after allogeneic stem cell transplantation to diagnose and monitor posttransplant lymphoproliferative disease (Journal of Clinical Microbiology (2002) 40:2 (351-358)). *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2316 (2002).

7 Detaillierte Aufstellung der selbst erbrachten Leistungen

Sharon Susanna Bajda (SB) hatte folgenden Anteil an der aufgeführten Publikation:

Bajda, S., Blazquez-Navarro, A., Samans, B., Wehler, P., Kaliszczyk, S., Amini, L., Schmueck-Henneresse, M., Witzke, O., Dittmer, U., Westhoff, T.H., Viebahn, R., Reinke, P., Thomusch, O., Hugo, C., Olek, S., Roch, T., Babel, N.: The role of soluble mediators in the clinical course of EBV infection and B cell homeostasis after kidney transplantation. *Sci. Rep.* 10, 1–13 (2020)

SB hatte zusammen mit zwei weiteren Ko-Autor*innen einen großen Einfluss auf die Konzeptualisierung sowie das Design der Studie, entwickelte die Fragestellungen und formulierte selbstständig die Hypothesen.

Auf Grundlage der vorhandenen Proben- bzw. Patient*innendatenbank erfolgte die Selektion der Proben laut des Studiendesigns durch SB in Rücksprache mit einem weiteren Ko-Autor.

Unter der Anleitung des Laborpersonals etablierte SB die präanalytischen Schritte und führte selbstständig die Probenvorbereitung durch. SB war alleine zuständig für die Durchführung der Legendplex™. Sie analysierte die Proben, wertete diese aus und dokumentierte anschließend die Ergebnisse.

Die Analyse der B-Zellen mittels epigenetischer Quantifizierung erfolgte durch die Firma Epimune, die ein Patent auf diese Technologie besitzt.

Die Umwandlung aller experimentellen Rohdaten wurde durch SB vorgenommen.

SB hat maßgeblich die Auswertungen und statistischen Analysen der Studie durchgeführt, wobei im Rahmen fachlicher Diskussionen die Expertise eines Bioinformatikers eingeflossen ist.

SB führte umfangreiche Literaturrecherchen durch, wobei einige Vorschläge seitens der anderen Ko-Autor*innen erfolgten.

Alle Abbildungen (1-11) im Manteltext und Figure 1 in der Publikation sind selbstständig durch SB erstellt worden. Die Abbildungen (Figures 2-7 und Supplementary Material Figures S1-S3 und Table S1) in der Publikation wurden hauptsächlich von SB unter Beteiligung eines weiteren Ko-Autors angefertigt.

Außerdem hat SB den ersten Entwurf für das Publikationsmanuskript geschrieben (Zusammenfassung, Einleitung, Material und Methoden, Ergebnisse und Diskussion), daraufhin Anregungen der Ko-Autor*innen eingearbeitet und das Manuskript bis zur Endfassung modifiziert, sodass schließlich alle Autor*innen diese endgültige Version zur Einreichung genehmigt haben. Des Weiteren hat SB im Prozess des Peer-reviews die Gutachter*innenfragen selbstständig beantwortet und das Antwortschreiben verfasst.

Zwischenergebnisse der Studie wurden von SB auf der 19. ESOT Konferenz (European Society for Organ Transplantation) in Kopenhagen vom 15.-18. September 2019 in Form eines selbsterstellten Posters vorgestellt.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sharon Susanna Babel geb. Bajda, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Einfluss löslicher Mediatoren auf die B-Zell-Homöostase und die Entwicklung von EBV-assoziierten Lymphoproliferationen in nierentransplantierten Patient*innen // Influence of soluble mediators on B cell homeostasis and the development of EBV-associated lymphoproliferation in kidney transplant patients“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9 Journal Summary List

Auszug aus dem Journal Impact Factor und Eigenfactor Score aus den Journal Citation Reports 2018

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI

Selected Categories: **"MULTIDISCIPLINARY SCIENCES"** Selected Category

Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 69 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	745,692	43.070	1.285010
2	SCIENCE	680,994	41.037	1.070190
3	National Science Review	1,842	13.222	0.006500
4	Science Advances	21,901	12.804	0.110010
5	Nature Communications	243,793	11.878	1.103290
6	Nature Human Behaviour	1,230	10.575	0.006550
7	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	661,118	9.580	1.022190
8	Science Bulletin	3,569	6.277	0.009840
9	Scientific Data	3,240	5.929	0.015610
10	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	1,994	5.122	0.006540
11	Journal of Advanced Research	2,691	5.045	0.004780
12	Research Synthesis Methods	1,932	5.043	0.005420
13	GigaScience	2,674	4.688	0.012510
14	Annals of the New York Academy of Sciences	46,385	4.295	0.025840
15	Scientific Reports	302,086	4.011	1.061540
16	Journal of the Royal Society Interface	12,933	3.224	0.029190
17	NPJ Microgravity	203	3.111	0.000670



OPEN

The role of soluble mediators in the clinical course of EBV infection and B cell homeostasis after kidney transplantation

Sharon Bajda¹, Arturo Blazquez-Navarro^{1,2,3}, Björn Samans⁴, Patrizia Wehler^{1,3}, Sviatlana Kaliszczyk^{1,3}, Leila Amini^{1,6}, Michael Schmueck-Henneresse^{1,6}, Oliver Witzke⁷, Ulf Dittmer⁷, Timm H. Westhoff³, Richard Viebahn⁵, Petra Reinke^{1,6}, Oliver Thomusch⁸, Christian Hugo⁹, Sven Olek⁴, Toralf Roch^{1,3} & Nina Babel^{1,3}✉

Epstein-Barr virus (EBV) reactivation can lead to serious complications in kidney transplant patients, including post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). Here, we have assessed the impact of EBV on B cell homeostasis at cellular and humoral level. In a multicenter study monitoring 540 kidney transplant patients during the first post-transplant year, EBV reactivation was detected in 109 patients. Thirteen soluble factors and B cell counts were analyzed in an EBV⁺ sub-cohort (N = 54) before, at peak and after EBV clearance and compared to a control group (N = 50). The B cell activating factor (BAFF) was significantly elevated among EBV⁺ patients. No additional soluble factors were associated with EBV. Importantly, in vitro experiments confirmed the proliferative effect of BAFF on EBV-infected B cells, simultaneously promoting EBV production. In contrast, elevated levels of BAFF in EBV⁺ patients did not lead to B cell expansion in vivo. Moreover, diminished positive inter-correlations of soluble factors and alterations of the bi-directional interplay between B cell and soluble factors were observed in EBV⁺ patients at peak and after clearance. Our data suggest that such alterations may counteract the proliferative effect of BAFF, preventing B cell expansion. The role of these alterations in lymphoma development should be analyzed in future studies.

Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) are a potentially fatal malignancy and one of the most severe complications after transplantation^{1,2}. While it comprises a highly heterogeneous range of manifestations including asymptomatic, spontaneously regressing B cell expansion, most PTLD occur as lethal, fulminant lymphomas^{1,2}. The majority of PTLD cases are driven by an infectious agent, the Epstein-Barr virus (EBV)^{1,3}.

EBV is a nearly ubiquitous γ -1 herpesvirus, infecting approximately 90% of the healthy population³⁻⁵. EBV primary infection commonly occurs in early childhood and targets B cells, establishing latency in the host memory B cells^{3,6-8}. The use of immunosuppression can disrupt the delicate balance between immune system and latent virus control, causing a 50-fold increase of EBV-infected B cells in peripheral blood^{9,10}. As a consequence, EBV reactivation is a common occurrence after solid organ transplantation^{11,12}.

