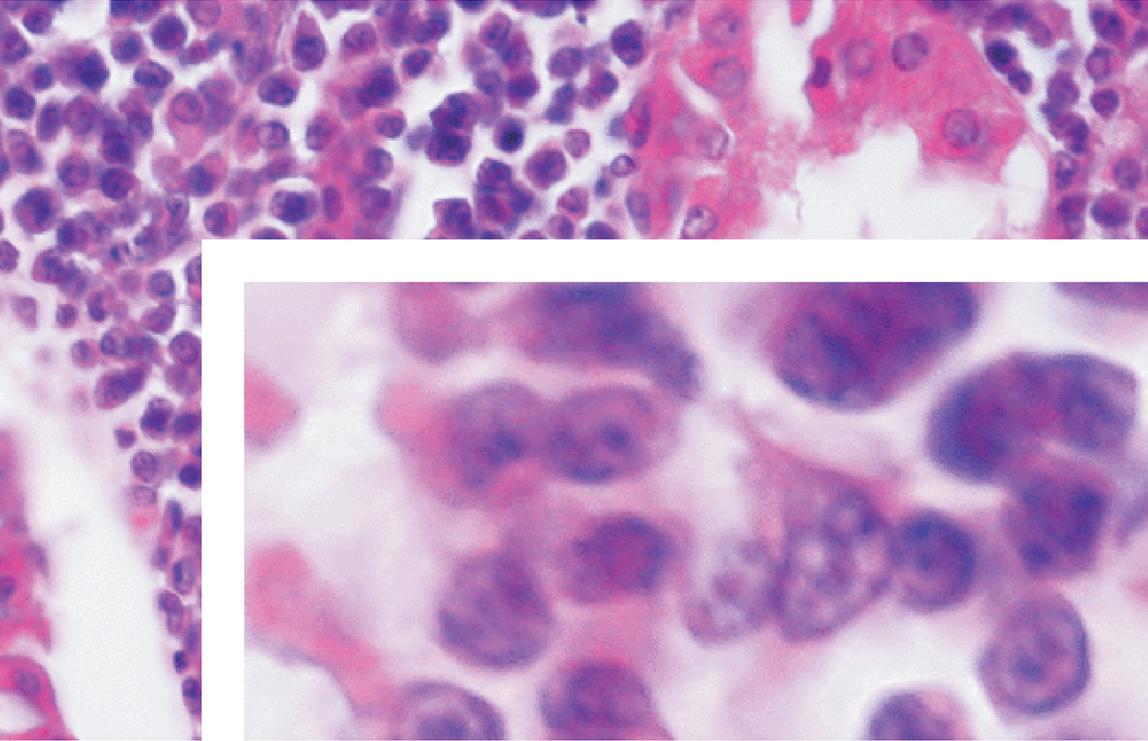


ENTWICKLUNG EINER PCR-GESTÜTZTEN KLONALITÄTS- DIAGNOSTIK BEI B-ZELL-LYMPHOMEN DER KATZE

MANFRED ALEXANDER HENRICH



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**ENTWICKLUNG EINER PCR-GESTÜTZTEN
KLONALITÄTSDIAGNOSTIK BEI B-ZELL-LYMPHOMEN
DER KATZE**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MANFRED ALEXANDER HENRICH

Tierarzt aus Karlsruhe

Gießen 2008

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation: 6. Mai 2008

Meinen Eltern und Estelle

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | LITERATURÜBERSICHT..... | 2 |
| 2.1 | Neoplastische Proliferationen von Blutzellen | 2 |
| 2.2 | Einteilung der lymphatischen Proliferationen bei der Katze | 2 |
| 2.2.1 | Makroskopische Einteilung..... | 2 |
| 2.2.2 | Histologische Einteilung | 3 |
| 2.2.2.1 | WHO-Klassifikation hämatopoetischer Tumoren der Haustiere | 3 |
| 2.2.2.2 | WHO-Klassifikation der in der Arbeit verwendeten Neoplasien..... | 5 |
| 2.2.2.2.1 | B-Zell-Lymphome..... | 5 |
| 2.2.2.2.1.1 | Follikelzentrums-Lymphom Typ II..... | 5 |
| 2.2.2.2.1.2 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom | 5 |
| 2.2.2.2.2 | T-Zell-Lymphome | 6 |
| 2.2.2.2.2.1 | Intestinales T-Zell-Lymphom | 6 |
| 2.2.2.2.2.2 | Lymphoblastisches T-Zell-Lymphom..... | 6 |
| 2.3 | Ätiologie lymphatischer Proliferationen bei der Katze..... | 6 |
| 2.3.1 | Das Feline Leukämievirus (FeLV)..... | 6 |
| 2.3.1.1 | Vorkommen bei lymphatischen Proliferationen..... | 6 |
| 2.3.1.2 | Tumorpathogenese | 7 |
| 2.3.2 | Das Feline Immundefizienz Virus (FIV)..... | 8 |
| 2.4 | Limitierung der histologischen Diagnostik lymphatischer Proliferationen | 8 |
| 2.5 | Klonalitätsanalyse | 9 |
| 2.5.1 | Untersuchung der Inaktivierung von X-Chromosomen | 9 |
| 2.5.2 | Nachweis somatischer Mutationen..... | 10 |
| 2.5.3 | Analyse viraler Integrationen | 11 |
| 2.5.4 | Lymphozytenanalyse..... | 11 |
| 2.5.4.1 | Molekularbiologische Grundlagen | 11 |
| 2.5.4.1.1 | B-Zellen..... | 11 |
| 2.5.4.1.2 | Aufbau des B-Zell-Rezeptors | 12 |
| 2.5.4.1.3 | V(D)J-Rekombination | 13 |
| 2.5.4.1.4 | Mechanismen zur Erhöhung der Antikörperdiversität | 16 |
| 2.5.4.1.4.1 | Kombinatorische Diversität..... | 16 |
| 2.5.4.1.4.2 | Junktionale Diversität..... | 16 |
| 2.5.4.1.4.3 | Somatische Hypermutation | 18 |
| 2.5.5 | Diagnostische Anwendung..... | 19 |
| 2.5.5.1 | Humanmedizin | 19 |
| 2.5.5.1.1 | Southern Blotting | 19 |
| 2.5.5.1.2 | PCR | 20 |
| 2.5.5.1.2.1 | B-Zell-Neoplasien | 21 |
| 2.5.5.2 | Veterinärmedizin | 22 |
| 2.5.5.2.1 | Hund..... | 22 |
| 2.5.5.2.2 | Katze..... | 22 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 24 |
| 3.1 | Vorbemerkung..... | 24 |
| 3.2 | Biologisches Material..... | 26 |
| 3.2.1 | Histologische und Immunhistologische Diagnose der verwendeten Proben ... | 28 |
| 3.3 | Isolierung von Nukleinsäuren | 29 |
| 3.3.1 | Isolierung von Gesamt-RNS aus unfixiertem Gewebe mittels Purescript® RNA Purification Kit..... | 29 |
| 3.3.2 | Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNS mittels Oligotex® mRNA Kit..... | 30 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.3.3 | Isolierung von DNS mittels Puregene® DNA Purification Kit | 31 |
| 3.3.3.1 | Isolierung von DNS aus unfixiertem Gewebe..... | 31 |
| 3.3.4 | Isolierung von DNS aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe..... | 32 |
| 3.3.4.1 | Isolierung mit dem Puregene® DNA Purification Kit..... | 32 |
| 3.3.4.2 | Isolierung durch Hitzebehandlung, Chelex 100 und Chloroformextraktion.... | 34 |
| 3.4 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 35 |
| 3.4.1 | Photometrische Konzentrationsbestimmung..... | 35 |
| 3.4.2 | Elektrophoretische Integritäts- und Konzentrationsbestimmung | 35 |
| 3.5 | Amplifikation von Nukleinsäuren..... | 36 |
| 3.5.1 | Verwendete Oligonukleotide..... | 36 |
| 3.5.2 | PCR-Verfahren..... | 38 |
| 3.5.2.1 | Primertest | 38 |
| 3.5.2.1.1 | Ergebniskontrolle | 39 |
| 3.5.2.2 | Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)..... | 40 |
| 3.5.2.3 | PCR mit dem SMART™ RACE Amplification Kit..... | 41 |
| 3.5.2.4 | CapFishing™ Technik..... | 43 |
| 3.5.2.5 | Amplifikation der cDNA mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase. | 45 |
| 3.5.2.5.1 | Leader-PCR..... | 46 |
| 3.6 | Aufreinigung von DNS | 46 |
| 3.7 | Klonierung von PCR-Produkten | 48 |
| 3.7.1 | AccepTor™ Vector Kit | 48 |
| 3.7.2 | Agar-Nährböden und Flüssigkulturmedien | 48 |
| 3.7.3 | dATP „Tailing“ der PCR-Produkte..... | 49 |
| 3.7.4 | Vorbereitung der DNS für die Klonierung..... | 49 |
| 3.7.5 | Ligation und Transformation | 49 |
| 3.7.6 | Kolonie-PCR | 50 |
| 3.7.7 | Anzucht geeigneter Kolonien und Plasmidpräparation..... | 51 |
| 3.7.8 | Biologische Sicherheit..... | 53 |
| 3.7.9 | Kontrolle der Plasmide..... | 53 |
| 3.8 | Sequenzierung und Auswertung der Sequenzierungsergebnisse | 54 |
| 3.9 | Test des diagnostischen Primersystems | 54 |
| 3.9.1 | Überprüfung der DNS-Qualität..... | 54 |
| 3.9.2 | Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des felines Immunglobulins.... | 55 |
| 3.9.2.1 | QIAGEN® Multiplex PCR Kit..... | 57 |
| 3.9.3 | Ergebniskontrolle (SDS-PAGE) | 58 |
| 3.9.4 | Heteroduplexanalyse | 60 |
| 4 | ERGEBNISSE | 61 |
| 4.1 | Analyse der schweren Kette des felines Immunglobulins | 61 |
| 4.1.1 | Verifizierung der veröffentlichten Sequenz der C-Region der schweren Kette des felines IgMs | 62 |
| 4.1.2 | Analyse der weiter in Richtung 5'-Ende gelegenen Sequenzen..... | 62 |
| 4.1.2.1 | SMART™ RACE-Technik | 62 |
| 4.1.2.2 | Leader-PCR..... | 64 |
| 4.1.2.3 | CapFishing™ -Technik | 66 |
| 4.2 | Entwicklung der Diagnostikprimer | 67 |
| 4.2.1 | Sense-Primer | 67 |
| 4.2.2 | Antisense-Primer | 68 |
| 4.2.3 | Überprüfung der Primer | 71 |
| 4.3 | Etablierung des Diagnostik-Systems..... | 71 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.3.1 | Elektrophorese..... | 71 |
| 4.3.2 | Isolierung der Proben-DNS | 72 |
| 4.3.2.1 | Frischmaterial..... | 72 |
| 4.3.2.2 | Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe | 72 |
| 4.3.3 | Amplifikation des CDR3..... | 73 |
| 4.3.4 | Heteroduplexanalyse | 73 |
| 4.3.5 | Ergebnisse der mit dem Diagnostiksystem untersuchten Proben..... | 74 |
| 4.3.5.1 | B-Zell-Lymphome..... | 74 |
| 4.3.5.1.1 | Fälle 3020/92 und 3597/06..... | 74 |
| 4.3.5.1.2 | Fälle T383/05 und T1528/07 | 76 |
| 4.3.5.1.3 | Fälle 2253/97 und 2047/95..... | 79 |
| 4.3.5.1.4 | Fälle T7795/05 und 940/97 | 82 |
| 4.3.5.1.5 | Fälle T7192/06 und S1003/04..... | 85 |
| 4.3.5.2 | Lymphatische Hyperplasien..... | 87 |
| 4.3.5.2.1 | Fälle T847/05 und T878/05..... | 87 |
| 4.3.5.2.2 | Fälle T630/05 und T273/05..... | 89 |
| 4.3.5.2.3 | Fälle T3746/05 und T6950/05..... | 91 |
| 4.3.5.2.4 | Fälle T7426/06 und S1592/04..... | 93 |
| 4.3.5.2.5 | Fälle S345/07 und S348/07 | 95 |
| 4.3.5.3 | T-Zell-Lymphome..... | 96 |
| 4.3.5.3.1 | Fälle 1883/94 und S1017/05 | 96 |
| 4.3.5.3.2 | Fälle 2155/90 und 280/92..... | 97 |
| 4.3.5.3.3 | Fälle 93/93 und 1989/98..... | 98 |
| 4.3.5.3.4 | Fälle 1379/99 und 1945/90..... | 99 |
| 4.3.5.3.5 | Fälle 217/94 und 15/96..... | 100 |
| 4.3.6 | Amplifikation der VH1-Positivkontrolle in getrennten Ansätzen..... | 101 |
| 5 | DISKUSSION | 102 |
| 5.1 | Analyse der schweren Kette des feline Immunglobulins..... | 102 |
| 5.1.1 | Analyse der Gene der schweren Kette mit der SMART™ RACE-Technik ... | 102 |
| 5.1.2 | Analyse des NCBI Trace Archivs | 103 |
| 5.1.3 | Leader-PCR..... | 104 |
| 5.1.4 | Analyse mit der CapFishing™ Technik | 105 |
| 5.2 | Diagnostikprimer..... | 105 |
| 5.2.1.1 | Vergleich mit dem bestehenden Diagnostiksystem | 106 |
| 5.3 | Horizontale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 107 |
| 5.4 | DNS-Isolierung und Qualität der gewonnenen DNS | 108 |
| 5.5 | Limitierung der Klonalitätsanalyse von B-Zell-Lymphomen mit der PCR... .. | 109 |
| 5.5.1 | Falsch negative Resultate | 109 |
| 5.5.2 | Falsch polyklonale Resultate..... | 110 |
| 5.5.3 | Falsch klonale Resultate..... | 111 |
| 5.5.3.1 | Pseudomonoklonal | 111 |
| 5.5.3.2 | Oligoklonal..... | 112 |
| 5.6 | Kriterien für die Interpretation der Elektrophorese-Ergebnisse..... | 112 |
| 5.7 | Heteroduplexanalyse | 113 |
| 5.8 | Aussagekraft der Elektrophorese-Resultate | 114 |
| 5.9 | Analyse der mit dem Diagnostiksystem amplifizierten Proben | 114 |
| 5.9.1 | Duplizierung der FR1-spezifischen Bande der VH1-Positivkontrolle..... | 114 |
| 5.9.2 | Diskussion der Ergebnisse der mit dem Primersystem untersuchten Proben .. | 115 |
| 5.9.2.1 | B-Zell-Lymphome..... | 115 |
| 5.9.2.1.1 | Fall 3020/93..... | 115 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.9.2.1.2 | Fall 3597/06..... | 115 |
| 5.9.2.1.3 | Fall T383/05 | 116 |
| 5.9.2.1.4 | Fall T1528/07 | 116 |
| 5.9.2.1.5 | Fall 2253/97..... | 118 |
| 5.9.2.1.6 | Fall 2074/95..... | 118 |
| 5.9.2.1.7 | Fall T7795/05 | 119 |
| 5.9.2.1.8 | Fall 940/97..... | 119 |
| 5.9.2.1.9 | Fall T7192/06 | 119 |
| 5.9.2.1.10 | Fall S1003/04 | 120 |
| 5.9.2.1.11 | Zusammenfassung der untersuchten B-Zell-Lymphome | 120 |
| 5.9.3 | Lymphatische Hyperplasien..... | 121 |
| 5.9.4 | T-Zell-Lymphome | 121 |
| 5.9.5 | Beurteilung des diagnostischen Systems..... | 122 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 123 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 125 |
| 8 | ANHANG | 135 |
| 8.1 | Verwendete Längenstandards | 135 |
| 8.1.1 | pUC19/MspI..... | 135 |
| 8.1.2 | MF | 136 |
| 8.2 | Gießblock für die horizontale SDS-PAGE..... | 136 |
| 8.3 | Tagebuchnummern, Art der Fixierung und DNS-Isolierung | 137 |
| 8.4 | Tagebuchnummern, Rasse, Alter und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe | 141 |
| 8.5 | Histologie der mit dem Diagnostiksystem untersuchten B-Zell-Lymphome. | 144 |
| 8.6 | Histologie der Probe 1883/94 (T-Zell-Lymphom)..... | 154 |
| 8.7 | Histologie der Probe 878/05 (Lymphatische Hyperplasie) | 155 |
| 8.8 | Lokalisierung von Leaderregion, SMART II TM Oligonukleotid, V-Region, CDR3 und C-Region in den Inserts..... | 156 |
| 8.9 | Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene..... | 158 |
| 8.10 | Veröffentlichter Teil der C-Region der schweren Kette des felines IgM (Cho et al., 1998)..... | 162 |
| 8.11 | Verzeichnis der Klone (Sequenzen der Inserts) | 162 |
| 8.12 | Sequenz der bei der Untersuchung von Fall T1528/07 aufgetretenen Nebenbande | 169 |
| 8.13 | Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme, Kits und Antikörper | 170 |
| 8.14 | Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel | 172 |
| 8.15 | Lösungen und Puffer | 175 |
| 8.15.1 | PCR | 175 |
| 8.15.1.1 | DEPC-Wasser – RNase-freies Wasser | 175 |
| 8.15.2 | Elektrophorese..... | 175 |
| 8.15.2.1 | 10 × TBE-Puffer | 175 |
| 8.15.2.2 | 40 × TAE-Puffer..... | 175 |
| 8.15.2.3 | 0,5 × T-Puffer | 175 |
| 8.15.2.4 | 15%ige Ficoll [®] -Lösung zum Beladen der Geltaschen | 176 |
| 8.15.2.5 | 2%ige und 3 %ige Agarosegele | 176 |
| 8.15.2.6 | Glasplatten silanisieren | 176 |
| 8.15.3 | Klonierung..... | 176 |
| 8.15.3.1 | LB Medium | 176 |
| 8.15.3.2 | LB Agar..... | 177 |

| | | |
|----------|-----------------------------------|------------|
| 9 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 178 |
|----------|-----------------------------------|------------|

1 Einleitung

„Wer mit Katzen spielt, darf die Kratzer nicht scheuen“

(Ägyptisches Sprichwort)

Bei der Identifizierung lymphatischer Neoplasien mit Hilfe der Histopathologie stellt sich öfters das Problem, neoplastische Lymphozyten von reaktiven Lymphozyten unterscheiden zu müssen. So können infiltrierende Lymphozyten oder proliferierendes lymphatisches Gewebe als Entzündungsreaktion in manchen Fällen den Zellen einer echten Neoplasie so ähnlich erscheinen (Mooney et al., 1987), dass eine eindeutige Abgrenzbarkeit durch den Untersucher ohne weitere diagnostische Maßnahmen nicht möglich ist.

Hierbei hilft eine Eigenschaft, welche neoplastische Lymphozyten von reaktiven unterscheidet. Es handelt sich dabei um die Monoklonalität lymphatischer Neoplasien. Dies bedeutet nichts anderes, als dass alle Zellen eines malignen lymphatischen Tumors durch Teilung aus einer entarteten Ausgangszelle hervorgegangen sind (Wainscoat und Fey, 1990).

Ziel dieser Arbeit war es, ein diagnostisches System auf Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion zu entwickeln, welches die Monoklonalität von feline B-Zell-Lymphomen zur Abgrenzung von reaktiven lymphozytären Proliferationen ausnutzt.

2 Literaturübersicht

2.1 Neoplastische Proliferationen von Blutzellen

Die deutschsprachige Veterinärmedizin spricht bei neoplastischen Proliferationen weißer Blutzellen traditionell von Leukosen (Ellermann und Bang, 1908). Dieser Begriff wurde ursprünglich zur Abgrenzung der soliden Tumoren von den Leukämien gewählt.

Diese systemischen Tumorerkrankungen jugendlicher oder reifer Blutzellen können je nach dem betroffenen Zelltyp in lymphatische und myeloische Proliferationen unterschieden werden. Dies entspricht der grundsätzlichen Einteilung der Leukozyten in die myeloische und die lymphatische Linie, die beide auf eine gemeinsame Vorläuferzelle zurück gehen (Lu et al., 2002).

Unter den neoplastischen Erkrankungen der Katze spielt die Gruppe der lymphatischen Proliferationen, die Lymphome, zahlenmäßig eine herausragende Rolle. Hardy (1981) beschreibt, dass bis zu 50 % aller Neoplasien der Katze hämoproliferative Erkrankungen sind. Andere Studien ergaben, dass von den bei seziierten Katzen gefundenen neoplastischen Proliferationen Leukosen über 50 % ausmachen, wobei es sich bei über 90 % um lymphatische Leukosen handelt (Reinacher, 1997; Reinacher und Theilen, 1987; Reinacher et al., 1995).

2.2 Einteilung der lymphatischen Proliferationen bei der Katze

Die lymphatischen Proliferationen können in solide Tumoren, die als maligne Lymphome bzw. Lymphosarkome bezeichnet werden, in lymphatische Leukämien, Tumoren der immunglobulinbildenden Zellen und das Thymom eingeteilt werden (Jarrett und Mackey, 1974).

2.2.1 Makroskopische Einteilung

Makroskopisch werden die malignen Lymphome der Katze, angelehnt an die WHO-Klassifikation von 1974 für die hämatopoetischen Tumoren bei Haustieren, anhand ihrer anatomischen Verteilung in die multizentrische Form, die intestinale Form, die Thymusform (mediastinale Form) und andere Formen eingeteilt (Jarrett und Mackey, 1974).

2.2.2 Histologische Einteilung

Die Humanmedizin hat zur histologischen Unterteilung der Non-Hodgkin-Lymphome verschiedene Klassifikationsmodelle entwickelt. Übernommen zur Einteilung der malignen Lymphome der Katze wurden vor allem die Rappaport-Klassifizierung (Valli et al., 1981), die National Cancer Institute Working Formulation (Day, 1995; Gabor et al., 1999; Valli et al., 2000) und die Kiel-Klassifizierung (Callanan et al., 1996). Die letzteren versuchen, eine sichere Aussage über die Prognose des Patienten zu machen, indem ein Zusammenhang zwischen dem biologischen Verhalten des Tumors und seinem Phänotyp hergestellt wird. Diesem Ziel dient die Unterscheidung in niedrig-, intermediär- und hochmaligne Formen. Die Berücksichtigung des Genotyps und des Immunphänotyps neben dem histologischen Befund wird bei der neueren REAL-Klassifizierung (Harris et al., 1994) angewandt.

2.2.2.1 WHO-Klassifikation hämatopoetischer Tumoren der Haustiere

Als aktueller internationaler Standard zur histologischen Klassifikation der hämatopoetischen Proliferationen bei Haustieren und damit auch der lymphatischen Proliferationen bei der Katze gilt jedoch die WHO-Klassifikation der hämatopoetischen Tumoren der Haustiere von 2002 (Valli et al., 2002), welche die Tumoren des lymphoiden Systems wie folgt einteilt:

**WHO-Klassifikation der hämatopoetischen Tumoren der Haustiere
(Auszug: Tumoren des lymphoiden Systems)**

1. B-Cell Lymphoid Neoplasms

- 1.1 Precursor B-cell neoplasms
 - 1.1.1 B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma
- 1.2 Mature B-cell neoplasms
 - 1.2.1 B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma
 - 1.2.2 B-cell lymphocytic lymphoma intermediate type (LLI)
 - 1.2.3 Lymphoplasmacytic lymphoma (LPL)
 - 1.2.4 Follicular lymphomas
 - 1.2.4.1 Mantle cell lymphoma (MCL)
 - 1.2.4.2 Follicular center cell lymphoma I
 - 1.2.4.3 Follicular center cell lymphoma II
 - 1.2.4.4 Follicular center cell lymphoma III
 - 1.2.4.5 Nodal marginal zone lymphoma
 - 1.2.4.6 Splenic marginal zone lymphoma
 - 1.2.5 Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
 - 1.2.6 Hairy cell leukemia
 - 1.2.7 Plasmacytic tumors
 - 1.2.7.1 Indolent plasmacytoma
 - 1.2.7.2 Anaplastic plasmacytoma
 - 1.2.7.3 Plasma cell myeloma
 - 1.2.8 Large B-cell lymphomas
 - 1.2.8.1 T-cell-rich B-cell lymphoma
 - 1.2.8.2 Large cell immunoblastic lymphoma
 - 1.2.8.3 Diffuse large B-cell (noncleaved, cleaved) lymphoma
 - 1.2.8.4 Thymic B-cell lymphoma (mediastinal B)
 - 1.2.8.5 Intravascular large B-cell lymphoma
 - 1.2.9 Burkitt-type lymphoma
 - 1.2.9.1 High-grade B-cell lymphoma, Burkitt-like

2. T-Cell and NK-Cell Lymphoid Neoplasms

- 2.1 Precursor T-cell neoplasms
 - 2.1.1 T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma
- 2.2 Mature T-cell and NK neoplasms
 - 2.2.1 Large granular lymphoproliferative disorders (LGL)
 - 2.2.1.1 T-cell chronic lymphocytic leukemia
 - 2.2.1.2 T-cell LGL lymphoma/leukemia
 - 2.2.1.3 NK-cell chronic lymphocytic leukemia
 - 2.2.2 Cutaneous T-cell neoplasms
 - 2.2.2.1 Cutaneous epitheliotropic lymphoma (CEL)
 - 2.2.2.1.1 CEL, mycosis fungoides type
 - 2.2.2.1.2 CEL, pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp) type
 - 2.2.2.2 Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma
 - 2.2.3 Extranodal/peripheral T-cell lymphoma (PTCL)
 - 2.2.3.1 PTCL, mixed lymphoid type
 - 2.2.3.2 PTCL, mixed inflammatory type
 - 2.2.4 Adult T-cell like lymphoma/leukemia
 - 2.2.5 Angioimmunoblastic lymphoma (AILD)
 - 2.2.6 Angiotropic lymphoma
 - 2.2.6.1 Angiocentric lymphoma
 - 2.2.6.2 Angioinvasive lymphoma
 - 2.2.7 Intestinal T-cell lymphoma
 - 2.2.8 Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)

3 Miscellaneous Tumors

- 3.1 Mast cell tumor
- 3.2 Hodgkin-like lymphoma
- 3.3 Thymoma
- 3.4 Thymic carcinoma (malignant thymoma)
- 3.5 Myelolipoma
- 3.6 Malignant fibrous histiocytoma

4 Benign Lymphoid Proliferations

- 4.1 Follicular lymphoid hyperplasia
- 4.2 Atypical follicular lymphoid hyperplasia

Diese Klassifikation teilt die lymphatischen Tumoren zunächst in B-Zell Neoplasien, T- und NK-Zell Neoplasien, sonstige Tumoren und gutartige lymphoide Proliferationen ein.

Die weitere Klassifikation der einzelnen Gruppen orientiert sich an zytologischen Faktoren wie Zellgröße, Kernform, -größe und -zahl, Verteilung des Chromatins, Kern-Zytoplasma-Verhältnis oder der Kernplatzierung. Weitere Einteilungskriterien sind die Lage des Tumors bzw. der Ursprungszelle im Gewebe und die Architektur des Tumors.

Die Kenntnis des Zelltyps, also lymphoblastisch, lymphozytär, plasmazytär, immunoblastisch, B- oder T-Zellen, hat eine große Bedeutung, da die Prognose der verschiedenen Lymphome unterschiedlich ist. So haben beim Menschen (Gisselbrecht et al., 1998; Melnyk et al., 1997) und beim Hund z.B. T-Zell-Lymphome eine schlechtere Prognose als B-Zell-Lymphome (Link und Hirschberger, 2000).

Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung des Immunphänotyps bei der Katze zeigten allerdings, dass hier keine Vorhersage der Prognose aufgrund der Zuordnung zum T-Zell-Phänotyp möglich war (Patterson-Kane et al., 2004; Vail et al., 1998).

2.2.2.2 WHO-Klassifikation der in der Arbeit verwendeten Neoplasien

Die nachfolgend aufgeführten Beschreibungen der in der Arbeit verwendeten Neoplasien entstammen dem Originaltext der WHO-Klassifikation der hämatopoetischen Tumoren der Haustiere von 2002 (Valli et al., 2002).

2.2.2.2.1 B-Zell-Lymphome

2.2.2.2.1.1 Follikelzentrums-Lymphom Typ II

Die folliculären Lymphome stammen von den Germinalzentren der Lymphknoten und der Milz ab. Sie sind durch eine folliculäre Architektur und einen nach außen ausdünnenden Saum von Mantelzellen gekennzeichnet.

Das Follikelzentrums-Lymphom Typ II ist ein sich langsam entwickelnder Tumor mit folliculärer Architektur. Er besteht aus kleinen reifen Zellen mit gekerbten Kernmembranen (sog. *cleaved cells*, bzw. *centrocytes*) und großen Zellen mit oder ohne gekerbten Zellkern (auch als *centroblasts* bezeichnet). Mitosen können in fast allen Follikeln beobachtet werden.

2.2.2.2.1.2 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

Großzellige B-Zell-Lymphome sind Tumoren mit diffuser Architektur, die aus großen B-Zellen bestehen.

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom ist mittelgradig aggressiv und besteht aus einer relativ einheitlichen Population von großen lymphoiden Zellen. Die Zellkerne sind teilweise

blasig mit verzweigtem Chromatin und zwei oder drei prominenten Nukleoli, welche typischerweise der Kernmembran anliegen.

2.2.2.2.2 T-Zell-Lymphome

2.2.2.2.2.1 Intestinales T-Zell-Lymphom

Dies sind langsam wachsende Tumoren des Darmtraktes, die wahrscheinlich aus chronischen Darmentzündungen (inflammatory bowel disease, IBD) hervorgehen. Sie bestehen aus einer starken Infiltration mit kleinen, dunkel gefärbten T-Lymphozyten mit irregulärer Kernform. Die Zellen dringen in das Darmepithel ein, wobei kleine Nester im Epithel gefunden werden können. Oft finden sich fokale Ulzerationen in der Darmschleimhaut. Die Lamina propria ist unregelmäßig involviert. Ein Kennzeichen der malignen Transformation ist die uneinheitliche Beteiligung der Villi, wobei nicht betroffene Villi neben stark infiltrierten liegen können.

2.2.2.2.2.2 Lymphoblastisches T-Zell-Lymphom

Dies ist ein schnell wachsender Tumor aus T-Lymphoblasten, der das Knochenmark und/oder das periphere Gewebe in unterschiedlichem Grad betrifft. Die Zellen sind mittelgroß mit mittlerer Kerngröße. Der Tumor zeigt eine diffuse Architektur und eine hohe Mitoserate. Die Kerne sind rund oder haben flache Einziehungen („convoluted type“). Die Nukleoli sind klein und undeutlich oder fehlen.

2.3 Ätiologie lymphatischer Proliferationen bei der Katze

2.3.1 Das Feline Leukämievirus (FeLV)

Das feline Leukämievirus gehört zum Genus der Gammaretroviren (Mammalian Typ C-Retrovirus) der Familie *Retroviridae* (Murphy et al., 1999). Es ist ein behülltes Einzelstrang-RNS-Virus mit ikosaedrischem Kapsid.

2.3.1.1 Vorkommen bei lymphatischen Proliferationen

Einer kanadischen Studie von Jackson et al. (1996) zufolge waren 54 % der Lymphome FeLV-Antigen-positiv. In älteren Untersuchungen konnten bei bis zu 70 % der an hämatopoetischen Proliferationen erkrankten Katzen das feline Leukämievirus (FeLV) nachgewiesen werden konnte (Hardy, 1981). Neuere australische Studien zeigten, dass dort im Untersuchungszeitraum nur 2 % der untersuchten Katzen mit hämatopoetischen

Proliferationen FeLV-Antigen-positiv waren. Jedoch konnte mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) in 26 % der Tumoren FeLV-Provirus nachgewiesen werden (Gabor et al., 2001a). Australien hat jedoch eine wesentlich niedrigere Häufigkeit von FeLV-Infektionen, als Mitteleuropa und die USA (Schmidt et al., 1992; Shaw et al., 1990). Eine andere australische Studie mit 14 Tieren mit Lymphomen konnte dementsprechend keine FeLV-DNS feststellen (Wang et al., 2001).

Eine US-amerikanische Studie belegt mit nur 14,5 % FeLV-positiven Lymphomen im Untersuchungsmaterial des Zeitraums von 1983 bis 2003 eine deutlich geringere Zahl von FeLV-positiven Lymphomen in neuerer Zeit (Louwerens et al., 2005). Diese Daten werden durch eine weitere Studie aus den USA bestätigt, die bei 110 Fällen von Lymphomen aus den Jahren 1988 bis 1996 nur bei 25,5 % der Fälle eine Assoziation mit FeLV nachweisen konnte (Vail et al., 1998). Diese Studie verzeichnet auch eine Änderung in Signalement und der relativen Häufigkeit der anatomischen Lokalisationen im Vergleich zu älteren Studien. Während diese Studien Lymphome vor allem bei jungen (medianes Alter 4-6 Jahre), FeLV-positiven Katzen meist als Thymusform registrierten (Hardy et al., 1980; Jackson et al., 1996), konnte mit der Studie von Vail et al. (1998) eine Verlagerung des medianen Alters auf 9,5 Jahre sowie eine Zunahme der relativen Häufigkeit von intestinalen (34,7 %) und multizentrischen (18,8 %) Lymphomen dokumentiert werden.

Zurückgeführt wird dieses Phänomen von den Autoren auf die FeLV-Eradikationsprogramme zu Beginn der 80er Jahre.

Bei in Gießen und Leipzig untersuchten Leukosen der Katze aus dem Zeitraum von 1980 bis 1996 stand die multizentrische Leukose mit 40 % der Leukosen im Vordergrund. Die Thymusformen machten ca. 21 % der untersuchten Neoplasien dieses Komplexes aus. Die intestinale Leukose konnte bei circa. 15 % der Leukosen gefunden werden (Reinacher, 1997). Eine in Gießen durchgeführte Dissertation untersuchte 129 maligne Lymphome von Sektionskatzen aus Gießen und Leipzig. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von 1988 bis 1995 und 1998 bis 2000 (Gießen) sowie 1994 bis 1998 (Leipzig). Hierbei waren circa 46 % der Lymphome FeLV-positiv. Auch in dieser Arbeit standen die multizentrischen Lymphome mit 38 % im Vordergrund, wohingegen intestinale und mediastinale Lymphome jeweils ca. zu 25 % vertreten waren (Köhler, 2003).

2.3.1.2 Tumorpathogenese

Für die Eigenschaft dieses Virus, Tumoren auszulösen, spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. So können die so genannten LTRs (long terminal repeats) am 3'-Ende des

Virusgenoms als Promotoren für zelluläre Protoonkogene dienen und über die Aktivierung dieser Gene zum Tumorwachstum führen (Athas et al., 1995; Rohn und Overbaugh, 1995). Ein anderer Mechanismus ist die Insertionsmutagenese. Hierbei integriert sich das retrovirale Provirus in die Nähe von Genen, die für Zelldifferenzierung oder –wachstum zuständig sind (Varmus, 1988). Ein Beispiel dafür ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *c-myc* in feline T-Zell-Lymphomen (Athas et al., 1994; Neil et al., 1987; Varmus, 1988)

2.3.2 Das Feline Immundefizienz Virus (FIV)

Untersuchungen mit einer deutlichen Korrelation FIV-seropositiver Katzen mit dem Auftreten von Lymphomen geben Hinweise darauf, dass das Feline Immundefizienz-Virus (FIV) mit lymphatischen Neoplasien in Zusammenhang steht (Callanan et al., 1996; Callanan et al., 1992; Hutson et al., 1991; Schmidt et al., 1992). So wurden in Australien 50 % (Gabor et al., 2001b) bzw. 46 % (Court et al., 1997) der Katzen mit Lymphomen FIV-seropositiv getestet. Hier ist allerdings aus epidemiologischen Untersuchungen bekannt, dass die FIV-Prävalenz in der australischen Katzenpopulation deutlich höher liegt als bei Katzen in Mitteleuropa und den USA (Schmidt et al., 1992; Shaw et al., 1990).

Das zum Genus Lentivirus der Retroviridae zählende Feline Immundefizienz-Virus (Murphy et al., 1999) infiziert bevorzugt CD4-positive-Lymphozyten und führt so zu einer Immunsuppression sowie einer generalisierten Lymphadenopathie (Pedersen und Barlough, 1991).

Trotz der oben genannten Häufung des Auftretens von Lymphomen bei seropositiven Katzen konnte in den meisten Tumorzellen kein integriertes FIV-Genom nachgewiesen werden (Terry et al., 1995). Der Pathogenesemechanismus bei der Tumorgenese ist unklar. Vermutlich spielt die FIV-Infektion, vergleichbar der HIV-Infektion, eine indirekte Rolle (Beatty et al., 1998; Endo et al., 1997; Terry et al., 1995).

2.4 Limitierung der histologischen Diagnostik lymphatischer Proliferationen

Lymphoproliferative Erkrankungen stellen für die klinische wie auch die pathologische Untersuchung oft ein diagnostisches Dilemma dar. So kann klinisch eine generalisierte Lymphknotenvergrößerung bei der Katze sowohl auf eine neoplastische als auch eine reaktive bzw. entzündliche Ursache hindeuten (Sherding, 1994). Auch weiterführende diagnostische Maßnahmen wie die histologische Untersuchung von Biopsien lassen nicht immer eine

eindeutige Diagnose zu, da sich auch durch histopathologische und immunhistologische Verfahren lymphatische Neoplasien der Katze manchmal nicht eindeutig von reaktiven lymphatischen Infiltrationen oder reaktiven Proliferationen im lymphatischen Gewebe abgrenzen lassen. So beschreibt eine Studie von 1987 sechs Fälle von Katzen mit generalisierter Lymphadenopathie, welche histologisch Kriterien von Lymphomen wie Verlust der Lymphknotenarchitektur, hohe Mitoserate, Kapselinfiltration oder follikelartige Strukturen ohne Germinalzentren zeigten. Die Initialdiagnose des Lymphoms wurde jedoch aufgrund Rückbildung der Lymphknotenvergrößerung und fehlender klinischer Symptomatik 12 bis 84 Monate nach Diagnosestellung zugunsten einer nichtmalignen Lymphadenopathie geändert (Mooney et al., 1987).

2.5 Klonalitätsanalyse

Die Abgrenzung der neoplastischen von reaktiven Zellen kann durch den Nachweis von Eigenschaften gelingen, welche nur die Tumorzellen, nicht aber die ihnen morphologisch und immunhistologisch ähnlichen Zellen besitzen. Der entscheidende, für die Diagnostik nutzbare Unterschied ist in der somatischen Mutationstheorie der Karzinogenese formuliert. Diese Theorie postuliert, dass ein Tumor aus Zellen besteht, die alle Nachkommen einer Zelle sind, in welcher eine oder mehrere irreversible somatische Mutationen aufgetreten sind (Knudson, 1985). Tatsächlich ist es so, dass bei den meisten malignen Tumoren eine klonale Population von Zellen vorliegt (Levy et al., 1977). Eine klonale Population ist definiert als diejenigen Zellen, die aus der mitotischen Teilung einer einzelnen somatischen Zelle entstanden sind (Secker-Walker, 1985). Auch auf maligne lymphatische Neoplasien trifft diese Eigenschaft zu (Levy et al., 1977). Der Nachweis der Klonalität einer neoplastischen Population kann dann erfolgen, wenn es möglich ist, mit Hilfe eines Markers die Homogenität der neoplastischen Population im Gegensatz zu einer heterogenen, nicht neoplastischen Vergleichspopulation zu zeigen.

Die Methoden der Klonalitätsanalyse können weitestgehend in folgende Kategorien eingeteilt werden: Untersuchung der Inaktivierung von X-Chromosomen, Nachweis somatischer Mutationen, Analyse viraler Integrationen und Lymphozytenanalyse (Wainscoat und Fey, 1990).

2.5.1 Untersuchung der Inaktivierung von X-Chromosomen

Bei weiblichen Säugetieren wird eines der beiden X-Chromosomen jeder Zelle während der frühen Embryonalentwicklung inaktiviert und dies wird stabil auf die Nachkommen der Zelle vererbt (Brown und Chandra, 1973; Lyon, 1988). Welches der beiden X-Chromosome dabei

inaktiviert wird, ist zufällig (Brown und Chandra, 1973). Somit besteht in einer polyklonalen Population ein Mosaik aus Zellen, in denen entweder das mütterliche oder das väterliche X-Chromosom inaktiviert ist. Bei einer monoklonalen Population dagegen besteht ein einheitliches Muster inaktivierter mütterlicher oder väterlicher X-Chromosomen.

Ein Beispiel für den Einsatz dieser Untersuchungsmethode ist die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) Isoenzymanalyse.

Diesem Verfahren zugrunde liegt die Tatsache, dass das Enzym G6PDH auf dem X-Chromosom kodiert ist (Martini et al., 1986) und in mehreren Varianten vorkommen kann (Beutler et al., 1967). Weibliche Säugetiere, die heterozygot für diese verschiedenen Varianten sind, exprimieren in normalen Geweben demnach verschiedene Varianten des Enzyms, in jeder einzelnen Zelle jedoch nur eine Variante. Ein Tumor, bestehend aus einer monoklonalen Population, wird also ein einheitliches Muster von G6PDH-Varianten zeigen (Beutler et al., 1967).

Der Klonalitätsnachweis über die Untersuchung inaktivierter X-Chromosomen ist allerdings natürlicherweise auf Säugetiere mit zwei X-Chromosomen beschränkt.

2.5.2 Nachweis somatischer Mutationen

Bei vielen humanen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen einheitliche, nicht zufällige chromosomale Aberrationen aufweisen (Mitelman et al., 2006), die durch Chromosomenanalyse als Klonalitätsmarker dienen können.

Als weiterer Klonalitätsnachweis dient in der Humanmedizin die Analyse von Punktmutationen, bevorzugt in den Onkogenen verschiedener Tumoren. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind Punktmutationen im *ras* Onkogen (Bos et al., 1984).

Als Möglichkeit der Detektion einer klonalen Tumorphilpopulation dient auch das „DNA Fingerprinting“. Diese Methode nutzt DNS-Sonden, die spezifisch an im Genom verteilte, sich nacheinander wiederholende Sequenzen, sog. VNTRs (Variable Numbers of Tandem Repeats) oder Mikrosatelliten, binden und so nach enzymatischer Verdauung des Genoms und elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente ein individuell spezifisches Bandenmuster ergeben (Jeffreys et al., 1985). Diese ursprünglich in der Forensik und zum Abstammungsnachweis genutzte Methode unterscheidet nicht nur unterschiedliche Individuen. Sie kann auch genetisch unterschiedliche Zellpopulationen innerhalb eines Individuums nachweisen, wie sie bei Tumoren mit somatischen Mutationen vorliegen (Fey et al., 1988).

2.5.3 Analyse viraler Integrationen

Die Integration von retroviralen Proviren ins Genom des Wirtsorganismus geschieht zufällig (Varmus, 1988). Entsteht aus einer retroviral infizierten Zelle, möglicherweise durch den Einfluss des integrierten Provirus, durch mitotische Teilung ein Tumor, so ist in allen Zellen dieses Tumors das Provirus an der gleichen Stelle integriert. Dies kann als Klonalitätsmarker dienen und wird in der Humanmedizin beispielsweise im Zuge der Diagnostik der adulten T-Zell-Leukämie eingesetzt (Takemoto et al., 1994).

Ein ähnliches Prinzip liegt der Klonalitätsdiagnostik von mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziierten Tumoren zugrunde. Die DNS des EBV ist vor der Infektion der Zelle ein doppelsträngiges lineares Molekül mit homologen, sich nacheinander wiederholenden Sequenzen (tandem repeats) an beiden Enden, wobei die Anzahl der tandem repeats zwischen den Einzelnviren variiert (Given et al., 1979).

Nach der Infektion der Zelle durch ein Virus werden die Enden fusioniert und die DNS des Virus liegt im latenten Zustand als zirkuläres episomales Molekül vor (Adams und Lindahl, 1975; Lindahl et al., 1976). Bei der Zellteilung im Zuge einer Tumorphiliferation wird die Virus-DNS ebenfalls amplifiziert und auf die Tochterzellen übertragen. Sie kann somit über die unterschiedliche Anzahl der tandem repeats und damit durch eine unterschiedliche Größe der Moleküle als Klonalitätsmarker dienen (Raab-Traub und Flynn, 1986; Shigehiko Ishihara, 1997; Walling et al., 2004).

2.5.4 Lymphozytenanalyse

Ziel der Klonalitätsdiagnostik bei lymphoproliferativen Erkrankungen sind die spezifischen Rezeptoren der Lymphozyten. Dies sind der T-Zell-Rezeptor im Falle der T-Lymphozyten und der B-Zell-Rezeptor im Falle der B-Lymphozyten.

2.5.4.1 Molekularbiologische Grundlagen

2.5.4.1.1 B-Zellen

Jede B-Zelle produziert ein individuelles Immunglobulinmolekül, das als Oberflächenmolekül in die Zytoplasmamembran eingebunden wird und somit Teil des B-Zell-Rezeptors wird (Wall und Kuehl, 1983). Der B-Zell-Rezeptor hat zwei verschiedene Funktionen. Einerseits bindet er effizient Antigene und diese können nach Endozytose und Prozessierung T-Helferzellen präsentiert werden (Chesnut und Grey, 1981). Andererseits überträgt der B-Zell-Rezeptor ein Signal, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des weiteren Verhaltens der Zelle spielt (Gold et al., 1990; Lane et al., 1990).

2.5.4.1.2 Aufbau des B-Zell-Rezeptors

Das Immunglobulinmolekül ist in der Zellmembran mit heterodimeren Proteinen assoziiert. Diese Heterodimere bestehen aus zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Proteinen, die als Ig- α und Ig- β bezeichnet werden (Reth, 1992).

Das Immunglobulinmolekül selbst besteht aus zwei identischen schweren (55 oder 70 kD) (Abbas et al., 2000a) und zwei identischen leichten Proteinketten (ca. 24 kD) (Abbas et al., 2000a). Dabei sind die leichten Ketten jeweils über eine Disulfidbrücke kovalent mit einer der schweren Ketten und die schweren Ketten untereinander ebenfalls über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Fleischman, 1966). In ihrer Gesamtheit bilden die Ketten zusammen eine Art Y-Struktur (Davies und Chacko, 1993).

Sowohl die leichten, als auch die schweren Ketten weisen so genannte Domänen auf. Dies sind Gruppen von sich wiederholenden homologen Abschnitten, die 70 bis 110 Aminosäuren lang sind und aus zwei β -Faltblättern bestehen (Edmundson et al., 1975). Diese β -Faltblätter bestehen aus jeweils drei bis fünf antiparallelen Ketten (Schiffer et al., 1973) und sind untereinander ebenfalls durch Disulfidbrücken verbunden (Edmundson et al., 1975).

Von diesen Domänen besitzen die leichten Ketten jeweils zwei, die schweren Ketten je nach Klasse vier bis fünf (Davies und Chacko, 1993).

Es gibt zwei verschiedene Klassen von leichten Ketten, κ und λ , wobei aufgrund der Identität der beiden leichten Ketten in einem Immunglobulinmolekül immer nur eine Klasse vorkommt und niemals beide nebeneinander. Das Verhältnis von Antikörpern mit κ -Leichtketten zu Antikörpern mit λ -Leichtketten ist speziesabhängig. Es beträgt im gesunden Organismus beispielsweise beim Menschen 0,8:1 bis 2,2:1 (Reichard et al., 2003) und bei der Katze 3:1 (Klotz et al., 1985).

Bei den schweren Ketten sind für den Menschen fünf Klassen beschrieben α , γ , δ , ϵ und μ (Davies und Chacko, 1993), welche die Zugehörigkeit eines Antikörpermoleküls zu den verschiedenen Immunglobulinklassen (IgA, IgG, IgD, IgE und IgM) determinieren (Lennox und Cohn, 1967). Bei der Katze wurden bislang IgG, IgA, IgM und IgE gefunden (Tizard, 2004).

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Antikörpermoleküle miteinander fällt auf, dass sich die Sequenzen im Bereich des Aminoendes der Proteine stark unterscheiden. Dies betrifft sowohl die ersten Domänen der leichten, als auch der schweren Ketten (Lennox und Cohn, 1967). Die Sequenzen der folgenden Domänen hingegen sind bei Molekülen einer Klasse annähernd gleich (Lennox und Cohn, 1967). Aufgrund dieser Unterschiede in der Aminosäurevariabilität werden die ersten Domänen als „variable“

Domänen und die folgenden als „konstante“ Domänen bezeichnet. Die variablen Domänen jeweils einer leichten und einer schweren Ketten bilden zusammen den Bereich, in dem Antigen gebunden werden kann. Dieser Bereich wird als „V-Region“ (variable region) des Moleküls bezeichnet. Die übrigen, konstanten Domänen bilden die so genannte „C-Region“ (constant region) (Williamson, 1976).

Der weitergehende Sequenzvergleich der Aminosäuren der V-Region zeigt, dass hier drei hypervariable Bereiche von vier Bereichen geringer Variabilität umrahmt werden (Kabat et al., 1979), wobei die hypervariablen Bereiche die Stellen mit Antigenkontakt bilden und daher als „complementary-determining region“ (CDR1-3, „Gegenstück-bildende Regionen“) bezeichnet werden (Wu und Kabat, 1970). Die Bereiche mit geringer Variabilität in der Aminosäuresequenz werden als „framework region“ (FR1-4, „Gerüstregionen“) bezeichnet (Wu et al., 1979).

2.5.4.1.3 V(D)J-Rekombination

Die große Zahl der bei Säugetieren vorkommenden verschiedenen Antikörper bzw. Immunglobuline wird nicht durch viele einzelne Gene kodiert. Ihre Gene setzen sich vielmehr aus mehreren Teilen zusammen (Tonegawa, 1983). Bei den Genen der V-Region der schweren Kette sind dies drei Teile, die als *V* („variable“), *J* („joining“) und *D* („diversity“) (Berman et al., 1988; Bernard et al., 1978; Early et al., 1980) bezeichnet werden. Anzumerken ist hierzu, dass der Begriff der „V-Region“ somit sowohl für den variablen Anteil des Proteins, als auch für einen Teil der Gene verwendet wird, die dieses Protein kodieren. In den Genen der leichten Ketten gibt es nur *V* und *J* Bereiche (Berman et al., 1988). Die Gene liegen jeweils in multipler Ausführung vor. So existieren in der Keimbahn beim Menschen für die schwere Kette des Immunglobulins 100 – 200 *V*-Gene, 16 – 50 *D*-Gene und 6 *J*-Gene. Aufgrund von Übereinstimmungen in der Sequenz der *V*-Gene können diese zu 7 Genfamilien zusammengefasst werden (Lefranc, 2001), wobei die einzelnen Mitglieder dieser Familien (je nach Autor auch als „Untergruppen“ bezeichnet) eine Übereinstimmung von mindestens 75 % auf Nukleotidebene haben (Giudicelli und Lefranc, 1999). Jedem *V*-Gen am 5'-Ende unmittelbar vorangellagert ist ein Genabschnitt, der ein so genanntes „leading“-Protein kodiert. Dieser Genabschnitt wird als „leader region“ bezeichnet (Tonegawa et al., 1978). Die Abstände zwischen den Genen der *V*-, *D*- und *J*-Region betragen in der Keimbahnkonfiguration mehrere Kilobasenpaare (Berman et al., 1988).

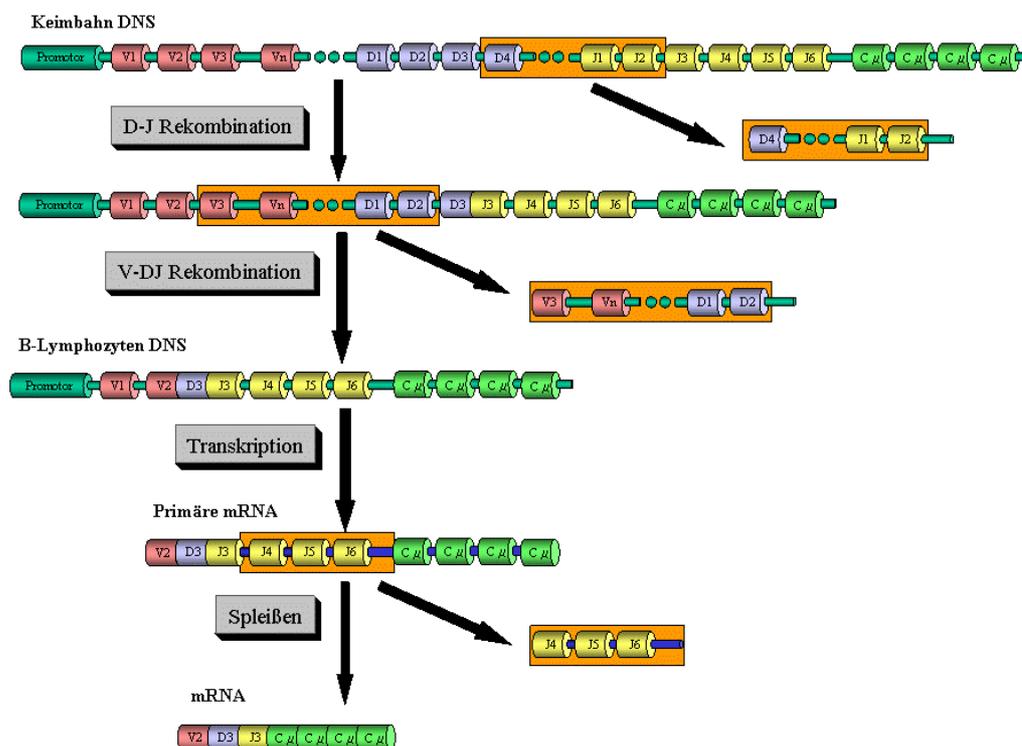
Um eine möglichst breite Diversität der Antikörper zu erreichen, wird aus den Gensegmenten der verschiedenen Elemente jeweils eines gewählt und mit den anderen zu einem funktionellen Gen kombiniert.

Dieses erstmals 1965 postulierte (Dreyer und Bennett, 1965) und 1978 auf DNS-Ebene nachgewiesene (Brack et al., 1978; Seidman et al., 1978) Rearrangement der Gene wird als **V(D)J-Rekombination** (vgl. Abbildung 1) bezeichnet.

Hierbei wird im Falle der schweren Kette zunächst eines der Gene für die D-Region mit einem Gen für die J-Region kombiniert (D-J Rekombination). Im nächsten Schritt wird ein V-Gen mit den bereits rekombinierten Teilen zusammengeführt (V-DJ Rekombination). In dieser Konfiguration liegt die DNS in reifen Lymphozyten vor. Bei den beschriebenen Schritten werden die zwischen den rearrangierten Segmenten liegenden, nicht benutzten Gensegmente enzymatisch eliminiert. Die in 5'-Richtung der DNS liegenden nicht verwendeten V-Gene müssen nicht durch einen enzymatischen Schritt eliminiert werden, da lediglich das rearrangierte V-Segment transkribiert wird (Janeway et al., 1999).

Die Zusammenführung des durch die Rekombination entstandenen Exons für den variablen Anteil der schweren Kette mit den Genen der konstanten Region und die Elimination der nichtrearrangierten J-Anteile wird erst durch das Spleißen im Zuge der RNS-Prozessierung erreicht (Rabbitts, 1978).

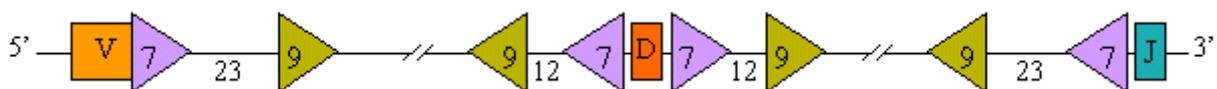
Abbildung 1: Schema der V(D)J-Rekombination



Die Rekombination beginnt damit, dass ein Enzymkomplex, in seiner Gesamtheit als **V(D)J-Rekombinase** bezeichnet (Abbas et al., 2000b), an spezifische Erkennungssequenzen der Lymphozyten-DNS bindet. Die dafür verantwortlichen Anteile des Komplexes sind zwei Proteine, die gemeinsam ausschließlich in reifenden Lymphozyten exprimiert werden und deren kodierende Gene aufgrund der Funktion ihrer Produkte als **recombination activating gene 1** (RAG1) (Schatz et al., 1989) und **recombination activating gene 2** (RAG2) (Oettinger et al., 1990) bezeichnet werden. Die RAG-Proteine binden an die so genannten **recombination signal sequences** (RSS). Diese Sequenzen bestehen aus einem hochkonservierten Bereich von sieben Nukleotiden (5'-CACAGTG-3' oder 5'-CACTGTG-3' mit geringen Variationen), dem sogenannten Heptamer und einem hochkonserviertem Bereich von neun Nukleotiden (5'-ACAAAACC-3' oder 5'-GGTTTTTGT-3' mit geringen Variationen), welcher als Nonamer bezeichnet wird. Zwischen diesen beiden liegt ein wenig konservierter Bereich aus entweder 12 ± 1 oder 23 ± 1 Nukleotiden. Dies entspricht annähernd einer oder zwei Windungen der DNS in der Doppelhelix (McBlane et al., 1995). Je nach Größe des Abstandes werden die Erkennungssequenzen als 12-RSS oder 23-RSS bezeichnet (Max et al., 1979; Sakano et al., 1979).

Die RSS flankieren die kodierenden Bereiche der Gensegmente des variablen Teils der schweren Kette. 23-RSS finden sich jeweils in 3'-Richtung neben den Genen der V-Region und in 5'-Richtung neben den Genen der J-Region, wohingegen die Gene der D-Region beidseits von 12-RSS flankiert werden (vgl. Abbildung 2) (Max et al., 1979; Sakano et al., 1979).

Abbildung 2: Lage der RSS-Sequenzen in Verhältnis zu den codierenden Sequenzen (Abbas et al., 2000b)



Die Anordnung der RSS lässt den Schluss zu, dass eine effiziente Rekombination nur zwischen einem Gensegment mit einem 12-RSS und einem Gensegment mit einem 23-RSS stattfindet (Early et al., 1980). Diese Einschränkung wird als „12/23-Regel“ bezeichnet (Tonegawa, 1983). Der Regel folgend, kann im Falle der schweren Kette ein D-Segment mit einem J_H-Segment kombiniert werden und ein V-Segment mit einem D-Segment, wohingegen eine direkte Kombination eines V_H-Segmentes mit einem J-Segment im Regelfall nicht geschieht.

Nachdem die Rekombinase über die RAG-Proteine zunächst an eines der RSS (12 oder 23) gebunden hat, wird durch die Bindung des entsprechenden zweiten, zu einem anderen

Gensegment gehörenden RSS (23 oder 12) die sog. **Synapsis** bzw. der **synaptische Komplex** gebildet (Hiom und Gellert, 1998). In diesem Enzym-DNS-Komplex erzeugen die RAG-Proteine zwei Doppelstrangbrüche, wodurch die DNS genau zwischen den RSS und den codierenden Elementen gespalten wird (McBlane et al., 1995; van Gent et al., 1995). Darauf folgend werden die entstehenden Enden der DNS durch die RAG-Proteine unter Beteiligung von DNS-Reparaturenzymen so miteinander verbunden, dass zwischen den Immunglobulingenen eine so genannte kodierende Verbindung und zwischen den beiden Heptameren eine so genannte Signalverbindung entsteht (McBlane et al., 1995).

2.5.4.1.4 Mechanismen zur Erhöhung der Antikörperdiversität

2.5.4.1.4.1 Kombinatorische Diversität

Durch die Kombination der einzelnen Gensegmente der variablen Anteile wird eine sehr hohe Zahl von Proteinen für die Antikörperketten kodiert, wobei die genaue Zahl von der Menge der kombinierbaren funktionellen Gensegmente abhängig ist. Die Diversität wird zusätzlich dadurch erhöht, dass die rekombinierten schweren Ketten mit den ebenfalls rekombinierten leichten Ketten zu einem Antikörpermolekül zusammengesetzt werden. Die kombinatorische Diversität des Antikörpermoleküls ist dadurch zumindest theoretisch das Produkt aller möglichen Kombinationen der schweren mit allen möglichen Kombinationen der leichten Kette.

De facto ist der Grad der kombinatorischen Diversität jedoch geringer, da nicht alle Rekombinationen gleich häufig auftauchen und nicht alle Paarungen von leichter und schwerer Kette einen funktionellen Antikörper bilden (Abbas et al., 2000b).

2.5.4.1.4.2 Junktionale Diversität

Die dritte hypervariable Region der schweren Kette (CDR3) wird im Gegensatz zu den beiden ersten nicht ausschließlich vom V-Segment des variablen Anteils codiert. Dieser Bereich besteht vielmehr aus der D-Region und der Verbindungssequenz zwischen V-Region und D-Region auf der einen Seite sowie der Verbindung zwischen D-Region und J-Region auf der anderen Seite (Seide und Kehoe, 1983).

In dieser Region wird die Diversität durch Hinzufügen und Entfernen von Nukleotiden im Laufe der Rekombination erhöht. Diese hinzugefügten Nukleotide werden je nach Entstehungsart als P- oder N-Nukleotide bezeichnet.

P-Nukleotide sind **p**allindromische Sequenzen, die an das Ende der Gensegmente angefügt werden. Während nach der Erzeugung der Doppelstrangbrüche an den Heptameren glatte 5'-

phosphorylierte Enden entstehen (Roth et al., 1993; Schlüssel et al., 1993), die zur Bildung der Signalverbindung präzise miteinander verbunden werden, bilden die Enden der kodierenden Segmente zunächst durch einen nukleophilen Angriff der 3'-gelegenen OH-Gruppe auf die gegenüberliegende Phosphodiesterbindung eine sog. Haarnadelformation aus, welche die freiliegenden Enden quasi versiegelt (Roth et al., 1992). Darauf folgend wird in der Nähe der Haarnadelformation an zufälliger Stelle ein Einzelstrangbruch erzeugt, so dass überhängende Einzelstränge entstehen, die aus einigen Nukleotiden der kodierenden Bereiche und ihren komplementären Nukleotiden bestehen (Besmer et al., 1998).

Zu diesem Zeitpunkt werden zufällig bis zu 20 sog. N-Nukleotide ohne Matrize (**non-template encoded**) von dem Enzym **Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT)** an das Ende der Einzelstränge eingefügt (Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993).

In einem nächsten Schritt verbinden sich die beiden Einzelstränge über eine kurze Strecke miteinander, wobei durch Reparaturenzyme mit Exonukleaseaktivität ungepaarte Nukleotide entfernt werden. Die fehlenden komplementären Nukleotide der Einzelstränge werden darauf folgend ergänzt und somit die kodierende Verbindung vollendet (Grawunder und Harfst, 2001).

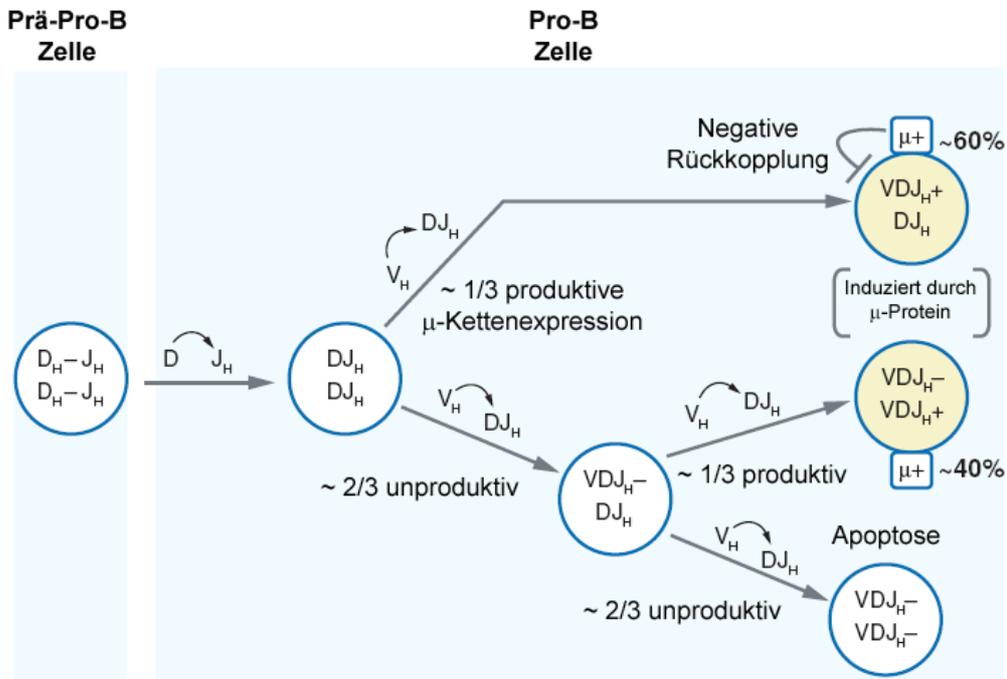
Aufgrund der Insertion der P- und N-Nukleotide wird die kodierende Verbindung auch als unpräzise Verbindung bezeichnet (Jung und Alt, 2004).

Durch die Zufälligkeit, in der die P- und N-Nukleotide addiert werden, entstehen nicht nur Produkte, die in der Basenzusammensetzung einzigartig sind. Die so entstandenen „neuen“ Gene unterscheiden sich auch jeweils in der Länge voneinander.

Misslingt die Rekombination in dem Sinne, dass kein funktionelles Gen entsteht, wird das zweite Allel umgelagert. Sollte auch das nicht zu einem funktionellen Ergebnis führen, erfolgt die Apoptose der Zelle (Waldmann, 1987). Der zugrundeliegende Mechanismus dieses als „allelischer Ausschluss“ bezeichneten Vorgangs ist noch nicht endgültig geklärt (Jung et al., 2006). Ergebnisse verschiedener Studien unterstützen jedoch die Theorie, dass im Pro-B-Zell Stadium zunächst auf beiden Allelen die D-J Rekombination stattfindet. Daran anschließend findet auf einem Allel die Zusammenführung mit einem V-Segment statt (Alt et al., 1984). Dieses neu entstandene Gen wird transkribiert und, sofern möglich, translatiert. Falls so ein intaktes funktionelles Protein entsteht („ μ -Protein“), wird dieses in die Membran eingelagert und bildet mit den bereits vorhandenen Ig- α und Ig- β eine Art provisorischen Rezeptor, der über eine angeschlossene Signalkaskade die Umlagerung des zweiten Allels verhindert (Brouns et al., 1993; Jumaa et al., 2005; Matsuo et al., 1993) (vgl. Abbildung 3).

Durch die Kombination von junktionaler und kombinatorischer Diversität können beim Menschen geschätzte 10^{11} mögliche Genvarianten geschaffen werden. Dabei ist allerdings nur ein Teil funktional und wird exprimiert (Abbas et al., 2000b).

Abbildung 3: Modell des allelischen Ausschlusses, modifiziert nach Jung et al., 2006



2.5.4.1.4.3 Somatische Hypermutation

Bei der somatischen Hypermutation treten zufällige Punktmutationen in den bereits rearrangierten Genen der schweren Kette auf. Dieses Phänomen findet bei der antigenvermittelten Hypermutation im Zuge des Antigenkontaktes statt. Es dient einer Art Feineinstellung der Antigenerkennung, indem die Bindungsfähigkeit der Antikörper stark erhöht wird (Maizels, 1995). Wenn durch die somatische Hypermutation und die dadurch entstehende leicht veränderte Aminosäuresequenz des Antikörpers dieser besser das Antigen bindet, wird die Expression des Bcl-2-Protein erhöht, welches die Zelle vor Apoptose – dem „programmierten Zelltod“ – schützt. Wird keine gute Antigenbindung erreicht, ist die Expression des Bcl-2-Proteins niedrig und in der Zelle wird über die Aktivierung des sogenannten FAS-Rezeptors die Apoptose ausgelöst (Mastache et al., 2006). Die somatische Hypermutation findet in bevorzugten Bereichen statt; vor allem CDR-1, CDR-2 und die dritte Framework-Region sind betroffen (Shapiro et al., 1999).

2.5.5 Diagnostische Anwendung

2.5.5.1 Humanmedizin

2.5.5.1.1 Southern Blotting

Die erste diagnostische Anwendung zur Identifizierung klonaler Lymphozytenpopulationen bestand im Einsatz des sog. „Southern Blottings“ Mitte der 80er Jahre (Arnold et al., 1983; Flug et al., 1985). Bei diesem Verfahren wird zunächst DNS aus dem zu analysierenden Gewebe extrahiert. Darauf folgend wird die DNS durch verschiedenen Restriktionsenzyme verdaut, wodurch Fragmente verschiedener Länge entstehen. Die Trennung dieser DNS-Fragmente erfolgt mittels Gelelektrophorese. Nach Übertragung der getrennten Fragmente auf Nitrozellulose werden diese mit Hilfe spezifischer Sonden sichtbar gemacht. Diese Sonden sind gegen bestimmte Sequenzen, beispielsweise die Sequenz der J-Region der schweren Kette, gerichtet. An die Sonden gekoppelt sind Systeme, mit denen die Fragmente sichtbar gemacht werden können. Dies kann beispielsweise eine Kopplung mit einem radioaktivem Isotop sein, dessen Strahlung auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann (Southern, 1975). Für ein sichtbares Signal muss eine gewisse Menge der Sonden an der gleichen Stelle akkumulieren, d.h. es muss eine bestimmte Anzahl Moleküle gleicher Größe mit der Zielsequenz an dieser Stelle vorhanden sein.

