

Analyse der Rekombination des felinen T-Zellrezeptor- γ -Gens bei T-Zell-Lymphosarkomen der Katze

ULRIKE ROXANE FISCHER



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 2013

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 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

**Analyse der Rekombination des felines T-Zellrezeptor- γ -Gens
bei T-Zell-Lymphosarkomen der Katze**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

ULRIKE ROXANE FISCHER

Tierärztin aus Weingarten

Gießen 2013

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. R. Neiger

Tag der Disputation: 11.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1.	Das Lymphosarkom	2
2.1.1	Definition und Ursprung	2
2.1.2	Klassifikationen	2
2.1.2.1	Anatomische Formen	2
2.1.2.2	Histologische und immunhistologische Klassifikation	3
2.1.3	Vergleich der Prognose von B- und T-Zell-Lymphosarkomen	7
2.1.3.1	Mensch	7
2.1.3.2	Katze	7
2.1.4	Besonderheiten bei der Katze	8
2.1.4.1	Prävalenz der Lymphosarkome	8
2.1.4.2	Ätiologie	8
2.1.5	Diagnosestellung	10
2.1.5.1	Histologie und Immunhistologie sowie ihre Einschränkungen	10
2.1.5.2	Molekularbiologische Methoden	11
3.	Material und Methoden	25
3.1.	Untersuchungsmaterial	25
3.2.	Histologie	25
3.2.1	Histopathologie	25
3.2.2	Immunhistologie	26
3.2.2.1	Nachweis des CD3-Antigens (Pan-T-Zell-Marker)	26
3.2.2.2	Nachweis des CD45R-Antigens (B220 (Ly5)) (Pan-B-Zell-Marker)	27
3.2.2.3	Nachweis von gp70- und p27-Antigen (FeLV)	28
3.2.2.4	Positivkontrollen	28
3.2.2.5	Auswertung	29
3.3.	Isolation von DNS	29
3.3.1	Isolation von DNS aus unfixiertem Gewebe	29
3.3.2	Isolation von DNS aus formalin- oder äthanolfixiertem Gewebe	31
3.3.3	Isolation von DNS aus formalin- oder äthanolfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe	31
3.3.3.1	Isolation mit dem Puregene [®] DNA Purification Kit	32

3.3.3.2	Isolation mittels Hitzebehandlung, Chelex 100 und Chloroform	33
3.3.3.3	Isolation mittels <i>WaxFreeTMDNA</i>	34
3.3.4	Aufbewahrung der isolierten DNS	34
3.4.	Konzentrationsbestimmung von DNS	34
3.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	34
3.4.2	Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung	35
3.5.	Kontrolle der DNS-Integrität	35
3.5.1	Integritätskontrolle mittels Elektrophorese	35
3.5.2	Integritätskontrolle mittels Kontrollfragmenten	35
3.6.	Diagnostik-Primer	36
3.7.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
3.7.1	Überprüfen der Diagnostik-Primer	37
3.7.1.1	Single-PCR	37
3.7.1.2	Gradienten-PCR	38
3.7.1.3	Multiplex-PCR	38
3.7.1.4	Template	40
3.7.2	Amplifikation der DNS des Untersuchungsmaterials	41
3.7.2.1	Multiplex-PCR	41
3.7.2.2	Subgruppen-spezifische PCR	41
3.8.	Heteroduplexanalyse (HDA)	42
3.9.	Kontrolle der PCR- und HDA-Ergebnisse	43
3.9.1	Elektrophorese	43
3.9.1.1	Agarosegelelektrophorese	43
3.9.1.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	44
3.9.1.3	Visualisierung der DNS und Dokumentation	46
3.9.2	Sequencer	47
3.9.2.1	Prinzip der Analyse mittels Sequencer	47
3.9.2.2	PCR-Bedingungen	47
3.9.2.3	Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung eines Sequencers	48
3.10.	Klonierung von PCR-Produkten	49
3.10.1	Aufreinigung der DNS aus dem Gel	49
3.10.2	CloneJET TM PCR Cloning Kit	49
3.10.3	Kultivierung und Subkultivierung ausgewählter Kolonien	50
3.10.4	Colony-Screening-PCR	51

3.10.5	Aufbewahrung der ausgewählten Kulturen	52
3.10.6	Präparation von Plasmid-DNS	52
3.11.	Aufreinigung von PCR-Produkten	53
3.12.	Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse	53
3.13.	Statistische Analyse	53
3.13.1	Datenaufbereitung	53
3.13.2	Auswertung der Daten	53
4.	Ergebnisse	56
4.1.	Isolation von DNS	56
4.2.	Auswahl der Primer zur Klonalitätsdiagnostik	56
4.2.1	Vergleich mit den Sequenzen von Weiss (2008)	56
4.2.2	Modifikation der Diagnostikprimer	59
4.2.3	Überprüfung der Diagnostikprimer	60
4.2.3.1	Auswahl der Anlagerungstemperatur	60
4.2.3.2	Sensitivität und Spezifität der Diagnostik-Primer	60
4.3.	Überprüfung der Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR	61
4.3.1	Menge des eingesetzten Templates	61
4.3.2	Elongationszeit	62
4.4.	Elektrische Feldstärke der PAGE	63
4.5.	Ergebnisse der untersuchten Proben in der Multiplex-PCR	64
4.5.1	T-Zell-Lymphosarkome	64
4.5.2	B-Zell-Lymphosarkome	65
4.5.3	Polyklonale Kontrollen	65
4.5.4	Sensitivität und Spezifität des diagnostischen Systems	66
4.6.	Amplifikation der einzelnen Subgruppen	67
4.7.	Auswirkung von Fäulnis- und Fixationsprozessen auf das diagnostische System	71
4.8.	Auftreten von Banden außerhalb des erwarteten Größenbereichs	74
4.9.	Untersuchung der Herkunft der oligoklonalen Banden	75
4.9.1	Klonierung und Sequenzierung aller Banden eines oligoklonalen Tumors	75
4.9.2	Visualisierung der PCR-Produkte mittels Sequencer	77
4.10.	Fall T989/08	79
4.10.1	Sequenzierung	79
4.10.2	Klonierung der mit den modifizierten Primern erhaltenen Banden	80

4.11. Anamnestische Daten, histologische und immunhistologische Klassifizierung	81
4.11.1 T-Zell-Lymphosarkome	81
4.11.1.1 Einteilung nach WHO-Klassifikation	81
4.11.1.2 Bewertung der histologisch und immunhistologisch erhobenen Merkmale	82
4.11.1.3 Anamnestische Daten	86
4.11.1.4 Untersuchung mittels logistischer Regression	90
4.11.2 B-Zell-Lymphosarkome	91
4.11.2.1 Einteilung nach WHO-Klassifikation	91
4.11.3 Polyklonales Kontrollgewebe	92
5 Diskussion	93
5.1. Ziel der Arbeit und Voraussetzungen	93
5.1.1 Diagnostikprimer	93
5.1.2 Einteilungskriterien der Ergebnisse	94
5.1.3 Auftrennung der PCR-Produkte	94
5.1.3.1 Heteroduplexanalyse (HDA) und Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	95
5.1.3.2 Sequencer	97
5.1.4 Auswirkungen der postmortalen Veränderungen und Fixationsprozesse	98
5.2. T-Zell-Lymphosarkome	99
5.2.1 Monoklonale monoallelische Populationen	99
5.2.2 Monoklonale biallelische bzw. biklonale Populationen	100
5.2.3 Oligoklonale Populationen	102
5.2.4 Polyklonale Populationen	108
5.2.5 Vorkommenshäufigkeit bestimmter Kombinationen von V- und J-Gensegmenten	110
5.3. B-Zell-Lymphosarkome	111
5.4. Polyklonale Kontrollgewebe	112
5.5. Vergleich mit bestehenden Diagnostiksystemen	112
5.6. Anwendung des diagnostischen Systems	114
6. Zusammenfassung	116
7. Summary	117
8. Literaturverzeichnis	118
9. Anhang	130
9.1. Tabellen	130

9.1.1	T-Zell-Lymphosarkome	130
9.1.2	B-Zell-Lymphosarkome und Kontrollen	139
9.1.3	Sequenzen	140
9.1.3.1	Veröffentlichte Sequenz des felinen TRG (Weiss, 2008)	140
9.1.3.2	Veröffentlichte Sequenz der Klone (Weiss, 2008), die zur Überprüfung der Primer für das diagnostische System verwendet wurden.	141
9.2.	Abbildungen	143
9.2.1	Verwendete Längenstandards	143
9.2.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	144
9.2.2.1	T-Zell-Lymphosarkome	144
9.2.2.2	B-Zell-Lymphosarkome	150
9.2.2.3	Polyklonale Kontrollen	152
9.2.3	Sequencer	154
9.2.4	Histologie und Immunhistologie	159
9.2.4.1	T-Zell-Lymphosarkome	159
9.2.4.2	B-Zell-Lymphosarkome	162
9.3.	Lösungen und Puffer	164
9.3.1	Immunhistologie	164
9.3.2	Isolation von DNS	165
9.3.3	Elektrophorese	165
9.3.4	Sequencer	166
9.3.5	Klonierung	167
9.4.	Bezugsquellen für Chemikalien und Laborgeräte	167
10.	Abkürzungsverzeichnis	175
11.	Danksagung	178
12.	Erklärung	180

1. Einleitung

Obwohl Lymphosarkome als die am häufigsten vorkommende Tumorform bei der Katze gelten (Crighton, 1969), kann dennoch immer noch nicht in allen Fällen eine eindeutige Diagnose gestellt werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine Abgrenzung mancher Lymphosarkome von reaktiven lymphatischen Proliferationen mit den in der Veterinärmedizin routinemäßig eingesetzten Methoden (Histologie und Immunhistologie) nicht möglich ist.

Es existieren jedoch weitere Untersuchungsmethoden, welche sich auf den Nachweis von Eigenschaften stützen, die für Tumoren spezifisch sind. Eine dieser Methoden basiert auf der Detektion des klonalen Ursprungs von Tumoren (Alexander, 1985). Speziell bei Lymphosarkomen kann dieser durch Analyse der klonal rearrangierten Antigenrezeptorgene mittels molekularbiologischer Methoden (Polymerasekettenreaktion) ermittelt werden (McCarthy, 1997).

