

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik für Onkologie, Hämatologie und Knochenmarkstransplantation mit Sektion  
Pneumologie

University Cancer Center Hamburg/ Hubertus Wald Tumorzentrum

Direktor: Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Einfluss von Lenalidomid auf das Immunrepertoire von Patienten mit  
myelodysplastischem Syndrom mit der Chromosomenveränderung del(5q)

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von:

Thorben Peter Mährle  
aus Bonn

Hamburg 2019

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.04.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Mascha Binder**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Maximilian Christopeit**

## Inhaltsverzeichnis

I.	Publikation	5
II.	Darstellung der Publikation	15
	<b>1. Vorwort</b>	15
	<b>2. Einleitung</b>	15
	<b>3. Material und Methoden</b>	
	3.1 Patienten-Charakteristika	18
	3.2 Angaben zu der Studie	19
	3.3 Isolierung von genomischer DNA aus mononukleären Zellen	19
	3.4 Multiplex PCR zur Amplifikation der Immunglobulin schwere Kette und des T-Zell Rezeptor beta für zielgerichtetes Illumina Next Generation Sequencing	19
	3.5 Illumina Next Generation Sequencing und Datenanalyse	20
	3.6 Analyse der Diversität der IGH und TRB Repertoires	20
	3.7 In silico Analyse der T-Zell Repertoires mit Hilfe von GLIPH und Entstehungswahrscheinlichkeiten Tools	20
	3.8 Statistische Analysen	21
	<b>4. Ergebnisse</b>	
	4.1 MDS del(5q) Patienten zeigen kein krankheits- oder behandlungsspezifisches Muster in Bezug auf die VJ-Genverteilung und CDR3-Längenverteilung	21
	4.2 Das B-Zell Repertoire im Knochenmark von MDS del(5q) Patienten erholt sich nach Lenalidomidtherapie	24
	4.3 Unter Therapie mit Lenalidomid kommt es im Knochenmark von MDS del(5q) Patienten zu einer erhöhten Klonalität der T-Zell Repertoires und zur Generierung Antigen induzierter T-Zell Cluster	24
	<b>5. Diskussion</b>	25
	<b>6. Zusammenfassung</b>	28
III.	Abkürzungsverzeichnis	30
IV.	Tabellenverzeichnis	31
V.	Abbildungsverzeichnis	31
VI.	Literaturverzeichnis	32

VII.	Erklärung des Eigenanteils	37
VIII.	Danksagung	38
IX.	Lebenslauf	39
X.	Eidesstattliche Versicherung	40

# Deep sequencing of bone marrow microenvironments of patients with del(5q) myelodysplastic syndrome reveals imprints of antigenic selection as well as generation of novel T-cell clusters as a response pattern to lenalidomide

Thorben Mährle,<sup>1\*</sup> Nuray Akyüz,<sup>1\*</sup> Pim Fuchs,<sup>2</sup> Nicola Bonzanni,<sup>2</sup> Donjete Simnica,<sup>1,3</sup> Ulrich Germing,<sup>4</sup> Anne Marie Asemissen,<sup>1</sup> Johann Christoph Jann,<sup>5</sup> Florian Nolte,<sup>5</sup> Wolf-Karsten Hofmann,<sup>5</sup> Daniel Nowak<sup>5</sup> and Mascha Binder<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology and Hematology, BMT with Pneumology section, Hubertus Wald Tumorzentrum / UCCH, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; <sup>2</sup>ENPICOM, 's-Hertogenbosch, the Netherlands; <sup>3</sup>Department of Hematology and Oncology, University Hospital Halle (Saale), Germany; <sup>4</sup>Department of Hematology, Oncology, and Clinical Immunology, Heinrich Heine University Düsseldorf, Germany and <sup>5</sup>Department of Hematology and Oncology, Medical Faculty Mannheim of the Heidelberg University, Mannheim, Germany

\*TM and NA contributed equally to this work.



Haematologica 2019  
Volume 104(7):1355-1364

## ABSTRACT

In myelodysplastic syndromes with a partial deletion of the long arm of chromosome 5, del(5q), lenalidomide is believed to reverse anergic T-cell immunity in the bone marrow resulting in suppression of the del(5q) clone. In this study we used next-generation sequencing of immunoglobulin heavy chain (*IGH*) and T-cell receptor beta (*TRB*) rearrangements in bone marrow-residing and peripheral blood-circulating lymphocytes of patients with del(5q) myelodysplastic syndromes to assess the immune architecture and track adaptive immune responses during treatment with lenalidomide. The baseline bone marrow B-cell space in patients was comparable to that of age-matched healthy controls in terms of gene usage and *IGH* clonality, but showed a higher percentage of hypermutated *IGH* sequences, indicating an expanded number of antigen-experienced B lineage cells. Bone marrow B lineage clonality decreased significantly and hypermutated *IGH* clones normalized upon lenalidomide treatment, well in line with the proliferative effect on healthy antigen-inexperienced B-cell precursors previously described for this drug. The T-cell space in bone marrow of patients with del(5q) myelodysplastic syndromes showed higher *TRB* clonality compared to that of healthy controls. Upon lenalidomide treatment, myelodysplastic syndrome-specific T-cell clusters with low to medium spontaneous generation probabilities emerged; these clusters were shared across patients, indicating a common antigen-driven T-cell response pattern. Hence, we observed B lineage diversification and generation of new, antigen-dependent T-cell clusters, compatible with a model of adaptive immunity induced against the del(5q) clone by lenalidomide. Overall, this supports the concept that lenalidomide not only alters the functional T-cell state, but also the composition of the T- and B-cell repertoires in del(5q) myelodysplastic syndromes.

## Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal stem cell disorders characterized by inefficient hematopoiesis. The most prevalent cytogenetic abnormality in these diseases is a partial deletion of the long arm of chromosome 5, del(5q), which is present in about 15% of patients.<sup>1</sup> This clinically distinct entity is char-

## Correspondence:

MASCHA BINDER,  
mascha.binder@uk-halle.de

Received: October 8, 2018.

Accepted: January 15, 2019.

Pre-published: January 24, 2019.

doi:10.3324/haematol.2018.208223

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: [www.haematologica.org/content/104/7/1355](http://www.haematologica.org/content/104/7/1355)

©2019 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



acterized by refractory anemia, often thrombocytopenia with atypical megakaryocytes in the bone marrow (BM) and a relatively low progression rate to acute myeloid leukemia compared to the rate of transformation of other types of MDS.<sup>2</sup> The pathogenesis seems to be partially driven by haploinsufficiency of genes located in the deleted area on chromosome 5.<sup>3-8</sup> Moreover, there is evidence of adaptive and innate immune dysregulation with altered cytokine networks, diminished NK cell activity and an anergic T-cell environment failing to suppress the defective del(5q) clone.<sup>9</sup>

In 2005, lenalidomide was approved in the USA for the treatment of lower-risk, transfusion-dependent del(5q) MDS patients as the first immunomodulatory drug. In the placebo-controlled phase III trial MDS-004, 56% of patients who received 10 mg/day lenalidomide achieved red blood cell transfusion independency for more than 26 weeks.<sup>10</sup> Response to lenalidomide was shown to be associated with significant improvement in survival with a median overall survival of 4 years.<sup>11</sup> Cereblon (CRBN), a substrate receptor of the CRL4 ubiquitin ligase complex, is the primary molecular target through which lenalidomide mediates its anti-tumor effects. Krönke *et al.* demonstrated that lenalidomide induces the ubiquitination and degradation of IKZF1, IKZF3 and CK1 $\alpha$  by binding to CRBN.<sup>12,13</sup> CK1 $\alpha$ , a negative regulator of p53, may be of particular pathophysiological relevance in the context of MDS del(5q), since it is encoded by a gene within the deleted chromosomal region and haploinsufficient expression sensitizes cells to lenalidomide therapy.<sup>12</sup> Furthermore, the ubiquitin-independent physiological chaperone-like function of CRBN is targeted by lenalidomide. Eichner *et al.* found that lenalidomide outcompetes CRBN for binding to and stabilizing the CD147-MCT1 complex.<sup>14</sup> This complex promotes various biological functions, including angiogenesis, proliferation and invasion. Since recent evidence suggests a negative regulatory role of CD147 in T-cell-mediated immune responses,<sup>15-17</sup> lenalidomide-induced CD147 destabilization has been speculated to explain not only direct anti-tumor effects, but also immune cell activation.<sup>14</sup> Functionally, the immunomodulation induced by lenalidomide was described as a reversal of pathological T-cell tolerance by increasing T-cell effector function and secretion of interleukin-2, interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>18</sup> Expanding on this, a recent RNA sequencing study on non-del(5q) MDS patients suggested that the immunomodulatory signal delivered by lenalidomide may also affect the composition rather than only the functional state of the local BM immune cells.<sup>19</sup> However, the immunomodulatory effects of lenalidomide on the microenvironment have not yet been fully defined.

In this study, we analyzed local BM and peripheral blood (PB) environments to understand the clonal immune architecture of MDS del(5q) and its modulation by lenalidomide. To do this, we used state-of-the-art next-generation sequencing (NGS) of immunoglobulin heavy chain (*IGH*) and T-cell receptor beta (*TRB*) rearrangements as an advanced technology that enables simultaneous identification of tens of thousands of unique B-cell and T-cell receptor rearrangements from a single tissue sample as well as tracking over time. These analyses demonstrated that lenalidomide shapes T-cell adaptive immune responses in the BM niche of patients with MDS del(5q).

## Methods

### Patients' characteristics

Patients' BM samples were collected between 2013 and 2016 at baseline and after a median of 12 months of lenalidomide treatment in the course of the LE-MON 5 and Bioregister trials. The cohort comprised 15 patients with del(5q) MDS. Matching pre- and post-treatment PB samples were available for eight of these patients. All del(5q) patients were treated in the LE-MON 5 trial,<sup>20</sup> a German multicenter, single-arm, open-label, phase II study [Safety of Lenalidomide Monotherapy and Markers for Disease Progression in Patients With IPSS Low- or Intermediate-1 Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) Associated With an Isolated Deletion 5q Cytogenetic Abnormality] according to the standard lenalidomide protocol.<sup>10</sup> As a reference, seven BM and 22 PB samples from age-matched healthy controls without hematologic abnormalities were included. Five BM samples were collected during hip replacement surgery and two were obtained from iliac crest aspiration of healthy individuals, without apparent differences. Hemograms of all the healthy donors were normal as were their C-reactive protein levels. The BM of all MDS patients was obtained by standardized aspiration and biopsy of the iliac crest. All MDS del(5q) samples analyzed in this study were previously subjected to NGS of TP53,<sup>21</sup> and were negative for TP53 mutations. The patients' characteristics are shown in Table 1.

### Study approval

Informed consent was obtained from all patients and healthy controls for the use of their diagnostic material for scientific purposes approved by the institutional review board (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, Henrich Heine University Düsseldorf, Germany, project number MC-LKP-392).

### Isolation of genomic DNA

Genomic DNA was isolated from >10<sup>6</sup> frozen BM or PB mononuclear cells using a Gen Elute mammalian genomic DNA miniprep kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) according to the supplier's suggestions.

### Multiplex polymerase chain reaction analysis for *IGH* and *TRB* repertoire amplification for Illumina targeted next-generation sequencing

Both the *IGH* and *TRB* genes containing the entire rearranged *V*, *D* and *J* segments were amplified with BIOMED2-FR1 (*IGH*), -TRB-A and -B primer pools starting from 250 ng of input genomic DNA.<sup>22</sup> Amplicons were tagged with Illumina adapters and indices in two consecutive polymerase chain reactions (PCR), as previously described.<sup>23</sup> Briefly, previously published primers<sup>22-24</sup> for the first PCR annealed within either the *IGH* or *TRB* loci and contained Illumina-compatible adapters for NGS primer annealing. A second PCR was performed using outer primers to extend the Illumina adapter for later hybridization of amplicons to the Illumina flow cell and to add a seven nucleotide barcode, allowing each sequence to be matched during data analysis to a certain patient and time point. All primers were purchased from Metabion (Martinsried, Germany). All PCR were performed using Phusion HS II polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Germany). Amplicons with the expected size were purified after agarose gel electrophoresis using a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The concentration of the amplicons was determined on Qubit (QIAGEN, Hilden, Germany) and the quality of the amplicon pools was controlled on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Böblingen, Germany) before being subjected to NGS.

**Illumina next-generation sequencing and data analysis**

NGS and demultiplexing were performed on an Illumina MiSeq sequencer (600-cycle single indexed, paired-end run, V3-chemistry). Analysis of rearranged *IGH* and *TRB* loci was computed using the MiXCR and ENPICOM's ImmunoGenomix Platforms analysis tools.<sup>23,25</sup> *In silico* grouping of lymphocyte interactions by paratope hotspots (GLIPH) cluster and generation probability analyses were performed as described in previous publications.<sup>26,27</sup>

**Repertoire metrics analyses**

Clonality is an index calculated according to the formula “1 - Pielou's evenness”.<sup>28</sup> Pielou's evenness is calculated according to the formula  $J = H'/\ln(S)$  where H' is the Shannon-Wiener diversity index and S is the total number of clones in a specific sample.<sup>29</sup> The clonality index ranges from 0 to 1, with 0 indicating complete diversity and 1 indicating absolute clonality of the investigated sample and thus the presence of only one clone.

***In silico* GLIPH and generation probability analyses**

We applied the GLIPH algorithm to our NGS-generated healthy donor and MDS patient *TRB* dataset.<sup>26</sup> Next we investi-

gated the generation probability of the GLIPH-generated *TRB* clusters of our healthy controls and MDS patients with the IGoR algorithm<sup>27</sup> and used the negative logarithmic value to display low probability values better. Clusters with low generation probability are expected to be generated by antigen selection, although no cutoff value defining “low” exists, to the best of our knowledge. For a better description of our data we decided to define cutoffs in our study by dividing the range between the lowest (13.1400259) and highest (36.7368006) observed generation probability values into three equally sized areas representing high (a value in the range of 13.1400259-21.0056175), medium (21.0056176-28.871209) and low (28.871210-36.7368006) probability. T-cell clusters that expand after lenalidomide treatment and have a low generation probability are expected to have been generated by antigen selection, whereas clusters which expand but have a high generation probability are less likely to have expanded by antigen selection.