Im Falle einer polyklonalen Lymphozytenpopulation kann je nach untersuchtem Gewebe lediglich die Keimbahnkonfiguration sichtbar gemacht werden, die in allen kernhaltigen, also auch den nicht lymphoiden Zellen des Gewebes, vorhanden ist. Die Fragmente der Lymphozyten-DNS mit ihren rearrangierten, jeweils unterschiedlich großen Genen für den Antigenrezeptor werden durch die Gelelektrophorese relativ gleichmäßig über die entsprechenden Größenbereiche verteilt, so dass an keiner Stelle so viel der Sonde binden kann, dass eine sichtbare Bande entsteht (Rezuke et al., 1997).

Liegt allerdings eine klonale Population wie im Falle eines Lymphoms vor, haben diese Zellen als Nachkommen einer einzigen Ausgangszelle alle das gleiche genetische Material, also alle gleichgroße Antigenrezeptorgene. Ist der Anteil der Tumorzellen an der untersuchten Gesamtpopulation groß genug - ca. 1-5 % aller rekombinierten Antigenrezeptoren (Medeiros und Carr, 1999) - entsteht eine sichtbare Bande, da sich die bei der Gelelektrophorese aufgetrennten Fragmente in einem Größenbereich akkumulieren (Rezuke et al., 1997).

Der Einsatz dieser Methode ist limitiert durch den hohen Arbeits- und Kostenaufwand sowie die großen Mengen DNS von guter Qualität, die benötigt werden (Lorenzen et al., 1994; Rezuke et al., 1997).

2.5.5.1.2 PCR

Anfang der 90iger Jahre wurde die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) für die Klonalitätsanalyse von Lymphomen erfolgreich etabliert (Bourguin et al., 1990; Brisco et al., 1990; Goudie et al., 1990; Trainor et al., 1990; Wan et al., 1990).

Die PCR ist eine Methode zur Synthese und Amplifikation von spezifischen Sequenzen doppelsträngiger DNS in vitro (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985). Grundlage der Reaktion ist der Einsatz von sog. Primern, kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden, die komplementär zur gesuchten Ausgangssequenz sind.

Man unterscheidet bei den Primern einen Vorwärtsprimer (forward oder sense primer), der in seiner Orientierung mit der Orientierung der notierten Sequenz übereinstimmt und einen Rückwärtsprimer (reverse oder antisense primer), der komplementär zur notierten Sequenz ist. Die beiden Primer werden in der Regel so gewählt, dass sie jeweils die Enden der gesuchten Sequenz binden (Sambrook et al., 1989).

Die Primer bilden nach Bindung an die zu amplifizierende Sequenz einen Ansatzpunkt für die DNS-Polymerase, die über mehrere Zyklen von Denaturierung der DNS und erneutem Binden der Primer spezifisch die Sequenz zwischen den beiden Primern amplifiziert (Baumforth et al., 1999).

Beim Einsatz der PCR zur Diagnostik von klonalen Lymphozytenpopulationen macht man sich zunutze, dass die einzelnen Gensegmente des variablen Anteils der Rezeptoren vor dem Genrearrangement zu weit auseinander liegen, um mit einer herkömmlichen PCR amplifiziert zu werden (Berman et al., 1988; Goudie, 1989; Goudie et al., 1990). Der Vorgang des Rearrangements bringt die Segmente jedoch so nahe zusammen, dass eine Amplifikation möglich wird (Medeiros und Carr, 1999).

Zur Unterscheidung einer klonalen von einer polyklonalen Population werden der Bereich mit höchster Diversität, also der CDR3 mit den N- bzw. P-Nukleotiden amplifiziert (Diaz-Cano, 1996). Dazu müssen Primer verwendet werden, die außerhalb dieses Bereichs binden, also in der V- bzw. der J-Region der Antigenrezeptor-Gene. Werden die Gene einer polyklonalen Population amplifiziert, sind die Amplifikate, bedingt durch das zufällige Entfernen und Hinzufügen von Nukleotiden beim Rearrangement, unterschiedlich groß. Liegt jedoch eine klonale Population vor, dominiert ein rearrangiertes Gen einer bestimmten Länge im Ausgangsmaterial, was zu einer Anhäufung von Amplifikaten einer Länge führt (Rezuke et al., 1997).

Die Sichtbarmachung der Amplifikate geschieht nach gelelektrophoretischer Auftrennung und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht. Handelt es sich bei dem Material um

Proben aus einer klonalen Lymphozytenpopulation, können diskrete Banden beobachtet werden. Proben polyklonaler Populationen stellen sich dagegen als unscharfer „Schmier“ bzw. Leitemuster dar (Medeiros und Carr, 1999).

Die Vorteile der PCR liegen in den geringen Anforderungen an die Probenqualität und -menge sowie dem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand. Nicht zuletzt ist diese Methode kostengünstiger. Im Gegensatz zum Southern Blotting, bei dem sich qualitativ entsprechende DNS nur aus frischem oder gefrorenem Material sicher extrahieren lässt, kann hier DNS eingesetzt werden, die aus Material stammt, das in Paraffin eingebettet war (Lorenzen et al., 1994; Segal et al., 1992).

2.5.5.1.2.1 B-Zell-Neoplasien

Verschiedene Arbeitsgruppen benutzten bei menschlichen B-Zell-Lymphomen Primer, die auf unterschiedliche Abschnitte der Gene der V-Region der schweren Kette der Immunglobuline zielten. Da jedes einzelne V- bzw. J-Segment im Rearrangement verwendet werden kann, aber es aufgrund der Diversität der Gene nicht praktikabel ist, spezifische Primer für jedes Segment zu benutzen, wurden die relativ konservierten Bereiche, die „framework regions“ (FR) als Bindungsstelle der Primer gewählt. Eingesetzt wurden Primer, die an FR1 (Aubin et al., 1995; Deane und Norton, 1991), FR2 (Ramasamy et al., 1992) oder FR3 (Brisco et al., 1990) binden, jeweils in Verbindung mit Primern, die gegen die J-Region der schweren Kette gerichtet (FR4) sind.

Da diese Framework-Regionen eine Homologie aufweisen, kann die Zahl an Primern begrenzt werden. Um für FR2 und FR3 einen hohen Prozentsatz der möglichen Rekombinationen nachzuweisen, genügte jeweils ein Primer für alle V-Familien (sog. „Consensus“-Primer). Für FR1 konnten sowohl consensus Primer (FR1c) (Aubin et al., 1995) als auch familienspezifische Primer (FR1f) (Deane und Norton, 1991) entwickelt werden. Die Anzahl der J-Regionen in der Keimbahnkonfiguration ist im Vergleich mit den V-Regionen relativ niedrig, so dass hier Consensus-Primer einfach zu finden waren.

Die Methodik wurde zunächst an frischem oder gefrorenem Material angewendet, konnte später jedoch erfolgreich auf formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Material übertragen werden (Wan et al., 1990). Dies war möglich, da je nach Methode Moleküle mit Längen zwischen 100 und 300 Basenpaaren erzeugt werden und DNS dieser Länge aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Material gewonnen werden kann.

Mit dieser Methode war es möglich, klonale Populationen aufzudecken, die nur 0,1 % der untersuchten Lymphozyten ausmachen (Rezuke et al., 1997).

2.5.5.2 Veterinärmedizin

Da bei allen Säugetieren die Gene für die Antigenrezeptoren ähnlich aufgebaut sind, ist eine Übertragung der in der Humanmedizin angewendeten Techniken auf die Diagnose der malignen Lymphome bei den Haussäugetieren möglich. So unterscheiden sich höhere Vertebraten z.B. in einigen Regionen der Frameworks 2 und 3 der V-Region der schweren Ketten der Immunglobulingene nur wenig (Rast und Litman, 1994).

2.5.5.2.1 Hund

Beim Hund wurde das Southern Blotting zur Charakterisierung und Diagnose von kaninen Lymphomen eingesetzt. Untersucht wurden dabei das Rearrangement der schweren Kette des Immunglobulins sowie das Rearrangement des T-Zell-Rezeptors β (Momoi et al., 1993).

Die PCR fand Anwendung mit gegen die Gene des T-Zell-Rezeptor γ (Vernau und Moore, 1999), des T-Zell Rezeptor β (Dreitz et al., 1999) sowie gegen die Gene von Immunglobulin (Burnett et al., 2003) gerichteten Primern.

2.5.5.2.2 Katze

Die Übereinstimmung der Antigenrezeptorgene der Katze mit denen des Menschen beträgt 60 – 80 % (Cho et al., 1998). Gene der konstanten Region der schweren Kette (IGHM und IGHG) konnten im Bereich B3q26 lokalisiert werden (Cho et al., 1997).

Klonalitätsanalysen bei B-Zell-Lymphomen der Katze wurden bei den Untersuchungen zur Pathogenese FeLV- und FIV-induzierter Tumoren angewendet. Anwendung fand das Southern Blotting bei der klonalen Rekombination der IgH-Kette (Beatty et al., 1998; Endo et al., 1997; Terry et al., 1995) und des TCR- β (Abbas et al., 2000b; Beatty et al., 1998; Callanan et al., 1996; Endo et al., 1997; Terry et al., 1995).

Die PCR wurde erstmals in einer 2005 veröffentlichten Studie zur molekularen Diagnostik von felines intestinalen T-Zell-Lymphomen eingesetzt (Moore et al., 2005). Mittels der so genannten 5'-RACE-Methode (rapid amplification of cDNA ends), einer Amplifikation unbekannter, in 5'-Ende der DNS gelegener Sequenzen, gelang es den Autoren 31 Klone mit Sequenzen der V-Region des felines T-Zell-Rezeptors zu erzeugen und zu sequenzieren. Mit auf Grundlage dieser Sequenzen erzeugten Primern gegen die V- und J-Region konnte in 22 von 28 intestinalen T-Zell-Lymphomen Klonalität nachgewiesen werden.

Ersten Einsatz zur Diagnose von B-Zell-Lymphomen fand die PCR in einer ebenfalls 2005 erschienenen Studie (Werner et al., 2005). Hier konnten die Autoren mit der so genannten SMART-RACE-Technik (vgl. 3.5.2.3) 24 Transkripte der V-Region sowie der J-Region der

schweren Kette des feline Immunglobulins entschlüsseln und aufgrund der Analyse und Identifikation der Framework-Regionen sowie der CDRs zwei Consensus-primers, passend für alle der 24 Transkripte entwickeln. Ein Primer wurde zur Bindung an die Framework-Region 2 entwickelt (5'-CCAGGCTCCAGGGAAGGG-3'), der zweite zur Bindung an die Framework-Region 3 (5'-TCCAGAGACAACGCCAAGAAC-3'). Als Antisense-Primer wurden Primer eingesetzt, welche im Bereich der J-Region binden. Zum Einsatz kamen hierbei zwei sequenzspezifische Primer (5'-ACACCGTCACCAGGGCTCC-3', 5'-TGAGGACACTGTGACTATGGTTCC-3') sowie ein so genannter degenerierter Primer (5'-GGACACCGTCACYAKGVYTCC-3').

Ein degenerierter Primer wird eingesetzt, um gleichzeitig mehrere Sequenzen zu erfassen, die sich nur in wenigen Basen unterscheiden. Der degenerierte Primer ist ein Gemisch aus Primern, die jeweils die entsprechende Basenzusammensetzung abdecken.

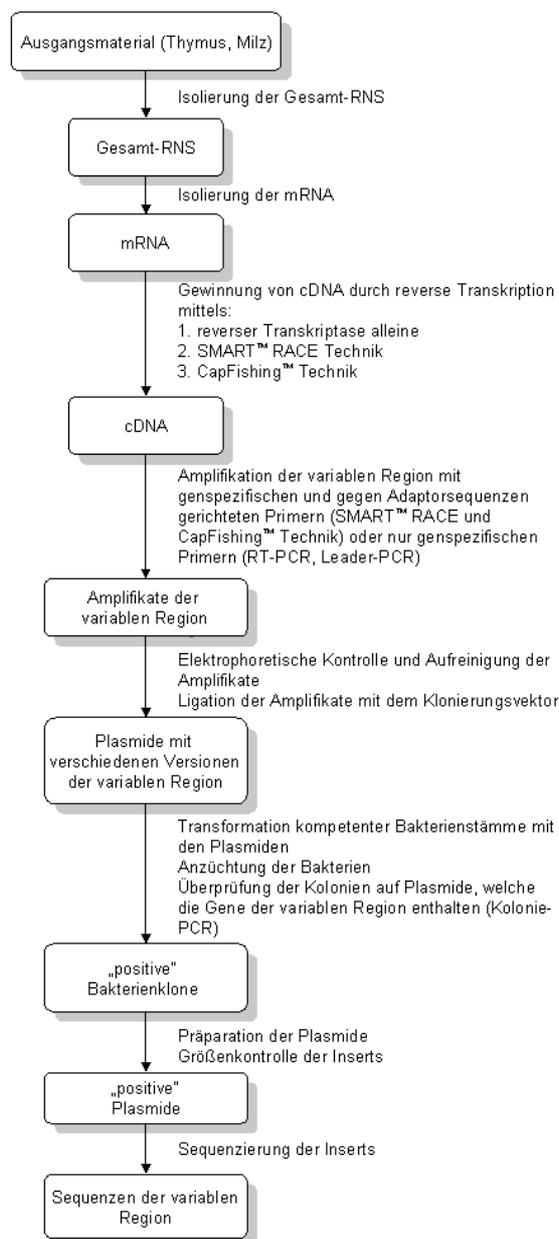
Mit diesem Primersystem wurden in der Studie 24 histologisch und immunhistologisch diagnostizierte B-Zell Neoplasien von Katzen untersucht. Zwei Proben wurden aufgrund schlechter DNS-Qualität aus der Studie ausgeschlossen. Bei 15 der übrig gebliebenen 22 Proben konnte eine monoklonale Population identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Vorbemerkung

Für die Entwicklung der PCR-gestützten Klonalitätsdiagnostik war es zunächst notwendig, die Gensequenzen der variablen Region der schweren Kette des felinen Immunglobulins zu analysieren und auf Grundlage dieser Analyse das zum Klonalitätsnachweis notwendige Primersystem zu entwickeln. Die Schritte vom biologischen Ausgangsmaterial bis zur Gewinnung der Sequenzen sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

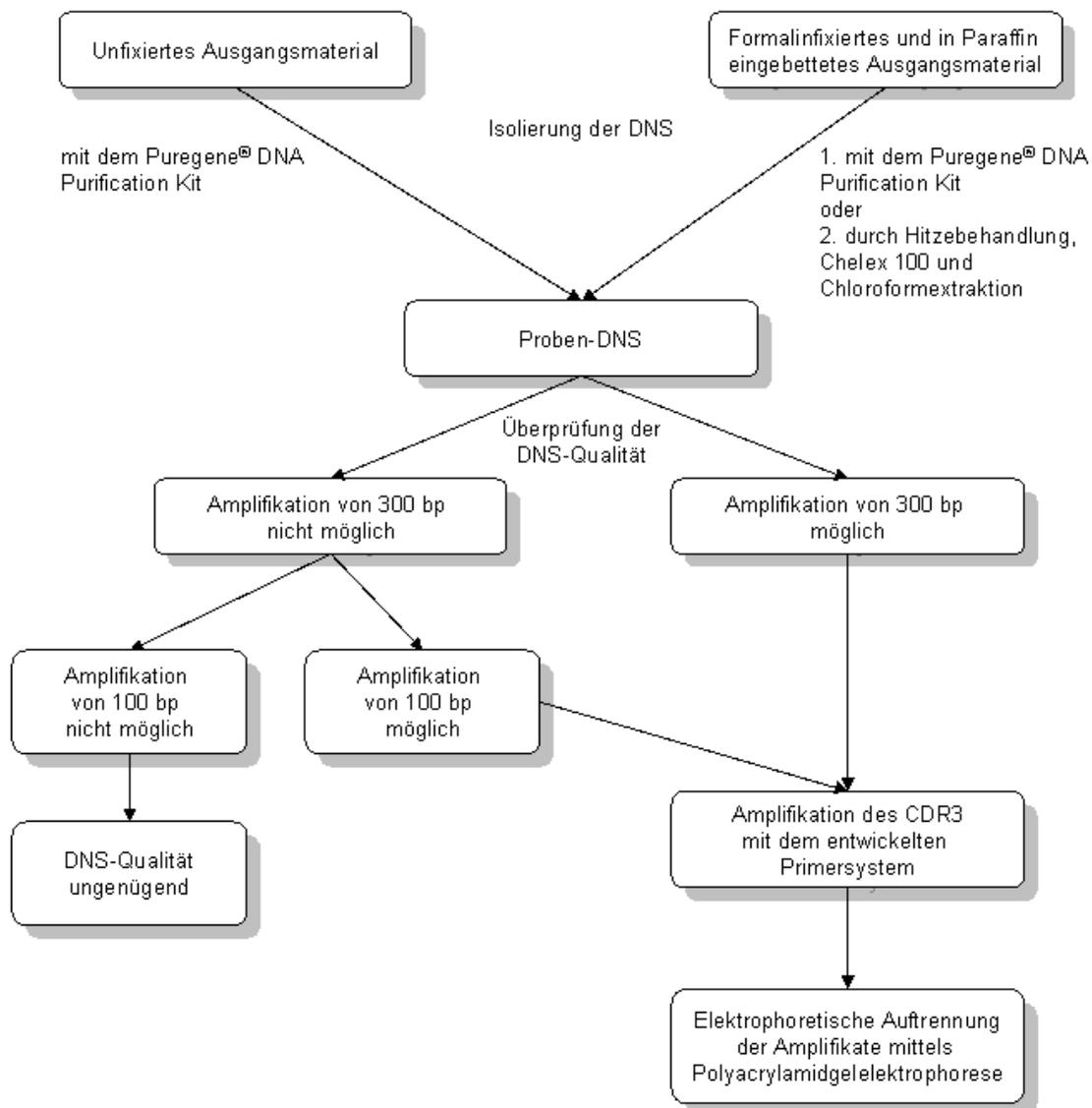
Abbildung 4: Schritte zur Analyse der Gene der variablen Region



Das auf Grundlage der Sequenzanalyse generierte Primersystem wurde an B-Zell-Lymphomen, T-Zell-Lymphomen und lymphatischen Hyperplasien getestet. Dazu wurde DNS von einer Vielzahl von Proben isoliert (s. Tabelle 59 und Tabelle 60) und jeweils zehn Proben aus jeder Kategorie (s. Tabelle 2 bis Tabelle 4) zum Test benutzt. Die Auswahl der Proben orientierte sich überwiegend an der Qualität, d.h. Amplifizierbarkeit, der DNS, wobei bewusst auch Proben weniger guter Qualität untersucht wurden (z.B. Fall 940/97).

Die Schritte vom biologischen Ausgangsmaterial bis zum Ergebnis der Elektrophorese sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Abbildung 5: Schema des Tests des Primersystems



3.2 Biologisches Material

Für die Analyse der Gene des feline Immunglobulins, wurde als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von mRNA Gewebe (Milz, Thymus) verschiedener Katzen verwendet (vgl. Tabelle 1). Kriterium für die Verwendung des Gewebes von Sektionskatzen war der Frischezustand der Tiere. Die Tiere durften zum Zeitpunkt der Probenahme maximal 30 Minuten verstorben sein. Das Gewebe (ca. 1 x 1 x 0,5 cm große Proben) wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Als Ausgangsmaterial zur Überprüfung des Diagnosesystems wurde entweder unfixiertes, oder formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe zur Gewinnung von DNS verwendet. Aufgrund deutlicher Unterschiede in der Qualität der isolierten DNS wurde eine Vielzahl von Proben isoliert, jedoch nur ein Teil der Proben für den Test des Diagnostiksystems eingesetzt (zur Art der Fixierung und die Isolierungsmethode aller Proben s. Tabelle 59).

Die genaue Herkunft der mit dem Diagnostiksystem untersuchten Proben ist in Tabelle 2 bis Tabelle 4 aufgeführt. Die Herkunft aller untersuchten Proben ist in Tabelle 60 aufgeführt.

Ein Teil der Tiere, deren Gewebe bzw. Blut entstammt dem Sektions- und Einsendungsgut des Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Bei den Geweben zur Überprüfung des Diagnosesystems wurden jedoch auch Proben von Einsendungen an das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig untersucht (Tagebuchnummern mit „L“ gekennzeichnet).

Tabelle 1: Geschlecht, Alter, Rasse der Katzen für die Analyse der felines Immunglobulingene

| Tagebuchnr. | Rasse | Alter | Geschlecht | Erkrankung |
|-------------|-------|-----------|------------|--|
| 1234/02 | EKH | 18 Jahre | w | Teils solides, teils tubuläres Mammakarzinom |
| 902/03 | EKH | 1 Jahr | m | Stumpfes Trauma |
| 897/04 | EKH | 12 Wochen | m | Fraktur des dritten Brustwirbels |
| 1675/04 | EKH | 7 Jahre | wk | Chromophobes Hypophysenadenom |

EKH= Europäisch Kurzhaar; m= männlich; w= weiblich; wk= weiblich, kastriert; mk= männlich, kastriert

Tabelle 2: Geschlecht, Alter, Rasse der Katzen mit B-Zell-Lymphomen

| Tagebuchnr. | Rasse | Alter | Geschlecht | Klassifikation (WHO) | Lokalisation |
|-------------|-------|-----------|------------|------------------------------------|--------------|
| 3020/92 (L) | EKH | k.a. | w | Diffuse large B-cell lymphoma | Niere |
| T3597/06 | EKH | 16 Monate | k.a. | Diffuse large B-cell lymphoma | Niere |
| T383/05 | k.a. | 14 Jahre | wk | Diffuse large B-cell lymphoma | Niere |
| T1528/07 | EKH | 3 Jahre | m | Diffuse large B-cell lymphoma | Niere |
| 2253/97 (L) | EKH | 7 Jahre | wk | Diffuse large B-cell lymphoma | Darm |
| 2047/95 (L) | EKH | k.a. | k.a. | Diffuse large B-cell lymphoma | Darm |
| T7795/05 | EKH | 10 Jahre | m | Diffuse large B-cell lymphoma | Auge |
| 940/97 (L) | EKH | 3 Jahre | mk | Diffuse large B-cell lymphoma | Darm |
| T7192/06 | EKH | 3 Jahre | mk | Follicular center cell lymphoma II | Lymphknoten |
| S1003/04 | Siam | 13 Jahre | m | Diffuse large B-cell lymphoma | Pankreas |

EKH= Europäisch Kurzhaar m= männlich; w= weiblich; wk= weiblich, kastriert; mk= männlich, kastriert; k.a.= keine Angabe

Tabelle 3: Geschlecht, Alter, Rasse der Katzen mit lymphatischen Hyperplasien

| Tagebuchnr. | Rasse | Alter | Geschlecht | Lokalisation |
|-------------|-------|----------|------------|-----------------------|
| T847/05 | k.a. | 14 Jahre | m | Pankreaslymphknoten |
| T878/05 | ka | 15 Jahre | w | Lymphknoten |
| T630/05 | ka | 2 Jahre | ka | Lymphknoten |
| T273/05 | BKH | 3 Jahre | mk | Mandibularlymphknoten |
| T3746/05 | k.a. | 1 Jahr | w | Mandibularlymphknoten |
| T6950/05 | k.a. | 2 Jahre | mk | Lymphknoten |
| T7426/06 | k.a. | k.a. | wk | Flanke |
| S1592/04 | EKH | 8 Monate | m | Milz |
| S345/07 | BKH | 9 Jahre | m | Milz |
| S348/07 | EKH | k.a. | m | Milz |

EKH= Europäisch Kurzhaar, BKH= Britisch Kurzhaar;
m= männlich; w= weiblich; wk= weiblich, kastriert; mk= männlich, kastriert; k.a.= keine Angabe

Tabelle 4: Geschlecht, Alter, Rasse der Katzen mit T-Zell-Lymphomen

| Tagebuchnr. | Rasse | Alter | Geschlecht | Klassifikation (WHO) | Lokalisation |
|-------------|--------|-----------|------------|-------------------------------|--------------|
| 2155/90 (L) | EKH | 12 Jahre | mk | Intestinal T-cell lymphoma | Darm |
| 280/92 (L) | EKH | 10 Jahre | wk | Intestinal T-cell lymphoma | Darm |
| 93/93 (L) | EKH | 13 Jahre | mk | Intestinal T-cell lymphoma | Darm |
| 1989/98 | EKH | 7,5 Jahre | wk | Intestinal T-cell lymphoma | Darm |
| 1379/99 | EKH | 15 Jahre | wk | Intestinal T-cell lymphoma | Darm |
| 1945/90 (L) | Perser | 5 Jahre | mk | T-cell lymphoblastic lymphoma | Niere |
| 1883/94 (L) | EKH | Adult | m | Intestinal T-cell lymphoma | Darm |
| S1017/05 | EKH | 8 Jahre | mk | T-cell lymphoblastic lymphoma | Niere |
| 217/94 (L) | EKH | 9 Monate | w | T-cell lymphoblastic lymphoma | Thymus |
| 15/96 (L) | EKH | 8 Monate | m | Intestinal T-cell lymphoma | Darm |

EKH= Europäisch Kurzhaar; m= männlich; w= weiblich; wk= weiblich, kastriert; mk= männlich, kastriert

3.2.1 Histologische und Immunhistologische Diagnose der verwendeten Proben

Die histologische und immunhistologische Diagnose und Klassifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Lymphome und lymphatischen Hyperplasien wurde bei einem Teil der Proben durch die Routinediagnostik des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig Universität Giessen durchgeführt, der andere Teil wurde im Zuge einer aus dem selben Haus stammenden Dissertationsarbeit klassifiziert und diagnostiziert (Köhler, 2003). Grundlage der Klassifizierung der Routinediagnostik war die WHO-Klassifikation hämatopoetischer Tumoren der Haustiere (Valli et al., 2002). Der Arbeit von Köhler (2003) zugrunde lag die REAL-Klassifikation (Harris et al., 1994). Eine Korrektur der Diagnosen der benutzten Proben nach der neueren WHO-Klassifikation war nicht notwendig, da die Entitäten der Proben in beiden Klassifikationen identisch sind.

Der immunhistologische Nachweis von B-Lymphozyten erfolgte mit einem gegen CD45R gerichteten Antikörper (clone B220 [Ly 5], Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada), wohingegen T-Lymphozyten mit einem gegen CD3 gerichteten Antikörper nachgewiesen wurden (polyklonal, Dako, Hamburg). Die Markierung erfolgte nach Standardprotokollen (Kipar et al., 1998).

Die Klassifizierung als B- oder T-Zell-Lymphom erfolgte, wenn die überwiegende Zahl von Tumorzellen den entsprechenden Marker exprimierte. Gleichzeitig vorhandene kleinere Populationen von Lymphozyten, die den Marker der anderen Linie exprimierten, wurden als tumorinfiltrierende Lymphozyten interpretiert.

3.3 Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNS aus unfixiertem Gewebe mittels Purescript® RNA Purification Kit

Das Prinzip des Purescript® RNA Purification Kits (Gentra-Systems, Minnesota, USA) beruht auf Lyse der Zellen mittels anionischer Detergenzien gefolgt von einer modifizierten Salzpräzipitation der DNS und der Proteine in Kombination mit Inhibitoren der RNase Aktivität. Die gewonnene RNS wurde in Alkohol gefällt, gewaschen und in steriler Lösung rehydriert.

1. Vorbereitung des Gewebes:

Das Gewebe wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 25 mg in einem Kryotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung GmbH, Nußloch) mit ca. 10 µm geschnitten.

2. Zellyse:

Das gefrorene Gewebe wird in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, das mit 750 µl „Cell Lysis Solution“ gefüllt ist und zügig durch 5 bis 10 Stöße mit einem Minimörser homogenisiert.

3. Protein-DNS-Fällung:

Zu dem Zellysat werden 250 µl „Protein-DNA Precipitation Solution“ hinzu gegeben, das Eppendorfgefäß 10-mal sanft geschwenkt und fünf Minuten in Eis inkubiert. Danach wird die Probe bei 16.000 x g für drei Minuten zentrifugiert, so dass DNS und Proteine ein dichtes Pellet formen.

4. RNS-Fällung:

Der RNS-haltige Überstand wird in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, das mit 750 µl 100%igem Isopropanol (2-Propanol) gefüllt ist und durch 50-maliges sanftes Schwenken vermischt. Darauf folgend wird die Probe bei 16.000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Die RNS formt dabei ein kleines durchsichtiges Pellet. Der Überstand wird vorsichtig weggeschüttet.

5. Waschen der RNS:

Zu dem Pellet werden 750 µl 70%iges Äthanol gegeben und das Gefäß einige Male geschwenkt. Darauf folgend wird die Probe bei 16.000 x g für eine Minute zentrifugiert, das Äthanol vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei offenem Deckel 15 Minuten luftgetrocknet.

6. RNS-Rehydrierung:

Zu dem Pellet werden 125 µl „RNA Hydration Solution“ gegeben, danach 30 Minuten auf Eis inkubiert, gründlich vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNS mittels Oligotex[®] mRNA Kit

Das Oligotex mRNA Kit zur Isolierung von poly A⁺ RNS aus Gesamt-RNS (Qiagen, Hilden) bedient sich eines patentierten Affinitätsmaterials (Oligotex Suspension) für die Detektion, Isolierung, Reinigung und enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren, die polyadenylierte Sequenzen enthalten. Das Material besteht aus sphärischen Polystyren-Latex-Partikeln, an die kovalent dC₁₀T₃₀-Oligonukleotide gebunden sind. An diese Oligonukleotide kann die mRNA, die im Gegensatz zu restliche RNS-Arten ein polyadenyliertes Ende besitzt, hybridisieren und so abgetrennt werden. Durch Verringerung der Ionenkonzentration kann diese Hybridisierung nach Isolierung des Oligotex-mRNA-Komplexes destabilisiert werden und die Oligotex-Partikel herausgefiltert werden.

1. Mischung der Komponenten:

Die Gesamt-RNS wird in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit RNase-freiem Wasser auf 250 µl aufgefüllt. Dazu werden 250 µl auf 70°C vorgewärmter „OEB“-Puffer und 15 µl der zuvor auf 37°C erwärmten, gevortexten und wieder auf Raumtemperatur abgekühlten Oligotex Suspension gegeben und gründlich vermischt.

2. Auflösung der Sekundärstruktur der RNS:

Die Mischung wird drei Minuten bei 70°C inkubiert.

3. Bindung an die Oligotex-Partikel:

Die Probe wird bei 20 bis 30°C zehn Minuten inkubiert.

4. Pelletierung des Oligotex-mRNA-Komplexes:

Die Probe wird zwei Minuten bei 18.000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig weggeschüttet.

5. Resuspendierung des Pellets und Filterung:

Das Pellet wird in 400 µl „OW2“-Puffer resuspendiert, in eine in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß platzierte Spin Column (Filtersäulchen für Zentrifugen) überführt und bei 18.000 x g eine Minute zentrifugiert.

6. Waschen des Oligotex-mRNA-Komplexes:

Das Säulchen wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 400 µl „OW2“-Puffer überschichtet und bei 18.000 x g eine Minute zentrifugiert.

7. Herauslösen der mRNA aus dem Oligotex-mRNA-Komplex:

Das Säulchen wird wiederum in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 20 bis 100 µl heißem (70°C) „OEB“-Puffer überschichtet, durch auf- und abpipettieren resuspendiert und bei 18.000 x g eine Minute zentrifugiert. Zur Erhöhung der Ausbeute sollte dieser Schritt einmal wiederholt werden.

8. Bis zur weiteren Verwendung wird die mRNA bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.3 Isolierung von DNS mittels Puregene® DNA Purification Kit

Das Prinzip des Puregene® DNA Purification Kits (Gentra-Systems, Minnesota, USA) beruht auf Lyse der Zellen mittels anionischer Detergenzien gefolgt von einer modifizierten Salzpräzipitation der DNS. Die gewonnene DNS wird in Alkohol gefällt, gewaschen und in steriler Lösung rehydriert.

3.3.3.1 Isolierung von DNS aus unfixiertem Gewebe

1. Vorbereitung des Gewebes:

Das Gewebe wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 75 mg in einem Kryotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung GmbH, Nußloch) mit ca. 10 µm geschnitten. Um Kontamination mit Fremd-DNS zu minimieren, werden sowohl das Kryotommesser, als auch die verwendeten Geräte (Pinzette, Eppendorfgefäße) durch vorheriges Autoklavieren (121 °C, 20 Minuten) von DNS befreit und die Fläche der Schnittstreckerplatte mit steriler Operationsfolie abgedeckt.

2. Zellyse:

Zu dem gefrorenen Gewebe werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß 500 µl „Cell Lysis Solution“ gegeben und das Gewebe durch 5 bis 10 Stöße mit einem Minimörser weiter zerkleinert. Das Gewebe wird durch leichtes Auf- und Abpipettieren mit der „Cell Lysis Solution“ vermischt und die Flüssigkeit in ein 14 ml Falcon-Tube überführt. Das verbleibende Gewebe wird wiederum mit 500 µl „Cell Lysis Solution“ versetzt, zerkleinert, vermischt und in das Falcon-Tube überführt. Dies wird solange wiederholt, bis insgesamt 3 ml „Cell Lysis Solution“ zu dem Gewebe zugegeben wurden und das gesamte Gewebe aus dem 1,5 ml Eppendorfgefäß in das 14 ml Falcontube überführt wurde.

3. Proteinase K Behandlung:

Zu dem Gewebe werden 15 µl „Proteinase K Solution“ gegeben und die Probe bei 55°C über Nacht inkubiert.

4. RNase Behandlung:

Zu dem Zelllysat werden 15 µl „RNase A Solution“ gegeben, die Probe durch 25maliges Umdrehen vermischt und 15 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

5. Proteinfällung:

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Probe mit 1 ml „Protein Precipitation Solution“ versetzt, 20 Sekunden kräftig gevortext und bei 2.000 x g zehn Minuten zentrifugiert.

Für größere Reinheit wird der Überstand in ein neues 14 ml Falcon-Tube überführt, die Probe erneut für 20 Sekunden gevortext und dann fünf Minuten in Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wird die Probe wiederum bei 2000 x g zehn Minuten zentrifugiert.

6. Fällung der DNS:

Der Überstand wird in ein mit 3 ml 100%igem Isopropanol (2-Propanol) gefülltes 14 ml Falcon-Tube überführt, 50 mal sanft umgedreht und bei 2.000 x g zehn Minuten zentrifugiert. Die DNS formt ein durchsichtiges kleines Pellet. Der Überstand wird vorsichtig weggeschüttet.

7. Waschen der DNS:

Zu dem Pellet werden 3 ml 70%iges Äthanol gegeben und das Gefäß einige Male umgedreht. Darauf folgend wird die Probe bei 2.000 x g eine Minute zentrifugiert, das Äthanol vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei offenem Deckel 15 Minuten luftgetrocknet.

8. DNS-Rehydrierung:

Das Pellet wird mit 150 µl „DNA Rehydration Solution“ überschichtet, fünf Sekunden kräftig gevortext und über Nacht bei Raumtemperatur rehydriert.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.3.4 Isolierung von DNS aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

3.3.4.1 Isolierung mit dem Puregene® DNA Purification Kit

1. Vorbereitung des Gewebes:

Von dem Paraffinblöckchen mit der zu untersuchenden Probe werden das um die Probe liegende Paraffin und die nicht untersuchten Organe auf eine Tiefe von ca. 100 µm mit einer sterilen Mikrotomklinge per Hand entfernt, so dass das Gewebe möglichst ausschließlich das zu untersuchende Organ enthält.

20 mg des eingebetteten Gewebes werden mit einem Mikrotom (Microm HM 335 E, MICROM GmbH, Walldorf) mit ca. 10 µm geschnitten. Um Kontamination mit Fremd-DNS zu minimieren, werden sowohl die Klinge als auch die verwendeten Geräte (Pinzette, Eppendorfgefäße) durch vorheriges Autoklavieren bei 121 °C und 20 Minuten (Eppendorfgefäße) bzw. Trockensterilisieren bei 220 °C für 4 Stunden (Klinge, Pinzette) von DNS befreit und der Messerhalter mit steriler Operationsfolie abgedeckt. Weiterhin wird unmittelbar an den Messerhalter anliegend eine sterilisierte Auffangvorrichtung aus Aluminium angebracht.

2. Entparaffinierung:

Zu dem zerkleinerten Gewebe werden in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß 600 µl Xylol gegeben und unter konstanter Vermischung fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgend wird die Probe bei 16.000 x g ein bis drei Minuten zentrifugiert und der Überstand über dem pelletierten Gewebe verworfen.

Die Zugabe von Xylol, Inkubation und Zentrifugation werden zweimal wiederholt, so dass das Gewebe insgesamt dreimal mit Xylol gewaschen wird.

Danach werden 600 µl 100%iges Äthanol zu dem Gewebe gegeben und unter konstanter Vermischung fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wird wiederum bei 16.000 x g ein bis drei Minuten zentrifugiert und der Überstand über dem pelletierten Gewebe verworfen. Die Zugabe von Äthanol, Inkubation und Zentrifugation wird einmal wiederholt, so dass das Gewebe insgesamt zweimal mit Äthanol gewaschen wurde.

3. Zellyse:

Das zerkleinerte, entparaffinierte Gewebe wird mit 600 µl „Cell Lysis Solution“ versetzt und zügig durch 5 bis 10 Stöße mit einem Minimörser homogenisiert.

4. Proteinase K Behandlung:

Zu dem Gewebe werden 3 µl „Proteinase K Solution“ gegeben und die Probe bei 55°C über Nacht inkubiert.

5. RNase Behandlung:

Zu dem Zellysat werden 3 µl „RNase A Solution“ gegeben, die Probe durch 25maliges Umdrehen vermischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

6. Proteinfällung:

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Probe mit 200 µl „Protein Precipitation Solution“ versetzt, 20 Sekunden kräftig gevortext und bei 16.000 x g drei Minuten zentrifugiert.

Für größere Reinheit wird der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, die Probe erneut für 20 Sekunden gevortext und dann fünf Minuten in Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wird die Probe wiederum bei 16.000 x g drei Minuten zentrifugiert.

7. Fällung der DNS:

Der Überstand wird in ein mit 600 µl 100%igem Isopropanol (2-Propanol) gefülltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, 50 mal sanft umgedreht und bei 16.000 x g drei Minuten zentrifugiert. Die DNS formt ein durchsichtiges kleines Pellet. Der Überstand wird vorsichtig weggeschüttet.

8. Waschen der DNS:

Zu dem Pellet werden 600 µl 70%iges Äthanol gegeben und das Gefäß einige Male umgedreht. Darauf folgend wird die Probe bei 16.000 x g eine Minute zentrifugiert, das Äthanol vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei offenem Deckel 15 Minuten luftgetrocknet.

9. DNS-Rehydrierung:

Das Pellet wird mit 150 µl „DNA Rehydration Solution“ überschichtet, fünf Sekunden kräftig gevortext und über Nacht bei Raumtemperatur rehydriert.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.3.4.2 Isolierung durch Hitzebehandlung, Chelex 100 und Chloroformextraktion

Grundlage dieser Form der Extraktion ist eine Kombination zweier Protokolle aus zwei Studien zur effizienteren Extraktion von DNS aus formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben (Coombs et al., 1999; Shi et al., 2004).

1. Vorbereitung der Proben

Fünf Scheiben aus einem Paraffinblock, jede ca. 10 µm dick, werden wie unter (3.3.4.1) beschrieben gewonnen und in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

2. Entparaffinieren und Lösen der Quervernetzungen

Zu dem Paraffinmaterial werden 2,5 µl Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) und 497,5 µl 0,1 molare Natronlauge gegeben (0,5%ige Tween[®] 20 Lösung in 0,1 molarer NaOH) und das Gefäß 20 Minuten bei 100°C inkubiert.

Nach Abkühlen auf 55°C werden 2 µl Proteinase K zugegeben und das Gefäß drei Stunden bei 55°C inkubiert.

3. Binden der DNS

Zu der Probe werden 500 µl einer 5%igen Chelex 100-Suspension (in 1x Tris-Puffer) (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegeben und das Gefäß zehn Minuten bei 99°C inkubiert. Nach sanftem Schwenken wird das 1,5 ml Eppendorfgefäß 15 Minuten bei 10.500 x g zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wird das Gefäß auf Eis inkubiert, bis das an der Oberfläche abgesetzte Paraffinwachs hart ist. Das Wachs wird vorsichtig entfernt.

4. Waschen der DNS

Die Probe wird auf 45°C erwärmt und 100 µl Chloroform dazugegeben. Nach sanftem Schwenken wird das Gefäß erneut für 15 Minuten bei 10.500 x g zentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Das Waschen der DNS wird zweimal wiederholt.

3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Mittels photometrischer Messung wurde die Extinktion der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ausgehend von einer Küvettendicke von 1 cm entspricht die Extinktion von 1 annähernd einer Konzentration von 50 µg DNS bzw. 40 µg RNS in 1 ml Volumen. Das gleichzeitig bestimmte Verhältnis aus der Extinktion bei 260 nm zu der Extinktion bei 280 nm gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäure und soll bei ca. 1,8 für DNS und 2,0 für RNS liegen.

3.4.2 Elektrophoretische Integritäts- und Konzentrationsbestimmung

Das unterschiedliche Wanderungsverhalten von Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe im elektrischen Feld erlaubt eine Aussage über die Integrität sowie die Menge im Vergleich mit einer DNS bekannter Größe und Konzentration (Basenleitern). Die Nukleinsäuren-Visualisierung erfolgte mit Ethidiumbromid unter UV-Licht (254-320 nm), wobei die Fluoreszenz der DNS-Menge proportional ist (Sambrook et al., 1989).

3.5 Amplifikation von Nukleinsäuren

3.5.1 Verwendete Oligonukleotide

Die Auswahl der verwendeten Oligonukleotide richtete sich, soweit möglich, nach den von Rychlik et al. (1995) publizierten Kriterien:

- Durchschnittliche Länge von 16-24 Basenpaaren.
- Möglichst einheitliche mittlere Schmelztemperatur in einem Primersystem, berechnet nach der Faustformel: $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.
- GC-Anteil: 50-60 %.
- Maximal 3 gleiche Basen hintereinander.
- Keine Haarnadelstrukturen von mehr als vier Basen.
- Keine Anlagerung der beiden im Paar verwendeten Primer von mehr als vier nebeneinander liegenden Basen.
- Keine Anlagerung der beiden Primer im Bereich der letzten 4 Basen am 3' Ende.

Die Primersynthese wurde von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, durchgeführt.

Ausgehend von der veröffentlichten Sequenz der C-Region der schweren Kette des felines IgM (Cho et al., 1998) wurden Primer zur Überprüfung der Sequenz am vorhandenen biologischen Material ausgesucht (vgl. Tabelle 5). Ausgangsmaterial für die weiteren Primersynthesen waren die oben genannte Sequenz und weitere selbst ermittelte Sequenzen. Für die Wahl der Primer zur Bindung in der Leader-Region wurden zunächst alle funktionellen, d.h. nicht als Pseudogen identifizierten Sequenzen der Einzelgene der humanen V-Region (GenBank accession number: NG_001019) jeweils als Suchsequenz für das NCBI Trace Archiv (NCBI, Bethesda) eingesetzt und somit den einzelnen humanen Genen ähnliche Traces ermittelt.

In den dadurch gefundenen Sequenzen wurde für jede Familie in jeweils einem Trace das Startkodon ermittelt und, falls vorhanden, der folgende Bereich mit der humanen Leadersequenz verglichen. Der Leadersequenz-entsprechende Bereich wurde als Suchsequenz für eine weitere Recherche im Trace Archiv verwendet. Primer für die entsprechenden Bereiche wurden nach Vergleich der einzelnen positiven Traces nach möglichst großer Übereinstimmung mit den Sequenzen einer Familie entwickelt.

Tabelle 5: Sequenz und Orientierung der Primer zur Überprüfung der veröffentlichten Sequenz (Cho et al., 1998) der felines C-Region.

| Primer | Basensequenz (5'-3') | Orientierung | Anlagerungstemp. | Amplikonlänge |
|---------|----------------------|--------------|------------------|---------------|
| FeIgMf1 | CGTCACCTTCTCCTGGAA | Sense | 58°C | 1341 bp |
| FeIgMr2 | ACATCTCACCCCATTGAC | Antisense | 58°C | |

Tabelle 6: Sequenz und Orientierung der Primer zur Identifikation der felines V-, D- und J-Region

| Primer | Basensequenz (5'-3') | Orientierung | Funktion |
|-----------|---|--------------|---|
| FeIgMfI | CTGTCCGACGAGCCCCTGGT | Sense | Primertest |
| FeIgMfII | CCTCATCCCGTCCAAATCTCTTCC | Sense | Primertest |
| FeIgMrI | GACTGGAGGGAAGGTCTGGATGTC | Antisense | Colony-screening Erste Amplifikation |
| FeIgMrII | CGTACTTGCCCTCTCTCAGGACTG | Antisense | Zweite Amplifikation cDNA-Synthese |
| FeIgMrIII | AGGGCAGGAGCACCTGAGAGGTAG | Antisense | Erste Amplifikation |
| FeIgMrIV | TCGATGTGAGGAAGTCATCTGAAC | Antisense | cDNA-Synthese |
| FeIgMrV | GGTTGTTGACCACACTGTTGTTCTTG | Antisense | Zweite Amplifikation |
| FeIgMrVI | GACAGGGAGCTCTCACAGGTGATG | Antisense | Colony-screening |
| IgHV3L | ATGGAGTTTGTGCTGGGCTGG | Sense | Bindung in Leader-Region |
| IgHV1L | CAATGGACTGGAGCTGGAGAATC | Sense | Bindung in Leader-Region |
| HuIgV2L | ATGGACATACTTTGTTCCAGGCTC | Sense | Bindung in Leader-Region |
| HuIgV4L | ACATGAAACAYCTGTGGTTCTTCC | Sense | Bindung in Leader-Region |
| HuIgV5L | ATGGGGTCAACCGCCATCCTCG | Sense | Bindung in Leader-Region |
| HuIgV6L | ATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTC | Sense | Bindung in Leader-Region |
| SMART II™ | AAGCAGTGGTATCAACGCAGGTACGC GGG | Sense | First strand adapter |
| UPL | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT | Sense | 5'-Adapterprimer |
| UPS | CTAATACGACTCACTATAGGG | Sense | 5'-Adapterprimer |
| NUP | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | Sense | 5'-Adapterprimer |

Tabelle 7: Sequenz und Orientierung der Diagnostik-Primer

| Primer | Basensequenz (5'-3') | Orientierung | Position |
|---------|-------------------------|--------------|----------------------------|
| V1FRI | GCAAAGCATCTGGATACAGCTTC | Sense | Familie VH1 Framework 1 |
| V1FRIII | GAAGTTCCAGGGCAGACTCAC | Sense | Familie VH1 Framework 3 |
| V3FRI | GTGGCCTCTGGATTACCTTC | Sense | Familie VH3 Framework 1 |
| V3FRIII | CCGTGAAGGGCCGATTAC | Sense | Familie VH3 Framework 3 |
| Jfam1 | CACCGTCACCAGGGCTCCTTG | Antisense | J-Region |
| Jfam2 | CACGGTGACCAGGGTCCCGGG | Antisense | J-Region |
| Jdeg | SACGGTGACYWGGGTDCCHTG* | Antisense | J-Region |

* S = C oder G; Y = C oder T; W = A oder T; D = nicht C; H = nicht G

3.5.2 PCR-Verfahren

3.5.2.1 Primertest

Die optimale Anlagerungstemperatur der Primer wurde durch die Gradienten-Option des Multicyclers PTC 200 (Biozym, Oldendorf) ermittelt.

Als Polymerase kam eine *Taq*-Polymerase, die BioTherm™ DNA-Polymerase (NatuTec, Frankfurt) zum Einsatz. Die Zusammensetzung des PCR-Mastermix für diese Polymerase ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Mastermix für die BioTherm™ DNA-Polymerase

| Reagenz | Bemerkung | Pro Ansatz (µl) |
|--------------------------|----------------------|-----------------|
| DEPC-Wasser | | 17,8 |
| „10 x Reaction Buffer“* | 10 fach konzentriert | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 0,5 |
| dNTPs | jeweils 10 mM | 1 |
| Sense-Primer | 10 µM | 0,5 |
| Antisense-Primer | 10 µM | 0,5 |
| BioTherm™ DNA-Polymerase | 5 U/µl | 0,2 |
| DNS | | 2 |
| Gesamtvolumen | | 25 |

* vom Anbieter der BioTherm™ DNA-Polymerase mitgelieferter Reaktionspuffer

Die Reaktionsbedingungen für die PCR sind in Tabelle 9 angegeben:

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen für die PCR mit der BioTherm™ DNA-Polymerase

| Reaktionsschritt | Zeit | Temperatur | Wiederholungen |
|----------------------------|--------------|------------|----------------|
| Denaturierung | 2 min 50 s | 94°C | - |
| Schmelzen | 15 s | 92°C | 35 |
| Anlagern | 30 s | Gradient | |
| Verlängern | 15 s | 72°C | |
| Abschließende Verlängerung | 5 min | 72°C | - |
| Kühlen | Bis Entnahme | 4°C | - |

Die Gradienten Option ermöglicht es, in einem Experiment 12 unterschiedliche Anlagerungstemperaturen innerhalb eines Temperaturintervalls von maximal 20 °C gleichzeitig zu testen. Das Temperaturintervall für die einzelnen Primerpaare orientierte sich dabei an der errechneten Schmelztemperatur.

Die Temperaturbedingungen für die Gradienten-PCR sind in Tabelle 10 exemplarisch für das Primerpaar FeIgMf1/FeIgMr2 aufgeführt.

Tabelle 10: Exemplarische Temperaturverteilung für die Gradienten-PCR

| Temperaturintervall in °C | Position auf dem Heizblock | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 54 – 62 | 54,0 | 54,2 | 54,7 | 55,3 | 56,3 | 57,5 | 58,8 | 60,0 | 60,8 | 61,4 | 61,9 | 62 |

3.5.2.1.1 Ergebniskontrolle

Die Kontrolle der Amplifikation erfolgte durch Horizontalgelelektrophorese mit 2%igen Agarosegelen unter Zugabe von Ethidiumbromid (Carl Roth, Karlsruhe). Dazu wurde eine der gewünschten Konzentration entsprechende Menge SeaKem® LE Agarose (Biozym, Oldendorf) in einem der benötigten Gelgröße entsprechendem Volumen 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer (s. 8.15.2.1) durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,25 µg/ml) und Abkühlung auf ca. 65°C in eine an den Enden verschlossene Gelbrücke mit einem Plastikrechen zum Erzeugen von Geltaschen gegossen. Als Längenstandards kamen eine mit dem Restriktionsenzym *MspI* geschnittene pUC19-DNA („pUC19/*MspI*“) (s. 8.1.1), sowie ein laboreigener Längenstandard („MF“, s. 8.1.2) zum Einsatz. Zum Beladen der Geltaschen diente eine mit Farbstoff versetzte 15%ige Ficoll 400 Lösung (Serva, Heidelberg). Die eingesetzten Farbstoffe orientieren sich an der Größe der zu erwartenden Amplifikate, um ein Überdecken der Banden zu vermeiden. Für kleine Amplifikate wurde Xylencyanol (Carl Roth, Karlsruhe) gewählt (Wanderung im 2%igen

Agarosegel auf der Höhe von ca. 800 bp und damit oberhalb der zu erwartenden Amplifikate), für große Amplifikate Bromphenolblau (Carl Roth, Karlsruhe), welches im 2%igen Agarosegel bei ca. 100 bp (und damit unterhalb der zu erwartenden Amplifikate) wandert.

15 µl des PCR-Produkts wurden mit 3 µl Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Gleichzeitig wurde in die erste, bei größeren Probenzahlen zusätzlich auch in die letzte Tasche des Gels der entsprechende Längenstandard zugegeben. Als Laufpuffer diente ebenfalls ein 1x TBE Puffer. Die Elektrophoreseläufe erfolgten bei einer Spannung von 6V/cm, bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA (Microcomputer Elektrophoresis Powersupply, Consort, Belgien) für 45 bis 60 Minuten. Zur Dokumentation wurde die DNS mit einem UV-Transluminator (Vilber Loumat, Torcy, Frankreich) bei 312 nm sichtbar gemacht und das Gel mit einem Geldokumentationssystem (Kodak 1.0 „Digital Imaging“) fotografiert und digital archiviert.

Diese Art der Ergebniskontrolle kam, soweit nicht anders angegeben, für alle folgend aufgeführten PCR-Verfahren zu Einsatz.

3.5.2.2 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde als „two step“ RT-PCR durchgeführt. Initial erfolgte die Übersetzung der mRNA in komplementäre DNS (cDNA), welche in einem weiteren Schritt mit der PhusionTM-Polymerase amplifiziert werden konnte. Die Bedingungen der zweiten Amplifikation entsprechen den unter 3.5.2.5 aufgeführten Bedingungen für die PhusionTM-Polymerase.

Die Übersetzung der mRNA in cDNA erfolgte mit der Reversen Transkriptase des Avian Myeloblastoma Virus (AMV-RT, peQLab, Erlangen) unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers (Länge 12 bp).

Genutzt wurde die RT-PCR zur Überprüfung der veröffentlichten Sequenz der C-Region des feline IgM (Cho et al., 1998). Hierbei wurden zur Amplifikation der cDNA die Primer IgMf1 als Sense-Primer und IgMr2 als Antisense-Primer mit einer Anlagerungstemperatur von 54°C eingesetzt.

Nach Auftauen, Mischen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g) wurden folgende Reagenzien in ein PCR-Tube gegeben:

Tabelle 11: Ansatz 1 für die reverse Transkription

| Reagenz | Bemerkung | (μ l) |
|-----------------------|---------------|------------|
| RNS | 1 – 5 μ g | 1 – 10 |
| cDNA-Synthese-Primer | 10 μ M | 2 |
| DEPC-H ₂ O | | ad 12,5 |

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach erfolgte auf Eis die Zugabe folgender Reagenzien:

Tabelle 12: Ansatz 2 für die reverse Transkription

| Reagenz | Bemerkung | (μ l) |
|------------------------|---------------------|------------|
| „5 x Reaktionspuffer“* | 5 fach konzentriert | 4 |
| dNTPs | jeweils 10 mM | 2,5 |
| AMV-RT | 25 U/ μ l | 1 |
| Gesamtvolumen | | 20 |

* vom Anbieter der AMV-RT mitgelieferter Reaktionspuffer.

Die Gefäße wurden gevortext und anzentrifugiert. Dann erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei 55 °C und zur Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 65 °C. Die Ansätze wurden entweder sofort amplifiziert oder bei -20 °C maximal 3 Monate gelagert.

3.5.2.3 PCR mit dem SMARTTM RACE Amplification Kit

Das SMARTTM RACE Amplification Kit (BD Biosciences, Heidelberg) ist eine Fusion der MarathonTM cDNA Technologie (Chenchik et al., 1995) mit der SMART (Switching Mechanism At 5' End of RNA Transcript) Methode. Diese Kombination erlaubt die Herstellung qualitativ hochwertiger cDNA aus geringsten Mengen Gesamt- oder polyadeninhaltiger RNS inklusive des 5' und 3' Ende des RNS Moleküls (Rapid Amplification of cDNA Ends = RACE).

Die Besonderheit dieses Systems liegt darin, dass in erster Linie lange cDNA Moleküle angereichert werden.

Die Reaktion beginnt mit einer cDNA-Synthese, die mit speziellen Oligo-dT-Primern (SMART-CDS bzw. 5'-RACE-CDS) aus dem Kit, mit Zufallsprimern oder mit genspezifischen Primern initiiert werden kann. Erreicht die Reverse Transkriptase - in diesem Kit wird die Reverse Transkriptase des Molony Murine Leukemia Virus (MMLV) verwendet - das 5' Ende der mRNA Matrize entfaltet sie terminale Transferaseaktivität. Dies führt dazu, dass an das 5'-Ende der neugeschaffenen cDNA Cytosinreste angehängt werden.

Ein spezielles Oligonukleotid (SMART IITM Oligonukleotid) aus dem Kit hybridisiert an diese Cytosin-Reste und dient der reversen Transkriptase als Matrize für den Einbau weiterer Nukleotide („switching mechanism at 5'end“). Auf diese Weise wird eine bekannte Sequenz der mRNA-Matrize zugefügt, welche als Hybridisierungsstelle für Primer in der weiteren Amplifikation dient.

Das ursprüngliche Protokoll des Herstellers wurde aufgrund von Erfahrungen anderer Mitarbeiter im Labor (Kreuzer, 2005) in einigen Punkten leicht verändert, so kam statt der „PowerScriptTM“ reversen Transkriptase (BD Biosciences, Heidelberg) die „SuperscriptTM II“ reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) zu Einsatz. Weiterhin wurde zur Verhinderung der Zerstörung der RNS der RNase-Inhibitor RNasin[®] (Promega, Mannheim) bei der cDNA-Synthese zugegeben.

Wie alle anderen Oligonukleotide, die zur cDNA-Synthese eingesetzt werden, kann das SMART IITM Oligonukleotid unter Umständen, statt an die Cytosinreste zu binden, ebenfalls an die RNS binden und somit eine cDNA-Synthese initiieren. Bei einer solchen cDNA wäre das SMART IITM Oligonukleotid an einem, die ihm komplementäre Sequenz am anderen Enden integriert. Dieses Molekül würde in weiteren Amplifikationen allein durch den spezifisch gegen die Komplementärsequenz des SMART IITM Oligonukleotids gerichteten Primer vervielfältigt werden. Dies verhindert die so genannte „Step-out“ PCR (Matz et al., 1999). Hierbei wird ein langes Oligonukleotid verwendet, welches im 3' Bereich dem SMART IITM Oligonukleotid entspricht, jedoch im 5' Bereich 20 Basen zusätzlich enthält. Wenn dieses als langer Universalprimer (UPL) bezeichnete Oligonukleotid an ein Konstrukt mit dem SMART IITM Oligonukleotid an beiden Enden bindet, entstehen an beiden Enden des Moleküls komplementäre Sequenzen mit entgegengesetzter Orientierung. Diese lagern sich bei weiteren Zyklen zusammen. Dadurch wird das Molekül zu einer Schleifenbildung gezwungen, die eine weitere Amplifikation verhindert.

Zusätzlich zu dem UPL wird ein kürzerer Primer zugegeben, der dem 5'-Bereich des UPLs entspricht. Dieses kurze Universalprimer (UPS) benannte Oligonukleotid wird in fünffach höherer Konzentration als der UPL zugegeben. Es dient als eigentlicher Amplifikationsprimer für die Vervielfältigung der gewünschten Moleküle mit der Sequenz des UPL an einer und der genspezifischen Sequenz an der anderen Seite. UPL und UPS werden zusammen als Universalprimer-Mix (UPM) benutzt. Soll die Spezifität eines solcherart gewonnenen PCR-Produktes erhöht werden, kann ein gegen das 3'-Ende des UPL gerichteter Primer („nested Universalprimer“, UP-nested) in Kombination mit einem weiter Richtung 5'-Ende gelegenen

genspezifischen Primer eingesetzt werden. Dabei entspricht die Sequenz des UP-nested der des SMART II™ Oligonukleotids.

Ca. 100 ng mRNA dienen als Template für die reverse Transkription. Nach Auftauen auf Eis, Mischen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g), kamen die Reagenzien in folgender Reihenfolge in ein PCR-Tube:

Tabelle 13: Ansatz 1 für die reverse Transkription im Zuge der SMART™ RACE.

| Reagenz | Bemerkung | (µl) |
|--------------------------|-----------|-------|
| RNS | 100 ng | 1 – 3 |
| cDNA-Synthese-Primer | 20 µM | 1 |
| SMART II™ Oligonukleotid | 10 µM | 1 |
| DEPC-H ₂ O | | ad 5 |

Dieser Ansatz wurde zwei Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

Tabelle 14: Ansatz 2 für die reverse Transkription im Zuge der SMART™ RACE

| Reagenz | Bemerkung | (µl) |
|---------------------------|---------------------|------|
| „5X First-Strand Buffer“* | 5 fach konzentriert | 2 |
| DTT | 0,1 mM | 1 |
| RNAsin® | 40 U/µl | 0,5 |
| dNTPs | 10 mM | 1 |
| Superscript™ II | 200 U/µl | 0,5 |
| Gesamtvolumen | | 10 |

* Bestandteil des SMART™ RACE Amplification Kits

Nach erneutem Vortexen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g) folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 42 °C. Der Ansatz wurde daraufhin mit 40 µl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Eine folgende Inkubation bei 72 °C diente zur Inaktivierung des Enzyms. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

3.5.2.4 CapFishing™ Technik

Eine weitere Methode zur Amplifikation vollständiger cDNA bietet das CapFishing™ Full-length cDNA Premix Kit (BioCat, Heidelberg). Hierbei kommt ein so genannter CapFishing™ Adapter zum Einsatz.

Nach der cDNA-Synthese, durchgeführt nach Herstellerangaben mit der „Superscript™ II“ reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe), bindet ein genspezifischer Primer innerhalb der

mRNA während der CapFishing™ Adapter an die CAP-Struktur am 5'-Ende der vollständigen mRNA bindet. In der weiteren Amplifikation dient die Sequenz des CapFishing™ Adapters der reversen Transkriptase als Matritze, wodurch die komplementäre Sequenz in die cDNA eingebaut wird und als späterer Anlagerungspunkt für die Primer der weiteren Amplifikation dient. Das führt dazu, dass im Endeffekt nur vollständige, d.h. auf die CAP-Struktur enthaltende mRNA-Moleküle zurückgehende cDNA-Moleküle amplifiziert werden. Zur Verhinderung der Degradation der mRNA wurde wiederum der RNase-Inhibitor RNasin® hinzugegeben.

Beim CapFishing™ wurden ca. 1 bis 3 µg mRNA für die reverse Transkription eingesetzt. Nach Auftauen auf Eis, Mischen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g), kamen die Reagenzien in folgender Reihenfolge in ein PCR-Tube:

Tabelle 15: Ansatz 1 für die reverse Transkription im Zuge des CapFishing™.

| Reagenz | Bemerkung | (µl) |
|-----------------------|-----------|---------|
| RNS | 1-3 µg | 1 – 4,5 |
| dNTPs | 10 mM | 4 |
| cDNA-Syntheseprimer | 10 µM | 2 |
| DEPC-H ₂ O | | ad 10,5 |

Dieser Ansatz wurde drei Minuten bei 75 °C inkubiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

Tabelle 16: Ansatz 2 für die reverse Transkription im Zuge des CapFishing™.

| Reagenz | Bemerkung | (µl) |
|------------------------|---------------------|------|
| „5x RT buffer“* | 5 fach konzentriert | 4 |
| DTT | 0,1 mM | 1 |
| „CapFishing™ Solution“ | | 1 |
| BSA | 1mg/ml | 2 |
| RNasin® | 40 U/µl | 0,5 |
| dNTPs | 10 mM | 1 |
| Superscript™ II | 200 U/µl | 1 |
| Gesamtvolumen | | 20 |

* vom Anbieter der Superscript™ II mitgelieferter Reaktionspuffer.

Nach erneutem Vortexen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g) folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 42 °C. Von dem zuvor drei Minuten bei 75 °C erwärmten und zwei Minuten auf Eis abgekühlten CapFishing™ Adapter wurden 3 µl sowie 0,3 µl der „SuperScript™ II“ reversen Transkriptase zugegeben. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 42 °C zum Integrieren der Adaptersequenz in die cDNA. Das

Enzym konnte durch eine sich anschließende 15 minütige Inkubation bei 70 °C sowie eine fünfminütige Inkubation bei 94 °C inaktiviert werden. Verdünnt wurde die so entstandene cDNA mit 180 µl DEPC-behandeltem Wasser. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung auf Eis oder bei -20 °C.

3.5.2.5 Amplifikation der cDNA mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase

Um bei der Amplifikation von Sequenzen für die Analyse der Gene des felinen Immunglobulins die polymerasebedingten Fehler zu verringern, kam die neu entwickelte Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase (BioCat, Heidelberg) zum Einsatz. Diese Polymerase hat nach Angaben des Herstellers eine fünfzigfach geringere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase und eine sechsfach niedrigere als die *Pfu*-Polymerase. Gleichzeitig bescheinigt der Hersteller ihr eine doppelt so hohe Umsatzgeschwindigkeit wie die der *Taq*-Polymerase. Eine bessere Thermostabilität lässt bei dieser Polymerase eine Denaturierungstemperatur von bis zu 98 °C zu, was ein Fehlanlagern der Primer vermindert. Da die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase eine Polymerase mit Fehlerkorrektur-Aktivität ist, werden hier bei der Amplifikation im Gegensatz zur Amplifikation mit der *Taq*-Polymerase, die Adenin-Überhänge produziert, glatte Enden ohne Adenin-Überhänge erzeugt. Die Zusammensetzung des Mastermix für die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Mastermix für die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase

| Reagenz | Konzentration | Pro Ansatz (µl) |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------|
| DEPC-Wasser | | 31,5 |
| „5x Phusion HF Buffer“ ¹ | 5 fach konzentriert | 10 |
| dNTPs | jeweils 10 mM | 1 |
| Sense-Primer | 10 µM | 1 |
| Antisense-Primer | 10 µM | 1 |
| Phusion™ | 2 U/µl | 0,5 |
| cDNA | | 5,0 |
| Gesamtvolumen | | 50,0 |

¹Bestandteil des Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase Kits

Die Reaktionsbedingungen wurden der höheren Thermostabilität der Phusion™ -Polymerase angepasst und sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen für die PCR mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase

| Reaktionsschritt | Zeit | Temperatur | Wiederholungen |
|----------------------------|------------------|----------------|----------------|
| Denaturierung | 30 s | 98 °C | - |
| Schmelzen | 10 s | 98 °C | 35 |
| Anlagern | 30 s | Primerabhängig | |
| Verlängern | 30 s | 72 °C | |
| Abschließende Verlängerung | 5 min | 72 °C | - |
| Kühlen | Bis zur Entnahme | 4 °C | - |

Die Amplifikation der cDNA geschah im Falle der SMART™ RACE-Technik und der CapFishing™ Methode als „Seminested“-PCR. Dies bedeutet, dass für die Amplifikation der cDNA jeweils der systemeigene Primer zu Amplifikation der eingebauten Signalsequenzen (UPM, CapFishing™ Adapter) in Kombination mit einem genspezifischen Primer eingesetzt wurde, wobei dieser genspezifische Primer weiter in Richtung 5'-Ende platziert wurde, als der Primer für die cDNA-Synthese.

Um bei der SMART™ RACE-Technik die Spezifität der Amplifikate noch weiter zu erhöhen, schloss sich an die erste Amplifikation eine zweite Reaktion mit dem nested-Universal-Primer und einem noch weiter in Richtung 5'-Ende der DNS gelegenen genspezifischen Primer als dem Primer für die erste Amplifikation an. Dies entspricht einer so genannten „Nested“-PCR.

3.5.2.5.1 Leader-PCR

Die Leader-PCR diente zur Amplifikation der cDNA mit einem Primer mit spezifischer Bindung in der Leaderregion und einem Primer mit Bindung in der C-Region, so dass die vollständigen Gene des variablen Abschnitts der schweren Kette amplifiziert werden konnten. Die Leader-PCR wurde mit den spezifischen Primern für die Leader-Region (IgHV1L für die VH1-Familie, IgHV3L für die VH3-Familie) in Kombination mit dem Antisense-Primer FeIgMrV mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase durchgeführt.

Primer, die gegen die humane Leaderregionen gerichtet sind (HuIgHV2L, HuIgHV4L, HuIgHV5L, HuIgHV6L) (Campbell et al., 1992), wurden ebenfalls in Kombination mit dem Antisense-Primer FeIgMrV eingesetzt und eine Amplifikation mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase versucht.