In der Humanmedizin erfolgt der Einsatz der PCR zur Unterstützung der Lymphosarkomdiagnostik seit den 90er Jahren, ist inzwischen etabliert (Bourguin et al., 1990; Goudie et al., 1990; Witzens et al., 1997) und wird auch zur Kontrolle der minimalen Resterkrankung und von Rückfällen eingesetzt (Stow et al., 2010).

In der Veterinärmedizin wird diese Technik erst in neuerer Zeit verwendet. Untersuchungen liegen zum einen beim Hund vor, bei dem die Struktur des caninen T-Zellrezeptor- β -Gens (TRB) (Dreitz et al., 1999; Matiasovic et al., 2009) und des caninen T-Zellrezeptor- γ -Gens (TRG) (Burnett et al., 2003; Vernau and Moore, 1999; Yagihara et al., 2007; Yamazaki et al., 2008) analysiert und Rearrangements untersucht wurden. Zum anderen fanden bei der Katze Untersuchungen zum TRG statt (Moore et al., 2005; Weiss et al., 2011).

Ziel dieser Arbeit ist es, histologisch und immunhistologisch klassifizierte T-Zell-Lymphosarkome sowie Kontrollgewebe auf das Vorhandensein klonal rearrangierter TRG zu untersuchen, um eine molekularbiologische Methode zur Unterstützung der Diagnose histologisch nicht eindeutiger T-Zell-Lymphosarkome zu entwickeln.

2. Literaturübersicht

2.1. Das Lymphosarkom

2.1.1 Definition und Ursprung

Lymphosarkome (Synonyme: malignes Lymphom, Lymphom) stellen solide Proliferationen sowie diffuse Infiltrationen lymphoretikulärer Zellen und deren Vorstufen in verschiedenen Organen und Geweben dar. Im Gegensatz dazu ist die Leukämie durch eine Erhöhung der Anzahl von neoplastischen lymphoiden Zellen oder das Vorhandensein von unreifen neoplastischen lymphoiden Zellen im Blut gekennzeichnet (Crighton, 1969). Eine Leukämie kommt bei der Katze nur selten vor (Crighton, 1969). Zur Abgrenzung der beiden Formen voneinander, werden in der deutschsprachigen veterinärmedizinischen Literatur die systemischen Tumoren als aleukämische und die Leukämie als leukämische Leukosen bezeichnet (Ellerman und Bang, 1908).

In der Humanmedizin werden Lymphome in benigne und maligne (Synonym: Lymphosarkom) unterschieden (Valli et al., 2002). Da in der Veterinärmedizin keine benignen Lymphome definiert sind, wird oft nur der Terminus Lymphom verwendet.

Zu den hämatopoietischen Neoplasien gehören nicht nur die oben genannten lymphatischen Formen, sondern auch Tumoren des myeloischen Systems, die Proliferationen von Zellen des übrigen hämatopoetischen Systems darstellen (Valli et al., 2002). Beide Formen gehen auf eine gemeinsame pluripotente Stammzelle zurück (Abramson et al., 1977). Lymphatische Neoplasien sind aber weitaus häufiger bei den Haussäugetieren (Crighton, 1969).

2.1.2 Klassifikationen

2.1.2.1 Anatomische Formen

Pathologisch-anatomisch werden Lymphosarkome in multizentrische, intestinale, mediastinale (Thymusform) und andere Formen eingeteilt (Crighton, 1969; Jarrett and Mackey, 1974). Bei der multizentrischen Form sind zahlreiche Organe wie Milz, Leber, Nieren, Lunge, Herz, Magendarmtrakt und Knochenmark betroffen. Die Lymphknoten sind häufig bilateral symmetrisch vergrößert. Die Hauptläsion bei der intestinalen Form befindet sich im Magendarmtrakt und dessen regionären Lymphknoten. Infiltrationen sind jedoch auch häufig in Leber und Nieren zu finden. Liegt die mediastinale Form vor, so ist das präkardiale Mittelfell durch einen großen Knoten ersetzt. Diese Tumorzellen können sich in die regionären Lymphknoten und auch in andere Organe ausbreiten. Die Hauptläsion bei den anderen Formen findet man – bezogen auf die Katze – am häufigsten in den Nieren.

2.1.2.2 Histologische und immunhistologische Klassifikation

Derzeit wird zur histologischen und immunhistologischen Einteilung in der Veterinärmedizin die WHO-Klassifikation der hämatopoietischen Tumore der Haustiere (Valli et al., 2002) angewandt:

TUMORS OF LYMPHOID SYSTEM

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)

1.2.6 Hairy cell lymphoma

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-cell neoplasms

2.2.1 Large granular lymphoproliferative disorders (LGL)

2. Literaturübersicht

- 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 tumors
- 3.2 Hodgkin-like lymphoma
- 3.3 Thymoma
- 3.4 Thymic carcinoma (malignant thymoma)
- 3.5 Myelolipoma
- 3.6 Malignant fibrous histiocyoma

4 Benign Lymphoid Proliferations

- 4.1 Follicular lymphoid hyperplasia
- 4.2 Atypical follicular lymphoid hyperplasia
- 4.3 Paracortical lymphoid hyperplasia

TUMORS OF MYELOID SYSTEM

1 Malignant Myeloid Proliferations

- 1.1 Precursor myeloid leukemia
 - 1.1.1 Acute myeloid leukemia/undifferentiated leukemia (AML M0)
 - 1.1.2 Acute myeloid leukemia without maturation (AML M1)
 - 1.1.3 Acute myeloid leukemia with maturation (AML M2)
 - 1.1.4 Acute promyelocytic leukemia (AML M3)
 - 1.1.5 Acute myelomonocytic leukemia (AML M4)
 - 1.1.6 Acute monoblastic leukemia (AML M5A)
 - 1.1.7 Acute monocytic leukemia (AML M5B)
 - 1.1.8 Erythroleukemia (AML M6A)

2. Literaturübersicht

- 1.1.9 Erythremic myelosis (AML M6B)
- 1.1.10 Acute megakaryoblastic leukemia (AML M7)
- 1.2 Chronic myelogenous leukemias (CML)
 - 1.2.1 CML, neutrophilic
 - 1.2.2 CML, eosinophilic
 - 1.2.3 CML, monocytic
 - 1.2.4 Polycythemia vera
 - 1.2.5 Megakaryocytic myelosis/essential thrombocythemia
- 1.3 Myelodysplastic syndromes
 - 1.3.1 Idiopathic myelofibrosis/myeloid metaplasia (MMM)
 - 1.3.2 Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)
 - 1.3.3 Refractory anemia with excess blasts (RAEB)
- 2 Solid Myeloid Proliferations**
 - 2.1 Cutaneous histiocytoma
 - 2.2 Cutaneous histiocytosis (cutaneous reactive histiocytosis)
 - 2.3 Systemic histiocytosis (systemic reactive histiocytosis)
 - 2.4 Histiocytic sarcoma/malignant histiocytosis
 - 2.5 Granulocytic sarcoma
- 3 Benign Myeloid Proliferations**
 - 3.1 Leukemoid reaction
 - 3.2 Leukopenia with left shift
 - 3.3 Loeffler-like syndrome

Bei dieser Klassifikation wird die Einteilung der Veränderungen zunächst in Bezug auf den Zelltyp (lymphoid/myeloisch) und die Dignität (maligne/benigne) vorgenommen. Bei dem lymphoiden System erfolgt darauf eine Unterscheidung anhand immunhistologischer Marker (B/T). Im nächsten Schritt werden die Tumore nach zytologischen Merkmalen (Zellgröße, Kerngröße und -form, Kern-Chromatin-Verhältnis, Anzahl der Nukleoli, Menge und Lokalisation des Zytoplasmas) und Ursprungszelle eingeteilt.

Im Folgenden werden die Tumortypen, die bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben vorkamen, genauer erklärt (Valli et al., 2002).

2.1.2.2.1 B-Zell-Lymphosarkome

– *Follicular center cell lymphoma II*

Diese langsam wachsenden Tumoren stammen von den Keimzentren der Lymphknoten ab, die sich durch eine charakteristische follikuläre Architektur und dünner werdende Mantelzelllagen auszeichnen. Bei Typ II besteht der Aufbau der Follikel hauptsächlich aus

kleinen, reifen, eingekerbten Zellen und großen, eingekerbten und nichteingekerbten Zellen. In den meisten Follikeln sind Mitosen zu finden.

– *Diffuse large B-cell lymphoma*

Es handelt sich um mäßig aggressive Tumoren, die eine diffuse Infiltration als Aufbau zeigen. Dieser besteht aus einer relativ einheitlichen Population von großen lymphoiden Zellen mit vesikulären Kernen, verzweigtem Chromatin und zwei bis drei deutlichen Nukleoli, die typischerweise die Kernmembran berühren.

2.1.2.2.2 T-Zell-Lymphosarkome

– *T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma*

Dieser Tumor schreitet schnell fort und besteht aus T-Zell-Lymphoblasten. Das Knochenmark und/oder die peripheren Gewebe sind in unterschiedlichem Ausmaß betroffen.

– *T-cell chronic lymphocytic lymphoma*

Es handelt sich hierbei um eine langsam fortschreitende Erkrankung relativ kleiner Zellen mit einer reifen oder dichten Verteilung des Chromatins.

– *Cutaneous epitheliotropic lymphoma (CEL), mycosis fungoides type*

Diese langsam fortschreitenden, sich oft multifokal ausbreitenden kutanen und mukokutanen epitheliotropen Tumore zeigen periphere Läsionen, die im Laufe der Zeit abwechselnd größer und kleiner werden und schließlich in ein chronisches leukämisches Stadium übergehen.

– *Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma*

Es handelt sich um eine Erkrankung vor allem bei Hunden und Katzen. Sie ist durch eine Proliferation maligner Lymphozyten gekennzeichnet, die große Teile der tiefen Dermis besetzen.

– *Extranodal/peripheral T-cell lymphoma (PTCL)*

Diese peripher extranodal oder oft subkutan gelegenen lymphoiden Proliferationen, die entweder aus gemischten lymphoiden Zellen oder aus einer Infiltration von verschiedenen Entzündungszellen bestehen, imitieren granulomatöse Entzündungen und können zu aggressiven multizentrischen Lymphosarkomen fortschreiten.

– *Angiocentric lymphoma*

Es handelt sich um eine aggressive maligne lymphoide Proliferation, die dichte zelluläre Infiltrate um kleine Arterien und Venen formt, welche die Gefäße einengen und das Lumen verschließen, wobei die murale Infiltration minimal ist.