In renal transplantation, about 20% of the patients develop EBV viremia during the first post-transplantation year. Seronegative patients and/or patients under immunosuppressive treatment with antithymocyte globuline are especially prone^{11,12}. On the other hand, EBV-associated PTLD occurs in only 0.5–2.0% of kidney transplantation

¹Berlin Institute of Health Center for Regenerative Therapies (BCRT): Berlin-Brandenburg Center für Regenerative Therapies, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ²Systems Immunology Lab, Department of Biology, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany. ³Medical Department I, Center for Translational Medicine, Marien Hospital Herne, University Hospital of the Ruhr-University Bochum, Herne, Germany. ⁴Ivana Türbachova Laboratory for Epigenetics, Epiontis GmbH, Precision for Medicine Group, Berlin, Germany. ⁵Chirurgical University Hospital, University Hospital Knappschaftskrankenhaus Bochum, University Hospital of the Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany. ⁶Berlin Center for Advanced Therapies (BeCAT), Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ⁷Department of Infectious Diseases, Institute for Virology, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany. ⁸Department of General Surgery, University Hospital Freiburg, Freiburg, Germany. ⁹Medical Clinic 3 – Nephrology Unit, University Hospital Carl Gustav Carus, Dresden, Germany. ✉email: nina.babel@charite.de

Variable	Control group (N = 50)	EBV* group (N = 54)	P value
Female gender	13 (26.0%)	15 (27.8%)	1.000
Age (years)	56 (44–62)	55 (49–63)	0.530
Donor age (years)	54 (43–61)	54 (48–62)	0.574
Body mass index (kg/m ²)	25.2 (22.8–28.8)	24.8 (22.7–29.8)	0.925
Baseline white blood cell count (10 ⁹ cells/L)	7.4 (6.2–8.9)	6.7 (5.6–9.0)	0.265
Baseline C reactive protein (mg/L)	2.8 (0.5–5.5)	1.6 (0.5–3.0)	0.298
Negative EBV serostatus pre-transplant ^a	3 (10.3%)	1 (3.6%)	0.611
Therapy arm	Arm A (basiliximab + tacrolimus + MMF + steroids)	14 (28.0%)	15 (27.8%)
	Arm B (basiliximab + tacrolimus + MMF + rapid steroid withdrawal)	9 (18.0%)	10 (18.5%)
	Arm C (rabbit ATG + tacrolimus + MMF + rapid steroid withdrawal)	27 (54.0%)	29 (53.7%)
Anti-cytomegalovirus prophylaxis	27 (54.0%)	32 (59.3%)	0.732
Acute rejection incidence	7 (14.0%)	8 (14.8%)	1.000
Cytomegalovirus reactivation incidence	9 (18.0%)	13 (24.1%)	0.605
Glomerular filtration rate 2 weeks post-transplantation (mL/min/1.73 m ²)	31.3 (17.8–43.7)	29.4 (15.9–47.9)	0.896
Glomerular filtration rate 1 year post-transplantation (mL/min/1.73 m ²)	46.9 (35.6–64.5)	47.5 (33.3–58.9)	0.419
Screening time points (post-transplantation days)	Before	15 (1–56)	13 (1–54)
	Peak	31 (25–92)	30 (20–91)
	After	62 (55–247)	70 (58–250)

Table 1. Summary of the patient sub-cohorts characteristics. Details on the demographic and treatment characteristics employed for patient matching are given, as well as the transplantation outcomes. Additionally, details on the measurement schema of the present study are provided. Data are given in number (percentage) or median (IQR). P value is calculated employing Pearson's chi-square test for binary variables and the Mann-Whitney test for continuous variables. ^aEBV serostatus was available for 54.8% of cases.

patients^{1,2}. This discrepancy can be partially explained by the degree of severity of the EBV reactivation, with higher viral loads being associated with an increased risk of the disease^{1,13,14}. However, the factors determining why certain EBV reactivations cause PTLD while others remain asymptomatic still remain elusive^{1,15}.

In this study, we have assessed the impact of EBV reactivation on B cell homeostasis at the cellular and humoral level in a cohort of patients during the first year after renal transplantation. Thus, we investigated the effect of reactivation on the kinetics of three soluble factors associated with PTLD development: interleukin (IL)-6, IL-10 and the tumor necrosis factor (TNF α)^{15–18}. Furthermore, additional soluble factors with a known role in B cell differentiation, proliferation, activation and class switch recombination or somatic hypermutation were analyzed, including IL-4, IL-5, IL-21, a proliferation-inducing ligand (APRIL) and the B cell activating factor (BAFF)^{19–21}. The expression levels of these factors were correlated with the counts of circulating B cells, determined by epigenetic B cell counting, which provides robust cell quantification even in peripheral blood samples stored for a longer time period²².

Here, we provide evidence of profound changes in the interrelations between the humoral and the cellular levels among patients with EBV reactivation. We hypothesize that these changes could potentially explain the lack of B cell expansion and PTLD development.

Material and methods

Patient population. As published before, the viral monitoring was a sub-study on the cohort of the multicenter, open-label, randomized and controlled Harmony trial (NCT 00724022)^{12,23}. The study was carried out in compliance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice. All participants provided written informed consent prior to inclusion into the study. The trial was approved by the Ethics Committee of Gustav Carus Technical University Dresden.

According to study design, induction therapy included either basiliximab or antithymocyte globuline (ATG). The maintenance immunosuppression was tacrolimus (Advagraf, Astellas) and mycophenolate mofetil (MMF)-based + /– corticosteroids²³.

A total of 540 patients were monitored for EBV viral load, as well as cytomegalovirus and BK virus, along eight pre-defined visits during the first post-transplantation year; 3715 blood samples were analysed¹². Monitoring was centrally performed¹². The detection limit was 250 copies/mL¹².

Study design. The patient sub-cohorts were defined according to their peak of EBV viral load. All patients with at least one positive measurement for EBV viral load and available blood and serum samples at three time points (before viremia onset, at peak and after clearing) were recruited into the study and assigned into the EBV*

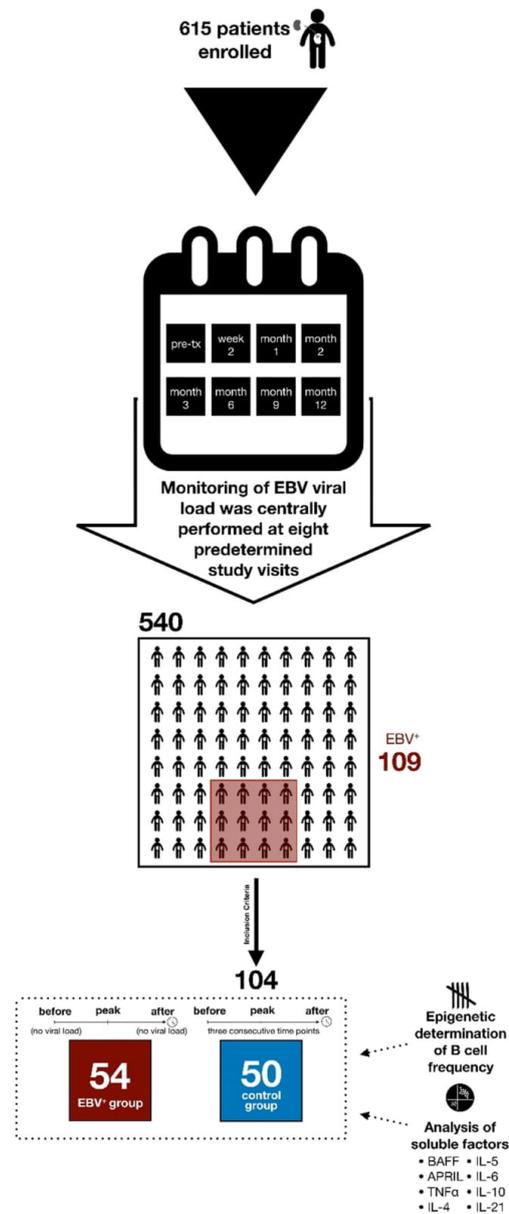


Figure 1. Trial profile. The diagram summarizes the viral monitoring performed in the Harmony cohort, the composition of the current cohort and the performed measurements.

group. The control group was randomly selected among the patients with no detectable EBV viral load. The patients of both groups were matched according to demographic characteristics (sex, age of donor and recipient, body mass index and baseline blood cell count as well as C reactive protein concentration), therapy (therapy

arm and anti-cytomegalovirus prophylaxis) and screening time points (see Table 1). Peripheral blood of EBV⁺ patients and the control group were analyzed at three time points for B cell frequency and concentration of the following soluble factors: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21, TNF α , APRIL and BAFF (see Fig. 1).