3.6 Aufreinigung von DNS

Der Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen ging eine präparative Elektrophorese voraus. Diese wurde analog zu den Elektrophoresen zur Ergebniskontrolle (s. 3.5.2.1.1) durchgeführt. Im Unterschied zu der dort aufgeführten Methode wurde aufgrund der Interaktion von Borat

mit subsequenten Reaktionen die Agarose in 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer (s. 8.15.2.2) gelöst und dieser auch als Laufpuffer verwendet. Um eine entsprechen große Menge DNS zu erhalten, wurden 35 µl des PCR-Produkts mit 7 µl Ladepuffer eingesetzt. Die Elektrophoresebedingungen wurden für eine schonende und effektive Trennung der Fragmente mit 3V/cm bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA und einer Laufzeit von 90 bis 120 Minuten gewählt. Zusätzlich wurde die Elektrophoresekammer mit Eiswasser gekühlt. Die Sichtbarmachung der DNS erfolgte zum Erhalt der Integrität der DNS auf einem UV-Transluminator (Vilber Loumat, Torcy, Frankreich) bei 254 nm. Konnte durch die Amplifikation der cDNA nur Fragmente unterschiedlicher Länge, sichtbar als Schmier, erzeugt werden, wurde das Gel unterhalb der Fragmente der erwarteten Größe abgeschnitten und in umgekehrter Orientierung noch einmal für die Hälfte der vorher verwendeten Zeit der Elektrophorese unterzogen. Dies führte zu einer Akkumulation der DNS in einer Bande, die ausgeschnitten und weiterverarbeitet werden konnte.

Für die Isolierung der DNS aus den ausgeschnittenen Agaroseblöckchen wurde das NucleoSpin® Extrakt II Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die zugrundeliegende Methode beruht darauf, dass die DNS nach Bindung an eine siliziumhaltige Membran in Anwesenheit chaotroper Salze in mehreren Waschschritten von Kontaminationen (z.B. Protein, RNS) befreit wird. Nach dem Trocknen der Membran wird die DNS mit einem im Kit enthaltenen Eluierungspuffer geringer Salzkonzentration gelöst.

1. Schmelzen der Agarose: Für je 100 mg Gel werden 200 µl des Bindepuffers („NT“) zugegeben und das Agaroseblöckchen bis zum vollständigen Schmelzen (5 bis 10 Minuten) bei 50 °C inkubiert.
2. Binden der DNS: Der Bindepuffer mit der gelösten DNS wird in ein Zentrifugiersälchen mit der siliziumhaltigen Membran pipettiert. Dieses Zentrifugiersälchen wird zuvor auf ein Sammelgefäß gesteckt, in welchem sich die flüssigen Anteile des Bindepuffer-DNS-Gemisches durch einminütige Zentrifugation bei 11.000 x g sammeln. Die Flüssigkeit wird verworfen.
3. Waschen: Durch Zugabe von 600 µl eines Waschpuffers („NT3“, ethanolhaltig) und anschließendem einminütigem Zentrifugieren bei 11.000 x g wird die Membran gewaschen. Das Trocken der Membran und die Befreiung von überschüssigem Ethanol wird durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11.000 x g erreicht. Die Sammelgefäße werden mit dem Durchfluss verworfen und das Zentrifugiersälchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt.

4. Lösen der DNS: Zum Lösen der DNS wird die Membran mit 25 bis 50 µl (Menge je nach erwarteter und erwünschter Menge bzw. Konzentration der DNS) eines Eluierungspuffers („NE“) überschichtet, abweichend vom Herstellerprotokoll für eine bessere Lösung drei Minuten (Hersteller: eine Minute) bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert.

Die solcherart gewonnene DNS-Lösung wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

Sollte doppelsträngige DNS direkt aus PCR-Ansätzen gewonnen werden, wurde diesen das doppelte Volumen NT-Puffer zugesetzt und das oben beschriebene Protokoll in Punkt 2 begonnen. Falls das Volumen des Reaktionsansatzes unter 50 µl lag, erfolgte eine Volumen Anpassung auf 50 µl mit 1 x Tris-Puffer.

3.7 Klonierung von PCR-Produkten

3.7.1 AccepTor™ Vector Kit

Die Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem AccepTor™ Vector Kit (Novagen, Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Der hier für die Klonierung verwendete *E. coli*-Stamm „NovaBlue GigaSingles™ Kompetente Zellen“ leitete sich vom Sicherheitsstamm K12 ab und wird mit dem Klonierungsvektor „pST-Blue-1“ kombiniert.

Das Prinzip des AccepTor™ Vector Kits beruht auf der Ligation eines DNS-Fragments (Insert) mit einzelnen Adenin-Überhängen in den linearisierten Vektor mit einzelnen Uridin-Überhängen.

3.7.2 Agar-Nährböden und Flüssigkulturmedien

Die Herstellung der Agar-Nährböden sowie der Flüssigkulturmedien erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989). Da mit dem verwendeten Vektor eine Ampizillinresistenz auf den Bakterienstamm übertragen wird, wurden die Nährböden und die Kulturmedien mit 100 µg/ml Ampizillin (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt. Durch diese Maßnahme wird ein Wachstum von möglichen kontaminierenden Bakterien minimiert.

Vor dem Ausplattieren der transformierten Bakterien wurden die Nährböden mit 40 µl IPTG-Lösung (23 mg IPTG in 1 ml dest. H₂O) (Carl Roth, Karlsruhe) und 40 µl X-Gal-Lösung (40 mg X-Gal in 1 ml DMF) (Carl Roth, Karlsruhe) überschichtet und bei 37 °C inkubiert.

3.7.3 dATP „Tailing“ der PCR-Produkte

Die Klonierung von mit der *Taq*-Polymerase erzeugten PCR-Produkten mit dem pST-Blue-1-Vektor gelingt durch die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase Adenin-Überhänge zu erzeugen relativ einfach. Bei Produkten, die mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase erzeugt wurden und die aufgrund der Fehlerkorrektur-Eigenschaft dieser Polymerase keine Adenin-Überhänge aufwiesen, war es notwendig, diese Überhänge nachträglich zu erzeugen.

Hierzu wurde mit Hilfe der *Taq*-Polymerase nach Aufreinigung der PCR-Produkte, wie beschrieben unter 3.6, entsprechende Überhänge produziert. Da die Phusion-Polymerase bei Salzkonzentrationen arbeitet, in denen die *Taq*-Polymerase nicht mehr effektiv funktioniert, war der vorangestellte Aufreinigungsschritt nötig.

Zur Erzeugung der Überhänge wurden 30 µl des aufgereinigten PCR-Produkts mit 4 µl des 10fach konzentrierten PCR-Puffers, 3 µl dATP (20 mM) und 3 µl der mit einem Verdünnungspuffer (peQLab, Erlangen) auf 1 U/l verdünnten *Taq*-Polymerase versetzt.

Diese Mischung wurde für 20 Minuten bei 72 °C inkubiert.

3.7.4 Vorbereitung der DNS für die Klonierung

Da der Hersteller für das Klonierungskit AccepTor™ Vector Kit eine Aufreinigung der DNS vor der Ligation empfiehlt, wurde die DNS nach dem dATP „Tailing“ erneut mit dem NucleoSpin® Extrakt II Kit (Macherey-Nagel, Düren) (s. 3.6) aufgereinigt.

3.7.5 Ligation und Transformation

Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben durch Mischung von Ligationsmastermix, PCR-Produkt und Klonierungsvektor im in Tabelle 19 beschriebenen Verhältnis.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

| Reagenz | Bemerkung | (µl) |
|-------------------------------|--------------|---------|
| pSTBlue-1 | 50 ng/µl | 1 – 4,5 |
| PCR-Produkt | aufgereinigt | 0,5 - 4 |
| Clonables™ 2x Ligation Premix | | 5 |
| DEPC-Wasser | | ad 10 |

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 16 °C im Wasserbad für ca. zwei Stunden. Der Hersteller gibt im Protokoll eine Inkubationszeit von 30 Minuten an, jedoch kann nach Angaben im Handbuch des Kits die Anzahl der rekombinierten Plasmide durch Verlängerung der Inkubationszeit auf zwei Stunden um das zwei- bis dreifache erhöht werden.

Für die Transformation wurde 1 µl des Ligationsansatzes zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis folgte durch die Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für exakt 30 Sekunden die Transformation der Zellen.

Nach erneuter Inkubation auf Eis für zwei Minuten wurden die Zellen mit 250 µl des im AccepTor™ Vector Kit enthaltenen „SOC“-Medium (ein Nährmedium zur Erhöhung der Transformationseffizienz der Zellen) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden zweimal 60 µl, zweimal 80 µl, zweimal 100 µl und der verbleibende Rest auf insgesamt sieben der vorbereiteten Agarnährböden ausplattiert. Nach Trocknung erfolgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht.

3.7.6 Kolonie-PCR

Fusioniert der vor der Ligation als lineares Molekül vorliegende Vektor ohne Insertion eines Fragmentes, werden zwei Anteile eines die β-Galaktosidase-kodierenden Genes in dem entstehenden ringförmigen Plasmid zusammengebracht. Die so von den Bakterien exprimierte β-Galaktosidase (induziert durch IPTG) setzt das den Agarnährböden zugesetzte X-Gal in einen blauen Farbstoff um, der die Kolonie verfärbt. Bei Insertion eines DNS-Fragmentes in den Vektor, wird dieses genau zwischen die beiden oben genannten Anteile des Galaktosidase-kodierenden Genes integriert und die β-Galaktosidase wird nicht exprimiert. Die Kolonien färben sich nicht blau, sondern bleiben weiß.

Zur Überprüfung der Inserts wurden die weißen Klonen mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers vom Agarnährboden in 3 ml Flüssigkulturmedium überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (Janke & Kunkel GmbH, Stauffen) bei 200 rpm inkubiert. 0,5 µl der angereicherten Bakterienkultur wurden in ein PCR-Gefäß mit 9,5 µl DEPC-Wassers verbracht und die Bakterien durch Inkubation bei 94 °C für 10 Minuten abgetötet.

Jeweils 15 µl des in Tabelle 20 beschriebenen Mastermix wurden zu den Bakterien gegeben und eine PCR unter dem jeweiligen Primersystem angepassten Bedingungen wie aus Tabelle 21 ersichtlich durchgeführt.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Mastermix für die Kolonie-PCR

| Reagenz | Konzentration | Pro Ansatz (µl) |
|---------------------------------|---------------------|-----------------|
| DEPC-Wasser | | 9,8 |
| “10 x Reaction Buffer“* | 5 fach konzentriert | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 0,5 |
| dNTPs | jeweils 10 mM | 1 |
| Sense-Primer | 10 µM | 0,5 |
| Antisense-Primer | 10 µM | 0,5 |
| BioTherm™ DNA-Polymerase | 5 U/l | 0,2 |
| Gesamtvolumen | | 15 |

* vom Anbieter der BioTherm™ DNA-Polymerase mitgelieferter Reaktionspuffer

Tabelle 21: Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR

| Reaktionsschritt | Zeit | Temperatur | Wiederholungen |
|----------------------------|--------------|----------------|----------------|
| Denaturierung | 2 min 50 s | 94 °C | - |
| Schmelzen | 15 s | 92 °C | 35 |
| Anlagern | 30 s | Primerabhängig | |
| Verlängern | 15 s | 72 °C | |
| Abschließende Verlängerung | 5 min | 72 °C | - |
| Kühlen | Bis Entnahme | 4 °C | - |

Die Ergebniskontrolle der Kolonie-PCR erfolgte wie unter 3.5.2.1.1 beschrieben auf 2%igen Agarosegelen

3.7.7 Anzucht geeigneter Kolonien und Plasmidpräparation

0,5 µl der in der Kolonie-PCR positiven Kolonien wurden aus der ersten Übernachtskultur in 10 ml Flüssigkulturmedium überführt und wiederum über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (Janke & Kunkel GmbH, Stauffen) bei 200 rpm inkubiert.

Von dieser Kultur wurden 4 bis 6 ml zur Plasmidpräparation mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt.

Die zugrundeliegende Methode des Kits beruht darauf, dass die durch alkalische Lyse freigewordene Plasmid-DNS durch differentielle Präzipitation von der genomischen getrennt und analog zum NucleoSpin® Extrakt (s 3.6) nach Bindung an eine siliziumhaltige Membran in mehreren Waschschritten von Kontaminationen (z.B. Protein, RNS) befreit wird. Eluiert wurde die DNS mit dem im Kit enthaltenen Eluierungspuffer.

Dazu wurden die 4 bis 6 ml der Bakterienkultur bei 4.500 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet folgendem Protokoll unterzogen:

1. Alkalische Lyse: Das Pellet wird in 250 µl des Resuspendierungspuffers („A1“) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 250 µl des Lysispuffers („A2“) und vorsichtiges Mischen erfolgt die Lyse der Zellen. Der Lysispuffer wird durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer („A3“) neutralisiert und die Bakterienreste für 10 Minuten bei 14.000 x g abzentrifugiert.
2. Binden der Plasmid-DNS: Der Bindepuffer mit der gelösten DNS wird in ein Zentrifugiersälchen mit der siliziumhaltigen Membran pipettiert. Dieses Zentrifugiersälchen wird zuvor auf ein Sammelgefäß gesteckt, in welchem sich die flüssigen Anteile des Bindepuffer-DNS-Gemisches durch einminütige Zentrifugation bei 11.000 x g sammeln. Die Flüssigkeit wird verworfen.
3. Erster Waschschrift: Durch Zugabe von 500 µl eines zuvor auf 50 °C erwärmten Waschpuffers („AW“) und anschließendes einminütiges Zentrifugieren bei 11.000 g wird die Membran gewaschen. Der Durchfluss wird verworfen:
4. Zweiter Waschschrift: Ein zweiter Waschschrift erfolgt durch die Zugabe von 600 µl eines zweiten Waschpuffers (A4) und eine sich wiederum anschließende Zentrifugation bei 11.000 x g für eine Minute. Der Durchfluss wird ebenfalls verworfen.
5. Trocknen der Membran: Das Trocknen der Membran wird durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11.000 x g erreicht. Die Sammelgefäße werden mit dem Durchfluss verworfen und das Zentrifugiersälchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt.
6. Lösen der DNS: Zum Lösen der DNS wird die Membran mit 50 µl des Eluierungspuffers (AE) überschichtet, abweichend vom Herstellerprotokoll für eine bessere Lösung drei Minuten (Hersteller: eine Minute) bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert.

Von der solcherart gewonnenen Plasmid-DNS-Lösung wurde photometrisch die Konzentration bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNS-Lösung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt oder für längere Konservierung bei -20 °C eingefroren.

3.7.8 Biologische Sicherheit

Folgend den Vorschriften des Gesetzes zur Regelung der Gentechnik (GenTG) und der Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung - GenTSV) sind die *E. coli* nach der Transformation als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) einzustufen. Aufgrund der Unbedenklichkeit des Spenderorganismus (Katze), des inserierten genetischen Materials (schwere Kette des Immunglobulins), des Vektors (pSTBlue) und des Bakterienstammes („NovaBlue GigaSingles™ Kompetente Zellen“) erfolgte die Einstufung in die Risikogruppe 1. Dementsprechend wurden die Arbeiten mit den transformierten Bakterien bis zur thermischen oder alkalischen Lyse entsprechend den Vorschriften für gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

3.7.9 Kontrolle der Plasmide

Eine Größenkontrolle der Inserts in den gewonnenen Plasmiden konnte durch einen Restriktionsverdau des Plasmides mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt werden. Der Vektor ist solcherart konstruiert, dass die Insertionstelle von Erkennungstellen des *EcoRI* flankiert wird, so dass – bis auf wenige zusätzliche Basenpaare – nur das Insert herausgeschnitten wird. Je nach Konzentration der Plasmid-DNS-Lösung wurden 1 bis 2 µl der Lösung in den Verdau eingesetzt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Mastermix für den Restriktionsverdau (Fortsetzung)

| Reagenz | Konzentration | Pro Ansatz (µl) |
|-----------------------------|----------------------|-----------------|
| DEPC-Wasser | | 20 - 21 |
| „10x Buffer <i>EcoRI</i> “* | 10 fach konzentriert | 2,5 |
| <i>EcoRI</i> | 10 U/l | 0,5 |
| Plasmid DNS | | 1-2 |
| Gesamtvolumen | | 25 |

* vom Anbieter des *EcoRI* mitgelieferter Reaktionspuffer

Nach ein bis zweistündiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad erfolgte mit 15 µl die Erfolgskontrolle durch Gelelektrophorese mit 2%igen Agarosegelen, wie beschrieben unter 3.5.2.1.1.

3.8 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg. Die Plasmide wurden hierzu mit plasmidspezifischen Rückwärtsprimern sequenziert.

Die Computerauswertung der Ergebnisse erfolgte mit den webbasierten Programmen BLAST[®]-Search Programm (NCBI, Bethesda, USA), ClustalW (EMBL-EBI, Heidelberg), dem speziell für Antigenrezeptorgene entwickelten V-QUEST (IMTG, Montpellier, Frankreich, (Lefranc et al., 1998)) und dem als Freeware erhältlichen Programm DNAClub (www.geneinfo.net, Genetics & Biotech Information Network).

3.9 Test des diagnostischen Primersystems

Die DNS der zu testenden Proben wurde wie unter 3.3. beschrieben isoliert. Die Art der Fixierung der Proben ist aus Tabelle 59 (Anhang) ersichtlich. Je nach Art der Fixierung wurde die Isolierungsmethode angepasst.

3.9.1 Überprüfung der DNS-Qualität

Um die Qualität der DNS, d.h. den Grad der Degradation der DNS zu überprüfen, wurde zunächst versucht, für jede Probe ein ca. 300 bp-großes Fragment aus dem nicht-rearrangierten Teil des Genoms mit der BioTherm[™] DNA-Polymerase zu amplifizieren. Geling es nicht, ein Fragment dieser Länge zu amplifizieren, erfolgte der Versuch, ein 100 bp-großes Fragment ebenfalls aus dem nicht-rearrangierten Teil des Genoms zu amplifizieren. Bei positiver Amplifikation wurden, falls möglich, 250 ng der DNS der Probe mit den Diagnostikprimern amplifiziert.

Als Primer für diese Fragmente wurden in der Arbeitsgruppe etablierte und an einer Vielzahl von Katzen gestestete Systeme benutzt.

Das Primersystem für das ca. 300 bp-große Fragment bestand aus dem Sense-Primer FCA740-F2 und dem Antisense-Primer FCA740-R2 (Menotti-Raymond et al., 2005). Mit diesen gegen Mikrosatelliten gerichteten Primern können je nach Katze Fragmente von 308 bis 336 bp erzeugt werden.

Der Mastermix und die Bedingungen für diese Reaktion sind in Tabelle 23 und Tabelle 24 angegeben.

Das Primersystem für das 100 bp-Fragment bildete der Sense-Primer glcIVex12f und der Antisense-Primer glcIV12r. Mit diesem in der Arbeitsgruppe entwickeltem System kann ein 100 bp-großer Bereich des Exon 12 der α -Glucosidase der Katze amplifiziert werden (Dr. W. Hecht, persönliche Mitteilung).

Mastermix und Reaktionsbedingungen für dieses System sind ebenfalls in Tabelle 23 und Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Mastermix für die Reaktionen zur Überprüfung der DNS-Qualität

| Reagenz | Konzentration | Pro Ansatz (µl) | |
|-------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
| | | FCA740-F2 / FCA740-R2 | gclVex12f / gclV12r |
| DEPC-Wasser | | 12,74 | 17,2 |
| Reaktionspuffer | 10 fach konzentriert | 2 | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 0,5 | 0,5 |
| dNTPs | jeweils 10 mM | 0,4 | 0,6 |
| Sense-Primer | 10 µM | 1,6 | 1 |
| Antisense-Primer | 10 µM | 1,6 | 1 |
| Taq-Polymerase | 5 U/l | 0,16 | 0,2 |
| DNS | 125 ng/µl | 1 | 2 |
| Gesamtvolumen | | 20 | 25 |

Tabelle 24: Reaktionsbedingungen für die PCR für die Reaktionen zur Überprüfung der DNS-Qualität

| Reaktionsschritt | Zeit | | Temperatur (°C) | | Wiederholungen |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|----------------|
| | FCA740-F2 / FCA740-R2 | gclVex12f / gclV12r | FCA740-F2 / FCA740-R2 | gclVex12f / gclV12r | |
| Denaturierung | 120 s | 180 s | 95 | 94 | - |
| Schmelzen | 15 s | 60 s | 94 | 94 | 35 |
| Anlagern | 45 s | 60 s | 59 | 53 | |
| Verlängern | 60 s | 60 s | 72 | 72 | |
| Abschließende Verlängerung | 10 min | 5 min | 72 | 72 | - |
| Kühlen | Bis zur Entnahme | | 4 | | - |

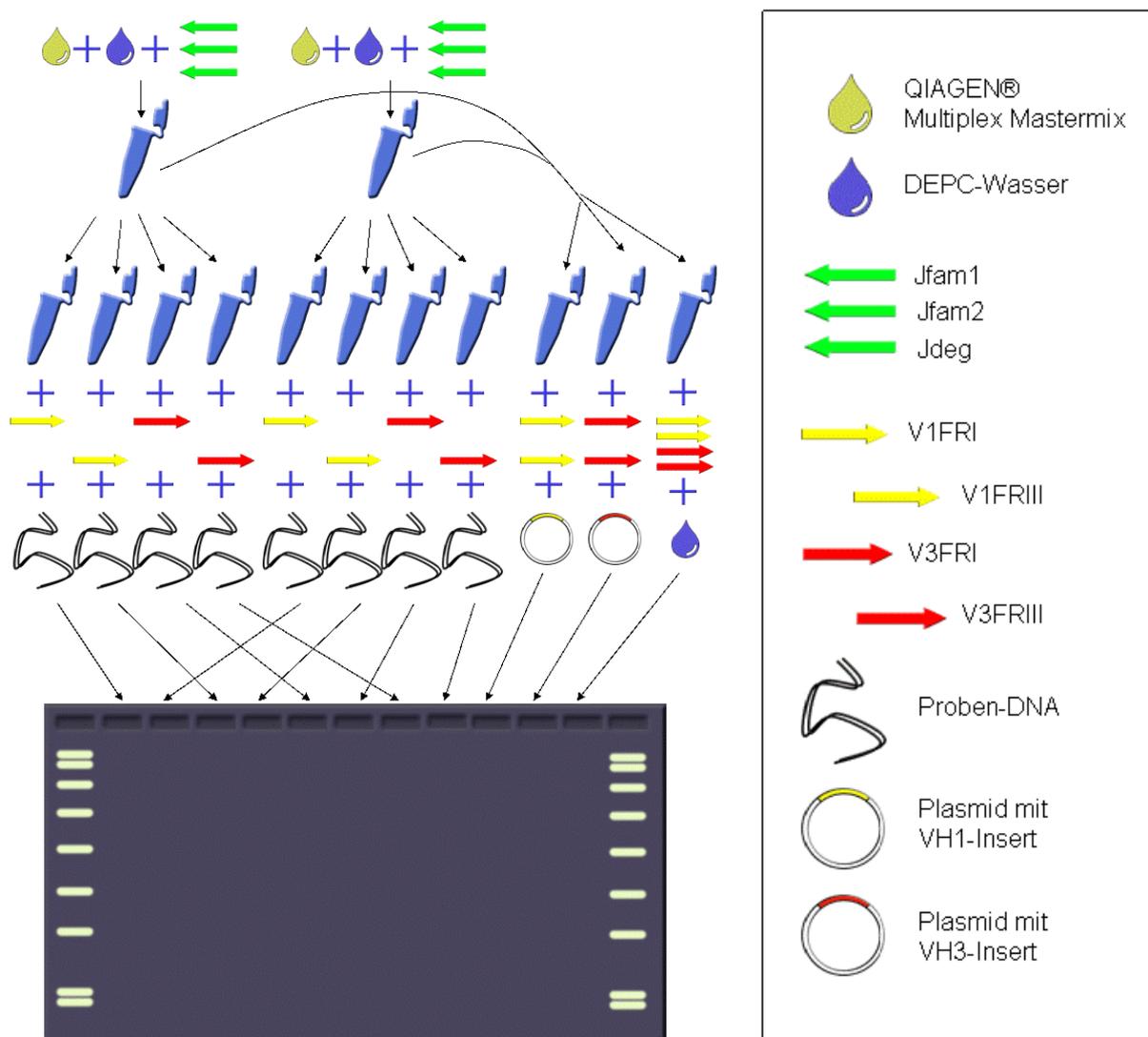
Die Erfolgskontrolle erfolgte wie unter 3.5.2.1.1 beschrieben mittels Elektrophorese auf 2%igen Agarosegelen.

3.9.2 Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des felines Immunglobulins

Die Amplifikation des CDR3 erfolgte durch vier Primersysteme. Pro untersuchte Probe wurden eine Kombination (J-Mix) von drei an identischer Stelle in der J-Region gelegenen Antisense-Primern (Jfam1, Jfam2 und Jdeg, vgl. Tabelle 7) mit je einem familienspezifischen Sense-Primer für den Bereich der Framework-Region 1 und der Framework-Region 3 der V-Region eingesetzt. Dies erfolgte für beide für die Katze identifizierte VH-Familien (s. 4.1.2.2).

Jedes einzelne der vier Systeme wurde im Doppelansatz angesetzt. Hierzu wurden der erste Mastermix sowie die entsprechenden Primer mit optimalerweise 250 ng Proben-DNS vermischt. Hierauf wurde der Reaktionsansatz in einem Block des Thermocyclers platziert und die PCR-Reaktion gestartet. Darauf folgend wurde ein gleichartiger Mastermix angesetzt, wiederum mit den entsprechenden Primern und einer gleichen Menge Proben-DNS versetzt und auf dem zweiten Block des Thermocyclers mit dem gleichen Programm amplifiziert. Für jedes Primerpaar wurde eine Reaktionskontrolle durchgeführt, wobei die jeweiligen Sense-Primer einer Familie (für die Definition der Familien s. 2.5.4.1.3) aufgrund der unterschiedlichen Größe der zu erwartenden Fragmente zusammen in einem Reaktionsgefäß amplifiziert werden konnten. Als Template für die Reaktionskontrolle dienten Plasmide mit Inserts aus der entsprechenden Familie. Weiterhin wurde für die gesamte Reaktion eine Negativkontrolle eingeschlossen. Diese enthielt den Mastermix sowie sämtliche benutzte Primer, jedoch wurde ihr statt DNS DEPC-Wasser zugesetzt. Ein Schema des Reaktionsansatzes ist in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 6: Schema der Amplifikation des CDR3



3.9.2.1 QIAGEN® Multiplex PCR Kit

Um für die Reaktionskontrolle die simultane Amplifizierung von zwei Fragmenten unterschiedlicher Länge in einem Reaktionsgefäß zu ermöglichen und wegen des Vorteils eines gebrauchsfertigen Mastermix (Mischung aus Polymerase, Reaktionspuffer und Nukleotiden) für die angestrebte routinemäßige Anwendung des diagnostischen Testes, wurde zur Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins das QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

Dieses Kit ermöglicht laut Herstellerangabe eine spezifische und effiziente Amplifizierung von zwei oder mehreren Produkten parallel in einem PCR-Reaktionsgefäß.

Die verwendete Polymerase (HotStarTaq® DNA Polymerase) ist eine so genannte „hotstart“ Taq-Polymerase. Bei dieser Form der Taq-Polymerase liegt das Enzym zunächst als inaktive Form vor und muss erst durch eine initiale Erwärmung auf 95 °C über 15 Minuten aktiviert werden.

Dies verhindert eine Fehlanlagerung der Primer und die Bildung von Primerdimeren während der Vorbereitung der Reaktion und des ersten Denaturierungsschrittes und erhöht damit die Spezifität der Reaktion.

Die Zusammensetzung der Komponenten für die Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins und die Bedingungen für die Reaktion sind in Tabelle 25 und Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Komponenten für die Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins.

| Reagenz | Konzentration | Pro Ansatz (µl) |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------|
| DEPC-Wasser | | ad 25 |
| „2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix“* | 10 fach konzentriert | 12,5 |
| Jfam1 | 10 µM | 0,5 |
| Jfam2 | 10 µM | 0,5 |
| Jfam3 | 100 µM | 0,5 |
| Sense-Primer | 10 µM | 0,5 |
| Proben-DNS | Je nach Probe | entpr. 250 ng |
| Gesamtvolumen | | 25 |

* Bestandteil des QIAGEN® Multiplex PCR Kits

Die Menge des benötigten DEPC-Wassers orientierte sich an der Konzentration der Proben-DNS. Lag die Konzentration nach Isolierung und Rehydrierung der gefällten DNS

über 125 ng/μl, wurde die DNS auf diese Konzentration verdünnt und 2 μl dieser Verdünnung in die Reaktion eingesetzt. Dementsprechend wurden 8,5 μl DEPC-Wasser eingesetzt. Lag die Konzentration nach Isolierung und Rehydrierung unter 125 ng/μl, wurden das der Menge von 250 ng entsprechende Volumen eingesetzt und dementsprechend das zur Gesamtvolumen von 25 μl fehlende Volumen DEPC-Wasser zugegeben. Das maximal eingesetzbare Volumen Proben-DNS betrug 10,5 μl. In einem solchen Fall wurde kein DEPC-Wasser zugesetzt.

Tabelle 26: Reaktionsbedingungen für die für die Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins.

| Reaktionsschritt | Zeit | Temperatur (°C) | Wiederholungen |
|---|-----------------|-----------------|----------------|
| Denaturierung (und Aktivierung der Polymerase) | 15 min. | 95 | - |
| Schmelzen | 15 s | 92 | 35 |
| Anlagern | 90 s | 68,5 | |
| Verlängern | 10 s | 72 | |
| Abschließende Verlängerung | 5 min | 72 | - |
| Kühlen | bis Entnahme | 4 | - |

3.9.3 Ergebniskontrolle (SDS-PAGE)

Die Ergebniskontrolle erfolgte als Horizontalgelelektrophorese mit 7%igen Polyacrylamidgelen unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE).

Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm und eine Fläche von 250 mm x 210 mm. Zum Herstellen der Gele wurden 26,25 ml einer 40%igen Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung (Carl Roth, Karlsruhe) mit 30 ml 5x TBE-Puffer und 91,26 ml destilliertem Wasser in einer Saugflasche (Carl Roth, Karlsruhe) vermischt und mittels einer angeschlossenen Vakuumpumpe (KNF Neuberger GmbH, Freiburg) entgast. Nach Zusatz von 1,5 ml 10%iger Natriumdodecylsulfat- (SDS) Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) wurde die Polymerisierung durch Zugabe von 225 μl Tetramethylethylendiamin (TEMED, Carl Roth, Karlsruhe) initiiert und durch Zugabe von 405 μl Ammoniumpersulfat (APS, Roth, Karlsruhe) katalysiert.

Die solcherart vorbereitete Lösung wurde in eine eigens für die horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese entwickelte Gießvorrichtung eingegossen.

Diese Gießvorrichtung bestand aus einem Aluminiumblock mit einer 1,5 mm tiefen Fräsung über die gesamte Fläche des Blockes mit Ausnahme eines schmalen Randes und mehrerer auf einer Seite des Blockes in Reihe angeordneter 1,5 mm hoher Stege, welche zur Erzeugung der Geltaschen dienten (vgl. Abbildung 42, Anhang). Für die Erzeugung der für die Polymerisierung des Polyacrylamids wichtigen anoxischen Bedingungen wurde eine silanisierte Glasplatte der Größe DIN A4 (21 cm x 27,9 cm) (Radeberger Bilderrahmen GmbH, Radeberg) so auf den Gießblock aufgelegt, dass der obere Rand auf den Stegen für die Taschen, aber nicht auf dem oberen Rand des Blockes auflag und somit eine nach drei Seiten offene Konstruktion bildete. Die Glasplatte wurde mit Klemmen befestigt und im Bereich der Stege mit Gewichten beschwert. Zur leichteren Ablösung der Gele vom Gießblock war dieser zuvor mit Silikonlösung (Serva, Heidelberg) silikonisiert worden. Die Gellösung wurde an einer Seite unter die Glasplatte gegossen, wobei durch die nach drei Seiten offene Konstruktion die Bildung von Luftblasen im Gel minimiert wurde.

Nach einer Polymerisierungszeit von ca. 20 bis 30 Minuten konnte das Gel durch vorsichtiges Lösen vom Gießblock entfernt werden, wobei es durch die Silanisierung an der Glasplatte haftete.

Eine ähnliche Methode für die Erzeugung von Polyacrylamidgelen für die Horizontalgelelektrophorese ist beschrieben (Izzo et al., 2006).

Für den Elektrophoreselauf wurde das Gel mitsamt der Glasplatte in eine Elektrophoresekammer der entsprechenden Größe verbracht.

Jeweils 8 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl Ladepuffer (6X Orange Loading Dye Solution, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Gleichzeitig wurde in die erste und die letzte Tasche des Gels der unter 8.1.1 beschriebene pUC 19/*MspI*-Längenstandard zugegeben. Als Laufpuffer diente ein 1x TBE Puffer.

Der Elektrophoreselauf erfolgte bei einer Spannung von 7,5 V/cm, bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA (Microcomputer Elektrophoresis Powersupply, Consort, Belgien) für 9,5 Stunden. Zur Abführung der bei der Elektrophorese entstehenden Wärme wurde die Elektrophoresekammer in einem Kühlschrank bei 4-8 °C gekühlt und über Kabel außen mit Strom versorgt.

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufes wurde das Gel mit der Glasplatte in einem Färbebad mit 1 x TBE-Puffer und Ethidiumbromid (0,5 µg/µl) 20 Minuten gefärbt und anschließend 20 Minuten in Leitungswasser entfärbt.

Für die Dokumentation wurde das Gel mit einer Angelschnur (Balzer, Lauterbach) von der Glasplatte abgeschnitten und auf einen UV-Transluminator (Vilber Loumat, Torcy,

Frankreich) verbracht, wo die DNS bei 254 nm sichtbar gemacht und das Gel mit einem Geldokumentationssystem (Kodak 1.0 „Digital Imaging“) fotografiert und digital archiviert werden konnte.

3.9.4 Heteroduplexanalyse

Von Reaktionen, die einer Heteroduplexanalyse unterzogen werden sollten, wurden je 10 µl in ein gesondertes PCR-Tube gegeben und dieses zunächst für 10 Minuten bei 95°C, darauf folgend eine Stunde bei 4°C inkubiert.

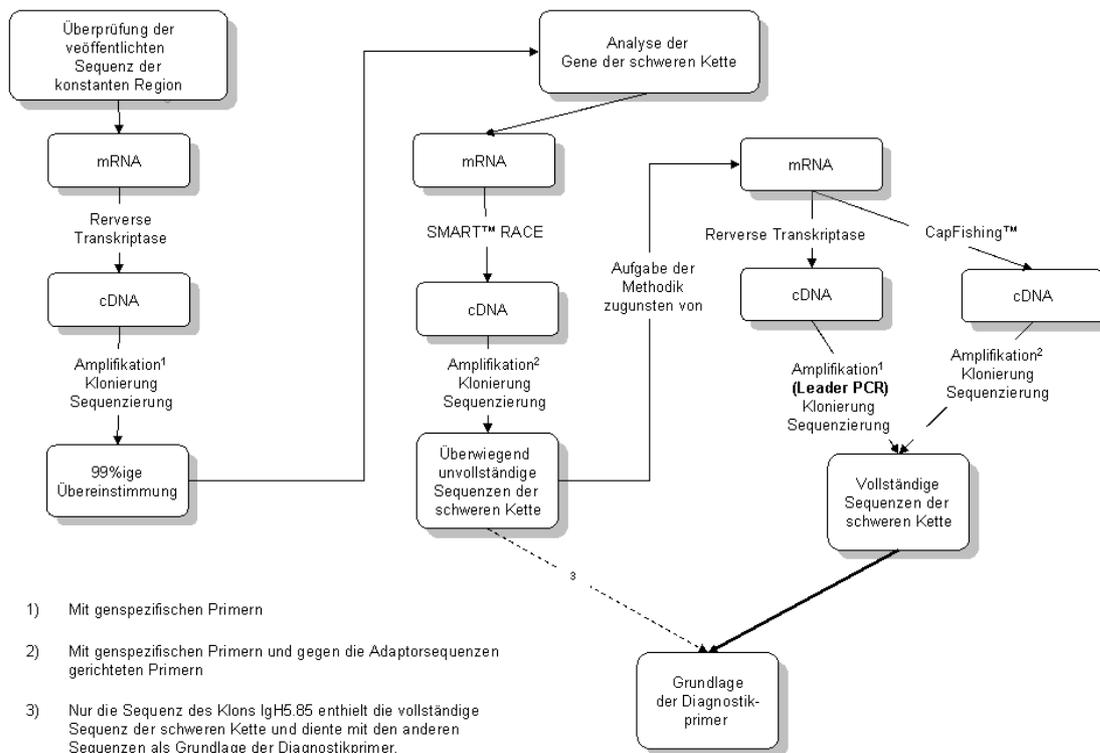
8 µl dieser Reaktion wurden einer Ergebniskontrolle mittels oben beschriebener SDS-PAGE unterzogen.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der schweren Kette des felines Immunglobulins

Für die Analyse der schweren Kette des felines Immunglobulins wurden verschiedene Methoden der Erzeugung von Inserts für die Klonierung und Sequenzierung aus der isolierten mRNA verwendet. Die zunächst verwendete SMARTTM RACE Technik wurde aufgrund geringer Effizienz zugunsten der Leader-PCR und der CapFishingTM Technik aufgegeben. In Abbildung 7 ist die durchgeführte Strategie der Analyse der schweren Kette schematisch dargestellt.

Abbildung 7: Schema der Strategie der Analyse der schweren Kette



4.1.1 Verifizierung der veröffentlichten Sequenz der C-Region der schweren Kette des felines IgMs

Aufgrund von Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe, die eine Diskrepanz zwischen den veröffentlichten Sequenzen der C-Region des felines TCR- β (Cho et al., 1998) und den eigenen Untersuchungsergebnissen feststellte, wurde die in der selben Arbeit (Cho et al., 1998) veröffentlichte Sequenz der C-Region der schweren Kette des felines IgM am eigenen biologischen Material mittels RT-PCR verifiziert.

Mit dem genspezifischen Primer FeIgMr2 gelang es, cDNA von zwei Katzen (S1234/02 und S902/03) zu gewinnen. Diese wurde mit den Primern FeIgMf1 und FeIgMr2 als spezifischen Primer für die Bindung in der C-Region amplifiziert. Nach Aufreinigung und Klonierung dieser Amplifikate, wurden die Plasmide aus zwei der in der Kolonie-PCR mit den Primern FeIgMf1 und FeIgMr2 positiven Klone sequenziert. Hierdurch konnte ein 764 bp-großes sowie ein 658 bp-großes Fragment identifiziert werden, die jeweils zu 99% mit der veröffentlichten Sequenz übereinstimmten.

4.1.2 Analyse der weiter in Richtung 5'-Ende gelegenen Sequenzen

4.1.2.1 SMARTTM RACE-Technik

Nach Verifizierung der veröffentlichten Sequenz am eigenen Material, wurde diese benutzt, um ausgehend von der C-Region zunächst mittels der SMARTTM RACE-Technik die Bereiche der V-, D- und J-Region zu amplifizieren. Hierzu konnten mit der Sequenz der C-Region als Grundlage neue Primer erstellt und diese für die Reaktion eingesetzt werden.

Als Ausgangsmaterial diente aufgereinigte mRNA des Tieres mit der Tagebuchnummer S897/04.

Zur Initiierung der cDNA-Synthese wurde der Antisense-Primer FeIgMrIV eingesetzt. Die weitere Amplifikation erfolgte als Seminested-PCR mit dem Primer FeIgMrIII und dem Universalprimermix (UPM) bei einer Anlagerungstemperatur von 63°C.

Von den dabei entstandenen Amplifikaten unterschiedlicher Länge wurden die Amplifikate mit einer Größe über 684 bp aufgereinigt und zur zweiten Amplifikation eingesetzt.

Die zweite Amplifikation erfolgte mit dem Nested-Universal-Primer in Kombination mit Primer FeIgMrII bei 63°C Anlagerungstemperatur. Von den Amplifikaten wurden wiederum die Fragmente mit einer Größe über 684 bp aufgereinigt und in kompetente Zellen kloniert.

Von zwei der in der Kolonie-PCR mit dem Primer FeIgMrI (Anlagerungstemperatur 68°C) in Kombination mit dem Nested-Universal-Primer positiven Kolonien (R2.2, R2.6, s. 8.11), wurde das Insert nach Plasmidisolierung sequenziert.

Hierbei ergaben sich eine 275 bp-große und eine 299 bp-große Sequenz, die in ihren letzten 162 Basenpaaren des 3'-Endes zu jeweils 100% mit den ersten 162 Basenpaaren der veröffentlichten Sequenz übereinstimmten. Somit konnte die bekannte Sequenz um 113 bzw. 137 Basenpaare ergänzt werden.

Auf der Basis der erweiterten Sequenz wurden drei Primer erstellt. Der Primer FeIgMfII wurde möglichst nahe an das 5'-Ende der neuen Sequenz platziert und diente als Sense-Primer für den Test der beiden anderen Primer. Die Primer FeIgMrV und FeIgMrVI wurden mit bereits bestehenden Primern zur weiteren SMART™ RACE-Reaktion und anschließender Klonierung der Produkte für die Analyse der in Richtung 5'-Ende gelegenen Sequenzen eingesetzt. Hier wurde der Primer FeIgMrII zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die erste Amplifikation erfolgte mit dem Primer FeIgMrI in Kombination mit dem UPM (Anlagerungstemperatur 63°C). Die Zweitamplifikation wurde mit dem Primer FeIgMrV in Kombination mit dem Nested-Universal-Primer (Anlagerungstemperatur 63°C) durchgeführt. Von drei der in der Kolonie-PCR mit dem Primer FeIgMrVI in Kombination mit dem Nested-Universal-Primer (Anlagerungstemperatur 68°C) positiven Kolonien wurden die entsprechenden Inserts nach Plasmidisolierung sequenziert (R3.1, R3.2, R3.3, s. 8.11).

Hierbei konnten bei den erhaltenen Sequenzen durch Vergleich mit der Sequenz des humanen Immunglobulins (V-Quest, IMTG, Montpellier, Frankreich) unvollständige Bereiche des CDR3 identifiziert werden.

Beispielhaft ist dies für das Insert des Klons R 3.1 in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: Äquivalente der Sequenz des Inserts des Klons R3.1 zur humanen Immunglobulinsequenz

| | | | | | | |
|-----|-------------|------------|------------------------|------------|------------|------------|
| 1 | AAGCAGTGGT | ATCAACGCAG | AGTACGCGGG | CTCCGTGAAG | GGCCGATTCA | CCATCTCCAG |
| 61 | AGACAACGCC | AAGAACACGC | TGTATCTGCA | GATGAACAGC | CTGAAGACCG | AGGACACGGC |
| 121 | CACATATCAC | TGTTCAAGAG | ATAGCA _{acta} | tgattactgg | ggccaaggag | ccctgatgac |
| 181 | gggtGTCCTCA | GAGACCTCAT | CCCGTCCAAA | TCTCTCCCC | CTCATCACCT | GTGAGAGCTC |
| 241 | CCTGTCCGAT | GAGCCCCTGG | TGGCCATGGG | CTGCCTGGCC | CGGGACTTCC | TGCCCAGCTC |
| 301 | CGTCACCTTC | TCCTGGAAct | ACAAGAACAA | CAGTGTGGTC | AACAACCA | |

AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGTACGCGGG: SMART II™ Oligonukleotid

Entsprechungen zur humanen Sequenz:

GRAU UNTERLEGT: VH3 (unvollständig) kleinbuchstaben: **IgHJ4**

UNTERSTRICHEN: N-Region GROSSBUCHSTABEN: **C-REGION**

KURSIV: D5

Bei ca. 300 durch weitere gleichartige SMART™ RACE-Reaktionen erzeugten Klonen konnte lediglich bei einem Klon ein Insert mittels Kolonie-PCR identifiziert werden, das eine einem vollständigen Gen der variablen Region der schweren Kette des Immunglobulins entsprechende Größe aufwies (IgH5.85, s. 8.11). Das Insert dieses Klons wurde sequenziert und mit der humanen Sequenz verglichen (s. Tabelle 62, Anhang).

4.1.2.2 Leader-PCR

Aufgrund der geringen Effizienz der SMART™ RACE-Methode wurde diese aufgegeben und das NCBI Trace Archiv (NCBI, Bethesda) als Grundlage für die Erstellung von Primern für die Amplifikation der vollständigen Sequenz der schweren Kette des felines Immunglobulins herangezogen. Im Trace Archiv konnten 13 Traces der Katze mit signifikanter Ähnlichkeit mit Mitgliedern der humanen VH1-Familie ermittelt werden, von denen mittels V-QUEST (IMTG, Montpellier, Frankreich; (Lefranc et al., 1998)) bei 11 eine über 80%ige Übereinstimmung mit der humanen VH1-Familie gefunden werden konnte. Zum überwiegenden Teil handelte es sich dabei um das Gen IGHV1-24*01. Beim Vergleich der Mitglieder der humanen VH3-Familie mit dem Trace Archiv konnten 145 Traces mit signifikanter Ähnlichkeit ermittelt werden, von denen bei 137 eine über 80%ige Übereinstimmung mit der humanen VH3-Familie ermittelt werden konnte. Der Vergleich der übrigen humanen VH-Familien ergab entweder keine signifikanten Übereinstimmungen mit

den Traces oder die gefundenen Traces konnten mittels V-Quest nicht eindeutig den Genen der schweren Kette zugeordnet werden, so dass lediglich die Traces mit Ähnlichkeiten zur humanen VH1- und VH3-Familie zur weiteren Analyse verwendet wurden. Jedoch wurden Hyperlinks aller Traces, die mittels der Suche gefunden wurden, in einer HTML-basierten Datenbank archiviert.

Durch Analyse auf das Vorhandensein von Leadersequenzen konnten für die VH1-Familie neun Traces ermittelt werden, die eine vollständige Leadersequenz enthielten. Für die VH3-Familie konnten 74 entsprechende Traces ermittelt werden. Mit den auf Grundlage dieser Sequenzen entwickelten Sense-Primern (IgHV3L und IgHV1L) in Kombination mit dem Antisense-Primer FeIgMrV (Anlagerungstemperatur für IgHV1L 62°C, für IgHV3L 65°C) konnten unter Verwendung der Phusion[™] High Fidelity DNA-Polymerase Amplifikate im Größenbereich von 600 Basenpaaren für die jeweiligen Familien erzeugt werden.

Diese wurden aufgereinigt und mittels Klonierung konnten in der Kolonie-PCR mit den Leader-Primern und FeIgMrVI (Anlagerungstemperatur für IgHV1L 62°C, für IgHV3L 65°C) für die VH1-Familie 34 positive Kolonien und für die VH3-Familie 38 positive Kolonien gewonnen werden. Von diesen positiven Kolonien wurden für jede Familie jeweils zehn Inserts nach Aufreinigung der Plasmide sequenziert. Für die VH1- und die VH3-Familie konnten auf diese Weise 9 vollständige Sequenzen der V-Region der schweren Kette des felines Immunglobulins einschließlich der zugehörigen Leader-Sequenz gewonnen werden (Für **VH1**: LV1.1.3, LV1.1.7, LV1.1.9, LV1.1.11, LV1.1.12, LV1.1.33, LV1.1.34, LV1.1.35, LV1.1.37; Für **VH3**: LV3.1.10, LV3.1.11, LV3.1.12, LV3.1.13, LV3.1.33, LV3.1.34, LV3.1.35, LV3.1.36, LV3.1.37) (s. 8.11).

Durch die Analyse der Sequenzen mittels V-Quest konnte auch hier eine Zuordnung der V-, D-, J-, N- sowie der Leader-Region erfolgen.

Abbildung 9 zeigt dies beispielhaft für das Insert des Klons LV1.1.3 (für die Analyse der übrigen Klone s. Tabelle 61 und Tabelle 62, Anhang).

Abbildung 9: Äquivalente der Sequenz des Inserts des Klon LV1.1.3 zur humanen Immunglobulinsequenz

| | | | | | | |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCTACAG <u>GT</u> | GTGCACTCCC |
| 61 | <u>AGGTTTTGCT</u> | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGAGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | <u>TCTGCAAAGC</u> | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | GTACTGGGTG | CGACAGGCTC |
| 181 | <u>CTGCACAAGG</u> | GTTTGAATGG | ATGGAAGCA | TTGACCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | <u>CACAGAAGTT</u> | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | <u>TGGAGCTGAG</u> | CAGTCTGAGG | TCTACAGACA | CGGCCGTGTA | TTATTGTGCA | <u>AGGTTTGAGT</u> |
| 361 | <u>TTAGGGGACT</u> | <u>ATTctatatt</u> | gactactggg | gccaaaggagc | cctggtgacg | gtGTCCTCAG |
| 421 | AGACCTCATC | CCGTCCAAAT | CTCTTCCCC | TCATCACCTG | TGAGAGCTCC | CTGTCCGATG |
| 481 | AGCCCCTGGT | GGCCATGGGC | TGCCTGGCCC | GGGACTTCCT | GCCCAGCTCC | GTCACCTTCT |
| 541 | CCTGGAACTA | CAAGAACAAC | AGTGTGGTCA | ACAACCA | | |

Entsprechungen zur humanen Sequenz:

FETT: Leaderregion UNTERSTRICHEN: N-Region

GRAU UNTERLEGT: VH1 kleinbuchstaben: **IgHJ4**

KURSIV: D3 GROSSBUCHSTABEN: **C-REGION**

Bei dem Versuch der Amplifikation der cDNA mit den Primern gegen die humane Leaderregionen konnten lediglich mit dem Primer HuIgHV2L in Kombination mit FeIgMrV (Anlagerungstemperatur 61°C) Amplifikate erzeugt werden. Die Amplifikate hatten eine Größe von ca. 420 bp. Nach Aufreinigung der Amplifikate, Klonierung, Isolierung und Aufreinigung der Plasmide von fünf in der Kolonie-PCR mit den Leader-Primern in Kombination mit FeIgMrVI positiven Kolonien wurden die Plasmide sequenziert. Die hierbei gewonnenen Sequenzen konnten mittels V-Quest alle der VH3-Familie zugeordnet werden (s. Tabelle 61 und Tabelle 62, Anhang).

4.1.2.3 CapFishing™-Technik

Die CapFishing™-Methode wurde parallel zur Leader-PCR eingesetzt. Hierbei wurde die cDNA-Synthese mit Zufallsprimern (N₆) initiiert. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit dem CapFishing™ Adapter in Kombination mit dem sequenzspezifischen Antisense-Primer FeIgMrV. Nach Klonierung des PCR-Produkts, Aufreinigung und Sequenzierung der Inserts konnten so neun zusätzliche Sequenzen gewonnen werden (Cp1.1, Cp1.2, Cp1.4, Cp1.6, Cp1.8, Cp1.9, Cp1.10, Cp1.11, Cp1.13, s. 8.11). Die so gewonnenen Sequenzen waren nochmal ca. 100 bp länger als die mit der Leader-PCR gewonnenen Sequenzen und konnten

nach Überprüfung mittels V-Quest alle der VH3-Familie zugeordnet werden (s. Tabelle 61 und Tabelle 62, Anhang).

4.2 Entwicklung der Diagnostikprimer

4.2.1 Sense-Primer

Durch direkten Vergleich der jeweiligen Sequenzen der beiden bei der Katze gefundenen VH-Familien konnten die Bereiche höchster (CDR, „complimentary-determining regions“) und geringster Variabilität (FR, „framework regions“) zwischen den Sequenzen bestimmt werden. Die entsprechenden Ausschnitte dieses Vergleiches sind in Abbildung 10 bis Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 10: Vergleich der Sequenzen der VH1-Familie (Ausschnitt) mit der Primerbindungsstelle in der Framework-Region 1

| | -----FR 1----- -----CDR 1----- -----FR 2----- | |
|-----------|---|-----|
| LV1.1.33 | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGCACCTGGTTGCGACAGGCT | 179 |
| LV1.1.35 | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGCACCTGGTTGCGACAGGCT | 180 |
| LV1.1.34 | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGCACCTGGTTGCGACAGGCT | 180 |
| LV1.1.9 | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATCCACTGGTTGCGACAGGCT | 180 |
| LV1.1.3 | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGTACTGGGTGCGACAGGCT | 180 |
| LV1.1.11 | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGTACTGGGTGCGACAGGCT | 180 |
| LV1.1.7 | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGTACTGGGTGCGACAGGCT | 180 |
| LV1.1.37 | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGTACTGGGTGCGACAGGCT | 180 |
| LV1.1.12 | TTCTGCAAAGCGTCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATCGCTGGTGGTGACAGGCT | 179 |
| CONSENSUS | TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGYACTGGKTGCGACAGGCT | |
| V1FRI | GCAAAGCATCTGGATACAGCTTC | |

Abbildung 11: Vergleich der Sequenzen der VH1-Familie (Ausschnitt) mit der Primerbindungsstelle in der Framework-Region 3

| | -----FR3----- | |
|-----------|---|-----|
| LV1.1.33 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | 299 |
| LV1.1.35 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | 300 |
| LV1.1.34 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | 300 |
| LV1.1.9 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | 300 |
| LV1.1.3 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | 300 |
| LV1.1.11 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | 300 |
| LV1.1.7 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | 300 |
| LV1.1.37 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | 300 |
| LV1.1.12 | GCACAGAAAGTCCAGGGCAACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAGACACAGCCTAC | 295 |
| CONSENSUS | GCACAGAAAGTCCAGGGCAGACTCACCCGTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC | |
| V1FRIII | GAAAGTCCAGGGCAGACTCAC | |

Abbildung 12: Vergleich der Sequenzen der VH3-Familie (Ausschnitt) mit der Primerbindungsstelle in der Framework-Region 1

| | FR 1 | CDR 1 | FR 2 | |
|-----------|--|----------------------|-------------|-----|
| LV3.1.33 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| LV3.1.35 | ACCTGTGTGGCCTCTGGGTTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| LV3.1.36 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 171 |
| LV3.1.34 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| LV3.1.37 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| LV3.1.13 | ACCTGTGCAAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAACTACTACATGAGCT | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| LV3.1.11 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCGGGAACTCTTTATATGAAC | TGGGT | CTGGCCAGGCT | 177 |
| LV3.1.10 | ACCTGGTGGTCTCTGGACTACACCTTCAGTAGCCACTACATGTTCT | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| LV3.1.12 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTACCTACTACATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| IGH5.85 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGGAATGAGCT | TGGGT | CCGCCAGGCT | 125 |
| Cp1.9 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAACTACGACATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| Cp1.13 | ACCTGTGTGGCCTCTGGACTACACCTTCAGGCGCTACGACATGAAAT | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| Cp1.1 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC | TGGGT | CCGCC--- | 175 |
| Cp1.8 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| Cp1.10 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTACTACATGCACT | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| Cp1.11 | ACCTGTGTAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAACTACTACATGAGCT | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| Cp1.2 | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | 178 |
| Cp1.4 | -----TTACACCTTCAGTAGATATGCAATGACCT | TGGGT | CCGCCAGGCT | 42 |
| Cp1.6 | ACCTGTATGGCCTCCGGATTCAACGTGGTAGCTATGGAATGAGCT | TGGTT | CCGCCAGGCT | 178 |
| CONSENSUS | ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTAYWRCATGAAC | TGGGT | CCGCCAGGCT | |
| V3FRI | G | GGCCTCTGGATTACACCTTC | | |

Abbildung 13: Vergleich der Sequenzen der VH3-Familie (Ausschnitt) mit der Primerbindungsstelle in der Framework-Region 3

| | FR3 | |
|-----------|---|-----|
| LV3.1.33 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCGTCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTCT | 298 |
| LV3.1.35 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCGTCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTCT | 298 |
| LV3.1.36 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCGTCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTCT | 291 |
| LV3.1.34 | ACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 295 |
| LV3.1.37 | ACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 295 |
| LV3.1.13 | GCTGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGGAT | 298 |
| LV3.1.11 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 297 |
| LV3.1.10 | ATAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCGTCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 298 |
| LV3.1.12 | GCAGAAATCCGTGAAGGGCCGATTACACCTCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 298 |
| IGH5.85 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 245 |
| Cp1.9 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 298 |
| Cp1.13 | GTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 298 |
| Cp1.1 | GCAGACTCCGTGAAGGGGATCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACACACTGTAT | 295 |
| Cp1.8 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 298 |
| Cp1.10 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 298 |
| Cp1.11 | CCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCTAGAGACAAAGCCAAGGAATACGCTGTAT | 298 |
| Cp1.2 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCATTGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 298 |
| Cp1.4 | GCAGACTCCATGAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTAT | 162 |
| Cp1.6 | GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCATTGACAAAGCCAAGAACACACTATAT | 298 |
| CONSENSUS | RCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCGTCTCCAGAGACAAAGCCAAGAACAGGCTGTMT | |
| V3FRIII | CCGTGAAGGGCCGATTAC | |

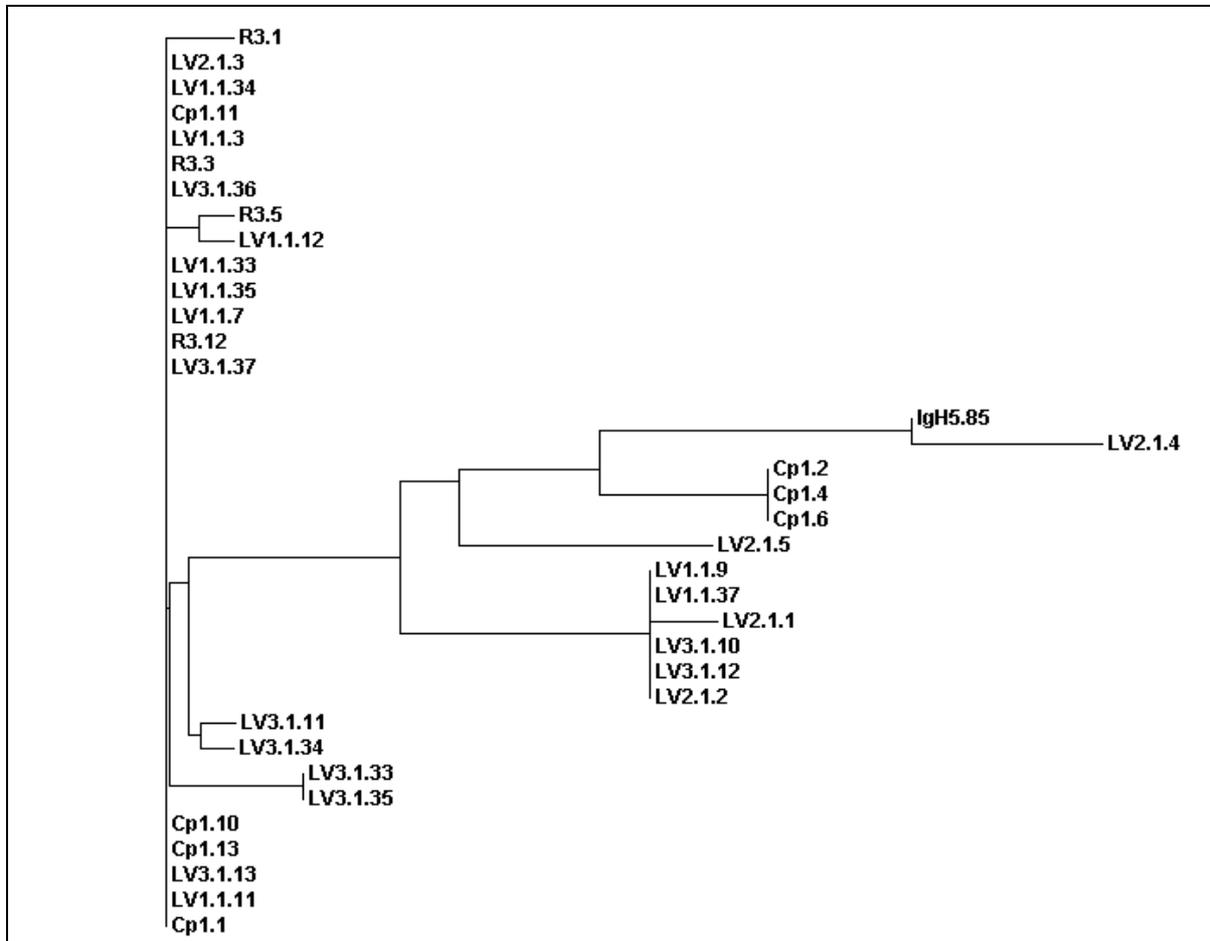
Die familienspezifischen Sense-Primer für die Diagnostik wurden jeweils für die Bindung an Stellen geringer Variabilität in Framework-Region 1 und Framework-Region 2 entwickelt.

4.2.2 Antisense-Primer

Für die Entwicklung der Antisense-Primer wurden die einzelnen in den erzeugten Sequenzen ermittelten J-Regionen mittels des webbasierten Programms ClustalW miteinander verglichen

und ein Verwandtschaftsdiagramm erstellt (vgl. Abbildung 14). In diesen Vergleich wurden auch Sequenzen einbezogen, die nicht für die Entwicklung der Sense-Primer benutzt wurden, weil die V-Region nur unvollständig erfasst wurde.

Abbildung 14: Verwandtschaftsverhältnisse der in den Inserts vorkommenden J-Regionen



Entsprechend der Ähnlichkeit der Sequenzen wurden diese zu Gruppen zusammengefasst und für jede Gruppe eine möglichst alle Mitglieder erfassende Sequenz für den Antisense-Primer ermittelt (sog. „Consensus-Sequenz“) (vgl. Abbildung 15 bis Abbildung 17).

Abbildung 15: Gruppe 1 der J-Regionen

| | |
|------------------|--|
| R 3.1 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| R 3.3 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| R 3.5 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| R 3.12 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV1.1.3 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV1.1.33 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV2.1.3 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV3.1.37 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV3.1.133 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTATCCCTCAGA |
| LV1.1.12 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV1.1.7 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV1.1.34 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV3.1.13 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| Cp1.1 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| Cp1.11 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV1.1.11 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV1.1.35 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV3.1.35 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTATCCCTCAGA |
| LV3.1.36 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| Cp1.10 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| Cp1.13 | TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV3.1.11 | AACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| LV3.1.34 | CACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTACCGGTGTCCCTCAGA |
| Consensus | CAAGGAGCCCTGGTACCGGTG |

Abbildung 16: Gruppe 2 der J-Regionen

| | |
|------------------|---|
| LV1.1.9 | TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA |
| LV2.1.1 | TACTGGGGTCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA |
| LV2.1.2 | TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA |
| LV1.1.37 | TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA |
| LV3.1.10 | TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA |
| LV3.1.12 | TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA |
| Consensus | CCCCGGGACCCTGGTCACCGTG |

Abbildung 17: Gruppe 3 der J-Regionen

| | |
|------------------|---|
| IgH 5.85 | ATCTGGGGCCCAAGGTACCCAGGTACCGTCTCCCAAGA |
| LV2.1.4 | ATCTGGGGCCCAAGGTACCCAGGTACCGTCTCCCAAGA |
| Cp1.2 | TTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCCTCAGA |
| Cp1.4 | TTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCCTCAGA |
| Cp1.6 | TTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCCTCAGA |
| LV2.1.5 | CTCTGGGGCCATGGAACCATAGTCACAGTGTCCCTCAGA |
| Consensus | CADGGHACCCWRGTCACCGTS |

In Gruppe 3 wurden alle J-Regionen zusammengefasst, die nicht in eine der beiden anderen Gruppe eingeordnet werden konnten. Für diese Gruppe wurde eine so genannte „degenerierte“ Consensus-Sequenz ermittelt. Diese Sequenz enthält alle an einer Lokalisation vorkommenden Nukleotide und wird im so genannten „ambiguity code“ notiert. Ein aus einer solchen Sequenz abgeleiteter Primer wird als „degenerierter Primer“ bezeichnet und stellt eine Mischung aus Primern mit den entsprechend unterschiedlichen Nukleotiden dar. Auf Basis der Sequenzen der Gruppen 1-3 wurden die Antisense-Primer „Jfam1“, „Jfam2“ und „Jdeg“ entwickelt. Da diese Primer exakt an derselben Lokalisation in der J-Region binden, konnten sie als Mischung („J-Mix“) zur Amplifikation eingesetzt werden, wobei der Primer „Jdeg“ in

zehnfach höherer Konzentration eingesetzt wurde, weil dieser als degenerierter Primer schon eine Mischung aus vielen verschiedenen Einzelprimern darstellt.

4.2.3 Überprüfung der Primer

Zur Überprüfung der Primer wurden die aufgereinigten Plasmide mit den Sense-Primern für beide Familien in Kombination mit den Antisense-Primern für die J-Region amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27 Ergebnisse der Amplifikation der Plasmide mit den Diagnostikprimern

| Klon | V1FRI | V1FRIII | V3FRI | V3FRIII |
|----------|-------|---------|-------|---------|
| LV1.1.3 | + | + | - | - |
| LV1.1.7 | + | + | - | - |
| LV1.1.9 | + | + | - | - |
| LV1.1.11 | + | + | - | - |
| LV1.1.12 | + | + | - | - |
| LV1.1.33 | + | + | - | - |
| LV1.1.34 | + | + | - | - |
| LV1.1.35 | + | + | - | - |
| LV1.1.37 | + | + | - | - |
| IgH5.85 | - | - | + | + |
| LV3.1.10 | - | - | + | + |
| LV3.1.11 | - | - | + | + |
| LV3.1.12 | - | - | + | + |
| LV3.1.13 | - | - | + | + |
| LV3.1.33 | - | - | + | + |
| LV3.1.34 | - | - | + | + |
| LV3.1.35 | - | - | + | + |
| LV3.1.36 | - | - | + | + |
| LV3.1.37 | - | - | + | + |

+ = Amplifikation; - = keine Amplifikation

4.3 Etablierung des Diagnostik-Systems

4.3.1 Elektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde als Horizontalgelelektrophorese durchgeführt. Die Gele wurden mit dem unter 3.9.3 beschriebenen Aluminiumgießblock erzeugt. Die ursprüngliche Intention, die Gele auf UV-durchlässiges Glas aufzubringen, um die solcherart stabilisierten Gele sicherer auf dem Transluminator fotografieren zu können, musste nach einigen Vorversuchen fallen gelassen werden, da selbst sehr UV-durchlässiges Glas die Leuchtstärke der Banden verringerte und so eine Detektion von schwachen Banden erschwert hätte.

Zur Lösung der Gele wurde daher eine straff gespannte Angelschnur zwischen Gel und Glasplatte gleichmäßig vom unteren Ende der Gele bis zum oberen Rand gezogen, wodurch

das Gel von der Glasplatte abgeschnitten werden konnte. Essentiell war dabei, dass die Angelschnur tatsächlich straff gespannt war, denn bei Nachlassen der Spannung war die Gefahr gegeben, dass Reste des Gels mit darin enthaltener DNS auf der Glasplatte zurückblieben.

Die besten Trennergebnisse für die erwarteten Fragmente konnten bei einer Polyacrylamidkonzentration von 7% und einer Spannung von 7,5 V/cm Elektrodenabstand bei einer Laufzeit von 9,5 Stunden erzielt werden.

4.3.2 Isolierung der Proben-DNS

Ausgehend von der Art der Proben wurden unterschiedliche Verfahren zur Extraktion der DNS angewendet. Untersucht wurden Proben von histologisch und immunhistologisch diagnostizierten B-Zell-Lymphomen, T-Zell-Lymphomen sowie lymphatischen Hyperplasien. Die Ergebnisse der Überprüfung der DNS-Qualität sowie die Art der Fixierung und die Isolierungsmethode aller Proben sind in Tabelle 59 angegeben.

4.3.2.1 Frischmaterial

Die Extraktion von Frischmaterial wurde hauptsächlich für die Gewinnung von Ausgangsmaterial für die Analyse der Gene der schweren Kette des felines Immunglobulins eingesetzt. Jedoch konnte auch die DNS eines histologisch diagnostizierten B-Zell-Lymphoms (Tagebuchnummer S1003/04) erfolgreich mit Hilfe des Protokolls für Frischmaterial des Extraktionskits Puregene[®] DNA Purification Kit gewonnen werden. Die DNS wies eine gute Amplifizierbarkeit im Bereich von 300 bp auf.

4.3.2.2 Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe

Für dieses Gewebe wurden zwei Methoden angewandt. Die zunächst verwendete Methode orientierte sich an dem Protokoll des Puregene[®] DNA Purification Kits zur DNS-Extraktion aus formalinfixiertem paraffineingebetteten Gewebe. Mit diesem Verfahren wurden 36 Proben extrahiert und die Qualität der DNS (s. 3.9.1) zunächst durch den Versuch der Amplifikation eines ca. 300 bp-großen Fragments überprüft. Von 36 Proben konnte bei elf Proben ein Amplikon dieser Länge erzeugt werden. Bei den 25 negativen Proben schloss sich der Versuch an, ein Fragment der Länge von 100 bp zu erzeugen. Dies gelang bei acht der Proben.