– *Intestinal T-cell lymphoma*

Diese langsam fortschreitenden kleinzelligen Lymphosarkome des Verdauungstrakts scheinen im Hintergrund chronischer *Inflammatory Bowel Diseases* (IBD) zu entstehen. Bei der Katze fehlen hierfür jedoch eindeutige Beweise (Barrs et al., 2012).

– *Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)*

Es handelt sich um ein schnell fortschreitendes großzelliges Lymphosarkom, das durch große und sehr pleomorphe Zellen gekennzeichnet ist.

2.1.3 Vergleich der Prognose von B- und T-Zell-Lymphosarkomen

2.1.3.1 Mensch

In der Humanmedizin weisen T-Zell-Lymphosarkome generell eine schlechtere Prognose auf. Der T-Zell-Phänotyp wurde als eigenständiger prognostischer Faktor aufgezeigt und gilt als einer der signifikantesten Prädiktoren (Gisselbrecht et al., 1998; Melnyk et al., 1997). So wurde nachgewiesen, dass bei einem Subtyp des Non-Hodgkin-Lymphoms, dem diffusen großzelligen Lymphosarkom, das erkrankungsfreie Intervall bei dem T-Zell-Phänotyp wesentlich kürzer war als bei dem B-Zell-Phänotyp (Lippman et al., 1988).

2.1.3.2 Katze

Bei der Katze wurde die Überlebenszeit bei Vorliegen von intestinalen B- oder T-Zell-Lymphosarkomen untersucht (Patterson-Kane et al., 2004). Obwohl die mittlere Überlebenszeit bei T-Zell-Lymphosarkomen halb so lang wie bei B-Zell-Lymphosarkomen war, lag keine statistische Signifikanz vor. Es wurde jedoch nur eine kleine Anzahl an Tumoren untersucht. Daher ist für eine eindeutige Aussage die Untersuchung einer größeren Fallzahl notwendig.

2.1.4 Besonderheiten bei der Katze

2.1.4.1 Prävalenz der Lymphosarkome

Lymphosarkome gelten als die am häufigsten vorkommende Tumorform bei der Katze (Crichton, 1969). In den 1960er Jahren wurde in den USA eine Prävalenz von 0,0416 % nachgewiesen (Dorn et al., 1967), bei den intestinalen Lymphosarkomen eine Prävalenz von 1,42 % (Loupal and Pfeil, 1984). In einer neueren Studie waren ca. 50 % aller Tumoren der in einem Zeitraum von 16 Jahren seziierten Katze hämatopoietische Tumoren (Reinacher et al., 1997).

2.1.4.2 Ätiologie

2.1.4.2.1 Felines Leukämie Virus

2.1.4.2.1.1 Tumorpathogenese

Mitte des 20. Jahrhunderts wurden bei Lymphosarkomen von Katzen mittels Elektronenmikroskopie Viruspartikel nachgewiesen, die in ihrer Morphologie den Viren ähnelten, die Leukämie und Sarkome beim Geflügel und der Maus verursachen (Jarrett, 1971; Jarrett et al., 1964). Man infizierte durch Inokulation mit dem aus Zellkulturen aufgereinigten Virus Katzenwelpen, die darauf nach acht bis 15 Monaten Lymphosarkome entwickelten.

Im Jahr 1969 wurde die Hypothese der viralen Onkogene für RNS-Viren aufgestellt (Huebner and Todaro, 1969). Die virale Information enthält unter anderem den Anteil, der für die Transformation der normalen Zelle in eine Tumorzelle verantwortlich ist.

Man nahm an, dass die onkogenen Eigenschaften des FeLV durch unterschiedliche Mechanismen entstehen. Zum einen wurde das Model der Insertionsmutagenese formuliert. Dabei integriert das virale Provirus in oder an zellulären Protoonkogenen und aktiviert diese. Bei FeLV wurde eine Integration angrenzend an den Transkriptionsfaktor *c-myc* (Braun et al., 1985; Neil et al., 1984; Terry et al., 1992) und an *flvi-1* aufgezeigt (Levesque et al., 1990; Terry et al., 1992). Zum anderen wurde eine Weitergabe von Protoonkogenen des Wirts, wie dem *Notch2*-Gen, nachgewiesen (Rohn et al., 1996). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Viren, deren *env*-Gen deletiert oder defekt ist, häufiger eine Tumorentstehung auslösen (Rohn et al., 1996). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass das entsprechende Hüllprotein abnorme oder mehrfache Reinfektionen nicht verhindert und so die provirale Mutagenese zellulärer Protoonkogene wahrscheinlicher wird.

2.1.4.2.1.2 Auftreten in Zusammenhang mit Lymphosarkomen

Das Vorkommen FeLV-assoziierter Lymphosarkome zeigte im Laufe der Zeit starke Veränderungen. Während im Zeitraum vor den 1980er Jahren 76 % der Katzen mit Lymphosarkom eine FeLV-Infektion aufwiesen (Francis et al., 1979), belegen neuere Studien einen deutlichen Rückgang. In den USA wurden in einer Studie innerhalb von 20 Jahren 546 Fälle von Lymphosarkomen bei Katzen untersucht (Louwerens et al., 2005). Bei nur 14,5 % wurde eine FeLV-Infektion nachgewiesen, wobei die Mehrheit von 56 % vor 1991 auftrat. In dem untersuchten Zeitraum von 1983 bis 2003 hat sich die Prävalenz von FeLV-negativen Lymphosarkomen jedoch von durchschnittlich 18 Fällen pro Jahr von 1983 bis 1994 auf 32,4 Fälle pro Jahr von 1994 bis 2003 fast verdoppelt. In einer australischen Studie von 2001 waren hingegen nur noch 26 % der Lymphome FeLV-positiv, wobei die Prävalenz von FeLV in Australien generell niedriger ist als in der nördlichen Hemisphäre (Gabor et al., 2001).

Inzwischen ist aber bekannt, dass die Prävalenz auch von der Nachweismethode abhängt. So waren bei einer Studie 80 % der Lymphosarkome in der PCR FeLV-positiv, jedoch nur 57 % mittels Immunhistologie (Jackson et al., 1993). Dies unterstützt die Theorie, dass bei einigen Lymphosarkomen latente oder replikationsunfähige FeLV beteiligt sind.

Neben den exogenen sind auch endogene FeLV-verwandte Sequenzen bei der Katze bekannt. Diese sind in die Keimbahn integriert und somit im Genom jeder Körperzelle vorhanden (Benveniste et al., 1975). Aufgrund von Kreuzreaktionen mit Antikörpern, die gegen die Translationsprodukte der endogenen Sequenzen gerichtet sind, besteht die Möglichkeit falsch positive Ergebnisse zu erhalten (Englert et al., 2012).

Andererseits wurde die höhere Nachweisrate mittels PCR auf eine höhere Sensitivität und der Möglichkeit, eine nichtproduktive Infektion nachweisen zu können, zurückgeführt. Bei einer neueren Untersuchung in Deutschland wiesen 58 % der untersuchten Katzen mit einer produktiven FeLV-Infektion Lymphosarkome auf (Suntz et al., 2010). In derselben Studie zeigten 50 % der Lymphosarkome eine nicht produktive FeLV-Infektion.

Eine 2010 in Iran veröffentlichte Studie zur Seroprävalenz des FeLV bei 170 Katzen wies eine Häufigkeit von 14,2 % auf (Akhtardanesh et al., 2010). In Deutschland wurde Blut von 17245 Katzen im Zeitraum zwischen 1993 und 2002 mittels ELISA auf das Vorhandensein von FeLV-Antigen getestet und es ergab sich eine Prävalenz von 3,6 % (Gleich et al., 2009).

Der Rückgang von FeLV-positiven Fällen wurde darauf zurückgeführt, dass seit den 1970er Jahren eine kommerzielle Nachweismethode verfügbar ist und seit den 1980er Jahren ein Impfstoff eingesetzt wird.

2.1.4.2.2 Ungeklärte Ätiologie

Nicht alle Fälle von Lymphosarkomen können durch eine Infektion mit Retroviren erklärt werden, da das Auftreten FIV- und FeLV-negativer Lymphosarkome nachgewiesen wurde (Sheldon et al., 1990). Des Weiteren wurde von einer spezifisch-pathogenfreien Katze berichtet, die ein Lymphosarkom entwickelte (Jarrett et al., 1984).

Die Entstehung von Tumoren wird generell mit einer progressiven Ansammlung genetischer und epigenetischer Abweichungen assoziiert. In Lymphosarkomen wurden zahlreiche entsprechende Veränderungen nachgewiesen, die nicht virus-assoziiert sind. In virusfreien Lymphosarkomzelllinien wurde eine chromosomale Instabilität in Form von numerischen Abweichungen detektiert (Gulino, 1992). Ein Verlust der Heterozygotie wurde bei humanen T-Zell-Lymphosarkomen in Regionen, die Tumorsuppressorgene enthalten, festgestellt; im Retinoblastomgenlocus, im APC (Adenomatosis polyposis coli) –Genlocus und im p53-Genlocus (Baumgartner et al., 2003). In derselben Studie wurden auch allelische Imbalancen in der Region 9q34 nachgewiesen. In dieser Region sind zahlreiche Kandidatengene gelegen, deren Defekt zur Entstehung von Lymphosarkomen beitragen kann. *c-abl* ist eine Tyrosinkinase, die konstitutiv aktiviert Pfade dereguliert, die den Zellzyklus und die Apoptose kontrollieren. Ein weiteres Kandidatengen ist *Notch-1*, ein transmembraner Rezeptor, der verantwortlich für die Differenzierung von Lymphozytenvorläufern in T-Zellen ist.

2.1.5 Diagnosestellung

2.1.5.1 Histologie und Immunhistologie sowie ihre Einschränkungen

Die Diagnose von Lymphosarkomen erfolgt in der Veterinärmedizin in erster Linie anhand Ausstrichen von Feinnadelaspirationen sowie HE-gefärbter Gewebeschnitte von Teilbiopsien oder vollständigen Knoten. Mittels immunhistologischer Nachweismethoden kann zusätzlich die Linienzugehörigkeit zu B- (Coffman and Weissman, 1981) oder T-Zellen (Beebe et al., 1994) ermittelt werden. Anschließend ist es möglich, die Neoplasien entsprechend der derzeit gültigen WHO-Klassifikation einzuteilen (Valli et al., 2002).