The time points of sampling were defined according to the course of EBV infection: EBV⁺ patients were analyzed before reactivation (“before”), at peak (“peak”) and after clearance (“after”). Accordingly, the time points before and after reactivation had no detectable viral loads. For patients with multiple EBV⁺ samples, “peak” was defined as the sample with highest viral load; the “before” and “after” samples were selected considering all EBV⁺ samples. Therefore, “before” samples corresponded to samples before the first EBV positive sample and “after” samples were samples after the last EBV positive sample. For the control group, the time points were matched according to the time points of EBV⁺ patients. For reasons of comprehensibility, the terms for these three consecutive time points will be also “before”, “peak” and “after”.

Screening of EBV viremia. As previously described by our group^{12,24} the EBV viral load was determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using the Prism 7500 Real Time Per System (ABI). PCR amplification were set up in a reaction volume of 25 μ L using primer and probe at final concentrations of 900 nM and 5 μ M. DNA was isolated from whole blood samples using the QIAamp DNA Mini Kit and according manufacturer’s instructions (Qiagen Corp, Hilden, Germany).

Epigenetic determination of B cell frequency. Due to the limited sample material availability, quantification of B cells could not be performed by conventional flow cytometry methods. Therefore, B cell frequency was determined based on the epigenetic quantification demonstrating a high correlation level with flow cytometry data as previously described by Baron et al.²² Briefly, frozen blood samples were thawed and lysed by addition of AL buffer and protease (QIAamp DNA MiniKit, Qiagen) at 56 °C for 1 h. After lysis, absolute ethanol was added to the lysate followed by washing and elution steps according to the manufacturer’s instructions. For bisulfite conversion and purification, genomic DNA was converted for 45 min at 80 °C in the presence of ammonium bisulfite and tetrahydrofuryl alcohol. Converted DNA was purified by magnetic beads (Mag-Bind Blood & Tissue DNA HDQ 96 Kit) and both customized and adapted buffers.

For epigenetic qPCR, following conditions were applied: Thermal cycling 1 \times 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles 95 °C for 15 s, and 61 °C for 1 min in 10 μ L-reactions using the Roche LightCycler 480 Probes Master.

Analysis of soluble factors. Analysis of soluble factors was performed as previously described by Stervbo et al.²⁵ Briefly, soluble mediators including human IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21, TNF α , BAFF, and APRIL were assessed using the LEGENDplex custom panel (BioLegend, San Diego, CA, USA). The samples were processed following the manufacturer’s instructions. In short, 1:2 diluted serum samples were mixed with assay beads in a V-bottom microtiter plate and incubated overnight. After washing and centrifugation, biotinylated detection antibodies were added following incubation for 1 h at 600 rpm on a plate shaker at room temperature. Streptavidin-PE detection antibodies were added and incubated for 30 min at 600 rpm at room temperature. After final washing, samples were measured. Quantification of the Streptavidin-PE signal fluorescence intensity was done using a flow cytometer (CytoFlex S, Beckman Coulter, Germany). From the resulting fcs-files, the analyte concentration was extracted using LEGENDplex Data Analysis Software.

Generation of lymphoblastic cell lines, quantification of B cells and EBV load under BAFF treatment. Lymphoblastic cell lines (LCL) have been generated from PBMC donated by kidney transplant patients as previously described²⁶. In brief, PBMC were treated with B95-8 EBV containing viral supernatants in the presence of CpG OND2006 (2.5 μ g/ml) and cyclosporine A (1 mg/ml). To study the effect of BAFF on the LCL, 5×10^5 cells were cultured in a 96 well flat bottom plate and treated with BAFF (1 ng/ml, 10 ng/ml and 100 ng/ml) in presence or absence of mycophenolic acid (MPA) (2.5 μ g/ml) and tacrolimus (Tac) (6 ng/ml). The drug concentrations in cell culture corresponded to the therapeutic trough level. Cell counts of live LCL were determined by flow cytometry (Cytotflex LX, Beckman Coulter). The viral load was determined in pools of the cell lysate and the cell culture supernatants using real time PCR as described in previous paragraph.

Statistical analysis. Differences between groups for categorical variables were calculated using Pearson’s chi-square test with continuity correction. Differences in quantitative variables between groups are analysed using the two-tailed Mann-Whitney U test; the expansion of B cells was tested employing the two-tailed Wilcoxon signed-rank test with $\mu = 0$. Correlation size and significance were calculated using Spearman’s correlation coefficient. The equality between two correlation matrices was tested employing the Jennrich test²⁷. The effects of BAFF on in vitro viral replication and B cell expansion were evaluated univariately through the Wilcoxon signed-rank test and multivariately through linear regression, controlling for the effect of immunosuppression and patient-specific effects. Normalized LCL B cell count was calculated for each patient dividing the B cell counts for every condition by the B cell count for untreated (no BAFF and no immunosuppression) cells. Real time data on EBV load were calculated as the inverse of the real time PCR threshold, normalized using the untreated condition (No BAFF, no immunosuppression) as control. In all cases, P values below 0.050 were considered significant. P values were not corrected for multiple testing, as this study was of exploratory nature^{28–30}.

Categorical variables are summarised as numbers and frequencies; quantitative variables are reported as median and interquartile range (IQR). Box plots depict the median, first and third quartile of a variable; the maximum length of the whiskers corresponds to 1.5 times the IQR.

Results

Characteristics of the patient cohort. We analyzed the EBV viral load in a total of 3715 blood samples collected from 540 patients during the first post-transplantation year¹². As described before, EBV viral load was detected in 109 (20.2%) patients; 37 (6.9%) patients suffered from elevated viral load (>2000 copies/mL) while high-level viremia (>10,000 copies/mL) was observed in 11 patients (2.0%)¹².

104 patients (54 EBV⁺ patients) of the original cohort were analyzed in-depth in this work. 18 patients (33.3%) had detectable viral load for more than one visit; only two patients (3.7%) had a prolonged viremia during more than two visits. There was only one case of severe EBV⁺ PTLD with a peak viral load of 12,271 copies/mL in the cohort¹². Unfortunately, this PTLD patient withdrew his informed consent for the study participation and could not therefore be included into the EBV⁺ sub-cohort for the present work. Details on the demographic characteristics, employed treatment, transplantation outcomes and screening schema of the groups are summarized in Table 1. Importantly, there were no significant differences between the two sub-cohorts for any of these characteristics.

BAFF was significantly associated with EBV reactivation. In previous studies, we and others observed an association of IL-6, IL-10 and TNF α expression with EBV-associated PTLD^{15–18}. Therefore, we analyzed whether these factors, as well as other B cell homeostasis associated soluble factors, can predict or contribute to the EBV reactivation. Additionally, we analyzed whether EBV reactivation itself can lead to changes in the soluble factor expression pattern. In total, 312 samples from 104 patients were measured for B cell frequency and IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21, TNF α , APRIL and BAFF concentration (Fig. 2).

We observed a significant association between EBV positivity and increased levels of BAFF in serum. As shown in Fig. 3a–c, a significant association of EBV reactivation was found both before [784 (355–1482) vs. 433 (173–1053) pg/ml; $P=0.016$] and after reactivation [836 (478–2094) vs. 480 (253–1100) pg/ml; $P=0.006$], while at peak only a borderline significant difference was observed [694 (432–1393) vs. 416 (222–1045) pg/ml; $P=0.080$]. Remarkably, we did not find any correlation between peak EBV load and BAFF levels (Fig. 3d–f).

None of the other measured soluble factors demonstrated a significant association with EBV reactivation, nor a correlation with peak viral load (Fig. 2).

In vitro BAFF treatment of EBV infected B cells facilitates their expansion and viral replication. To better understand the association of EBV with increased BAFF concentrations, we analyzed the in vitro effects of BAFF on lymphoblastoid cell lines (LCL) generated from kidney transplant patients by infecting their B cells with EBV. Upon generation of stable LCL from four patients, the cell lines were cultured with increasing concentrations of BAFF in the presence or absence of the immunosuppressive drugs MPA and tacrolimus.