Aufgrund der geringen Effizienz dieser Methode wurden folgend 54 Proben mit einer Kombination aus Hitzebehandlung in Natronlauge mit Tween[®] 20, Bindung an Chelex 100 und Waschen mit Chloroform extrahiert.

Der Versuch der Amplifikation des ca. 300 bp-großen und des 100 bp-großen Fragmentes misslang zunächst, durch zweimaliges Wiederholen des Waschens mit Chloroform konnte jedoch bei 12 der 54 Proben ein Amplikon der Länge von 300 bp erzeugt werden. Bei 38 der 42 negativen Proben gelang folgend die Amplifikation des 100 bp Fragmentes.

4.3.3 Amplifikation des CDR3

Die Amplifikation des CDR3 mit den Diagnostikprimern wurde wie unter 3.9.2 beschrieben durchgeführt. Zur Überprüfung der Wirksamkeit des Systems wurde die DNS von jeweils zehn B-Zell-Lymphomen, zehn lymphatischen Hyperplasien und zehn T-Zell-Lymphomen mit dem System amplifiziert.

Die Tagebuchnummern der verwendeten Proben sind in Tabelle 1 bis Tabelle 3 aufgeführt. Die Auswahl der Proben aus der Gesamtheit der isolierten Proben orientierte sich an der Qualität der DNS. Bevorzugt wurden Proben amplifiziert, bei denen das 300 bp-Fragment amplifiziert werden konnte.

4.3.4 Heteroduplexanalyse

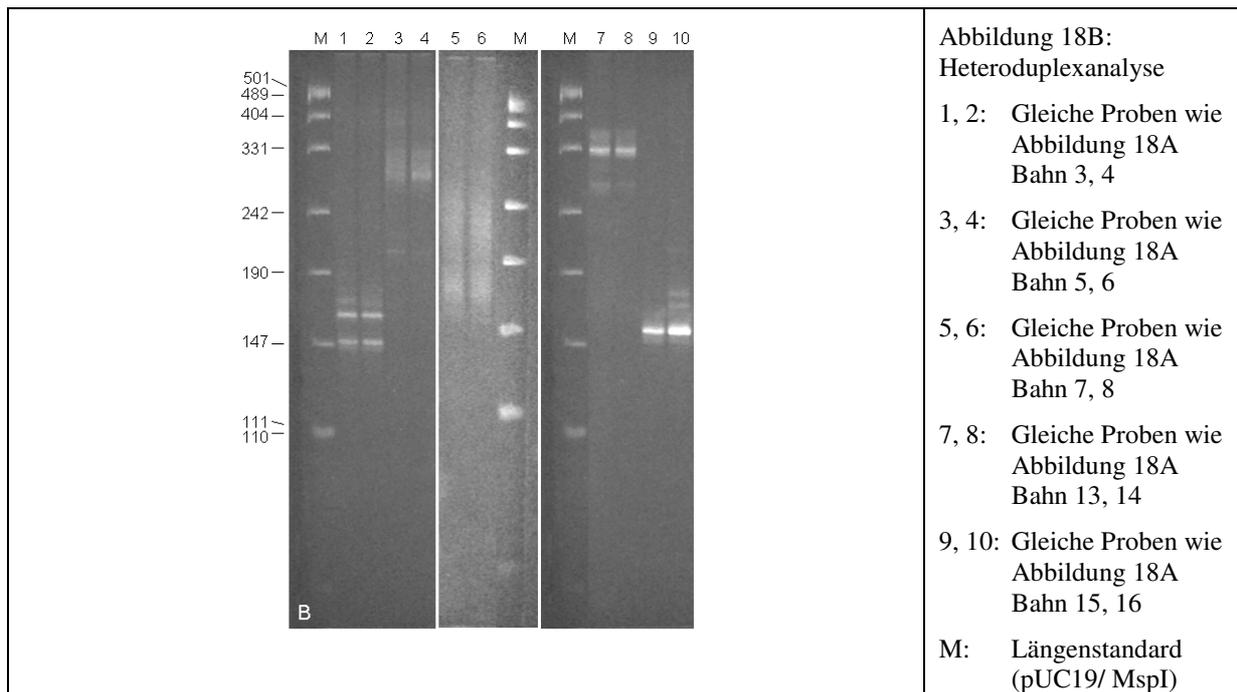
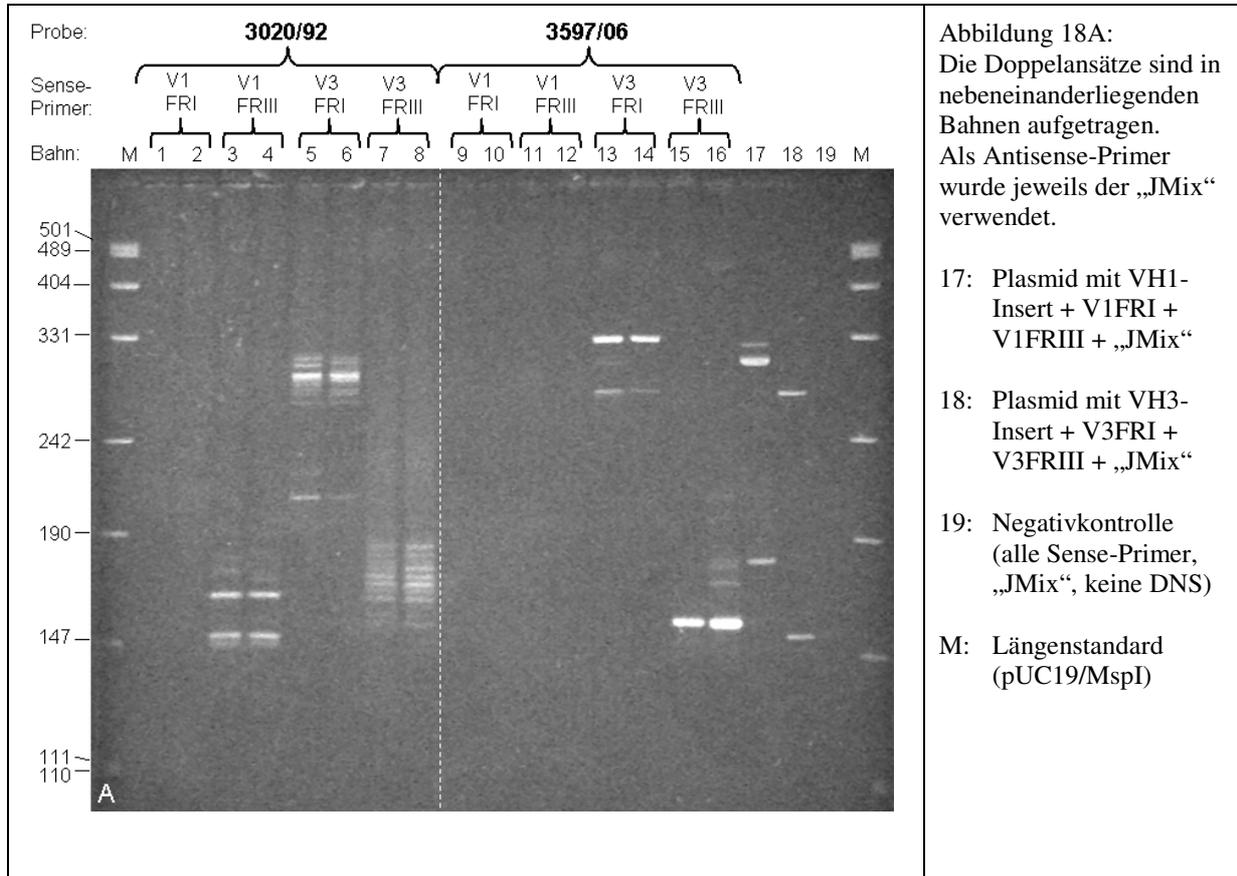
Die Heteroduplexanalyse wurde bei Proben durchgeführt, die Banden gleicher Größe in beiden Reaktionen des Doppelansatzes zeigten.

4.3.5 Ergebnisse der mit dem Diagnostiksystem untersuchten Proben

4.3.5.1 B-Zell-Lymphome

4.3.5.1.1 Fälle 3020/92 und 3597/06

Abbildung 18: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 3020/92 und 3597/06



Ergebnisse

Tabelle 28: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 3020/92

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|--|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 18A, Bahn 1 + 2) | Zwei reproduzierbare* Banden sowie 6 bis 7 nicht reproduzierbare schwache Banden (Abbildung 18A, Bahn 3 + 4) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbaren Banden bleiben bestehen (Abbildung 18B, Bahn 1 + 2). | Leitermuster aus 10 bis 12 Banden, die im mittleren Abschnitt eine höhere Fluoreszenz aufweisen (Abbildung 18A, Bahn 5 + 6). <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die stärkere Fluoreszenz im mittleren Bereich ist verschwunden, das Leitermuster ist unscharf (Abbildung 18B, Bahn 3 + 4). | Leitermuster aus 12 bis 14 Banden (Abbildung 18A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unschärfer „Schmier“ (Abbildung 18B, Bahn 5 + 6) |

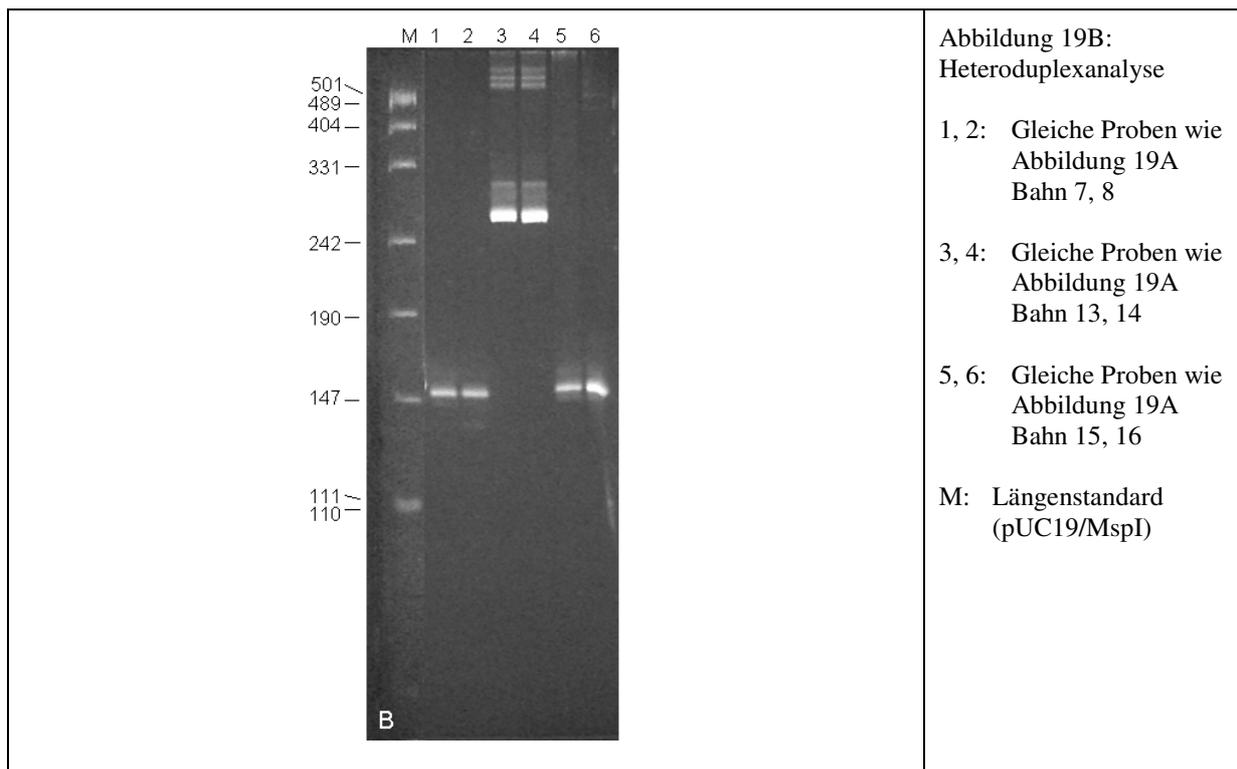
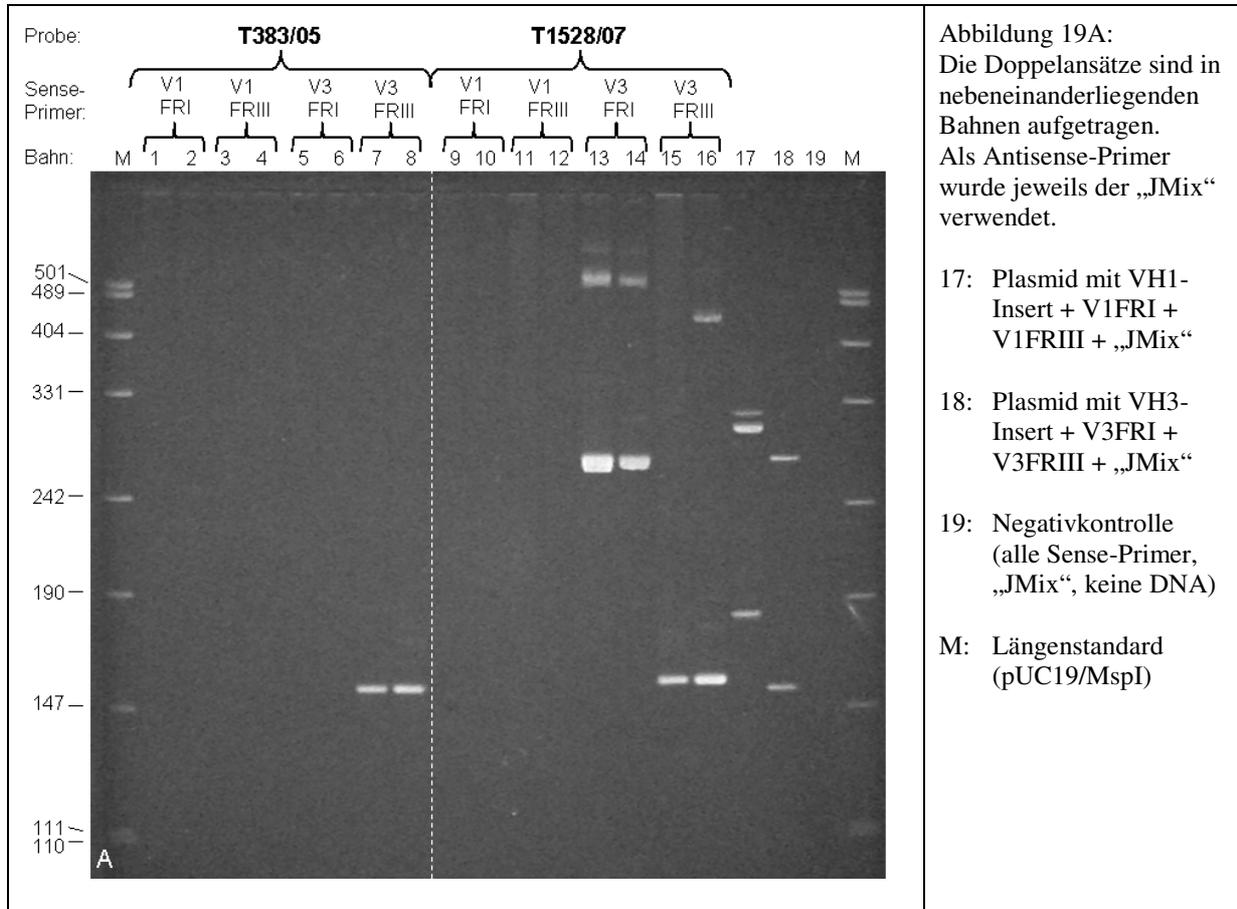
* d.h. in beiden Doppelansätzen auf gleicher Höhe vorhanden.

Tabelle 29: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 3597/06

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 18A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 18A, Bahn 11 + 12) | Zwei reproduzierbare Banden und 1 bis 2 nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 18A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbaren Banden bleiben bestehen (Abbildung 18B, Bahn 7 + 8). | Eine reproduzierbare Bande und 3 bis 4 nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 18A, Bahn 15 + 16) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande bleibt bestehen (Abbildung 18B, Bahn 9 + 10). |

4.3.5.1.2 Fälle T383/05 und T1528/07

Abbildung 19: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T383/05 und T1528/07



Ergebnisse

Tabelle 30: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T383/05

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 3 + 4) | Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 5 + 6) | Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 19A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande bleibt bestehen (Abbildung 19B, Bahn 1 + 2). |

Tabelle 31: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T1528/07

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 11 + 12) | Eine reproduzierbare Banden im erwarteten Größenbereich, eine reproduzierbare Bande oberhalb des erwarteten Größenbereichs (Abbildung 19A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande im erwarteten Größenbereich bleibt bestehen (Abbildung 19B, Bahn 3 + 4). | Eine reproduzierbare Bande im erwarteten Größenbereich, eine nicht reproduzierbare Bande oberhalb des erwarteten Größenbereichs (Abbildung 19A, Bahn 15 + 16) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande im erwarteten Größenbereich bleibt bestehen (Abbildung 19B, Bahn 5 + 6). |

Zur Überprüfung der in Abbildung 19A in Bahn 13 und 14 sichtbaren Banden im Größenbereich von 500 bp wurde ein Aliquot der Probe mittels präparativer Elektrophorese aufgetrennt, die DNA aus den entsprechenden Banden aufgereinigt (s. 3.6) und sequenziert. Die Sequenz ist in Abbildung 20 dargestellt und zeigt rearrangierte Immunglobulingene im Bereich des 5'-Endes und Teile einer nicht rearrangierte J-Region im Bereich des 3'-Endes (Situation vor dem Spleißen).

Ergebnisse

Abbildung 20: Sequenz der bei der Untersuchung von Fall T1528/07 aufgetretenen Nebenbande

| | | | | | | |
|-----|-------------------|--------------------|------------|------------|--------------------|--------------------|
| 1 | <u>GTGGCCTCTG</u> | GATTCACCTT | CAGTAGCTAC | TACATGAGCT | GGGTCCGCCA | GGCTCCAGGG |
| 61 | <u>AAGGGGCTGC</u> | AGTGGGTCGC | ATATATTAGT | AGTAGTGGAG | GTAGCATATA | CTACGCAGAC |
| 121 | <u>TCCGTGAAGG</u> | GCCGATTCAC | CATCTCCAGA | GACAACGCCA | AGAACACGCT | GTATCTGCAG |
| 181 | <u>ATGAACAGCC</u> | TGAAGACCGA | GGACACGGCC | ACATATTACT | <u>GTGCTCGGGG</u> | <u>GGTCCCAGATG</u> |
| 241 | gactcctggg | gccaaggagc | cctggtgacg | GTGTCTCAG | GTGAGTCCTC | CCGGCTTCC |
| 301 | TCTCTCTCT | CTGTCTGGAG | GTTTGGCTG | CATTGGGGA | GAAAACGGAG | GGTGCCAGGG |
| 361 | TCTCGGACCT | AGGGCTGGCT | TGGTGGCCAG | GCTCTCCGGG | GACCTCAGCC | ACCCTCAGCT |
| 421 | TCAGGGGCCA | CCTGGTCCTC | TCAGCCTCAC | TGGCTGTGAT | CTGAGGTGGA | CCGAGGCCTT |
| 481 | AGCCAGGCC | C <u>ACTTCTTGT</u> | CTGGGGCCCC | ACCAACATTG | TCA <u>CAATGTG</u> | acaactggtt |
| 541 | caactactgg | ggccacggaa | ccct | | | |

GRAU UNTERLEGT: V-Region

kleinbuchstaben: J-Regionen

UNTERSTRICHEN: N-Region

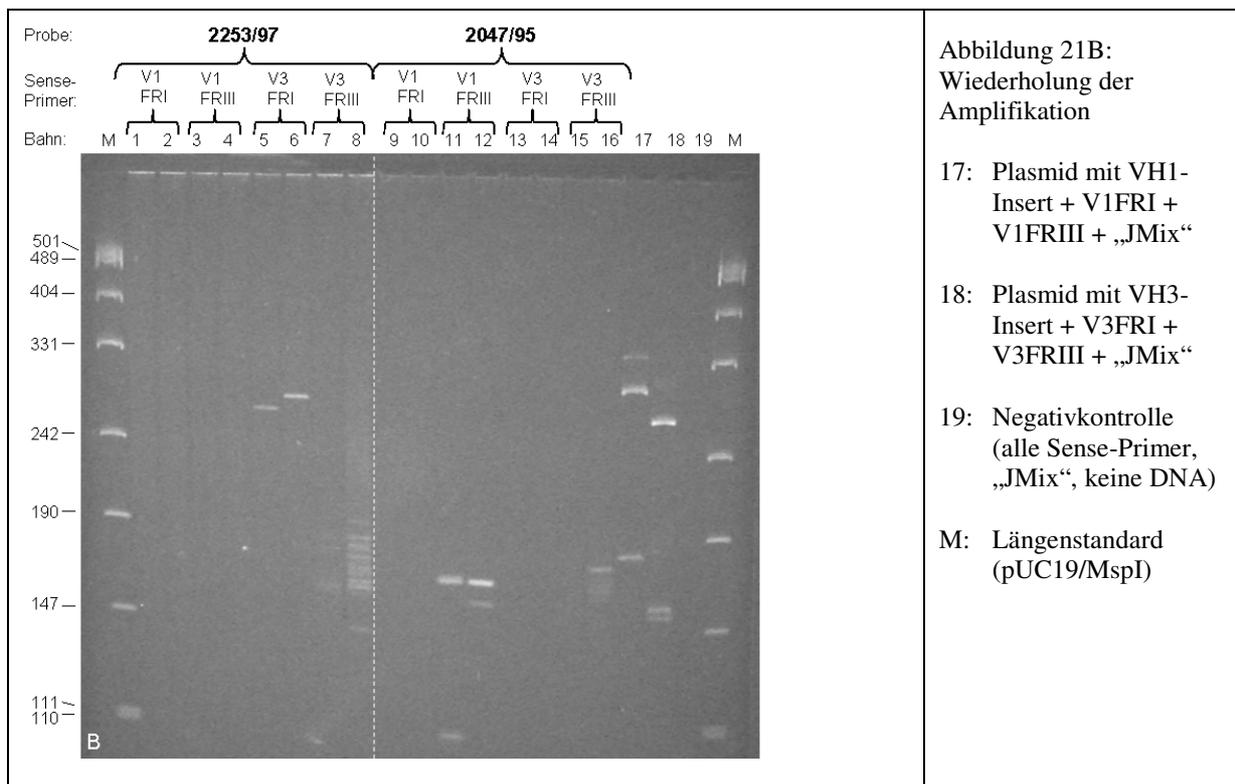
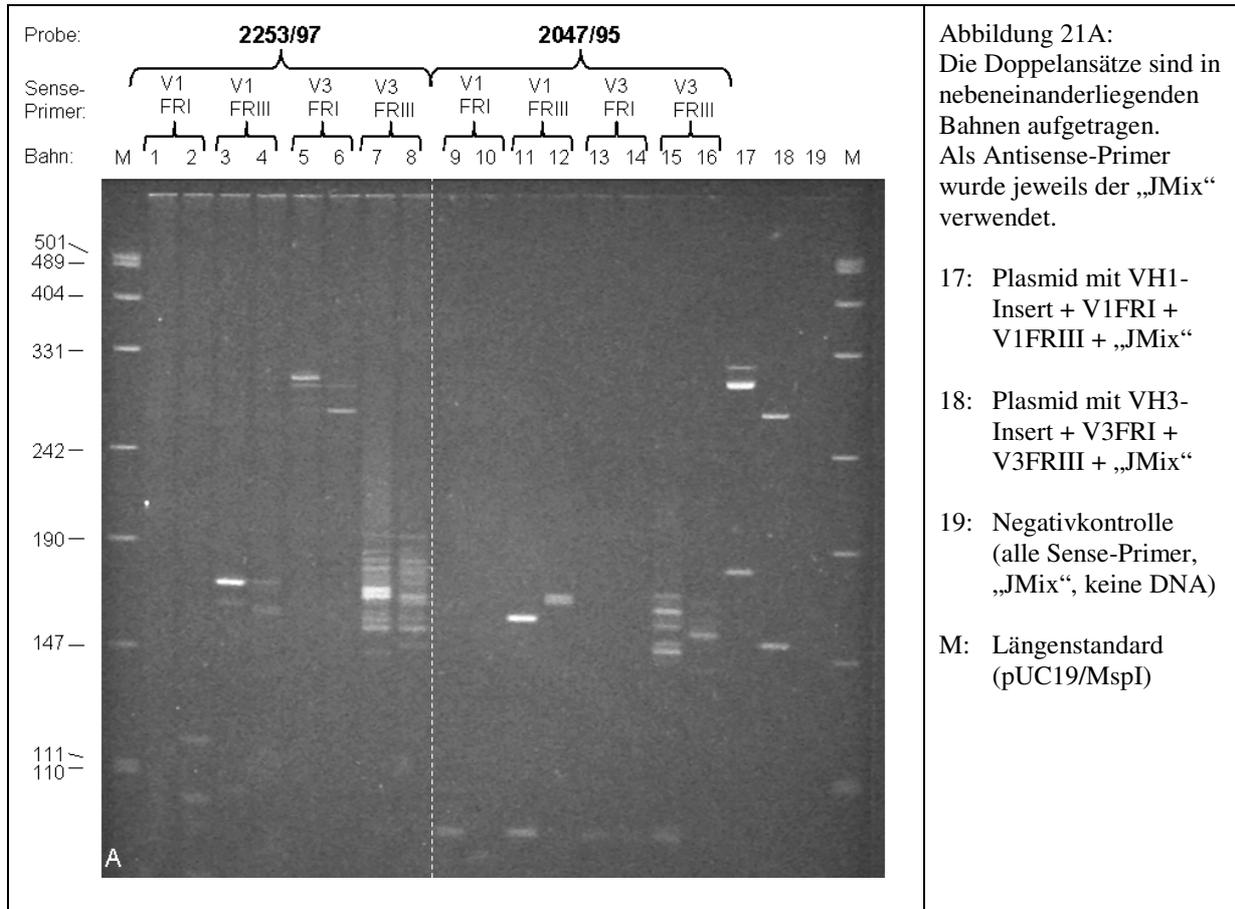
ACTTCTTGT: Nonamer

KURSIV: D-Region

CAATGTG: Heptamer

4.3.5.1.3 Fälle 2253/97 und 2047/95

Abbildung 21: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 2253/97 und 2047/95



Ergebnisse

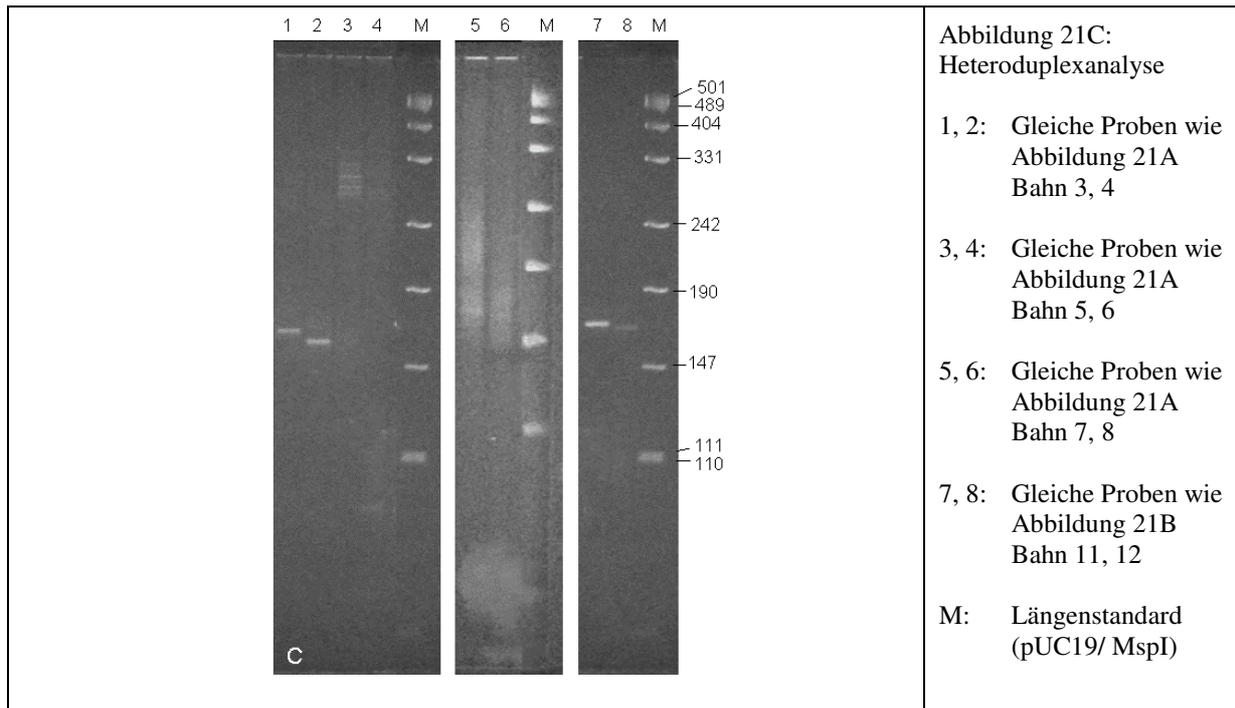


Tabelle 32: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 2253/97

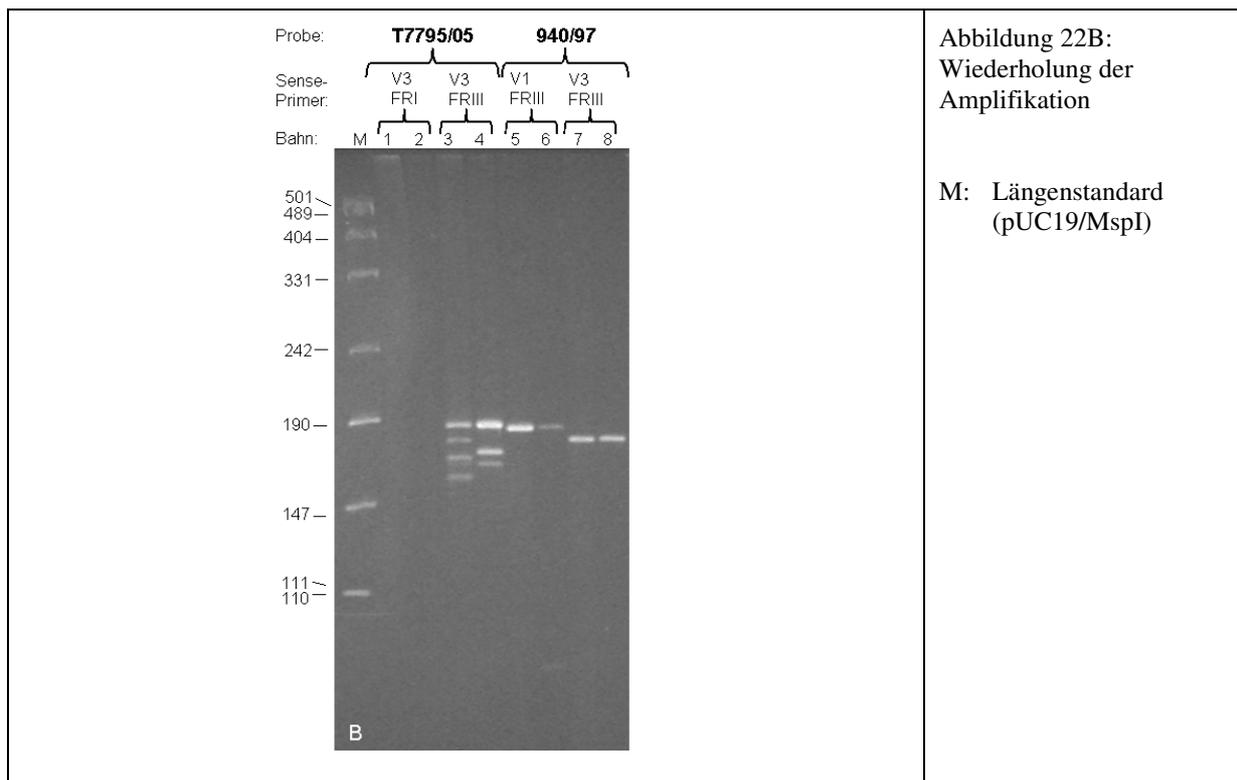
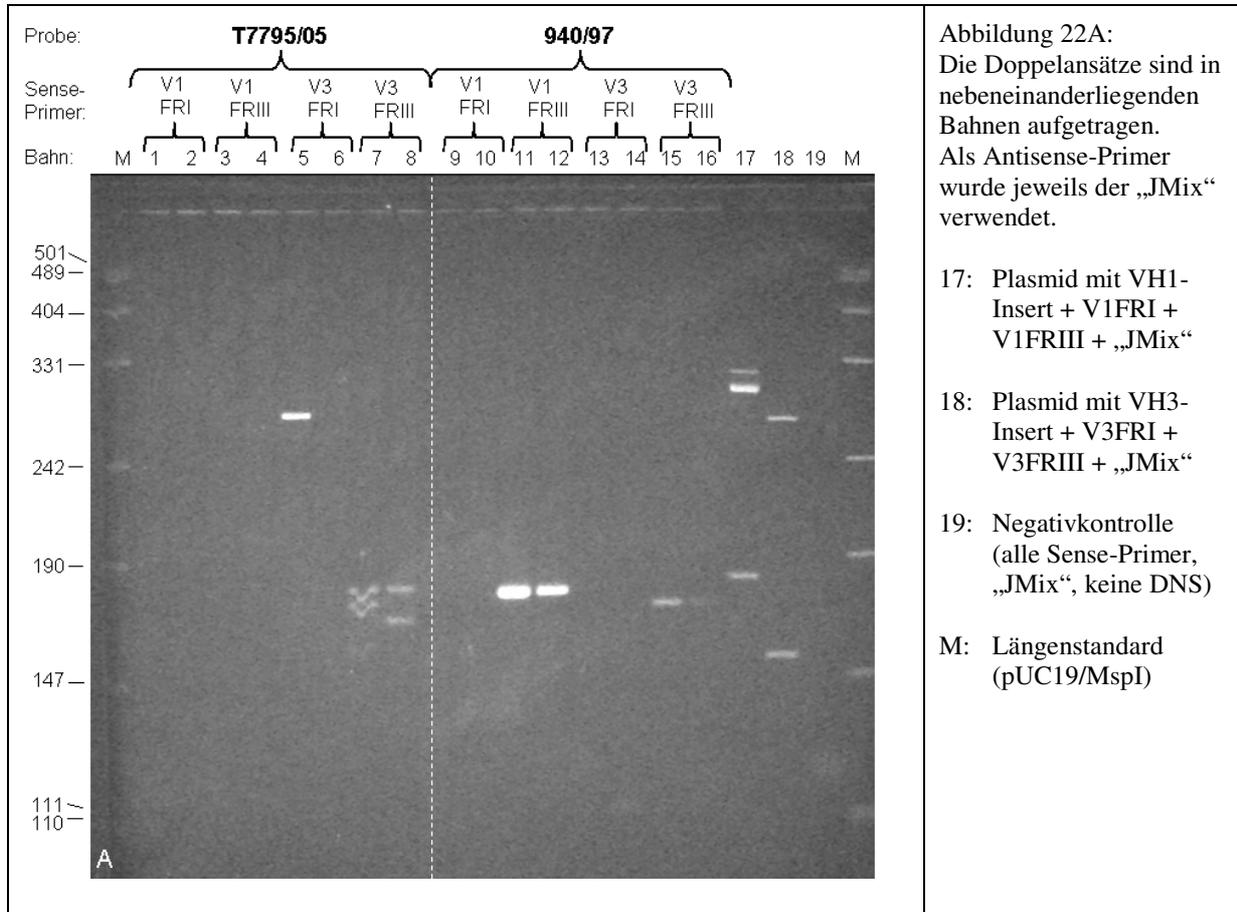
| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 21A, Bahn 1 + 2) | Eine reproduzierbare, ein bis zwei nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 21A, Bahn 3 + 4) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Keine Amplifikation (Abbildung 21B, Bahn 3 + 4) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Zwei Banden unterschiedlicher Größe in den beiden Doppelansätzen (Abbildung 21C, Bahn 1 + 2) | Drei bis vier nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 21A, Bahn 5 + 6) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine nicht reproduzierbare Bande (Abbildung 21B, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unschärfer „Schmier“ (Abbildung 21C, Bahn 3 + 4) | Leitermuster aus 10 bis 12 Banden, die im mittleren Abschnitt eine höhere Fluoreszenz aufweisen (Abbildung 21A, Bahn 7 + 8). <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Schwachere Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 21B, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unschärfer „Schmier“ (Abbildung 21C, Bahn 5 + 6) |

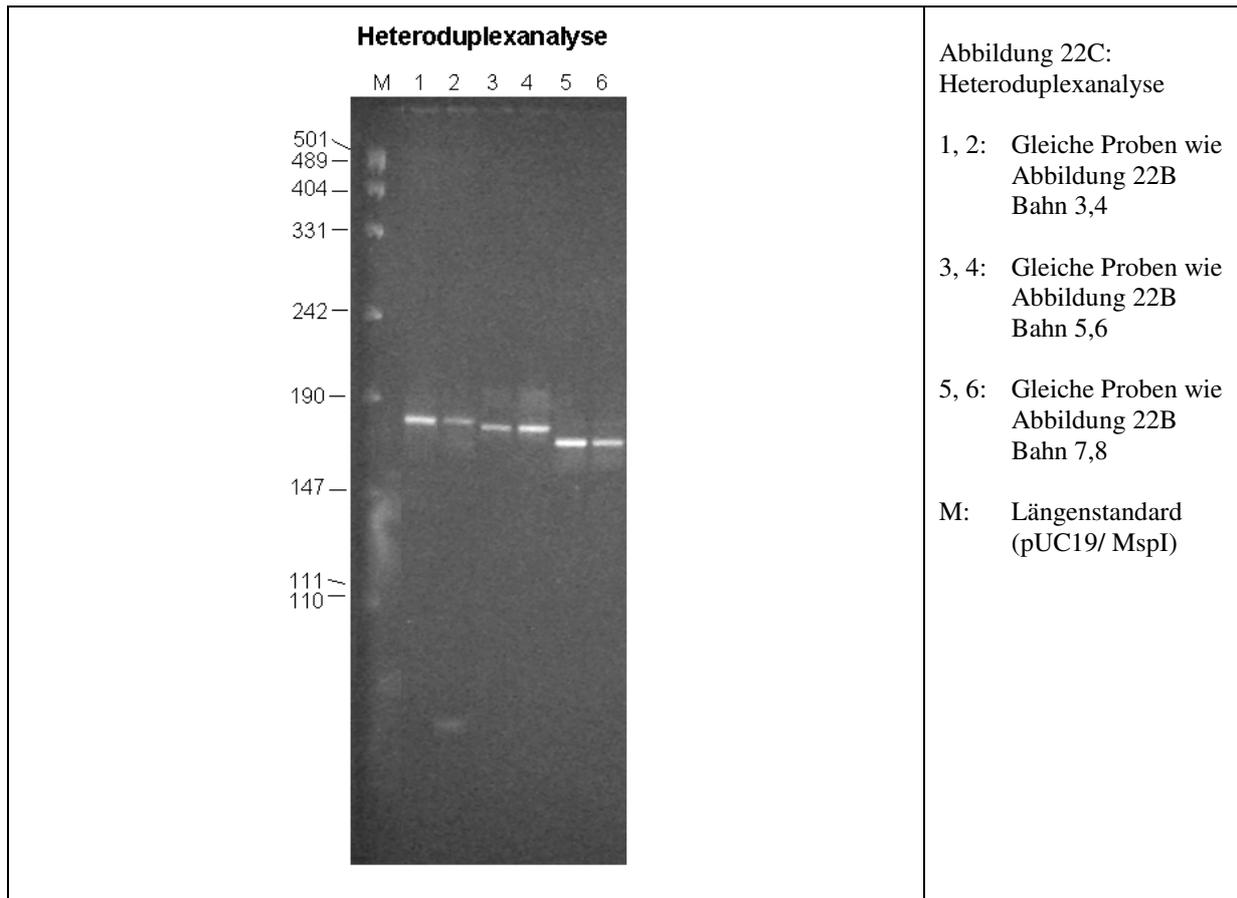
Tabelle 33: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 2047/95

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|--|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 21A, Bahn 9 + 10) | Zwei Banden unterschiedlicher Größe in den beiden Reaktionen des Doppelansatzes (Abbildung 21A, Bahn 11 + 12) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine reproduzierbare Bande, eine kleinere Bande in einer der beiden Reaktionen (Abbildung 21B, Bahn 11 + 12) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 21C, Bahn 7 + 8) | Keine Amplifikation. (Abbildung 21A, Bahn 13 + 14) | 6 bis 7 nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 21A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.1.4 Fälle T7795/05 und 940/97

Abbildung 22: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T7795/05 und 940/97





Ergebnisse

Tabelle 34: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T7795/05

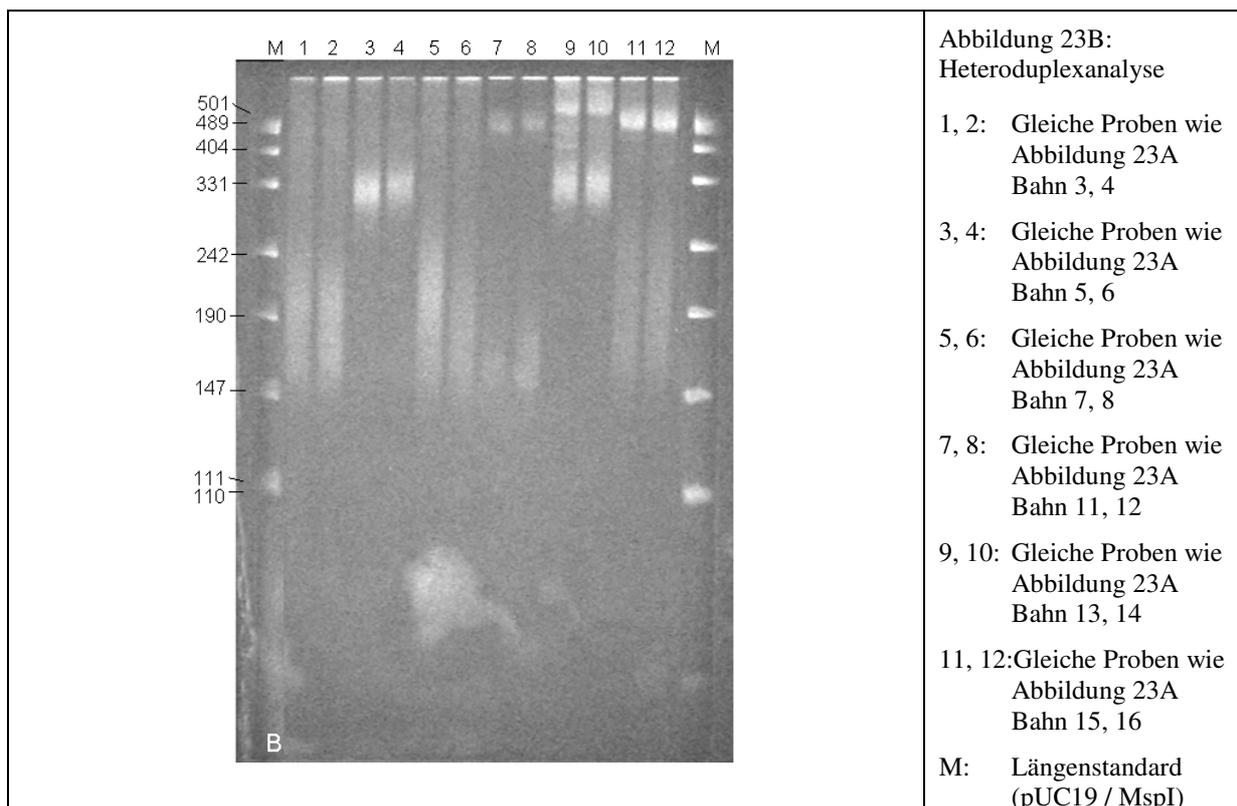
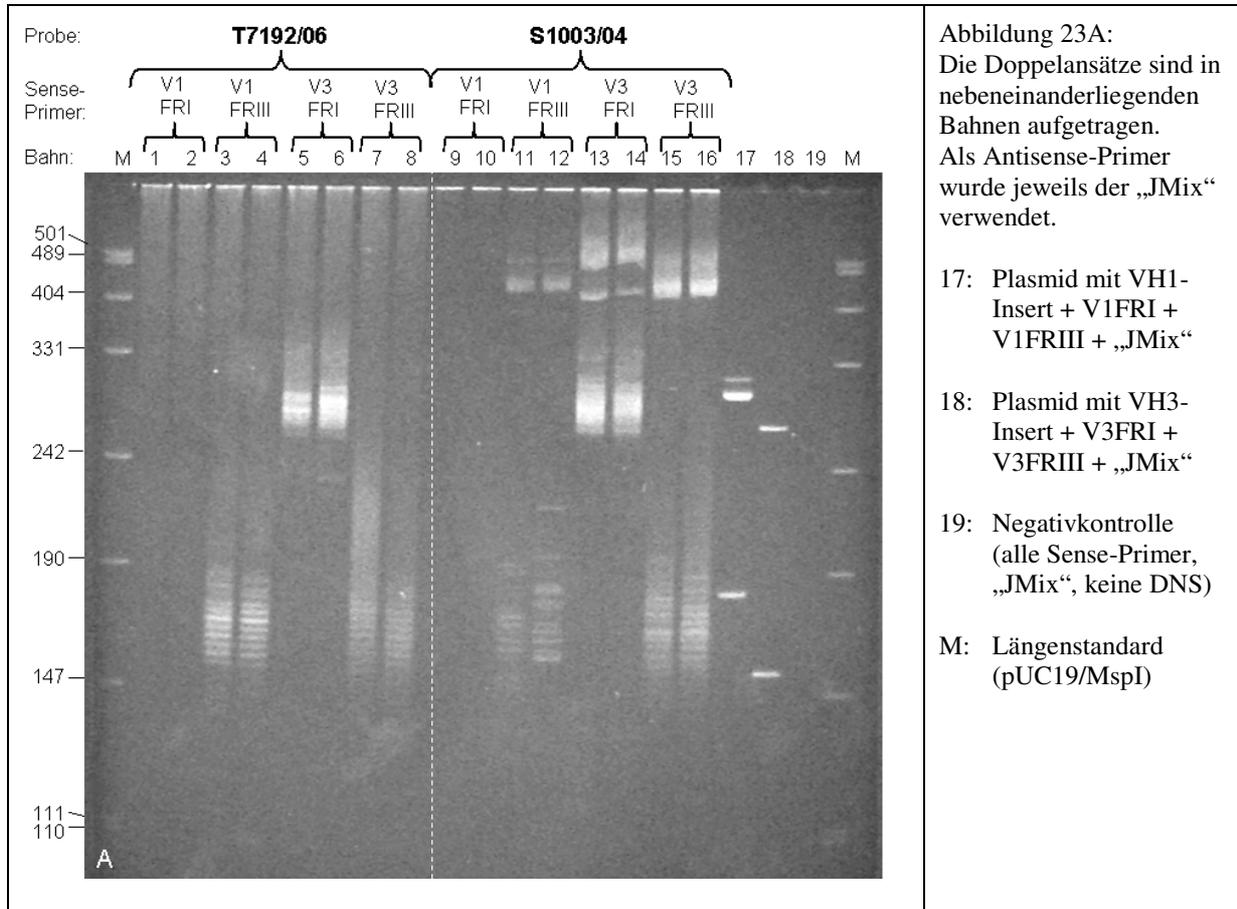
| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 22A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 22A, Bahn 3 + 4) | Eine nicht reproduzierbare Bande (Abbildung 22A, Bahn 5) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Keine Amplifikation (Abbildung 22B, Bahn 1 + 2) | Eine reproduzierbare, ein bis zwei nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 22A, Bahn 7 + 8) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine reproduzierbare, drei bis fünf nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 22B, Bahn 3 + 4) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22C, Bahn 1 + 2) |

Tabelle 35: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 940/97

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 22A, Bahn 9 + 10) | Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22A, Bahn 11 + 12) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22B, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande bleibt bestehen (Abbildung 22C, Bahn 5 + 8). | Keine Amplifikation (Abbildung 22A, Bahn 13 + 14) | Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22A, Bahn 15 + 16) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22B, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande bleibt bestehen (Abbildung 22C, Bahn 7 + 8). |

4.3.5.1.5 Fälle T7192/06 und S1003/04

Abbildung 23: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T7192/06 und S1003/04



Ergebnisse

Tabelle 36: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T7192/06

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|--|--|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 23A, Bahn 1 + 2) | Leitermuster aus 10 bis 12 Banden, die im mittleren Abschnitt eine höhere Fluoreszenz aufweisen (Abbildung 23A, Bahn 3 + 4). <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 1 + 2) | Leitermuster mit zusammenfließenden Banden im mittleren Abschnitt (Abbildung 23A, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 3 + 4) | Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 23A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 5 + 6) |

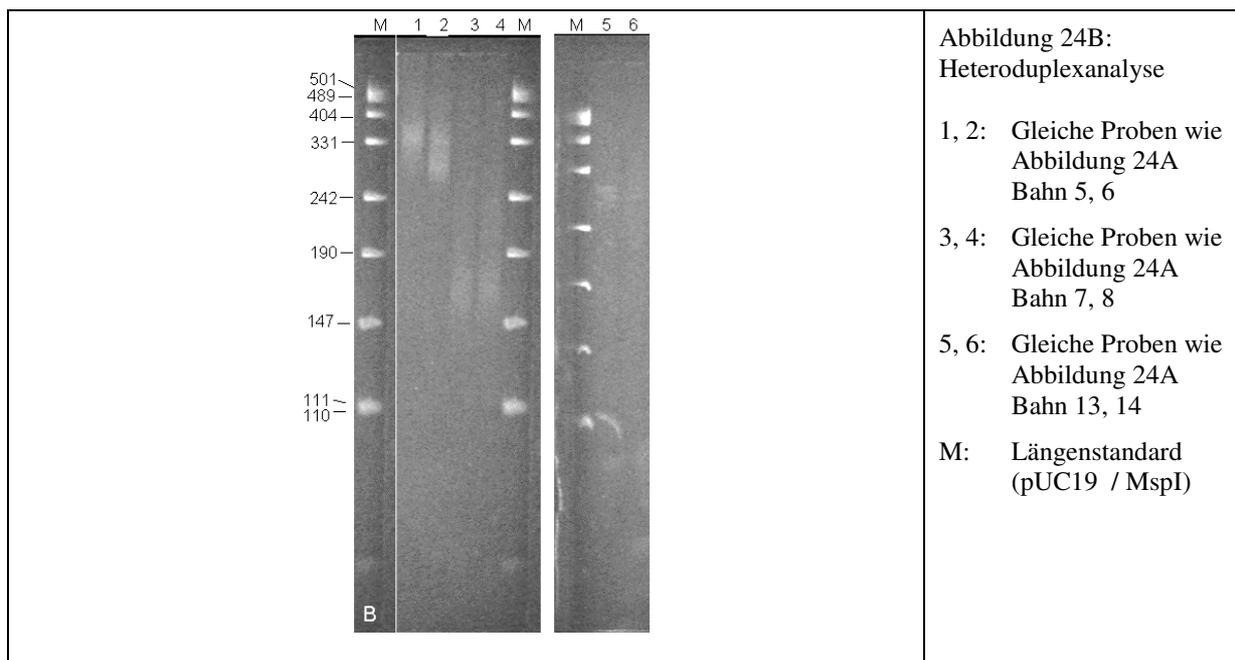
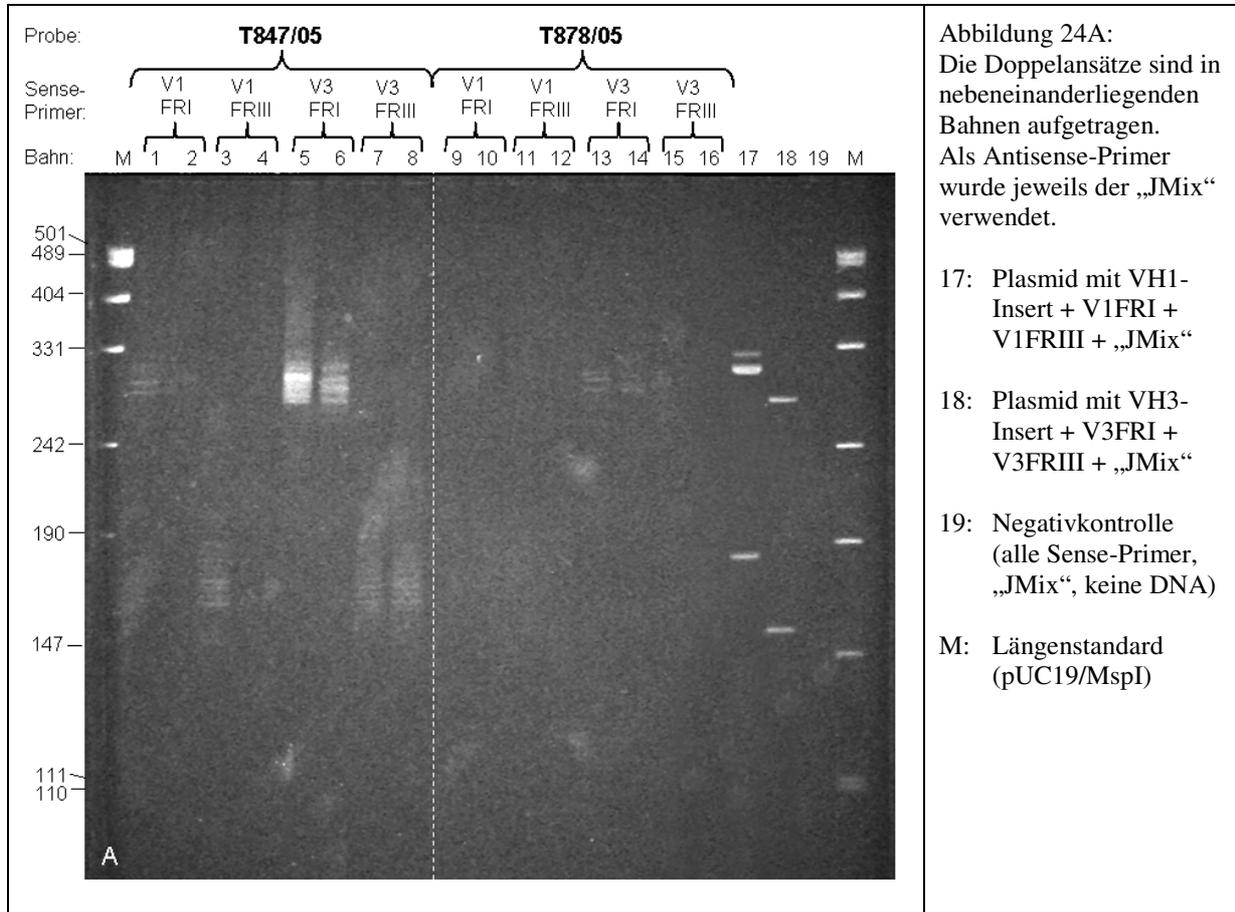
Tabelle 37: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S1003/04

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 23A, Bahn 9 + 10) | Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 23A, Bahn 11 + 12) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 7 + 8) | Leitermuster mit zusammenfließenden Banden im mittleren Abschnitt (Abbildung 23A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 9 + 10) | Leitermuster aus 10 bis 20 Banden (Abbildung 23A, Bahn 15 + 16) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 11 + 12) |

4.3.5.2 Lymphatische Hyperplasien

4.3.5.2.1 Fälle T847/05 und T878/05

Abbildung 24: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T847/05 und T878/05



Ergebnisse

Tabelle 38: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T847/05

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|--|---|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| 1 bis 2 nicht reproduzierbare sehr schwache Banden (Abbildung 24A, Bahn 1) | 6 bis 8 nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 24A, Bahn 3) | Leitermuster mit zusammenfließenden Banden, im mittleren Abschnitt (Abbildung 24A, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 24B, Bahn 1 + 2) | Leitermuster aus 10 bis 14 Banden (Abbildung 24A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 24B, Bahn 3 + 4) |

Tabelle 39: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T878/05

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 24A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 24A, Bahn 11 + 12) | 2 bis 3 sehr schwache Banden (Abbildung 24A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 24B, Bahn 5 + 6) | Keine Amplifikation. (Abbildung 24A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.2.2 Fälle T630/05 und T273/05

Abbildung 25: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T630/05 und T273/05

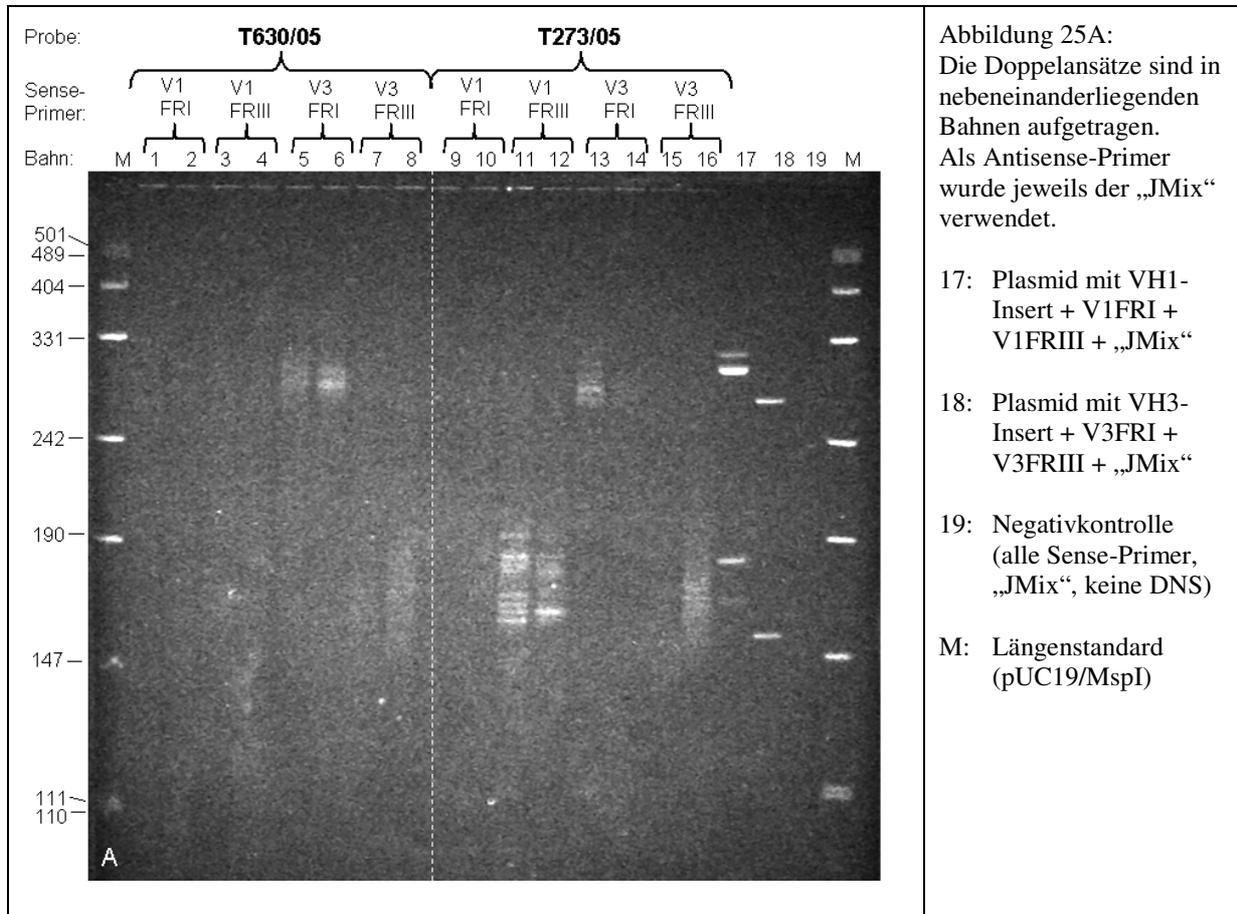


Abbildung 25A:
Die Doppelansätze sind in nebeneinanderliegenden Bahnen aufgetragen. Als Antisense-Primer wurde jeweils der „JMIX“ verwendet.