Mit Hilfe dieser Methoden lässt sich jedoch nicht immer entscheiden, ob es sich um eine neoplastische oder eine reaktive Proliferation von Lymphozyten handelt, da manche Lymphosarkome aus einer Minderheit von malignen Zellen sowie einer heterogenen Population von anderen Entzündungszellen und Lymphozyten bestehen können (Walton and Hendrick, 2001). Periphere reaktive Lymphadenopathien können mehrere Merkmale eines peripheren Lymphosarkoms aufweisen, wie beispielsweise den Verlust der Architektur des

Lymphknotens, uniforme lymphoide Zellen mit mitotischer Aktivität in den parakortikalen Bereichen, die die Follikel ersetzen, sowie kapsuläre und perinodale Infiltration (Mooney et al., 1987). Zusätzlich ist es möglich, dass aufgrund verschiedener Infektionskrankheiten reaktive Lymphozyten auftreten, die morphologische Charakteristika ihrer malignen Pendanten aufweisen (Avery and Avery, 2004). Ein weiteres Problem besteht darin, intestinale Lymphosarkome von der IBD abzugrenzen, da eine IBD ein Lymphosarkom nachahmen kann (Ragaini et al., 2003). Verschiedene Studien belegten daher auch, dass diese beiden Erkrankungen mittels histologisch untersuchter Biopsien weder beim Menschen noch bei der Katze verlässlich voneinander unterschieden werden können (Briscoe et al., 2011; El-Zimaity et al., 2005; Evans et al., 2006). Eine Ursache hierfür ist, dass das intestinale Lymphosarkom meist aus gut differenzierten, kleinen Lymphozyten besteht (Waly et al., 2005; Willard, 1999). Die Schwierigkeit, eine korrekte Diagnose zu stellen, wird zusätzlich durch die Tatsache erhöht, dass eine Transformation der Lymphozytenpopulation, die eine IBD ausmacht, zu einem Lymphosarkom erfolgen kann (Avery and Avery, 2004).

2.1.5.2 Molekularbiologische Methoden

2.1.5.2.1 Grundlagen

2.1.5.2.1.1 Klonalitätstheorie

Wie einleitend erwähnt, besteht die Möglichkeit, die Diagnose eines Lymphosarkoms durch Methoden zu unterstützen, die tumorspezifische Eigenschaften nachweisen.

Dies geht auf die Hypothese zurück, dass die Zellpopulation, die einen Tumor ausmacht, von einer einzigen Ursprungszelle ausgeht (Alexander, 1985) und daher als monoklonal zu bezeichnen ist. Diese Ursprungszelle überträgt ihre durch Mutation entstandenen genetischen Veränderungen auf ihre Nachkommen (Fialkow, 1979; Secker-Walker, 1985).

Eine Methode zum Nachweis der Klonalität, auch bei Lymphosarkomen, die entsprechende Veränderungen aufweisen, stellt die Untersuchung somatischer Mutationen dar, deren Hypothese auf die Überlegungen von Theodor Boveri Anfang des 20. Jahrhunderts zurückgeht (Boveri, 1914). Als Marker dienen beim Mensch einheitliche chromosomale Anomalien wie zum Beispiel die *bcl-1* und *bcl-2* Translokationen bei non-Hodgkin-Lymphomen (Rezuke et al., 1997; Wainscoat and Fey, 1990).

Eine weitere Möglichkeit speziell bei weiblichen Individuen ist die Bestimmung des Phänotyps des Enzyms Glucose-6-Phosphatdehydrogenase auf dem X-Chromosom (Linder and Gartler, 1965; Smith et al., 1971).

Bei lymphatischen Proliferationen ist es des Weiteren möglich, die Klonalität durch Analyse der rearrangierten Antigenrezeptorgene zu untersuchen. Bei den B-Lymphozyten sind dies die Gene der schweren Kette und der beiden leichten Ketten der Antikörper, bei den T-Lymphozyten werden die Ketten des T-Zell-Rezeptors (TCR) rearrangiert (McCarthy, 1997; Rezuke et al., 1997).

2.1.5.2.1.2 T-Zellen

2.1.5.2.1.2.1 T-Zell-Entwicklung

T-Lymphozyten entstehen ontogenetisch aus pluripotenten Stammzellen vor allem im Knochenmark und auch in der Leber. Sie wandern nach einer ersten Differenzierung als multipotente Zellen unter anderem in den Thymus ein, wo die ersten Reifungsstadien entstehen (Spits et al., 1995). Bei $\gamma\delta$ T-Zellen wurde nachgewiesen, dass sich diese auch außerhalb des Thymus in der Leber und der Haut (Groh and Strominger, 1990) sowie im Darm (Spits et al., 1995) entwickeln. Die reifen T-Lymphozyten zirkulieren darauf im peripheren Blut und lassen sich in den peripheren lymphatischen Geweben nieder. Hierzu gehören die parakortikalen Bereiche der Lymphknoten, die periarteriolären Bereiche der Milz und die Peyer'schen Platten des Darms (Picker and Butcher, 1992).

2.1.5.2.1.3 T-Zellrezeptor

2.1.5.2.1.3.1 Aufbau und kodierende Gene

Die T-Lymphozyten besitzen einen membranständigen Protein-Komplex auf ihrer Oberfläche, der in seiner Struktur dem Immunglobulin-Rezeptor ähnelt (Saito et al., 1984). Die Gene, die für den T-Zellrezeptor (TCR) kodieren, werden früh in der Entwicklung im Thymus rearrangiert (Spits et al., 1995).

Die vier Gene α , β , γ und δ kodieren für zwei verschiedene TCR, die als Heterodimere vorliegen. Dies sind der $\alpha\beta$ - und der $\gamma\delta$ -Rezeptor (Brenner et al., 1986; Pardoll et al., 1987).

Anfang der 1980er Jahre wurde der $\alpha\beta$ -Rezeptor zunächst auf einer Lymphosarkomzelllinie nachgewiesen. Danach fand man die Struktur eines durch eine Disulfid-Brücke verbundenen Epitops auch auf normalen T-Lymphozyten (Allison et al., 1982; Chien et al., 1984; Meuer et al., 1983; Siu et al., 1984). Nach dem TCR α - und dem TCR β -Protein wurde das TCR γ -Protein entdeckt (Brenner et al., 1986), zuletzt das TCR δ -Protein (Brenner et al., 1986; Chien et al., 1987). Dessen Gene liegen in 5'-Richtung der kodierenden JC-Segmente der TRA und werden bei deren VJ-Rekombination deletiert. Die Zellen, die den $\gamma\delta$ -Rezeptor auf der Oberfläche tragen, entsprechen einer gesonderten T-Zelllinie. Ihre Entwicklung geht in

der Ontogenese der Entwicklung derjenigen T-Zellen, die den $\alpha\beta$ -Rezeptor auf der Oberfläche tragen, im Thymus voraus (Chien et al., 1987; Pardoll et al., 1987; Raulet et al., 1985). Man stellte die Hypothese auf, dass bei einem produktiven Rearrangement des $\gamma\delta$ -Rezeptors kein weiteres Rearrangement der Gene des T-Zellrezeptor- α (TRA) und des T-Zellrezeptor- β (TRB) stattfindet und der $\gamma\delta$ -Rezeptor im Zusammenhang mit CD3 gebildet wird (Pardoll et al., 1987). Falls das Rearrangement der Gene des T-Zellrezeptor- γ (TRG) und des T-Zellrezeptor- δ (TRD) jedoch nicht-produktiv ist, rearrangieren die TRB, die Zelle exprimiert zunächst einen prä- $\alpha\beta$ -Rezeptor, der das Rearrangement der TRA initiiert, und schließlich exprimiert die Zelle den $\alpha\beta$ -Rezeptor auf der Oberfläche (Garbe and von Boehmer, 2007; Taghon and Rothenberg, 2008). Dies ist möglich, da zu der Zeit, zu der die TRD und TRG ein komplettes Rearrangement aufweisen, die TRB bereits partiell rearrangiert sind und die Zellen mit dem Rearrangement fortfahren (Pardoll et al., 1987). Des Weiteren wird durch Signale des prä- $\alpha\beta$ -Rezeptors ein Silencer für die γ -Proteinkette exprimiert und die Expression wird herunterreguliert (Ferrero et al., 2006).

Die Mehrheit von über 95 % der humanen T-Lymphozyten trägt den $\alpha\beta$ -Rezeptor auf der Oberfläche und nur weniger als 5 % den $\gamma\delta$ -Rezeptor (Royer and Reinherz, 1987). In den meisten murinen und humanen $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten finden sich jedoch nicht produktive Rekombinationen des TRG (Chien et al., 1984; Coad et al., 1997; Ferrero et al., 2006; Heilig and Tonegawa, 1987; Theodorou et al., 1994), da dieses vor den TRA und TRB rearrangiert und nicht, wie die TRD, deletiert werden (Chien et al., 1987; Garbe and von Boehmer, 2007; Hewitt et al., 2010; Taghon and Rothenberg, 2008).

Die als Heterodimere vorliegenden Proteine sind durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden und aus variablen (V-) und konstanten (C-) Regionen aufgebaut (Allison et al., 2001; Saito et al., 1984) (s. Abb. 1). Die C-Regionen verankern den Rezeptor in der Zellmembran und sind an der Effektorfunktion der Zelle beteiligt, die V-Regionen an der Antigenerkennung (Gill and Gulley, 1994).

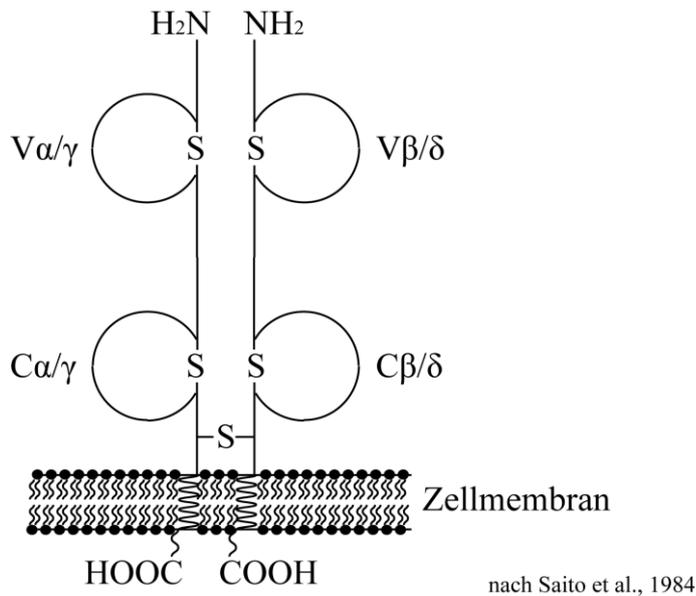


Abbildung 1: Schematische Darstellung des TCR

Der TCR $\alpha\beta$ kann Antigene nur über MHC-Moleküle vermittelt erkennen (MHC-Restriktion) (Benacerraf and Germain, 1978; Zinkernagel and Doherty, 1974). Im Gegensatz dazu erkennt der TCR $\gamma\delta$ die Antigene direkt (Allison et al., 2001; Taghon and Rothenberg, 2008).