To analyze the impact of BAFF on B-cell proliferation and EBV replication, flow cytometry analysis and quantitative EBV-specific real-time PCR were performed, respectively. Our data demonstrate higher EBV load in LCL treated by BAFF compared to untreated controls (Fig. 4a). The observed difference was significant (0.13 ± 0.06 , $P=0.041$; see Table S1), as tested employing multi-parameter regression analysis. Likewise, although not significant in univariate comparison (Fig. 4b), BAFF treatment was significantly associated with increased numbers of LCL, compared to untreated cells as demonstrated by multi-parameter regression controlling for confounders (0.36 ± 0.14 , $P=0.017$; Table S1). However a dose dependent effect of BAFF could not be observed.

EBV reactivation and BAFF expression did not lead to B cell expansion. As BAFF was shown to be associated with increased viral replication and B cell proliferation in vitro, we wondered whether we observed a similar effect of EBV reactivation on the levels of peripheral B cells among EBV⁺ patients. The peripheral B cell was quantified by epigenetic cell counting, which shows a high correlation with frequently used flow cytometry determination of $\rho=0.96–0.98$ ²². Surprisingly, no significant difference in B cell frequency was observed between the patients with EBV reactivation and the control group, at any of the three time points (see Fig. 5a–c). Likewise, no correlation between kinetics of EBV loads and B cell count kinetics was found within the EBV⁺ group (Fig. 5d–f). There was no significant B cell expansion among EBV⁺ patients neither at peak ($P=0.739$) nor after reactivation ($P=0.543$), compared with the time point before reactivation. Furthermore, no significant difference in the B cell kinetics was observed between the EBV⁺ patients and the control group (see Figure S1).

EBV reactivation was significantly associated with an altered state of the immune system. Since no B cell expansion was observed despite increased BAFF level in EBV⁺ patients, we hypothesized that other soluble factors or soluble factor patterns might counteract the proliferative effect of BAFF. Therefore, we analyzed the effects of EBV reactivation in the inter-correlations of the measured factors. Figure 6a,b shows the correlation matrix for the two sub-cohorts, while Fig. 7 depicts the difference between the correlation matrices. Supplementary Figure S2 shows only the significant correlations ($P<0.050$) for the two sub-cohorts.

Patients in the EBV⁺ group showed remarkable differences in their correlations matrix compared with the control group. The difference between the two correlation matrices was highly significant ($P<0.001$). In detail, EBV reactivation was associated with a general weakening of the correlations between soluble factors: While the measured interleukins and TNF α were positively correlated with each other at almost all time points (90.8%) in the control group, the ratio of positive correlations in the EBV⁺ group was substantially lower (66.0%).

These differences also affected the interplay between soluble factors and B cells. Thus, IL-5 and IL-21 were positively correlated with B cell in the EBV⁺ group, whereas a mixture of positive and negative correlations were observed in the control group. Interestingly, in the case of BAFF the correlation with B cell frequency was

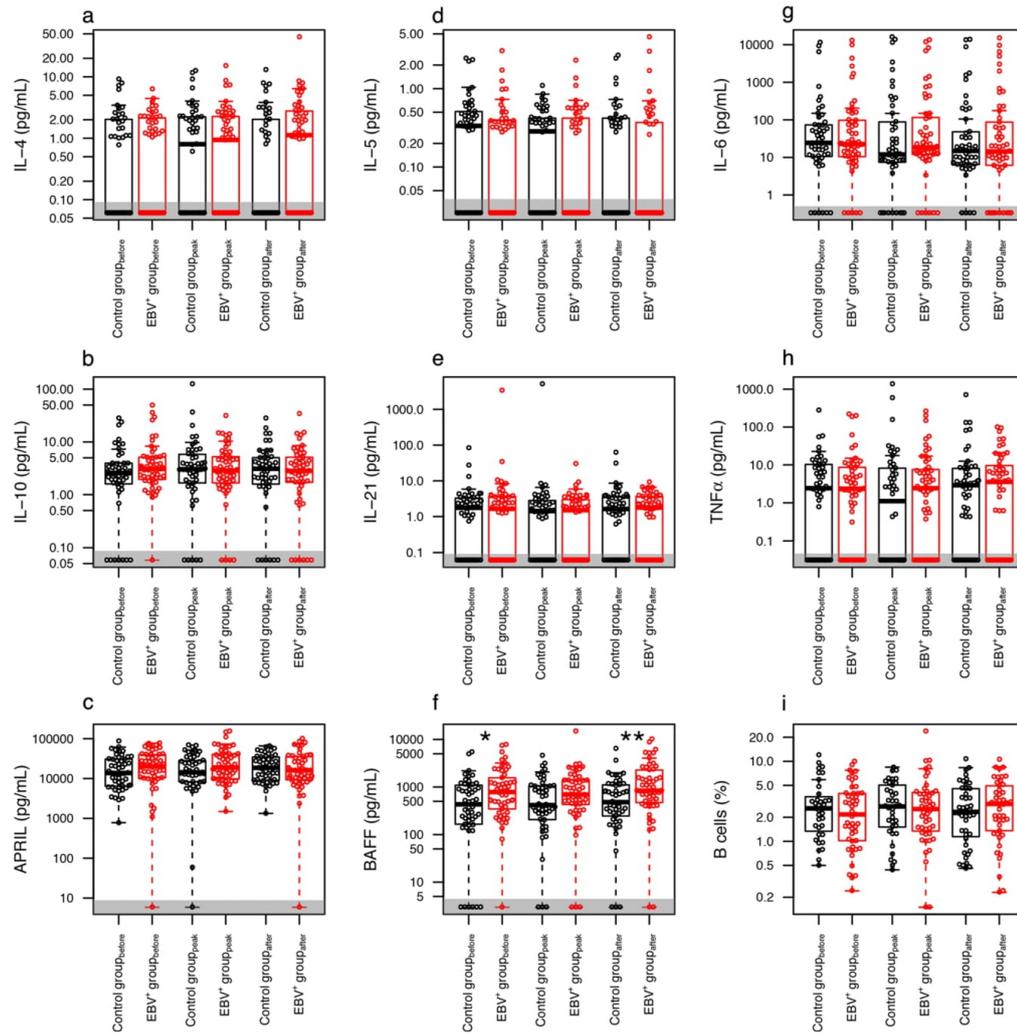


Figure 2. Concentration of the soluble mediators and B cell frequencies at the three time points. Patients in the control group are depicted in black, EBV⁺ patients in red. Significant differences ($P < 0.050$) between the sub-cohorts are indicated with one asterisk, highly significant differences ($P < 0.010$), with two asterisks. Note that the y-axis is in logarithmic scale. For the sake of convenience, measurements below detection limit are depicted with an arbitrarily defined low value within the area shaded in gray; for the calculation of significance these measurements were considered to have a value of 0.

negative among EBV⁺ patients, but this was not the case for the control group. As a result, as seen in Fig. 7, the correlation coefficients for the EBV⁺ group were lower than for the control.

To determine whether the altered state of immune system could possibly be a consequence rather than a cause of EBV reactivation, we further analyzed the time dependence of this altered state (see Figure S3). Remarkably, no significant difference could be observed between the sub-cohorts before EBV reactivation ($P = 0.257$). A significant difference was observed already at peak ($P = 0.010$); this difference was even larger after reactivation ($P < 0.001$).