17: Plasmid mit VH1-Insert + V1FRI + V1FRIII + „JMIX“

18: Plasmid mit VH3-Insert + V3FRI + V3FRIII + „JMIX“

19: Negativkontrolle (alle Sense-Primer, „JMIX“, keine DNS)

M: Längenstandard (pUC19/MspI)

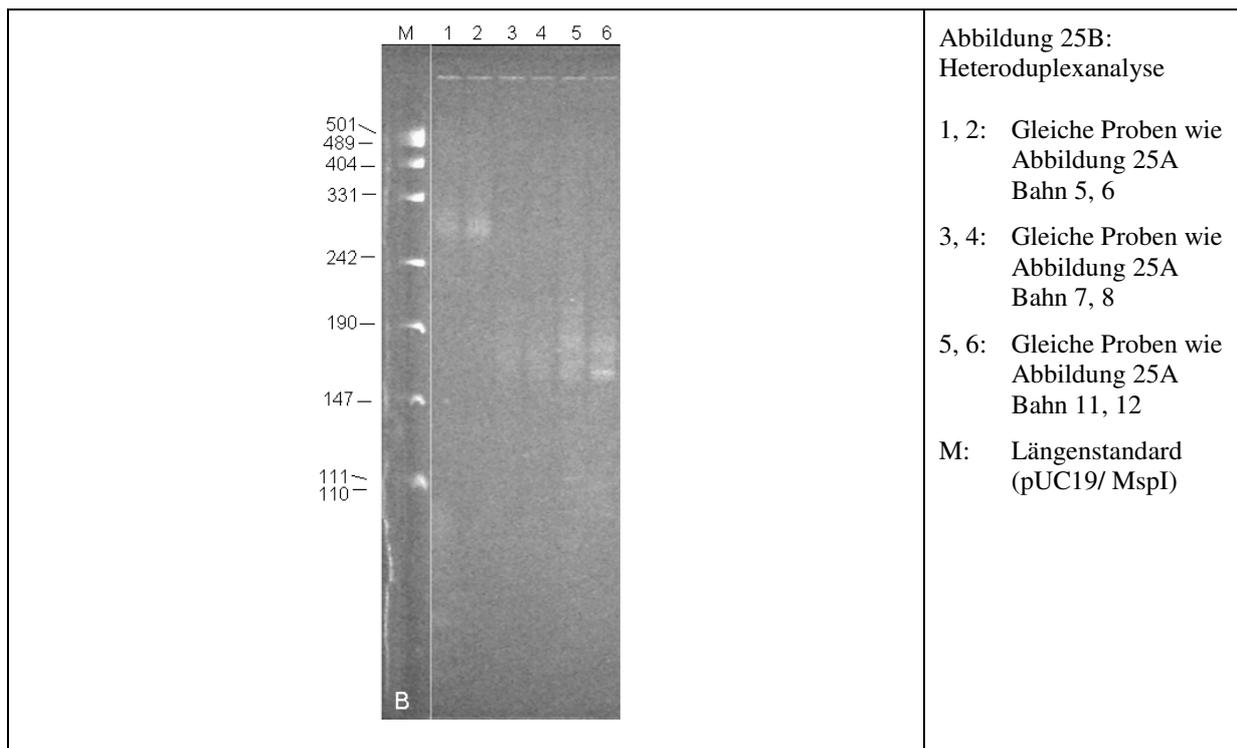


Abbildung 25B:
Heteroduplexanalyse

1, 2: Gleiche Proben wie Abbildung 25A Bahn 5, 6

3, 4: Gleiche Proben wie Abbildung 25A Bahn 7, 8

5, 6: Gleiche Proben wie Abbildung 25A Bahn 11, 12

M: Längenstandard (pUC19/ MspI)

Ergebnisse

Tabelle 40: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T630/05

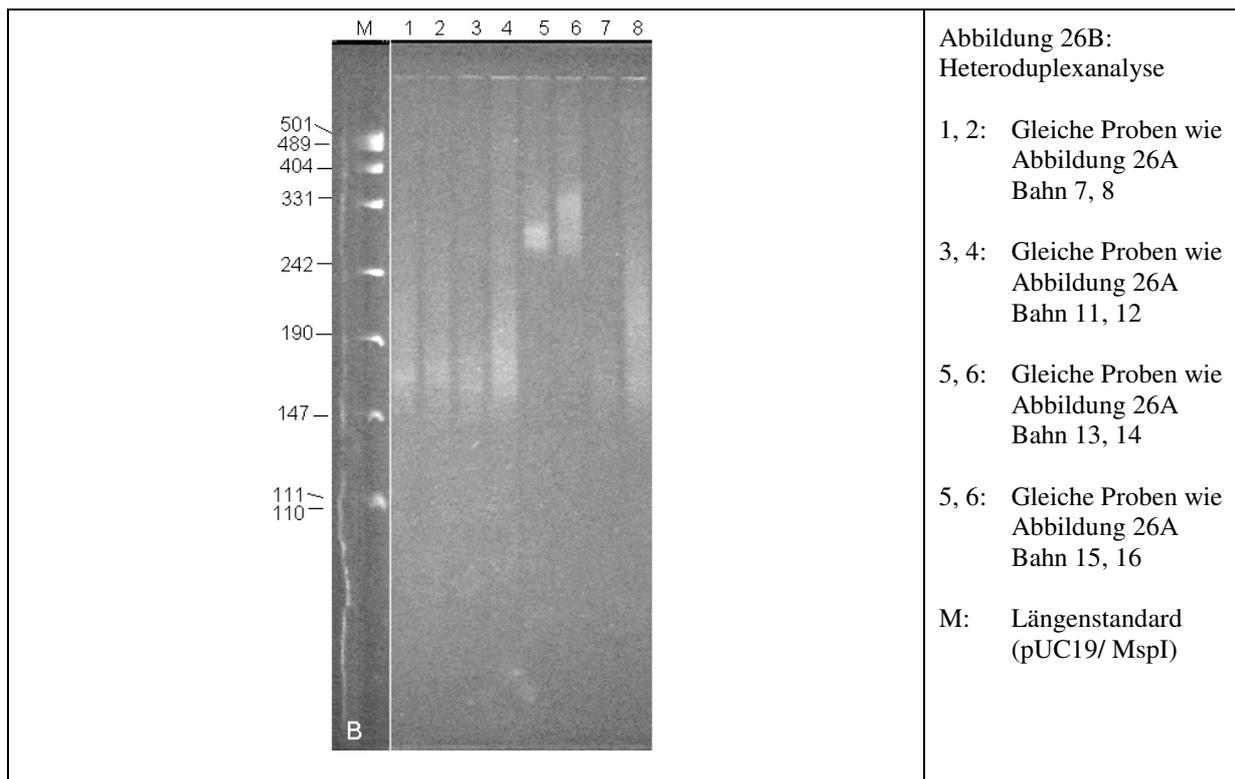
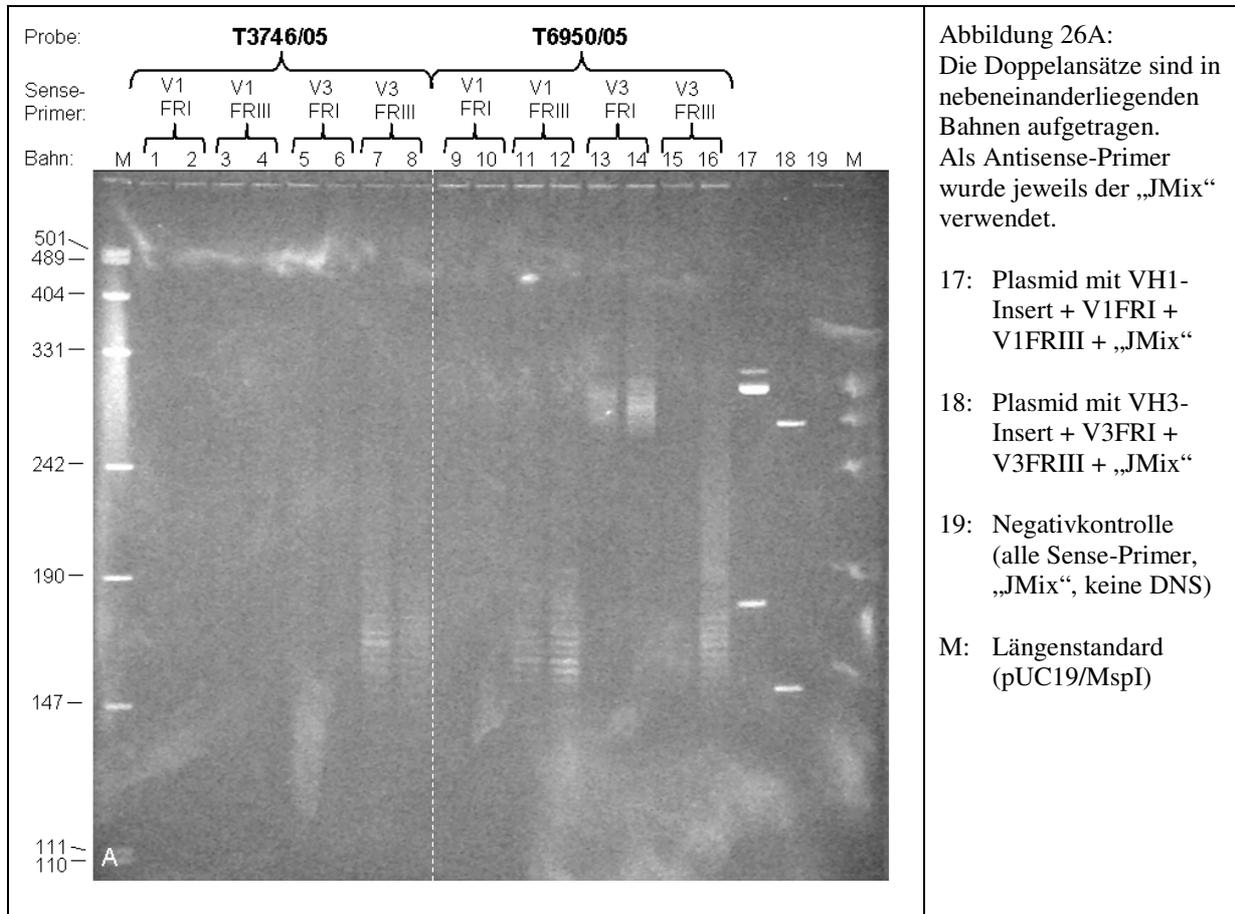
| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|--|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 25A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 25A, Bahn 3 + 4) | 6 bis 8 schwache Banden (Abbildung 25A, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 25B, Bahn 1 + 2) | Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 25A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 25B, Bahn 3 + 4) |

Tabelle 41: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T273/05

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|--|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 24A, Bahn 9 + 10) | Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 24A, Bahn 11 + 12) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 24B, Bahn 5 + 6) | 5 bis 6 nicht reproduzierbare, schwache Banden (Abbildung 24A, Bahn 13) | Nicht reproduzierbares Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 24A, Bahn 16) |

4.3.5.2.3 Fälle T3746/05 und T6950/05

Abbildung 26: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T3746/05 und T6950/05



Ergebnisse

Tabelle 42: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T3746/05

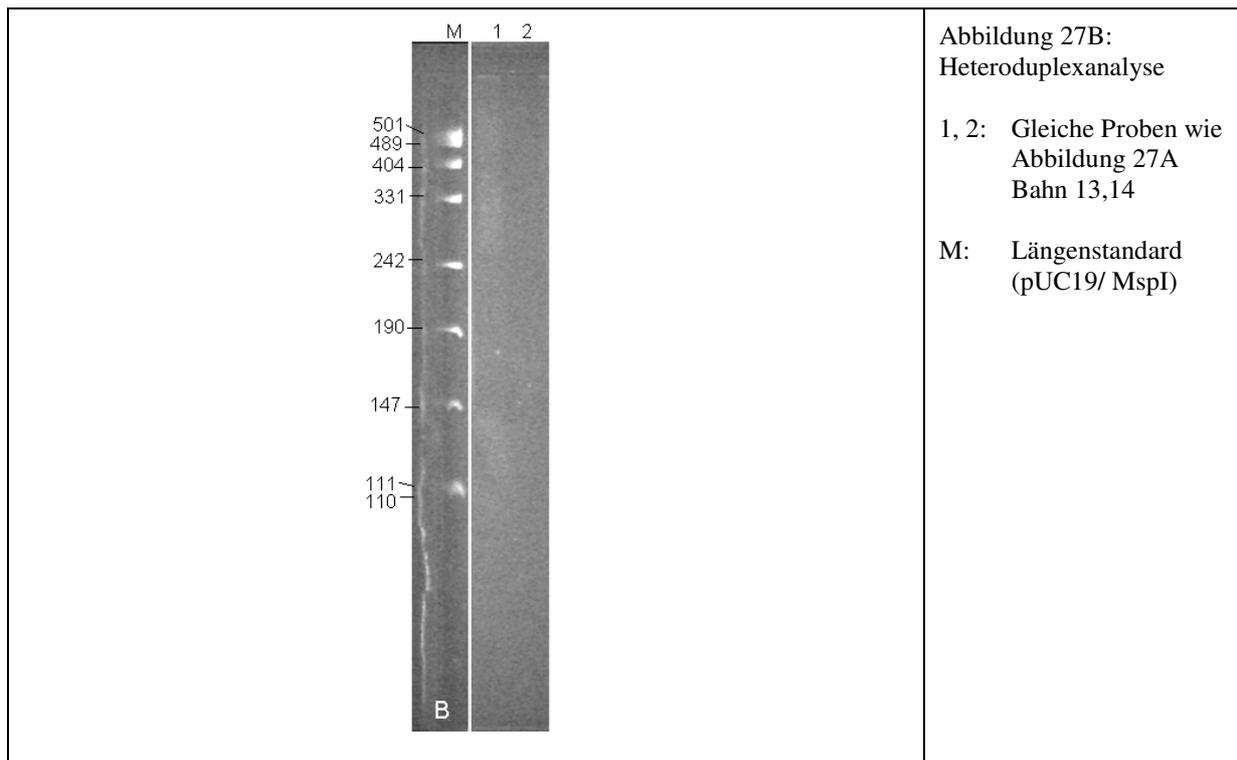
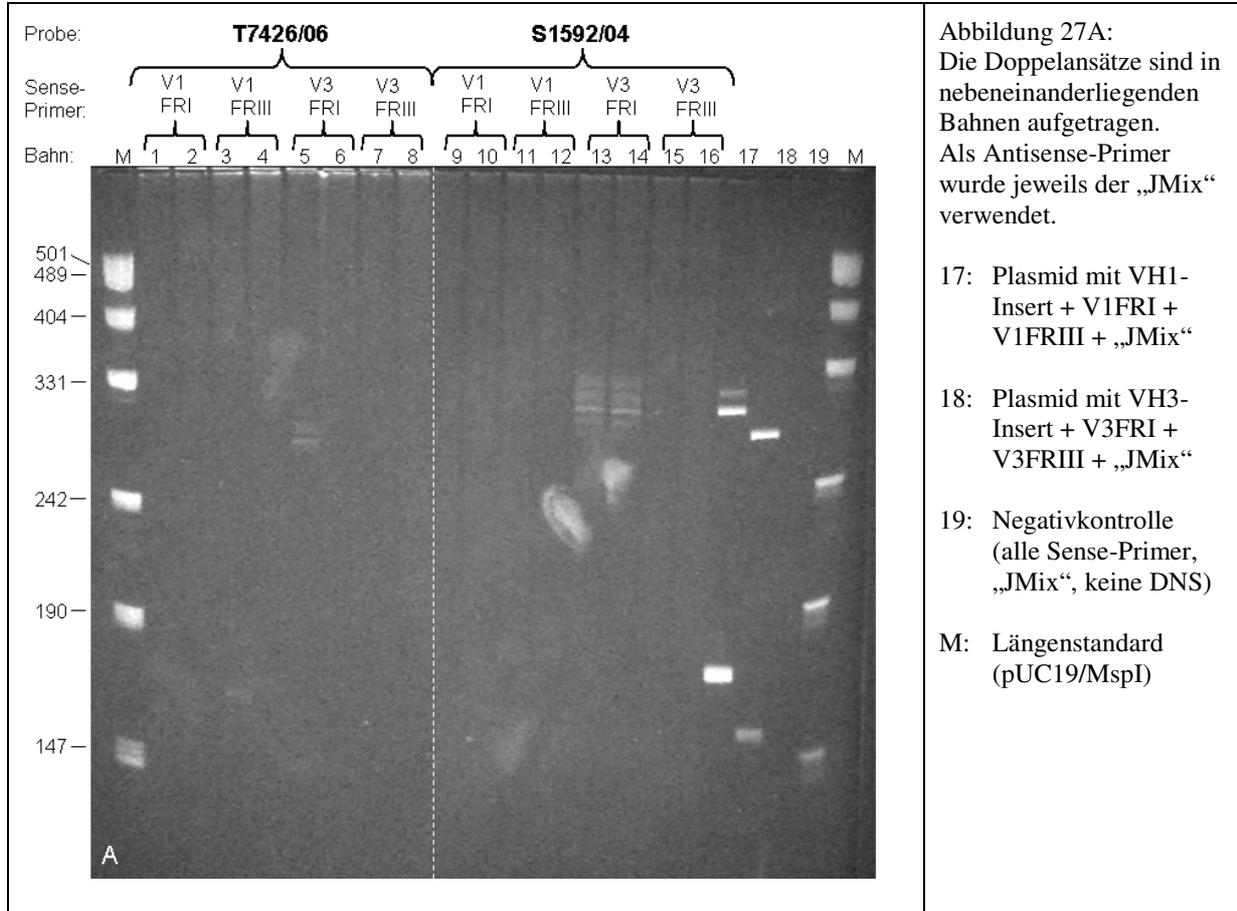
| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|--|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 26A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 26A, Bahn 3 + 4) | Keine Amplifikation. (Abbildung 26A, Bahn 5 + 6) | 5 bis 6 Banden. (Abbildung 26A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 26B, Bahn 1 + 2) |

Tabelle 43: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T6950/05

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|--|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 26A, Bahn 9 + 10) | Leitermuster aus 6 bis 8 Banden, davon einige reproduzierbar (Abbildung 26A, Bahn 11 + 12) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 26B, Bahn 3 + 4) | Unscharfes Leitermuster (Abbildung 26A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 26B, Bahn 5 + 6) | Teilweise reproduzierbares Leitermuster aus 6 bis 8 Banden (Abbildung 26A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.2.4 Fälle T7426/06 und S1592/04

Abbildung 27: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T7426/06 und S1592/04



Ergebnisse

Tabelle 44: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T7426/06

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 3 + 4) | 3 bis 4 nicht reproduzierbare, schwache Banden (Abbildung 27A, Bahn 5 + 6) | Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 7 + 8) |

Tabelle 45: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S1592/04

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|--|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 11 + 12) | Unschärfes Leitmuster mit erhöhter Fluoreszenz im mittleren Abschnitt (Abbildung 27A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unschärfer „Schmier“ (Abbildung 27B, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.2.5 Fälle S345/07 und S348/07

Abbildung 28: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle S345/07 und S348/07

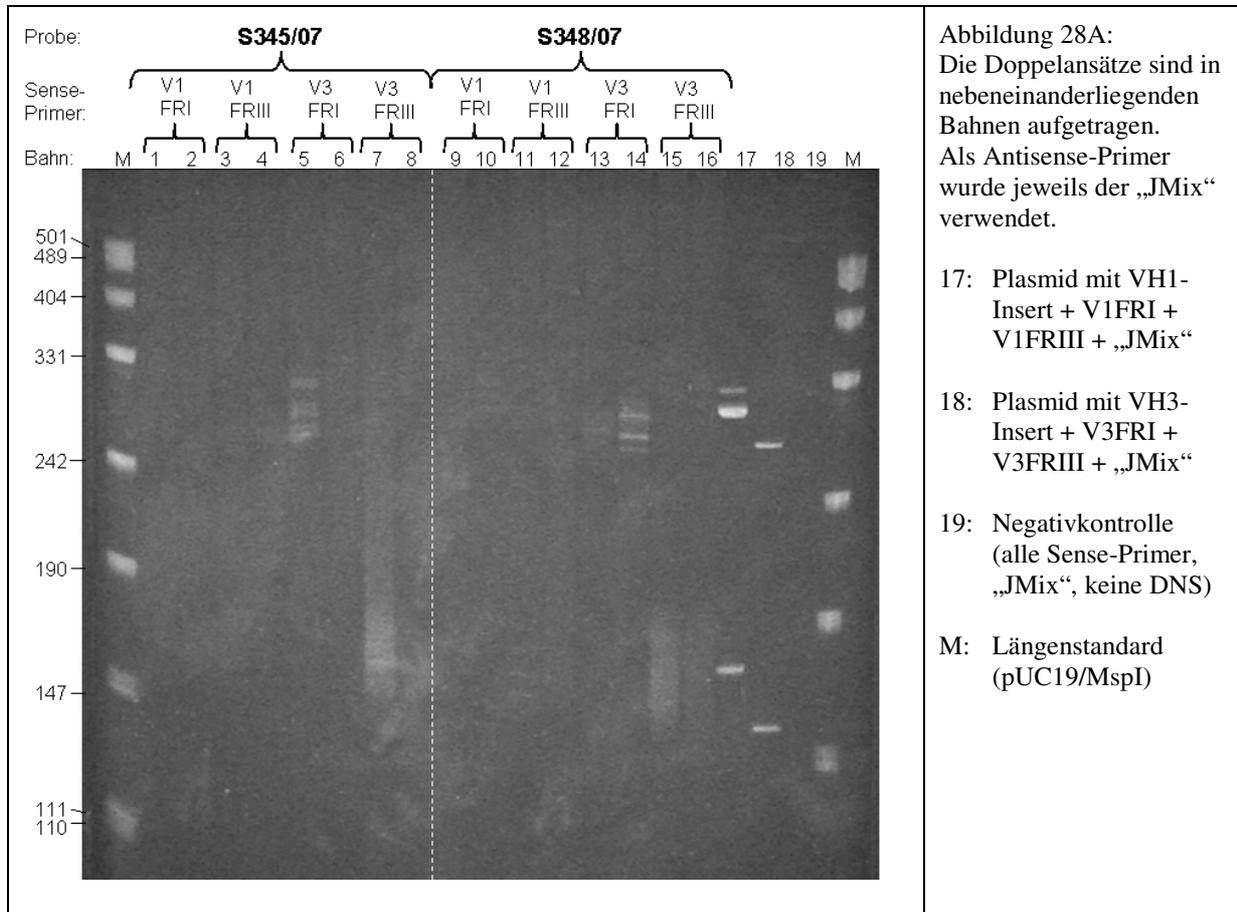


Tabelle 46: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S345/07

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 28A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 28A, Bahn 3 + 4) | 6 bis 7 nicht reproduzierbare schwache Banden (Abbildung 28A, Bahn 5) | Unschärfes, nicht reproduzierbares Leitermuster (Abbildung 28A, Bahn 7 + 8) |

Tabelle 47: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S348/07

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 28A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 28A, Bahn 11 + 12) | 5 bis 6 nicht reproduzierbare schwache Banden (Abbildung 28A, Bahn 13 + 14) | Unschärfer „Schmier“ (Abbildung 28A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.3 T-Zell-Lymphome

4.3.5.3.1 Fälle 1883/94 und S1017/05

Abbildung 29: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 1883/94 und S1017/05

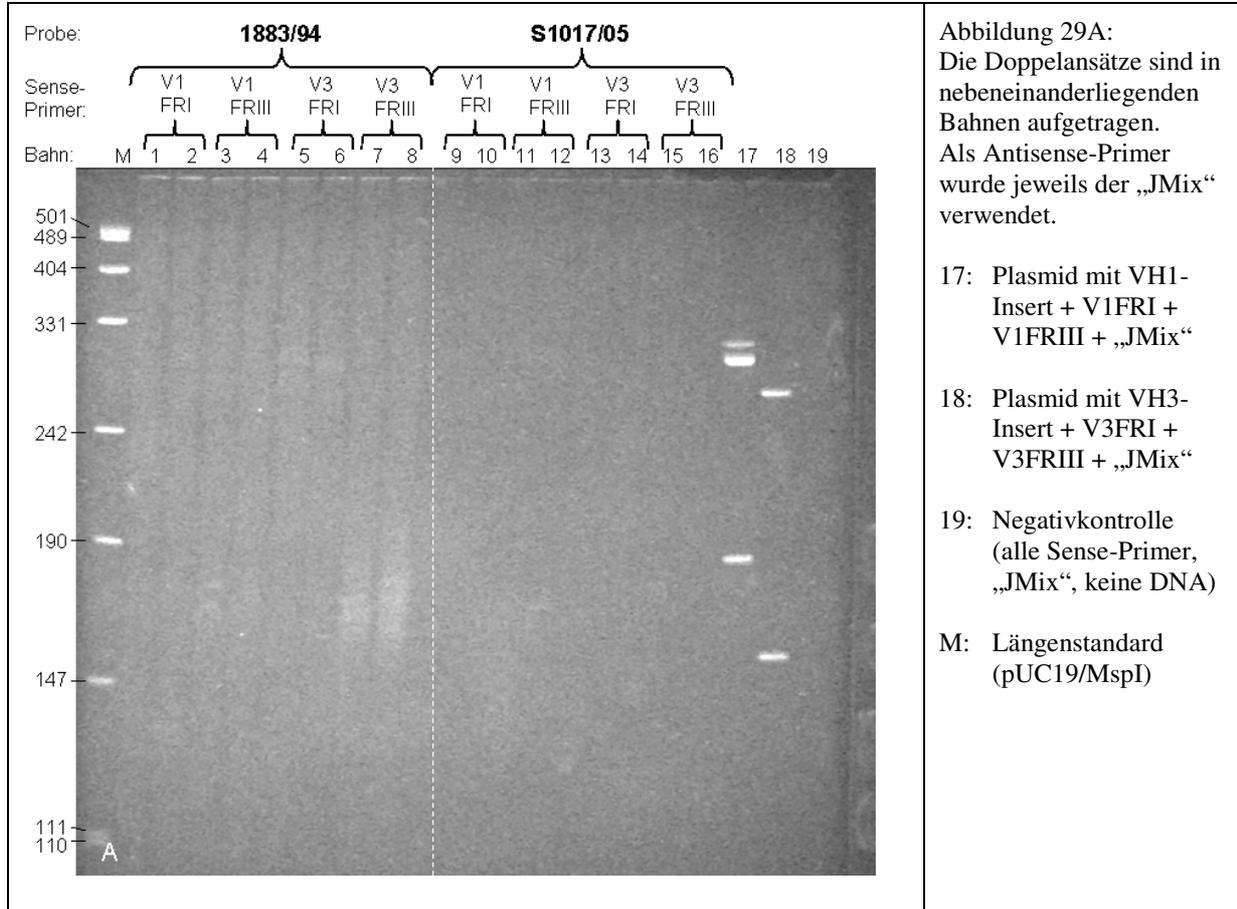


Tabelle 48: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 1883/94

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|--|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 3 + 4) | Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 5 + 6) | Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 29A, Bahn 7 + 8) |

Tabelle 49: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S1017/05

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 11 + 12) | Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 13 + 14) | Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.3.2 Fälle 2155/90 und 280/92

Abbildung 30: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 2155/90 und 280/92

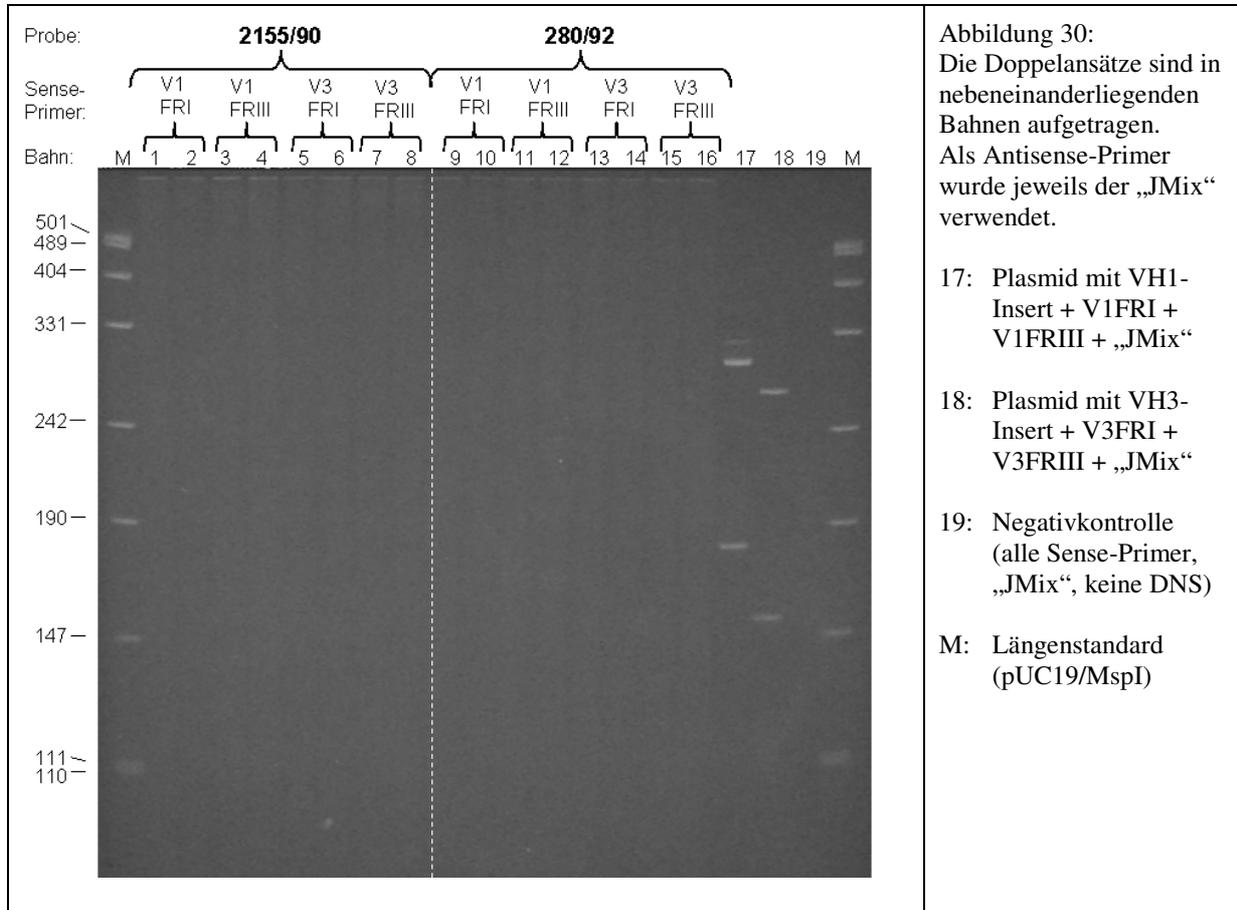


Tabelle 50: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 2155/90

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 3 + 4) | Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 5 + 6) | Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 7 + 8) |

Tabelle 51: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 280/92

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 11 + 12) | Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 13 + 14) | Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.3.3 Fälle 93/93 und 1989/98

Abbildung 31: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 93/93 und 1989/98

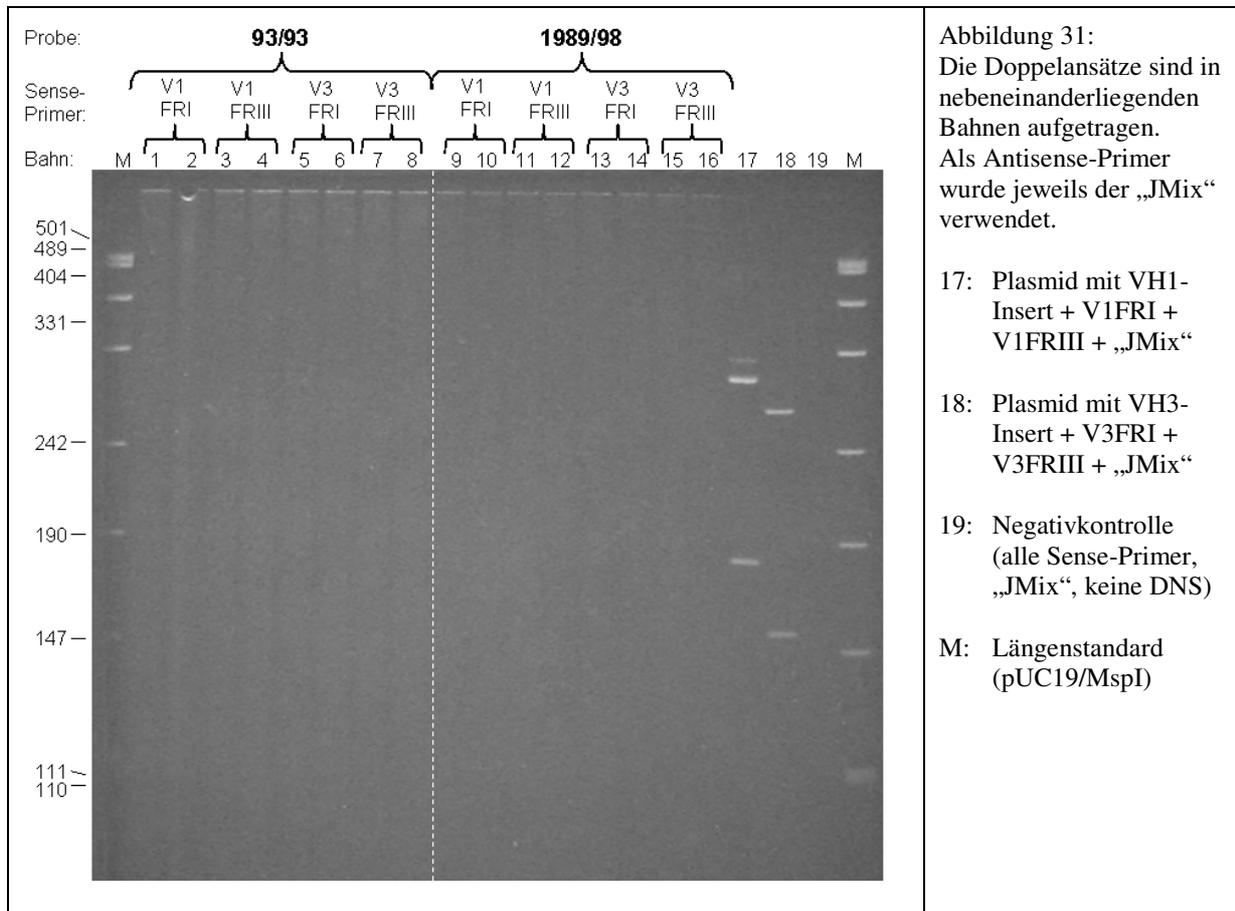


Tabelle 52: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 93/93

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 3 + 4) | Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 5 + 6) | Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 7 + 8) |

Tabelle 53: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 1989/98

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 11 + 12) | Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 13 + 14) | Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.3.4 Fälle 1379/99 und 1945/90

Abbildung 32: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 1379/99 und 1945/90

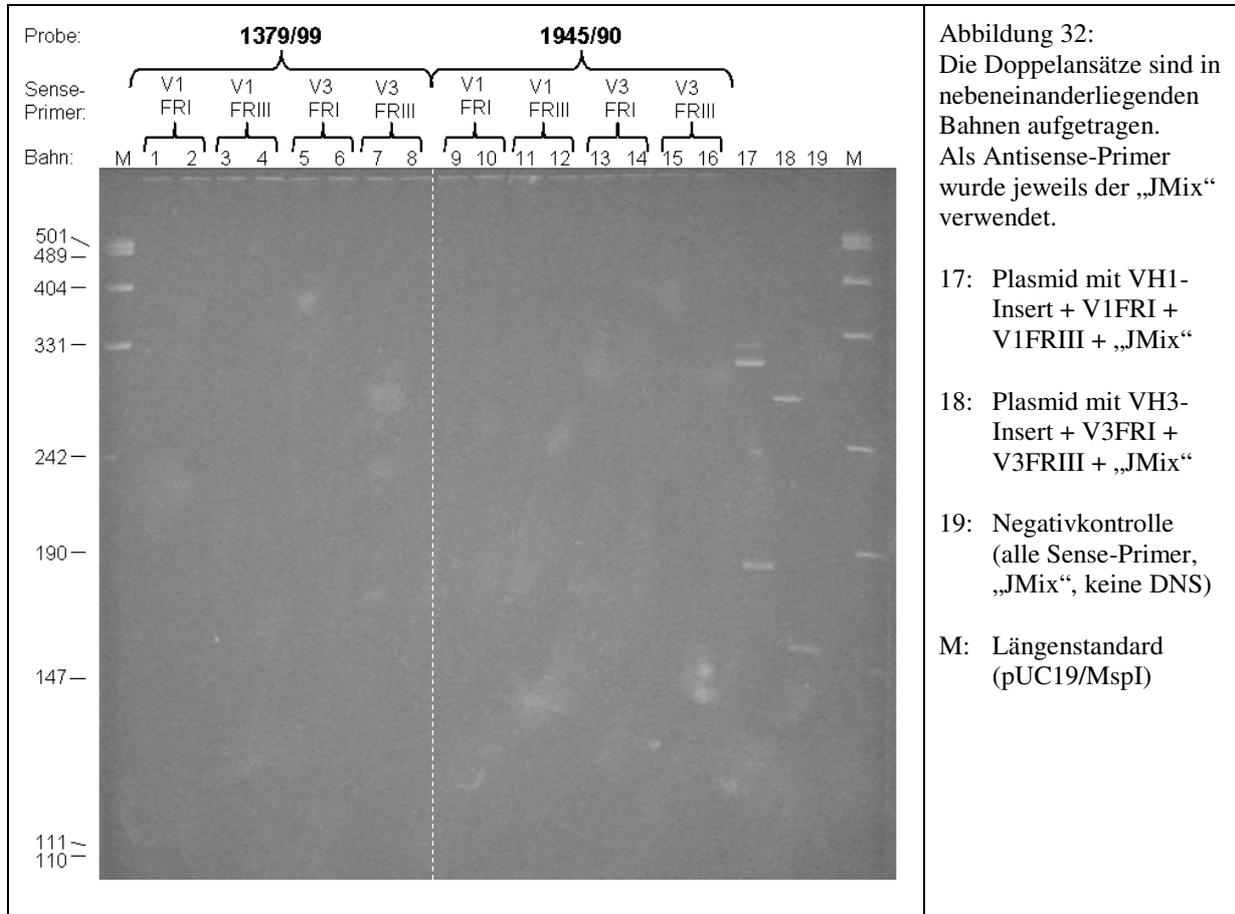


Tabelle 54: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 1379/99

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 3 + 4) | Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 5 + 6) | Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 7 + 8) |

Tabelle 55: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 1945/90

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 11 + 12) | Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 13 + 14) | Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 15 + 16) |

4.3.5.3.5 Fälle 217/94 und 15/96

Abbildung 33: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 217/94 und 15/96

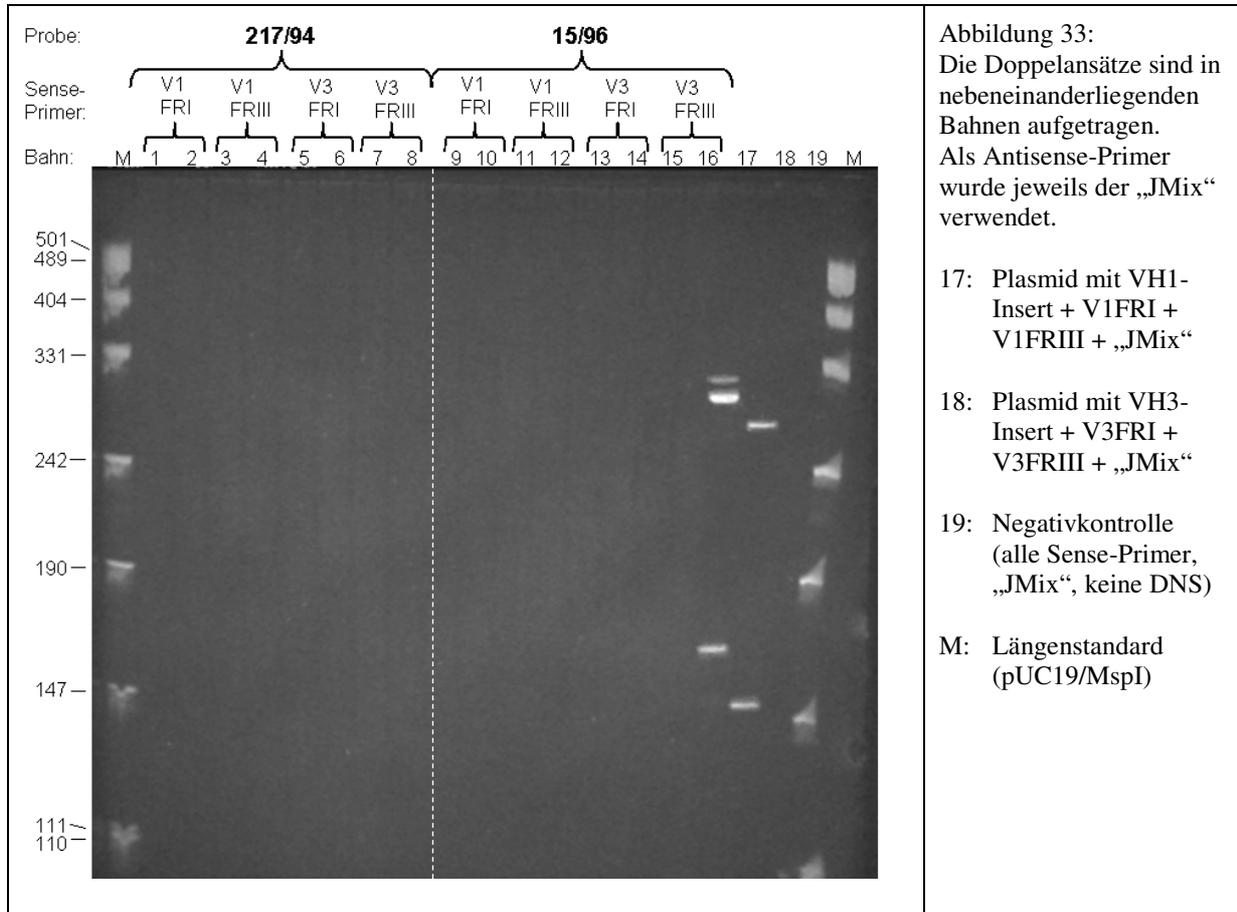


Tabelle 56: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 217/94

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|---|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 1 + 2) | Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 3 + 4) | Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 5 + 6) | Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 7 + 8) |

Tabelle 57: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 15/96

| Amplifikation der VH1-Familie | | Amplifikation der VH3-Familie | |
|--|---|---|---|
| Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer | Mit FR1-spezifischem Primer | Mit FR3-spezifischem Primer |
| Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 9 + 10) | Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 11 + 12) | Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 13 + 14) | Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 15 + 16) |

4.3.6 Amplifikation der VH1-Positivkontrolle in getrennten Ansätzen

In Abbildung 18 bis Abbildung 33 kann bei der Positivkontrolle der VH1-Familie oberhalb der erwarteten Bande für die Amplifikation mit dem gegen die Framework 1-Region gerichteten Primer eine zusätzliche schwache Bande beobachtet werden (s. z.B. Abbildung 18A, Bahn 17).

Zur Überprüfung inwieweit Interaktionen der Amplifikate miteinander eine Rolle bei der Entstehung dieser zusätzlichen Bande spielen, wurde das Plasmid mit dem Insert aus der VH1-Familie mit beiden Sense-Primern zusammen und den jeweiligen Sense-Primern im Einzelansatz unter den in Absatz 3.9.2.1 beschriebenen Bedingungen amplifiziert.

Abbildung 34: Ergebnis der Amplifikation der Positivkontrolle der VH1-Familie

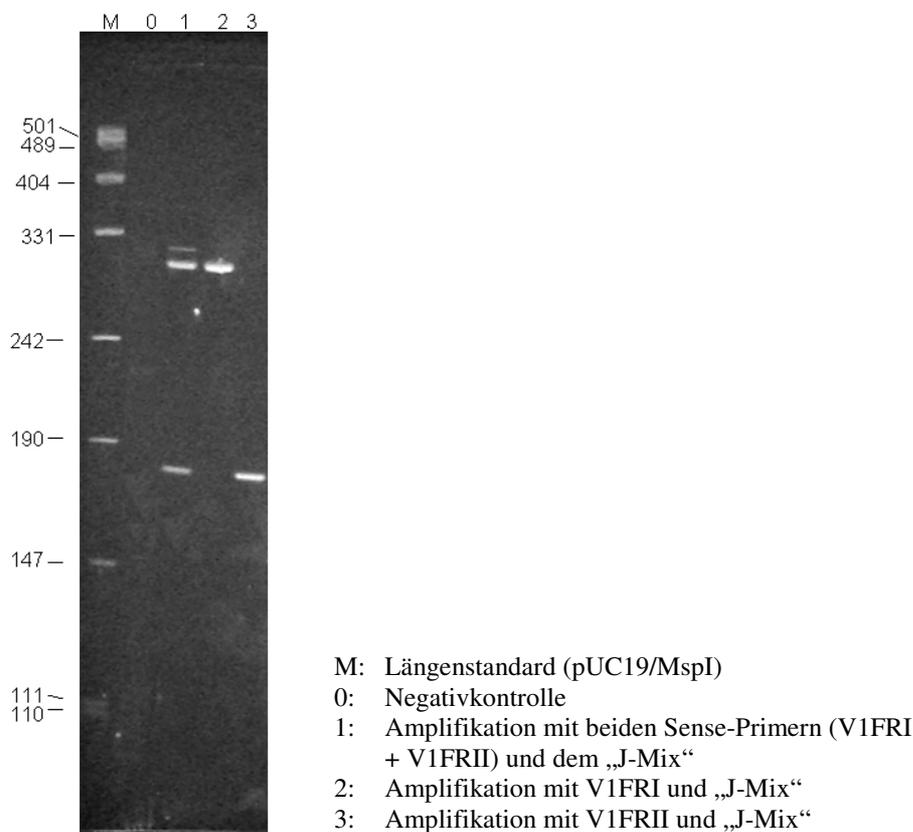


Abbildung 34 zeigt, dass die zusätzliche Bande bei Amplifikation der Primer im Einzelansatz nicht mehr vorhanden ist.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, für die Katze ein PCR-gestütztes diagnostisches System zur Abgrenzung neoplastischer B-Zell Populationen von reaktiven lymphatischen Geweben zu entwickeln. Da das Genom der Katze noch nicht vollständig entschlüsselt und charakterisiert ist, konnte für die Entwicklung der Primer für das diagnostische System nur bedingt auf bestehende Sequenzen zurückgegriffen werden. Die optimale Grundlage für die Entwicklung eines bestmöglichen Systems wäre die genomische Charakterisierung der entsprechenden Gene im Vergleich mit Expressionsanalysen der einzelnen Varianten. Da dies aber die Grenzen der vorliegenden Arbeit weit übersteigen würde, mussten als praktikablere Lösung möglichst viele exprimierte Gene analysiert und auf Grundlage dieser Sequenzen die diagnostischen Primer erstellt werden.

5.1 Analyse der schweren Kette des felines Immunglobulins

Basis für die Analyse der variablen Region der schweren Kette des felines Immunglobulins war die veröffentlichte Sequenz der konstanten Region der schweren Kette des felines IgM (Cho et al., 1998). Bei Analysen der Gene der variablen Region des felines TCR- γ zeigte sich, dass die in derselben Arbeit veröffentlichte Sequenz der konstanten Region des felines TCR- γ nicht ohne weiteres nachvollziehbar war (Weiss, 2007). Die Überprüfung der Sequenz der konstanten Region der schweren Kette des felines IgM am eigenen biologischen Material ergab jedoch eine 99%ige Übereinstimmung mit den veröffentlichten Sequenzen, so dass diese daraufhin als weitere Basis für die Analyse verwendet werden konnten.

5.1.1 Analyse der Gene der schweren Kette mit der SMARTTM RACE-Technik

Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass cDNA hergestellt werden kann, die der vollen Länge der RNS-Matrize entspricht. Dies ist für die Suche nach unbekanntem Gensequenzen vorteilhaft. Da das „SMARTTM RACE Amplification Kit“ die MarathonTM cDNA-Technologie (Chenchik et al., 1995) mit der SMART-Methode (Switch Mechanism At 5' End of RNA Transcript) verbindet, ist es möglich, hochqualitative cDNA aus geringen Mengen Gesamt-RNS inklusive der 5' und 3' Enden (Rapid Amplification of cDNA Ends = RACE) zu amplifizieren.

Die SMARTTM RACE-Technik zeigte zunächst sehr gute Ergebnisse, um die weiter in 5'-Ende gelegenen Abschnitte zu amplifizieren. Durch die Erweiterung der bekannten Sequenz der schweren Kette und die daraus resultierenden Primer gelang die Analyse des Anfangsteils der variablen Region. Die Methode wurde nach weiteren Versuchen aufgegeben, weil lediglich ein Klon mit genügend großem Insert erzeugt werden konnte. Dieses Problem kann im Ausgangsmaterial begründet sein. RNS unterliegt durch die Omnipräsenz von RNasen sehr schnell der enzymatischen Spaltung. Dies führt dazu, dass im Ausgangsmaterial auch unvollständige, kleine mRNA-Moleküle vorliegen. Gelangt bei der SMARTTM RACE-Technik die Polymerase an das 5'-Ende der mRNA, entfaltet sie ihre terminale Transferaseaktivität unabhängig davon, ob dieses Ende durch Spaltung entstanden ist oder das ursprüngliche Ende der mRNA darstellt.

Dies bedeutet, dass als Grundlage der folgenden Amplifikation ein Gemisch aus größeren und kleineren cDNA-Fragmenten vorliegt, die alle die Sequenz des SMART IITM Oligonukleotids beinhalten und amplifiziert werden können. Dies konnte beispielsweise an der Sequenz des Klons R3.1 (vgl. Abbildung 8) gezeigt werden, der eine unvollständige Version der variablen Region der schweren Kette mit integriertem SMART IITM Oligonukleotid am 5'-Ende enthält. Sowohl bei der Amplifikation in der PCR als auch bei der Transformation im Zuge der Klonierung werden kleinere DNS-Moleküle bevorzugt, was die geringe Zahl an ausreichend großen Inserts in den erzeugten Klonen erklären könnte.

5.1.2 Analyse des NCBI Trace Archivs

Das NCBI Trace Archiv ist eine Datenbank mit unsortierten Ergebnissen aus Genom-Projekten verschiedener Spezies. Zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit waren für die Spezies *Felis catus* 10.301.275 Einträge gespeichert. Mit dem BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool)-Programm ist es möglich, die Einträge des Trace Archivs gezielt nach bestimmten Sequenzen zu durchsuchen. Aufgrund der hohen Zahl von Einträgen, die für die Katze in dieser Datenbank vorhanden sind, kann angenommen werden, dass ein nicht unbeträchtlicher Teil des Genoms der Katze in Form von unsortierten Rohdaten vorliegt. Die Vollständigkeit bleibt jedoch ungewiss, so dass die Ergebnisse der Analyse nur als Anhaltspunkt für die tatsächliche Situation in vivo dienen können.

Grundlage der Analyse waren die Ergebnisse, dass die konstanten Bereiche des felines B-Zell-Rezeptors zu 60-80% mit den humanen Genen übereinstimmen (Cho et al., 1998). Darauf aufbauend entstand die Hypothese, dass eine ähnlich große Übereinstimmung mit den konservierten Bereichen der variablen Region bestehen könne oder zumindest eine im

Detektionsbereich des BLAST[®]-Programms liegende. Mit den Sequenzen der Mitglieder der humanen VH-Familien als Suchsequenzen konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Suche im NCBI Trace Archiv Sequenzen zweier den humanen VH-Familien homologer feliner VH-Familien vorlagen (VH1 und VH3). Hierbei war auffällig, dass die Mehrheit der gefundenen Traces homolog zu humanen VH3-Familie war, wohingegen weniger Traces eine Homologie zur humanen VH1-Familie zeigte. Betrachtet man die Häufigkeit der Mitglieder der humanen VH-Familien, so zeigt sich, dass hier die VH3-Familie mit 52 Genen die zahlenmäßig stärkste Familie bildet, gefolgt von der VH1-Familie mit 17 Mitgliedern (Lefranc, 2001). Die Ähnlichkeit in der Häufigkeitsverteilung der VH-Familien zwischen Mensch und gefundenen Traces der Katze kann ein Hinweis auf eine mögliche Ähnlichkeit der beiden Spezies in Bezug auf die Häufigkeit der Gene der einzelnen Familien auf genomischer Ebene sein. Allerdings gilt dies nur unter dem Vorbehalt der Ungewissheit über die Vollständigkeit des Katzengenoms in den Traces des NCBI-Archivs und der Möglichkeit der Überlappung und Mehrfacherfassung bestimmter Abschnitte des Genoms in verschiedenen Traces.

5.1.3 Leader-PCR

Mit der Identifizierung der Leadersequenzen in den Traces konnten Primer entwickelt werden, die spezifisch für die einzelnen Familien waren und gleichzeitig in einem unmittelbar vor den gesuchten Genen der variablen Region gelegenen Abschnitt binden sollten. Mit Hilfe dieser Primer konnten Klone mit Inserts erzeugt werden, die die vollständige Sequenz der Gene des variablen Anteils der schweren Kette enthielten. Gegen die Leader-Region gerichtete Primer wurden auch in der Humanmedizin erfolgreich für die Analyse des Repertoire der VH-Familien eingesetzt (Campbell et al., 1992). Ein Einsatz dieser Primer zum Nachweis von Monoklonalität von Lymphomen ist möglich und wurde auch in der Humanmedizin an genomischer DNS, isoliert aus B-Zell-Lymphom-Zelllinien, angewandt (Inghirami et al., 1993). Der Einsatz von weiter in Richtung 3'-Ende der DNS gelegenen Primern hat jedoch den Vorteil, dass die erwarteten Amplifikate kleiner sind. Dies ist in zweierlei Hinsicht wichtig. Einerseits müssen für größere Amplifikate größere Ausgangsmoleküle vorliegen, d.h. die DNS-Qualität muss besser sein. Auf der anderen Seite ist die Geschwindigkeit, mit der sich DNS-Moleküle bei der Elektrophorese vorwärts bewegen umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Basenpaaranzahl (Helling et al., 1974). Daher ist die Trennungsschäfe bei gegebener Elektrophoresezeit zwischen zwei DNS-Molekülen abhängig von ihrem Größenverhältnis zueinander. Das

bedeutet, dass sich geringe Längenunterschiede bei der Trennung kleinerer Fragmente schneller bemerkbar machen, als bei großen Fragmenten.

5.1.4 Analyse mit der CapFishing™ Technik

Die neun mit der CapFishing™-Methode gewonnenen Inserts wurden alle der VH3-Familie zugeordnet. Mitglieder der VH1-Familie konnten mit dieser Methode nicht detektiert werden. Die CapFishing™-Methode war bei der Amplifikation der V-Region ausgehend von der bekannten C-Region allerdings erfolgreicher als die SMART™ RACE-Technik.

5.2 Diagnostikprimer

Der erste Schritt im Zuge des Genarrangements der schweren Kette ist die Kombination eines D-Segments mit einem J-Segment. Daher wäre die sensibelste Methode für die Detektion von Immunglobulinrearrangements für die molekulare Diagnostik auch unreifer B-Zell-Neoplasien eine Bindung von Primern im Bereich der D-Region (Diaz-Cano, 1996). Allerdings bildet dieser Bereich einen Großteil der dritten hypervariablen Region. Durch die Variabilität ist diese Region für die Bindung von Primern, die möglichst viele unterschiedliche IgH-Gensequenzen erfassen sollen, ungeeignet. Geeigneter für solche Primer sind die Framework-Regionen. Klonalitätsanalysen im humanmedizinischen Bereich, aber auch Arbeiten über die Amplifikation der Immunglobulingene des Hundes zur molekularen Diagnostik zielen auf diese Bereiche (Burnett et al., 2003; Segal et al., 1994a; Segal et al., 1994b).

Die auf Grundlage der gewonnenen Sequenzen der schweren Kette des felines Immunglobulins entwickelten Sense-Primer wurden so gewählt, dass sie für jede Familie in Bereiche großer Homologie zwischen den einzelnen Sequenzen binden. Für jede Familie wurden zwei familienspezifische Primer als Sense-Primer gewählt. Einer der Primer wurde für die Bindung im Bereich der ersten Framework Region, der zweite für die Bindung im Bereich der dritten Framework Region gewählt. Dies entspricht dem in der Literatur als gut zur Aufspürung von Immunglobulin-Rearrangements erachtetem Vorgehen (Deane und Norton, 1990, 1991; Diaz-Cano, 1996; Inghirami et al., 1993). Der Grund liegt vor allem darin, dass mit dem Einsatz von zwei verschiedenen Sense-Primern pro Familie das Risiko verringert werden kann, dass eine Probe aufgrund der fehlenden Bindungsfähigkeit eines Primers nicht amplifiziert wird.

Die Antisense-Primer wurden so gewählt, dass sie einerseits möglichst alle bei der Analyse der Gene des feline Immunglobulins gefundenen Sequenzen erfassen, gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass für den Fall einer Bindung von mehr als einem Primer die Position der einzelnen Primer in der J-Region exakt übereinstimmt. Dadurch konnte eine Anwendung der Primer als Primer-Mischung in der Multiplex-Reaktion gewährleistet werden und die Anzahl der notwendigen PCR-Ansätze pro Probe von 24 auf 8 gesenkt werden.

5.2.1.1 Vergleich mit dem bestehenden Diagnostiksystem

In der von Werner et al. (2005) veröffentlichte Studie zur molekularen Klonalitätsdiagnostik von B-Zell-Lymphomen bei der Katze wurden 24 mit der SMART™ RACE-Technik gewonnene Sequenzen der schweren Kette des feline Immunglobulins analysiert. Die Autoren fanden bei allen 24 Sequenzen eine große Homologie im Bereich der Framework-Regionen und entwickelten auf der Basis dieser Sequenzen zwei Sense-Primer im Bereich der Framework-Region 2 und der Framework-Region 3 (FR2: 5'-CCAGGCTCCAGGGAAGGG-3' und FR3: 5'-TCCAGAGACAACGCCAAGAAC-3').

Vergleicht man die in der Studie angegebenen Proteinsequenzen mit der Übersetzung der in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen, so wird deutlich, dass sich die 24 von Werner et al. (2005) gefundenen Sequenzen der VH3-Familie zuordnen lassen. Abbildung 35 zeigt den Vergleich zwischen der Übersetzung des Klons TR-FIG-17 von Werner et al. (2005) mit den Proteinsequenzen der Klone LV3.1.13 (VH3) und LV1.1.33 (VH1).

Abbildung 35: Vergleich der Proteinsequenz von Werner et al. (2005) mit der Übersetzung von eigenen VH1 und VH3-Sequenzen

| | | | |
|-----------|-----|--|-----|
| TR-FIG-17 | 1 | MEFVLGWVFLVTLTKGVQCDVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVASGFTFSSYTMNWVRQAP | 60 |
| LV3.1.13 | 1 | MEFVLGWVFLVTLTKGVQCDVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCAASGFTFSNYMSWVRQAP | 60 |
| LV1.1.33 | 1 | MDWSWRILYLVAVATGVHSQVLLVQSGAEVRKPGASVKIFCKASGYSETDYMHWLRQAP | 60 |
| TR-FIG-17 | 61 | GKGLQEVAYIRYNGGNIYYADSVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLKTED-ATYYCAREGN | 119 |
| LV3.1.13 | 61 | GKGLQVVAWINRNGQDIWYADSVKGRFTISRDNKNTLDLLMNSLKTEDTATYYCARSGT | 120 |
| LV1.1.33 | 61 | EQGLEWMGRIDPEDGSTSYAQKFGRLTLTADTSTNTAYMELSSLRSADTAMYYCARLLY | 120 |
| TR-FIG-17 | 121 | DVDYADDYWGQALVTVSSETSSRPNLFPLITC | 152 |
| LV3.1.13 | 121 | TIATSYVYWGQALVTVSSETSSRPNLFPLITC | 153 |
| LV1.1.33 | 121 | --RGYFDYWGQALVTVSSETSSRPNLFPLITC | 151 |

Dementsprechend zeigen die von Werner et al. (2005) entwickelten Primer eine 100%ige Übereinstimmung mit den Sequenzen der VH3-Familie jedoch nur eine 67%ige („FR2“), respektive 57%ige („FR3“) Übereinstimmung mit den Sequenzen der VH1-Familie (s. Abbildung 36)

Abbildung 36: Vergleich der Primersequenzen von Werner et al. (2005) mit Sequenzen der VH1 und VH3-Familie

| | | |
|---------------------------|---|----|
| Primer „FR2“ | -----CCAGGCTCCAGGGAAGGG----- | 18 |
| LV3.1.33_FR2 | CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTTCGCATAT | 46 |
| LV1.1.33_FR2 | CTGGTTGCGACAGGCTCCTGAACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGA | 46 |
| Primer „FR3“ | -----TCCAGAGACAACGCCAAGAAC----- | 21 |
| LV3.1.33 FR3 (Ausschnitt) | GGGCCGATTACCCGTCCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTC | 45 |
| LV1.1.33 FR3 (Ausschnitt) | GGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTA | 45 |

Trotz der nicht 100%igen Übereinstimmung der Primer von Werner et al. (2005) mit den Sequenzen der VH1-Familie kann es jedoch möglich sein, dass schon die bestehende Übereinstimmung ausreicht, um Mitglieder der VH1-Familie zu amplifizieren.

Da in der Studie von Werner et al. (2005) lediglich die Übersetzung in die Proteinsequenzen der dort analysierten Gensequenzen aufgeführt ist, ist ein direkter Vergleich mit den Nukleotidsequenzen nicht möglich.

Die Feststellung, dass alle von Werner et al. (2005) mit der SMARTTM RACE-Technik erzeugten Sequenzen der schweren Kette der VH3-Familie zuzuordnen sind, stimmen mit den in dieser Arbeit gefundenen Verhältnissen überein. Sowohl mit der SMARTTM RACE-Technik, als auch mit der CapFishingTM-Methode konnten lediglich Sequenzen von Mitgliedern der VH3-Familie erzeugt werden. Beide Methoden benutzen mRNA als Ausgangsmaterial, was auf eine stärkere Expressierung der VH3-Familie hinweisen kann.

5.3 Horizontale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zur Erzeugung von Gelen für die horizontale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese weitestgehend gleichartige Methode wurde von Izzo et al. (2006) beschrieben. Unterschiede liegen jedoch im Material des Gießblockes und der Erzeugung der Gele selbst. Für den in dieser Arbeit verwendeten Gießblock wurde Aluminium als Material gewählt. Aluminium bietet im Vergleich zu Plexiglas bedeutend bessere Formbeständigkeit. Im Laufe von Vorversuchen zeigte sich, dass gerade größere Gele zum Anhaften am Gießblock neigen. Daher war eine Silikonisierung des Blockes vorteilhaft, die zu einer besseren Lösung des polymerisierten Gels von der so behandelten Oberfläche führt (Sambrook et al., 1989). Für die Silikonisierung wird die aufgetragene Lösung ca. eine

Stunde bei 120°C getrocknet. Dieses Verfahren muss regelmäßig erneut durchgeführt werden. Für die dadurch entstehende wiederkehrende Erhitzung und Abkühlung des Blockes ist Aluminium besser geeignet als Plexiglas. In der Studie von Izzo et al. (2006) wird die Glasplatte für die Erzeugung der Gele auf Ober- und Unterkante des Gießblockes aufgelegt. Durch die in dieser Arbeit beschriebene Methode, dem Auflegen der Glasplatte auf die Unterkante des Blockes und die Stege für die Taschen, konnte die Gefahr des Einschlusses von Luftblasen deutlich verringert werden.

5.4 DNS-Isolierung und Qualität der gewonnenen DNS

DNS unterliegt nach der Entnahme von Geweben aus lebenden Organismen oder dem Tod eines Organismus der Degradation durch autolytische und fäulnisbedingte Prozesse (Cina, 1994). Daher ist der Frischezustand des Gewebes für die Qualität der DNS entscheidend. Die gleichen Vorgänge, die zur Degradation der DNS führen, betreffen auch die übrigen Zellbestandteile und führen daher auch zu morphologischen Veränderungen der Zelle. Um diesen morphologischen Veränderungen entgegenzuwirken, kann das Gewebe fixiert werden. Diese Fixierung geschieht bei Gewebe, das zur histologischen Untersuchung bestimmt ist, im Regelfall in einer 10%igen Formaldehydlösung (Srinivasan et al., 2002). Jedoch zeigt die DNS, die aus formalinfixiertem Gewebe isoliert wird, deutliche Qualitätsminderung (Serth et al., 2000), wobei die Dauer der Fixation negativ die Qualität beeinflusst (Ferrer et al., 2007). Formalin interagiert unter anderem mit der DNS, indem es zu einer Kreuzvernetzung zwischen Proteinen und den Nukleinsäuren führt (Douglas und Rogers, 1998).

Eine der häufigsten Methoden bei der Isolierung von DNS aus formalinfixiertem Gewebe ist der Einsatz von Proteinasen zur Lösung der Quervernetzung. Dieses Prinzip kam auch bei den formalinfixierten Proben in dieser Arbeit zum Einsatz. Für die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben mussten die Proben zuvor entparaffiniert werden. Bei dem Puregene[®] DNA Purification Kit wird dies mit Xylol und Alkohol durchgeführt. Die anschließende Extraktion der DNS wird durch Proteinfällung mit folgender Fällung der DNS erreicht. Jedoch war hier die Anzahl von Proben mit qualitativ ausreichender DNS, überprüft durch die Amplifizierung des 300 bp- und des 100 bp-großen Fragmentes, nicht zufriedenstellend. Daher wurde eine zweite Methode der DNS-Isolierung angewandt, die eine Kombination aus zwei veröffentlichten Protokollen darstellt (Coombs et al., 1999; Shi et al., 2004). Shi et al. (2004) schlagen zur schnellen und effektiven Extraktion eine Wärmebehandlung der Paraffinproben bei 100°C in Natronlauge vor, da unter sauren

Bedingungen die DNS bei der Extraktion zerstört wird. Die optimale, in der Studie festgestellte Konzentration der Natronlauge war 0,1 M.

Coombs et al. (1999) benutzten eine Erwärmung der Proben auf 90°C unter Zugabe von 0,5% Tween[®] 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat), einem nichtionischem Tensid, welches in Konzentrationen von 0,05% bis 0,5% Säugetierzellen lysiert. An die Wärmebehandlung schloss sich eine vergleichsweise kurze (3 Stunden) Behandlung der Proben mit Proteinase K an. Die Extraktion erfolgte unter Zugaben von Chelex 100 und Chloroform. Chelex 100 ist ein Styren-Divinylbenzen-Kopolymer, das Iminodiazetationen beinhaltet, welche als komplexbildende Gruppen fungieren und eine hohe Aktivität für polyvalente Metallionen aufweisen. Chelex 100 bindet DNS und kann so zur Extraktion von genomischer DNS benutzt werden (Walsh et al., 1991). Das Protokoll von Coombs et al. (1999) wurde dahingehend modifiziert, dass die 0,5%ige Tween[®] 20-Lösung mit 0,1 M Natronlauge als Lösungsmittel angesetzt wurde und die Temperatur für die Hitzebehandlung auf 100°C erhöht wurde. Auch wurde die von Coombs et al. (1999) vorgeschlagene Dauer der Hitzebehandlung von 10 Minuten auf die von Shi et al. (2004) benutzten 20 Minuten verlängert.

Mit der modifizierten Hitzebehandlung konnte durch das Wegfallen der Übernacht-Inkubationen, welche bei der Extraktion mit dem Puregene[®] DNA Purification Kit notwendig sind, eine Verkürzung der Prozedurdauer von insgesamt ca. 3 Tagen auf wenige Stunden erreicht werden.

5.5 Limitierung der Klonalitätsanalyse von B-Zell-Lymphomen mit der PCR

5.5.1 Falsch negative Resultate

Ein großes Limit der Klonalitätsdiagnostik von B-Zell-Lymphomen mit der PCR liegt in der Möglichkeit, dass eine vorhandene monoklonale Population nicht von dem Primersystem erkannt wird. Im Bereich der Humanmedizin ist dies bei ca. 30% der Lymphome der Fall (Diss et al., 2002). Dies kann auf mehreren grundsätzlichen Mechanismen beruhen (Algara et al., 1993; Medeiros und Carr, 1999). Ein Problem liegt in dem Einsatz der Consensus-Primer und der familienspezifischen Primer. Diese Primer sind entwickelt, um möglichst viele Sequenzen zu binden. Im Umkehrschluss passen sie auf die einzelnen Sequenzen nicht absolut perfekt, so dass einzelne Sequenzen unter Umständen nicht erkannt werden, d.h. hier der Primer nicht bindet (Medeiros und Carr, 1999; van Dongen et al., 2003). Bei der Katze kommt hinzu, dass mit den in dieser Arbeit und in der Studie von Werner et al. (2005)

gefundenen Varianten das Repertoire der Gene der schweren Kette mit großer Sicherheit nur unvollständig abgedeckt wird. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass einige lymphatische Neoplasien a priori von den bestehenden Primersystemen nicht erkannt werden können. Eine zweite Ursache für eine fehlende Bindung der Primer liegt in der somatischen Hypermutation. Da hierbei auch die dritte Framework-Region betroffen ist (Shapiro et al., 1999), können die hierbei entstehenden Punktmutationen auch die Bindungsstelle des FR3-Primers betreffen und die Bindungsfähigkeit des Primers herabsetzen oder eine Bindung vollständig verhindern. Dies konnte bei humanen Follikelzenter-Lymphomen und diffusen großzelligen Lymphomen, welche als Neoplasien von Lymphozyten nach Antigenkontakt angesehen werden, gezeigt werden (van Dongen et al., 2003). Werner et. al (2005) konnten das Phänomen an von ihnen untersuchten felines diffusen großzelligen Lymphomen mit fehlender Bindung der FR3-Primer demonstrieren. Eine dritte Möglichkeit der fehlenden Primerbindung besteht bei Lymphomen, bei denen die Sequenzen der schweren Kette durch chromosomale Abnormalitäten wie Translokationen, Inversionen oder Deletionen entscheidend verändert wurde. In humanen Lymphomen sind einige Translokationen regelmäßig nachweisbar, wie z.B. t(14;18) bei Follikelzenter-Lymphomen und großzelligen Lymphomen (Fukuhara et al., 1979) oder t(11;14) bei Mantelzell-Lymphomen (de Boer et al., 1997). Bei der Katze konnte beispielsweise eine Translokation t(A2;D3) bei zwei T-Zell-Lymphomen festgestellt werden (Wu et al., 1995). Ein falsch negatives Ergebnis kann auch dann entstehen, wenn die Menge amplifizierbarer DNS nicht ausreicht, um eine sichtbare Bande zu erzeugen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Überprüfung der DNS durch Amplifikation von 300 bp und 100 bp-großen Fragmenten vermieden, indem nur solche Proben der Klonalitätsanalyse unterzogen wurden, bei denen wenigstens das 100 bp-große Fragment sicher amplifiziert werden konnte.

5.5.2 Falsch polyklonale Resultate

„Falsch polyklonale“ Resultate entstehen, wenn bei bestehender monoklonaler Population die Klonalitätsanalyse als Ergebnis eine polyklonalen Population erbringt. Ursache hierfür ist das gleichzeitige Vorliegen einer monoklonalen Tumorphpopulation und einer polyklonalen Population von B-Zellen im selben Gewebe, wie z.B. tumorinfiltrierende Lymphozyten oder gewebebeständige Lymphozyten. Da das Diagnostiksystem dafür geschaffen ist, möglichst viele rearrangierte Varianten zu erkennen, werden im optimalen Fall alle im Gewebe vorkommenden Lymphozyten erkannt (Algara et al., 1993). Dies bedeutet, dass die polyklonalen Varianten mit den monoklonalen als Zielsequenz für die Primerbindung

konkurrieren (McCarthy, 1997). Liegt die monoklonale Population im Vergleich zur polyklonalen Population in zu geringer Konzentration vor, können die polyklonalen Banden in der Elektrophorese schwache monoklonale Banden überdecken. Humanmedizinische Studien beschreiben für die PCR eine Sensitivität von 1%-10% (McCarthy et al., 1990; Trainor et al., 1990; van Dongen et al., 2003) für Gewebe mit polyklonalem Hintergrund. Dies bedeutet, dass in einer DNS-Isolierung von 100 Zellen 1 bis 10 neoplastische Lymphozyten vorhanden sein müssen, um als monoklonale Population erkannt zu werden, wenn die übrigen der 100 Zellen überwiegend aus Lymphozyten bestehen. Dagegen steht eine Sensitivität von 5‰ in Geweben ohne reaktive Lymphozyten (McCarthy et al., 1991). Dies bedeutet, dass zur Erkennung der monoklonalen Population in einer DNS-Isolierung von 1000 Zellen lediglich 5 neoplastische Lymphozyten vorhanden sein müssen, wenn die übrigen der 1000 Zellen nicht zum lymphatischen Gewebe gehören.

Erkennen die Primer aus oben genannten Gründen eine monoklonale Population in einem Gewebe mit reaktiven Lymphozyten nicht, wird bei Vorliegen einer ausreichend großen polyklonalen Population nur diese amplifiziert und ergibt ein polyklonales Muster in der Elektrophorese (Werner et al., 2005).

5.5.3 Falsch klonale Resultate

5.5.3.1 Pseudomonoklonal

Bei der Analyse von Proben mit wenigen Lymphozyten trat bei der PCR-gestützten Klonalitätsdiagnostik ein Phänomen auf, das von den Autoren als „Pseudomonoklonalität“ (Elenitoba-Johnson et al., 2000) bzw. „Pseudoklonalität“ bezeichnet wurde. Hierbei zeigten die Proben, obwohl histologisch und immunhistologisch als reaktiver Prozess erscheinend, ein monoklonales Muster in der Elektrophorese (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Hoeve et al., 2000). Ursache hierfür ist eine zu geringe Menge an Zielsequenzen, wie sie bei sehr kleinen Proben oder bei Proben mit schlechter DNS-Qualität vorkommt. Dies konnte durch Amplifikation von Verdünnungen reaktiven Lymphgewebes gezeigt werden. Hier konnte zunächst ein polyklonales Muster, mit zunehmenden Verdünnungen jedoch ein inkomplettes polyklonales Muster (s.u.), ein oligoklonales Muster (s.u.) und schließlich ein pseudomonoklonales Muster erzeugt werden (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Hoeve et al., 2000).

Das Phänomen der Pseudomonoklonalität wird durch die exponentielle Amplifikation, der in den ersten PCR-Zyklen gebildeten Produkte erklärt. Hierbei können zufällig einzelne Klone einer kleinen polyklonalen Population bevorzugt amplifiziert werden (Moore et al., 2005).

Die Zufälligkeit, in der dies geschieht, sorgt jedoch dafür, dass die Banden in verschiedenen PCR-Reaktionen unterschiedliche Größen zeigen (Elenitoba-Johnson et al., 2000).

Aus diesem Grund sollten, wie auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, die PCR-Reaktionen immer mindestens im Doppelansatz durchgeführt werden.

5.5.3.2 Oligoklonal

Erscheint in der Elektrophorese ein reproduzierbares Bandenmuster mit 3 bis 5 scharfen Banden, wird dieses Ergebnis als Hinweis auf eine Oligoklonalität der untersuchten Probe gewertet (Werner et al., 2005). Dies wird auf eine Prädominanz einiger weniger, durch die Selektion im Zuge des Antigenkontakts bevorzugter Lymphozyten-Subklone zurückgeführt. Bei T-Zellen konnte dieses Phänomen bei humanen Patienten in Zusammenhang mit Epstein-Barr-Virus- oder Zytomegalievirus-Infektionen beobachtet werden (van Dongen et al., 2003). Eine humanmedizinische Studie zeigte jedoch auch Oligoklonalität bei 30% der Fälle von Vorläufer-B-Zell-Leukämien (Szczepanski et al., 2001). Jedoch kann, wie bereits erwähnt, die Oligoklonalität ähnlich wie die Pseudoklonalität auch ein Hinweis auf geringe Mengen an Lymphozyten bzw. geringe Mengen amplifizierbare DNS in der Ausgangsprobe sein (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Hoeve et al., 2000).