2.1.5.2.1.3.2 V(D)J-Rekombination

Mitte der 50er Jahre stellte Jerne die „Theorie der natürlichen Selektion der Antikörper“ auf (Jerne, 1955). Diese Theorie wurde von Burnet modifiziert (Burnet, 1976). Ihm zufolge handelt es sich nicht um eine natürliche, sondern um eine klonale Selektion, bei der sich bestimmte Zellen nach einem Antigenstimulus vermehren. Um die Vielfalt der Antikörper zu erklären, wurde die Notwendigkeit eines genetischen Prozesses im Laufe der Entwicklung unterstellt, bei dem es zu einer zufälligen Zusammensetzung der kodierenden Regionen kommt.

Die theoretische Basis des DNS-Rearrangements zur Bildung der Antigenrezeptoren wurde bereits in den 60er Jahren gelegt (Dreyer and Bennett, 1965). In Abbildung 2 ist das Rearrangement der Gene des TCR schematisch dargestellt.

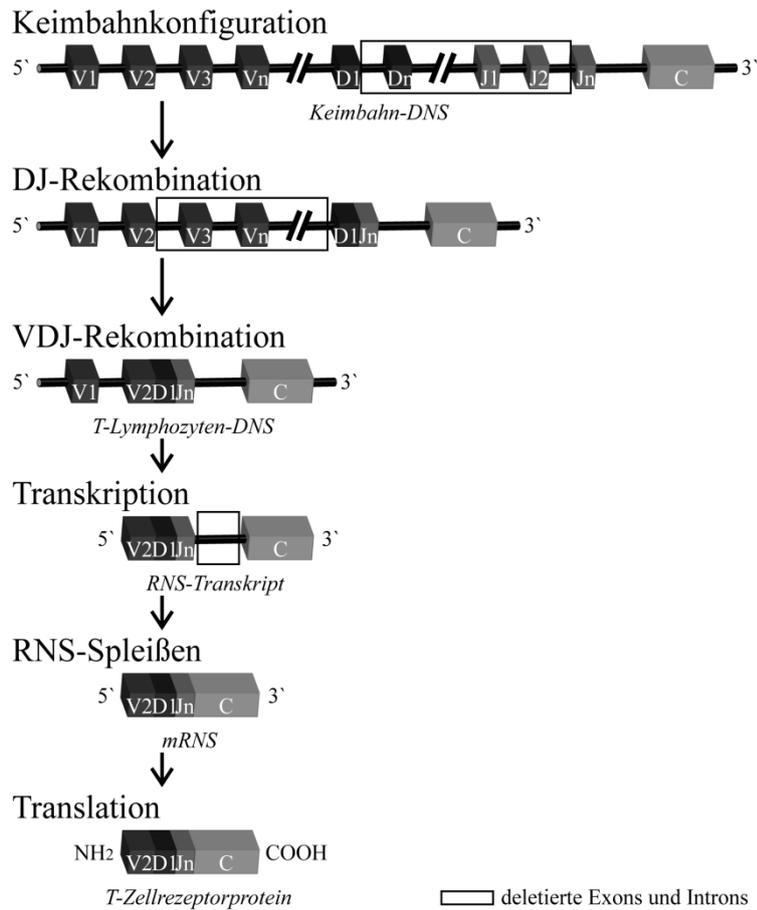


Abbildung 2: VDJ-Rekombination

Die nicht-rearrangierte DNS wird als Keimbahnkonfiguration bezeichnet (Coad et al., 1997; Rezuke et al., 1997; Siu et al., 1984). Die Exone, die für die V-Region der TCRs kodieren, werden Variable (V)-, Diversity (D)- und Joining (J)-Segmente und die, welche für die C-Region kodieren, Constant (C)-Segmente genannt.

Das Rearrangement beginnt damit, dass ein D- und ein J-Segment gezielt aneinander gelagert werden. Die dazwischen liegenden kodierenden und nichtkodierenden DNS-Sequenzen werden deletiert. Es entsteht eine DJ-Rekombination.

Auf ähnliche Weise wird ein V-Segment an das DJ-Segment angelagert und es entsteht eine VDJ-Rekombination.

Anschließend wird die DNS in mRNS transkribiert, obwohl das VDJ-Segment noch nicht an das C-Segment angelagert ist. Durch das darauffolgende Spleißen der mRNS mit Deletion der nichtkodierenden Sequenzen wird das VDJ- an das C-Segment angelagert und eine VDJC-mRNS gebildet. Diese kann in ein TCR-Protein translatiert werden (Rezuke et al., 1997).

Die TRB und die TRD bestehen aus V-, D-, J- und C-Segmenten, während die TRA und die TRG nur aus V-, J- und C-Segmenten aufgebaut sind (Coad et al., 1997; Hayday et al., 1985; Lieber, 1991; Rezuke et al., 1997; Saito et al., 1984; Siu et al., 1984).

Die verschiedenen Gene der V-, D-, J- und C-Segmente werden als Varianten bezeichnet (Lefranc, 2001). Die verschiedenen Varianten werden traditionell ab einer Homologie von 75 % auf Nukleotidebene in Subgruppen zusammengefasst (Giudicelli and Lefranc, 1999). Als Cluster werden Gruppen von V-, D-, J- und C-Gensegmenten, die auf dem Chromosom aufeinander folgen, bezeichnet (Weiss, 2008) (s. Abb. 3).



Abbildung 3: Beispiel für einen in Clustern aufgebauten TRG.

2.1.5.2.1.3.3 Vermittlung der Rekombination

Zwischen den verschiedenen Gensequenzen liegen spezielle Erkennungssequenzen, welche die Rekombination vermitteln, die sogenannten Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) (Siu et al., 1984; Tonegawa, 1983). Diese bestehen aus drei Elementen. An dem einen Ende befindet sich ein hochkonserviertes Heptamer und an dem anderen ein weniger konserviertes Nonamer mit einer entsprechenden Konsensussequenz von 5'-CACAGTG-3' oder 5'-ACAAAACC-3' (Jung and Alt, 2004; Leder, 1982; van Gent et al., 1995). Dazwischen liegt eine nichtkonservierte Spacer-Sequenz, die entweder aus 12 oder 23 ± 1 Basen besteht, was ein bzw. zwei Windungen der α -Helixstruktur der DNS entspricht (Gill and Gulley, 1994; Hayday et al., 1985). Bei der Rekombination lagert sich immer ein Gensegment, das an seinem Ende die RSS Heptamer – 12 Basenspacer – Nonamer besitzt, an eines mit der RSS Nonamer – 23 Basenspacer – Heptamer an (12/23-Regel) (Lewis and Gellert, 1989; Lewis, 1994). Die RSS bilden nach der Rekombination zweier Gensegmente eine Signalverbindung, wobei eine exakte Ligation der beiden Heptamere stattfindet, während die verbundenen Gensegmente durch eine nichtexakte Ligation eine kodierende Verbindung formen (s. Abb. 4) (Roth et al., 1993; Tonegawa, 1983). Die exakte Ligation ohne Verlust von Basen beruht darauf, dass die RSS im Gegensatz zu den kodierenden Enden glatte Enden aufweisen (Roth et al., 1993).

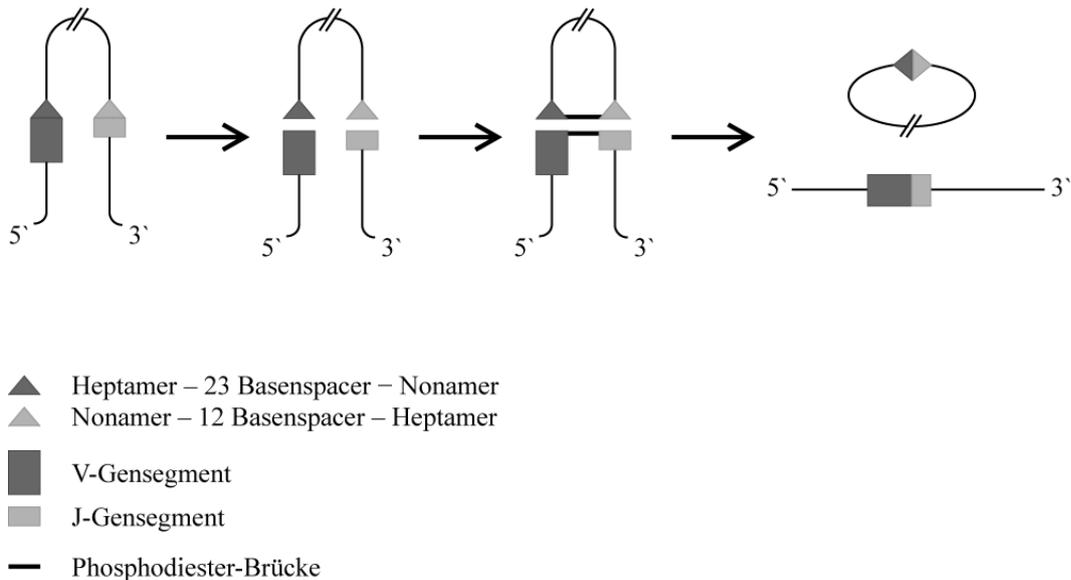


Abbildung 4: Erkennungssequenzen der Rekombination (nach Alt, 1982).

2.1.5.2.1.3.4 Initiierung der Rekombination

Die VDJ-Rekombination wird durch die Aktivität des VDJ-Rekombinase-Komplexes initiiert. Dieser wird durch die Proteine RAG-1 und RAG-2 gebildet (Alt et al., 1992; Lieber, 1991; Oettinger et al., 1990). Es wurde nachgewiesen, dass das RAG-1-Protein direkt die Spaltung der DNS aktivieren kann, jedoch nur bei Anwesenheit des RAG-2-Proteins (McBlane et al., 1995; van Gent et al., 1995). Bei Fehlen eines oder beider Gene ist keine Spaltung der DNS möglich (van Gent et al., 1995). Die Bildung des Doppelstrangbruchs stellt daher den limitierenden Schritt bei der V(D)J-Rekombination dar.