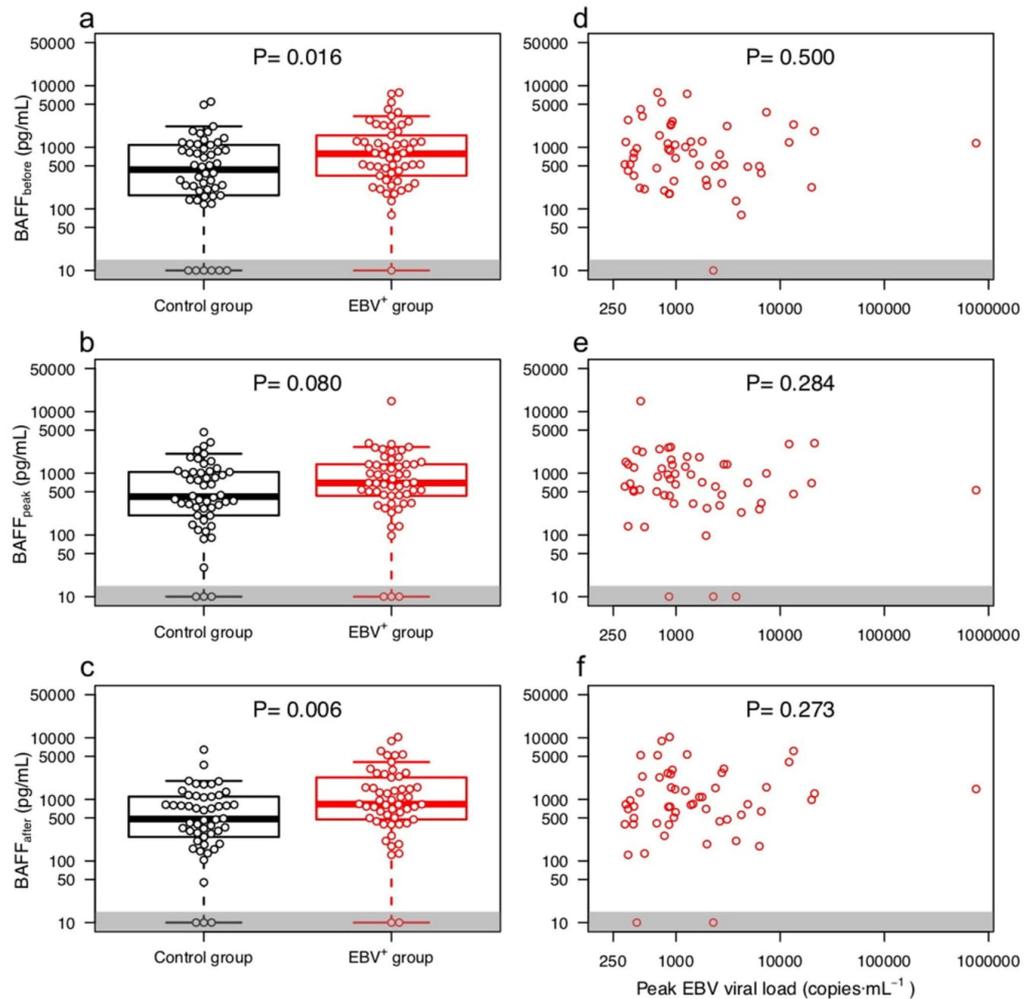


Figure 3. BAFF concentration in serum as a function of EBV reactivation. The left column shows the measured BAFF concentration for both sub-cohorts at the time points before (a), peak (b) and after (c); the right column depicts the measured BAFF concentrations in the EBV⁺ group at time points before (d), peak (e) and after (f) as a function of EBV viral load at peak. The results on (a–c) are also contained in Fig. 1f and are shown here enlarged for a better data view. Samples with a BAFF concentration below detection limit are depicted in the gray area; for the calculation of significance these concentrations were considered to have a value of 0. Note that both axes are in logarithmic scale.

Discussion

In this study, we have analyzed the tri-directional interplay between EBV reactivation, B cells and B cell-associated soluble serum mediators. Our main findings include:

- Patients with EBV reactivation demonstrated significantly increased concentrations of BAFF in serum, both before viremia onset and after its clearing. No significant association was found between severity of EBV reactivation and BAFF levels.
- In accordance with these findings, BAFF treatment was associated with increased EBV replication and expansion of EBV infected B cells in vitro.
- In spite of the increased serum BAFF levels found in EBV⁺ group, EBV reactivation was neither associated with increased B cell frequency nor with B cell expansion.

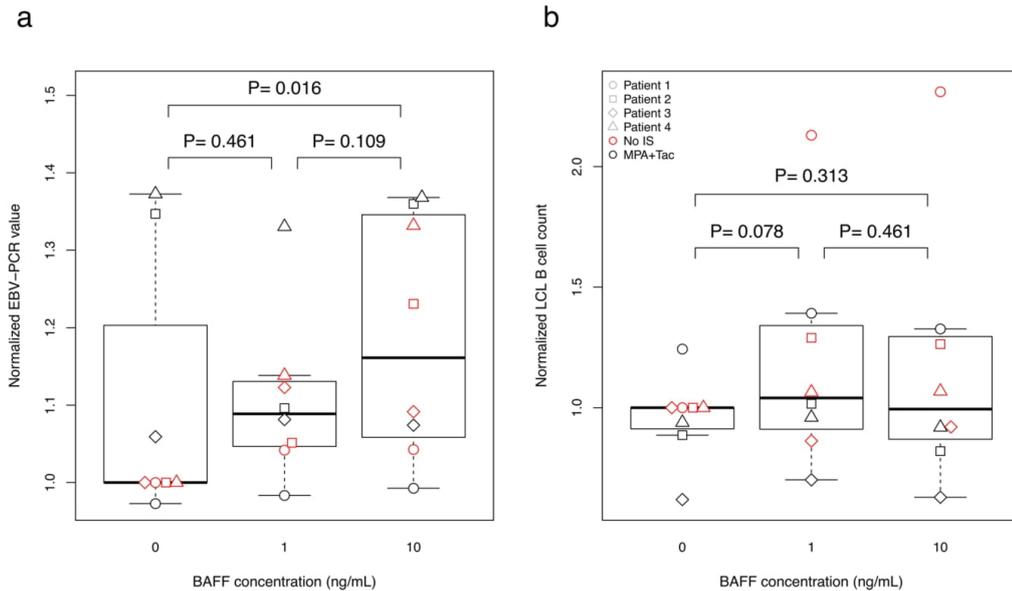


Figure 4. BAFF treatment of EBV-infected LCL leads to increased EBV replication and cell expansion. LCL B cells from four different renal transplant patients were cultured with increasing BAFF concentrations (x-axis), with MPA + Tac (black symbols), or without MPA + Tac (red symbols). EBV load under BAFF treatment was assessed by normalization of EBV-PCR data obtained after BAFF treatment to untreated samples (a). The normalized LCL B cell count (b) represents the ratio of the B cell count by the untreated (BAFF=0 and No IS) LCL B cells.

- EBV reactivation was associated with a significantly altered state of the immune system as assessed by correlation matrix analysis. This alteration of the immune system was detected at reactivation peak and after clearing.

By demonstrating increased level of BAFF in EBV⁺ group, we showed for the first time a possible effect of EBV reactivation on B cell homeostasis. Our analyses demonstrate furthermore that EBV reactivation might have a profound effect on immune response, altering the interplay between soluble factors and cellular immunity. The significance of the alteration increased even more after clearing of EBV viral load. Interestingly, even though increased BAFF concentrations have been shown to be associated with EBV reactivation both in vitro and in vivo, no distinctive correlation profile was observed before viremia onset.

What is the nature of this altered state of the immune system? The univariate testing of single factors found only a significant association of EBV⁺ patients with higher levels of BAFF. BAFF is known as a key regulator of B cell homeostasis^{31–33}, and its effects on expansion of EBV-infected B cell could be confirmed in our in vitro experiment. Importantly, no upregulation of the markers for PTLD development including IL-6, IL-10 and TNF α was observed^{15–18}. Furthermore, the examination of the correlation matrices and the matrix of correlation differences (Figs. 5 and 6) reveals two general phenomena: A weakening of the positive inter-correlations of most measured factors (especially IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21 and TNF α) and alterations of the bi-directional interplay between B cell and soluble factors. These latter alterations affect, among others, the correlation of BAFF with B cell frequencies. This is remarkable, as BAFF has been shown to be a lymphoma marker in the immunosuppressive context such as AIDS³⁴. The differences between our study and the study on AIDS patients could be explained by the impact of EBV infection, as EBV infection was not considered in the AIDS study. In contrast, we demonstrated that EBV reactivation was associated with a strong reduction of the BAFF-B cell correlation in our study, which may explain the lack of B cell expansion.