**Statistics**

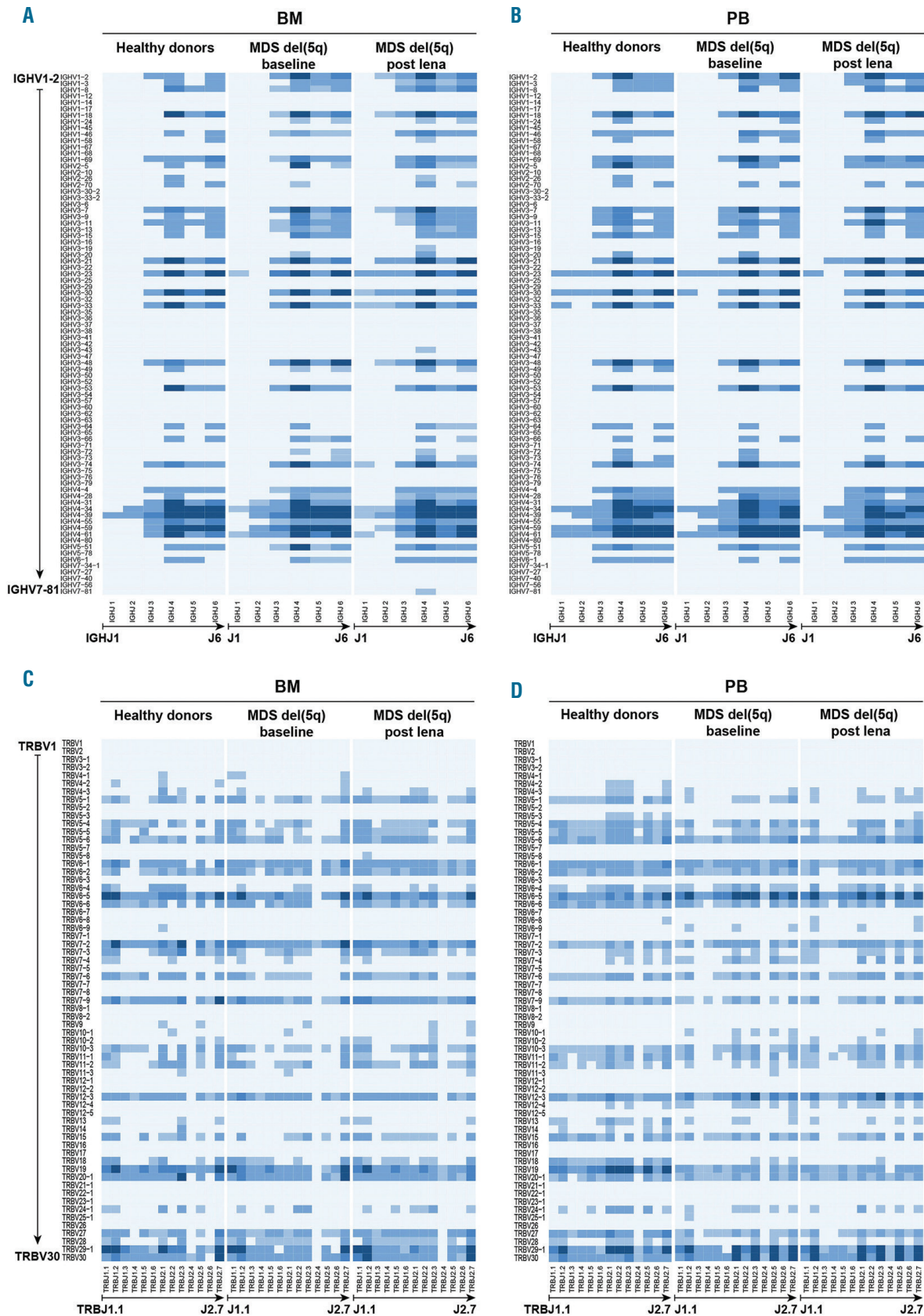
Differences in distributions were studied using the Student *t*-test. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

**Table 1. Characteristics of the cohort of patients with del(5q) myelodysplastic syndromes.**

Patient n.	Age at first diagnosis	Sex	WHO diagnosis	IPSS	Samples	Months after 1 <sup>st</sup> sample	Response at sample collection	Best response
1	66	F	Isolated del5q	Int-1	BM, PB	0 12	Baseline PR	PR/TI
2	75	F	Isolated del5q	Int-1	BM, PB	0 16	Baseline No treatment	No change/SD
3	78	F	Isolated del5q	Int-1	BM, PB	0 7	Baseline PR	TI
4	68	F	Isolated del5q	Int-1	BM	0 15	Baseline PD (morphology)	TI
5	74	M	Isolated del5q	Int-1	BM, PB	0 30	Baseline NA	CCR/TI
6	52	M	Isolated del5q	Int-1	BM, PB	0 7	Baseline SD	NA
7	71	M	Isolated del5q	Low	BM, PB	0 18	Baseline CR	CCR/TI
8	63	F	Isolated del5q	Int-1	BM, PB	0 6	Baseline SD	NA
9	76	F	Isolated del5q	Low	BM, PB	0 42	Baseline PR/CCR?	CCR/TI
10	48	F	Isolated del5q	Int-1	BM	0 30	Baseline Relapse	CCR/TI
11	68	F	Isolated del5q	Int-1	BM	0 12	Baseline PD (RAEB-2)	PR/TI
12	74	M	Isolated del5q	Int-1	BM	0 6	Baseline PD (RAEB-2)	TI
13	60	M	Isolated del5q	Int-1	BM	0 6	Baseline CR	CCR/TI
14	51	F	Isolated del5q	Int-1	BM	0 12	Baseline CR	CCR/TI
15	45	F	Isolated del5q	Int-1	BM	0 6	Baseline CR	CCR/TI

N: number; F: female; M: male; WHO: World Health Organization; Isolated del5q: myelodysplastic syndrome with isolated deletion of chromosome 5q; IPSS: International Prognostic Scoring System; Int-1: intermediate risk 1; BM: bone marrow; PB: peripheral blood; TI: transfusion independence; CR: complete remission; CCR: complete cytogenetic remission; PR: partial remission; SD: stable disease; PD: progressive disease; RAEB-2: refractory anemia with excess blasts-2; NA: not available; Baseline: indicates sample taken before the initiation of lenalidomide treatment.





**Figure 1. TRB and IGH V- and J-gene usage before and after lenalidomide treatment in patients with del(5q) myelodysplastic syndromes and in healthy controls.** For each sample from healthy controls and patients with del(5q) myelodysplastic syndromes before (baseline) and after lenalidomide therapy, the frequency of the V-J gene combinations of all IGH and TRB clones was calculated separately as a percentage. The median frequencies, in percentages, are shown for (A,B) IGH and (C,D) TRB V-J-gene combinations for healthy controls and patients, before and after lenalidomide treatment, in (A,C) bone marrow and (B,D) peripheral blood samples as heat maps. Light blue represents lowest frequency and dark blue highest frequency. For both IGH and TRB, J genes are listed along the x axis and functional V genes along the y axis. BM: bone marrow; PB: peripheral blood; MDS: myelodysplastic syndrome; baseline: prior to lenalidomide treatment; post lena: after lenalidomide treatment



## Results

### No disease-specific gene usage or shared individual B- or T-cell clones in immune environments of patients with del(5q) myelodysplastic syndromes

In search of a repertoire signature of immune environments in del(5q) MDS or a signature of treatment response to lenalidomide, we globally compared B- and T-cell spaces of our cohort of del(5q) MDS patients (characteristics shown in Table 1) with those of healthy, age-matched controls. To this end, next-generation immunosequencing was performed on the T lineage *TRB* locus and the B lineage *IGH* locus in all subjects at baseline as well as 6-42 months after initiation of lenalidomide treatment. As regards *TRB* and *IGH* gene usage, del(5q) MDS samples did not differ from samples from age-matched healthy donors and no systematic biases in gene usage were observed upon lenalidomide treatment (Figure 1A-D). Moreover, no disease-specific shared B- or T-cell clones were discernable (Figure 2). Interestingly, PB and BM samples as well as follow-up samples from the same patient showed significant overlapping for *TRB* (Figure 2B), but not for *IGH* (Figure 2A).

### The clonal bone marrow B-cell space diversifies upon lenalidomide treatment in del(5q) myelodysplastic syndromes

Next, we explored B-cell architectural changes upon lenalidomide treatment by comparing pre- and post-lenalidomide *IGH* repertoires. The pre-lenalidomide BM B-cell space in del(5q) MDS was comparable to the B-cell space of age-matched healthy donors in terms of *IGH* clonality, but showed a significantly higher somatic hypermutation rate of *IGH* clones, indicating an extended number of antigen-experienced B lineage cells (Figure 3A,C). BM (but not PB) B lineage clonality decreased significantly even below the levels in the age-matched healthy donor group and somatic hypermutation rates of *IGH* clones normalized in BM and PB upon lenalidomide treatment (Figure 3A-D).

### *TRB* clonality is increased in myelodysplastic syndrome del(5q) bone marrow and GLIPH analysis reveals the presence of myelodysplastic syndrome-specific and lenalidomide-induced T-cell clusters

The BM T-cell space of patients with del(5q) MDS showed a higher *TRB* clonality compared to that of healthy control BM both before and after lenalidomide treatment, while there were no differences in PB T cells suggesting antigen-driven clonal T-cell selection only in the local BM environment (Figure 4A,B).

To further define antigen-driven T-cell dynamics in the BM of del(5q) MDS patients undergoing lenalidomide treatment, we performed GLIPH analysis<sup>27</sup> on our *TRB* NGS dataset. The GLIPH algorithm clusters T-cell receptors according to their presumed antigen specificity based on conserved motif analysis.<sup>26</sup> Since our global analysis of T-cell clonality suggested antigen-driven selection in the BM but not in PB, we exclusively used *TRB* repertoires from the local MDS microenvironment for this analysis. In a first step, T-cell clusters were determined by GLIPH analysis in BM from healthy controls as well as del(5q) MDS patients before and after lenalidomide treatment. When looking at MDS-exclusive T-cell clusters, we found a higher number of newly emerging clusters that were

shared between individual patients in the samples after lenalidomide treatment compared to the clusters that were present only at the pre-treatment time point (n=534 vs. 240 clusters, respectively) (Figure 5A). This indicated new T-cell cluster generation in response to lenalidomide. Of all clusters that persisted in the BM across the two sampling time points (n=1,242), the majority (n=813) decreased after treatment, while only fewer clusters clonally expanded after treatment (Figure 5A,B). The few MDS-exclusive T-cell clusters that were present before exposure to lenalidomide and that expanded upon treatment were mostly clusters with high generation probability and were therefore less likely to constitute a true T-cell response directed against the MDS clone. In contrast, the T-cell clusters newly generated upon lenalidomide treatment showed much lower generation probabilities, further supporting the hypothesis that the newly emerging clusters (in contrast to the preexisting ones) are specifically generated in response to the MDS clone (Figure 5B). Together, this indicates that despite large overlaps in the pre- and post-therapeutic *TRB* repertoire of individual patients, lenalidomide-induced T-cell immunity may be significantly driven by newly generated T-cell clusters in the local MDS del(5q) BM microenvironment which are shared between individual MDS patients. Table 2 summarizes the presumably most specific top 25 lenalidomide-induced T-cell clusters (low generation probability) that were shared between two or more patients.

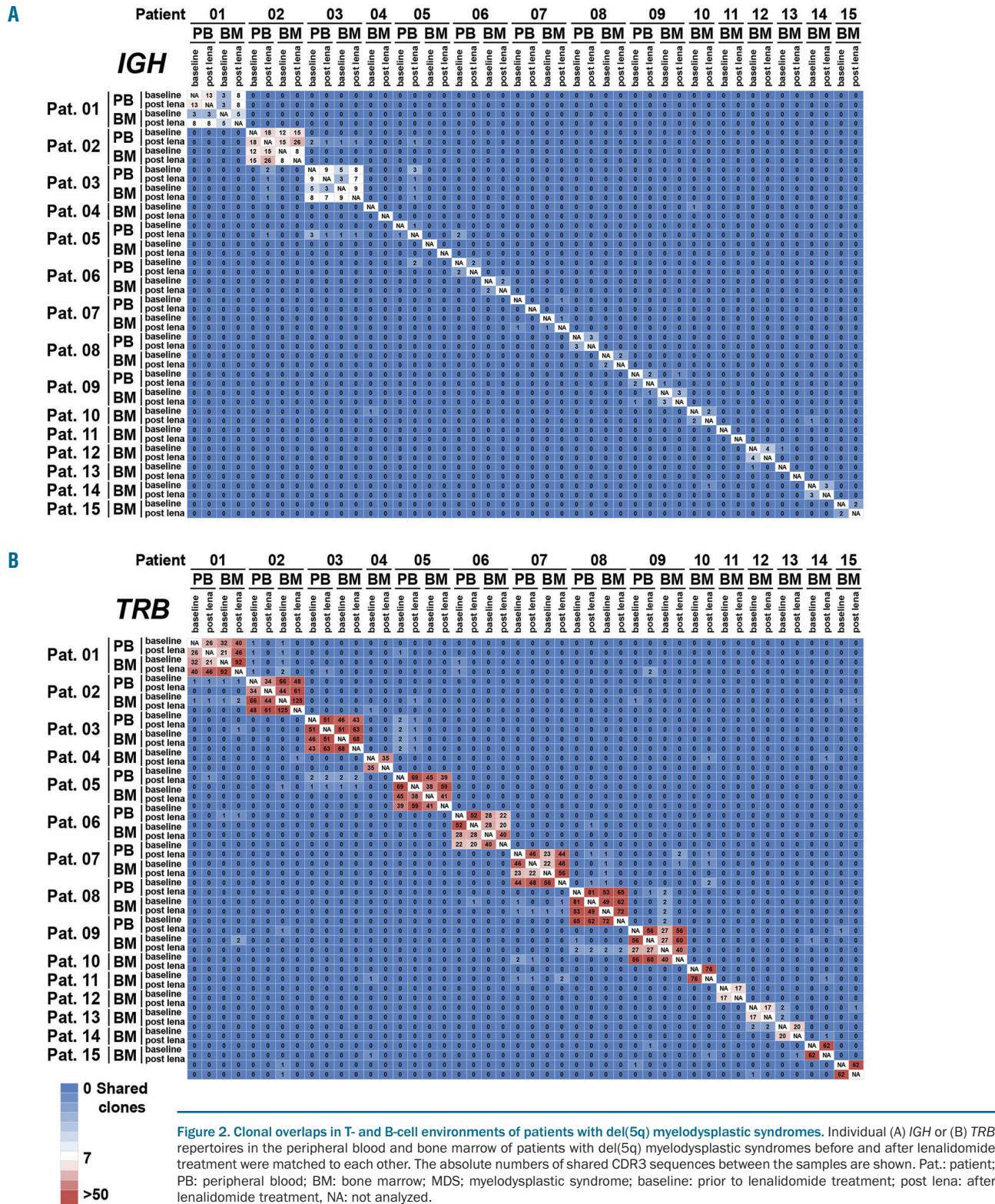
## Discussion

The immunomodulatory drug lenalidomide is effective in the treatment of del(5q) MDS. While lenalidomide has undebatable direct effects on the del(5q)-clone mediated by CRBN, the immunomodulatory effects on the microenvironment are less well defined to date. In this study we used state-of-the-art NGS technology to gain insight into local BM immune environments in del(5q) MDS and their modulation upon treatment. NGS technology makes it possible to characterize large immune repertoires in depth and at high throughput, to monitor individual immune clones over time and to integrate all information to derive quantitative and reliable repertoire metrics data such as clonality indices, gene usage, clonal space distribution and somatic mutational frequencies. Thereby, the immune repertoire determined by NGS not only transforms our ability to detect imprints of antigenic drive,<sup>23,30</sup> but also provides valuable insight into immunological drug effects.<sup>24, 31-35</sup>