5.6 Kriterien für die Interpretation der Elektrophorese-Ergebnisse

Angelehnt an die Vorschläge von Hoeve et al. (2000) modifiziert nach Werner et al. (2005) können die Ergebnisse der Elektrophorese folgendermaßen eingestuft werden:

1. Monoklonal: Eine oder zwei *reproduzierbare* (Werner et al., 2005) Banden im erwarteten Größenbereich, entweder selbständig oder vor dem Hintergrund mehrerer schwächerer (polyklonaler) Banden. Der Fall von zwei reproduzierbaren Banden kann als biallelische VDJ-Rekombination der Ursprungszelle gewertet werden (Signoretti et al., 1999; van Dongen et al., 2003; Werner et al., 2005).
2. Oligoklonal: Drei bis *fünf* (Werner et al., 2005) reproduzierbare Banden, möglicherweise vor einem polyklonalem Hintergrund.
3. Polyklonal: Eine Leiter von 10 bis 20 Banden, die mit Gaußscher Normalverteilung über den erwarteten Größenbereich verteilt sind.
4. Inkomplett polyklonal: Weniger als 10, d.h. **6 bis 10** (*durch die engere Definition der Oligoklonalität*) Banden im erwarteten Größenbereich, die zufällig verteilt sind, unterschiedliche Stärke haben und bei wiederholten Experimenten variieren.
5. Pseudoklonal (Werner et al., 2005): Eine oder mehrere, gut abgrenzbare, nicht reproduzierbare Banden. (In Hinblick auf die vorhergehenden Definitionen kann hier

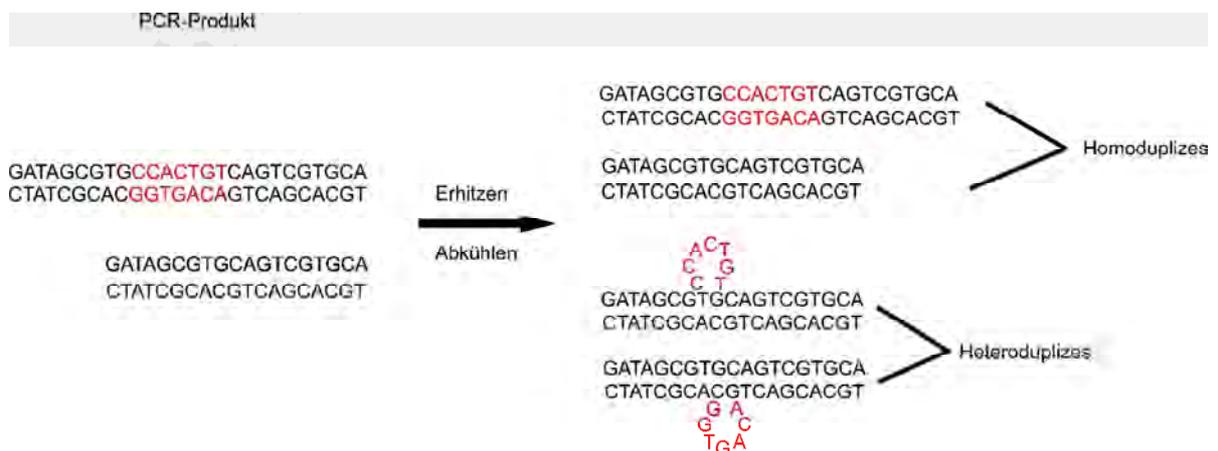
bei ein bis zwei nicht reproduzierbaren Banden von „**pseudomonoklonal**“ und von drei bis fünf nicht reproduzierbaren Banden als „**pseudooligoklonal**“ gesprochen werden.)

6. Kein Signal: Keine Bande im erwarteten Größenbereich oder schwache Banden außerhalb der erwarteten Produktlänge.

5.7 Heteroduplexanalyse

Mit der Heteroduplexanalyse kann die Monoklonalität eines unklaren Ergebnisses überprüft werden. Bei der Heteroduplexanalyse werden die PCR-Produkte bei hoher Temperatur denaturiert, d.h. die Doppelstränge lösen sich, und werden bei niedrigerer Temperatur wieder aneinander angenähert (Garcia-Sanz et al., 1999; Gonzalez et al., 1999). Bei Vorliegen einer polyklonalen Population werden durch diese Methode Heteroduplexe gebildet. Heteroduplexe bilden sich dann, wenn ein PCR-Produkt vorliegt, in dem sich die einzelnen Moleküle sehr ähnlich sind, aber in einigen Basen unterscheiden. Durch die Denaturierung wird die doppelsträngige DNS getrennt. Bei der Wiederannäherung paaren in einem heterogenen Produkt nicht nur die homologen Stränge (Homoduplexe), sondern die sich ähnlichen Stränge binden in übereinstimmenden Bereichen. An Stellen mit nicht übereinstimmender Sequenz entstehen in diesen Molekülen ungepaarte Basen, die für veränderte Laufeigenschaften in der Elektrophorese sorgen (Cotton, 1997). Wenn sich, wie bei den Genen der schweren Kette, die Moleküle nicht nur in der Basenzusammensetzung, sondern auch in der Anzahl der Basen unterscheiden, bilden sich Schleifen in der DNS (s. Abbildung 37). Dies verstärkt den Effekt. Die veränderten Laufeigenschaften – die Heteroduplexe migrieren langsamer in der Elektrophorese – können eine polyklonale Population deutlich werden lassen, da diese oberhalb der erwarteten Größe migrieren. Die Homoduplexe können dagegen im erwarteten Größenbereich deutlicher hervortreten (van Dongen et al., 2003).

Abbildung 37: Entstehung der Homo- und Heteroduplexe durch Erhitzung und Abkühlung der PCR-Produkte



5.8 Aussagekraft der Elektrophorese-Resultate

Aufgrund der systemimmanenten Möglichkeit falsch negativer bzw. falsch polyklonaler Resultate kann die PCR-gestützte Klonalitätsdiagnostik lediglich bei einem positivem monoklonalem Ergebnis, welches durch die oben genannten Kriterien verifiziert ist, dem Untersucher einen deutlichen Hinweis auf eine monoklonale Population geben. Somit kann in einem solchen Fall der Untersucher durch Kombination der histologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Befunde in der Lage sein, einen Tumor von einem reaktiven lymphatischen Gewebe abzugrenzen.

Eine umgekehrte Abgrenzung, d.h. der Ausschluss eines Tumors im untersuchten Gewebe ist aufgrund der oben beschriebenen Möglichkeit der Nichterfassung einer klonalen Population nicht möglich.

5.9 Analyse der mit dem Diagnostiksystem amplifizierten Proben

5.9.1 Duplizierung der FR1-spezifischen Bande der VH1-Positivkontrolle

Bei der Amplifikation der Proben mit dem Diagnostiksystem wurde für die Kontrolle der VH1-spezifischen Primer ein Plasmid mit einem Insert aus Genen der VH1-Familie mit beiden Sense-Primern in Verbindung mit den Antisense-Primern amplifiziert. Dabei konnte festgestellt werden, dass im Bereich der Bande des V1FR1-Primers eine zusätzliche schwache Bande kurz oberhalb der erwarteten Bande erschien.

Analysen der Sequenz der Inserts sowie des Plasmids konnten keine zusätzliche Bindungstellen der benutzen Primer erkennen lassen. Bei Amplifikation des Plasmids mit den Sense-Primern in Einzelreaktionen konnte die Bande nicht mehr erzeugt werden (s. 4.3.6.) Dies weist darauf hin, dass diese zusätzliche Bande möglicherweise durch eine Interaktion der beiden Amplifikate miteinander entsteht. Grundsätzlich können die Einzelstränge beider Amplifikate miteinander binden, da das Amplifikat mit dem V1FR3-Primer dem 3'-Ende des Amplifikats mit dem V1FR1-Primers entspricht.

Möglich wäre z.B. die Bildung eines Moleküls, das im Bereich des 3'-Endes doppelsträngig ist und im Bereich des 5'-Endes einzelsträngig. Wenn nun die Konformation des Einzelstranges eine Abbremsung des Moleküls bewirkt, könnte diese zur Bildung einer zusätzlichen Bande führen.

5.9.2 Diskussion der Ergebnisse der mit dem Primersystem untersuchten Proben

Nachfolgend werden die Ergebnisse der mit dem Primersystem untersuchten Proben diskutiert. Grundlage der Diskussion sind die histologische und immunhistologische Klassifizierung der Proben (s. 3.2 und 8.5 - 8.7), die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung (s. 4.3.5) sowie in einzelnen Fällen die Qualität der DNS (s. Tabelle 59).

5.9.2.1 B-Zell-Lymphome

5.9.2.1.1 Fall 3020/93

Dieser Tumor ist nach histologischer und immunhistologischer Klassifikation ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, welches die Niere infiltriert (s. Abbildung 43).

Die PCR-Reaktion ergibt in der Elektrophorese (s. Abbildung 18) nach den oben beschriebenen Kriterien ein monoklonales Muster auf schwachem inkomplett polyklonalen Hintergrund mit zwei Banden für die Amplifikation mit den VH1-spezifischen Primer in der Framework 3-Region. Die Primer für die VH3-Familie ergeben für beide Frameworkregionen ein polyklonales Muster, wobei bei dem FR1-spezifischen Primer eine starke Fluoreszenz im mittleren Abschnitt des Musters zu erkennen ist, welche jedoch nach Heteroduplexanalyse verschwindet und auf die Häufung von Klonen ähnlicher Größe aufgrund der Gaußschen Normalverteilung zurückzuführen ist.

Aufgrund der Elektrophorese-Ergebnisse in Kombination mit den histologischen und immunhistologischen Befunden kann dieser Tumor als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit biallelischem Rearrangement der Gene der VH1-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.2 Fall 3597/06

Dies ist histologisch und immunhistologisch ebenfalls ein die Niere infiltrierendes, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (s. Abbildung 44).

Die Amplifikation mit dem Diagnostiksystem (s. Abbildung 18) ergibt kein Signal für die VH1-spezifischen Primer, jedoch jeweils ein monoklonales Muster für die Primer der VH3-Familie, wobei zwei reproduzierbare Banden des FR1-spezifischen Primers vor einem pseudomonoklonalem und eine reproduzierbare Bande des FR3-spezifischen Primers vor einem pseudooligoklonalem Hintergrund liegen.

Kombiniert mit den histologischen und immunhistologischen Ergebnissen kann dieser Tumor als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit biallelischem Rearrangement der Gene der VH3-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.3 Fall T383/05

Histologisch und immunhistologisch konnte auch dieser Tumor als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Manifestation in der Niere klassifiziert werden (s. Abbildung 45).

Die Ergebnisse der PCR (s. Abbildung 19) ergaben ein monoklonales Muster mit einer reproduzierbaren Bande im Bereich des FR3-spezifischen Primers der VH3-Familie. Es erfolgte keine Amplifikation der VH1-spezifischen Sequenzen und der FR1-spezifischen Sequenzen der VH3-Familie. Die fehlende Bindung in diesem Bereich kann auf die unter 5.5.1 beschriebenen Gründe zurückzuführen sein, wobei die Qualität der DNS grundsätzlich die Amplifikation eines Fragmentes der entsprechenden Größe zulässt (s. Tabelle 59). Das Fehlen eines Signals für VH1-spezifische Sequenzen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass dieser Tumor keinen polyklonalen Hintergrund, d.h. keine Infiltration mit reaktiven Lymphozyten beider Familien zu haben scheint.

Somit kann dieser Tumor als großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement der Gene der VH3-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.4 Fall T1528/07

Auch dieser Tumor ist ein die Niere infiltrierendes, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, wie durch die histologische und immunhistologische Untersuchung festgestellt werden konnte (s. Abbildung 46).

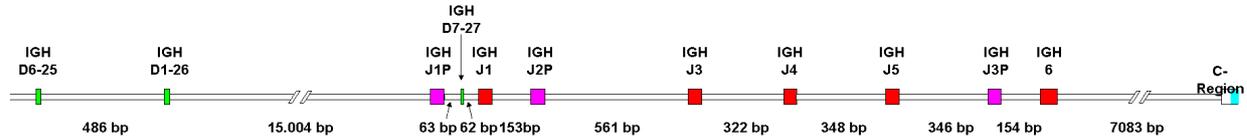
Bei diesem Tumor konnte für beide VH3-spezifischen Primer ein monoklonales Muster ermittelt werden (s. Abbildung 19). Somit kann dieser Tumor ebenfalls als großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement der Gene der VH3-Familie klassifiziert werden.

Bei der Amplifikation dieses Tumors konnte ein Phänomen beobachtet werden, welches auch bei der PCR-gestützten Klonalitätsanalyse lymphatischer Neoplasien in der Humanmedizin beschrieben ist. Zusätzlich zu den Banden im erwarteten Größenbereich traten bei der Amplifikation Banden im Bereich von 450 bis 550 Basenpaaren auf.

Dies kann mit der Bindung der Antisense-Primer in nicht-rearrangierten J-Segmenten erklärt werden (Deane und Norton, 1990). Diese werden erst im Zuge des Spleißens, d.h. erst nach der Transkription der DNS, entfernt und liegen damit in der B-Lymphozyten-DNS unmittelbar in Richtung 3'-Ende zu den rearrangierten Genen (vgl. Abbildung 1) (Rabbitts, 1978). Die Abstände zwischen den einzelnen Mitgliedern der J-Region sind im humanen Genom kurz genug, um mit einer gewöhnlichen PCR amplifiziert zu werden. Abbildung 38 zeigt dies schematisch in einem Ausschnitt der genomischen Verteilung der humanen D- und

J-Gene, erstellt auf Grundlage der genomischen Sequenzen (GeneBank Accession-Number: NG_001019)

Abbildung 38: Schema der genomischen Verteilung der humanen D- und J-Gene (Ausschnitt)



Dass dieses Phänomen auch bei der Katze auftritt, konnte durch Aufreinigung, Klonierung und Sequenzierung einer solchen Bande außerhalb der erwarteten Größe gezeigt werden. Abbildung 39 zeigt die Sequenz der Bande. Das Vorliegen des Heptamers und des Nonamers in dem Bereich zwischen den beiden J-Regionen zeigt, dass es sich bei der weiter Richtung 3'-Ende der DNS gelegenen Region um eine nicht rearrangierte Sequenz handelt.

Abbildung 39: Sequenz der oberhalb des erwarteten Größenbereich liegenden Bande

| | | | | | | |
|-----|------------|--------------------|-------------|------------|--------------------|-------------|
| 1 | GTGGCCTCTG | GATTACCTT | CAGTAGCTAC | TACATGAGCT | GGGTCCGCCA | GGCTCCAGGG |
| 61 | AAGGGGCTGC | AGTGGGTCGC | ATATATTAGT | AGTAGTGGAG | GTAGCATATA | CTACGCAGAC |
| 121 | TCCGTGAAGG | GCCGATTCAC | CATCTCCAGA | GACAACGCCA | AGAACACGCT | GTATCTGCAG |
| 181 | ATGAACAGCC | TGAAGACCGA | GGACACGGCC | ACATATTACT | GTGCTCGGGG | GGTCCCAGATG |
| 241 | gactcctggg | gccaaaggagc | cctgggtgacg | GTGTCTCAG | GTGAGTCCTC | CCGGCTTTCC |
| 301 | TCTCCTCTCT | CTGTCTGGGAG | GTTTGGCTG | CATTGGGGA | GAAAACGGAG | GGTGCCAGGG |
| 361 | TCTCGGACCT | AGGGCTGGCT | TGGTGGCCAG | GCTCTCCGGG | GACCTCAGCC | ACCCTCAGCT |
| 421 | TCAGGGGCCA | CCTGGTCCTC | TCAGCCTCAC | TGGCTGTGAT | CTGAGGTGGA | CCGAGGCCTT |
| 481 | AGCCAGGCC | C <u>ACTTCTTGT</u> | CTGGGGCCCC | ACCAACATTG | TCA <u>CAATGTG</u> | acaactggtt |
| 541 | caactactgg | ggccacggaa | ccct | | | |

| | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| GRAU UNTERLEGT: V-Region | kleinbuchstaben: J-Regionen |
| UNTERSTRICHEN: N-Region | <u>ACTTCTTGT</u> : Nonamer |
| KURSIV: D-Region | <u>CAATGTG</u> : Heptamer |

5.9.2.1.5 Fall 2253/97

Dieser histologisch und immunhistologisch als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom im Darm klassifizierte Tumor (s. Abbildung 47) zeigt für die VH1-spezifischen Primer im Bereich des FR3-spezifischen Primers eine im Doppelansatz, jedoch nicht in wiederholten Versuchen reproduzierbare Bande. Nach Durchführung der Heteroduplexanalyse können lediglich zwei Banden unterschiedlicher Größe gesehen werden. Für die VH3-spezifischen Primer besteht ein pseudooligoklonales Muster für den FR1-spezifischen Primer, sowie ein inkomplett polyklonales Muster für den FR3-spezifischen Primer (s. Abbildung 21). Mit der Heteroduplexanalyse konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Ergebnisse dieses Tumors weisen auf das Vorliegen einer geringen Menge Zielsequenz hin. Da die verwendete Probe eine angemessene Größe und auch eine gute Zelldichte aufwies (s. Abbildung 47) kann hier eine starke Fragmentierung der DNS im Ausgangsmaterial als Ursache in Frage kommen. Diese Annahme wird durch die Unfähigkeit, ein 300 bp-großes Fragment zu amplifizieren, unterstützt.

Durch die Elektrophorese-Ergebnisse konnte bei dieser Probe keine eindeutige Monoklonalität nachgewiesen werden, d.h. in diesem Fall können die molekularbiologischen Befunde nicht zur Unterstützung der histologischen und immunhistologischen Befunde dienen.

5.9.2.1.6 Fall 2074/95

Dieser ebenfalls aus dem Darm stammende histologisch und immunhistologisch als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom diagnostizierte Tumor (s. Abbildung 48) zeigt für den FR3-spezifischen Primer der VH1-Familie in der ersten Amplifikation zwei Banden unterschiedlicher Größe in den beiden Reaktionen des Doppelansatzes (s. Abbildung 21). In der Wiederholung der Amplifikation lassen sich zwei Banden identischer Größe in den beiden Reaktionen des Doppelansatzes und eine kleinere Bande in einer der beiden Reaktionen erkennen. Letztere Bande verschwindet in der Heteroduplexanalyse. Mit der zweiten Amplifikation konnte eine reproduzierbare Bande für den FR3-spezifischen Primer der VH1-Familie ermittelt werden. Inwieweit die kleinere Bande der zweiten Amplifikation eine Reproduktion der kleineren Bande der ersten Replikation darstellt, d.h. Hinweis auf ein biallelisches Rearrangement gibt, lässt sich aufgrund der leicht unterschiedlichen Laufeigenschaften der beiden Gele nicht exakt feststellen. Die Amplifikation mit dem FR3-spezifischen Primer der VH3-Familie ergibt ein inkomplett polyklonales Muster.

Somit kann dieser Tumor auf der Kombination von histologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Befunde als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement der Gene der VH1-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.7 Fall T7795/05

Dieser Tumor aus dem Auge einer Katze wurde histologische und immunhistologisch ebenfalls als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom eingestuft (s. Abbildung 49).

Die Ergebnisse der Elektrophorese (s. Abbildung 22) zeigen bei diesem Tumor kein Signal für die VH1-spezifischen Primer, eine nicht reproduzierbare Bande für den FR1-spezifischen Primer der VH3-Familie und eine reproduzierbare Bande vor einem pseudooligoklonalem Hintergrund für die FR3-spezifischen Primer der VH3-Familie.

Somit kann dieser Tumor mit Hilfe der molekularbiologischen Befunde kombiniert mit Histologie und Immunhistologie als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement der VH3-Gene diagnostiziert werden.

Die fehlende Reproduzierbarkeit der Bande für den FR1-spezifischen Primer der VH3-Familie kann ihre Ursache in der Qualität der Ausgangs-DNS haben, da bei dem Versuch der Amplifikation des 300 bp-großen Fragmentes lediglich eine schwache Amplifikation erreicht werden konnte.

5.9.2.1.8 Fall 940/97

Bei diesem diffusen großzelligem B-Zell-Lymphom aus dem Darm (s. Abbildung 50) konnten für die FR3-spezifischen Primer beider Familien ein monoklonales Muster ermittelt werden (s. Abbildung 22).

Damit kann dieser Tumor durch Histologie, Immunhistologie und molekularbiologische Befunde als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit biallelischem Rearrangement der Gene sowohl der VH1- als auch der VH3-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.9 Fall T7192/06

Bei diesem histologisch und immunhistologisch als Follikelzentrams-Lymphom vom Typ II klassifizierten Tumor aus dem Lymphknoten (s. Abbildung 51) konnte durch die Amplifikation lediglich ein polyklonales Muster für den FR3-spezifischen Primer der VH1-Familie und die VH3-spezifischen Primer erreicht werden (s. Abbildung 23). Durch die Heteroduplexanalyse konnte hier ebenfalls kein monoklonales Muster aufgezeigt werden.

Die Probe stammt aus einem Lymphknoten, also einem Gewebe mit vielen nicht neoplastischen Lymphozyten, welche das starke polyklonale Muster erzeugen und

möglicherweise eine monoklonale Bande überdecken, wenn eine vorhandene monoklonale Population amplifiziert wurde.

Bei dieser Probe können die molekularbiologischen Befunde nicht zur Unterstützung der histologischen und immunhistologischen Befunde herangezogen werden.

5.9.2.1.10 Fall S1003/04

Dieser durch Histologie und Immunhistologie als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Manifestation im Pankreas diagnostizierte Tumor (s. Abbildung 52) zeigt wie T7192/06 ein polyklonales Muster für den FR1-spezifischen Primer der VH1-Familie sowie für die VH3-spezifischen Primer (s. Abbildung 23). Auch mit der Heteroduplexanalyse konnte keine Monoklonalität nachgewiesen werden. Auch bei dieser Probe kann keine Unterstützung der histologischen und immunhistologischen Befunde durch die Molekularbiologie erfolgen.

5.9.2.1.11 Zusammenfassung der untersuchten B-Zell-Lymphome

In Tabelle 58 sind die Ergebnisse der untersuchten B-Zell-Lymphome zusammengefasst.

Tabelle 58: Ergebnisse der untersuchten B-Zell-Lymphome

| Fall | Histologische/ Immunhistologische Diagnose | Molekularbiologische Diagnose | Familie | DNS- Qualität |
|----------|--|---|---------|---|
| 3020/92 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Niere) | Monoklonalität nachweisbar (biallelisches Rearrangement) | VH1 | 300 Basenpaare amplifizierbar |
| 3597/06 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Niere) | Monoklonalität nachweisbar (biallelisches Rearrangement) | VH3 | 300 Basenpaare amplifizierbar |
| T383/05 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Niere) | Monoklonalität nachweisbar | VH3 | 300 Basenpaare amplifizierbar |
| T1528/07 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Niere) | Monoklonalität nachweisbar | VH3 | 300 Basenpaare amplifizierbar |
| 2253/97 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Darm) | Monoklonalität nicht nachweisbar | - | 100 Basenpaare amplifizierbar |
| 2047/95 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Darm) | Monoklonalität nachweisbar | VH1 | 100 Basenpaare amplifizierbar |
| T7795/05 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Auge) | Monoklonalität nachweisbar | VH3 | 300 Basenpaare (schwach) amplifizierbar |
| 940/97 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Darm) | Monoklonalität nachweisbar (biallelisches Rearrangement) | VH1/VH3 | 100 Basenpaare (schwach) amplifizierbar |
| T7192/06 | Follikelzentrums-Lymphom Typ II (Lymphknoten) | Monoklonalität nicht nachweisbar | - | 300 Basenpaare amplifizierbar |
| S1003/04 | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Pankreas) | Monoklonalität nicht nachweisbar | - | 300 Basenpaare amplifizierbar |

5.9.3 Lymphatische Hyperplasien

Bei der Untersuchung der histologisch klassifizierten lymphatischen Hyperplasien (als Beispiel s. Abbildung 54) mittels PCR und Elektrophorese konnte bei keiner Probe ein monoklonales Muster erzeugt werden (s. Abbildung 24 bis Abbildung 28).

Die erzeugten Muster variieren von polyklonal über inkomplett polyklonal zu pseudooligoklonal.

Proben, die innerhalb des polyklonalen Musters in beiden Reaktionen des Doppelansatzes Banden gleicher Größe zeigten, wurden zusätzlich der Heteroduplexanalyse unterzogen.

Hierbei konnte ebenfalls bei keiner der Proben ein monoklonales Muster gefunden werden.

5.9.4 T-Zell-Lymphome

Bei keinem der untersuchten T-Zell-Lymphome konnte ein monoklonales Muster erzeugt werden (s. Abbildung 29 bis Abbildung 33). Zum überwiegenden Teil wurde mittels PCR und Elektrophorese kein Signal erzeugt. Lediglich bei der Probe 1883/94 konnte für den FR3-spezifischen Primer der VH3-Familie ein polyklonales Muster gefunden werden, welches wahrscheinlich auf eine kleine Population tumorinfiltrierende B-Lymphozyten zurückzuführen ist, wie sie in den Bildern der Probe (s. Abbildung 53, Bilder 2B, 2C) zu erkennen ist.

Eine Bindung der B-Zell-spezifischen Primer bei T-Zell-Lymphomen wäre aufgrund der so genannten „Linienuntreue“ (bzw. „Linienpromiskuität“) möglich. Mit diesen Begriffen wird die Eigenschaft einiger Lymphome beschrieben, welche die Gene beider Linien (T und B) rearrangieren (Cossman et al., 1988; Felix et al., 1990).

Daher ist durch alleinige Bewertung der rearrangierten Gene eine Zuordnung einer lymphatischen Neoplasie zu B- oder T-Zelllinie nicht möglich.

5.9.5 Beurteilung des diagnostischen Systems

Mit dem System konnte bei sieben der zehn untersuchten Tumoren eine Monoklonalität bestätigt werden. Die Unfähigkeit des Systems, bei den drei übrigen Proben eine Monoklonalität aufzudecken, ist wahrscheinlich in den oben genannten Gründen für falsch negative bzw. falsch polyklonale Befunde begründet.

Auffällig ist jedoch, dass bei keiner der Proben eine deutliche Amplifikation mit dem FR1-spezifischen Primer der VH1-Familie stattfindet. Selbst bei deutlicher Amplifikation der Proben mit dem FR3-spezifischen Primer der VH1-Familie, konnte dies nicht beobachtet werden. Lediglich eine sehr dezente Amplifikation konnte bei einer lymphatischen Hyperplasie (T847/05) gefunden werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass der FR1-spezifische Primer der VH1-Familie bei den untersuchten Proben keine adäquate Bindung zeigt. Die Reaktionsbedingungen scheinen hierfür keine Rolle zu spielen, da mit dem Primer unter gleichen Bedingungen das Insert des VH1-Klons amplifiziert werden konnte. Für eine genauere Untersuchung der Ursachen der fehlenden Amplifikation müsste eine ausgedehnte Analyse der Sequenzen der untersuchten Tumoren erfolgen.

Das entwickelte Diagnostiksystem ist in den Grenzen der PCR-Diagnostik von Lymphomen in der Lage, Monoklonalität aufzudecken und somit dem Untersucher im positiven Falle eine Unterstützung bei der histologischen und immunhistologischen Diagnose zu geben. Das System kann, vor allem aufgrund der unvollständigen Entschlüsselung des feline Genoms, nicht als optimal betrachtet werden. Daher wird es mit fortschreitendem Entschlüsseln der entsprechenden Gene den veränderten Informationen angepasst werden müssen.

6 Zusammenfassung

1. Ziel der Arbeit war es, ein PCR-gestütztes Diagnostiksystem für die B-Zell-Lymphome der Katze zu entwickeln.
2. In der Literaturübersicht wird zunächst ein Überblick über Klassifikation und Ätiologie feliner Lymphome gegeben und die Methoden der Klonalitätsdiagnostik werden kurz besprochen. Die molekularbiologischen Grundlagen der Lymphozytenanalyse, hier vor allem das Rearrangement der Gene der schweren Kette und die weiteren Ursachen der Diversität dieser Gene, werden aufgezeigt. Im Weiteren wird der Einsatz der Lymphozytendiagnostik als Klonalitätsmarker bei Mensch, Hund und Katze beschrieben.
3. Zur Entwicklung des Diagnostiksystems mussten die Gene der variablen Region der schweren Kette des felinen Immunglobulins analysiert werden und auf Grundlage dieser Analyse ein Primersystem entwickelt werden.
4. Mit verschiedenen Methoden konnten zwei zu den Familien der Gene der schweren Kette des humanen Immunglobulins homologe Familien bei der Katze analysiert werden.
5. Auf Grundlage dieser Analyse konnte ein Diagnostiksystem mit jeweils zwei familienspezifischen Primern für beide Familien entwickelt werden.
6. Mit Hilfe dieses Primersystems konnten bei zehn untersuchten felinen B-Zell-Lymphomen in sieben Fällen eine Monoklonalität nachgewiesen werden. Bei jeweils zehn untersuchten lymphatischen Hyperplasien und T-Zell-Lymphomen konnte keine Monoklonalität nachgewiesen werden.

Summary

1. The aim of this study was to develop a PCR-based diagnostic system for the diagnosis of feline B-cell lymphomas.
2. An overview on the classification and etiology of feline lymphomas is given and the methods of clonality analysis are summarized. The molecular basis of lymphocyte analysis is explained with emphasis on the rearrangement of heavy chain genes as well as on further causes of the diversity of these genes. Furthermore, the usage of lymphocyte analysis for clonality analysis in man, dogs and cats is described.
3. For the development of a diagnostic system, feline heavy chain genes had to be analysed to design a system of PCR primers on the basis of this analysis.
4. Using different methods, two families of feline heavy chain genes, homologous to families of the human heavy chain gene could be identified and analysed.
5. Based on this analysis a diagnostic system with two family-specific primers for each family was designed.
6. By use of this system, in 7 of 10 feline B-cell lymphomas monoclonality was detected. No monoclonality was detected in 10 lymphatic hyperplasias and 10 T-cell lymphomas.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtmann, A.H., Pober, J.S., (Hrsg), 2000a. Antibodies and antigens. In: Cellular and molecular immunology, 4. Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 41-62.
- Abbas, A.K., Lichtmann, A.H., Pober, J.S., (Hrsg), 2000b. Lymphocyte maturation and expression of antigen receptor genes. In: Cellular and molecular immunology, 4. Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 125-160.
- Adams, A., Lindahl, T., 1975. Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 1477-1481.
- Algara, P., Martinez, P., Sanchez, L., Villuendas, R., Benitez, J., Rivas, C., Piris, M.A., 1993. The detection of B-cell monoclonal populations by polymerase chain reaction: Accuracy of approach and application in gastric endoscopic biopsy specimens. *Hum Pathol* 24, 1184-1188.
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., Baltimore, D., 1984. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *Embo J* 3, 1209-1219.
- Arnold, A., Cossman, J., Bakhshi, A., Jaffe, E.S., Waldmann, T.A., Korsmeyer, S.J., 1983. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 309, 1593-1599.
- Athas, G.B., Choi, B., Prabhu, S., Lobelle-Rich, P.A., Levy, L.S., 1995. Genetic determinants of feline leukemia virus-induced multicentric lymphomas. *Virology* 214, 431-438.
- Athas, G.B., Starkey, C.R., Levy, L.S., 1994. Retroviral determinants of leukemogenesis. *Crit Rev Oncog* 5, 169-199.
- Aubin, J., Davi, F., Nguyen-Salomon, F., Leboeuf, D., Debert, C., Taher, M., Valensi, F., Canioni, D., Brousse, N., Varet, B., et al., 1995. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 9, 471-479.
- Baumforth, K.R., Nelson, P.N., Digby, J.E., O'Neil, J.D., Murray, P.G., 1999. Demystified ... the polymerase chain reaction. *Mol Pathol* 52, 1-10.
- Beatty, J.A., Callanan, J.J., Terry, A., Jarrett, O., Neil, J.C., 1998. Molecular and immunophenotypical characterization of a feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a direct role for FIV in B-lymphocyte transformation? *J Virol* 72, 767-771.
- Berman, J.E., Mellis, S.J., Pollock, R., Smith, C.L., Suh, H., Heinke, B., Kowal, C., Surti, U., Chess, L., Cantor, C.R., et al., 1988. Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus. *Embo J* 7, 727-738.
- Bernard, O., Hozumi, N., Tonegawa, S., 1978. Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell* 15, 1133-1144.
- Besmer, E., Mansilla-Soto, J., Cassard, S., Sawchuk, D.J., Brown, G., Sadofsky, M., Lewis, S.M., Nussenzweig, M.C., Cortes, P., 1998. Hairpin coding end opening is mediated by RAG1 and RAG2 proteins. *Mol Cell* 2, 817-828.
- Beutler, E., Collins, Z., Irwin, L.E., 1967. Value of genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in tracing the origin of malignant tumors. *N Engl J Med* 276, 389-391.
- Bos, J.L., Verlaan-de Vries, M., Jansen, A.M., Veeneman, G.H., van Boom, J.H., van der Eb, A.J., 1984. Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res* 12, 9155-9163.

- Bourguin, A., Tung, R., Galili, N., Sklar, J., 1990. Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 8536-8540.
- Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., Tonegawa, S., 1978. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1-14.
- Brisco, M.J., Tan, L.W., Orsborn, A.M., Morley, A.A., 1990. Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br J Haematol* 75, 163-167.
- Brouns, G.S., de Vries, E., van Noesel, C.J.M., Mason, D.Y., van Lier, R.A.W., Borst, J., 1993. The structure of the mu/pseudo light chain complex on human pre-B cells is consistent with a function in signal transduction. *Eur J Immunol* 23, 1088-1097.
- Brown, S.W., Chandra, H.S., 1973. Inactivation system of the mammalian X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 195-199.
- Burnett, R.C., Vernau, W., Modiano, J.F., Olver, C.S., Moore, P.F., Avery, A.C., 2003. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol* 40, 32-41.
- Callanan, J.J., Jones, B.A., Irvine, J., Willett, B.J., McCandlish, I.A., Jarrett, O., 1996. Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. *Vet Pathol* 33, 264-272.
- Callanan, J.J., McCandlish, I.A., O'Neil, B., Lawrence, C.E., Rigby, M., Pacitti, A.M., Jarrett, O., 1992. Lymphosarcoma in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection [corrected]. *Vet Rec* 130, 293-295.
- Campbell, M.J., Zelenetz, A.D., Levy, S., Levy, R., 1992. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol* 29, 193-203.
- Chenchik, A., Moqadam, F., Siebert, P., 1995. Marathon cDNA amplification: A new method for cloning full-length cDNAs. *Clontechniques* X, 5-8.
- Chesnut, R., Grey, H., 1981. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J Immunol* 126, 1075-1079.
- Cho, K.W., Satoh, H., Youn, H.Y., Watari, T., Tsujimoto, H., O'Brien, S.J., Hasegawa, A., 1997. Assignment of the cat immunoglobulin heavy chain genes IGHM and IGHG to chromosome B3q26 and T cell receptor chain gene TCRG to A2q12-->q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 79, 118-120.
- Cho, K.-W., Youn, H.-Y., Okada, M., Satoh, H., Cevario, S., O'Brien, S.J., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1998. Cloning and mapping of cat (*Felis catus*) immunoglobulin and T-cell receptor genes. *Immunogenetics* 47, 226-233.
- Cina, S.J.M.D., 1994. Flow cytometric evaluation of DNA degradation: a predictor of postmortem interval? *Am J Forensic Med Pathol* 15, 300-302.
- Coombs, N.J., Gough, A.C., Primrose, J.N., 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 27, e12.
- Cossman, J., Uppenkamp, M., Sundeen, J., Coupland, R., Raffeld, M., 1988. Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 112, 117-127.
- Cotton, R.G., 1997. Slowly but surely towards better scanning for mutations. *Trends Genet* 13, 43-46.
- Court, E.A., Watson, A.D., Peaston, A.E., 1997. Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J* 75, 424-427.
- Davies, D.R., Chacko, S., 1993. Antibody structure. *Acc Chem Res* 26, 421-427.
- Day, M.J., 1995. Immunophenotypic characterisation of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. *J Comp Pathol* 112, 79 - 96.

- de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Schuurings, E., Kluin, P.M., 1997. Bcl-1/cyclin D1 in malignant lymphoma. *Ann Oncol* 8 Suppl 2, 109-117.
- Deane, M., Norton, J.D., 1990. Immunoglobulin heavy chain variable region family usage is independent of tumor cell phenotype in human B lineage leukemias. *Eur J Immunol* 20, 2209-2217.
- Deane, M., Norton, J.D., 1991. Immunoglobulin gene 'fingerprinting': an approach to analysis of B lymphoid clonality in lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 77, 274-281.
- Diaz-Cano, S., 1996. PCR-based alternative for diagnosis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement: principles, practice, and polemics. *Diagn Mol Pathol* 5, 3-9.
- Diss, T.C., Liu, H.X., Du, M.Q., Isaacson, P.G., 2002. Improvements to B cell clonality analysis using PCR amplification of immunoglobulin light chain genes. *Mol Pathol* 55, 98-101.
- Douglas, M.P., Rogers, S.O., 1998. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res* 401, 77-88.
- Dreitz, M.J., Ogilvie, G., Sim, G.K., 1999. Rearranged T lymphocyte antigen receptor genes as markers of malignant T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 69, 113-119.
- Dreyer, W.J., Bennett, J.C., 1965. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci USA* 54, 864-869.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., Hood, L., 1980. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981-992.
- Edmundson, A.B., Ely, K.R., Abola, E.E., Schiffer, M., Panagiotopoulos, N., 1975. Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chains. *Biochemistry* 14, 3953-3961.
- Elenitoba-Johnson, K.S., Bohling, S.D., Mitchell, R.S., Brown, M.S., Robetorye, R.S., 2000. PCR analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in polyclonal processes can yield pseudoclonal bands as an artifact of low B cell number. *J Mol Diagn* 2, 92-96.
- Ellermann, V., Bang, O., 1908. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Centralbl. f. Bakt.* 56, 595-609.
- Endo, Y., Cho, K.W., Nishigaki, K., Momoi, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Goto, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1997. Molecular characteristics of malignant lymphomas in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Immunol Immunopathol* 57, 153-167.
- Felix, C., Poplack, D., Reaman, G., Steinberg, S., Cole, D., Taylor, B., Begley, C., Kirsch, I., 1990. Characterization of immunoglobulin and T-cell receptor gene patterns in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol* 8, 431-442.
- Ferrer, I., Armstrong, J., Capellari, S., Parchi, P., Arzberger, T., Bell, J., Budka, H., Strobel, T., Giaccone, G., Rossi, G., Bogdanovic, N., Fakai, P., Schmitt, A., Riederers, P., Al-Sarraj, S., Ravid, R., Kretschmar, H., 2007. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol* 30, Epublikation.
- Fey, M.F., Wells, R.A., Wainscoat, J.S., Thein, S.L., 1988. Assessment of clonality in gastrointestinal cancer by DNA fingerprinting. *J Clin Invest* 82, 1532-1537.
- Fleischman, J.B., 1966. Immunoglobulins. *Annu Rev Biochem* 35, 835-872.
- Flug, F., Pelicci, P.G., Bonetti, F., Knowles, D.M., 2nd, Dalla-Favera, R., 1985. T-cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3460-3464.
- Fukuhara, S., Rowley, J.D., Variakojis, D., Golomb, H.M., 1979. Chromosome Abnormalities in Poorly Differentiated Lymphocytic Lymphoma. *Cancer Res* 39, 3119-3128.
- Gabor, L.J., Canfield, P.J., Malik, R., 1999. Immunophenotypic and histological characterisation of 109 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J* 77, 436-441.

- Gabor, L.J., Jackson, M.L., Trask, B., Malik, R., Canfield, P.J., 2001a. Feline leukaemia virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 79, 476-481.
- Gabor, L.J., Love, D.N., Malik, R., Canfield, P.J., 2001b. Feline immunodeficiency virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 79, 540-545.
- Garcia-Sanz, R., Lopez-Perez, R., Langerak, A.W., Gonzalez, D., Chillon, M.C., Balanzategui, A., Mateos, M.V., Alaejos, I., Gonzalez, M., Van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., 1999. Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica* 84, 328-335.
- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., Mathis, D., 1993. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261, 1175-1178.
- Gisselbrecht, C., Gaulard, P., Lepage, E., Coiffier, B., Briere, J., Haioun, C., Cazals-Hatem, D., Bosly, A., Xerri, L., Tilly, H., Berger, F., Bouhabdallah, R., Diebold, J., 1998. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Blood* 92, 76-82.
- Giudicelli, V., Lefranc, M.P., 1999. Ontology for immunogenetics: the IMGT-ONTOLOGY. *Bioinformatics* 15, 1047-1054.
- Given, D., Yee, D., Griem, K., Kieff, E., 1979. DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 30, 852-862.
- Gold, M.R., Law, D.A., DeFranco, A.L., 1990. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor. *Nature* 345, 810-813.
- Gonzalez, M., Gonzalez, D., Lopez-Perez, R., Garcia-Sanz, R., Chillon, M.C., Balanzategui, A., Mateos, M.V., Alaejos, I., Langerak, A.W., Orfao, A., Van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., 1999. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica* 84, 779-784.
- Goudie, R.B., 1989. A strategy for demonstrating the clonal origin of small numbers of T lymphocytes in histopathological specimens. *J Pathol* 158, 261-265.
- Goudie, R.B., Karim, S.N., Mills, K., Alcorn, M., Lee, F.D., 1990. A sensitive method of screening for dominant T cell clones by amplification of T cell gamma gene rearrangements with the polymerase chain reaction. *J Pathol* 162, 191-196.
- Grawunder, U., Harfst, E., 2001. How to make ends meet in V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* 13, 186-194.
- Hardy, W.D., Jr., 1981. Haematopoietic tumors of cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 17, 921-940.
- Hardy, W.D., Jr., McClelland, A.J., Zuckerman, E.E., Snyder, H.W., Jr., MacEwen, E.G., Francis, D., Essex, M., 1980. Development of virus non-producer lymphosarcomas in pet cats exposed to FeLV. *Nature* 288, 90-92.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peters, C., Falini, B., Gatter, K.C., et al., 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392.
- Helling, R.B., Goodman, H.M., Boyer, H.W., 1974. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14, 1235-1244.
- Hiom, K., Gellert, M., 1998. Assembly of a 12/23 paired signal complex: a critical control point in V(D)J recombination. *Mol Cell* 1, 1011-1019.
- Hoeve, M.A., Krol, A.D.G., Philippo, K., Derksen, P.W.B., Veenendaal, R.A., Schuurin, E., Kluin, P.M., van Krieken, J.H.J.M., 2000. Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *J Clin Pathol-Mol Path* 53, 194-200.

- Hutson, C.A., Rideout, B.A., Pedersen, N.C., 1991. Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of southern California. *J Am Vet Med Assoc* 199, 1357-1362.
- Inghirami, G., Szabolcs, M.J., Yee, H.T., Corradini, P., Cesarman, E., Knowles, D.M., 1993. Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell non-Hodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 68, 746-757.
- Izzo, V., Costa, M.A., Di Fiore, R., Duro, G., Bellavia, D., Cascone, E., Colombo, P., Gioviale, M.C., Barbieri, R., 2006. Electrophoresis of proteins and DNA on horizontal sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Immun Ageing* 3, 7.
- Jackson, M.L., Wood, S.L., Misra, V., Haines, D.M., 1996. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. *Can J Vet Res* 60, 199-204.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D., 1999. *Immuno Biology: The immune system in health and disease*, 4. Edition. Elsevier.
- Jarrett, W.F., Mackey, L.J., 1974. Neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues. *Bull World Health Organ* 50, 21-34.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76-79.
- Jumaa, H., Hendriks, R.W., Reth, M., 2005. B cell signaling and tumorigenesis. *Annu Rev Immunol* 23, 415-445.
- Jung, D., Alt, F.W., 2004. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116, 299-311.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 24, 541-570.
- Kabat, E., Wu, T., Bilofsky, H., 1979. Evidence supporting somatic assembly of the DNA segments (minigenes), coding for the framework, and complementarity-determining segments of immunoglobulin variable regions. *J Exp Med* 149, 1299-1313.
- Kipar, A., Bellmann, S., Kremendahl, J., Kohler, K., Reinacher, M., 1998. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 65, 243-257.
- Klotz, F., Gathings, W., Cooper, M., 1985. Development and distribution of B lineage cells in the domestic cat: analysis with monoclonal antibodies to cat mu-, gamma-, kappa-, and lambda-chains and heterologous anti-alpha antibodies. *J Immunol* 134, 95-100.
- Knudson, A.G., Jr., 1985. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45, 1437-1443.
- Köhler, K., 2003. Untersuchungen zur Klassifikation maligner Lymphome sowie zur differentiellen Expression von Virusproteinen bei FeLV-positiven malignen Lymphomen der Katze. *Diss Vet Med. Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., Alt, F.W., 1993. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 261, 1171-1175.
- Kreuzer, R., 2005. Charakterisierung des genetischen Defektes der GM1-Gangliosidose beim Alaskan Husky. *Diss Vet Med. Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Lane, P., McConnell, F., Schieven, G., Clark, E., Ledbetter, J., 1990. The role of class II molecules in human B cell activation. Association with phosphatidyl inositol turnover, protein tyrosine phosphorylation, and proliferation. *J Immunol* 144, 3684-3692.
- Lefranc, M.P., 2001. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet* 18, 100-116.

- Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Busin, C., Bodmer, J., Muller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Chaume, D., 1998. IMGT, the International ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 26, 297-303.
- Lennox, E.S., Cohn, M., 1967. Immunoglobulins. *Annu Rev Biochem* 36, 365-406.
- Levy, R., Warnke, R., Dorfman, R., Haimovich, J., 1977. The monoclonality of human B-cell lymphomas. *J Exp Med* 145, 1014-1028.
- Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G.W., Kaschka-Dierich, C., Jehn, U., 1976. Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* 102, 511-530.
- Link, M., Hirschberger, J., 2000. Felines malignes Lymphom: Ergebnisse der Chemotherapie und prognostische Faktoren. *Tierärztl. Prax.* 28 (K), 87 – 93.
- Lorenzen, J., Hansmann, M.-L., R., F., 1994. Klonalitätsnachweis bei lymphoproliferativen Erkrankungen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion. *Pathologie* 15, 96 – 102.
- Louwerens, M., London, C.A., Pedersen, N.C., Lyons, L.A., 2005. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med* 19, 329-335.
- Lu, M., Kawamoto, H., Katsube, Y., Ikawa, T., Katsura, Y., 2002. The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells. *J Immunol* 169, 3519-3525.
- Lyon, M.F., 1988. The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. *Am J Hum Genet* 42, 8-16.
- Maizels, N., 1995. Somatic hypermutation: How many mechanisms diversify V region sequences? *Cell* 83, 9-12.
- Martini, G., Toniolo, D., Vulliamy, T., Luzzatto, L., Dono, R., Viglietto, G., Paonessa, G., D'Urso, M., Persico, M.G., 1986. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Embo J* 5, 1849-1855.
- Mastache, E.F., Lindroth, K., Fernandez, C., Gonzalez-Fernandez, A., 2006. Somatic Hypermutation of Ig Genes is Affected Differently by Failures in Apoptosis Caused by Disruption of Fas (lpr Mutation) or by Overexpression of Bcl-2. *Scand J Immunol* 63, 420-429.
- Matsuo, T., Nomura, J., Kuwahara, K., Igarashi, H., Inui, S., Hamaguchi, M., Kimoto, M., Sakaguchi, N., 1993. Cross-linking of B cell receptor-related MB-1 molecule induces protein tyrosine phosphorylation in early B lineage cells. *J Immunol* 150, 3766-3775.
- Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L., Chenchik, A., 1999. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucl Acids Res* 27, 1558-1560.
- Max, E.E., Seidman, J.G., Leder, P., 1979. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 3450-3454.
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., Oettinger, M.A., 1995. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387-395.
- McCarthy, K., Sloane, J., Kabarowski, J., Matutes, E., Wiedemann, L., 1991. The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 138, 821-828.
- McCarthy, K.P., 1997. Molecular diagnosis of lymphomas and associated diseases. *Cancer Metastasis Rev* 16, 109-125.
- McCarthy, K.P., Sloane, J.P., Wiedemann, L.M., 1990. Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 43, 429-432.
- Medeiros, L.J., Carr, J., 1999. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 123, 1189-1207.

- Melnyk, A., Rodriguez, A., Pugh, W.C., Cabannillas, F., 1997. Evaluation of the Revised European-American Lymphoma classification confirms the clinical relevance of immunophenotype in 560 cases of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89, 4514-4520.
- Menotti-Raymond, M.A., David, V.A., Wachter, L.L., Butler, J.M., O'Brien, S.J., 2005. An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *J Forensic Sci* 50, 1061-1070.
- Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F.E., 2006. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Momoi, Y., Nagase, M., Okamoto, Y., Okuda, M., Sasaki, N., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1993. Rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in canine lymphoma/leukemia cells. *J Vet Med Sci* 55, 775-780.
- Mooney, S.C., Patnaik, A.K., Hayes, A.A., MacEwen, E.G., 1987. Generalized lymphadenopathy resembling lymphoma in cats: six cases (1972-1976). *J Am Vet Med Assoc* 190, 897-900.
- Moore, P.F., Woo, J.C., Vernau, W., Kosten, S., Graham, P.S., 2005. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 167-178.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Murphy, F.A., Gibbs, E., Horzinek, M.C., Studdert, M., 1999. *Veterinary virology*, 3 Edition. Academic Press.
- Neil, J.C., Forrest, D., Doggett, D.L., Mullins, J.I., 1987. The role of feline leukaemia virus in naturally occurring leukaemias. *Cancer Surv* 6, 117-137.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., Baltimore, D., 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.
- Patterson-Kane, J.C., Kugler, B.P., Francis, K., 2004. The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *J Comp Pathol* 130, 220-222.
- Pedersen, N.C., Barlough, J.E., 1991. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *J Am Vet Med Assoc* 199, 1298-1305.
- Raab-Traub, N., Flynn, K., 1986. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 47, 883-889.
- Rabbitts, T.H., 1978. Evidence for splicing of interrupted immunoglobulin variable and constant region sequences in nuclear RNA. *Nature* 275, 291-296.
- Ramasamy, I., Brisco, M., Morley, A., 1992. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 45, 770-775.
- Rast, J.P., Litman, G.W., 1994. T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9248-9252.
- Reichard, K.K., McKenna, R.W., Kroft, S.H., 2003. Comparative analysis of light chain expression in germinal center cells and mantle cells of reactive lymphoid tissues. A four-color flow cytometric study. *Am J Clin Pathol* 119, 130-136.
- Reinacher, M., 1997. Praxisrelevante Tumoren bei der Katze. *Prakt. Tierarzt, coll. vet.* XXVII, 10 - 12.
- Reinacher, M., Theilen, G., 1987. Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am J Vet Res* 48, 939-945.

- Reinacher, M., Wittmer, G., Koberstein, H., Failing, K., 1995. Untersuchungen zur Bedeutung der FeLV-Infektion für Erkrankungen bei Sektionskatzen. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 108, 58 - 60.
- Reth, M., 1992. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10, 97-121.
- Rezuke, W.N., Abernathy, E.C., Tsongalis, G.J., 1997. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin Chem* 43, 1814-1823.
- Rohn, J.L., Overbaugh, J., 1995. In vivo selection of long terminal repeat alterations in feline leukemia virus-induced thymic lymphomas. *Virology* 206, 661-665.
- Roth, D.B., Menetski, J.P., Nakajima, P.B., Bosma, M.J., Gellert, M., 1992. V(D)J recombination: broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. *Cell* 70, 983-991.
- Roth, D.B., Zhu, C., Gellert, M., 1993. Characterization of broken DNA molecules associated with V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10788-10792.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., Tonegawa, S., 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280, 288-294.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., Baltimore, D., 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.
- Schiffer, M., Girling, R.L., Ely, K.R., Edmundson, A.B., 1973. Structure of a lambda-type Bence-Jones protein at 3.5-Å resolution. *Biochemistry* 12, 4620-4631.
- Schlüssel, M., Constantinescu, A., Morrow, T., Baxter, M., Peng, A., 1993. Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev* 7, 2520-2532.
- Schmidt, V., Horzinek, M.C., (Hrsg), 1992. *Krankheiten der Katze*. Bd. 1, Gustav Fischer Verlag.
- Secker-Walker, L.M., 1985. The meaning of a clone. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 16, 187-188.
- Segal, G.H., Jorgensen, T., Masih, A.S., Braylan, R.C., 1994a. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: I. Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type. *Hum Pathol* 25, 1269-1275.
- Segal, G.H., Jorgensen, T., Scott, M., Braylan, R.C., 1994b. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II. Follicular lymphomas. *Hum Pathol* 25, 1276-1282.
- Segal, G.H., Wittwer, C.T., Fishleder, A.J., Stoler, M.H., Tubbs, R.R., Kjeldsberg, C.R., 1992. Identification of monoclonal B-cell populations by rapid cycle polymerase chain reaction. A practical screening method for the detection of immunoglobulin gene rearrangements. *Am J Pathol* 141, 1291-1297.
- Seide, R.K., Kehoe, J.M., 1983. The genetic control of antibody formation. *Vet Immunol Immunopathol* 4, 3-42.
- Seidman, J.G., Leder, A., Edgell, M.H., Polsky, F., Tilghman, S.M., Tiemeier, D.C., Leder, P., 1978. Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 3881-3885.
- Serth, J., Kuczyk, M.A., Paeslack, U., Lichtinghagen, R., Jonas, U., 2000. Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *Am J Pathol* 156, 1189-1196.

- Shapiro, G.S., Aviszus, K., Ikle, D., Wysocki, L.J., 1999. Predicting regional mutability in antibody V genes based solely on di- and trinucleotide sequence composition. *J Immunol* 163, 259-268.
- Shaw, S.E., Robertson, I.D., Robinson, W.F., Alexander, R., Sutherland, R.J., 1990. Feline immunodeficiency virus: disease associations. *Aust Vet Practit* 20, 194 – 198.
- Sherding, R.G., 1994. *The Cat: Diseases and Clinical Management*, Vol 1, 2nd Edition. Churchill Livingstone.
- Shi, S.-R., Datar, R., Liu, C., Wu, L., Zhang, Z., Cote, R.J., Taylor, C.R., 2004. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol* 122, 211-218.
- Shigehiko Ishihara, S.O., Hiroshi Wakiguchi, Takano Kurashige, Kanji Hirai, Keisei Kawa-Ha., 1997. Clonal lymphoproliferation following chronic active Epstein-Barr virus infection and hypersensitivity to mosquito bites. *Am J Hematol* 54, 276-281.
- Signoretti, S., Murphy, M., Cangi, M.G., Puddu, P., Kadin, M.E., Loda, M., 1999. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction and nonradioactive single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 154, 67-75.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S., 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161, 1961-1971.
- Szczepanski, T., Willemse, M.J., van Wering, E.R., van Weerden, J.F., Kamps, W.A., van Dongen, J.J., 2001. Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 15, 1415-1423.
- Takemoto, S., Matsuoka, M., Yamaguchi, K., Takatsuki, K., 1994. A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. *Blood* 84, 3080-3085.
- Terry, A., Callanan, J.J., Fulton, R., Jarrett, O., Neil, J.C., 1995. Molecular analysis of tumours from feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: an indirect role for FIV? *Int J Cancer* 61, 227-232.
- Tizard, I.R., 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*, 7 Edition. Saunders.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tonegawa, S., Maxam, A.M., Tizard, R., Bernard, O., Gilbert, W., 1978. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 1485-1489.
- Trainor, K.J., Brisco, M.J., Story, C.J., Morley, A.A., 1990. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75, 2220-2222.
- Vail, D.M., Moore, A.S., Ogilvie, G.K., Volk, L.M., 1998. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med* 12, 349-354.
- Valli, V.E., Jacobs, R.M., Norris, A., Couto, C.G., Morrison, W.B., McCaw, D., Cotter, S., Ogilvie, G., Moore, A., 2000. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Invest* 12, 295-306.
- Valli, V.E., Jacobs, R.M., Parodi, A.L., Vernau, W., Moore, P.F., 2002. *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals: Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals.*, Vol VIII. Armed Force Institut of Pathology, American Registry of Pathology.

- Valli, V.E., McSherry, B.J., Dunham, B.M., Jacobs, R.M., Lumsden, J.H., 1981. Histocytology of lymphoid tumors in the dog, cat and cow. *Vet Pathol* 18, 494-512.
- van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Bruggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurink, 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, 2257-2317.
- van Gent, D.C., McBlane, J.F., Ramsden, D.A., Sadofsky, M.J., Hesse, J.E., Gellert, M., 1995. Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system. *Cell* 81, 925-934.
- Varmus, H., 1988. Retroviruses. *Science* 240, 1427-1435.
- Vernau, W., Moore, P.F., 1999. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 69, 145-164.
- Wainscoat, J.S., Fey, M.F., 1990. Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res* 50, 1355-1360.
- Waldmann, T.A., 1987. The arrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv Immunol* 40, 247 – 321.
- Wall, R., Kuehl, M., 1983. Biosynthesis and Regulation of Immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 1, 393-422.
- Walling, D.M., Andritsos, L.A., Etienne, W., Payne, D.A., Aronson, J.F., Flaitz, C.M., Nichols, C.M., 2004. Molecular markers of clonality and identity in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disease. *J Med Virol* 74, 94-101.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506-513.
- Wan, J.H., Trainor, K.J., Brisco, M.J., Morley, A.A., 1990. Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 43, 888-890.
- Wang, J., Kyaw-Tanner, M., Lee, C., Robinson, W.F., 2001. Characterisation of lymphosarcomas in Australian cats using polymerase chain reaction and immunohistochemical examination. *Aust Vet J* 79, 41-46.
- Weiss, A., 2007. Untersuchungen zur Klassifikation maligner Lymphome sowie zur differentiellen Expression von Virusproteinen bei FeLV-positiven malignen Lymphomen der Katze. *Diss Vet Med. Justus-Liebig-Universität, Giessen.*
- Werner, J.A., Woo, J.C., Vernau, W., Graham, P.S., Grahn, R.A., Lyons, L.A., Moore, P.F., 2005. Characterization of Feline Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes for the Molecular Diagnosis of B-cell Neoplasia. *Vet Pathol* 42, 596-607.
- Williamson, A.R., 1976. The Biological Origin of Antibody Diversity. *Annu Rev Biochem* 45, 467-500.
- Wu, F.-Y., Iijima, K., Tsujimoto, H., Tamura, Y., Higurashi, M., 1995. Chromosomal translocations in two feline T-cell lymphomas. *Leuk Res* 19, 857-860.
- Wu, T.T., Kabat, E.A., 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132, 211-250.
- Wu, T.T., Kabat, E.A., Bilofsky, H., 1979. Some sequence similarities among cloned mouse DNA segments that code for lambda and kappa light chains of immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4617-4621.

8 Anhang

8.1 Verwendete Längenstandards

8.1.1 pUC19/MspI

Für die Herstellung des DNS-Längenstandards pUC19/*MspI* wurde ein zirkuläres Plasmid des Typs pUC19 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) den Angaben des Herstellers folgend in Library Efficiency[®] DH5 α [™] Cells (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Diese wurden über Nacht auf Agarplatten angezchtet.

Eine blaue Kolonie wurde nach Überführung in 100 ml LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert.

Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit isoliert (s. 3.7.7) und aufgereinigt. Aus der Plasmid-DNS-Lösung konnte die DNS mit einem Zehntel Volumen Natriumacetat und dem gleichen Volumen 100%igem Isopropanol gefällt werden. Die Rehydrierung des so entstandenen und luftgetrockneten Pellets erfolgte mit einer der Größe des Pellets angemessenen Menge 0,5 × Tris-Puffer (Zugabe von Puffer bis zur Lösung des Pellets). Nach der photometrischen Bestimmung der DNS-Konzentration wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease *MspI* (Fermentas, St. Leon-Rot) unter Standardbedingungen gespalten. Nach Deaktivieren des Enzyms durch Inkubation für 20 Minuten bei 65 °C wurde der Ansatz mit 0,5 × Tris-Puffer (s. 8.15.2.3) auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l eingestellt und mit der unter 8.15.2.4 beschriebenen Lösung zum Laden der Geltaschen unter Verwendung von Xylenzyanol als Farbstoff versetzt.

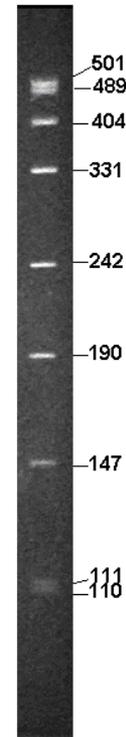


Abbildung 40:
pUC19/*MspI* mit Angabe der Länge der verschiedenen Banden in Basenpaaren.

8.1.2 MF

Der Längenstandard MF beruht auf dem Plasmid pCR2.1 aus dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Karlsruhe). Die entstehenden Fragmentgrößen wurden anhand der durch den Hersteller angegebenen Sequenz mit dem Programm DNAsis 6.00 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, USA) bestimmt. Das Plasmid wurde nach Herstellerangaben in die effizienten DH5 α Zellen des Kits transformiert. Anzucht und Plasmidisolation erfolgten wie unter 3.7.7 angegeben. Von dem isolierten Plasmid wurden 60 % mit der Restriktionsendonuklease *Hinf*I und 40 % mit *Rsa*I unter Standardbedingungen verdaut. Nach Deaktivieren der Enzyme durch Inkubation für 20 Minuten bei 65 °C erfolgte die Vermischung beider Ansätze untereinander und mit der unter 8.15.2.4 beschriebenen Lösung zum Laden der Geltaschen unter Verwendung von Bromphenolblau als Farbstoff.

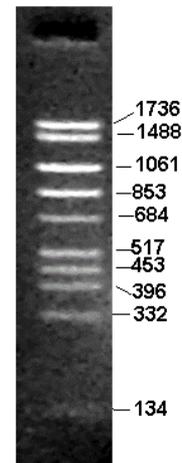
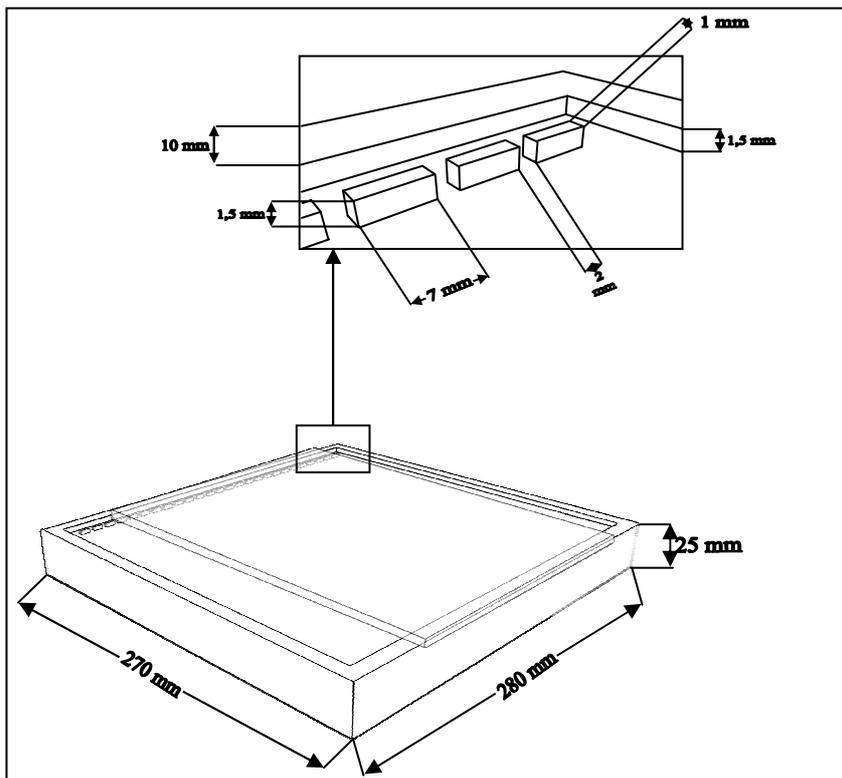


Abbildung 41:

Längenstandard MF mit Angabe der Länge der einzelnen Banden in Basenpaaren.

8.2 Gießblock für die horizontale SDS-PAGE

Abbildung 42: Schemazeichnung des Gießblockes für die horizontale SDS-PAGE



8.3 Tagebuchnummern, Art der Fixierung und DNS-Isolierung

FFPE: Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe

Amp: Amplifikation

(Amp): Schwache Amplifikation

kAmp: Keine Amplifikation

n.d.: Nicht durchgeführt

Tabelle 59: Isolierte DNS-Proben

| Tagebuchnummer | Art der Fixierung | Isolierungsmethode | 300 bp amplifizierbar | 100 bp amplifizierbar |
|------------------------|-------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| B-Zell-Lymphome | | | | |
| 380/89 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | kAmp |
| 2071/89 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | kAmp |
| 1895/90 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 2802/92 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | Amp |
| 2847/92 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 3020/92 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| 2137/92 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 512/93 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 1107/94 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | kAmp |
| 1925/94 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 3166/94 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| 1014/95 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | Amp |
| 2047/95 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 817/97 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 940/97 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | (Amp) |
| 1300/97 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 2253/97 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 2467/97 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 2655/97 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | kAmp |
| 197/98 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex | Amp | n.d.* |

Anhang

Tabelle 59: Isolierte DNS-Proben (Fortsetzung)

| Tagebuch- nummer | Art der Fixierung | Isolierungsmethode | 300 bp amplifizierbar | 100 bp amplifizierbar |
|----------------------------------|----------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| | | 100/Chloroform | | |
| 1852/98 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| 2130/99 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 1550/00 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | (Amp) |
| S1003/04 | Frischmaterial | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| T383/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| T2415/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| T3429/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| T7795/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | (Amp) | n.d.* |
| S509/06 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | (Amp) |
| T1009/06 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| 3597/06 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| T7192/06 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| T1528/07 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| Lymphatische Hyperplasien | | | | |
| S1592/04 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | Amp |
| T273/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | Amp | n.d.* |
| S407/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| T630/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | Amp | n.d.* |
| T847/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | Amp | n.d.* |
| T878/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| S895/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | kAmp |
| S1033/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S1037/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S1132/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S1408/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S1412/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| T1600/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| T3171/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |

Anhang

Tabelle 59: Isolierte DNS-Proben (Fortsetzung)

| Tagebuchnummer | Art der Fixierung | Isolierungsmethode | 300 bp amplifizierbar | 100 bp amplifizierbar |
|------------------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| T3746/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | (Amp) | Amp |
| T5322/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | kAmp |
| T5391/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | kAmp |
| T6950/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | Amp | n.d.* |
| T7547/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | (Amp) |
| T7876/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| T8154/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| T8216/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| T8549/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| T8638/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| T8831/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| T8920/05 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| T7426/06 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| T7558/06 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S345/07 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| S348/07 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | Amp | n.d.* |
| T-Zell-Lymphome | | | | |
| 758/89 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | kAmp |
| 1768/89 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | kAmp |
| 1584/90 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | (Amp) | kAmp |
| 1945/90 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 2155/90 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 280/92 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 1357/92 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 93/93 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 761/93 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 217/94 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | Amp | n.d.* |
| 1883/94 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | Amp | n.d.* |
| 835/95 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex | (Amp) | Amp |

Tabelle 59: Isolierte DNS-Proben (Fortsetzung)

| Tagebuchnummer | Art der Fixierung | Isolierungsmethode | 300 bp amplifizierbar | 100 bp amplifizierbar |
|-----------------------|--------------------------|--|------------------------------|------------------------------|
| | | 100/Chloroform | | |
| 15/96 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | (Amp) | Amp |
| 394/97 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 908/98 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 1989/98 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | (Amp) | Amp |
| 358/99 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| 1379/99 | FFPE | Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform | kAmp | Amp |
| S156/03 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S915/03 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S886/04 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S1205/04 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S1771/04 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | (Amp) |
| S1017/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | Amp |
| T3558/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | Amp |
| T4261/05 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| S372/06 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | kAmp |
| T781/07 | FFPE | Puregene® DNA Purification Kit | kAmp | Amp |

*eine Amplifikation des 100 bp-großen Fragmentes war nur notwendig, wenn die Amplifikation des 300 bp-großen Fragmentes mißlang.