Based on these observations, we speculate that the observed alterations in the B cell-associated soluble factor network would comprise not only an EBV-induced disruption of the immune system, but also the response of the immune system against these very same disruptions. This hypothesis would have far-reaching implications. Accordingly, the alterations in B-cell soluble factor pattern could therefore be viewed as part of an anti-PTLD signature. While the nature and mechanism of this immune alteration signature are highly speculative, the elevated BAFF concentrations before and during EBV reactivation found in our study could perhaps be a marker for this anti-PTLD state. In line with this, BAFF was not associated with PTLD in a recent study in liver transplantation patients³⁵. Moreover, BAFF has been even shown to play an important role in antiviral immune

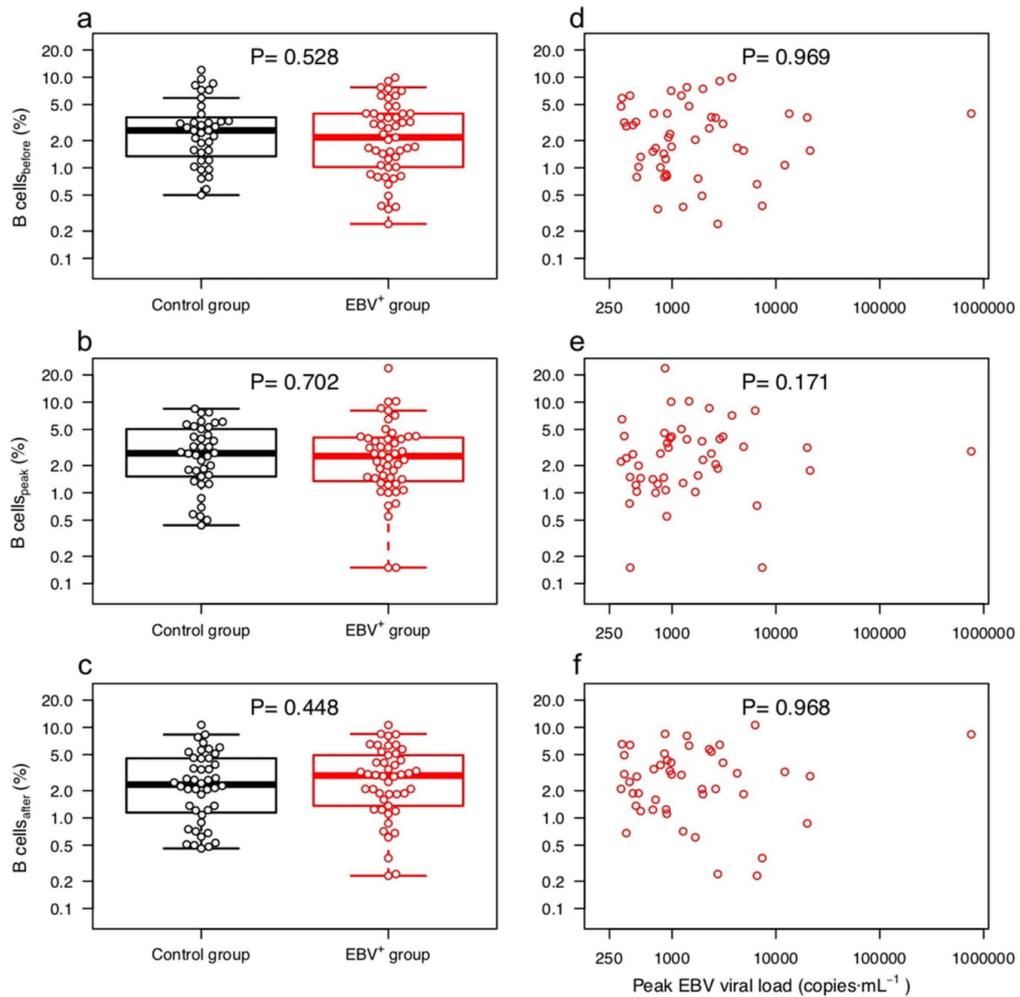


Figure 5. B cell frequency in blood as a function of EBV reactivation. The left column shows the measured B cell frequencies for both sub-cohorts at the time points before (a), peak (b) and after (c); the right column depicts the measured B cell frequencies in the EBV⁺ group at time points before (d), peak (e) and after (f) as a function of EBV viral load at peak. The results on a-c are also contained in Fig. 1i and are shown here enlarged to allow for a better view of the data. Note that both axes are in logarithmic scale.

response³⁶. Further studies are needed to assess the nature and persistence of the EBV-associated alterations in the B cell homeostasis, as well as their hypothetical relationship with development of PTLT.

Besides the postulated role in antiviral defense, BAFF upregulation might be employed as a predictive marker of EBV reactivation. Thus, our data demonstrate an elevated level of BAFF prior EBV reactivation and an association of BAFF with increased in vitro viral replication. These results are in line with previous reports on the upregulation of BAFF in vitro and in vivo in EBV-infected B cells^{37,38}.

Remarkably, our results demonstrate that the univariate analysis of the measured factors cannot capture the complexity of the changes in the B cell homeostasis associated with EBV reactivation. The consequences of reactivation could only be detected through a systems approach that takes into account all the interrelations between the measured factors. A reason for this is that immune soluble factors exhibit mutual synergies and act in concert, and analysis techniques have to take into account these synergies^{39–41}. Correlation analysis is a powerful tool to identify these synergies and therefore changes in complex signaling systems, identifying altered states

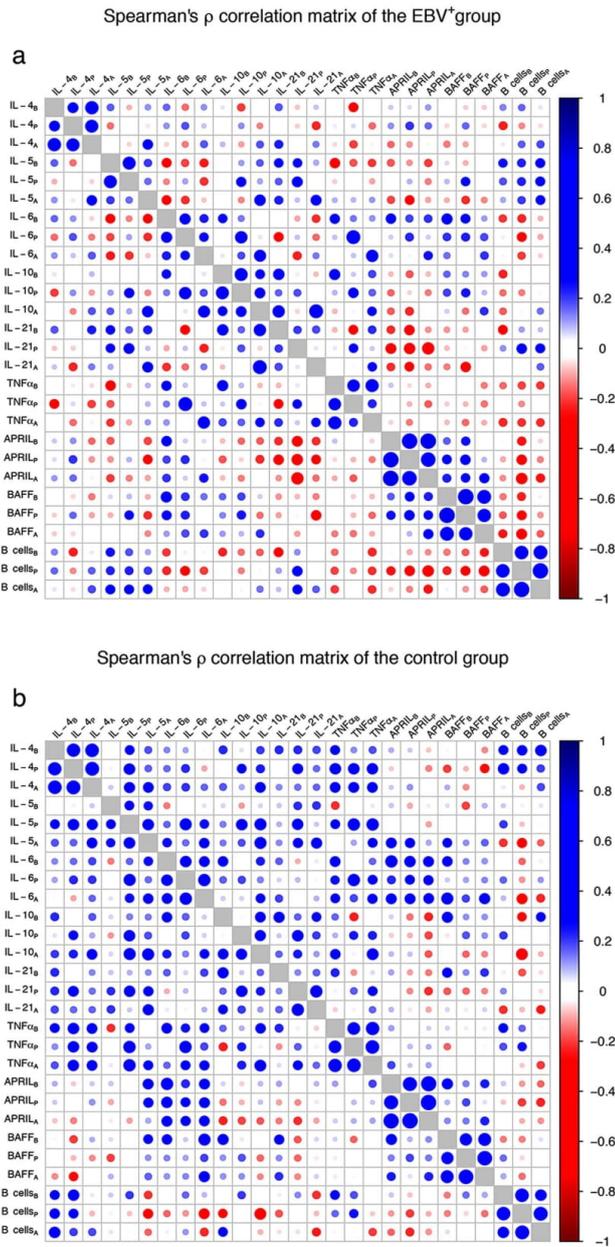


Figure 6. Correlation matrices of soluble factors and B cell for the patient sub-cohorts. **(a)** Represents the correlation matrix of the EBV⁺ group, whereas **(b)** depicts the correlation matrix of the control group. Correlation strength is represented by both circle size and color intensity, where (as shown in the legend) blue tones denote positive correlations and red tones, negative correlations. Subscripts in variable labels denote the time point of measurement (B: before, P: peak, A: after).