Our analyses showed that lenalidomide exerts systematic effects on the local B- and T-cell compartments in the BM of patients with del(5q) MDS. Since no significant clonal B-cell overlap between pre- and post-treatment samples was detectable in BM, the small but highly frequent clones detected after initiation of lenalidomide treatment most likely represent newly generated clones, given that our sequencing depth of around 17,000 successfully aligned productive *IGH* reads per sample exceeds the greatest possible number of B lineage cells in the sample (1,136-5,682 per PCR, assuming a percentage of B lineage cells with completed *VDJ* recombination of 3-15% of BM mononuclear cells). Collectively, the changes observed in the *IGH* repertoire reflect the proliferative effect on healthy B-cell precursors previously described for this

drug.<sup>36</sup> It is also in line with the observed upregulation of *PAX5*, a gene involved in *V(H)DJ(H)* recombination of pro-B cells, in lenalidomide responders described in a BM RNA sequencing study of patients with non-del(5q) MDS, suggesting that this drug non-specifically expands the B lineage pool by this mechanism.<sup>19</sup>

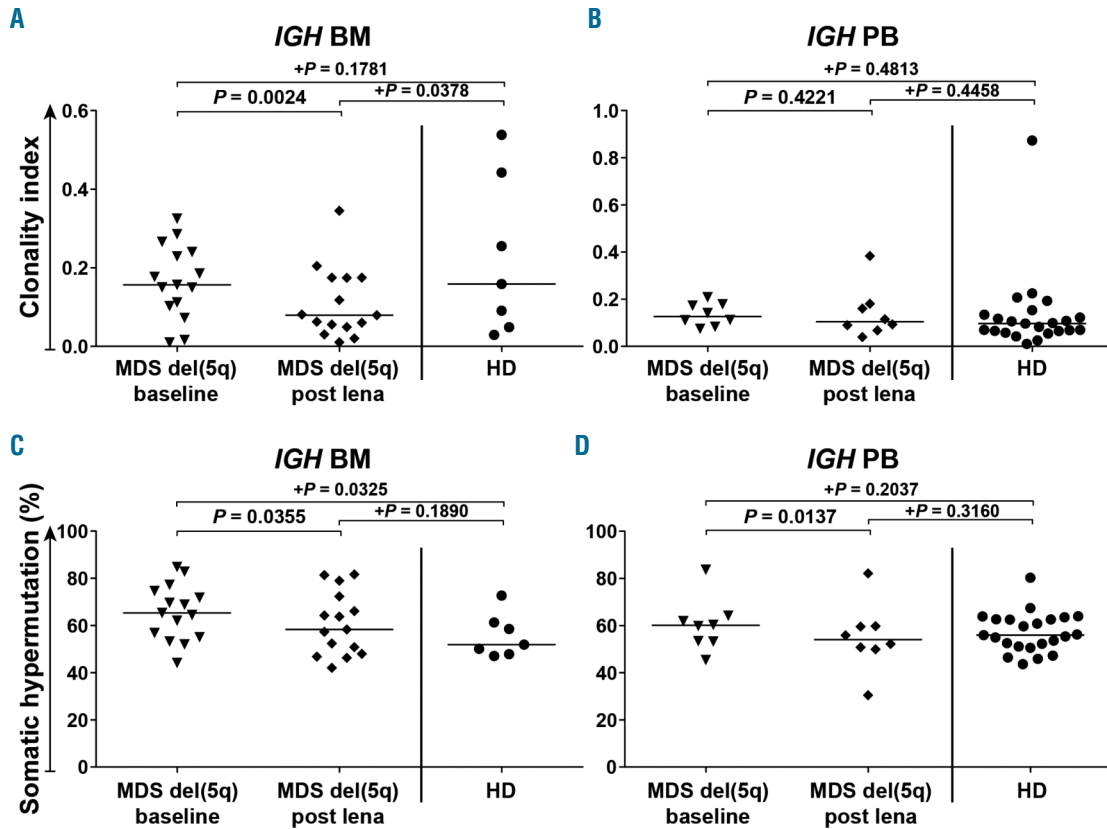
The BM T-cell space in patients with del(5q) MDS was significantly more restricted than that of PB indicating T-cell-mediated immunity in the BM niche where T cells are in direct contact with the del(5q) MDS clone. The BM T-cell repertoire was much more conserved over time than the B-cell repertoire with a higher clonal overlap between



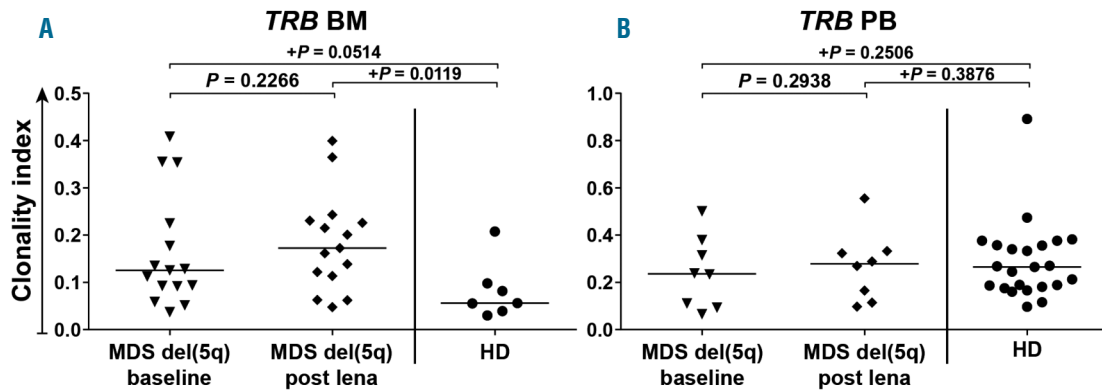


the pre- and post-therapeutic samples. However, when GLIPH analysis was used to determine the dynamics of T-cell clusters with presumably identical antigen recognition, we found that the majority of preexisting MDS-specific BM T-cell clusters were either lost or reduced in size,

while new T-cell clusters with low to medium generation probabilities, which were shared between different patients, emerged upon lenalidomide treatment. Therefore, the cluster analysis provided indirect, but strong evidence that the observed T-cell dynamics is not



**Figure 3.** IGH clonality and hypermutation in the peripheral blood and bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes at baseline and after initiation of lenalidomide treatment. (A,B) Clonality index and (C,D) somatic hypermutation rate of the IGH repertoire in samples of (A,C) bone marrow and (B,D) peripheral blood from patients with myelodysplastic syndromes before and after lenalidomide treatment and in samples from healthy controls. The median of each group is indicated in the diagrams. Statistical analysis was performed using the Student t-test. Differences between pre- and post-lenalidomide samples are indicated as *P* values and those between either pre- or post-lenalidomide samples and samples from healthy controls are indicated as *+P* values. BM: bone marrow; PB: peripheral blood; MDS: myelodysplastic syndrome; baseline: prior to lenalidomide treatment; post lena: after lenalidomide treatment; HD: healthy donor.

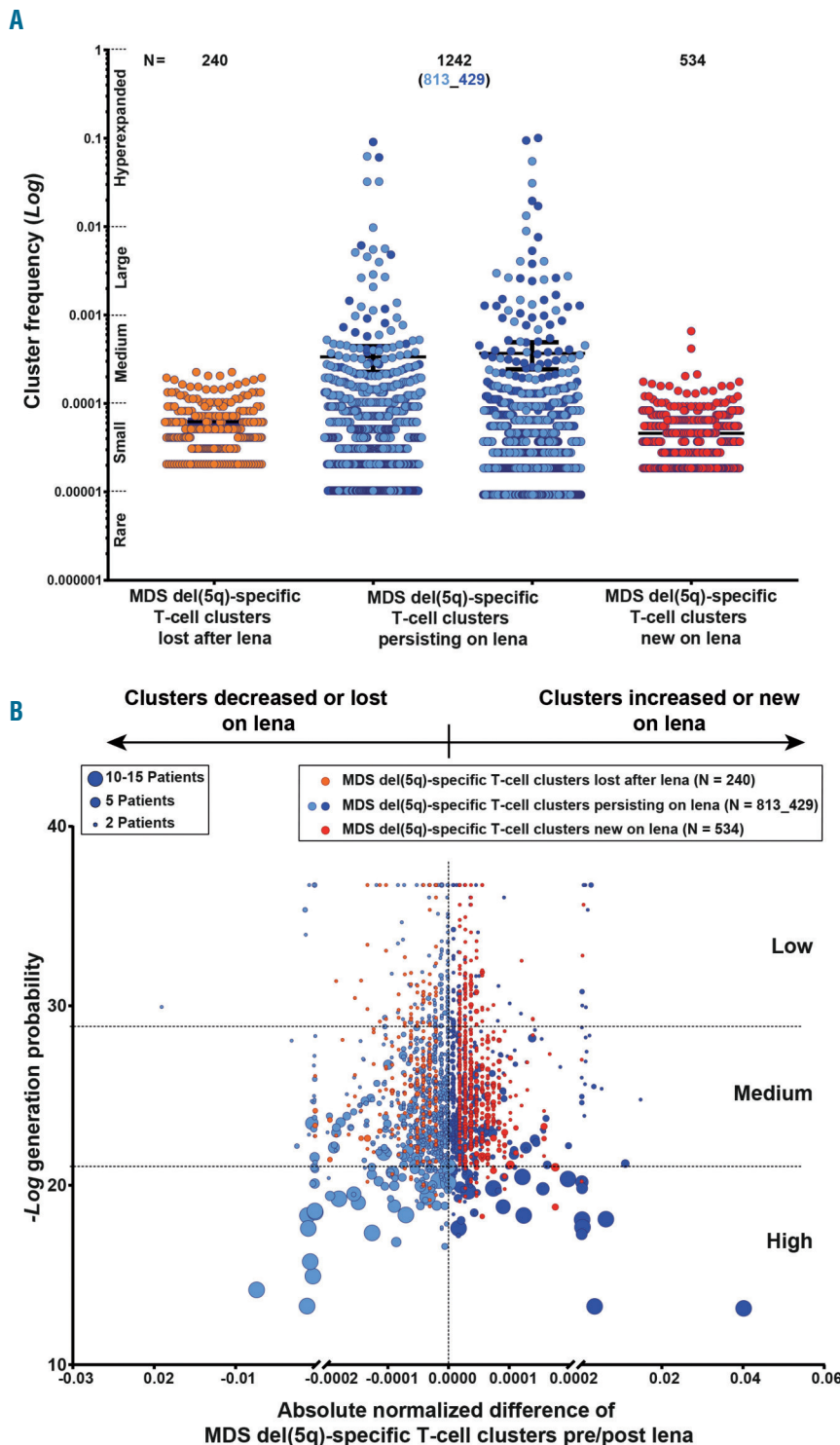


**Figure 4.** TRB clonality in the peripheral blood and bone marrow of patients with del(5q) myelodysplastic syndromes at baseline and after initiation of lenalidomide treatment. (A,B) Clonality index of the TRB repertoire in samples of bone marrow (A) and peripheral blood (B) from patients with myelodysplastic syndromes before and after lenalidomide treatment and in samples from healthy controls. The median of each group is indicated in the diagrams. Statistical analysis was performed using the Student t-test. Differences between pre- and post-lenalidomide samples are indicated as *P* values and those between either pre- or post-lenalidomide samples and samples from healthy controls are indicated as *+P* values. BM: bone marrow; PB: peripheral blood; MDS: myelodysplastic syndrome; baseline: prior to lenalidomide treatment; post lena: after lenalidomide treatment; HD: healthy donor.

due to non-specific stimulation, but is antigen-driven and directed against the MDS del(5q) clone. Along this line of reasoning, our findings support the concept that the immunomodulatory effect of lenalidomide not only influences the functional state of T cells, but also induces a profound change in the local BM T-cell composition leading to the generation of novel T-cell clusters that can be observed across patients. These clusters, if confirmed by future studies, could also be helpful to explain or even predict resistance or loss of response to lenalidomide.

Moreover, it would be of interest to determine whether these clusters also appear in patients with non-del(5q) disease and represent a general mechanism of action of lenalidomide independently of the del(5q) MDS. This will need to be addressed in future studies.

Expansion of knowledge about the immune response induced by lenalidomide treatment in the BM of MDS patients may be of particular clinical importance in the era of immune checkpoint therapy. Although MDS is considered to be less immunogenic than solid tumors, the obser-



**Figure 5.** *In silico* TRB cluster analysis of del(5q) myelodysplastic syndrome bone marrow samples at baseline and after initiation of lenalidomide treatment. (A) Frequencies and (B) generation probabilities of *in silico*-generated TRB clusters in bone marrow mononuclear cells from patients with del(5q) myelodysplastic syndromes (MDS) at baseline versus post-lenalidomide treatment. Clusters detected in both were designated as shared and are colored according to their frequency (bright blue decreasing, dark blue increasing on treatment). The absolute normalized difference of a cluster was calculated by subtracting the cluster frequencies observed in MDS samples at baseline from frequencies observed in samples after lenalidomide treatment. The size of the dots in (B) represents the numbers of individuals sharing the specific cluster. Lena: lenalidomide.

Table 2. Lenalidomide-induced T-cell clusters.