8.4 Tagebuchnummern, Rasse, Alter und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe

(Proben aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig sind mit einem „L“ gekennzeichnet)

EKH: Europäisch Kurzhaar, BKH: Britisch Kurzhaar, w: weiblich, m: männlich, wk: weiblich-kastriert, mk: männlich-kastriert, Mo: Monate, k.a.: keine Angabe

Tabelle 60: Tagebuchnummer, Rasse, Alter (in Jahren, soweit nicht anders angegeben) und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe

| Tagebuchnummer | Rasse | Alter | Geschlecht | Lokalisation |
|------------------------|------------|-------|------------|-----------------|
| B-Zell-Lymphome | | | | |
| 380/89 L | EKH | 12 | w | Darm |
| 2071/89 L | k.a. | k.a. | k.a. | Darm |
| 1895/90 L | EKH | 10 | m | Darm |
| 2802/92 L | EKH | 8 | wk | Niere |
| 2847/92 L | EKH | 2 | wk | Darm |
| 3020/92 L | EKH | k.a. | w | Niere |
| 2137/92 L | EKH | k.a. | w | Niere |
| 512/93 L | EKH | ad. | w | Lymphknoten |
| 1107/94 L | EKH | ad. | k.a. | Niere |
| 1925/94 L | EKH | k.a. | k.a. | Thymus |
| 3166/94 L | EKH | 2 | w | Lymphknoten |
| 1014/95 L | EKH | 6 | w | Niere |
| 2047/95 L | EKH | k.a. | k.a. | Darm |
| 817/97 L | EKH | 7 | mk | Darm |
| 1300/97 L | EKH | 3 | mk | Thymus |
| 940/97 L | EKH | 3 | mk | Darm |
| 2253/97 L | EKH | 7 | wk | Darm |
| 2467/97 L | EKH | 15 | w | Niere |
| 2655/97 L | EKH | adult | mk | Thymus |
| 197/98 L | EKH/Perser | 7 | w | Darm |
| 1852/98 | EKH | 3 | wk | Lymphknoten |
| 2130/99 | EKH | 19 | mk | Darm |
| 1550/00 | EKH | 16 | mk | Thymus |
| S1003/04 | Siam | 13 | m | Pankreas |
| T383/05 | k.a. | 14 | wk | Niere |
| T2415/05 | wk | ka | 12a | Darm |
| T3429/05 | k.a. | 15 | wk | Magen |
| T7795/05 | ka | 10 | m | Auge |
| S509/06 | EKH | 14 | wk | Lymphknoten |
| T1009/06 | EKH | 15 | wk | Vordergliedmaße |
| T3597/06 | EKH | 16 Mo | k.a. | Niere |
| T7192/06 | EKH | 3 | mk | Lymphknoten |
| T1528/07 | EKH | 3 | m | Niere |

Tabelle 60: Tagebuchnummer, Rasse, Alter (in Jahren, soweit nicht anders angegeben) und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe (Fortsetzung)

| Tagebuchnummer | Rasse | Alter | Geschlecht | Lokalisation |
|----------------------------------|--------------|-------|------------|--------------|
| Lymphatische Hyperplasien | | | | |
| S1592/04 | EKH | 8 | m | Milz |
| T273/05 | BKH | 3 | mk | Lymphknoten |
| S408/05 | EKH | 5 | mk | Lymphknoten |
| T630/05 | EKH | 2 | k.a. | Lymphknoten |
| T847/05 | EKH | 14 | mk | Lymphknoten |
| T878/05 | EKH | 15 | wk | Lymphknoten |
| S895/05 | Abessiner | 4 | mk | Milz |
| S1033/05 | Türk. Angora | 5 | wk | Milz |
| S1037/05 | EKH | 1 | wk | Lymphknoten |
| T1132/05 | k.a. | 3,5 | m | Lymphknoten |
| S1408/05 | EKH | 3 Mo | w | Milz |
| S1412/05 | Karhäuser | 16 Mo | w | Milz |
| T1600/05 | EKH | 7 Mo | w | Milz |
| T3171/05 | EKH | 7 Mo | wk | Lymphknoten |
| T3746/05 | EKH | 1 | w | Lymphknoten |
| T5322/05 | Siam-Mix | 12 | wk | Lymphknoten |
| T5391/05 | Maine-Coon | 1 | mk | Lymphknoten |
| T6950/05 | EKH | 2 | mk | Lymphknoten |
| T7547/05 | EKH | 14 | w | Milz |
| T7876/05 | k.a. | 8 | m | Lymphknoten |
| T8154/05 | EKH | 8 | mk | Lymphknoten |
| T8216/05 | EKH | 10 | mk | Lymphknoten |
| T8549/05 | EKH | 12 | w | Lymphknoten |
| T8638/05 | EKH | 1 | m | Lymphknoten |
| T8831/05 | EKH | 1 | w | Lymphknoten |
| T8920/05 | EKH | 11 | mk | Lymphknoten |
| T7426/06 | EKH | 1 | m | Lymphknoten |
| T7558/06 | EKH | 6 Mo | m | Lymphknoten |
| S345/07 | BKH | 9 | wk | Milz |
| S348/07 | k.a. | 1 | m | Milz |
| T-Zell-Lymphome | | | | |
| 758/89 L | EKH | 8 | m | Thymus |
| 1768/89 L | Perser | 5 | mk | Thymus |
| 1584/90 L | EKH | 8 | mk | Thymus |
| 1945/90 L | Perser | 5 | mk | Niere |
| 2155/90 L | EKH | 12 | mk | Darm |
| 280/92 L | EKH | 10 | wk | Darm |
| 1357/92 L | EKH | 10 | mk | Lymphknoten |
| 93/93 L | EKH | 13 | mk | Darm |
| 761/93 L | Siam | 2 | w | Thymus |
| 217/94 L | EKH | 0,75 | w | Thymus |
| 1883/94 L | EKH | adult | m | Darm |
| 835/95 L | Perser | 5 | wk | Thymus |
| 15/96 L | EKH | 8 Mo | m | Darm |
| 394/97 L | EKH | 2 | m | Thymus |
| 908/98 | EKH | 3 | mk | Thymus |
| 1989/98 | EKH | 7,5 | wk | Darm |

Tabelle 60: Tagebuchnummer, Rasse, Alter (in Jahren, soweit nicht anders angegeben) und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe (Fortsetzung)

| Tagebuchnummer | Rasse | Alter | Geschlecht | Lokalisation |
|-----------------------|--------------|--------------|-------------------|---------------------|
| 358/99 | EKH | 8 Mo | w | Lymphknoten |
| 1379/99 | EKH | 15 | wk | Darm |
| S156/03 | EKH | 5 | wk | Thymus |
| S915/03 | EKH | 7 | mk | Niere |
| S880/04 | k.a. | k.a. | wk | Thymus |
| S1205/04 | EKH | k.a. | w | Niere |
| S1771/04 | EKH | 1,5 | w | Thymus |
| S1017/05 | EKH | 8 | mk | Niere |
| T3558/05 | k.a. | 14 | w | Flanke |
| T4261/05 | EKH | 9 | mk | Lunge |
| S372/06 | k.a. | 1 | m | Darm |
| T781/07 | k.a. | 11 | wk | Nacken |

8.5 Histologie der mit dem Diagnostiksystem untersuchten B-Zell-Lymphome

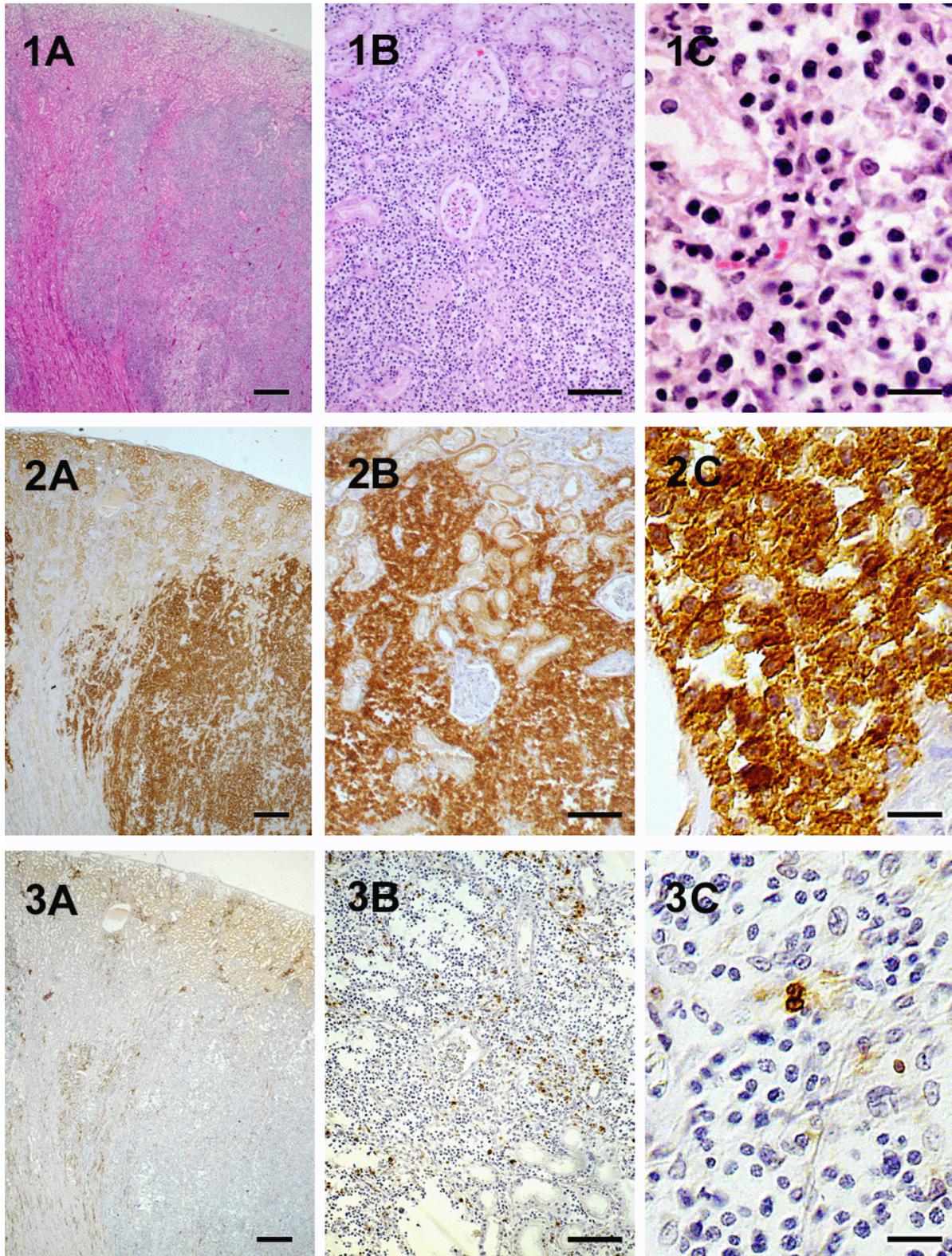


Abbildung 43: 3020/92

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergroößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

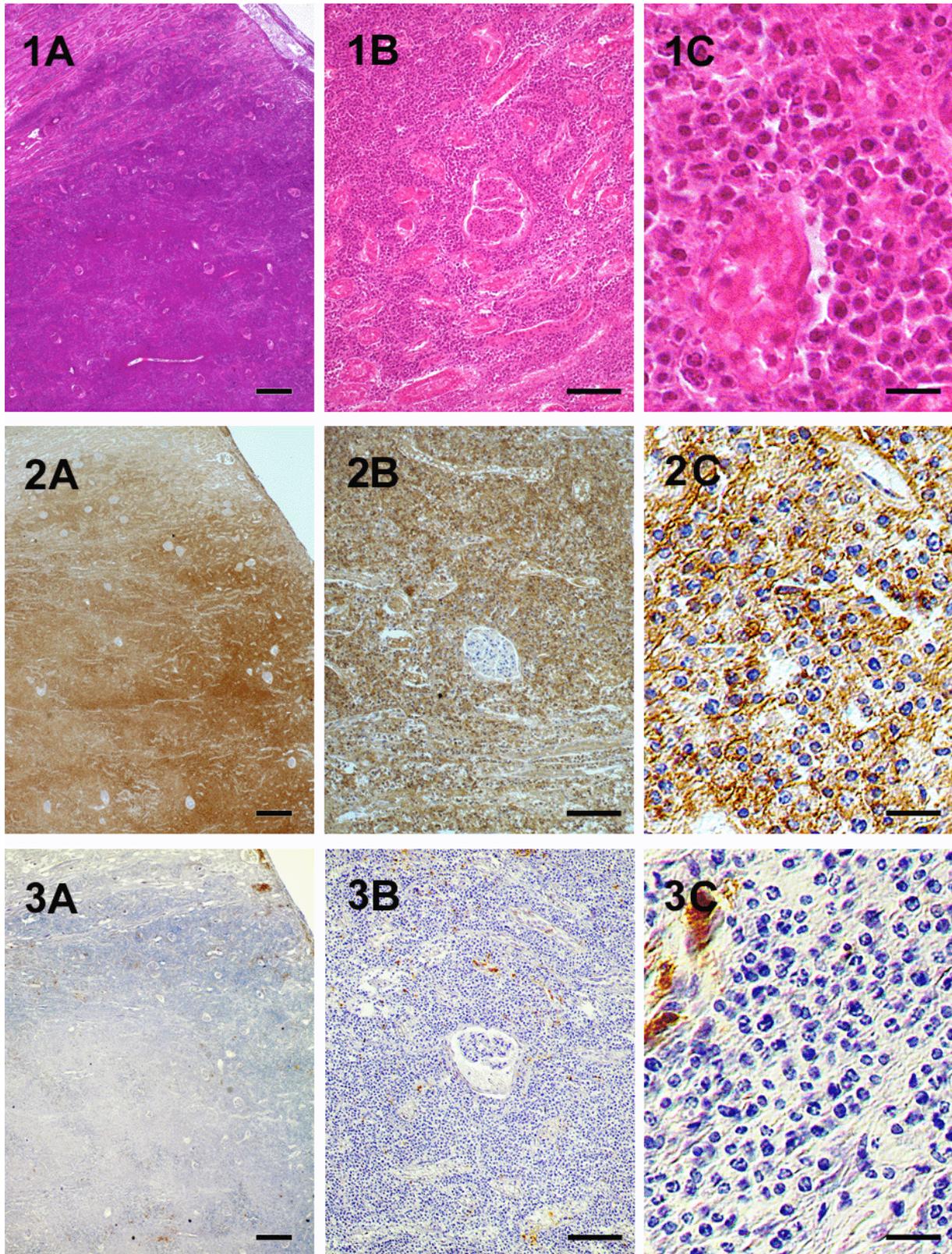


Abbildung 44: T3597/06

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 μm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 μm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 μm)

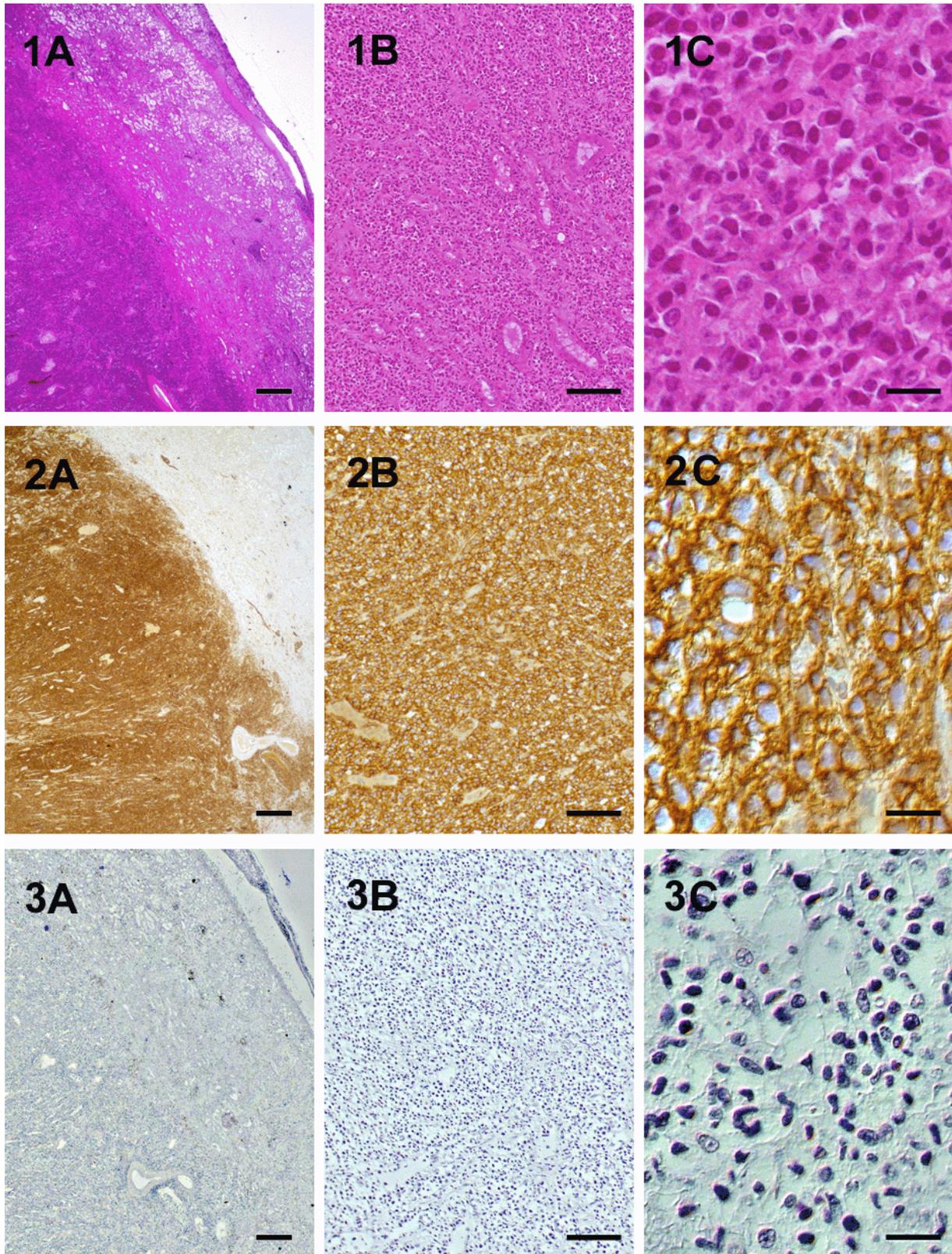


Abbildung 45: T383/05

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

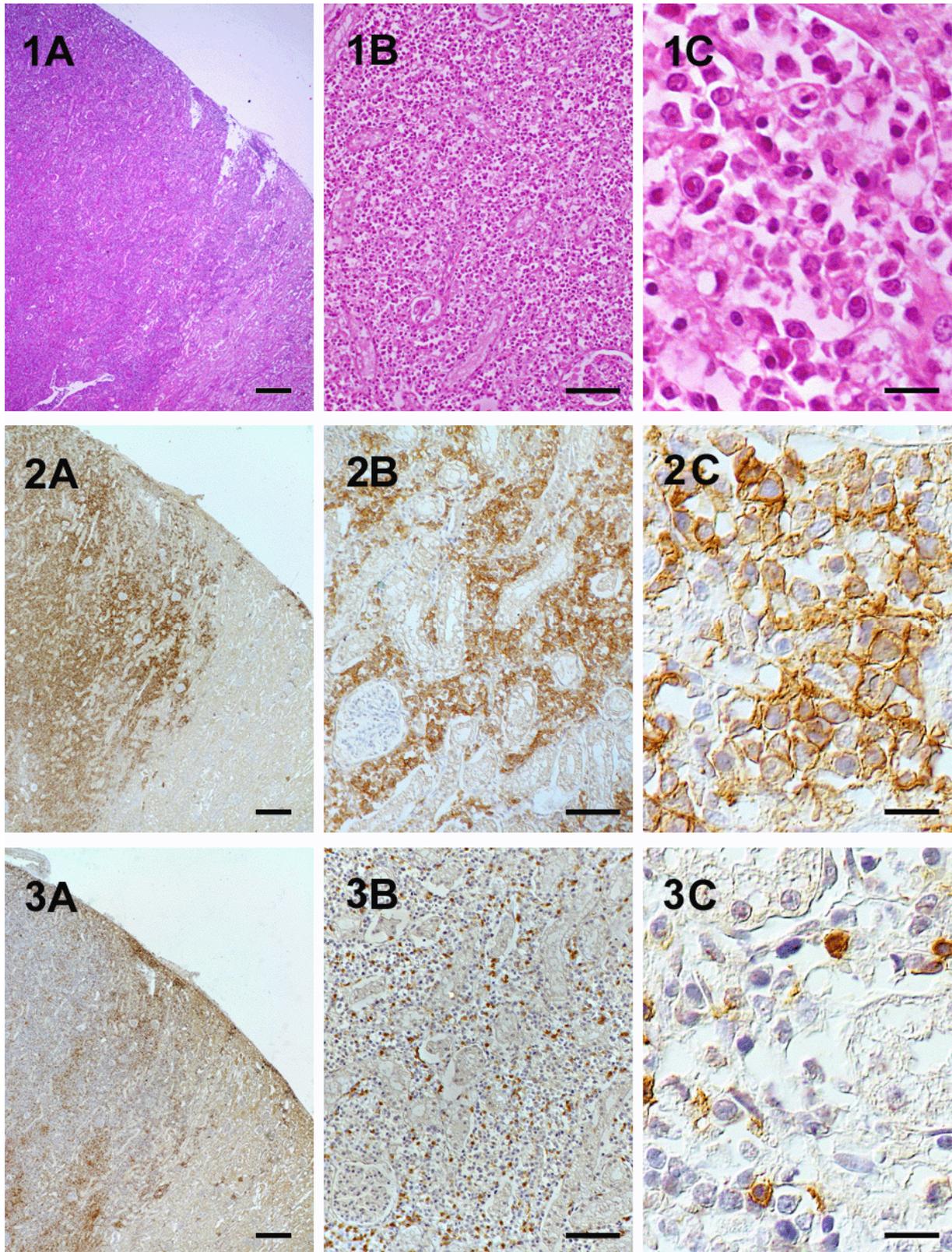


Abbildung 46: T1528/07

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

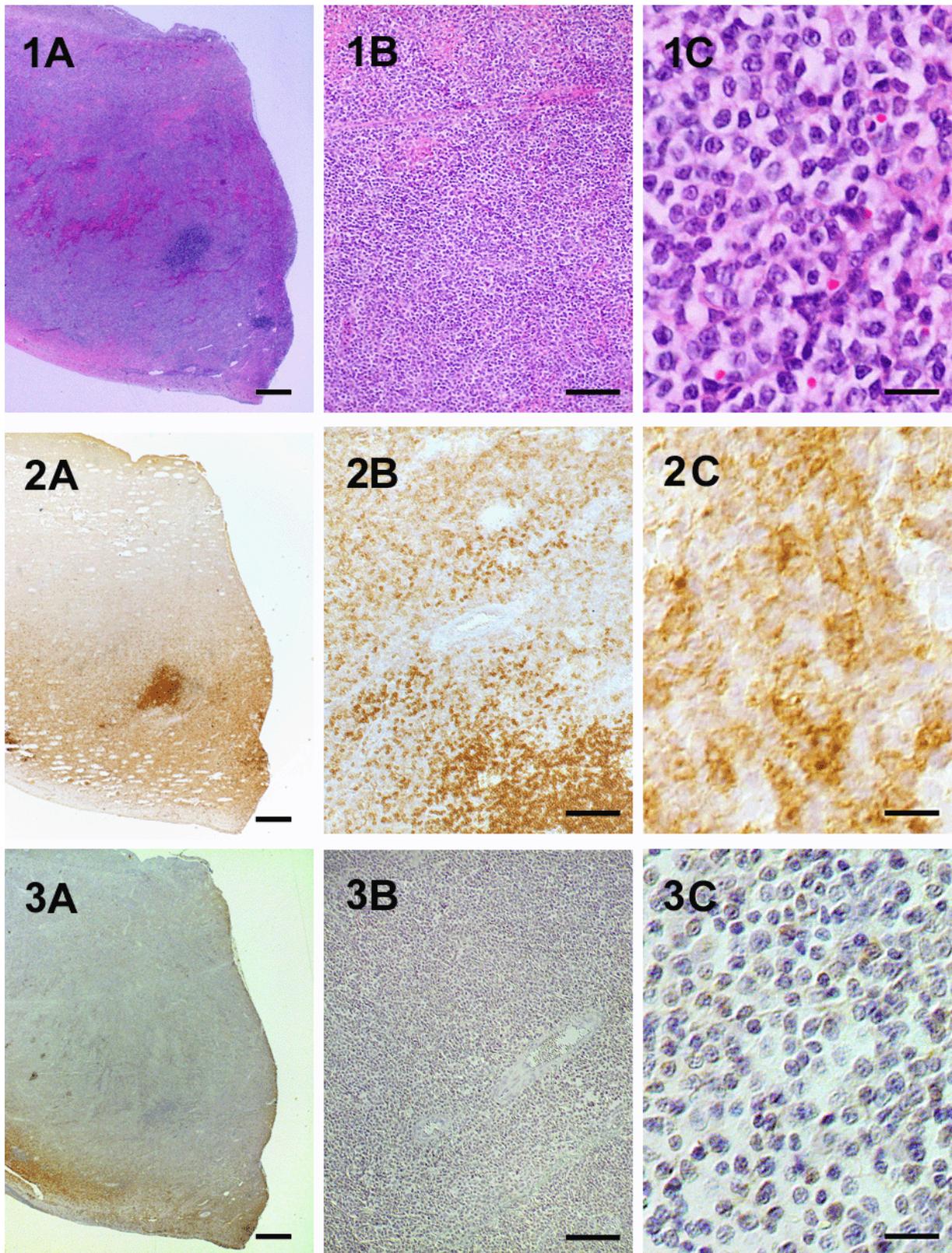


Abbildung 47: 2253/97

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

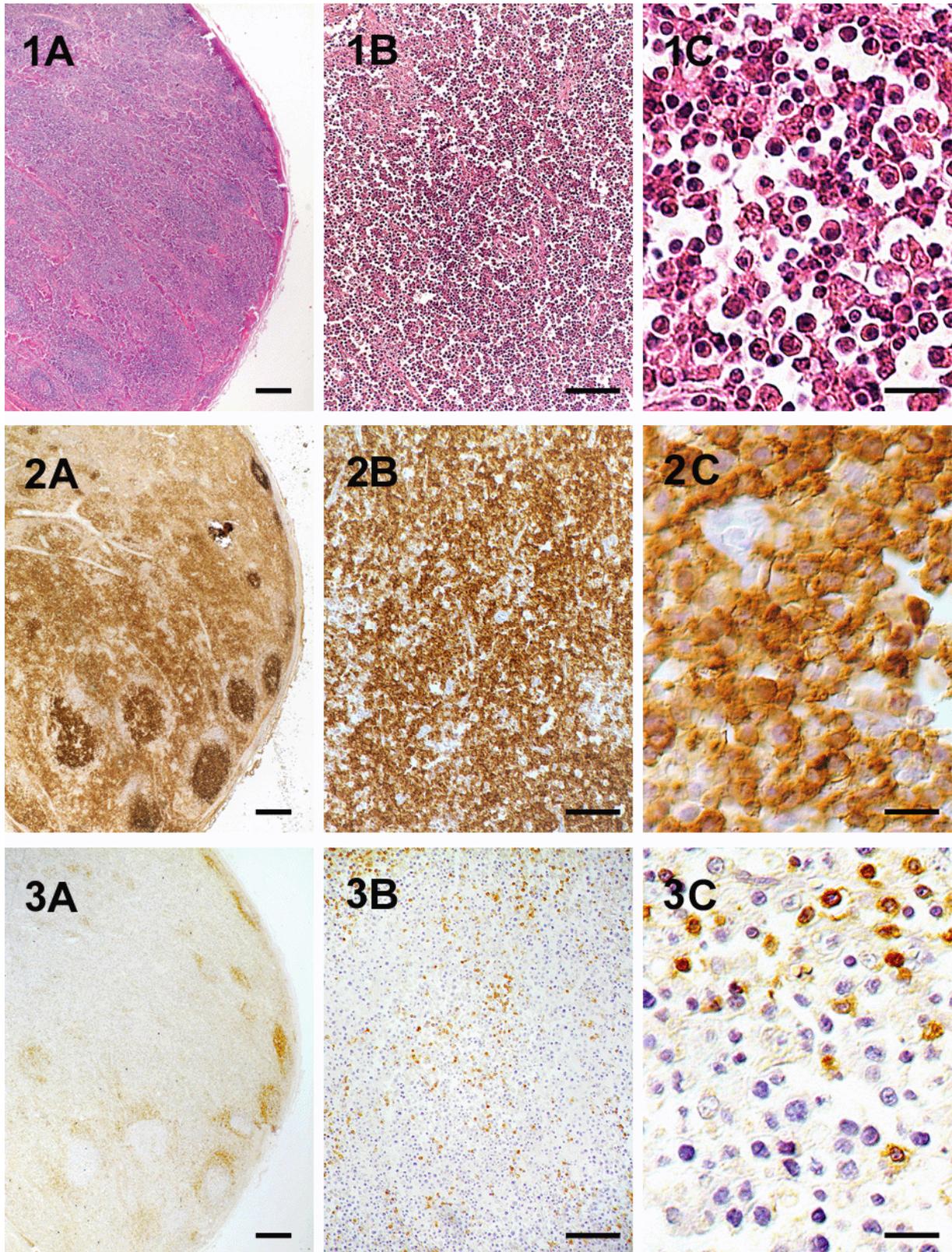


Abbildung 48: 2047/95

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

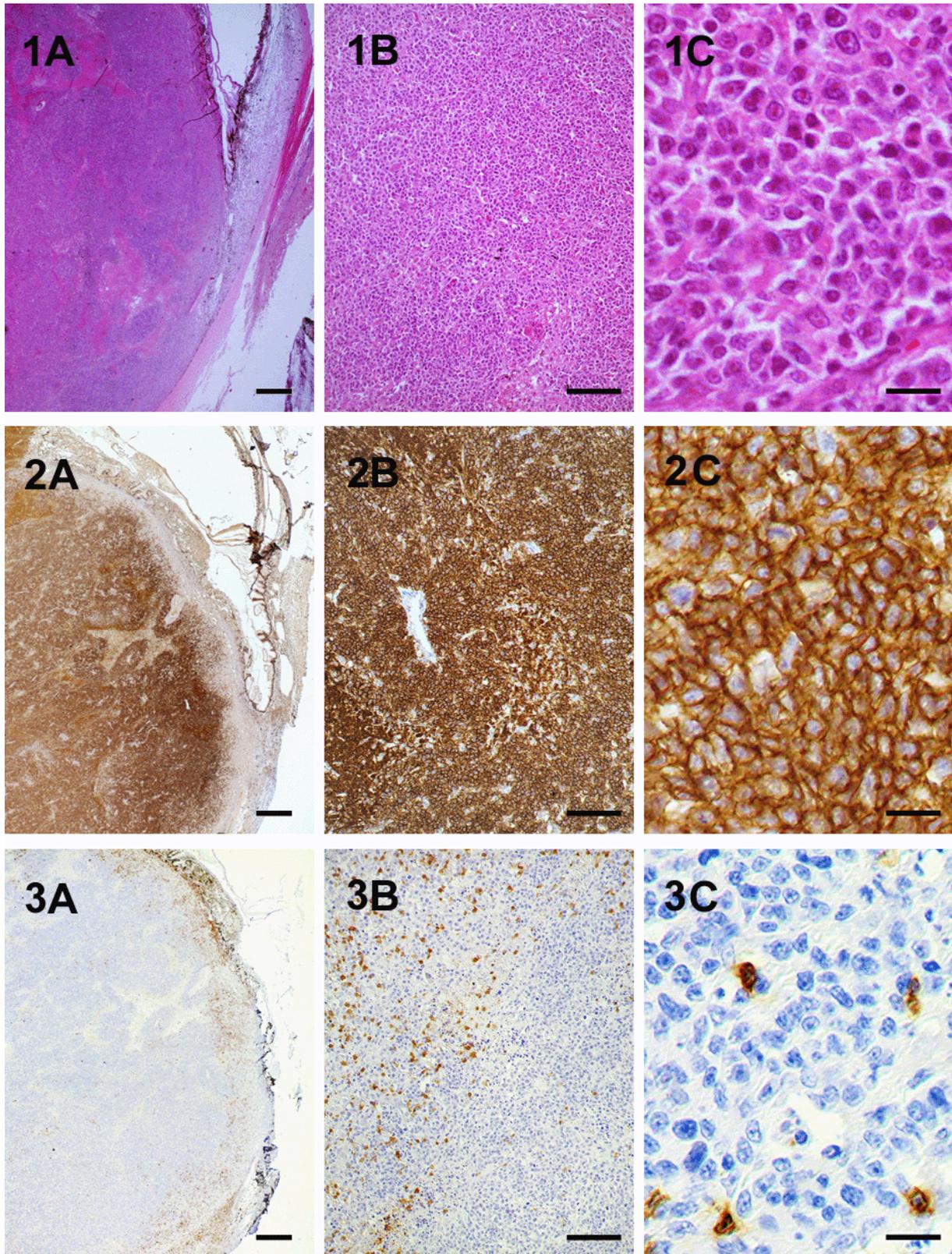


Abbildung 49: T7795/05

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

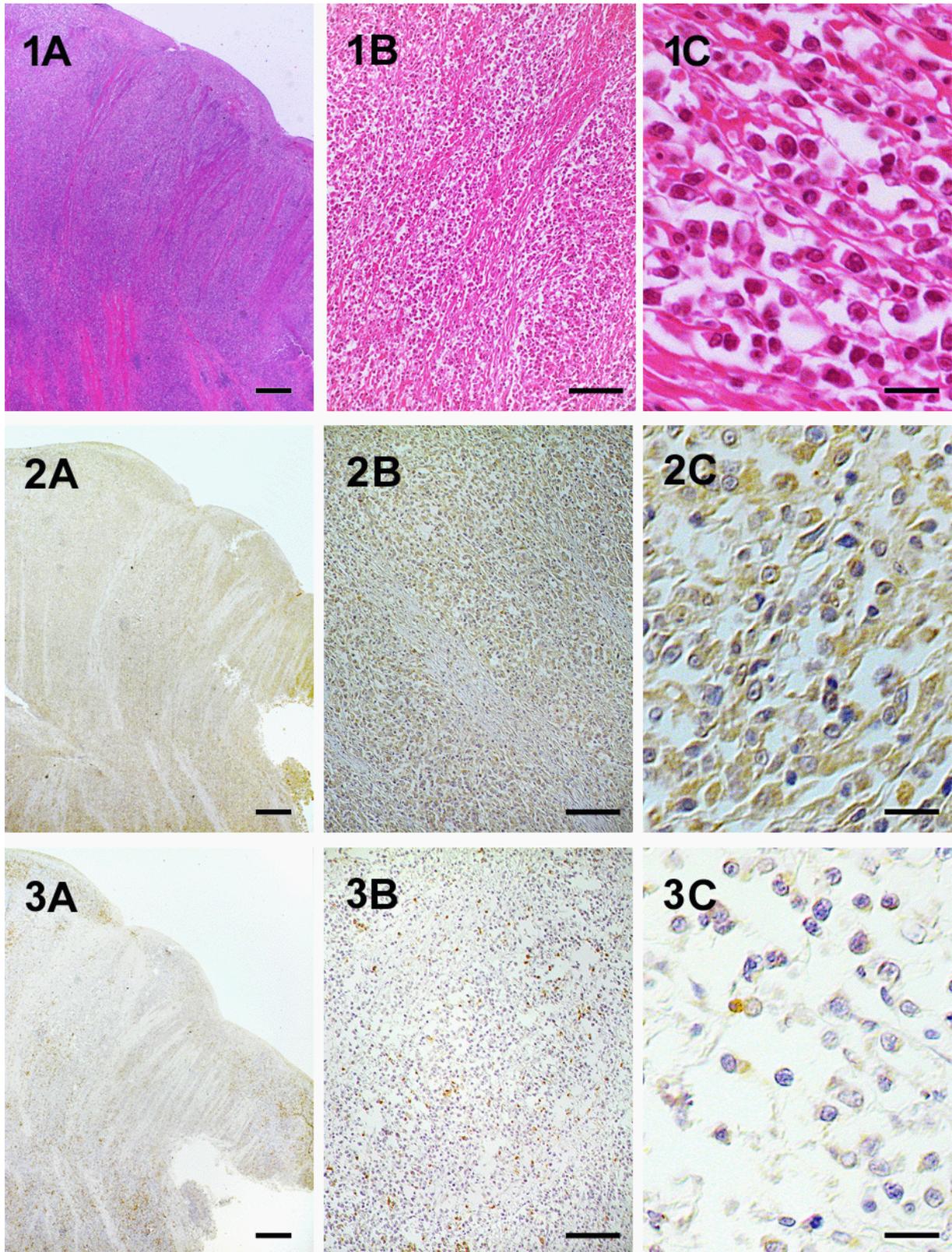


Abbildung 50: 940/97

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

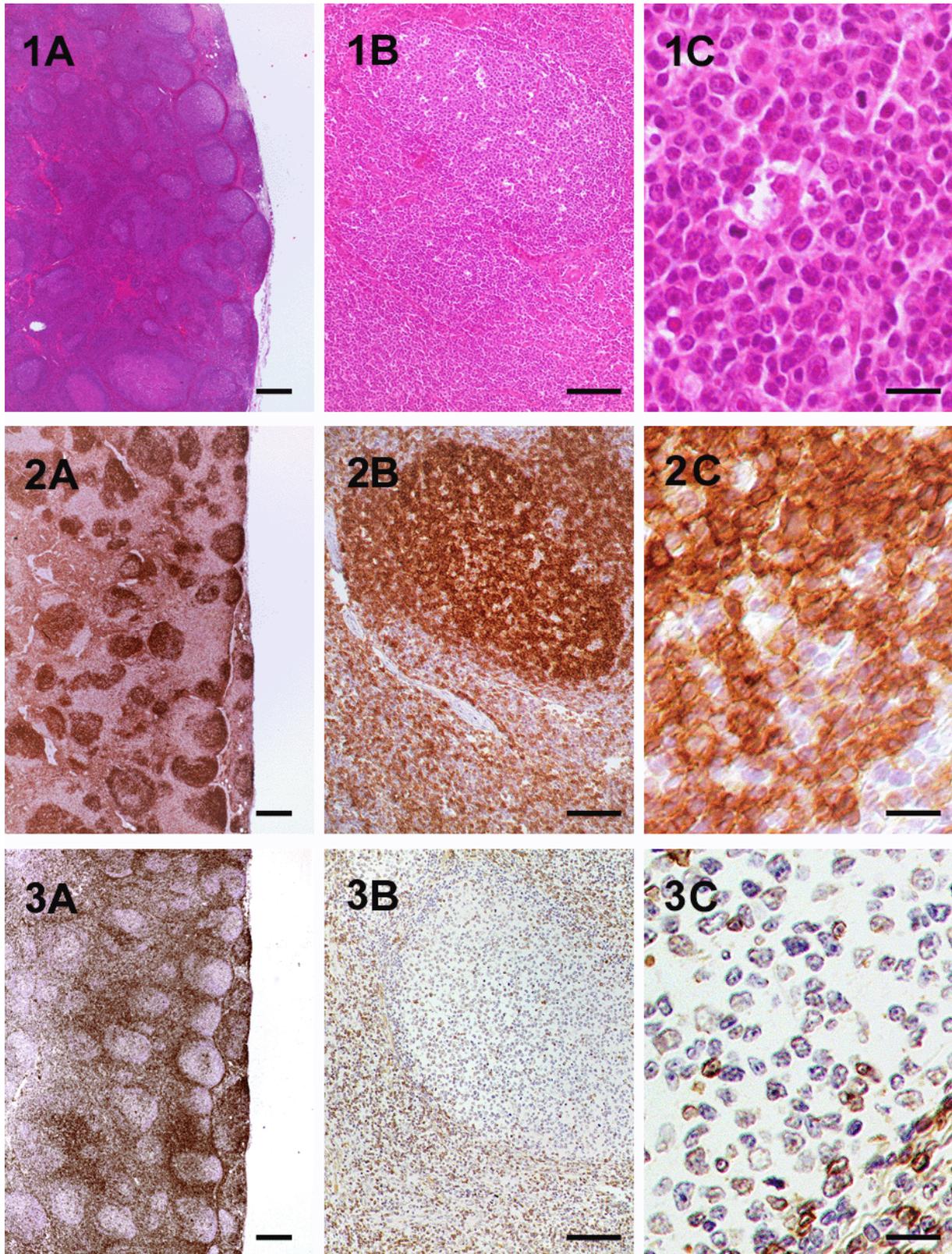


Abbildung 51: T7192/06

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

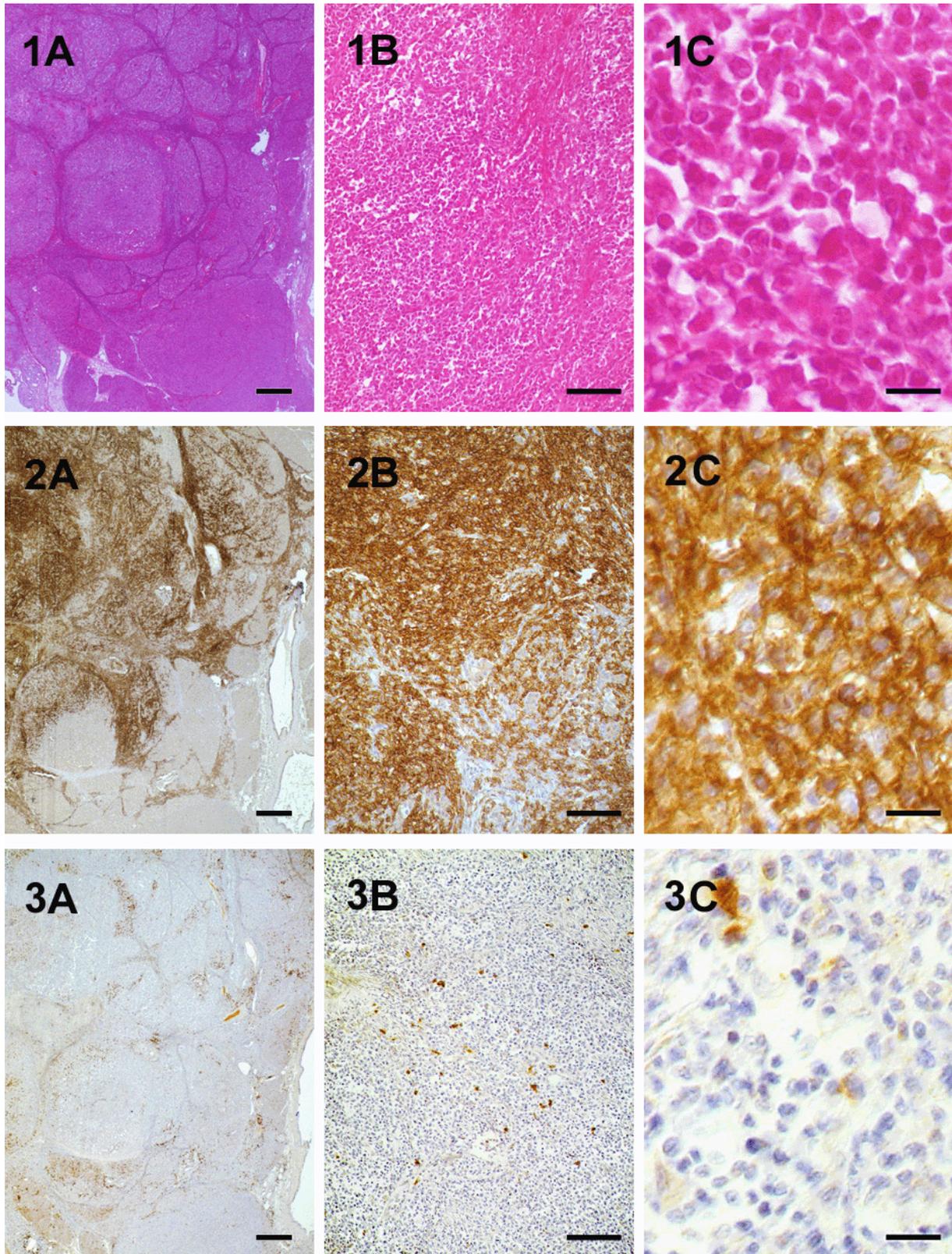


Abbildung 52: S1003/04

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

8.6 Histologie der Probe 1883/94 (T-Zell-Lymphom)

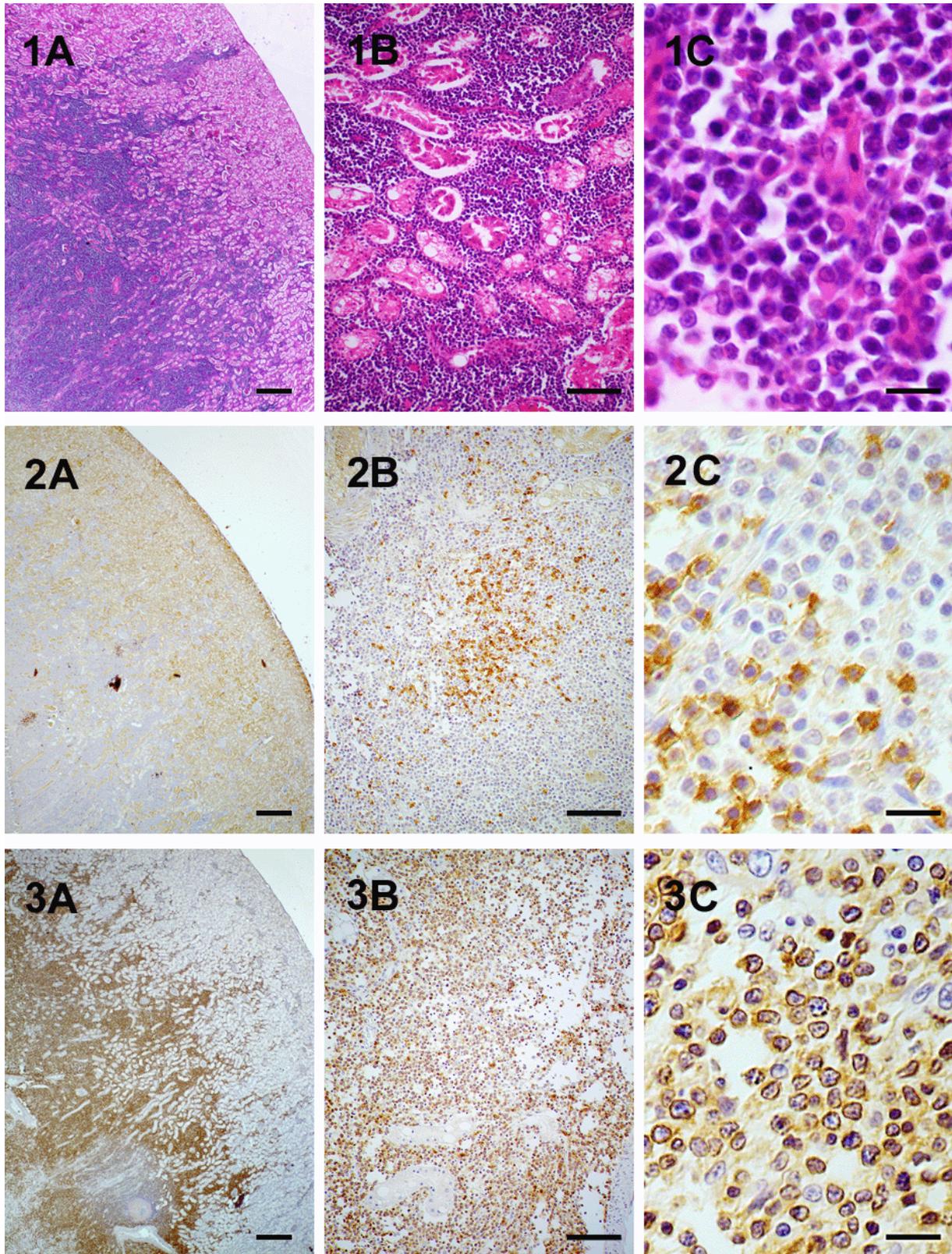


Abbildung 53: 1883/94

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

8.7 Histologie der Probe 878/05 (Lymphatische Hyperplasie)

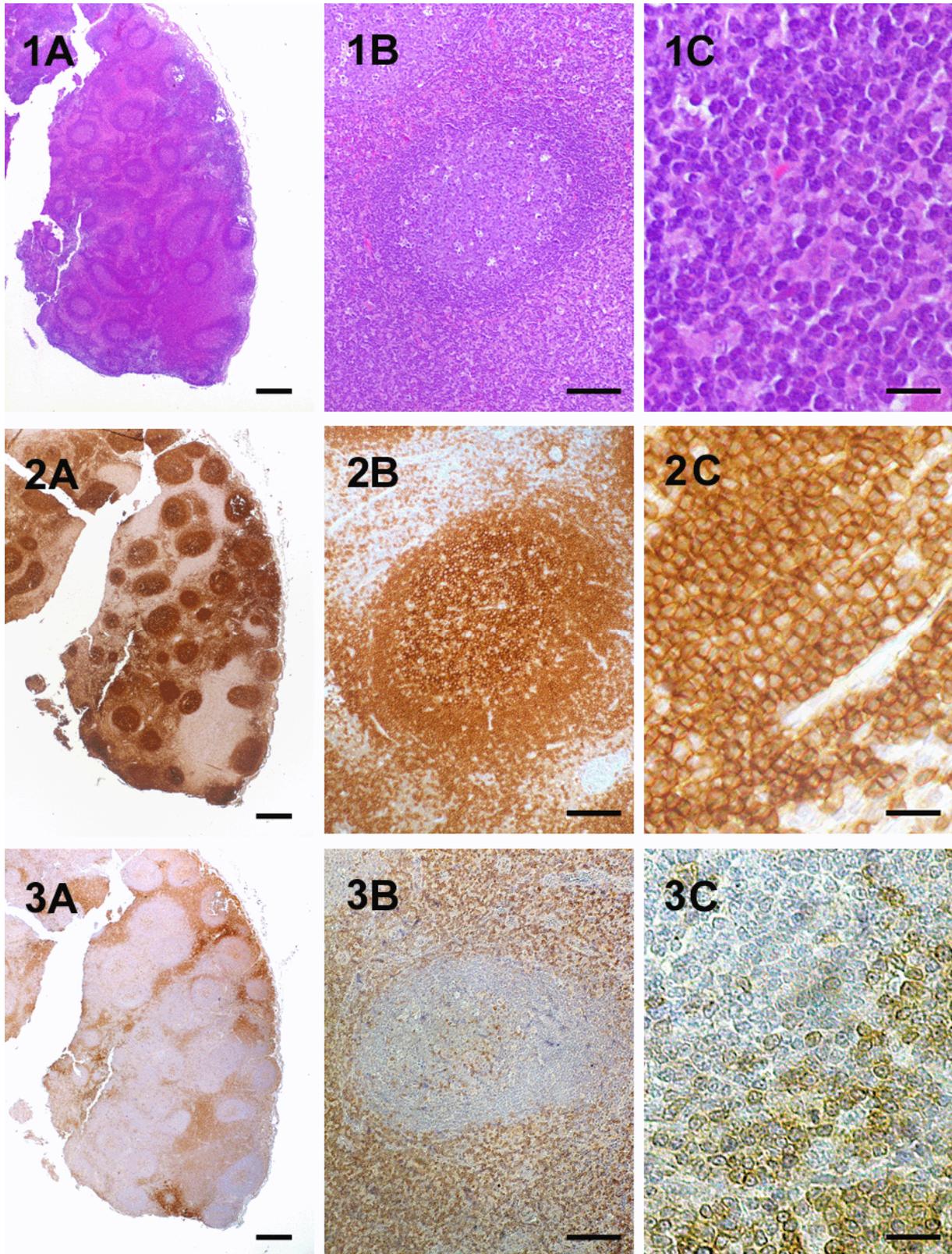


Abbildung 54: 878/05

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

8.8 Lokalisierung von Leaderregion, SMART II™ Oligonukleotid, V-Region, CDR3 und C-Region in den Inserts

Tabelle 61: Lokalisierung von Leaderregion, SMART II™ Oligonukleotid, V-Region, CDR3 und C-Region

| Klon | Leader-region | SMART II™ Oligonukleotid | V-Region | CDR3 | C-Region |
|----------|---------------|--------------------------|----------|---------|----------|
| R3.1 | — | 1-30 | 31-133 | 131-160 | 184-348 |
| R3.3 | — | 1-30 | 31-138 | 132-173 | 197-361 |
| R3.5 | — | 1-30 | 31-134 | 123-161 | 185-349 |
| IgH5.85 | — | 1-30 | 31-300 | 290-328 | 351-516 |
| LV1.1.3 | 1-59 | — | 60-352 | 345-389 | 413-577 |
| LV1.1.7 | 1-59 | — | 60-350 | 345-380 | 404-568 |
| LV1.1.9 | 1-59 | — | 60-352 | 345-389 | 413-577 |
| LV1.1.11 | 1-59 | — | 60-352 | 345-374 | 398-556 |
| LV1.1.12 | 1-59 | — | 60-344 | 340-393 | 417-581 |
| LV1.1.33 | 1-59 | — | 60-349 | 345-383 | 407-571 |
| LV1.1.34 | 1-59 | — | 60-349 | 345-380 | 404-568 |
| LV1.1.35 | 1-59 | — | 60-352 | 345-401 | 425-589 |
| LV1.1.37 | 1-59 | — | 60-360 | 345-383 | 407-571 |
| LV2.1.1 | — | — | 1-191 | 189-236 | 260-402 |
| LV2.1.2 | — | — | 1-197 | 189-233 | 257-421 |
| LV2.1.3 | — | — | 1-15 | 5-64 | 88-252 |
| LV2.1.4 | — | — | 1-196 | 189-233 | 254-421 |
| LV2.1.5 | — | — | 1-194 | 189-221 | 245-409 |
| LV3.1.10 | 1-57 | — | 58-345 | 343-381 | 405-569 |
| LV3.1.11 | 1-57 | — | 58-344 | 342-371 | 395-559 |
| LV3.1.12 | 1-57 | — | 58-347 | 343-375 | 399-563 |
| LV3.1.13 | 1-57 | — | 58-351 | 343-387 | 411-575 |
| LV3.1.33 | 1-57 | — | 58-353 | 343-372 | 397-560 |
| LV3.1.34 | 1-57 | — | 58-346 | 340-360 | 348-548 |
| LV3.1.35 | 1-57 | — | 58-353 | 343-372 | 397-560 |
| LV3.1.36 | 1-51 | — | 52-347 | 337-366 | 390-554 |
| LV3.1.37 | 1-57 | — | 58-348 | 340-375 | 399-563 |
| Cp1.1 | 113-169 | — | 170-455 | 452-484 | 508-670 |
| Cp1.2 | 112-168 | — | 169-459 | 454-474 | 499-551 |
| Cp1.4 | — | — | 1-217 | 207-251 | 276-439 |
| Cp1.6 | 134-190 | — | 191-482 | 476-523 | 548-711 |
| Cp1.8 | 109-165 | — | 166-452 | ? | 514-678 |

Tabelle 61: Lokalisierung von Leaderregion, SMART II™ Oligonukleotid, V-Region, CDR3 und C-Region
(Fortsetzung)

| Klon | Leader-region | SMART II™ Oligonukleotid | V-Region | CDR3 | C-Region |
|--------|---------------|--------------------------|----------|---------|----------|
| Cp1.9 | 113-169 | — | 170-462 | 455-481 | 507-669 |
| Cp1.10 | 111-167 | — | 168-459 | 453-500 | 524-688 |
| Cp1.11 | 109-165 | — | 166-461 | 451-483 | 507-671 |
| Cp1.13 | 109-165 | — | 166-455 | 451-486 | 510-674 |

8.9 Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene

Tabelle 62: Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene

| Klon | CDR3 | | | | | Humane Entsprechungen |
|----------|----------------------|--------------|----------------|----------------------|----------------------|--|
| | 3' Ende der V-Region | N1 | D-Region | N2 | 5'-Ende der J-Region | |
| R3.1 | TGT | TCA | AGAGATAGC | A | ACTATGATTACTGG | IGHV3-23*01 IGHD5-24*01 IGHJ4*01 |
| R3.3 | TGTGCGA | GTAGAGACCC | TGGTACCGGG | GTA | TTTGACTACTGG | IGHV3-23*01 IGHD3-10*01 IGHJ4*01 |
| R3.5 | TGTGCGAGAGA | T | TATGGTGGGGTAGT | ACC | GACTACTGG | IGHV3-53*01 IGHD3-10*01 IGHJ4*01 |
| IgH5.85 | TGTGCAAAAAG | T | TGAACACCGGGG | GGGA | TTTTGTACTCTGG | IGHV3-23*01 IGHD4-23*01 IGHJ3*02 |
| LV1.1.3 | TGTGCAA | GGTTTGA | GTTTAGGGGA | CTATT | CTATATTGACTACTGG | IGHV1-24*01 IGHD3-16*01 IGHJ4*01 |
| LV1.1.7 | TGTGC | CAAGGAGGA | AGCGGGTGG | GCTAGG | CTACTGG | IGHV1-24*01IGHD6-13*01IGHJ4*01 |
| LV1.1.9 | TGTGCAA | GGACGGATAGCG | ACTATGCTGGGGG | GTTCA | ACTACTGG | IGHV1-24*01 IGHD3-10*02 IGHJ4*03 |
| LV1.1.11 | TGTGCAA | GTGGG | GTGGGAGCGAC | CA | ACTGG | IGHV1-24*01 IGHD1-26*01 IGHJ4*01 |
| LV1.1.12 | TGTG | GAAGGGCCGG | ACTACTGTATCGA | GAGTAACTGTCCGGACGGGG | CTACTGG | IGHV1-2*01 IGHD1-1*01 IGHJ4*01 |

Tabelle 62: Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene (Fortsetzung)

| Klon | CDR3 | | | | | Humane Entsprechungen |
|----------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|----------------------|--|
| | 3' Ende der V-Region | N1 | D-Region | N2 | 5'-Ende der J-Region | |
| LV1.1.33 | TGTGC | G | AGGCTGTTGTA | TCGGGGG | TACTTTGACTACTGG | IGHV1-24*01 IGHD2-2*01 IGHJ4*01 |
| LV1.1.34 | TGTGC | CAGGGGACGCGGGC | CTGGGG | TTGACTACTGG | TGTGC | IGHV1-24*01 IGHD7-27*01 IGHJ4*01 |
| LV1.1.35 | TGTCAA | GGATTGGG | TGTATCGGAGTAGCTG | TGCTACGAGGCC | CTTTGACTACTGG | IGHV1-24*01 IGHD2-15*01 IGHJ4*01 |
| LV1.1.37 | TGTGCA | C | GAGCTGGGTAC | CCG | AACTGGTTCAACTACTGG | IGHV1-24*01 IGHD5*01 IGHJ5*01 |
| LV2.1.1 | TGT | ACCACTAGAG | GTGGGGTCTACTAC | GATATGGACGACA | ACTACTGG | IGHV3-74*01 IGHD1-26*01 IGHJ4*03 |
| LV2.1.2 | TGTGCAAGA | AGGTCGGAGG | TAGCGGGTGGGCC | CCTAGC | CTACTGG | IGHV3-74*01 IGHD6-6*01 IGHJ4*03 |
| LV2.1.3 | TGTGCGAAAAGA | TGGGAACGATAGCG AC | TATATTGGCCGG | AATGTGCCCGGA | GACTACTGG | IGHV3-74*01 IGHD3-9*01 IGHJ4*01 |
| LV2.1.4 | TGTGCCAG | | TATCGGCATACC | AAACCGCAATA | CTTTGGGTATCTGG | IGHV3-74*01 IGHD3-16*02 IGHJ3*02 |
| LV2.1.5 | TGTGCG | TCGGTCCG | TGCCAACA | C | CGATCTCTGG | IGHV3-48*03 IGHD4-4*01 IGHJ2*01 |
| LV3.1.10 | TGT | ATC | AGTAGATTGAAG | GCTTTAAAGAGCAACT | ACTGG | IGHV3-74*02 IGHD2-2*01 IGHJ1*01 |

Tabelle 62: Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene (Fortsetzung)

| Klon | CDR3 | | | | | Humane Entsprechungen |
|-----------|----------------------|-----------|------------------|-------------|----------------------|--|
| | 3' Ende der V-Region | N1 | D-Region | N2 | 5'-Ende der J-Region | |
| LV3.1.11 | TGT | ACAAT | ACTACGATAGCT | GGGG | TACTGG | IGHV3-48*03 IGHD4-4*01 IGHJ4*01 |
| LV3.1.12 | TGTGC | | GACTTCCGGGG | CCGGGTTCAAG | TACTGG | IGHV3-74*02 IGHD4-23*01 IGHJ4*03 |
| LV3.1.13 | TGCCCCAGA | TCAGG | GACTACGATAGCGACT | AGTTATGTA | TACTGG | IGHV3-21*01 IGHD4-23*01 IGHJ4*01 |
| LV3.1.133 | TGTGGCGCGGA | | TAGC | G | ACCTTGACTACTGG | IGHV3-21*01 IGHD6-6*01 IGHJ4*01 |
| LV3.1.134 | TGTGCGA | CCCCAGGGC | | | ACTGG | IGHV3-21*01 IGHJ4*01 |
| LV3.1.135 | TGTGGCGCGGA | | TAGC | G | ACCTTGACTACTGG | IGHV3-21*01 IGHD6-6*01 IGHJ4*01 |
| LV3.1.136 | TGTGGCGCGGA | | TAGC | G | ACCTTGACTACTGG | IGHV3-21*01 IGHD6-6*01 IGHJ4*01 |
| LV3.1.137 | TGTGCCAGA | C | TGGCGATAGCGACTA | TG | GACTACTGG | IGHV3-48*03 IGHD5-12*01 IGHJ4*01 |
| Cp1.1 | TGTG | | TGGTAGCGACTAC | CCTCCAG | GACTACTGG | IGHV3-21*01 IGHD2-15*01 IGHJ4*01 |
| Cp1.2 | TGTTCCG | C | CTAT | CCAGTTT | TGG | IGHV3-21*01 IGHD2-2*01 IGHJ1*01 |

Tabelle 62: Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene (Fortsetzung)

| Klon | CDR3 | | | | | Humane Entsprechungen |
|--------|-----------------------|-----------|-------------------|----------------------|----------------------|--|
| | 3' Ende der V-Region | N1 | D-Region | N2 | 5'-Ende der J-Region | |
| Cp1.4 | TGTGCGACAGAGA | TGGGAG | TACTCACTAATGATTAC | TTCCAGTTT | TGG | IGHV3-23*01 IGHD5-12*01 IGHJ1*01 |
| Cp1.6 | TGTGCGA | GATTCGTGG | GGCGACAAT | GGGGCGACCACTTCCCGTTT | TGG | IGHV3-23*04 IGHD5-24*01 IGHJ1*01 |
| Cp1.8 | Nicht klassifizierbar | | | | | IGHV3-21*01 |
| Cp1.9 | TGTACGAG | | GTGGGAAC | CTTTG | TACTGG | IGHV3-74*02 IGHD4-23*01 IGHJ4*01 |
| Cp1.10 | TGTGCGA | GGGGACCA | ATAGTAGCGGGTGG | GCTAGAAA | TTGACTACTGG | IGHV3-23*04 IGHD6-13*01 IGHJ4*01 |
| Cp1.11 | TGTGCGACAGAGA | TCCTAA | CTATGC | | TGACTACTGG | IGHV3-11*01 IGHD2-2*01 IGHJ4*01 |
| Cp1.13 | TGTGC | GACCCA | AGTAGCGGGTGG | CCCCCG | CTACTGG | IGHV3-74*02 IGHD6-13*01 IGHJ4*01 |

8.10 Veröffentlichter Teil der C-Region der schweren Kette des felines IgM (Cho et al., 1998)

| | | | | | | |
|------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| 1 | GACTCACTAT | AGGGCAAGCA | GTGGTATCAA | CGCAGAGTAC | GCGGGTGGGT | CCCATCTGAC |
| 61 | TACTGGGGCC | AAGGAGCCCT | GGTGACGGTG | TCCTCAGAGA | CCTCATCCCG | TCCAAATCTC |
| 121 | TTCCCCCTCA | TCACCTGTGA | GAGCTCCCTG | TCCGATGAGC | CCCTGGTGGC | CATGGGCTGC |
| 181 | CTGGCCCGGG | ACTTCCTGCC | CAGCTCCGTC | ACCTTCTCCT | GGAActACAA | GAACAACAGT |
| 241 | GTGGTCAACA | ACCAGGACAT | CCAGACCTTC | CCTCCAGTCC | TGAGAGAGGG | CAAGTACGAT |
| 301 | GGCTACCTCT | CAGGTGCTCC | TGCCCTCCGT | GGATGTCCTC | CAGGGTTCAG | ATGACTTCCT |
| 361 | CACATGCAAT | GTGAAACACC | CCAAGGGCAA | CAGTGAGGTG | AACGTGCCCA | TCCAGTGCC |
| 421 | TGTAGAGCTG | TCCCCAACG | TGACTGTCTT | CATCCCACCC | CGTGACGCTT | TCTCTGACAA |
| 481 | CAACCAGCGC | ACATCCCAGC | TCCTCTGTCA | GGCAACAGGC | TTCAGCCCCA | AGAAGATCTC |
| 541 | TGTGTCCTGG | CTTCGTGACG | GGAAGCCCAT | CAAGTCGGGC | TTCAACCCAG | GCAACGTGGA |
| 601 | GGCTGAGAAC | CAAGGGCCCG | GACCTGTGAC | CTACAGGGTC | CTCAGCACGC | TGACCATCAC |
| 661 | CGAGAATGCC | TGGCTCAGCC | AGAGCGTGTT | CAC TTGCAAT | GTGGAGACACA | GTGGGCTGAC |
| 721 | CTTCAAGAAG | AACGTGTCTT | CCGCATGCAT | CCTCAACACG | CAGGCCAGCA | TCAGAATCTT |
| 781 | CGCCATTCCC | CCCACCTTGG | CCAGCATCTT | CCAAACCAAG | TCGGCCAAGC | TGTCTGCGAG |
| 841 | GGTCGTAGAC | CTGACCACCC | GCGACAGCCT | GAACATCTCC | TGGACCCGCC | AGAATGGCGA |
| 901 | CTTTCTGCCA | ACCACCACCA | TCTTCCAGAG | CAACCTCAAC | AACACCTTCA | GTGCCACGGG |
| 961 | GGAGGCCTCC | GTCTGTGCAG | AGGACTGGGA | GTCAGGGGAG | GACTTCACTT | GCACGGTGAC |
| 1021 | CCACACGAT | CTGCCCTCAC | CACTGAAGAA | GACCATCTCT | AAACCCAAGG | AGGTCACAAA |
| 1081 | GCAACCGCCC | TCCGTCTACG | TCCTGCCACC | CAGCCGGGAG | CAGCTGAGCC | TGCGGGAGTC |
| 1141 | AGCCACAGTC | ACTTGCCTGG | TGAAGGGCTT | CTCACCCGCA | GATGTGTTTCG | TGCAATGGCT |
| 1201 | GCAGAAAGGC | CAACCCATGT | CCTCTGAGAG | TTACGTGACC | AGTGACCCGA | AGCCCGAGCC |
| 1261 | CCAGGACCCC | CACCTCTACT | TTGTCCACAG | CACCCTGACT | GTGAGTGAGG | AGGAGTGAGG |
| 1321 | CTCGGGGGAG | ACCTACACCT | GTGTTGTGGG | CCACGAGGCC | CTGCCCCACA | TGGTGACGGA |
| 1381 | GAGGAGCGTG | GACAAGTCCA | CCGGTAAACC | CACCCGTGAC | AACGTGTCCC | TGGTCTTGTC |
| 1441 | TGACACGGCC | ACCACCTGCT | ACTGACCTGT | GGCCGGCCTC | ACTCCGGGTG | GATCCCAGAG |
| 1501 | TCCCTGGGGA | ACCCATCGCC | TGTGTGTGCA | TGTGTGCAAA | CTAACCGTGT | CAATGGGGTG |
| 1561 | AGATGTGGCG | TTTTTTCAAA | TTTGAATAA | AAACTTCCTT | TC | |

8.11 Verzeichnis der Klone (Sequenzen der Inserts)

R2.2

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | GACTCACTAT | AGGGCAAGCA | GTGGTATCAA | CGCAGAGTAC | GCGGGTGGGT | CCCATCTGAC |
| 61 | TACTGGGGCC | AAGGAGCCCT | GGTGACGGTG | TCCTCAGAGA | CCTCATCCCG | TCCAAATCTC |
| 121 | TTCCCCCTCA | TCACCTGTGA | GAGCTCCCTG | TCCGATGAGC | CCCTGGTGGC | CATGGGCTGC |
| 181 | CTGGCCCGGG | ACTTCCTGCC | CAGCTCCGTC | ACCTTCTCCT | GGAActACAA | GAACAACAGT |
| 241 | GTGGTCAACA | ACCAGGACAT | CCAGACCTTC | CCTCCAGTCC | TGAGAGAGGG | CAAGTACGA |

R2.6

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | AGTGGTATCA | ACGCAGAGTA | CGCGGGTGGG | TTTACTACT | GGGGCCAAGG | AGCCCTGGTG |
| 61 | ACGGTGTCTT | CAGAGACCTC | ATCCCGTCCA | AATCTCTTCC | CCCTCATCAC | CTGTGAGAGC |
| 121 | TCCCTGTCCG | ATGAGCCCTT | GGTGGCCATG | GGCTGCCTGG | CCCGGGACTT | CCTGCCAGC |
| 181 | TCCGTACCTT | TCTCCTGGAA | CTACAAGAAC | AACAGTGTGG | TCAACAACCA | GGACATCCAG |
| 241 | ACCTTCCTCT | CAGTCCTGAG | AGAGGGCAAG | TACGA | | |