Matrix of correlation differences

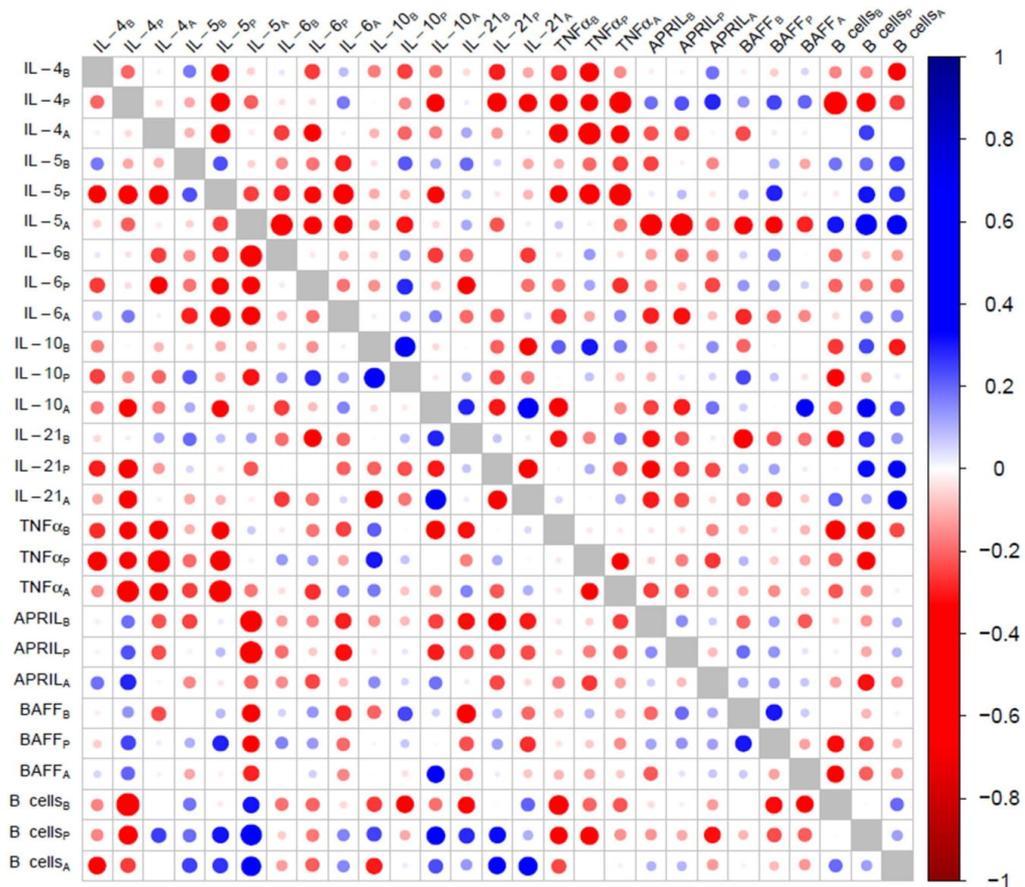


Figure 7. Difference between the correlation matrices of the EBV⁺ group and the control group. The absolute value difference between the correlations is represented by circle size. Blue tones denote that the EBV⁺ group had an increased correlation compared to the control group and vice versa for the red tones. Subscripts in variable labels denote the time point of measurement (B: before, P: peak, A: after).

that transcend the mere changes in concentration of single factors and treating the network of correlations as a whole^{40,42,43}. In the field of immunological research, correlation analysis has been recently employed to elucidate changes in the cytokine signaling associated with immunomodulatory drugs, anti-bacterial immune response and glioma development, among others^{40,42,43}.

This study has some limitations: Firstly, even though there is evidence that suggests a role of prolonged EBV viremia in the development of PTLD, we did not analyze the influence of viremia duration separately. This was due to the low incidence of prolonged EBV viremia, as only two patients had detectable viral load for more than two visits. Secondly, only three time points were analyzed, so that we do not have any data on the persistence of the observed alterations of the immune system among EBV⁺ patients. Furthermore, since the follow-up of the Harmony trial was of 1 year, we do not have information on whether any of the patients of our study developed PTLD after 1 year post-transplantation, as it generally the case in adult renal transplantation^{2,44,45}. Unfortunately, the only EBV⁺ PTLD case in our study cohort could not be analyzed in depth, due to the patient's decision to withdraw informed consent. Therefore, no samples were available. Finally, with only 13 measured factors, we might be missing important aspects of the immune response in our analysis: among others, the role of T cells in

controlling EBV⁺ reactivation and expansion of infected B cells, which could be a potential explanation for the observed altered state of the immune system and hypothetical anti-PTLD signature¹.

In conclusion, our work offers insights in the EBV-associated changes of the B cell homeostasis, both from a humoral and cellular point of view. These alterations were especially striking after viral clearing and comprised a reduction of the B cell proliferating effects of BAFF. As reactivation was simultaneously associated with increased BAFF levels, it can be speculated that the observed alterations correspond to an anti-PTLD signature, which could explain the lack of BAFF-associated B cell proliferation and consequently PTLD development in our study. Additional studies, including a larger number of factors and measurements, are required to further elucidate the nature and consequences of the EBV-associated alterations of the immune system in renal transplantation patients.

Data availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding authors upon request.

Received: 29 January 2020; Accepted: 24 September 2020

Published online: 11 November 2020

References

- Dierickx, D. & Habermann, T. M. Post-transplantation lymphoproliferative disorders in adults. *N. Engl. J. Med.* **378**, 549–562 (2018).
- Petrara, M. R. *et al.* Post-transplant lymphoproliferative disorders: From epidemiology to pathogenesis-driven treatment. *Cancer Lett.* **369**, 37–44 (2015).
- Andrei, G., Trompet, E. & Snoeck, R. Novel therapeutics for Epstein–Barr virus. <https://doi.org/10.3390/molecules24050997> (2019).
- Rivera-Soto, R. & Damania, B. Modulation of angiogenic processes by the human gammaherpesviruses, Epstein–Barr virus and Kaposi's. *Front. Immunol.* **10**, 1544 (2019).
- Ng, S.-B. & Khoury, J. D. Epstein–Barr virus in lymphoproliferative processes: An update for the diagnostic pathologist. *Adv. Anat. Pathol.* **16**, 40–55 (2009).
- Guidry, J. T., Birdwell, C. E. & Scott, R. S. Epstein–Barr virus in the pathogenesis of oral cancers. *Oral Dis.* **24**, 497–508 (2018).
- Thorley-Lawson, D. A. & Gross, A. Persistence of the Epstein–Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1328–1337 (2004).
- Jangra, S., Yuen, K., Botelho, M. G. & Jin, D.-Y. Epstein–Barr virus and innate immunity: Friends or foes? *Microorganisms* **7**, 183 (2019).
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B. & Thorley-Lawson, D. A. Epstein–Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J. Exp. Med.* **190**, 567–576 (1999).
- Nijland, M. L. *et al.* Epstein–Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease after solid organ transplantation: Pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Transplant. Direct.* **2**, e48 (2016).
- Bamoulid, J. *et al.* Subclinical Epstein–Barr virus Viremia among adult renal transplant recipients: Incidence and consequences. *Am. J. Transplant.* **13**, 656–662 (2013).
- Blazquez-Navarro, A. *et al.* BKV, CMV, and EBV interactions and their effect on graft function one year post-renal transplantation: Results from a large multi-centre study. *EBioMedicine* **34**, 113–121 (2018).
- Van Esser, J. W. J. *et al.* Prevention of Epstein–Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **99**, 4364–4369 (2002).
- Tsai, D. E. *et al.* EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: Results of a two-arm prospective trial. *Am. J. Transplant.* **8**, 1016–1024 (2008).
- Morscio, J., Dierickx, D. & Tousseyn, T. Molecular pathogenesis of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorder: What do we know so far? *Clin. Dev. Immunol.* **2013** (2013).
- Hinrichs, C. *et al.* IL-6 and IL-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders development and maintenance: A longitudinal study of cytokine plasma levels and T-cell subsets in 38 patients undergoing treatment. *Transpl. Int.* **24**, 892–903 (2011).
- McAulay, K. A., Haque, T. & Crawford, D. H. Tumour necrosis factor gene polymorphism: A predictive factor for the development of post-transplant lymphoproliferative disease. *Br. J. Cancer* **101**, 1019–1027 (2009).
- Muti, G. *et al.* Epstein–Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in EBV-positive and EBV-negative post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* **122**, 927–933 (2003).
- Wu, Y. *et al.* The biological effects of IL-21 signaling on B-cell-mediated responses in organ transplantation. *Front. Immunol.* **7**, 1–10 (2016).
- Figgett, W. A., Vincent, F. B., Saulep-Easton, D. & Mackay, F. Roles of ligands from the TNF superfamily in B cell development, function, and regulation. *Semin. Immunol.* **26**, 191–202 (2014).
- Horikawa, K. & Takatsu, K. Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation. *Immunology* **118**, 497–508 (2006).
- Baron, U. *et al.* Epigenetic immune cell counting in human blood samples for immunodiagnostics. *Sci. Transl. Med.* **10**, ean3508 (2018).
- Thomusch, O. *et al.* Rabbit-ATG or basiliximab induction for rapid steroid withdrawal after renal transplantation (Harmony): An open-label, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* **388**, 3006–3016 (2016).
- Babel, N. *et al.* Sustained BK viremia as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: Analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation* **88**, 89–95 (2009).
- Stervbo, U. *et al.* Repeated changes to the gravitational field negatively affect the serum concentration of select growth factors and cytokines. *Front. Physiol.* **10**, 1–6 (2019).
- Amini, L. *et al.* Comprehensive characterization of a next-generation antiviral T-cell product and feasibility for application in immunosuppressed transplant patients. *Front. Immunol.* **10** (2019).
- Jennrich, R. I. An asymptotic χ^2 test for the equality of two correlation matrices. *J. Am. Stat. Assoc.* **65**, 904–912 (1970).
- Developing a Protocol for Observational Comparative Effectiveness Research A User's Guide.* (Agency for Healthcare Research and Quality, 2013).
- Bender, R. & Lange, S. Adjusting for multiple testing—When and how? *J. Clin. Epidemiol.* **54**, 343–349 (2001).
- Li, G. *et al.* An introduction to multiplicity issues in clinical trials: The what, why, when and how. *Int. J. Epidemiol.* 746–755, <https://doi.org/10.1093/ije/dyw320> (2017).
- Tafalla, C. & Granja, A. G. Novel insights on the regulation of B cell functionality by members of the tumor necrosis factor superfamily in jawed fish. *Front. Immunol.* **9** (2018).
- Cohen, Y. *et al.* BlyS: Member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science (80-)* **285**, 260–263 (1999).
- Yang, M. *et al.* B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J. Immunol.* **175**, 2814–2824 (2005).