	Cluster (CDR3 sequence)	*Post-lenalidomide expansion (absolute normalized difference)	Generation probability
Clusters with low generation probability shared by 3 patients	CASREPSGGKPOHF	5.57E-05	31.88
	CATKDRDSNQPQHF	3.71E-05	31.23
	CASSLWGGGDQPQHF	4.64E-05	30.77
	CASSLGGLAGAEQFF	3.71E-05	30.06
	CATSGSGRFYNEQFF	4.64E-05	29.69
Clusters with low generation probability shared by 2 patients	CASSQDFDTQYF	1.86E-05	36.74
	CASTEGRADTIYF	1.86E-05	36.74
	CASSLGGGTAGYEQYF	5.57E-05	36.74
	CASSPDGGRGGEQYF	5.57E-05	36.74
	CAWSDRGLIGAFF	1.86E-05	36.74
	CASSSSQAGTEAFF	2.78E-05	36.74
	CASRSRDRGGDTF	1.86E-05	36.74
	CASSLSAGVLEQYF	3.71E-05	36.74
	CASSSGPRQLFF	3.71E-05	36.04
	CASSLGYPGSASYKQYF	6.59E-04	35.64
	CASSQDSLSGYTF	3.71E-05	35.64
	CSVEALGGATDTQYF	1.86E-05	35.64
	CASSPRGVSQYTF	2.78E-05	34.95
	CASSFPDREQYF	1.86E-05	34.79
	CASSRDRGGVGEKLF	1.86E-05	34.43
	CASTSGLAVTGELFF	2.78E-05	34.25
	CSASPRPLAFF	3.71E-05	34.10
	CASRPAGGRGEQFF	4.64E-05	33.60
	CAS TTAGAGQPQHF	2.78E-05	33.56
	CASSPSTGGANVLTFF	4.64E-05	33.07

\*The absolute normalized difference is calculated by subtracting the cluster frequencies observed in baseline myelodysplastic syndrome (MDS) samples from those detected in MDS samples after lenalidomide treatment.

vation of novel lenalidomide-related T-cell clusters is reminiscent of recent data on response to PD-1 inhibitors following failure of hypomethylating agent treatment.<sup>37,38</sup> It has been shown that hypomethylating agent therapy leads to upregulation of PD-1 and PD-L1 in MDS BM cells, which may be an explanation of the sensitivity of a subset of MDS patients to immune checkpoint therapy after failure of hypomethylating agent treatment. This concept has not yet been tested in lenalidomide-refractory MDS patients. Our data demonstrating emergence of novel T-cell clusters could, therefore, possibly serve as a novel predictive marker for such a strategy, a possibility which warrants further prospective evaluation. Identification of the

antigens recognized by the described lenalidomide-induced shared T-cell clusters could help in the design of novel immunotherapeutic approaches for del(5q) MDS.

#### Acknowledgments

The authors thank the "Hamburger Krebsgesellschaft" for financial support (grant to MB) and the Hubertus Wald Foundation for supporting a professorship (MB) for immunological cancer research and treatment. The authors also thank Janina Radloff and Barbara Goesch for their excellent technical assistance and Prof. Tanja Zeller for providing relevant material. DN is an endowed Professor of the Deutsche Jose Carreras Leukemia Stiftung (DJCLSH03/01).

#### References

- Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385-4395.
- Kuendgen A, Laussek M, List AF, et al. Lenalidomide does not increase AML progression risk in RBC transfusion-dependent patients with Low- or Intermediate-1-risk MDS with del(5q): a comparative analysis. *Leukemia*. 2013;27(5):1072-1079.
- Boultonwood J, Pellagatti A, Cattani H, et al. Gene expression profiling of CD34+ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br J Haematol*. 2007;139(4):578-589.
- Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335-339.
- Boultonwood J, Pellagatti A, McKenzie AN, Wainscoat JS. Advances in the 5q- syndrome. *Blood*. 2010;116(26):5803-5811.
- Dutt S, Narla A, Lin K, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011;117(9):2567-2576.
- Wei S, Chen X, Rocha K, et al. A critical role for phosphatase haploinsufficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12974-12979.
- Pellagatti A, Jadersten M, Forsblom AM, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(27):11406-11411.
- Heise C, Carter T, Schafer P, Chopra R. Pleiotropic mechanisms of action of lenalidomide efficacy in del(5q) myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(10):1663-1672.
- Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, et al. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*. 2011;118(14):3765-3776.
- Giagounidis A, Mufti GJ, Mittelman M, et al. Outcomes in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with isolated deletion 5q treated with lenalidomide: a subset analysis from the MDS-004 study. *Eur J Haematol*. 2014;93(5):429-438.
- Kronke J, Fink EC, Hollenbach FW, et al.

- Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1alpha in del(5q) MDS. *Nature*. 2015;523(7559):183-188.
13. Kronke J, Udeshi ND, Narla A, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science*. 2014;343(6168):301-305.
  14. Eichner R, Heider M, Fernandez-Saiz V, et al. Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon-CD147-MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity. *Nat Med*. 2016;22(7):735-743.
  15. Staffler G, Szekeles A, Schutz GJ, et al. Selective inhibition of T cell activation via CD147 through novel modulation of lipid rafts. *J Immunol*. 2003;171(4):1707-1714.
  16. Hu J, Dang N, Yao H, et al. Involvement of HAb18G/CD147 in T cell activation and immunological synapse formation. *J Cell Mol Med*. 2010;14(8):2132-2143.
  17. Landskron J, Tasken K. CD147 in regulatory T cells. *Cell Immunol*. 2013;282(1):17-20.
  18. McDaniel JM, Zou JX, Fulp W, Chen DT, List AF, Epling-Burnette PK. Reversal of T-cell tolerance in myelodysplastic syndrome through lenalidomide immune modulation. *Leukemia*. 2012;26(6):1425-1429.
  19. Kerdivel G, Chesnais V, Becht E, et al. Lenalidomide-mediated erythroid improvement in non-del(5q) myelodysplastic syndromes is associated with bone marrow immuno-remodeling. *Leukemia*. 2018;32(2):558-562.
  20. Schuler E, Giagounidis A, Haase D, et al. Results of a multicenter prospective phase II trial investigating the safety and efficacy of lenalidomide in patients with myelodysplastic syndromes with isolated del(5q) (LEMON 5). *Leukemia*. 2016;30(7):1580-1582.
  21. Mossner M, Jann JC, Nowak D, et al. Prevalence, clonal dynamics and clinical impact of TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome with isolated deletion (5q) treated with lenalidomide: results from a prospective multicenter study of the German MDS Study Group (GMDS). *Leukemia*. 2016;30(9):1956-1959.
  22. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-2317.
  23. Schliffke S, Akyuz N, Ford CT, et al. Clinical response to ibrutinib is accompanied by normalization of the T-cell environment in CLL-related autoimmune cytopenia. *Leukemia*. 2016;30(11):2232-2234.
  24. Akyuz N, Brandt A, Stein A, et al. T-cell diversification reflects antigen selection in the blood of patients on immune checkpoint inhibition and may be exploited as liquid biopsy biomarker. *Int J Cancer*. 2017;140(11):2535-2544.
  25. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods*. 2015;12(5):380-381.
  26. Glanville J, Huang H, Nau A, et al. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature*. 2017;547(7661):94-98.
  27. Marcou Q, Mora T, Walczak AM. High-throughput immune repertoire analysis with IGoR. *Nat Commun*. 2018;9(1):561.
  28. Kirsch I, Vignali M, Robins H. T-cell receptor profiling in cancer. *Mol Oncol*. 2015;9(10):2063-2070.
  29. Pielou EC. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *J Theor Biol*. 1966;10(2):370-383.
  30. Schliffke S, Sivina M, Kim E, et al. Dynamic changes of the normal B lymphocyte repertoire in CLL in response to ibrutinib or FCR chemo-immunotherapy. *Oncol Immunology*. 2017;e1417720.
  31. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-571.
  32. Riaz N, Havel JJ, Makarov V, et al. Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with nivolumab. *Cell*. 2017;171(4):934-949.
  33. Gros A, Parkhurst MR, Tran E, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med*. 2016;22(4):433-438.
  34. Robert L, Tsoi J, Wang X, et al. CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res*. 2014;20(9):2424-2432.
  35. Cha E, Klinger M, Hou Y, et al. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med*. 2014;6(238):238ra270.
  36. Verhelle D, Corral IG, Wong K, et al. Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells. *Cancer Res*. 2007;67(2):746-755.
  37. Boddu P, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Allison J, Sharma P, Daver N. The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(4):790-802.
  38. Hidalgo-Lopez JE, Kanagal-Shamanna R, Quesada AE, et al. Progress in myelodysplastic syndromes: clinicopathologic correlations and immune checkpoints. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017;17s:S16-S25.



## II. Darstellung der Publikation

### 1. Vorwort

Diese Arbeit dient der zusammenfassenden Darstellung der im Juli 2019 in „*Haematologica, The Journal of the Ferrata Storti Foundation*“ erschienenen Publikation mit dem Titel "*Deep sequencing of bone marrow microenvironments of patients with del(5q) myelodysplastic syndrome reveals imprints of antigenic selection as well as generation of novel T cell clusters as response pattern to lenalidomide*". Die Schrift orientiert sich am Aufbau der Originalarbeit. Ergänzende, detaillierte Informationen über die angewandte Methodik und Ergebnisse inklusive der Abbildungen sind der oben aufgeführten Publikation zu entnehmen.

### 2. Einleitung

Die myelodysplastischen Syndrome (MDS) sind klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzellen, welche klinisch zu einer ineffektiven Hämatopoese führen. Sie stellen die größte Gruppe der erworbenen Erkrankungen mit Knochenmarksversagen bei Erwachsenen dar (Bejar and Steensma, 2014, Yoshida, 1996, Heaney and Golde, 1999). Studien schätzen die Neuerkrankungsrate auf 30.000 bis 40.000 Fälle pro Jahr allein für die Vereinigten Staaten von Amerika (Cogle et al., 2011, Goldberg et al., 2010). Die Inzidenz für Europa liegt ähnlich hoch und wird vermutlich auf Grund des immer höheren Alters der Bevölkerung in den nächsten Jahren noch weiter ansteigen (Malcovati et al., 2013). Die Diagnose MDS wird anhand der mikroskopischen Untersuchung von Knochenmarkaspirat und einer Knochenmarkbiopsie gestellt. Die Proben werden nach Anzahl der verschiedenen Zellreihen, Grad der Dysplasie und Anzahl der Blasten im Knochenmark beurteilt. Zusätzlich erlauben zytogenetische Analysen eine genauere Einteilung nach der aktuellen WHO-Klassifikation (siehe Tabelle 1), sind aber für die Diagnosestellung nicht erforderlich (Arber et al., 2016, Garcia-Manero, 2014). Die häufigste zytogenetische Aberration stellt die Deletion des langen Armes von Chromosom 5, del(5q), dar (Haase et al., 2007). Diese Untergruppe charakterisiert sich häufig durch eine refraktäre Anämie, Thrombozytämie mit atypischen Megakaryozyten im Knochenmark und einer vergleichsweise geringen Progressionsrate zu einer akuten myeloischen Leukämie (Tefferi and Vardiman, 2009, Hofmann and Koeffler, 2005, Kuendgen et al., 2013). Das mediane Erkrankungsalter liegt etwa bei 66 Jahren und im Gegensatz zu anderen MDS-Formen sind Frauen häufiger betroffen als Männer (Giagounidis et al., 2004). Mit einem medianen Überleben von etwa 80 Monaten hat dieser Subtyp im Vergleich zu anderen eine gute Prognose (Haase et al., 2007). Auch wenn die Pathogenese größtenteils durch die Haploinsuffizienz der auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 liegenden Gene erklärbar ist, gibt es Hinweise auf Dysregulationen des

angeborenen und adaptiven Immunsystems, mit daraus resultierender Beeinträchtigung der Bekämpfung von klonalen del(5q) Zellen (Heise et al., 2010, Boulton et al., 2007, Boulton et al., 2010).

Name	Dysplastic lineages	Cytopenias*	Ring sideroblasts as % of marrow erythroid elements	BM and PB blasts	Cytogenetics by conventional karyotype analysis
MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD)	1	1 or 2	<15%/<5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD)	2 or 3	1-3	<15%/<5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
<b>MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)</b>					
MDS-RS with single lineage dysplasia (MDS-RS-SLD)	1	1 or 2	≥15%/≥5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS-RS with multilineage dysplasia (MDS-RS-MLD)	2 or 3	1-3	≥15%/≥5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with isolated del(5q)	1-3	1-2	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	del(5q) alone or with 1 additional abnormality except -7 or del(7q)
<b>MDS with excess blasts (MDS-EB)</b>					
MDS-EB-1	0-3	1-3	None or any	BM 5%-9% or PB 2%-4%, no Auer rods	Any
MDS-EB-2	0-3	1-3	None or any	BM 10%-19% or PB 5%-19% or Auer rods	Any
<b>MDS, unclassifiable (MDS-U)</b>					
with 1% blood blasts	1-3	1-3	None or any	BM <5%, PB = 1%,‡ no Auer rods	Any
with single lineage dysplasia and pancytopenia	1	3	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any
based on defining cytogenetic abnormality	0	1-3	<15%§	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	MDS-defining abnormality
Refractory cytopenia of childhood	1-3	1-3	None	BM <5%, PB <2%	Any

Tabelle 1: WHO-Klassifikation und Kriterien für myelodysplastische Syndrome (Arber et al., 2016)

Lenalidomid wurde erfolgreich Mitte der 90er Jahre als Derivat des Thalidomids mit dem Ziel entwickelt, eine Substanz mit stärkeren immunologischen und antikrebs Eigenschaften und gleichzeitig weniger typischen unerwünschten Wirkungen wie Somnolenz, Obstipation und Neuropathien zu schaffen (Bartlett et al., 2004). Aktuell wird es speziell bei der Therapie von MDS mit begleitender Deletion des langen Armes von Chromosom 5 und den multiplen Myelomen eingesetzt (Ades and Fenaux, 2011, Holstein and McCarthy, 2017). Eingeschlossen in die LE-MON 5 Studie, im Rahmen derer auch das in der Originalarbeit untersuchte Patientenkollektiv behandelt wurde, wurden 89 Patienten mit MDS del(5q), welche in den letzten 8 Wochen vor Rekrutierung auf eine Transfusion von Erythrozytenkonzentraten angewiesen waren. Zusätzliche Einschlusskriterien waren ein Blastenanteil im Knochenmark von unter 5% und laut „*International prognostic scoring system*“ (IPSS) eine Zuordnung zur Risikoklasse „*low*“ oder „*intermediate-1*“. Es wurde eine orale Behandlung mit 10 mg Lenalidomid für 21 Tage in einem 28 Tage Zyklus durchgeführt. 60 Patienten erreichten eine Transfusionsunabhängigkeit mit einem medianen Anstieg des Hämoglobins um 3.6g/dl (Schuler et al., 2016). Außerdem konnten andere Studien zeigen, dass ein Ansprechen auf die Therapie mit einem signifikanten Anstieg des