R3.1

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | AAGCAGTGGT | ATCAACGCAG | AGTACGCAGG | CTCCGTGAAG | GGCCGATTCA | CCATCTCCAG |
| 61 | AGACAACGCC | AAGAACACGC | TGTATCTGCA | GATGAACAGC | CTGAAGACCG | AGGACACGGC |
| 121 | CACATATCAC | TGTTCAAGAG | ATAGCAACTA | TGATTACTGG | GGCCAAGGAG | CCCTGATGAC |
| 181 | GGTGTCTCTA | GAGACCTCAT | CCCGTCCAAA | TCTCTTCCCC | CTCATCACCT | GTGAGAGCTC |
| 241 | CCTGTCCGAT | GAGCCCCTGG | TGGCCATGGG | CTGCCTGGCC | CGGGACTTCC | TGCCAGCTC |
| 301 | CGTCACCTTC | TCCTGGAAct | ACAAGAACAA | CAGTGTGGTC | AACAACC | |

R3.3

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | AAGCAGTGGT | ATCAACGCAG | AGTACGCAGG | CTCCGTGAAG | GGCCGATTCA | CCATCTCCAG |
| 61 | AGACAACGCC | AAGAACACGC | TGTATCTGCA | GATGAACAGC | CTCAAGACCG | AGGACACGGC |
| 121 | CACATATTAC | TGTGCGAGTA | GAGACCCTGG | TACCGGGGTA | TTTACTACT | GGGGCCAAGG |
| 181 | AGCCCTGGTG | ACGGTGTCTT | CAGAGACCTC | ATCCCGTCCA | AATCTCTTCC | CCCTCATCAC |

Anhang

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 241 | CTGTGAGAGC | TCCCTGTCCG | ATGAGCCCCT | GGTGGCCATG | GGCTGCCTGG | CCCGGGACTT |
| 301 | CCTGCCCAGC | TCCGTACACT | TCTCCTGGAA | CTACAAGAAC | AACAGTGTGG | TCAACAACCA |

R3.5

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | AAGCAGTGGT | ATCAACGCAG | ACTCCGTGAA | GGGCCGATTC | ACCATCTCCA | GAGACAACGC |
| 61 | CAAGAACACG | CTGTATCTGC | AGATGAACAG | CCTGAAGACC | GAGGACACGG | CCACATATTA |
| 121 | CTGTGCGAGA | GATTATGGGT | GGGGTAGTAC | CGACTACTGG | GGCCAAGGAG | GCCTGGTGAC |
| 181 | GGTGTCTCA | GAGACCTCAT | CCCGTCCAAA | TCTCTTCCCC | CTCATCACCT | GTGAGAGCTC |
| 241 | CCTGTCCGAT | GAGCCCCTGG | TGGCCATGGG | CTGCCTGGCC | CGGGACTTCC | TGCCAGCTC |
| 301 | CGTACCTTC | TCCTGGAATC | ACAAGAACAA | CAGTGTGGTC | AACAACCAAT | |

IgH5.85

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 1 | AAGCAGTGGT | ATCAACGCAG | AGTCGGGGGG | AGACCTGGTG | AAGCCCAGGG | GGTCCCTGAG |
| 61 | ACTCACCTGT | GTGGCCTCTG | GATTCACCTT | CAGTAGCTAT | GGAATGAGCT | GGGTCCGCCA |
| 121 | GGCTCCAGGG | AAGGGGCTGC | AGTGGGTGCG | ATATATTAGA | TACGATGGAA | GTAGCACAAA |
| 181 | CTATGCAGAC | TCCGTGAAGG | GCCGATTCAC | CATCTCCAGA | GACAACGCCA | AGAACACGCT |
| 241 | GTATCTGCAG | ATGAACAGCC | TGAAGACCGA | GGACACGGCC | ACATATTACT | GTGCAAAAAGT |
| 301 | TGAACACCGG | GGGGGATTTT | GTATCTGGGG | CCAAGGTACC | CAGGTACCCG | TCTCCCAAGA |
| 361 | GACCTCATCC | CGTCCAAATC | TCTTCCCCCT | CATCACCTGT | GAGAGCTCCC | TGTCCGATGA |
| 421 | GCCCCTGGTG | GCCATGGGCT | GCCTGGCCCG | GGACTTCCTG | CCCAGCTCCG | TCACCTTCTC |
| 481 | CTGGAACTAC | AAGAACAACA | GTGTGGTCAA | CAACCA | | |

LV1.1.3

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCTACAGGT | GTGCACTCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGAGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | TCTGCAAAGC | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | GTACTGGGTG | CGACAGGCTC |
| 181 | CTGCACAAGG | GTTTGAATGG | ATGGGAAGCA | TTGACCCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | CACAGAAGTT | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | TGGAGCTGAG | CAGTCTGAGG | TCTACAGACA | CGGCCGTGTA | TTATTGTGCA | AGGTTTGAAGT |
| 361 | TTAGGGGACT | ATTCTATATT | GACTACTGGG | GCCAAGGAGC | CCTGGTGACG | GTGTCTCAG |
| 421 | AGACCTCATC | CCGTCCAAAT | CTCTTCCCCC | TCATCACCTG | TGAGAGCTCC | CTGTCCGATG |
| 481 | AGCCCTGGT | GGCCATGGGC | TGCCTGGCCC | GGGACTTCCT | GCCCAGCTCC | GTACCTTCT |
| 541 | CCTGGAACTA | CAAGAACAAC | AGTGTGGTCA | ACAACCA | | |

LV1.1.7

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCTACAGGT | GTGCACTCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGAGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | TCTGCAAAGC | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | GTACTGGGTG | CGACAGGCTC |
| 181 | CTGCACAAGG | GTTTGAATGG | ATGGGAAGCA | TTGACCCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | CACAGAAGTT | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | TGGAGCTGAG | CAGTCTGAGG | TCTACAGACA | CGGCCGTGTA | TTATTGTGCC | AAGGAGGAAG |
| 361 | CGGTGGGCT | AGGCTACTGG | GGCCAAGGAG | CCCTGGTGAC | GGTGTCTCA | GAGACCTCAT |
| 421 | CCCGTCCAAA | TCTCTTCCCC | CTCATCACCT | GTGAGAGCTC | CCTGTCCGAT | GAGCCCCTGG |
| 481 | TGGCCATGGG | CTGCCTGGCC | CGGGACTTCC | TGCCAGCTC | CGTACCTTC | TCCTGGAATC |
| 541 | ACAAGAACA | CAGTGTGGTC | AACAACCA | | | |

LV1.1.9

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCGACAGGT | GTGCACTCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGGGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | TCTGCAAAGC | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | CCACTGGTTG | CGACAGGCTC |
| 181 | CTGAACAAGG | GCTTGAATGG | ATGGGAAGAA | TTGACCCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | CACAGAAGTT | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | TGGAGCTGAG | CAGTCTGAGG | TCTGCAGACA | CAGCCATGTA | TTACTGTGCA | AGGACGGATA |
| 361 | GCGACTATGC | TGGGGGGTTC | AACTACTGGG | GCCCCGGGAC | CCTGGTCACC | GTGTCTTCAG |
| 421 | AGACCTCATC | CCGTCCAAAT | CTCTTCCCCC | TCATCACCTG | TGAGAGCTCC | CTGTCCGATG |
| 481 | AGCCCTGGT | GGCCATGGGC | TGCCTGGCCC | GGGACTTCCT | GCCCAGCTCC | GTACCTTCT |
| 541 | CCTGGAACTA | CAAGAACAAC | AGTGTGGTCA | ACAACCA | | |

LV1.1.11

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCTACAGGT | GTGCACTCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGAGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | TCTGCAAAGC | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | GTACTGGGTG | CGACAGGCTC |
| 181 | CTGCACAAGG | GTTTGAATGG | ATGGGAAGCA | TTGACCCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | CACAGAAGTT | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | TGGAGCTGAA | CAGTCTGAGG | TCTACAGACA | CGGCCGTGTA | TTATTGTGCA | AGTGGGGTGG |

Anhang

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 361 | GAGCGACCAA | CTGGGGCCAA | GGAGCCCTGG | TGACGGTGTC | CTCAGAGACC | TCATCCCGTC |
| 421 | CAAATCTCTT | CCCCCTCATC | ACCTGTGAGA | GCTCCCTGTC | CGATGAGCCC | CTGGTGGCCA |
| 481 | TGGGCTGCCT | GGCCCGGGAC | TTCCTGCCCA | GCTCCGTAC | CTTCTCTG | AACTACAAGA |
| 541 | ACAACAGTGT | GTCAAACAA | CCA | | | |

LV1.1.12

| | | | | | | |
|-----|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCAACAGGT | GTTCAATCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCG | GGACTGAAGT | GAGGAAGCCT | GGGGCATCAG | TGAAGATCTT |
| 121 | CTGCAAAGCG | TCTGGATACA | GCTTCACTGA | TCACTATATG | CGCTGGTGGT | GACAGGCCCC |
| 181 | TGGACAAGGG | TTTGAGTGGA | TGGGAGGCCT | TGACCCTGAA | GATGGTTCTT | CTAGGCACAG |
| 241 | AAGTCCAGG | GCAAACCTCAC | CCTGACAGCA | GACACATCCA | CAGACACAGC | CTACATGGAA |
| 301 | CTGAGCAGTC | TGGGGTCTGC | AGACACAGCC | GTGTATTACT | GTGGAAGGGC | CGGACTACTG |
| 361 | TATCGAGAGT | AACTGTCCGG | ACGGGGCTAC | TGGGGCCAAG | GAGTCTGTGG | GACGGTGTCC |
| 421 | TCAGAGACCT | CATCCCGTCC | AAATCTCTTC | CCCCTCATCA | CCTGTGAGAG | CTCCCTGTCC |
| 481 | GATGAGCCCC | TGGTGGCCAT | GGGCTGCCTG | GCCCCGGACT | TCCTGCCAG | CTCCGTACC |
| 541 | TTCTCTGGA | ACTACAAGAA | CAACAGTGTG | GTCAACAACC | A | |

LV1.1.33

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCGACAGGT | GTGCACTCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGGGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | TCTGCAAAGC | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | GCACTGGTTG | CGACAGGCTC |
| 181 | CTGAACAAGG | GCTTGAGTGG | ATGGGAAGAA | TTGACCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | CACAGAAGTT | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | TGGAGCTGAG | CAGTCTGAGG | TCTGCAGACA | CAGCCATGTA | TTACTGTGCG | AGGCTGTTGT |
| 361 | ATCGGGGTA | CTTTGACTAC | TGGGGCCAAG | GAGCCCTGGT | GACGGTGTCC | TCAGAGACCT |
| 421 | CATCCCGTCC | AAATCTCTTC | CCCCTCATCA | CCTGTGAGAG | CTCCCTGTCC | GATGAGCCCC |
| 481 | TGGTGGCCAT | GGGCTGCCTG | GCCCCGGACT | TCCTGCCAG | CTCCGTACC | TTCTCTGGA |
| 541 | ACTACAAGAA | CAACAGTGTG | GTCAACAACC | A | | |

LV1.1.34

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCGACAGGT | GTGCACTCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGGGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | TCTGCAAAGC | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | GCACTGGTTG | CGACAGGCTC |
| 181 | CTGAACAAGG | GCTTGAGTGG | ATGGGAAGAA | TTGACCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | CACAGAAGTT | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | TGGAGCTGAG | CAGTCTGAGG | TCTGCAGACA | CAGCCATGTA | TTACTGTGCC | AGGGGACGCG |
| 361 | GGCCTGGGGT | TGACTACTGG | GGCCAAGGAG | CCCTGGTGAC | GGTGTCTCA | GAGACCTCAT |
| 421 | CCCGTCCAAA | TCTCTTCCCC | CTCATCACCT | GTGAGAGCTC | CCTGTCCGAT | GAGCCCCTGG |
| 481 | TGGCCATGGG | CTGCCTGGCC | CGGGACTTCC | TGCCAGCTC | CGTCACCTTC | TCCTGGAAC |
| 541 | ACAAGAACAA | CAGTGTGGTC | AACAACCA | | | |

LV1.1.35

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCGACAGGT | GTGCACTCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGGGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | TCTGCAAAGC | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | GCACTGGTTG | CGACAGGCTC |
| 181 | CTGAACAAGG | GCTTGAGTGG | ATGGGAAGAA | TTGACCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | CACAGAAGTT | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | TGGAGCTGAG | CAGTCTGAGG | TCTGCAGACA | CAGCCATGTA | TTACTGTGCA | AGGATTGGGT |
| 361 | GTATCGGGAG | TAGCTGTGCT | ACGAGGCCCT | TTGACTACTG | GGGCCAAGGA | GCCCTGGTGA |
| 421 | CGGTGTCTC | AGAGACCTCA | TCCCCTCCAA | ATCTCTTCCC | CCTCATCACC | TGTGAGAGCT |
| 481 | CCGTGTCCGA | TGAGCCCCTG | GTGGCCACGG | GCTGCCTGGC | CCGGGACTTC | CTGCCAGCT |
| 541 | CCGTACCTT | CTCCTGGAAC | TACAAGAACA | ACAGTGTGGT | CAACAACCA | |

LV1.1.37

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | CAATGGACTG | GAGCTGGAGA | ATCCTCTACC | TGGTGGCAGT | GGCTACAGGT | GTGCACTCCC |
| 61 | AGGTTTTGCT | GGTGCAGTCT | GGGGCTGAAG | TGAGGAAGCC | TGAGGCATCA | GTGAAGATCT |
| 121 | TCTGCAAAGC | ATCTGGATAC | AGCTTCACTG | ATTACTATAT | GTACTGGGTG | CGACAGGCTC |
| 181 | CTGACAAGG | GTTTGAGTGG | ATGGGAAGCA | TTGACCCTGA | AGATGGTTCT | ACAAGCTATG |
| 241 | CACAGAAGTT | CCAGGGCAGA | CTCACCTGA | CAGCAGACAC | ATCCACAAC | ACAGCCTACA |
| 301 | TGGAGCTGAG | CAGTCTGAGG | TCTACAGACA | CGGCCGTGTA | TTATTGTGCA | CGAGCTGGGT |
| 361 | ACCCGAAGT | GTTCAACTAC | TGGGGCCCCG | GGACCCTGGT | CACCGTGTCT | TCAGAGACCT |
| 421 | CATCCCGTCC | AAATCTCTTC | CCCCTCATCA | CCTGTGAGAG | CTCCCTGTCC | GATGAGCCCC |
| 481 | TGGTGGCCAT | GGGCTGCCTG | GCCCCGGACT | TCCTGCCAG | CTCCGTACC | TTCTCTGGA |
| 541 | ACTACAAGAA | CAACAGTGTG | GTCAACAACC | A | | |

LV2.1.1

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGACATAC | TTGTGCCAG | GCTCCAGGAA | AGGGGCTGCT | GTGGGTCGCT | TCAATTCGTG |
| 61 | GTGATGGAAC | TGCCACATAC | TACCCAGACT | CAGTGAGGGG | CCGATTCACC | ATCTCCAGAG |
| 121 | ACAACGCCAA | GAAAATGCTG | TATCTGCAGA | TGAACAGTCT | AGAGACCGAG | GACACGGCCA |
| 181 | CATATTACTG | TACCACTAGA | GGTGGGGTCT | ACTACGATAT | GGACGACAAC | TACTGGGGTC |
| 241 | CCGGGACCCT | GGTCACCGTG | TCTTCAGAGA | CCTCATCCCG | TCCAATCTC | TCCCCCTCA |
| 301 | TCACCTGTGA | GAGCTCCCTG | TCCGATGAGC | CCCTGGTGGC | CATGGGCTGC | CTGGCCCGGG |
| 361 | ACTTCCTGCC | CAGCTCCGTC | ACCTTCTCCT | GGAACATAAA | GA | |

LV2.1.2

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGACATAC | TTGTGCCAG | GCTCCAGGGA | AGGGGCTGCA | GTGGGTCGCG | CTCATTAATA |
| 61 | CTGATGGAAC | TAGAATATAC | TACGCAGATT | CCGCGAAGGG | CCGATTCACC | ATCTCCAGAG |
| 121 | ACAACGCCAA | GAACACGCTG | TATCTGCAGA | TGAACAGCCT | GAAGACCGAG | GACACGGCCA |
| 181 | CATATTACTG | TGCAAGAAGG | TCGGAGGTAG | CGGGTGGGCC | CCTAGCCTAC | TGGGGCCCCG |
| 241 | GGACCCTGGT | CACCGTGTCT | TCAGAGACCT | CATCCCGTCC | AAATCTCTTC | CCCCTCATCA |
| 301 | CCTGTGAGAG | CTCCCTGTCC | GATGAGCCCC | TGGTGGCCAT | GGGCTGCCTG | GCCCGGGACT |
| 361 | TCCTGCCCAG | CTCCGTCAAC | TTCTCCTGGA | ACTACAAGAA | CAACAGTGTG | GTCAACAACC |
| 421 | A | | | | | |

LV2.1.3

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | TTTCTGTGCG | AAAGATGGGA | ACGATAGCGA | CTATATTGGC | CGGAATGTGC | CGCGAGACTA |
| 61 | CTGGGGCCAA | GGAGCCCTGG | TGACGGTGTG | CTCAGAGACC | TCATCCCGTC | CAAATCTCTT |
| 121 | CCCCCTCATC | ACCTGTGAGA | GCTCCCTGTC | CGATGAGCCC | CTGGTGGCCA | TGGGCTGCCT |
| 181 | GGCCGGGGAC | TTCTGCCCCA | GCTCCGTAC | CTTCTCTGG | AACTACAAGA | ACAACAGTGT |
| 241 | GGTCAACAAC | CA | | | | |

LV2.1.4

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGACATAC | TTGTGCCAG | GCTCCAGGGA | AGGGGCTGGA | GTGGGTCGCG | ACCATTGAAG |
| 61 | ATGATGGAAC | TATCACAACC | TACGCAGACT | CCGTGAAGGG | CCGATTCACC | ATCTCCAGAG |
| 121 | ACAACGCCAA | GAACACCCTG | TATTTGCAGA | TGAATTGCCT | GAGGACCGAG | GACACGGCCA |
| 181 | CATATTACTG | TGCCAGTATC | GGCATAACAA | ACCGCAATAC | TTTGGGTATC | TGGGGCCAGG |
| 241 | GTACCCAGGT | CACCGTCTCC | CACGAGACCT | CATCCCGTCC | AAATCTCTTC | CCCCTCATCA |
| 301 | CCTGTGAGAG | CTCCCTGTCC | GATGAGCCCC | TGGTGGCCAT | GGGCTGCCTG | GCCCGGGACT |
| 361 | TCCTGCCCAG | CTCCGTCAAC | TTCTCCTGGA | ACTACAAGAA | CAACAGTGTG | GTCAACAACC |
| 421 | A | | | | | |

LV2.1.5

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGACATAC | TTGTGCCAG | GCTCCAGGAA | AGGGGCCGCA | GTGGGTCGCG | ATAATAAGTA |
| 61 | CTAATGGAGG | TACCTCAATC | TACGCAGACT | CGGTGAGGGG | CCGATTCACC | ATCTCCAGAG |
| 121 | ACAACGCCAA | GAACGCGCTG | TATCTGGAGA | TGAATAGCCT | CAAGACCGAG | CAACGGCCA |
| 181 | CATATTACTG | TGCGTCGGTC | CGTGCCAACA | CCGATCTCTG | GGGCCATGGA | ACCATAGTCA |
| 241 | CAGTGCTCTC | AGAGACCTCA | TCCCGTCCAA | ATCTCTTCCC | CCTCATCACC | TGTGAGAGCT |
| 301 | CCCTGTCCGA | TGAGCCCCTG | GTGGCCATGG | GCTGCCTGGC | CCGGGACTTC | CTGCCAGCT |
| 361 | CCGTACCTT | CTCTGGAAC | TACAAGAACA | ACAGTGTGGT | CAACAACCA | |

LV3.1.10

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGAGTTTG | TGCTGGGCTG | GGTTTTCTCTG | GTTGCTATTT | TAAAAGGTGT | CCAGTGTGAT |
| 61 | GTGCAGCTGG | TGGAGTCTGG | GGGAGACCTG | GTGAAGCCTG | GGGGTCCCT | GAGACTCACC |
| 121 | TGCGTGGTCT | CTGGACTCAC | CTTCAGTAGC | CACTACATGT | TCTGGGTCCG | CCAGGCTCCG |
| 181 | GGGAAGGGGC | TGCAATGGGT | CGCATTTTATT | AATCTCGATG | GATCTACCAC | CACCTATATA |
| 241 | GACTCCGTGA | AGGGCCGATT | CACCGTCTCT | AGAGACAACG | CCAAGAACAC | GCTGTATCTG |
| 301 | CAGATGGACA | GCCTCACGAC | CGAGGACACG | GCCACATATT | ACTGTATCAG | TAGATTGAAG |
| 361 | GCTTTAAAGA | GCAACTACTG | GGGCCCCGGG | ACCCTGGTCA | CCGTGTCTTC | AGAGACCTCA |
| 421 | TCCCGTCCAA | ATCTCTTCCC | CCTCATCACC | TGTGAGAGCT | CCCTGTCCGA | TGAGCCCCTG |
| 481 | GTGGCCATGG | GCTGCCTGGC | CCGGGACTTC | CTGCCAGCT | CCGTACCTT | CTCTGGAAC |
| 541 | TACAAGAACA | ACAGTGTGGT | CAACAACCA | | | |

LV3.1.11

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGAGTTTG | TGCTGGGCTG | GGTGTCTCTG | GTTGCTCTTT | TAAAGGTATC | CAGTGTGACG |
| 61 | TGCAGCTGGT | GGAGTCTGGG | GGAGACCTGG | TGAAGCCTGG | GGGGTCCCTG | AGAGTCACTT |
| 121 | GTGTGGCCTC | TGGATTCACC | TTCGGGAATC | TTTATATGAA | CTGGGTCTGC | CAGGCTCCAG |
| 181 | GGAAGGGGCT | GCAGTGGGTC | GCATATATTA | GATATGATGG | AAGTAGCATA | TACTATGCAG |
| 241 | ACTCCGTGAA | GGCCGATTC | ACCATTCCCA | GAGACAACGC | CAAGAACACG | CTGTATCTGC |
| 301 | AGATGAACAG | TCTGAAGACC | GAGGACACGA | CCACATATTA | CTGTACAATA | CTACGATAGC |

Anhang

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 361 | TGGGGTACTG | GGGCCAAGGA | GCCCTGGTGA | CGGTGTCCTC | AGAGACCTCA | TCCCGTCCAA |
| 421 | ATCTCTTCCC | CCTCATCACC | TGTGAGAGCT | CCCTGTCCGA | TGAGCCCCTG | GTGGCCATGG |
| 481 | GCTGCCTGGC | CCGGGACTTC | CTGCCACGCT | CCGTACACCT | CTCCTGGAAC | TACAAGAACA |
| 541 | ACAGTGTGGT | CAACAACCA | | | | |

LV3.1.12

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGAGTTTG | TGCTGGGCTG | GGTTTTCCCTG | GTTGCTCTTT | TAAAAGGTGT | CCAGTGTGAC |
| 61 | GTGCAGCTGG | TGGAGTCTGG | GGGAGACCTG | GTGAAGCCTG | GGGGGTCCCT | GAGACTCACC |
| 121 | TGTGTGGCCT | CTGGATTAC | CTTCAGTACC | TACTACATGA | ACTGGGTCCG | CCAGGCTCCA |
| 181 | GGGAAGGGGC | TTCAGTGGGT | CGCATATATT | AAGAATGATG | GGAGTATCAC | AAACTACGCA |
| 241 | GAATCCGTGA | AGGGCCGATT | CACCCTCTCC | AGAGACAACA | CCAAGAACAC | GCTGTATCTG |
| 301 | CAGATGAACA | ACCTCAAGCC | TGAGGACACG | GCCACATATT | ACTGTGCGAC | TTCGGGGGCC |
| 361 | GGTTCAAGT | ACTGGGGCCC | CGGGACCCTG | GTCACCGTGT | CTTCAGAGAC | CTCATCCCCT |
| 421 | CCAAATCTCT | TCCCCCTCAT | CACCTGTGAG | AGTCCCCTGT | CCGATGAGCC | CCGTGTGGCC |
| 481 | ATGGGCTGCC | TGGCCCGGGA | CTTCCTGCC | AGCTCCGTCA | CCTTCTCCTG | GAACTACAAG |
| 541 | AACAACAGTG | TGGTCAACAA | CCA | | | |

LV3.1.13

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|
| 1 | ATGGAGTTTG | TGCTGGGCTG | GGTTTTCCCTG | GTTACTCTTT | TAAAAGGTGT | CCAGTGTGAT |
| 61 | GTGCAGTTGG | TGGAGTCTGG | GGGAGACCTG | GTGAAGCCTG | GGGGGTCCCT | GAGACTCACC |
| 121 | TGTGCAGCCT | CTGGATTAC | CTTCAGTAAC | TACTACATGA | GCTGGGTCCG | CCAGGCTCCA |
| 181 | GGGAAGGGGC | TACAGTGGGT | CGCATGGATT | AATCGTAATG | GACAAGACAT | ATGGTACGCT |
| 241 | GACTCCGTGA | AGGGCCGATT | CACCATCTCC | AGAGACAACG | CCAAGAACAC | GCTGGATCTG |
| 301 | CTTATGAACA | GCCTGAAGAC | CGAGGACACG | GCCACATACT | ACTGCGCCAG | ATCAGGGACT |
| 361 | ACCATAGCGA | CTAGTTATGT | ATACTGGGGC | CAAGGAGCCC | TGGTGCAGGT | GTCCCTCAGAG |
| 421 | ACCTCATCCC | GTCCAAATCT | CTTCCCCCTC | ATCACCTGTG | AGAGCTCCCT | GTCCGATGAG |
| 481 | CCCCTGGTGG | CCATGGGCTG | CCTGGCCCCG | GACTTCTCTG | CCAGTCCGCT | CACCTTCTCC |
| 541 | TGGAACTACA | AGAACAACAG | TGTGGTCAAC | AACCA | | |

LV3.1.33

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGAGTTTG | TGCTGGGCTG | GGTTTTCCCTG | GTTACTCTTT | TAAAAGGTGT | CCAGTGTGAC |
| 61 | GTGCAGCTGG | TGGAGTCTGG | GGGAGACCTG | GTGAAGCCTG | GGGGGTCTCT | GAGACTCACC |
| 121 | TGTGTGGCCT | CTGGATTAC | CTTCAGTAGC | TATAGCATGA | ACTGGGTCCG | CCAGGCTCCA |
| 181 | GGGAAGGGGC | TGCAGTGGGT | CGCATATATT | AGATATGATG | GAAGTAGCAT | ATACTATGCA |
| 241 | GACTCCGTGA | AGGGCCGATT | CACCGTCTCC | AGAGACAACG | CCAAGAACAC | GCTGTCTCTG |
| 301 | CAGATGAACA | GTCTGAAGAC | CGAGGACACG | GCCACATATT | ACTGTGCGCG | CGATAGCGAC |
| 361 | CTTGACTACT | GGGGCCAAGG | AGCCCTGGTG | ACGATATCCT | CAGAGACCTC | ATCCCCTCCA |
| 421 | AATCTTTCC | CCCTCATCAC | CTGTGAGAGC | TCCCTGTCCG | ATGAGCCCCT | GGTGGCCATG |
| 481 | GGCTGCCTGG | CCCGGACTT | CCTGCCCAGC | TCCGTACCT | TCTCCTGGAA | CTACAAGAAC |
| 541 | AACAGTGTGG | TCAACAACCA | | | | |

LV3.1.34

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGAGTTTG | TGCTGGGCTG | GGTTTTCCCTG | GTTACTCTTT | TAAAAGGTGT | CCAGTGTGAC |
| 61 | GTGCAGCTGG | TGGAGTCTGG | GGGAGACCTG | GTGAAGCCTG | GGGGGTCTCT | GAGACTCACC |
| 121 | TGTGTGGCCT | CTGGATTAC | CTTCAGTAGC | TATAGCATGA | ACTGGGTCCG | CCAGGCTCCA |
| 181 | GGGAAGGGGC | TGCAGTGGGT | CGCATATATA | AGTAGTGGAG | GTAGCACATA | CTACACAGAC |
| 241 | TCCGTGAAGG | GCCGATTAC | CATCTCCAGA | GACAACGGCA | AGAACACGCT | GTATCTGCAG |
| 301 | ATGAACAGCC | TCAAGACCGA | GGACACGGCC | ACATATTACT | GTGCGACCCC | AGGGCACTGG |
| 361 | GGCCAAGGAG | CCCTGGTGAC | GGTGTCTTCA | GAGACCTCAT | CCCGTCCAAA | TCTCTTCCCC |
| 421 | CTCATCACCT | GTGAGAGCTC | CCTGTCCGAT | GAGCCCCTGG | TGGCCATGGG | CTGCCTGGCC |
| 481 | CGGGACTTCC | TGCCAGCTC | CGTCACCTT | TCCTGGAAC | ACAAGAACAA | CAGTGTGGTC |
| 541 | AACAACCA | | | | | |

LV3.1.35

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGAGTTTG | TGCTGGGCTG | GGTTTTCCCTG | GTTACTCTTT | TAAAAGGTGT | CCAGTGTGAC |
| 61 | GTGCAGCTGG | TGGAGTCTGG | GGGAGACCTG | GTGAAGCCTG | GGGGGTCTCT | GAGACTCACC |
| 121 | TGTGTGGCCT | CTGGATTAC | CTTCAGTAGC | TATAGCATGA | ACTGGGTCCG | CCAGGCTCCA |
| 181 | GGGAAGGGGC | TGCAGTGGGT | CGCATATATT | AGATATGATG | GAAGTAGCAT | ATACTATGCA |
| 241 | GACTCCGTGA | AGGGCCGATT | CACCGTCTCC | AGAGACAACG | CCAAGAACAC | GCTGTCTCTG |
| 301 | CAGATGAACA | GTCTGAAGAC | CGAGGACACG | GCCACATATT | ACTGTGCGCG | CGATAGCGAC |
| 361 | CTTGACTACT | GGGGCCAAGG | AGCCCTGGTG | ACGATATCCT | CAGAGACCTC | ATCCCCTCCA |
| 421 | AAICTTTCC | CCCTCATCAC | CTGTGAGAGC | TCCCTGTCCG | ATGAGCCCCT | GGTGGCCATG |
| 481 | GGCTGCCTGG | CCCGGACTT | CCTGCCCAGC | TCCGTACCT | TCTCCTGGAA | CTACAAGAAC |
| 541 | AACAGTGTGG | TCAACAACCA | | | | |

LV3.1.36

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | TTTGTGCTGG | GCTGGGTTTT | CCTGGTACT | CTTTAAAAG | GTGTCCAGTG | TGACGTGCAG |
| 61 | CTGGTGGAGT | CTGGGGGAGA | CCTGGTGAAG | CCTGGGGGGT | CTCTGAGACT | CACCTGTGTG |
| 121 | GCCTCTGGAT | TCACCTTCAG | TAGCTATAGC | ATGAACTGGG | TCCGCCAGGC | TCCAGGGAAG |
| 181 | GGGCTGCAGT | GGGTCGCATA | TATTAGATAT | GATGGAAGTA | GCATATACTA | TGCAGACTCC |
| 241 | GTGAAGGGCC | GATTCAACGT | CTCCAGAGAC | AACGCCAAGA | ACACGCTGTC | TCTGCAGATG |
| 301 | AACAGTCTGA | AGACCGAGGA | CACGGCCACA | TATTACTGTG | CGCGCGATAG | CGACCTTGAC |
| 361 | TACTGGGGCC | AAGGAGCCCT | GGTGACGGTG | TCCTCAGAGA | CCTCATCCCG | TCCAAATCTC |
| 421 | TTCCCCCTCA | TCACCTGTGA | GAGCTCCCTG | TCCGATGAGC | CCATGGCCAC | CAGGGGCTCA |
| 481 | TCGGACAGGG | ACTTCCTGCC | CAGCTCCGTG | ACCTTCTCCT | GGAACACAA | GAACAACAGT |
| 541 | GTGGTCAACA | ACCA | | | | |

LV3.1.37

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | ATGGAGTTTG | TGCTGGGCTG | GGTGTTCCTG | GTTGCTCTTT | TAAAAGGTGT | CCAGTGTGAC |
| 61 | GTGCAGCTGG | TGGAGTCTGG | GGGAGACCTG | GTGCAGCCTG | GGGGTCCCT | GAGACTCACC |
| 121 | TGTGTGGCCT | CTGGATTAC | CTTCAGTAGC | TATGAAATGA | ACTGGTCCG | CCAGGCTCCA |
| 181 | GGGAAGGGGC | TGCAGTGGGT | CGCATATATA | AGTAGTGGAG | GTAGCACATA | CTACACAGAC |
| 241 | TCCGTGAAGG | GCCGATTAC | CATCTCCAGA | GACAACGCCA | AGAACACGCT | GTATCTGCAG |
| 301 | ATGAACAGCC | TCAAGACCGA | GGACACGGCC | ACATATTACT | GTGCGAGACT | GGCGATAGCG |
| 361 | ACTATGGACT | ACTGGGGCCA | AGGAGCCCTG | GTGACGGTGT | CCTCAGAGAC | CTCATCCCGT |
| 421 | CCAAATCTCT | TCCCCCTCAT | CACCTGTGAG | AGCTCCCTGT | CCGATGAGCC | CCTGGTGGCC |
| 481 | ATGGGCTGCC | TGGCCCGGGA | CTTCTGCCC | AGCTCCGTC | CCTTCTCCTG | GAACTACAAG |
| 541 | AACAACAGTG | TGGTCAACAA | CCA | | | |

Cp1.1

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | TGCTACCAG | GCATTGCTT | CATGGGGATA | GGGGAGCTGG | GAGAGGAGCC | CCAGCCCCGG |
| 61 | GAGTCCAGG | TGTTCCATT | CTGTGATCAG | CACAGAACAC | ACACACTCA | CCATGGAGAC |
| 121 | TGTGCTGGGC | TGGGTTTTCC | TGGTTGCTCT | TTAAAAGGT | GTCCAGTGTG | ACGTGCAGCT |
| 181 | GGTGGAGTCT | GGGGGAGACC | TGGTGAAGCC | TGGGGGGTCT | CTGAGACTCA | CCTGTGTGGC |
| 241 | CTCTGGATT | ACCTTCAGTA | GCTATAGCAT | GAAGTGGGTC | CGCCCTCCAG | GGAAAGGGCT |
| 301 | GCAGTGGGTC | GCATACATTT | ATACTGATGG | AAGTAGCACA | AACTATGCAG | ACTCCGTGAA |
| 361 | GGGACGATT | ACCATCTCCA | GAGACAACGC | CAAGAACACA | CTGTATCTGC | AGATGAACAG |
| 421 | CCTGAAAACC | GAGGACACGG | CCACATATTA | CTGTGTGGTA | GCGACTACCC | TCCAGGACTA |
| 481 | CTGGGGCCAA | GGAGCCCTGG | TGACGGTGTG | CTCAGAGACC | TCATCCCGTC | CAAATCTCTT |
| 541 | CCCCCTCATC | ACCTGTGAGA | GCTCCCTGTC | CGATGAGCCC | CTGGTGGCCA | TGGGCTGCCT |
| 601 | GGCCCGGGAC | TTCTGCCCCA | GCTCCGTAC | CTTCTCCTGG | AACTACAAGA | ACAACAGTGT |
| 661 | GGTCAACAAC | A | | | | |

Cp1.2

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | GTCTACCAGG | CATTGCTTC | ATGGGGGATA | GGGAGCTGGG | AGACGAGCCC | CAGCCCCAGA |
| 61 | AGTCCAGGT | GTTACCAGTC | TGTGATCAGC | ACAGAACACA | CACACCTCAC | CATGGAGTTT |
| 121 | GTGCTGGGCT | GGGTTTTCT | GGTTGCTCT | TTAAAAGGTG | TCCAGTGTGA | TGTGCAGCTG |
| 181 | TGGAATCTG | GGGAGACCT | GGTGAAGCCT | GGGGGGTCCC | TGAGACTCAC | CTGTGTGGCC |
| 241 | TCTGATTCA | CCTTCAGTAG | CTATAGCATG | AACTGGGTCC | GCCAGGCTCC | AGGGAAGGGG |
| 301 | CTGCAGTGGG | TCGCATATAT | TAGTAGTAGT | GGAGGTAGCA | CAGGTTACGC | AGACTCCGTG |
| 361 | AAGGGCCGAT | TCACCATCTC | CATTGACAAC | GCCAAGAACA | CGCTGTATCT | GCAGATGGAC |
| 421 | AGCCTGAAGA | CTGAGGACAC | GGCCACATAT | TACTGTTCCG | CTATCCAGTT | TTGGGGCCAG |
| 481 | GGCACCTGG | TCACCGTCTC | CTCAGAGACC | TCATCCCGTC | CAAATCTCTT | CCCCCTCATC |
| 541 | ACCTGTGAGA | G | | | | |

Cp1.4

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | TCACCTTCAG | TAGATATGCA | ATGACCTGGG | TCCGCCAGGC | TCCAGGGAAG | GGACTGCAGT |
| 61 | GGGICTCAGC | AATTAGTGAT | AGTGGAGGTA | CCACACACTA | TGCAGACTCC | ATGAGGGGCC |
| 121 | GATTCACCAT | CTCCAGAGAC | AACGCCAAGA | ACACGCTGTA | TCTGCAGATG | AACAGCCTGA |
| 181 | AGACCGAGGA | CACGGCCACA | TATTACTGTG | CGAGAGATCG | GAGTACTCAC | TATGATTACT |
| 241 | TCCAGTTTTG | GGGCCAGGGC | ACCCTGGTCA | CCGTCTCCTC | AGAGACTCA | TCCCGTCCAA |
| 301 | ATCTCTTCCC | CCTCATCACC | TGTGAGAGCT | CCCTGTCCGA | TGAGCCCTG | GTGGCCATGG |
| 361 | GCTGCTGGC | CCGGGACTTC | CTGCCAGCT | CCGTACACCT | CTCCTGGAAC | TACAAGAACA |
| 421 | ACAGTGTGGT | CAACAACCA | | | | |

Cp1.6

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | CGGATCCAGA | ATTGCTGATT | GTCTACCAGG | CATTGCTTC | ATGGGGGATA | GGGAGCTGG |
| 61 | GAGACGAGCC | CCAGCCCCA | GGAGTCCCAG | GTGTTCCCAT | TCTGTGATCG | GCACAGAACA |
| 121 | CAGACACCTC | ACCATGGAGT | TTGTGTTGG | CTGGGTGTT | CTCATTGCTC | TTTTAAAAGG |
| 181 | TGTCAGTGT | GACGAGCAGC | TGGTGGAGTC | TGGGGGAGAC | CTGGTGAAGC | CTGGGGGGTC |
| 241 | CCTGAGACTC | ACCTGTATGG | CCTCCGATT | CAACGTCGGT | AGCTATGGAA | TGAGCTGGTT |

Anhang

| | | | | | | |
|-----|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 301 | CCGCCAGGCT | CCAGGAAAGG | GGCTGCAGTG | GGTCACAGCA | ATTAGTGCTG | GTGGAGGTAG |
| 361 | CACAAGTTAC | GCAGACTCCG | TGAAGGGCCG | ATTCACCATC | TCCATTGACA | ACGCCAAGAA |
| 421 | CACACTATAT | CTGCAGATGG | ACAGCCTGAA | GACTGAGGAC | ACGGCCACAT | ATTACTGTGC |
| 481 | GAGATTCTGTG | GGGCGACAAT | GGGGCGACCA | CTTCCCCTTT | TGGGGCCAGG | GCACCCTGGT |
| 541 | CACCGTCTCC | TCAGAGACCT | CATCCCCTCC | AAATCTCTTC | CCCCTCATCA | CCTGTGAGAG |
| 601 | CTCCCTGTCC | GATGAGCCCC | TGGTGGCCAT | GGGCTGCCTG | GCCCCGGACT | TCCTGCCAG |
| 661 | CTCCGTCACC | TTCTCCTGGA | ACTACAAGAA | CAACAGTGTG | GTCAACAACC | A |

Cp1.8

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | GTCTACCAGG | CATTCGCTTC | ATGGGGGATA | GGGGGGGAGA | CGATCCCCAG | CCCCAGAAGT |
| 61 | CCCAGGTGTT | ACCAGTCTGT | GATCAGCACA | GAACACACAC | ACCTAACCAT | GGAGTTTGTG |
| 121 | CTGGGCTGGG | TTTTCTGGT | TGCTCTTTTA | AAAGGTGTCC | AGTGTGATGT | GCAGCTGGTG |
| 181 | GAATCTGGGG | GAGACCTGGT | GAAGCCTGGG | GGGTCCCTGA | GACTCACCTG | TGTGGCCTCT |
| 241 | GGATTACCT | TCAGTAGCTA | TAGCATGAAC | TGGGTCCGCC | AGGCTCCAGG | GAAGGGCTG |
| 301 | CAGTGGGTCG | CATACATTTA | TAAAGATGGA | AGTAGCACAA | GCTATGCAGA | CTCCGTGAAG |
| 361 | GGCCGATTCA | CCATCTCCAG | AGACAACGCC | AAGAACACGC | TGTATCTGCA | GATGAACAGC |
| 421 | CTGAAGACCG | AGGACACGGC | CACATATTGC | CGTGCAAAG | CCCCTCGGGC | CAACTGTATC |
| 481 | GGATCACGA | CGCGTCGGAA | CCCTGGTGAC | GGTGTCCCTG | GAGACCTCAT | CCCGTCCAAA |
| 541 | TCTCTTCCCC | CTCATCACCT | GTGAGAGCTC | CCTGTCCGAT | GAGCCCCTGG | TGGCCATGGG |
| 601 | CTGCCTGGCC | CGGGACTTCC | TGCCCAGCTC | CGTCACCTTC | TCCTGGAACT | ACAAGAACAA |
| 661 | CAGTGTGGTC | AACAACCA | | | | |

Cp1.9

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | GTCTACCAGG | CATTCGCTTC | ATGGGGGATA | GGGAGCTGGG | AGAGGAGCCC | CAGCCCCAGG |
| 61 | AGTCCAGGTG | TTCCCATTCT | GTGATCAGCA | CAGATCACAC | ACACACCTCA | CCATGGAGTT |
| 121 | TGTGCTGGGC | TGGGTTTTCC | TGGTTGCTCT | TTTAAAAGGT | GTCCAGTGTG | ACGTGCAGCT |
| 181 | GGTGGAGTCT | GGGGGAGACC | TGGTGAAGCC | TGGGGGGTCC | CTGAGACTCA | CCTGTGTGGC |
| 241 | CTCTGGATTC | ACCTTCAGTA | ACTACGACAT | GAACTGGGTC | CGCCAGGCTC | CAGGGAAGGG |
| 301 | GCTGCAGTGG | GTCGCATATA | TTAATACTGA | TGGAAGTAGC | ACAAGGTACG | CAGACTCCGT |
| 361 | GAAGGGCCGA | TTCACCATT | CCAGAGACAA | TGCCAAGAAC | ACGCTGTATC | TGCAGATGAA |
| 421 | CAGCCTCAAG | ACCGAGGACA | CGGCACATA | TTACTGTACG | AGGTGGGAAC | CTTTGTACTG |
| 481 | GGGCCACGGA | GCCCTGGTGA | CGGTGACCTC | AGAGACCTCA | TCCCCGCCAA | ATCTCTTCCC |
| 541 | CCTCATCACC | TGTGAGAGCT | CCCTGTCCGA | TGAGCCCCTG | GTGGCCATGG | GCTGCCTGGC |
| 601 | CCGGGACTTC | CTGCCAGCT | CCGTACCTT | CTCCTGGAAC | TACAAGAACA | ACAGTGTGGT |
| 661 | CAACAACCA | | | | | |

Cp1.10

| | | | | | | |
|-----|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | CTACCAGGCA | TTCGCTTCAT | GGGGGATAGG | GGAGCTGGGA | GAGGAGCCCC | AGCCCCGGGA |
| 61 | GTCCAGGTG | TTCCCATTCT | GTGATCAGCA | CAGAACATAG | ACACCTCACC | ATGGAGTTTG |
| 121 | TGCTGGGCTG | GGTTTTCTCTG | GTTGCTCTTT | TAAAAGGTGT | CCAGTGTGAT | GTACAGCTGG |
| 181 | TGGAATCTGG | GGGAGACCTG | GTGAAGCCTG | GGGGGTCCCT | GAGACTCACC | TGTGTGGCCT |
| 241 | CTGGATTCAC | CTTCAGTAGC | TACTACATGC | ACTGGGTCCG | CCAGGCTCCA | GGGAAGGGGC |
| 301 | TGCAGTGGGT | CGCACAAATT | AGTAGTAGTG | GAGGTAGCAC | ATACTACGCA | GACTCCGTGA |
| 361 | AGGGCCGATT | CACCATCTCC | AGAGACAACG | CCAAGAACAC | GCTGTATCTG | CAGATGAACA |
| 421 | GCCTGAAGAC | CGAGGACACG | GCCACATATT | ACTGTGCGAG | GGGACCAATA | GTAGCGGGTG |
| 481 | GGCTAGAAAT | TGACTACTGG | GGCCAAGGAG | CCCTGGTGAC | GGTGTCCCTA | GAGACCTCAT |
| 541 | CCCGTCCAAA | TCTCTTCCCC | CTCATCACCT | GTGAGAGCTC | CCTGTCCGAT | GAGCCCCTGG |
| 601 | TGGCCATGGG | CTGCCTGGCC | CGGGACTTCC | TGCCCAGCTC | CGTCACCTTC | TCCTGGAACT |
| 661 | ACAAGAACAA | CAGTGTGGTC | AACAACCA | | | |

Cp1.11

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | GTCTACCAGG | CATTCGCTTC | ATGGGGGATA | GGGGGGGAGA | GGAGCCCCAG | CCCCAGGAGT |
| 61 | CCCAGGTGTT | CCCATTCTGT | GATCAGCACA | GAACACACAC | ACCTCACCAT | GGAGTTTGTG |
| 121 | CTGGGCTGGG | TTTTCTGGT | TACTCTTTTA | AAAGGTGTCC | AGTGTGATGT | GCAGTTGGTG |
| 181 | GAGTCTGGGG | GAGACCTGGT | GAAGCCTGGG | GGGTCCCTGA | GACTCACCTG | TGTAGCCTCT |
| 241 | GGATTCACCT | TCAGTAACTA | CTACATGAGC | TGGGTCCGCC | AGGCTCCAGG | GAAGGGGCTG |
| 301 | CAGTGGGTCG | CATATATTAG | TGGTGGTGGG | GGTGACATAT | ACTACCCAGA | CTCCGTGAAG |
| 361 | GGCCGATTCA | CCATCTCTAG | AGACAACGCC | AGGAATACGC | TGTATCTGCA | GATGAACAGC |
| 421 | CTGAAGACCG | AGGACACGGC | CACATATTAC | TGTGCGACAG | ATCCTAACTA | TGCTGACTAC |
| 481 | TGGGGCCAAG | GAGCCCTGGT | GACGGTGTCC | TCAGAGACCT | CATCCCCTCC | AAATCTCTTC |
| 541 | CCCCTCATCA | CCTGTGAGAG | CTCCCTGTCC | GATGAGCCCC | TGGTGGCCAT | GGGCTGCCTG |
| 601 | GCCCCGGACT | TCCTGCCAG | CTCCGTCACC | TTCTCCTGGA | ACTACAAGAA | CAACAGTGTG |
| 661 | GTCAACAACC | A | | | | |

Cp1.12

| | | | | | | |
|-----|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | GTCTACCAGG | CATTCGCTTC | ATGGGGGATA | GGGGAGTGTG | TTGGGTCTCC | ATCCAGAAGA |
| 61 | CAGAAATGCA | GATGCTGTGG | TCCCTCCTCT | GCCTGCTGGC | AGCTCCCCTG | GGTGTCTTAT |
| 121 | CTCAACTTAC | ACTTCGGGAG | TCCGGCCCAG | GACTGGTGAA | GCCTTCACAA | TCCCTCTCTC |
| 181 | TCACCTCGGT | TGTCTCCGGA | GGTCTGTGTA | CCAGCAGTTA | CTACTGGAAC | TGGATCCGCC |
| 241 | AGCGCCCTGG | GAGAGGGTTG | GAGTGGCTGG | GGTACTGGTC | AGGTAGCACC | AGCTACAACC |
| 301 | CGGCTTTCCA | GGGCCGCATC | TCCATCACTG | CTGACACAGC | CCAGAACCAG | TTCTCCCTGC |
| 361 | AGCTGAGCTC | CATGACCACC | GAGGACACGG | CCGTGTATTA | CTGTGCAAGA | AGCTTGGGTA |
| 421 | TGGAGGGGTA | CTACCTCCAC | GGGGCGAACT | TTGACTACTG | GGGCCAAGGA | GCCCTGGTGA |
| 481 | CGGTGTCTCT | AGAGACCTCA | TCCCCTCCAA | ATCTCTTCCC | CCTCATCACC | TGTGAGAGCT |
| 541 | CCCTGTCCGA | TGAGCCCCTG | GTGGCCATGG | GCTGCCTGGC | CCGGGACTTC | CTGCCAGCT |
| 601 | CCGTACACCTT | CTCCTGGAAC | TACAAGAACA | ACAGTGTGGT | CAACAACC | |

Cp1.13

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | GTCTACCAGG | CATTCGCTTC | ATGGGGGATA | GGGGGGAGAG | GAGCCCCAGC | CCCAGGAGTC |
| 61 | CAGGTGTTCC | CATTCTGTGA | TCAGCACAGA | TCACACACAC | ACCTCACCAT | GGAGTTTGTG |
| 121 | CTGGGCTGGG | TTTTCTGGT | TGCTCTTTTA | AAAGGTGTCC | AGTGTGACGT | GCAGCTGGTG |
| 181 | GAGTCTGGGG | GAGACCTGGT | GAAGCCTGGG | GGGTCCCTGA | GACTCACCTG | TGTGGCCTCT |
| 241 | GGACTCACCT | TCAGGCGCTA | CGACATGAAA | TGGGTCCGCC | AGGCTCCAGG | GAAGGGGCTG |
| 301 | CAGTGGGTCG | CATATATTGA | CACTGATGGA | ACTAGCACAA | GCTACGTAGA | CTCCGTGAAG |
| 361 | GGCCGATTCA | CCATCTCCAG | AGACAACGCG | AAGAACACGC | TGTATCTGCA | GATGAACAGC |
| 421 | CTGAAGACCG | AGGACACGGC | CACATATTAC | TGTGCGACCC | AAGTAGCGGG | TGGCCCCCGC |
| 481 | TACTGGGGCC | AAGGAGCCCT | GGTGACGGTG | TCCTCAGAGA | CCTCATCCCC | TCCAAATCTC |
| 541 | TTCCCCCTCA | TCACCTGTGA | GAGCTCCCTG | TCCGATGAGC | CCCTGGTGGC | CATGGGCTGC |
| 601 | CTGGCCCGGG | ACTTCTGCCC | CAGCTCCGTC | ACCTTCTCCT | GGAACATAAA | GAACAACAGT |
| 661 | GTGGTCAACA | ACCA | | | | |

8.12 Sequenz der bei der Untersuchung von Fall T1528/07

aufgetretenen Nebenbande

| | | | | | | |
|-----|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | GTGGCCTCTG | GATTACACCTT | CAGTAGCTAC | TACATGAGCT | GGGTCCGCCA | GGCTCCAGGG |
| 61 | AAGGGGCTGC | AGTGGGTTCG | ATATATTAGT | AGTAGTGGAG | GTAGCATATA | CTACGCAGAC |
| 121 | TCCGTGAAGG | GCCGATTAC | CATCTCCAGA | GACAACGCCA | AGAACACGCT | GTATCTGCAG |
| 181 | ATGAACAGCC | TGAAGACCGA | GGACACGGCC | ACATATTACT | GTGCTCGGGG | GGTCCCGATG |
| 241 | GACTCCTGGG | GCCAAGGAGC | CCTGGTGACG | GTGTCCTCAG | GTGAGTCCTC | CCGGCTTTCC |
| 301 | TCTCCTCTCT | CTGTCGGGAG | GTTTTGGCTG | CATTTGGGGA | GAAAACGGAG | GGTGCCAGGG |
| 361 | TCICGGACCT | AGGGCTGGCT | TGGTGGCCAG | GCTCTCCGGG | GACCTCAGCC | ACCCTCAGCT |
| 421 | TCAGGGGCCA | CCTGGTCCTC | TCAGCCTCAC | TGGCTGTGAT | CTGAGGTGGA | CCGAGGCCTT |
| 481 | AGCCAGGCC | CACTTCTTGT | CTGGGGCCCC | ACCAACATTG | TCACAATGTG | ACAACCTGGT |
| 541 | CAACTACTGG | GGCCACGGAA | CCCT | | | |

8.13 Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme, Kits und Antikörper

Biozym, Oldendorf (Vertreter von Gentra Inc., Mineapolis MN, USA)

Puregene[®] Kit, Kat.-Nr.: 202005

Purescript[®] Kit, Kat.-Nr.: 212010

SeaKem[®] LE Agarose, Kat.-Nr.: 840.00

BD Biosciences Heidelberg, Palo Alto, CA, USA

SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit, Kat.-Nr. 632914

BioCat, Heidelberg (Vertreter von Seegene, Kangnam-gu Seoul, Korea und von Finnzymes, Espoo Finland)

CapFishing[™] Full-lengt cDNA Premix Kit, Kat.-Nr. E1030-SG

Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase Kit, Kat.-Nr. F-553S

Bio-Rad Laboratories GmbH

Chelex 100 Resin, Kat.-Nr.: 142-1253

Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada

Anti-Mouse CD45R (Ly 5, B220), Purified (Clone RA3-6B2), Kat.-Nr.: CL8990AP

Dako, Hamburg

CD3, Polyclonal, Rabbit Anti-Human, Kat.-Nr.: A0452

Invitrogen, Karlsruhe

Superscript[™] II Reverse Transkriptase, Kat.-Nr. 18064-022

Library Efficiency[®] DH5 α [™] Competent Cells, Kat.-Nr.: 18263-012

TOPO TA Cloning[®] Kit, Kat.-Nr.: 12355-038

Macherey & Nagel, Düren

NucleoSpin[®] Extract II, Kat.-Nr.: 740590.250

NucleoSpin[®] Plasmid, Kat.-Nr.: 740588.250

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

*Eco*RI, Kat.-Nr.: ER0271

*Hinf*I, Kat.-Nr.: ER0801

pUC19 DNS, Kat.-Nr.: SD0061

*Rsa*I, Kat.-Nr.: ER1121

6X Orange Loading Dye Solution, Kat.-Nr.: R0631

Natutec, Frankfurt

BioTherm™ DNS-Polymerase, Kat.-Nr.: GC-002-002

Novagen-Merck Biosciences GmbH, Darmstadt

AccepTor™ Vector Kit, Kat.-Nr.: 70595-4

peQLab, Erlangen

dNTP-Set "Long Range", Kat.-Nr.: 20-2110

dNTP-Set, Kat.-Nr.: 20-2011

peQGOLD AMV, Reverse Transkriptase, Kat.-Nr.: 03-1010

SAWADY Taq-DNS-Polymerase, Kat. Nr.: 01-1030

Promega, Mannheim

RNAasin®, Ribonuclease Inhibitor, Kat.-Nr.: N2111

Qiagen, Hilden

Oligotex® Direct mRNA Kit, Kat.-Nr.: 70022

QIAshredder®-Säulen, Kat.-Nr.: 79654

QIAGEN® Multiplex PCR Kit, Kat.-Nr.: 206143

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

2-Propanol, Rotipuran® p. a., Kat.-Nr.: 6752.2

Ampicillin Natriumsalz, Kat.-Nr.: KO29.1

Ammoniumperoxodisulfat ≥98 %, p.a., Kat.-Nr.: 9592.3

Borsäure p. a., Kat.-Nr.: 6943.3

Bromphenolblau, Kat.-Nr.: A512.1

DEPC ≥ 97 %, Kat.-Nr.: K028.1

EDTA-Dinatrium-Dihydrat p. a., Kat.-Nr.: 8043.1

Ethanol, Rotipuran® p. a., Kat.-Nr.: 9065.4

Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10mg/ml): Kat.-Nr.: 2218.2

IPTG, Kat.-Nr.: 2316.2

LB-AGAR (Luria Miller), Kat.-Nr.: X969.2

LB-Medium (Luria Miller), Kat.-Nr.: X968.2

Natriumacetat p. a., Kat.-Nr.: 6773.2

Natriumdodekylsulfat, Kat.-Nr.: 2326.2

Roti[®] Chlorophorm/Isoamylalkohol, Kat.-Nr.: X984.1

Roti[®] Phenol, Kat.-Nr.: 0038.1

Rotiphorese[®] Gel 40 (19:1), Kat.-Nr.: 3030.1

TEMED 99 %, p.a., für die Elektrophorese, Kat.-Nr.: 2367.3

Tris-Puffer Ultra Pure, Kat.-Nr.: 5429.2

X-Gal, Kat.-Nr.: 2315.3

Xylenzyanol, Kat.-Nr.: C.I. 42135

Serva, Heidelberg

Ficoll[®] 400, Kat.-Nr.: 39763.02

Silicone Solution SERVA, Kat.-Nr.: 35130

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tween[®]20, Kat.-Nr.: P9416

8.14 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

Assab Medizin AB, Stockholm, Schweden

Brutschrank 77.09 615A 303 GF

Balzer GmbH

Monofile Schnur, Kat.-Nr: 12062/030

Biometra, Göttingen

BioDoc Analyse Geldokumentation System

Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf

Multicycler PTC 200

Multicycler PTC 200 Gradient

PCR Soft Tubes, 0,5 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710911

PCR Soft Tubes, 0,2 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710920

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 1000 µl: Kat.-Nr.: 781002

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 200 µl: Kat.-Nr.: 780202

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 100 µl: Kat.-Nr.: 780102

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 20 µl: Kat.-Nr.: 780022

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 10 µl: Kat.-Nr.: 780017

Consort, Belgien

Microcomputer Electrophoresis Power Supply

Eastman Kodak Inc., USA

Kodak Gel-Dokumentation System Version 1.0

Eppendorf GmbH, Hamburg

Eppendorfszentrifuge 5415C

Haereus, Hanau

Zentrifuge-Labofuge 400R

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim

Varioklav[®] Dampfsterilisator Typ 500 EV

Janke & Kunkel GmbH & Co KG JKA Labortechnik, Stauffen

Schüttler HS501D

Keutz, Reiskirchen

Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“, horizontal, Kat.-Nr.: 0030191-00

Gießvorrichtung, Kat.-Nr.: 0030191-03

KNF Neuberger GmbH, Freiburg

Membran-Vakuumpumpe, Kat.-Nr.: N 035AN.18

MAGV, Rabenau

Falcon™ Rundboden-Röhrchen, Kat.-Nr.: 352059

1mal Petrischalen, ohne Nocken, Kat.-Nr.: 632180

Mettler GmbH, Giessen

Präzisionswaage PM 4600 Delta Range

Präzisionswaage AE100

MICROM GmbH, Walldorf

Mikrotom Microm HM 335 E

Privileg, Quelle, Gießen

Mikrowellengerät 7020

Radeberger Bilderrahmen GmbH, Radeberg

21 cm x 29,7 cm (DIN A4) Rahmenloser Bildhalter Normalglas, Kat.-Nr.: 300450

Reichert-Jung, Nußloch

Kryomikrotom Frigocut 2.700

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Saugflasche, Erlenmeyerform, Kat.-Nr.: E576.1

Shimadzu Europa GmbH, Duisburg

Shimadzu UV-1202, UV-VIS Spektrophotometer

Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich

UV-Transluminator 312 nm

UV-Transluminator 254 nm

Horst Zaun, Königswinter (Oberpleis)

Semperguard, Latex puderfrei, Kat.-Nr.: 8247 0482

Semperguard, Nitril USH puderfrei, Kat.-Nr.: 8106 02082

8.15 Lösungen und Puffer

Die folgend aufgeführten Lösungen und Puffer wurden, soweit angegeben, bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert.

8.15.1 PCR

8.15.1.1 DEPC-Wasser – RNase-freies Wasser

1 ml Diethylpyrocarbonat gibt man zu 1l Aqua dest.. Über Nacht auf Magnetrührer inkubieren. Danach autoklavieren.

8.15.2 Elektrophorese

8.15.2.1 10 × TBE-Puffer

108,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

55,0 g Borsäure (MW 61,83)

8,3 g EDTA-Na₂ (MW 372,24)

ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

8.15.2.2 40 × TAE-Puffer

193,6 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

108,8 g Na-Acetat (MW 82,03)

15,2 g EDTA-Na₂ (MW 372,24)

ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

8.15.2.3 0,5 × T-Puffer

60,57 mg Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

ad 100 ml Aqua dest., autoklavieren

8.15.2.4 15%ige Ficoll[®]-Lösung zum Beladen der Geltaschen

1,5 g Ficoll[®] 400

ad 10 ml Aqua dest.,

Schütteln bis zur vollständigen Auflösung.

Zugabe von 25 mg Xylenzylanol oder 25 mg Bromphenolblau

8.15.2.5 2%ige und 3 %ige Agarosegele

100 ml 1×TBE (10 ml 10×TBE und 90 ml Aqua dest.)

2 g bzw. 3 g Agarose

Die Agarose in 1×TBE Puffer in der Mikrowelle aufkochen bis zur vollständigen Auflösung.

Auf ca. 60 °C abkühlen lassen und 8 µl 0,1%ige Ethidiumbromidlösung zufügen. Gel

blasenfrei in Gießvorrichtung mit einem oder zwei Kämmen (20 Zähne) gießen. Nach dem

Erstarren des Gels die Kämmen entfernen.

8.15.2.6 Glasplatten silanisieren

Zu silanisierende Oberflächen gründlich reinigen, als letzten Reinigungsschritt mit dest.

Wasser abspülen. 20 µl 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat-Lösung und 150 µl 10%ige

Essigsäure in ein Falcon-Tube geben und auf 5 ml mit absolutem Ethanol auffüllen.

Oberflächen gründlich mit dieser Lösung beschichten (Lösung auftropfen und mit Papiertuch

verreiben). Trocknen lassen. Etwas Diethylether auftropfen und Oberfläche damit polieren.

Zwei- bis dreimal wiederholen. Etwas abs. Ethanol auftropfen und Oberfläche damit polieren.

Zwei- bis dreimal wiederholen. Trocknen lassen.

8.15.3 Klonierung

8.15.3.1 LB Medium

25 g Fertigmedium

ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen lassen und 100µg/ml Ampicillin hinzufügen. Bis zur

Verwendung bei 4°C lagern.

8.15.3.2 LB Agar

40 g Fertigmedium

ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen lassen und 100 µg/ml Ampicillin hinzufügen. In sterile Petrischalen gießen, erstarren lassen und anschließend bei 4°C lagern.

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| (Amp) | Schwache Amplifikation |
| A | Adenin |
| Amp | Amplifikation |
| AMV | Avian Myeloblastoma Virus |
| B3q26 | Langer Arm des Chromosom 3, Region 2, Band 6 |
| Bcl-2 | B-cell leukemia/lymphoma 2 (Protein) |
| BKH | British Kurzhaar |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C | Cytosin |
| CD | cluster of differentiation |
| cDNA | complementary DNA |
| CDR | complimentary-determining region |
| C-Region | constant region |
| D | diversity |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMFO | Dimethyformamid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EKH | Europäisch Kurzhaar |
| FeLV | Felines Leukämievirus |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| FFPE | Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe |
| FIV | Felines Immundefizienzvirus |
| FR | framework region |
| G | Guanin |
| G6PDH | Glucose-6-Phosphatdehydrogenase |
| HIV | Humanes Immundefizienzvirus |
| Ig | Immunglobulin |
| IgH | immunoglobulin heavy (chain), schwere Kette des Immunglobulins |
| IGHG | immunoglobulin heavy gamma-chain gene |
| IGHM | immunoglobulin heavy μ -chain gene |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| J | joining |
| k.a. | keine Angabe |
| kAmp | Keine Amplifikation |
| kD | Kilodalton |
| L | Leipzig |
| LTR | long terminal repeat |
| m | männlich |
| MALT | mucosa-associated lymphatic tissue |
| mk | männlich, kastriert |
| mRNA | messenger ribonucleic acid (Boten-RNS) |
| N | non templated encoded |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| OH | Hydroxylgruppe |
| P | pallindromische Nukleotide |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| PCR | polymerase chain reaction |
| Pfu | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| poly A | Polyadenyliert |
| RACE | rapid amplification of cDNA ends |
| RAG | recombination activating gene |
| REAL | revised european american lymphoma classification |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| rpm | revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RSS | recombination signal sequences |
| RT | Reverse Transkription |
| SDS | Natriumdodekylsulfat |
| SMART | switch mechanism at 5' end of RNA transcript |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TCR | T-cell receptor |
| TdT | Terminale Desoxynukleotidtransferase |
| UPL | langer Universalprimer |
| UPM | Mischung aus kurzem und langen Universalprimer |
| UPS | kurzer Universalprimer |
| UV | Ultraviolett |
| V | variable |
| VH | V-Region der schweren (heavy) Kette des Immunglobulins |
| VNTR | variable numbers of tandem repeats |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| w | weiblich |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation der Vereinten Nationen |
| wk | weiblich, kastriert |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid |

Danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Dr. Werner Hecht für die vielen produktiven Diskussionen, Vorschläge und seine unerschöpfliche Geduld bei Fragen des molekularbiologischen Laien.

Herrn Alexander Weiss für die unbezahlbare Hilfe zu Beginn der Arbeit, aber auch für die Unterstützung bis zuletzt.

Herrn Dr. Kernt Köhler für die Überlassung der Lymphomproben einschließlich ihrer Klassifizierung, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie, die bei der Anfertigung und Diagnose der histologischen und immunhistologischen Proben aus der Routinediagnostik beteiligt waren.

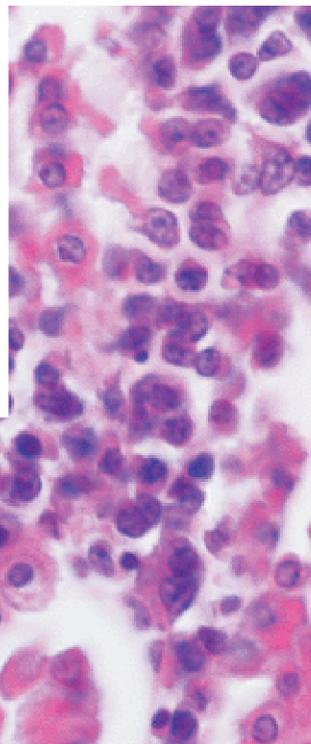
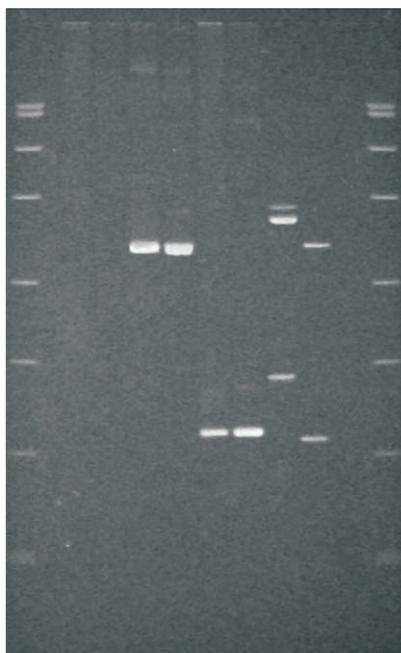
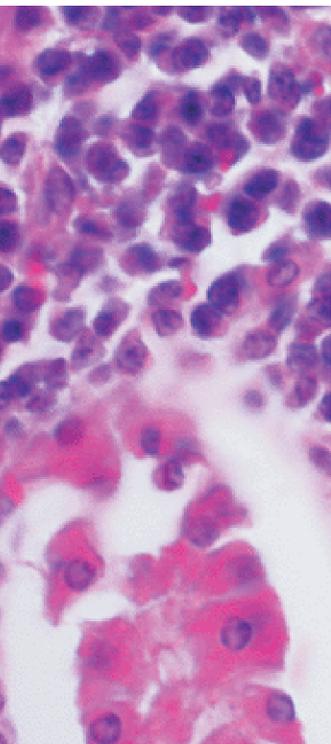
Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Silke Engel für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie insbesondere bei Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, meinen Schwiegereltern und vor allem Estelle.

Danksagung

Das Dissertationsprojekt wurde unterstützt durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5276-5



9 783595 2768