Der RAG-Komplex bleibt nach dem Einfügen des Doppelstrangbruchs mit den zwei Signalenden und den zwei kodierenden Enden verbunden, so dass diese anschließend durch ein allgegenwärtig exprimiertes Set von sogenannten *nonhomologous end joining* (NHEJ)-Proteinen ligiert werden können (Bassing et al., 2002).

2.1.5.2.1.3.5 Diversität der Antigenrezeptoren

Um die Diversität der Antigenrezeptoren zu erhöhen, existieren bei den T-Zellen drei verschiedene Mechanismen: die kombinatorische Diversität, die Bindungsstellendiversität und die Insertionsdiversität (Lafaille et al., 1989).

Die kombinatorische Diversität wird durch die Kombination vieler verschiedener Gensegmente hervorgerufen. So existieren in den humanen TRG 14 V-, 5 J- und 2 C-Segmente (Coad et al., 1997; van Dongen et al., 2003). In den felines TRG wurden bislang 22 V-, 13 J- und 6 C-Gensegmente entdeckt (Cho et al., 1998; Moore et al., 2005; Weiss et al., 2008; Weiss et al., 2010).

Die Diversität der Bindungsstellen entsteht durch die Aktivität einer DNS-Exonuklease, die an den ungenau aneinandergefügten Enden der rekombinierenden Gensegmente willkürlich Basen abbaut (Lafaille et al., 1989).

Die Insertionsdiversität beruht auf zwei unterschiedlichen Vorgängen. Einerseits fügt das Enzym terminale Deoxynukleotidyltransferase ohne Vorlage Nukleotide, genannt N-Nukleotide (*non-template*), hinzu (Coad et al., 1997; Tonegawa, 1983). Die N-Nukleotide enthalten häufiger als bei einer zufälligen Verteilung erwartet G-Reste oder GC- bzw. CG-Paare (Alt and Baltimore, 1982; Lafaille et al., 1989; Lieber, 1991).

Andererseits entstehen palindromische Sequenzen bestehend aus aufeinanderfolgenden Mono- oder Dinukleotiden, die sogenannten P-Nukleotide (Lafaille et al., 1989). P-Nukleotide wurden nur an kodierenden Verbindungen gefunden, jedoch nicht an Signalverbindungen (Lafaille et al., 1989; Lewis and Gellert, 1989; Roth et al., 1992). Als Entstehungsweg der P-Nukleotide wurde die Hypothese des Haarnadel-Modells aufgestellt (Lieber, 1991; Roth et al., 1992). Es wird angenommen, dass zunächst durch den RAG-Komplex ein Einzelstrangbruch zwischen einer Signalsequenz und einer kodierenden Region auftritt, der in eine Haarnadelstruktur an den kodierenden Enden umgeformt wird (McBlane et al., 1995; van Gent et al., 1995). Diese Haarnadelstruktur wird danach durch Einfügen eines spezifischen Bruchs abgelöst und es entsteht eine Einzelstrangverlängerung mit einem Palindrom am Ende (Lewis, 1994; Roth et al., 1992). Die Verlängerung wird anschließend auf dem gegenüberliegenden Strang aufgefüllt.

Durch diese Prozesse werden ausreichend viele unterschiedliche TCRs gebildet, um das enorme Spektrum an Antigenen abzudecken (Coad et al., 1997).

Bei Immunglobulinen kommen des Weiteren somatische Hypermutationen vor. Bei diesem Prozess treten willkürliche Punktmutationen in den Antigenbindungsstellen auf (McCarthy, 1997). Dieser Vorgang tritt bei dem TCR β , wenn überhaupt, jedoch nur unregelmäßig auf (Concannon et al., 1986; Siu et al., 1984), während bei dem TCR γ bislang noch kein Hinweis darauf gefunden werden konnte (Hayday et al., 1985).

2.1.5.2.1.3.6 N-Region

Durch die Vorgänge der kombinatorischen Diversität, der Bindungsstellendiversität und der Insertionsdiversität wird die sogenannte N-Region gebildet. Die TRA und die TRG besitzen jeweils eine N-Region zwischen dem V- und dem J-Gensegment, die TRB und die TRD jeweils zwei N-Regionen; eine zwischen dem V- und dem D-Gensegment sowie eine zwischen dem D- und dem J-Gensegment (Rezuke et al., 1997; van Dongen et al., 2003).

2.1.5.2.1.3.7 Aufbau der V-Region des Antigenrezeptors

Die V-Region des Antigenrezeptors besteht aus funktionell unterschiedlichen Bereichen. Die *framework regions* (FR) stellen konservierte Nukleotidsequenzen dar, die als Primerbindungsstellen genutzt werden können, während die *complementarity determining regions* (CDR) hypervariable DNS-Sequenzen sind, die für die Antigenbindungsstelle kodieren (McCarthy, 1997; Rezuze et al., 1997). Von diesen leistet die CDR3, die erst durch den Prozess des Rearrangements entsteht, den Hauptbeitrag zur Antigenpezifität und bildet daher die Basis zur Bestimmung der Klonalität (Davis and Bjorkman, 1988; Tonegawa, 1983). Die CDR3 ist bei den TRG aus dem Ende des V-Gensegments, der N-Region und dem Anfang des J-Gensegments aufgebaut (s. Abb. 5).

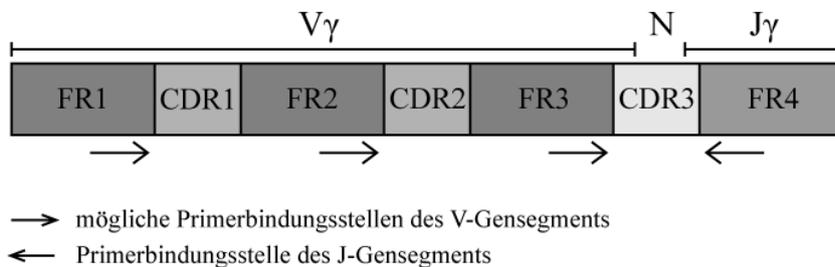


Abbildung 5: Aufbau des rearrangierten VJ-Gensegments. Die CDR1 und die CDR2 sind keimbahnkodiert. Die CDR3 jedoch wird durch das VJ-Rearrangement gebildet und besteht aus dem Ende des V-, dem Anfang des J-Gensegments sowie der N-Region.

2.1.5.2.1.3.8 Gene des T-Zell-Rezeptor- γ der Katze

Die konstante Region der felines TRG wurde von Cho untersucht (Cho et al., 1998). Hierbei wurde herausgefunden, dass der kodierende Abschnitt 554 bp groß ist und sich auf Chromosom A2 befindet.

Die Sequenz der variablen Region der felines TRG wurde zunächst von Moore analysiert (Moore et al., 2005). Das V-Gensegment wurde anhand einer Homologie von 80 % in drei Familien eingeteilt, wobei die erste dominant exprimiert zu sein schien. In die erste Familie fielen 12 verschiedene V-Gensegmente mit einer Homologie von über 90 %. Die zweite Familie wies nur ein V-Gensegment auf und die dritte nur zwei. Bei den J-Gensegmenten wurde eine hohe Homologie nachgewiesen und es wurden insgesamt 6 verschiedene Varianten entdeckt.

Weiss jedoch teilte die V-Gensegmente aufgrund einer Homologie von 75 % in zwei Subgruppen ein, wobei drei Varianten in die erste Subgruppe fielen und den drei von Moore identifizierten Familien entsprechen (Weiss et al., 2008). Die zweite Subgruppe enthält nur die vierte Variante, die zuvor noch nicht beschrieben worden war. Bei zwei Varianten konnte

die 23RSS nachgewiesen werden. Die Sequenz des Heptamers lautete 5'-CACAGCC-3' und des Nonamers 5'-GCAAAAAGT-3'. Des Weiteren wurden vier V-Gensegmente identifiziert, bei denen es sich aufgrund von Mutationen in den kodierenden Sequenzen wahrscheinlich um Pseudogene handelt (Weiss et al., 2010). Eines dieser Gene repräsentiert eine weitere Subgruppe.

Im J-Gensegment wurden acht Varianten entdeckt und aufgrund ihrer Homologie drei Subgruppen zugeordnet (Weiss et al., 2008). In die Subgruppe 1 fielen fünf Varianten, Subgruppe 2 enthielt zwei und Subgruppe 3 eine Variante. Auch hier wurden bei zwei Varianten die 12RSS identifiziert. Die Sequenz des Nonamer war 5'-^G/_C^A/_TTTTC^T/_AG^T/_A-3' und die des Heptamers 5'-^G/_TA^C/_T^A/_G^G/_ATG-3'. Bei einem weiteren identifizierten J-Gensegment handelt es sich wahrscheinlich um ein Pseudogen (Weiss et al., 2010).

Außerdem wurden sechs unterschiedliche C-Gensegmente identifiziert.

Aufgrund der Häufigkeit bestimmter Kombinationen der verschiedenen Gensegmente wurde die Hypothese aufgestellt, dass der unarrangierte TRG in Clustern organisiert ist (Weiss, 2008) (s. Abb. 6).

Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass der TRG-Locus der Maus, des Hundes, des Rindes und des Schafes, deren genomische Struktur bereits analysiert ist, ebenfalls in Clustern organisiert ist (Herzig et al., 2006; Massari et al., 2009; Vernooij et al., 1993).

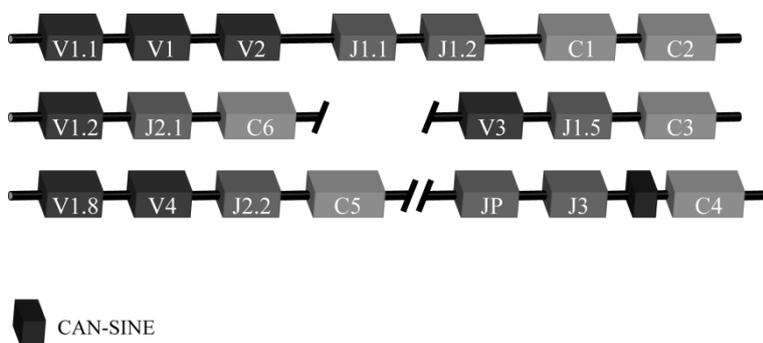


Abbildung 6: Schematische Darstellung der angenommenen Clusterbildung des TRG-Locus der Katze. CAN-SINE stellt ein für Fleischfresser typisches „short interspersed element“ dar (Weiss, 2008).