Patientenüberlebens vergesellschaftet war (Giagounidis et al., 2014). Der primäre Mechanismus, über den Lenalidomid seine Wirkung gegen die klonalen Zellen mit del(5q) entfaltet, ist die Initiierung der Ubiquitinierung und damit Degradation von IKZF1, IKZF3 und CK1 $\alpha$  durch Bindung an Cereblon (CRBN), welches ein Substratrezeptor des CRL4-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist (Kronke et al., 2015, Kronke et al., 2014). Eine besondere Rolle spielt hier das CK1 $\alpha$ , welches auf der bei MDS del(5q) fehlenden Region kodiert ist. Es ist ein negativer Regulator von TP53 und durch die vorliegende Haploinsuffizienz ein ausgezeichnetes Ziel für Lenalidomid (Kronke et al., 2015). Ein weiterer Effekt von Lenalidomid ist die Destabilisierung des CD147-MCT1 Komplexes, was zu einer Aktivierung von Immunzellen führt (Eichner et al., 2016). Zusätzlich konnte *in vitro* durch eine Stimulierung des T-Zell-Rezeptor(TCR)-Komplexes mit vernetzenden CD3-Antikörpern in Anwesenheit von Lenalidomid ein deutlicher Effekt auf den funktionellen Status von T-Zellen nachgewiesen werden. Dies führte zu einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen und Proliferation. Interessanterweise war ohne gleichzeitige TCR Stimulation kein Effekt messbar, was darauf hindeutet, dass Lenalidomid keine eigene mitogene Aktivität in T-Zellen besitzt (McDaniel et al., 2012). Die Stimulation von NK-Zellen und der NK-Zell vermittelten „antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität“ (ADCC) zählt ebenfalls zu den Effekten von Lenalidomid (Davies et al., 2001, Tai et al., 2005). Abgesehen von einer direkten aktivierenden Wirkung auf Zellen des Immunsystems beobachteten Kerdivel et al. eine veränderte Zusammensetzung des Immunmilieus im Knochenmark von Patienten, die ein Ansprechen auf die Therapie mit Lenalidomid gezeigt hatten (Kerdivel et al., 2018). Trotz aller Fortschritte sind die genauen immunmodulatorischen Effekte von Lenalidomid bis heute nicht völlig verstanden.

Mit der Entwicklung des „*Next Generation Sequencing*“ (NGS) kam es zu einer Revolutionierung innerhalb der Genomforschung. Plötzlich war es möglich, das gesamte menschliche Genom innerhalb weniger Tage zu sequenzieren und das zu relativ geringen Kosten, die in den vergangenen Jahren noch weiter gefallen sind (Behjati and Tarpey, 2013, Levy and Myers, 2016). Mit dieser Technik konnten ebenfalls deutliche Fortschritte im Bereich der Immunrepertoireforschung erzielt werden. Das Immunrepertoire eines Menschen ist definiert als die Summe aller T- und B-Zellen, welche das adaptive Immunsystem ausmachen. Jede einzelne T- und B-Zelle besitzt auf der Zelloberfläche einen für diese Zelle spezifischen und einmaligen Rezeptor, T-Zell Rezeptor (*TCR*) und B-Zell Rezeptor (*BCR*) genannt. Beide Rezeptoren sind als Heterodimere aufgebaut. Der *BCR* besteht aus einer leichten und einer schweren Kette, der *TCR* aus einer alpha und beta Kette (siehe Abbildung 1). Die Sequenz für die Antigenbindungsstellen von *TCR* und *BCR*, auch „variable Region“ genannt, entsteht durch Genumlagerung und ihre Vielfalt determiniert die Diversität und Spezifität der möglichen Antigenerkennung. Bei der schweren Kette des BCR, sowie der

beta Kette des TCR, setzt sie sich aus verschiedenen zufälligen Kombinationen von *V*- (*variable*), *D*- (*diversity*) und *J*-Genfamilien (*joining*) zusammen und bildet vier weniger variable Gerüstregionen („*framework regions 1-4*“, FR-1-4) und drei hypervariable Regionen („*complementary determining regions 1-3*“, CDR-1-3) (Liu and Wu, 2018, Padlan, 1994, Dal

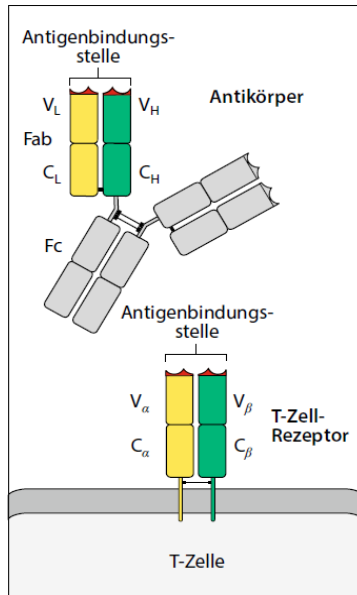


Abbildung 1: Schematische Darstellung des membrangebundenen T- und löslichen B-Zell Rezeptors. Der T-Zell Rezeptor ähnelt einem membrangebundenen Fab-Fragment. Das Fab-Fragment von Antikörpermolekülen (lösliche BCR) ist ein durch Disulfidbrücken verknüpftes Heterodimer. Jede Kette enthält eine konstante Immunglobulinomäne und eine variable Domäne. Die nebeneinanderliegenden variablen Domänen bilden die Antigenbindungsstelle (Murphy and Weaver, 2018)

Porto et al., 2004). Die Diversität des BCR wird durch somatische Hypermutation noch weiter erhöht. Bei diesem Prozess werden durch das Enzym „aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase“ (AID) einzelne Aminosäuren in den V-Genen mutiert, wodurch Antikörper mit höherer Affinität für bestimmte Antigene entstehen können (Maizels, 2005, Papavasiliou and Schatz, 2002).

Die CDR3 Regionen der schweren Kette (*IGH*) des BCR und der beta Kette (*TRB*) des TCR spielen auf Grund ihrer höheren Variabilität und Spezifität eine dominante Rolle in der Antigenerkennung und eignen sich deshalb besonders gut als Ziel bei der Immunrepertoireforschung (Xu and Davis, 2000). Ziel unserer Arbeit war es, die klonale Immunarchitektur von MDS del(5q) und ihre Modulation durch Lenalidomid besser zu verstehen. Dafür haben wir Proben aus Knochenmark und peripherem Blut von Patienten vor und nach Behandlung mit Lenalidomid und gesunden Kontrollgruppen mit *IGH* und *TRB* „*Next Generation Sequencing*“ analysiert. Unsere Auswertung zeigt, dass Lenalidomid die adaptive Immunantwort von T-Zellen im Knochenmark beeinflusst.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patienten-Charakteristika

Die Knochenmarksproben der Patienten wurden zwischen den Jahren 2013 und 2016 im Rahmen der LE-MON 5 und Bioregister Studien gesammelt. Die Kohorte umfasst 15 Patienten mit del(5q) MDS (Proben wurden vor dem Start der Therapie und nach im Median 12 Monaten Behandlung mit Lenalidomid gesammelt). Für 8 Patienten der Kohorte waren auch an entsprechenden Zeitpunkten gewonnene periphere Blutproben verfügbar. Alle del(5q) MDS Patienten wurden im Rahmen der LE-MON 5 Studie behandelt, bei der es sich

um eine deutsche, multizentrische, einarmige open-label Phase II Studie (*Safety of Lenalidomide Monotherapy and Markers for Disease Progression in Patients With IPSS Low- or Intermediate-1 Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) Associated With an Isolated Deletion 5q Cytogenetic Abnormality*) handelt (Schuler et al., 2016). Als Referenz wurden 7 Knochenmark- und 22 periphere Blutproben von gesunden Spendern passenden Alters eingeschlossen.

### **3.2 Angaben zu der Studie**

Von allen Patienten und gesunden Spendern wurde eine Einverständniserklärung für die Verwendung der Reste ihres diagnostischen Materials zu wissenschaftlichen Zwecken eingeholt. Dies wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Deutschland, Projektnummer MC-LKP-392, genehmigt.

### **3.3 Isolierung von genomischer DNA aus mononukleären Zellen**

Die genomische DNA wurde aus  $>10^6$  mononukleären Zellen gewonnen, die entweder aus gefrorenem Knochenmark (BMMNC) oder peripherem Blut (PBMNC) stammten. Dafür wurde das „Gen Elute mammalian genomic DNA miniprep kit“ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), entsprechend den Anweisungen des Herstellers, verwendet.

### **3.4 Multiplex PCR zur Amplifikation der Immunglobulin schwere Kette und des T-Zell Rezeptor beta für zielgerichtetes Illumina Next Generation Sequencing**

Die rearrangierten V-, D- und J-Gensegmente aus den Immunglobulin schwere Kette (*IGH*) und T-Zell Rezeptor beta (*TRB*) Genen wurden mit Hilfe der BIOMED2-FR1 (*IGH*), -*TRB*-A und -B Primer Pools amplifiziert (van Dongen et al., 2003). Dafür wurden pro Probe etwa 250ng genomische DNA verwendet. Bei der ersten PCR wurden mit Hilfe der zuvor publizierten Primer sowohl die VDJ-rearrangierten *IGH* und *TRB* Gene amplifiziert als auch ein Teil der Illumina NGS kompatiblen Adapter integriert (van Dongen et al., 2003, Schliffke et al., 2016, Akyuz et al., 2017). In einer zweiten PCR wurden Primer benutzt, um die Illumina Adapter zu verlängern und so eine spätere Hybridisierung der amplifizierten Fragmente an der Illumina „flow cell“ zu ermöglichen. Außerdem wurde ein 7 Nukleotide umfassender Barcode eingefügt, welcher während der Datenanalyse eine genaue Zuordnung der Sequenzen zu Patient, Gewebe und Zeitpunkt ermöglicht. Alle amplifizierten Fragmente mit der erwarteten Größe wurden nach der Agarose Gel-Elektrophorese mit Hilfe des „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gereinigt. Vor dem Start der Sequenzierung erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der amplifizierten Fragmente mit dem Qubit (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Die Qualität der

Proben wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) überprüft.

### **3.5 Illumina Next Generation Sequencing und Datenanalyse**

Das „Next Generation Sequencing“ (NGS) wurde mit dem Illumina MiSeq Sequenzierer (600-cycle single indexed, paired-end run, V3-chemistry) durchgeführt. Für die Analyse und Berechnung der VDJ-rearrangierten IGH und TRB Loci wurden die Programme MiXCR und ENPICOM's ImmunoGenomix Plattform verwendet. Die GLIPH (*grouping of lymphocyte interactions by paratope hotspots*) Clusteranalysen und die Berechnung der „Entstehungswahrscheinlichkeiten“ wurden gemäß früherer Publikationen durchgeführt (Glanville et al., 2017, Marcou et al., 2018).

### **3.6 Analyse der Diversität der IGH und TRB Repertoires**

Diversität oder Klonalität wird durch verschiedene Indices dargestellt. Wir haben für die Analyse der B- und T-Zell Repertoires den *Clonality index* verwendet. Der *Clonality index* wird nach der Formel “1 - Pielou's evenness” berechnet (Kirsch et al., 2015). *Pielou's evenness* wiederum bestimmt man mit der Formel  $J = H'/\ln(S)$ , wobei H' der Shannon-Wiener Diversitätsindex und S die absolute Zahl an Klonen in einer spezifischen Probe sind (Pielou, 1966). Der *Clonality index* reicht von 0 bis 1, wobei 0 absolute Diversität und 1 absolute Klonalität mit der Anwesenheit von nur einem Klon bedeutet.

### **3.7 In silico Analyse der T-Zell Repertoires mit Hilfe von GLIPH und Entstehungswahrscheinlichkeiten Tools**

Um zu analysieren, ob die TRB Repertoires von unterschiedlichen MDS del(5q) Patienten vor oder nach Lenalidomid Behandlung oder im Vergleich zu den gesunden Spendern Gemeinsamkeiten in Bezug auf die CDR3 Regionen zeigen bzw. diese sich in Cluster zusammenfassen lassen, haben wir den GLIPH Algorithmus auf die NGS generierten TRB - Daten der gesunden Spender und MDS del(5q) Patienten angewendet (Glanville et al., 2017). In einem zweiten Schritt haben wir die Entstehungswahrscheinlichkeiten der GLIPH generierten TRB Cluster mit dem IGoR Algorithmus bestimmt (Marcou et al., 2018). Um niedrige Wahrscheinlichkeitswerte besser abbilden zu können, haben wir den negativen Logarithmus benutzt. Cluster mit einer niedrigen Entstehungswahrscheinlichkeit sind höchstwahrscheinlich durch Antigen induzierte Selektion entstanden. Nach unserem Wissen existiert jedoch kein Grenzwert, der „niedrige Entstehungswahrscheinlichkeit“ definiert. Um unsere Daten besser darstellen zu können, entschieden wir uns, die Spanne zwischen den geringsten (13,1400259) und den höchsten (36,7368006) beobachteten Werten für die Entstehungswahrscheinlichkeit in drei gleich große Bereiche zu teilen. So haben wir für unsere Studie eine niedrige Entstehungswahrscheinlichkeit für die Werte von 28,871210 bis



36,73688006, eine mittlere von 21,0056176 bis 28,871209 und eine hohe von 13,1400259 bis 21,0056175 definiert.