34. Epeldegui, M. *et al.* A prospective study of serum microbial translocation biomarkers and risk of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *AIDS* **32**, 945–954 (2018).
35. Engels, E. A. *et al.* Donor-specific antibodies, immunoglobulin-free light chains, and BAFF levels in relation to risk of late-onset PTLD in liver recipients. *Transplant. Direct* **4**, 1–5 (2018).
36. Vincent, F. B. *et al.* The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**, 203–215 (2013).
37. He, B., Raab-Traub, N., Casali, P. & Cerutti, A. EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J. Immunol.* **171**, 5215–5224 (2003).
38. Serafini, B. *et al.* Epstein-barr virus latent infection and baf expression in B cells in the multiple sclerosis brain: Implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 677–693 (2010).
39. Barteo, E. & McFadden, G. Cytokine synergy: An underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. *Cytokine* **63**, 237–240 (2013).
40. Schwartzbaum, J. *et al.* Association between prediagnostic allergy-related serum cytokines and glioma. *PLoS ONE* **10**, 1–17 (2015).
41. Ksendzovsky, A. *et al.* Mechanisms of cytokine-induced glioma immunosuppression. *Open Cancer Immunol. J.* **3**, 30–35 (2010).
42. Wu, Y., Garmire, L. X. & Fan, R. Inter-cellular signaling network reveals a mechanistic transition in tumor microenvironment. *Integr. Biol.* **4** (2012).
43. Hotson, A. N. *et al.* Coordinate actions of innate immune responses oppose those of the adaptive immune system during Salmonella infection of mice. *Sci. Signal.* **9**, 1–13 (2016).
44. Végso, G., Hajdu, M. & Sebestyén, A. Lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation-classification, incidence, risk factors, early detection and treatment options. *Pathol. Oncol. Res.* **17**, 443–454 (2011).
45. Babel, N. *et al.* Evidence for genetic susceptibility towards development of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ recipients. *Transplantation* **84**, 387–391 (2007).

Acknowledgements

Gerhard C. Starck Stiftung. Ernst-Ludwig Ehrlich Studienwerk.

Author contributions

N.B., S.O., C.H., O.T., U.D., O.W., P.R., R.V. and T.H.W. contributed to the study design, sample collection, and/or sample management. S.B., P.W., B.S., S.K., L.A., M.S.H. and S.O. carried out the experiments. SB and ABN performed the statistical analysis. S.B., A.B.N., T.R. and N.B. performed data interpretation. S.B. and A.B.N. drafted the manuscript. All authors have contributed to the manuscript and approved the final version of the manuscript for submission.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by grants of Federal Ministry of Education and Research (BMBF) eKID and noChro.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76607-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

11 Lebenslauf

12 Publikationsliste

Research Paper

1. **Bajda, S.**, Blazquez-Navarro, A., Samans, B., Wehler, P., Kaliszczyk, S., Amini, L., Schmueck-Henneresse, M., Witzke, O., Dittmer, U., Westhoff, T.H., Viebahn, R., Reinke, P., Thomusch, O., Hugo, C., Olek, S., Roch, T., Babel, N.: **The role of soluble mediators in the clinical course of EBV infection and B cell homeostasis after kidney transplantation.** *Sci. Rep.* 10, 1–13 (2020).
2. Stervbo, U., **Bajda, S.**, Wehler, P., Rohn, B.J., Streichhahn, M., Temizsoy, S., Kohut, E., Roch, T., Viebahn, R., Westhoff, T.H., Babel, N.: **Stability of 12 T-helper cell-associated cytokines in human serum under different pre-analytical conditions.** *Cytokine* **129**, 155044 (2020).

Poster

1. **Bajda, S.**, Blazquez-Navarro A., Roch T., Samans B., Wehler P., Olek S., Babel, N.: **Evaluation the role of soluble mediators on B cell homeostasis and the development of early EBV-associated lymphoproliferative disorders in kidney transplant patients**
19th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT),
Kopenhagen (09/2019)

13 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Nina Babel für die Überlassung des Themas und die konstruktive Zusammenarbeit bedanken. Sowohl im Beruflichen als auch im Privaten hat sie mich die gesamte Zeit über begleitet und gefördert. Mit raschen Antworten hat sie mir eine Betreuung zukommen lassen, die ich mir nicht hätte besser wünschen können.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Zweitbetreuer Dr. rer. nat. Toralf Roch, der mich außerordentlich unterstützt hat und jederzeit für alle Fragen zur Verfügung stand.

Außerdem geht ein großer Dank an Dr. rer. nat. Arturo Blazquez-Navarro, der mich vor allem in allen statistischen Analysen beraten hat, mir immer zur Seite stand und mir mit einer großen Portion Geduld alle meine Fragen, auch über die Statistik hinaus, beantwortet hat.

Patrizia Wehler möchte ich für die kompetente Einarbeitung und Hilfsbereitschaft im Labor sowie die stets gute Laune herzlich danken, sodass auch die Laborarbeit Spaß gemacht hat.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner Arbeitsgruppe für die vielen interessanten Debatten und Vorschläge während unserer Meetings.

Auch möchte ich den Patient*innen, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre, meinen großen Dank aussprechen.

Ich danke außerdem der Gerhard C. Starck Stiftung und dem Ernst Ludwig Ehrlich Studienwerk für die finanzielle und ideelle Unterstützung und Förderung während der gesamten Studienzeit, durch die es mir möglich war, mich auf das Studium zu konzentrieren.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Freund danken, die mir die nötige Kraft gegeben haben auch in schwierigen Zeiten durchzuhalten.