Aufgrund dieser limitierten Anzahl an Familien und Varianten sollte es möglich sein, diese mit einer relativ geringen Anzahl an *Consensusprimern* nachzuweisen.

Es ist jedoch anzunehmen, dass die bereits nachgewiesenen Varianten und Familien nicht alle bei der Katze vorhandenen darstellen, sondern dass noch weitere entdeckt werden.

2.1.5.2.2 Untersuchungsmethoden

Nach Aufklärung der Sequenzen der humanen TRA und TRB (Saito et al., 1984) sowie der humanen TRG (Hayday et al., 1985) war die Grundlage für die molekulargenetische Diagnostik von Lymphomen in der Humanmedizin geschaffen.

2.1.5.2.2.1 Southern Blot

2.1.5.2.2.1.1 Anwendung beim Mensch

Bei dieser Nachweismethode wird die isolierte DNS mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, welche die DNS an Stellen, an denen die Enzyme spezifische Basenpaarsequenzen erkennen, schneiden (Cossman et al., 1991; Gill and Gulley, 1994; Hayday et al., 1985; Rezuke et al., 1997). Die verdauten DNS-Fragmente werden entsprechend ihrer Größe in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und daraufhin denaturiert. Anschließend werden sie auf eine Nylonmembran überführt und mit einer spezifischen DNS-Sonde hybridisiert (Rezuke et al., 1997). Die Visualisierung der Fragmente kann radioaktiv mit ^{32}P , mittels Chemilumineszenz sowie kolorimetrisch erfolgen.

Bei T-Zell-Lymphosarkomen wurde häufig das Rearrangement der TRB analysiert (Cossman et al., 1991; Gill and Gulley, 1994). Die Sonden, die für den Nachweis monoklonaler Populationen verwendet werden, erkennen das DJ-Rearrangement sowie das VDJ-Rearrangement.

Damit eine Bande sichtbar wird, müssen ausreichend viele Lymphozyten das gleiche Rearrangement aufweisen. Daher findet man bei polyklonalen Populationen nur die Bande, die der Keimbahnkonfiguration entspricht, bei monoklonalen Populationen jedoch noch zusätzlich die Bande, die dem rearrangierten Gen entspricht.

Mittels Southern Blot-Analyse kann man monoklonale Populationen, die nur 1-2 % der Gesamtpopulation ausmachen, detektieren (Cossman et al., 1988).

Nachteile der Southern Blot-Analyse sind zum einen, dass nur frisches oder gefrorenes Gewebe DNS-Fragmente ausreichender Menge und Länge von mehreren kb aufweist (Bourguin et al., 1990; McCarthy et al., 1992; McCarthy et al., 1990). Somit entfällt diese Art der Diagnostik für FFPE-Material. Zum anderen ist sie teuer und zeitaufwendig (Trainor et al., 1991).

2.1.5.2.2.1.2 Anwendung bei der Katze

Bei der Katze wurden die TRB und die TRG mittels Southern Blot-Analyse untersucht (Endo et al., 1997). Grundlage für die Untersuchung der TRB war die von Terry analysierte Sequenz

der C-Region (Terry et al., 1992). Als TRG-Sonde wurde ein DNS-Fragment, das der C-Region entspricht, verwendet. Dieses basierte auf Homologie zu der C-Region der humanen und murinen TRG (Endo et al., 1997). Die TRB war in dieser Studie bei nur einer von fünf Katzen mit Lymphosarkom rearrangiert. Bei der TRG konnte kein Rearrangement festgestellt werden.

2.1.5.2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.1.5.2.2.2.1 Anwendung beim Mensch

Seit Anfang der 90er Jahre wird die PCR als Nachweismethode monoklonaler T-Zellpopulationen genutzt (Bourguin et al., 1990; Goudie et al., 1990). Mittels dieser diagnostischen Methode wird das Rearrangement der Gensegmente untersucht, die für die V-Region des TCR kodieren (Rezuke et al., 1997). Jeder Lymphozyt trägt eine einzigartige V-Region, die zur Diversität der Antigenerkennungsstellen beiträgt (Bourguin et al., 1990).

Des Weiteren tragen die V- und J-Gensegmente der V-Region mit den *framework regions* kurze DNS-Sequenzen, die bei vielen Lymphozyten identisch sind und daher als Bindungsstellen für *Consensusprimer* genutzt werden können (Endo et al., 1997; Hayday et al., 1985; McCarthy, 1997; McCarthy et al., 1992).

Da die TRA sehr komplex und die TRD häufig deletiert sind, sind die TRB sowie die TRG als Zielsequenz für die PCR am besten geeignet und werden daher am häufigsten entweder einzeln oder in Kombination für die Diagnostik verwendet (Bourguin et al., 1990; Diss et al., 1995; Goudie et al., 1990; McCarthy et al., 1991, , 1992; Theodorou et al., 1994; Trainor et al., 1991). Dabei treten bei der Analyse der TRB häufiger falsch negative Ergebnisse auf, weswegen die TRG bevorzugt untersucht werden (Diss et al., 1995; Theodorou et al., 1994).

Das Prinzip des Nachweises rearrangierter DNS mittels PCR basiert darauf, dass die im V- und im J-Gensegment gelegenen Primer die Zielsequenz nur amplifizieren können, falls diese rearrangiert ist, da die Segmente in der Keimbahnkonfiguration mehrere kb voneinander entfernt sind (Goudie, 1989; Leder, 1982; McCarthy, 1997; Rezuke et al., 1997) (s. Abb. 7).

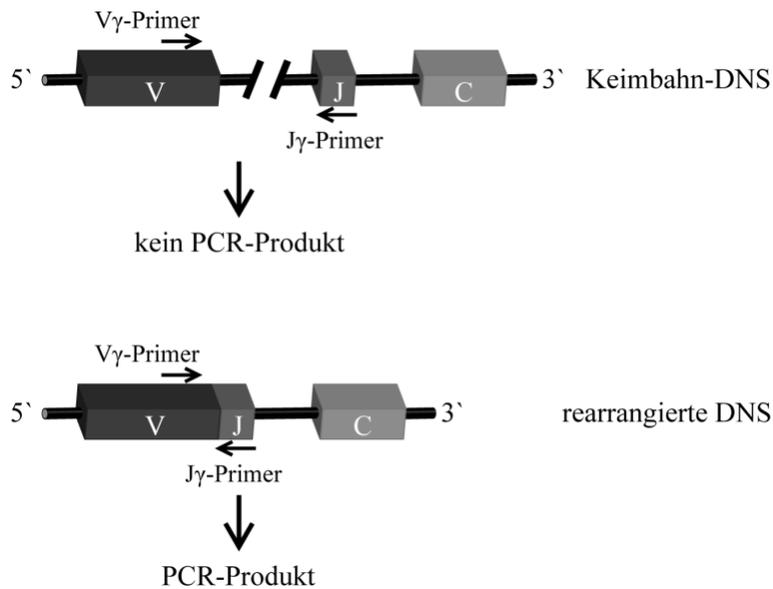


Abbildung 7: Prinzip der PCR zum Nachweis von monoklonalen T-Zellpopulationen

Eine polyklonale T-Zellpopulation besitzt sehr viele verschiedene Rearrangements, die sich in ihrer Größe und Basenzusammensetzung unterscheiden. Bei der Auftrennung mittels Gelelektrophorese ergeben sie einen sogenannten Schmier oder eine Leiter, je nach Auflösung des Systems (Bourguin et al., 1990; McCarthy et al., 1992; Rezuze et al., 1997). Eine monoklonale T-Zellpopulation jedoch besitzt identische Rearrangements. Daher erscheint die DNS als distinkte Bande auf dem Gel (Goudie et al., 1990).

Die Sensitivität variiert je nach Methode zwischen 0,1 und 1 % (Bourguin et al., 1990; Goudie et al., 1990).

Um sicherzustellen, dass tatsächlich eine Bande vorliegt, die aus einer genetisch identischen Lymphozytenpopulation besteht, muss eine Auflösung von einer Base vorliegen. Dies wurde beim Mensch durch Techniken wie der denaturierenden Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (zur Stadt et al., 2001) oder der nichtradioaktiven Analyse von Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen erreicht (Signoretti et al., 1999). Diese Techniken sind jedoch umständlich und erfordern eine spezielle Ausrüstung (Witzens et al., 1997).

Eine einfache Methode, um Amplifikate nicht nur anhand ihrer Länge, sondern zusätzlich mittels ihrer Basenzusammensetzung zu unterscheiden, stellt die Heteroduplexanalyse dar (Offermans et al., 1995; van Dongen et al., 2003; zur Stadt et al., 2001). Hierbei werden die PCR-Produkte denaturiert und anschließend kontrolliert abgekühlt. Dadurch kommt es zur Anlagerung von homologen (Homoduplices) und heterologen Strängen (Heteroduplices). Die Heteroduplices weisen aufgrund ihrer Sekundärstruktur deutlich veränderte Laufeigenschaften auf und können somit von den Homoduplices in einer Elektrophorese unterschieden werden.

Eine weitere Verbesserung kann dadurch erreicht werden, dass man einen Sequencer zur Elektrophorese verwendet (Shah et al., 2009). Hierbei wird durch eine hohe Feldstärke von ca. 60 V/cm eine Auflösung von einer Base erreicht

Die PCR wurde auch erfolgreich zur Überwachung der minimalen Resterkrankung (MRD) eingesetzt (Stow et al., 2010).

2.1.5.2.2.2 Anwendung bei der Katze

Bei der Katze erfolgte der Klonalitätsnachweis von T-Zell-Lymphosarkomen bislang nur anhand der TRG. In einer ersten Studie (Moore et al., 2005) wurde intestinales Gewebe untersucht. Mittels Histologie und Immunhistologie wurde bei 28 Katzen die Diagnose eines intestinalen Lymphosarkoms, bei 9 die einer IBD gestellt, und bei drei Tieren wurde keine Veränderung festgestellt. Bei 78 % der Lymphosarkome wurde eine monoklonale und bei 11 % eine oligoklonale Population detektiert. Bei den Katzen mit IBD und unverändertem Gewebe wies die Analyse ausschließlich polyklonale Populationen auf.