### **3.8 Statistische Analysen**

Verteilungsunterschiede wurden mit dem *Student t-test* untersucht. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 MDS del(5q) Patienten zeigen kein krankheits- oder behandlungsspezifisches Muster in Bezug auf die VJ-Genverteilung und CDR3-Längenverteilung**

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir das B- und T-Zell Repertoire unserer MDS del(5q) Kohorte mit dem von gesunden Spendern passenden Alters verglichen. Untersucht wurden hierbei die VJ-Genverteilung, die Längenverteilung der CDR3 Regionen und bei mehreren Patientenproben gemeinsam vorkommende Klone. Als Zielsequenz für das NGS haben wir für die B-Zellen das *IGH* und für die T-Zellen das *TRB* Gen ausgewählt. Die Analysezeitpunkte lagen bei allen Patienten vor, sowie 6-42 Monate nach Beginn der Therapie mit Lenalidomid. Ziel war es, eventuelle krankheitsspezifische Muster im Repertoire der Immunzellen oder Veränderungen dieses Repertoires als Reaktion auf die Lenalidomidbehandlung aufzudecken. Es konnten keine spezifischen B- oder T-Zell Klone, bei mehreren Patienten „überlappend“ nachgewiesen werden, was einen Hinweis auf ein krankheitsspezifisches Vorhandensein gegeben hätte. Allerdings zeigte sich bei den T-Zellen für alle KM und PB Proben desselben Patienten eine deutliche Überlappung, nicht aber bei den B-Zellen. Bezogen auf die Verwendung der V und J-Gene bei den MDS del(5q) Patienten war kein Unterschied im Vergleich zu den gesunden Spendern feststellbar. Zusätzlich fand sich hier kein Anhalt für eine gerichtete Veränderung der Verwendung von V- und J-Genen unter Therapie mit Lenalidomid. Im Zuge einer Immunantwort von T- und B-Zellen auf ein Antigen kann es zu Änderungen in der Länge oder Aminosäuresequenzen der CDR3 Region kommen (Fields et al., 1996, Kou et al., 2000). Bei der Untersuchung der CDR3 Längenverteilung der Immunrepertoires der MDS Patienten vor und nach Behandlung mit Lenalidomid und der gesunden Spender ließ sich sowohl bei den B- als auch den T-Zellen kein Unterschied feststellen (siehe Abbildung 2 und 3).





#### **4.2 Das B-Zell Repertoire im Knochenmark von MDS del(5q) Patienten erholt sich nach Lenalidomidtherapie**

Bei der Analyse der B-Zell Repertoires vor und nach der Therapie mit Lenalidomid zeigte sich, dass das B-Zell Kompartiment im Knochenmark von MDS del(5q) Patienten vor Therapie, in Bezug auf die Klonalität, vergleichbar mit dem der gesunden Spender passenden Alters war. Allerdings fiel eine signifikant höhere Hypermutationsrate der IGH Klone auf. Da der Prozess der Hypermutation nur bei reifen B-Zellen nach Auslösung einer Immunantwort stattfindet (Li et al., 2004), spricht dies für einen größeren Anteil an durch Antigene aktivierte B-Zellen. Nach Therapie mit Lenalidomid kam es im Knochenmark zu einer signifikanten Abnahme der Klonalität im B-Zell Kompartiment noch unter die Werte der gesunden Spender. Im peripheren Blut war dies nicht zu beobachten. Zusätzlich sank die Rate an hypermutierten B-Zell Klonen in Knochenmark und peripherem Blut signifikant auf Werte, die in etwa denen der gesunden Spender passenden Alters entsprachen.

#### **4.3 Unter Therapie mit Lenalidomid kommt es im Knochenmark von MDS del(5q) Patienten zu einer erhöhten Klonalität der T-Zell Repertoires und zur Generierung Antigen induzierter T-Zell Cluster**

Die *TRB* Klonalität war im Knochenmark der MDS del(5q) Patienten, im Vergleich zu den gesunden Spendern deutlich erhöht. Dies galt sowohl für den Zeitpunkt vor als auch nach Beginn der Lenalidomidtherapie. Bei den Proben aus peripherem Blut ließ sich hingegen kein Unterschied zwischen Patienten und gesunden Spendern feststellen. Diese Tatsache spricht für eine Antigen gesteuerte klonale Selektion von T-Zellen, die lokal auf das Knochenmark begrenzt ist. Daher wurden die *GLIPH* Analysen nur mit den aus Knochenmarkspalten gewonnenen *TRB* Repertoires durchgeführt. Per Algorithmus wurden bei der *GLIPH* Analyse T-Zellen mit wahrscheinlich gleicher Antigenpezifität zu Clustern zusammengefasst. Für die Erstellung der Cluster waren das Vorhandensein von konservierten Aminosäure-Motiven und eine hohe Ähnlichkeit der CDR3-Sequenzen entscheidend (Glanville et al., 2017). Nur T-Zell Cluster, die ausschließlich bei MDS del(5q) Patienten beobachtet und bei mindestens 2 Patienten gefunden wurden, wurden für weitere Analysen berücksichtigt. Mit Hilfe des zweiten Algorithmus *IGoR* konnten zusätzlich die Entstehungswahrscheinlichkeiten dieser Cluster berechnet werden (Marcou et al., 2018). Bei der Betrachtung der zu beiden Probenzeitpunkten existenten Cluster (n=1242) ließ sich feststellen, dass der größte Teil (n=813) nach der Therapie in der Frequenz abnahm. Die Cluster mit zunehmender Frequenz unter Therapie wiesen eine hohe Entstehungswahrscheinlichkeit auf und waren deshalb sehr wahrscheinlich nicht Teil einer spezifischen T-Zell Antwort gegen den vorhandenen MDS del(5q) Klon. Es fanden sich 240 Cluster, welche nur vor dem Zeitpunkt des Therapiebeginns vorhanden waren. Eine

wesentlich höhere Zahl an neu entstandenen Clustern nach Therapiebeginn (n=534) lässt auf eine durch Lenalidomid induzierte Entstehung schließen. Da diese neuen Cluster auch eine deutlich niedrigere Entstehungswahrscheinlichkeit aufwiesen als jene, die zu beiden Zeitpunkten vorhanden waren und unter der Therapie expandierten, wird die Vermutung unterstützt, dass diese neuen Cluster im Zuge einer spezifischen Immun-Antwort gegen den MDS del(5q) Klon entstanden sind. Zusammen deuten diese Informationen darauf hin, dass die durch Lenalidomid induzierte T-Zell Immunität durch neu entstehende spezifische T-Zell Cluster im Knochenmark von MDS del(5q) Patienten vermittelt wird.

## 5. Diskussion

Lenalidomid gehört zur Gruppe der immunmodulatorischen Substanzen und wird erfolgreich in der Therapie von MDS del(5q) und den multiplen Myelomen eingesetzt. Obwohl es für diese Indikation seit dem Jahr 2005 von der *American Drug Association* eine Zulassung besitzt, sind noch immer viele Aspekte seiner immunmodulatorischen Wirkungsweise unbekannt. Wir haben das B- und T-Zell Milieu von MDS del(5q) Patienten im Knochenmark sowie im peripheren Blut vor und nach Therapie mit Lenalidomid untersucht. Hierfür wurde fortschrittlichste NGS („*Next Generation Sequencing*“) Technologie, welche die Immunrepertoireforschung auf Grund der massiv erhöhten Datenverarbeitungs- und Sequenzierungstiefe bei gleichzeitig wesentlich geringeren Kosten in den letzten Jahren revolutioniert hat, verwendet. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Lenalidomid neben seiner über Cereblon vermittelten direkten Wirkung auf den del(5q) Klon (Kronke et al., 2014, Kronke et al., 2015) auch Einfluss auf den funktionellen Status von Zellen des Immunsystems besitzt (McDaniel et al., 2012, Kotla et al., 2009, Reske et al., 2010). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Lenalidomid darüber hinaus einen Effekt auf die Komposition des B- und T-Zell Kompartimentes im Knochenmark, aber auch im peripheren Blut von MDS del(5q) Patienten besitzt.

Obwohl unsere durchschnittliche Sequenzierungstiefe die größtmögliche Zahl an verschiedenen B-Zellen in der hier eingesetzten Probenmenge überstieg, ließ sich kaum eine Überlappung der B-Zell Repertoires der einzelnen MDS del(5q) Patienten vor und nach Therapie mit Lenalidomid feststellen. Zusammen mit der unter Therapie gesunkenen Hypermutationsrate, was für einen größeren Anteil an noch nicht Antigen exponierten B-Zellen spricht, deutet dies darauf hin, dass es sich bei den vielen kleinen Klonen, welche nach Therapiebeginn zu finden waren, um neu generierte Klone handelt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen früherer Studien, welche einen proliferativen Effekt von



Lenalidomid auf gesunde Vorläufer-B-Zellen beschrieben haben (Acebes-Huerta et al., 2014, Kerdivel et al., 2018, Verhelle et al., 2007).

Im Vergleich zu den gesunden Spendern war die T-Zell Klonalität im Knochenmark der MDS del(5q) Patienten deutlich höher als im peripheren Blut. Dies ist höchstwahrscheinlich bedingt durch eine T-Zell vermittelte Immunreaktion gegen den im Knochenmark vorliegenden del(5q) Stammzellklon. Erwähnenswert ist auch die wesentlich höhere Überlappung von gleichen T-Zell Klonen in Knochenmark und peripherem Blut der einzelnen MDS del(5q) Patienten zu beiden Messzeitpunkten, welche bei den B-Zellen nicht zu beobachten war. Wir konnten mit Hilfe der *GLIPH* Analyse feststellen, dass der größte Teil der vor Therapiebeginn existenten MDS spezifischen T-Zell Klone zahlenmäßig zurückging oder verschwand. Von besonderem Interesse ist die Gruppe der unter Therapie neu aufgetretenen T-Zell Cluster mit einer niedrigen bis mittleren Entstehungswahrscheinlichkeit, von denen einige bei 2 oder 3 Patienten gleichzeitig zu finden waren. Diese Tatsache spricht stark für eine gerichtete, Antigen vermittelte Reaktion neu generierter T-Zell Cluster gegen den MDS del(5q) Klon unter Lenalidomidtherapie. Die von uns festgestellten Veränderungen im Immunrepertoire der MDS del(5q) Patienten sind ein Hinweis, dass Lenalidomid nicht nur den funktionellen Status von T-Zellen beeinflusst, sondern, speziell im Knochenmark, zu Änderungen im lokalen T-Zell Kompartiment mit Generierung neuer MDS spezifischer Cluster führt. Da wir unsere Studie mit einem vergleichsweise kleinen Patientenkollektiv durchgeführt haben, wäre es sinnvoll, in diesem Bereich weitere Studien mit größeren Patientenzahlen folgen zu lassen.

Interessant wäre, ob sich die Wirkung auf die Komposition des T-Zell Kompartiments auch bei MDS Patienten ohne del(5q) und anderen Krankheitsentitäten nachweisen lässt, in denen Lenalidomid in der Therapie eingesetzt wird. Bei *in vitro* Versuchen konnte Lenalidomid eine Steigerung der Antigen spezifischen T-Zell Antwort gegen ein Peptid des MART-1 Tumor Antigens (Melan-Aaa26-35\*A27L), welches mit dem auf malignen und nicht-malignen Plasmazellen vorkommenden HM1.24aa22-30 Myelom-Antigen kreuzreagiert, nachgewiesen werden. (Neuber et al., 2011, Ozaki et al., 1997, Ozaki et al., 1998, Harada et al., 2013). Krämer et al. versuchten diese verstärkte Myelom spezifische T-Zell Antwort mit einer Kohorte von 34 Patienten auch *in vivo* nachzuweisen. Bei den 13 Patienten, die mit Lenalidomid behandelt wurden, zeigte sich eine deutlich gesteigerte Frequenz von HM1.24aa22-30 spezifischen T-Zell Antworten im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=21), welche nicht mit Lenalidomid behandelt wurde (Kramer et al., 2016). Auch in der Behandlung der chronisch lymphatische Leukämie (CLL) findet Lenalidomid seine Anwendung. Aue et al. konnten bei mit Lenalidomid behandelten CLL Patienten eine gesteigerte Infiltration von T-Zellen in Lymphknoten nachweisen. Zusätzlich zeigte sich in der Tiefensequenzierung der



Lymphknotenbiopsien eine verringerte Diversität des *TRB* und T-Zell Rezeptor alpha Repertoires, was die Autoren als Ergebnis der Expansion von ausgesuchten Klonen ansahen (Aue et al., 2018). Sollte sich die Existenz von spezifischen Cluster/Klone als Reaktion auf Lenalidomid in zukünftigen Studien bestätigen und auch außerhalb des MDS del(5q) Settings nachweisbar sein, könnte dies in der Behandlung dieser Patienten neue Optionen eröffnen. Möglicherweise könnten sie als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf die Therapie oder eine Resistenzentwicklung dienen. Darüber hinaus bekommen Immuntherapien wie die Checkpoint Inhibitoren oder auch Chimärer Antigen Rezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) einen immer größeren Stellenwert in der Behandlung von hämatologischen Erkrankungen. Für die Medikamentengruppe der hypomethylierenden Substanzen (*HMA*), welche regelhaft bei der Behandlung von MDS eingesetzt werden, konnte zuletzt eine steigender Effekt auf die Expression von PD-1 und PDL-1 in MDS Knochenmarkszellen festgestellt werden (Yang et al., 2014, Boddu et al., 2018). Die Behandlung mit Checkpoint Inhibitoren, parallel oder nach Versagen der HMA Therapie, ist Gegenstand aktueller Forschung, konnte aber erste ermutigende Ergebnisse liefern (Boddu et al., 2018, Hidalgo-Lopez et al., 2017, Daver et al., 2019). Die Mechanismen der Resistenzentwicklung unter Lenalidomidtherapie sind noch unverstanden und das Konzept der Checkpoint Inhibition nach Versagen der Lenalidomidtherapie ist noch nicht in klinischen Studien untersucht worden. Interessant ist die Tatsache, dass Krämer et al. bei 6 von 12 Patienten mit multiplen Myelom, die unter Lenalidomidtherapie einen Rückfall erlitten hatten, in vitro durch Stimulation mit Lenalidomid nach wie vor eine verstärkte T-Zell Immunreaktion auslösen konnten (Kramer et al., 2016). Dies könnte dafür sprechen, dass die Resistenzentwicklung nicht auf einem Wirksamkeitsverlust an den T-Zellen beruht. In einer zweiten Studie, in welcher die Kombination von Lenalidomid und Prednisolon bei niedrig Risiko MDS non del(5q) untersucht wurde, hatte ein Großteil der Patienten ohne ein Ansprechen auf die Therapie (14/20) im Vorfeld eine Behandlung mit *HMA* bekommen (Komrokji et al., 2019). Ob eine Therapie mit Checkpoint Inhibitoren parallel oder erst nach Versagen einer Lenalidomidtherapie sinnvoll sein kann, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Eine genaue Identifizierung der durch die neuen Lenalidomid induzierten T-Zell Cluster erkannten Antigene, könnte zudem neue immuntherapeutische Ansätze möglich machen. Monoklonale und bispezifische Antikörper sowie vereinzelt auch CAR-T-Zellen werden gegenwärtig schon in der Therapie der multiplen Myelome gegen maligne entartete Plasmazellen eingesetzt (Franssen et al., 2019, Mikkilineni and Kochenderfer, 2017). Sollte es sich bei den identifizierten Epitopen, auf durch Lenalidomid induzierten T-Zell Clustern, um hochspezifische Strukturen nur auf den malignen Zellen handeln, wäre in Zukunft auch eine Entwicklung dieser Therapien für MDS Patienten mit und ohne del(5q) denkbar.

## 6. Zusammenfassung

Es sind noch immer nicht alle Aspekte der Wirkungsweise von immunmodulatorischen Substanzen, allen voran Lenalidomid, bei der Behandlung von Erkrankungen des blutbildenden Systems verstanden. Ein Einfluss auf den funktionellen Status von Immunzellen wird in der Literatur seit längerem beschrieben. Ziel dieser Studie war es, die möglichen Effekte von Lenalidomid auf die Komposition des Immunrepertoires, folglich der T- und B-Zellen von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) mit einer Deletion des langen Armes von Chromosom 5 del(5q) im Knochenmark und peripheren Blut zu untersuchen. Hierfür wurden 15 Knochenmarkproben und 8 Proben peripheres Blut von MDS del(5q) Patienten vor und nach der Therapie und Proben von gesunden Spendern passenden Alters mittels modernster „Next Generation Sequencing“ (NGS) Technologie untersucht. Die Beobachtungen im B-Zell Kompartiment lassen auf einen proliferativen Effekt auf unreife noch nicht Antigen exponierte B-Zellen schließen. Dies wurde für Lenalidomid schon früher beschrieben. Mit Hilfe von Algorithmen konnten aus den Datensätzen der Proben T-Zellen mit höchstwahrscheinlich gleicher Antigenerkennung zu sogenannten Clustern zusammengefasst werden. Es ließ sich beobachten, dass eine große Zahl der zu beiden Probenzeitpunkten existenten Cluster eine hohe Entstehungswahrscheinlichkeit aufwies. Im Gegensatz dazu standen unter Therapie neu entstandene Cluster mit einer niedrigen bis mittleren Entstehungswahrscheinlichkeit, von denen einige bei mehreren Patienten zu finden waren. Dies spricht stark für eine Antigen gerichtete Generierung von neuen T-Zell Clustern gegen den MDS del(5q) Klon unter Lenalidomidtherapie. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass Lenalidomid neben seinen bekannten Effekten auf den funktionellen Status von Immunzellen ebenfalls die Komposition des Immunrepertoires von Patienten mit MDS del(5q) beeinflusst.

## 6. Summary

The effects of immune modulatory drugs such as Lenalidomide for the treatment of diseases of the haemopoietic system is currently a topic of research. However, medical literature describes an influence of Lenalidomide on the functional status of immune cells. The main focus of this study was to investigate the various effects of the drug on B and T-cells found in bone marrow and peripheral blood of patients with myelodysplastic syndromes (MDS) with a partial deletion of the long arm of chromosome 5 (del(5q)). Blood and bonemarrow was taken from 8 and 15 Patients with MDS del(5q) respectively, before and after treatment with Lenalidomide as well as donated blood and bonemarrow from healthy individuals of a similar age. All samples were examined with state of the art next generation sequencing technology.

Our observations validate a proliferative effect on young, non-antigen experienced B-cells in accordance with previously publications. An algorithm was then used to identify T-cells with a presumed identical antigen recognition which were assigned to specific 'clusters'. It was observed that the T-cell clusters that were found before and after the treatment with Lenalidomide had a high generation probability. A small number of new T-cell clusters emerged after the treatment with the drug. These clusters had a low to medium generation probability which indicates new T cell cluster generation in response to Lenalidomide. Our results show that Lenalidomide not only has an effect on the functional status of immune cells but influences the immune cell composition of patients with MDS del(5q).

### III. Abkürzungsverzeichnis

<i>ADCC</i>	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
<i>AID</i>	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>
<i>AML</i>	<i>Akute Myeloische Leukämie</i>
<i>BCR</i>	<i>B-cell receptor</i>
<i>BMMNC</i>	<i>Bone marrow mononuclear cells</i>
<i>CAR-T-Zellen</i>	<i>Chimeric antigen receptor t-cells</i>
<i>CD</i>	<i>Cluster of differentiation</i>
<i>CDR</i>	<i>Complementary determining region</i>
<i>CRL4-E3</i>	<i>Cullin-Ring ubiquitin ligase 4-E3</i>
<i>CRBN</i>	<i>Cereblon</i>
<i>CK1<math>\alpha</math></i>	<i>Casein kinase 1 A 1</i>
<i>Del(5q)</i>	<i>Deletion des langen Armes von Chromosom 5</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
<i>Fab</i>	<i>Fragment antigen binding</i>
<i>GLIPH</i>	<i>Grouping of lymphocyte interactions by paratope hotspots</i>
<i>HD</i>	<i>Healthy Donor</i>
<i>HMA</i>	<i>Hypomethylating agents</i>
<i>IGH</i>	<i>Immunglobulin heavy chain</i>
<i>IKZF1</i>	<i>Ikaros transcription factor 1</i>
<i>IKZF3</i>	<i>Ikaros transcription factor 3</i>
<i>IPSS</i>	<i>International prognostic scoring system</i>
<i>KM</i>	<i>Knochenmark</i>
<i>LE-MON-5</i>	<i>Multizentrische, einarmige, offene Phase II Studie zur Erfassung der Sicherheit und Feststellung von Progressions-Markern einer Monotherapie mit Lenalidomid (Revlimid®) bei Patienten mit MDS (IPSS low oder intermediate-1) und einer isolierten Deletion 5q(Del(5q)) (MDS-LE-MON-5)</i>
<i>MART1</i>	<i>Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1</i>
<i>MCT1</i>	<i>Monocarboxylate transporters 1</i>
<i>MDS</i>	<i>Myelodysplastisches Syndrom</i>
<i>NGS</i>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<i>NK-Zellen</i>	<i>Natürliche Killerzellen</i>
<i>PB</i>	<i>Peripheres Blut</i>
<i>PBMNC</i>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PDL-1</i>	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
<i>TCR</i>	<i>T-cell receptor</i>
<i>TP53</i>	<i>Tumor suppressor protein-53</i>
<i>TRB</i>	<i>T-cell receptor beta</i>
<i>V,D,J-Gene</i>	<i>Variable, diversity, joining-gene</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organisation</i>

## IV. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** WHO-Klassifikation und Kriterien für Myelodysplastische Syndrome.

Übernommen aus: ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M. J., LE BEAU, M. M., BLOOMFIELD, C. D., CAZZOLA, M. & VARDIMAN, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.

## V. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des membran gebundenen T- und löslichen B-Zell Rezeptors. Bild übernommen aus: MURPHY, KENNETH., WEAVER, CASEY., 2018. Janeway Immunologie. 9. Auflage. Seite 194. Berlin. Springer-Verlag GmbH Deutschland.

**Abbildung 2:** CDR3-Längenverteilung der B-Zell Rezeptoren bei MDS del(5q) Patienten vor und nach Behandlung mit Lenalidomid und gesunden Spendern in Knochenmark und peripherem Blut.

**Abbildung 3:** CDR3-Längenverteilung der T-Zell Rezeptoren bei MDS del(5q) Patienten, vor und nach Behandlung mit Lenalidomid und gesunden Spendern in Knochenmark und peripherem Blut.

## VI. Literaturverzeichnis

- ACEBES-HUERTA, A., HUERGO-ZAPICO, L., GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. P., FERNANDEZ-GUIZAN, A., PAYER, A. R., LOPEZ-SOTO, A. & GONZALEZ, S. 2014. Lenalidomide induces immunomodulation in chronic lymphocytic leukemia and enhances antitumor immune responses mediated by NK and CD4 T cells. *Biomed Res Int*, 2014, 265840.
- ADES, L. & FENAUX, P. 2011. Immunomodulating drugs in myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 556-60.
- AKYUZ, N., BRANDT, A., STEIN, A., SCHLIFFKE, S., MAHRLE, T., QUIDDE, J., GOEKKURT, E., LOGES, S., HAALCK, T., FORD, C. T., ASEMISSEN, A. M., THIELE, B., RADLOFF, J., THENHAUSEN, T., KROHN-GRIMBERGHE, A., BOKEMEYER, C. & BINDER, M. 2017. T-cell diversification reflects antigen selection in the blood of patients on immune checkpoint inhibition and may be exploited as liquid biopsy biomarker. *Int J Cancer*, 140, 2535-2544.
- ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M. J., LE BEAU, M. M., BLOOMFIELD, C. D., CAZZOLA, M. & VARDIMAN, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.
- AUE, G., SUN, C., LIU, D., PARK, J. H., PITTALUGA, S., TIAN, X., LEE, E., SOTO, S., VALDEZ, J., MARIC, I., STETLER-STEVENSON, M., YUAN, C., NAKAMURA, Y., MURANSKI, P. & WIESTNER, A. 2018. Activation of Th1 Immunity within the Tumor Microenvironment Is Associated with Clinical Response to Lenalidomide in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Immunol*, 201, 1967-1974.
- BARTLETT, J. B., DREDGE, K. & DALGLEISH, A. G. 2004. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer*, 4, 314-22.
- BEHJATI, S. & TARPEY, P. S. 2013. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 98, 236-8.
- BEJAR, R. & STEENSMA, D. P. 2014. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 124, 2793-803.
- BODDU, P., KANTARJIAN, H., GARCIA-MANERO, G., ALLISON, J., SHARMA, P. & DAVER, N. 2018. The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS. *Leuk Lymphoma*, 59, 790-802.
- BOULTWOOD, J., PELLAGATTI, A., CATTAN, H., LAWRIE, C. H., GIAGOUNIDIS, A., MALCOVATI, L., DELLA PORTA, M. G., JADERSTEN, M., KILLICK, S., FIDLER, C., CAZZOLA, M., HELLSTROM-LINDBERG, E. & WAINSCOAT, J. S. 2007. Gene expression profiling of CD34+ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br J Haematol*, 139, 578-89.
- BOULTWOOD, J., PELLAGATTI, A., MCKENZIE, A. N. & WAINSCOAT, J. S. 2010. Advances in the 5q- syndrome. *Blood*, 116, 5803-11.
- COGLE, C. R., CRAIG, B. M., ROLLISON, D. E. & LIST, A. F. 2011. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood*, 117, 7121-5.
- DAL PORTO, J. M., GAULD, S. B., MERRELL, K. T., MILLS, D., PUGH-BERNARD, A. E. & CAMBIER, J. 2004. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol*, 41, 599-613.
- DAVER, N., GARCIA-MANERO, G., BASU, S., BODDU, P. C., ALFAYEZ, M., CORTES, J. E., KONOPLEVA, M., RAVANDI-KASHANI, F., JABBOUR, E., KADIA, T., NOGUERAS-GONZALEZ, G. M., NING, J., PEMMARAJU, N., DINARDO, C. D., ANDREEFF, M., PIERCE, S. A., GORDON, T., KORNBLAU, S. M., FLORES, W., ALHAMAL, Z., BUESO-RAMOS, C., JORGENSEN, J. L., PATEL, K. P., BLANDO, J., ALLISON, J. P., SHARMA, P. & KANTARJIAN, H. 2019. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. *Cancer Discov*, 9, 370-383.
- DAVIES, F. E., RAJE, N., HIDESHIMA, T., LENTZSCH, S., YOUNG, G., TAI, Y. T., LIN, B., PODAR, K., GUPTA, D., CHAUHAN, D., TREON, S. P., RICHARDSON, P. G., SCHLOSSMAN, R. L., MORGAN, G. J., MULLER, G. W., STIRLING, D. I. & ANDERSON, K. C. 2001. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, 98, 210-6.

- EICHNER, R., HEIDER, M., FERNANDEZ-SAIZ, V., VAN BEBBER, F., GARZ, A. K., LEMEER, S., RUDELIUS, M., TARGOSZ, B. S., JACOBS, L., KNORN, A. M., SLAWSKA, J., PLATZBECKER, U., GERMING, U., LANGER, C., KNOP, S., EINSELE, H., PESCHEL, C., HAASS, C., KELLER, U., SCHMID, B., GOTZE, K. S., KUSTER, B. & BASSERMANN, F. 2016. Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon-CD147-MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity. *Nat Med*, 22, 735-43.
- FIELDS, B. A., MALCHIODI, E. L., LI, H., YSERN, X., STAUFFACHER, C. V., SCHLIEVERT, P. M., KARJALAINEN, K. & MARIUZZA, R. A. 1996. Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen. *Nature*, 384, 188-92.
- FRANSSEN, L. E., MUTIS, T., LOKHORST, H. M. & VAN DE DONK, N. 2019. Immunotherapy in myeloma: how far have we come? *Ther Adv Hematol*, 10, 2040620718822660.
- GARCIA-MANERO, G. 2014. Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 89, 97-108.
- GIAGOUNIDIS, A., MUFTI, G. J., MITTELMAN, M., SANZ, G., PLATZBECKER, U., MUUS, P., SELLESLAG, D., BEYNE-RAUZY, O., TE BOEKHORST, P., DEL CANIZO, C., GUERCI-BRESLER, A., NILSSON, L., LUBBERT, M., QUESNEL, B., GANSER, A., BOWEN, D., SCHLEGELBERGER, B., GOHRING, G., FU, T., BENETTAIB, B., HELLSTROM-LINDBERG, E. & FENAUX, P. 2014. Outcomes in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with isolated deletion 5q treated with lenalidomide: a subset analysis from the MDS-004 study. *Eur J Haematol*, 93, 429-38.
- GIAGOUNIDIS, A. A., GERMING, U., WAINSCOAT, J. S., BOULTWOOD, J. & AUL, C. 2004. The 5q-syndrome. *Hematology*, 9, 271-7.
- GLANVILLE, J., HUANG, H., NAU, A., HATTON, O., WAGAR, L. E., RUBELT, F., JI, X., HAN, A., KRAMS, S. M., PETTUS, C., HAAS, N., ARLEHAMN, C. S. L., SETTE, A., BOYD, S. D., SCRIBA, T. J., MARTINEZ, O. M. & DAVIS, M. M. 2017. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature*, 547, 94-98.
- GOLDBERG, S. L., CHEN, E., CORRAL, M., GUO, A., MODY-PATEL, N., PECORA, A. L. & LAOURI, M. 2010. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol*, 28, 2847-52.
- HAASE, D., GERMING, U., SCHANZ, J., PFEILSTOCKER, M., NOSSLINGER, T., HILDEBRANDT, B., KUNDGEN, A., LUBBERT, M., KUNZMANN, R., GIAGOUNIDIS, A. A., AUL, C., TRUMPER, L., KRIEGER, O., STAUDER, R., MULLER, T. H., WIMAZAL, F., VALENT, P., FONATSCH, C. & STEIDL, C. 2007. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, 110, 4385-95.
- HARADA, T., OZAKI, S., ODA, A., TSUJI, D., IKEGAME, A., IWASA, M., UDAKA, K., FUJII, S., NAKAMURA, S., MIKI, H., KAGAWA, K., KURODA, Y., KAWAI, S., ITOH, K., YAMADA-OKABE, H., MATSUMOTO, T. & ABE, M. 2013. Combination with a defucosylated anti-HM1.24 monoclonal antibody plus lenalidomide induces marked ADCC against myeloma cells and their progenitors. *PLoS One*, 8, e83905.
- HEANEY, M. L. & GOLDE, D. W. 1999. Myelodysplasia. *N Engl J Med*, 340, 1649-60.
- HEISE, C., CARTER, T., SCHAFFER, P. & CHOPRA, R. 2010. Pleiotropic mechanisms of action of lenalidomide efficacy in del(5q) myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Anticancer Ther*, 10, 1663-72.
- HIDALGO-LOPEZ, J. E., KANAGAL-SHAMANNA, R., QUESADA, A. E., THAKRAL, B., HU, Z., MITSUHASHI, T., YABE, M., GARCIA-MANERO, G. & BUESO-RAMOS, C. E. 2017. Progress in Myelodysplastic Syndromes: Clinicopathologic Correlations and Immune Checkpoints. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 17S, S16-S25.
- HOFMANN, W. K. & KOEFFLER, H. P. 2005. Myelodysplastic syndrome. *Annu Rev Med*, 56, 1-16.
- HOLSTEIN, S. A. & MCCARTHY, P. L. 2017. Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience. *Drugs*, 77, 505-520.
- KERDIVEL, G., CHESNAIS, V., BECHT, E., TOMA, A., CAGNARD, N., DUMONT, F., ROUSSEAU, A., FENAUX, P., CHEVRET, S., CHAPUIS, N., BOEVA, V., FRIDMAN, W. H., FONTENAY, M. & KOSMIDER, O. 2018. Lenalidomide-mediated erythroid improvement in non-del(5q)



- myelodysplastic syndromes is associated with bone marrow immuno-remodeling. *Leukemia*, 32, 558-562.
- KIRSCH, I., VIGNALI, M. & ROBINS, H. 2015. T-cell receptor profiling in cancer. *Mol Oncol*, 9, 2063-70.
- KOMROKJI, R. S., AL ALI, N. H., PADRON, E., COGLE, C., TINSLEY, S., SALLMAN, D., LANCET, J. E. & LIS, A. F. 2019. Lenalidomide and Prednisone in Low and Intermediate-1 IPSS Risk, Non-Del(5q) Patients With Myelodysplastic Syndromes: Phase 2 Clinical Trial. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*.
- KOTLA, V., GOEL, S., NISCHAL, S., HEUCK, C., VIVEK, K., DAS, B. & VERMA, A. 2009. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*, 2, 36.
- KOU, Z. C., PUHR, J. S., ROJAS, M., MCCORMACK, W. T., GOODENOW, M. M. & SLEASMAN, J. W. 2000. T-Cell receptor Vbeta repertoire CDR3 length diversity differs within CD45RA and CD45RO T-cell subsets in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7, 953-9.
- KRAMER, I., ENGELHARDT, M., FICHTNER, S., NEUBER, B., MEDENHOFF, S., BERTSCH, U., HILLEGASS, J., RAAB, M. S., HOSE, D., HO, A. D., GOLDSCHMIDT, H. & HUNDEMER, M. 2016. Lenalidomide enhances myeloma-specific T-cell responses in vivo and in vitro. *Oncoimmunology*, 5, e1139662.
- KRONKE, J., FINK, E. C., HOLLENBACH, P. W., MACBETH, K. J., HURST, S. N., UDESHI, N. D., CHAMBERLAIN, P. P., MANI, D. R., MAN, H. W., GANDHI, A. K., SVINKINA, T., SCHNEIDER, R. K., MCCONKEY, M., JARAS, M., GRIFFITHS, E., WETZLER, M., BULLINGER, L., CATHERS, B. E., CARR, S. A., CHOPRA, R. & EBERT, B. L. 2015. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1alpha in del(5q) MDS. *Nature*, 523, 183-188.
- KRONKE, J., UDESHI, N. D., NARLA, A., GRAUMAN, P., HURST, S. N., MCCONKEY, M., SVINKINA, T., HECKL, D., COMER, E., LI, X., CIARLO, C., HARTMAN, E., MUNSHI, N., SCHENONE, M., SCHREIBER, S. L., CARR, S. A. & EBERT, B. L. 2014. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science*, 343, 301-5.
- KUENDGEN, A., LAUSEKER, M., LIST, A. F., FENAUX, P., GIAGOUNIDIS, A. A., BRANDENBURG, N. A., BACKSTROM, J., GLASMACHER, A., HASFORD, J., GERMING, U. & INTERNATIONAL WORKING GROUP ON, M. D. S. W. D. 2013. Lenalidomide does not increase AML progression risk in RBC transfusion-dependent patients with Low- or Intermediate-1-risk MDS with del(5q): a comparative analysis. *Leukemia*, 27, 1072-9.
- LEVY, S. E. & MYERS, R. M. 2016. Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 17, 95-115.
- LI, Z., WOO, C. J., IGLESIAS-USSEL, M. D., RONAI, D. & SCHARFF, M. D. 2004. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev*, 18, 1-11.
- LIU, X. & WU, J. 2018. History, applications, and challenges of immune repertoire research. *Cell Biol Toxicol*, 34, 441-457.
- MAIZELS, N. 2005. Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet*, 39, 23-46.
- MALCOVATI, L., HELLSTROM-LINDBERG, E., BOWEN, D., ADES, L., CERMAK, J., DEL CANIZO, C., DELLA PORTA, M. G., FENAUX, P., GATTERMANN, N., GERMING, U., JANSEN, J. H., MITTELMAN, M., MUFTI, G., PLATZBECKER, U., SANZ, G. F., SELLESLAG, D., SKOV-HOLM, M., STAUDER, R., SYMEONIDIS, A., VAN DE LOOSDRECHT, A. A., DE WITTE, T., CAZZOLA, M. & EUROPEAN LEUKEMIA, N. 2013. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*, 122, 2943-64.
- MARCOU, Q., MORA, T. & WALCZAK, A. M. 2018. High-throughput immune repertoire analysis with IGoR. *Nat Commun*, 9, 561.
- MCDANIEL, J. M., ZOU, J. X., FULP, W., CHEN, D. T., LIST, A. F. & EPLING-BURNETTE, P. K. 2012. Reversal of T-cell tolerance in myelodysplastic syndrome through lenalidomide immune modulation. *Leukemia*, 26, 1425-9.
- MIKKILINENI, L. & KOCHENDERFER, J. N. 2017. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood*, 130, 2594-2602.

- MURPHY, K., WEAVER, C., 2018. Janeway Immunologie, 9. Auflage, Seite 194, Berlin, Springer-Verlag GmbH Deutschland
- NEUBER, B., HERTH, I., TOLLIVER, C., SCHOENLAND, S., HEGENBART, U., HOSE, D., WITZENS-HARIG, M., HO, A. D., GOLDSCHMIDT, H., KLEIN, B. & HUNDEMER, M. 2011. Lenalidomide enhances antigen-specific activity and decreases CD45RA expression of T cells from patients with multiple myeloma. *J Immunol*, 187, 1047-56.
- OZAKI, S., KOSAKA, M., HARADA, M., NISHITANI, H., ODOMI, M. & MATSUMOTO, T. 1998. Radioimmunodetection of human myeloma xenografts with a monoclonal antibody directed against a plasma cell specific antigen, HM1.24. *Cancer*, 82, 2184-90.
- OZAKI, S., KOSAKA, M., WAKATSUKI, S., ABE, M., KOISHIHARA, Y. & MATSUMOTO, T. 1997. Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. *Blood*, 90, 3179-86.
- PADLAN, E. A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*, 31, 169-217.
- PAPAVASILIOU, F. N. & SCHATZ, D. G. 2002. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*, 109 Suppl, S35-44.
- PIELOU, E. C. 1966. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *J Theor Biol*, 10, 370-83.
- RESKE, T., FULCINITI, M. & MUNSHI, N. C. 2010. Mechanism of action of immunomodulatory agents in multiple myeloma. *Med Oncol*, 27 Suppl 1, S7-13.
- SCHLIFFKE, S., AKYUZ, N., FORD, C. T., MAHRLE, T., THENHAUSEN, T., KROHN-GRIMBERGHE, A., KNOP, S., BOKEMEYER, C. & BINDER, M. 2016. Clinical response to ibrutinib is accompanied by normalization of the T-cell environment in CLL-related autoimmune cytopenia. *Leukemia*, 30, 2232-2234.
- SCHULER, E., GIAGOUNIDIS, A., HAASE, D., SHIRNESHAN, K., BUSCHE, G., PLATZBECKER, U., NOLTE, F., GOTZE, K., SCHLENK, R. F., GANSER, A., LETSCH, A., BRAULKE, F., LUBBERT, M., BUG, G., SCHAFHAUSEN, P., BACHER, U., GATTERMANN, N., WULFERT, M., HAAS, R. & GERMING, U. 2016. Results of a multicenter prospective phase II trial investigating the safety and efficacy of lenalidomide in patients with myelodysplastic syndromes with isolated del(5q) (LE-MON 5). *Leukemia*, 30, 1580-2.
- TAI, Y. T., LI, X. F., CATLEY, L., COFFEY, R., BREITKREUTZ, I., BAE, J., SONG, W., PODAR, K., HIDESHIMA, T., CHAUHAN, D., SCHLOSSMAN, R., RICHARDSON, P., TREON, S. P., GREWAL, I. S., MUNSHI, N. C. & ANDERSON, K. C. 2005. Immunomodulatory drug lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40 SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications. *Cancer Res*, 65, 11712-20.
- TEFFERI, A. & VARDIMAN, J. W. 2009. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 361, 1872-85.
- VAN DONGEN, J. J., LANGERAK, A. W., BRUGGEMANN, M., EVANS, P. A., HUMMEL, M., LAVENDER, F. L., DELABESSE, E., DAVI, F., SCHUURING, E., GARCIA-SANZ, R., VAN KRIEKEN, J. H., DROESE, J., GONZALEZ, D., BASTARD, C., WHITE, H. E., SPAARGAREN, M., GONZALEZ, M., PARREIRA, A., SMITH, J. L., MORGAN, G. J., KNEBA, M. & MACINTYRE, E. A. 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17, 2257-317.
- VERHELLE, D., CORRAL, L. G., WONG, K., MUELLER, J. H., MOUTOUH-DE PARSEVAL, L., JENSEN-PERGAKES, K., SCHAFER, P. H., CHEN, R., GLEZER, E., FERGUSON, G. D., LOPEZ-GIRONA, A., MULLER, G. W., BRADY, H. A. & CHAN, K. W. 2007. Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells. *Cancer Res*, 67, 746-55.
- XU, J. L. & DAVIS, M. M. 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*, 13, 37-45.
- YANG, H., BUESO-RAMOS, C., DINARDO, C., ESTECIO, M. R., DAVANLOU, M., GENG, Q. R., FANG, Z., NGUYEN, M., PIERCE, S., WEI, Y., PARMAR, S., CORTES, J., KANTARJIAN, H. & GARCIA-

MANERO, G. 2014. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*, 28, 1280-8.

YOSHIDA, Y. 1996. Physician Education: Myelodysplastic Syndrome. *Oncologist*, 1, 284-287.

## VII. Erklärung des Eigenanteils

Eigenanteil:

- Literaturrecherche und Auswertung
- Beteiligung an der Etablierung der PCR Schemata für *BCR* und *TCR*.
- Isolation der genomischen DNA aus Proben der gesunden Spender.
- Durchführung der PCR's und Agarose Gel-Elektrophoresen sowie Qualitäts- und Quantitätsanalysen aller Amplikons aus Patientenproben und den Proben der gesunden Spender.
- Herstellung der Proben-Pools für das *Next Generation Sequencing*,
- Beteiligung an der Vorbereitung und Durchführung von *Next Generation Sequencing*.
- Auswertung aller durch Next Generation Sequencing erhobenen Datensätze.
- Statistische Analysen der ausgewerteten Sequenzierungsergebnisse
- Erstellen der Abbildungen der Originalpublikation
- Mitarbeit am Manuskript
- Präsentation in laborinternen Seminaren.

Anteil der Co-Autoren:

- Etablierung der multiplex *PCR* für *TRB* Analyse, Etablierung der *PCR* Schemata für *BCR* und *TCR*, Beteiligung an der Vorbereitung und Durchführung von *Next Generation Sequencing*, Etablierung der Auswertungsvorlagen für *BCR*- und *TCR*-Datensätze und Hilfe bei der Auswertung sowie statistische Analysen der Datensätze, Erstellen der Tabellen und Abbildungen der Originalpublikation sowie Mitarbeit am Manuskript: Nuray Akyüz.
- Erstellung eines *TCR*-Analyse Tools zur Durchführung und Veranschaulichung der *GLIPH*- und Entstehungswahrscheinlichkeit-Analysen: Pim Fuchs und Nicola Bonzanni.
- Vorbereitung einiger Proben der gesunden Spender, Beteiligung an der Vorbereitung und Durchführung von *Next Generation Sequencing*, Hilfe bei der Auswertung sowie statistische Analysen der Datensätze: Donjete Simnica.
- Bereitstellung der Proben aus Knochenmark und peripherem Blut von Patienten mit *MDS del(5q)* vor und nach Behandlung mit Lenalidomid: Ulrich Germing, Johann Christoph Jann, Florian Nolte und Wolf-Karsten Hofmann.
- Erstellen des Manuskripts: Mascha Binder

## **VIII. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Mascha Binder bedanken, die mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser experimentellen Doktorarbeit gegeben und mich die gesamte Zeit über unterstützt und motiviert hat. Besonderer Dank gebührt Nuray Akyüz für die beste Einarbeitung, die man sich in einem Labor wünschen kann und die darüber hinaus wegen Ihrer unglaublichen Hilfsbereitschaft immer eine Ansprechpartnerin für mich war. Dem gesamten Team der AG Binder möchte ich für die tolle Stimmung im Labor und Büro danken. Natürlich gilt mein Dank auch allen Co-Autoren der Originalpublikation, die diese erst möglich gemacht haben. Zu guter Letzt geht mein tief empfundener Dank an meine Familie, welche mich zu jeder Zeit und in jeder Hinsicht unterstützt hat und ohne die diese Arbeit vermutlich so nicht zu Stande gekommen wäre.

## **IX. Lebenslauf**

**Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt**

## **X. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.