In einer weiteren Studie (Weiss et al., 2011) wurden 17 T-Zell-Lymphosarkome, 20 B-Zell-Lymphosarkome, 7 lymphatische Hyperplasien, 2 Lymphadenitiden und ein Fall einer IBD untersucht. Klonale Zellpopulationen wurden in 68 % der T-Zell-Lymphosarkome und 22 % der B-Zell-Lymphosarkome festgestellt. Diese Ergebnisse bezogen sich jedoch nur auf die erste Subgruppe der V-Gensegmente der TRG, da bei Untersuchung der anderen Subgruppen bei 86 % der lymphatischen Hyperplasien eine distinkte Bande nachgewiesen wurde. Dies wurde auf die geringe Längenvariation der CDR3 bei diesen Subgruppen zurückgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde Gewebe von insgesamt 24 bzw. 72 Katzen aus dem Sektions- (S Nummer/Jahr-Blocknummer) bzw. Biopsiematerial (T Nummer/Jahr-Blocknummer) des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (z.B. S1204/09-1) sowie von 49 Katzen aus dem Biopsiematerial (Nummer/Jahr) des Instituts für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig (z.B. 6752/89). Bei 12 Katzen lagen mehrere Gewebe (zwischen zwei und sieben) zur Untersuchung vor (Einzelheiten und Interpretation der Ergebnisse s. Tab. 21 unter 9.1.1). Falls in den Geweben unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Klonalität erzielt wurden, wurde falls vorhanden das monoklonale Ergebnis in die weitere Bewertung aufgenommen. Falls nicht, wurde das oligoklonale Ergebnis bewertet. Die Proben von 16 Sektionstieren wurden doppelt entnommen. Die erste Probe wurde für die DNS-Isolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die zweite Probe wurde für die histopathologische Untersuchung direkt in 10 % Formalin (Carl Roth, Karlsruhe) fixiert und routinemäßig in einem Einbettautomaten (TissueTec[®] VIP, Vogel Wilhelm GmbH) in Paraffin (Paraplast, Histo-comp[®], Vogel Wilhelm GmbH) eingebettet.

Die Proben des Biopsiematerials und der restlichen Sektionsfälle waren bereits in 10 % Formalin fixiert und bis auf eine Probe auch bereits routinemäßig in einem Einbettautomaten in Paraffin eingebettet.

3.2. Histologie

Die histopathologische und die immunhistologische Untersuchung dienten zur Klassifizierung der Tumore entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation (Valli et al., 2002).

3.2.1 Histopathologie

Die histopathologische Untersuchung zur Klassifikation der Lymphosarkome und die Untersuchung der Kontrollen erfolgte stets an HE-gefärbten Schnitten. Falls notwendig, wurde eine Giemsa-Färbung angefertigt und zur Beurteilung mit herangezogen.

Beurteilt wurden Zellreife, infiltratives Wachstum, Wachstumsmuster sowie das Ausmaß der Nekrose.

3.2.2 Immunhistologie

Die Schnitte wurden auf SuperFrost*/Plus-Objektträgern (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen und bei 37 °C luftgetrocknet. Anschließend erfolgte das Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol[®], Carl Roth, Karlsruhe) für 10 min und das Entfernen des Xylol-Ersatzes in absteigender Alkoholreihe (2 x Isopropanol, 1 x 96 % Alkohol, 1 x 80 % Alkohol für je 3 min) (Carl Roth, Karlsruhe).

Die endogene Peroxidase wurde durch eine Inkubation in Methanol (Carl Roth, Karlsruhe) mit frisch zugesetztem 0,5 % H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p.a., Merck, Darmstadt) für 30 min bei RT inaktiviert.

Danach wurden die Schnitte für 2 x 5 min in TBS (pH 7,8) (s. 9.3.1) gewaschen.

3.2.2.1 Nachweis des CD3-Antigens (Pan-T-Zell-Marker)

Zur Demaskierung unterzog man die Proben einer Behandlung mit Target Retrieval Solution (pH 9; DakoCytomatation, Hamburg). Die Target Retrieval Solution wurde in Plastikkuvetten (GfL, Burgwedel) auf 96 °C erhitzt. Die Schnitte wurden für 25 min bei 96 °C inkubiert und anschließend 15 min in der bei RT abkühlenden Lösung belassen.

Die Proben wurden 1 x 5 min in TBS gewaschen.

Die Objektträger wurden auf die mit TBS befeuchteten Coverplates[®] (Life Science International, Frankfurt/Main) aufgelegt, die Coverplates[®] in dafür vorgesehene Halterung eingesetzt.

Es fand eine Inkubation für 20 min bei RT mit 20 % Schweineserum in TBS statt.

Anschließend wurde der polyklonale Primärantikörper Kaninchen anti-human CD3 (DakoCytomatation, Hamburg) 1:100 in TBS mit 20 % Schweineserum (s. 9.3.1) bzw. das Kaninchenkontrollserum (DakoCytomatation, Hamburg) 1:2500 (Negativkontrollsnitte) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 12-18 h bei 4 °C. Der Primärantikörper wurde bereits erfolgreich zum Nachweis von T-Lymphozyten der Katze eingesetzt (Kipar et al., 2001).

Die Schnitte wusch man 3 x 5 min in TBS.

Der Sekundärantikörper Schwein anti-Kaninchen IgG (DakoCytomatation, Hamburg) wurde 1:100 in TBS mit 20 % Schweineserum verdünnt aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert; die Schnitte 3 x 5 min in TBS gewaschen.

Anschließend erfolgte das Auftragen des 1:100 in TBS mit 20 % Schweineserum verdünnten Kaninchen-PAP (DakoCytomatation, Hamburg) und die Inkubation der Schnitte 30 min bei RT.

Die Schnitte wurden 3 x 5 min in TBS gewaschen.

Die Proben wurden in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid Dihydrat (DAB) (Sigma-Aldrich, München) (s. 9.3.1) mit frisch angesetztem 0,01 % H₂O₂ in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1) (Sigma-Aldrich, Seelze) (s. 9.3.1) unter ständigem Rühren 10 min bei RT inkubiert.

Die Schnitte wurden 3 x 5 min in TBS und 1 x in A. dest. gewaschen.

Eine Inkubation mit Kardasewitsch (s. 9.3.1) erfolgte zur Entfernung des Formalinpigments.

Die Schnitte wurden 2 x 5 min in A. dest. gewaschen.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Papanicolaous Hämatoxilin (Merck, Darmstadt) 1:10 verdünnt in A. dest. für 20-60 s. Anschließend wurden die Proben 5 min in Leitungswasser gebläut.

Die Entwässerung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 50 % Alkohol, 1 x 70 % Alkohol, 1 x 80 % Alkohol, 1 x 96 % Alkohol, 2 x Isopropanol für je 3 min); die Klärung dauerte 2 x 5 min in Roti-Histol[®].

Das Eindecken erfolgte mit Folie in einem Eindeckautomaten (TissueTec[®], Vogel, Gießen).

3.2.2.2 Nachweis des CD45R-Antigens (B220 (Ly5)) (Pan-B-Zell-Marker)

Die Demaskierung erfolgte durch eine Zitratpufferbehandlung. 10 mM Zitratpuffer (pH 6; s. 9.3.1) wurde in Plastikkuvetten im Wasserbad auf 97 °C erhitzt. Die Objektträger wurden für 20-25 min eingestellt und anschließend 15 min in der bei RT abkühlenden Lösung belassen.

Zum Waschen wurden die Proben für 5 min in TBS überführt.

Die Objektträger wurden auf die mit TBS befeuchteten Coverplates[®] aufgelegt, die Coverplates[®] in dafür vorgesehene Halterung eingesetzt.

Es wurde mit unverdünntem Pferdeserum (s. 9.3.1) für 10 min bei RT inkubiert.

Daraufhin wurden der monoklonale Primärantikörper Ratte anti-Maus CD45R-Antigen (Cedarlane, Hornby, Ontario, USA) 1:1000 in TBS mit 1 % BSA (DIANOVA, Hamburg) verdünnt aufgetragen. Der Primärantikörper wurde bereits erfolgreich zum Nachweis von B-Lymphozyten der Katze eingesetzt (Kipar et al., 2001). Der monoklonale Antikörper Ratte IgG2a (Linaris, Wertheim-Bettingen) diente in der Verdünnung 1:400 als Negativkontrolle. Alle Schnitte wurden 12-18 h bei 4 °C inkubiert.

Die Schnitte wurden 3 x 5 min in TBS gewaschen.

Die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers Kaninchen anti-Ratte IgG (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) fand in der Verdünnung 9 µl/1 ml TBS mit 1 % BSA für eine Dauer von 30 min bei RT statt.

Die Schnitte wurden 3 x 5 min in TBS gewaschen.

Anschließend wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert; die Schnitte danach 3 x 5 min in TBS gewaschen.

Die Inkubation mit DAB sowie die weitere Behandlung erfolgten wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

3.2.2.3 Nachweis von gp70- und p27-Antigen (FeLV)

Die Demaskierung fand durch eine Inkubation für 10 min in auf 97 °C erhitztem Target Unmasking Fluid (TUF) (DIANOVA, Hamburg) statt. Die Objektträger wurden anschließend 15 min in der bei RT abkühlenden Lösung belassen.

Die Proben wurden für 5 min in TBS gewaschen.

Die Objektträger wurden auf die mit TBS befeuchteten Coverplates[®] aufgelegt, die Coverplates[®] in dafür vorgesehene Halterung eingesetzt.

Danach wurde 10 min bei RT mit 20 % Schweineserum in TBS inkubiert.

Die Primärantikörper p27 (Custom Monoclonals International, Sacramento, USA; Verdünnung 1:170 in TBS mit 20 % Schweineserum) und gp70 (Custom Monoclonals International, Sacramento, USA; Verdünnung 1:400 in TBS mit 20 % Schweineserum) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Schnitte 12-14 h bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation der Negativkontrollschnitte hingegen fand mit dem 1:110 in TBS mit 20 % Schweineserum verdünnten monoklonalen Antikörper T1 (Zellkulturüberstand, gegen ein Oberflächenantigen von Thymus-Lymphozyten von Hühnern gerichtet (Hirschberger, 1987)) bei gleicher Temperatur und Zeitdauer statt.

Die Schnitte wurden 3 x 5 min in TBS gewaschen.

Der Sekundärantikörper Kaninchen anti-Maus IgG PO (DakoCytomatation, Hamburg) wurde in TBS 1:100 mit 20 % Schweineserum verdünnt, aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert.

Das Waschen der Schnitte erfolgte 3 x 5 min in TBS.

Die Inkubation mit DAB sowie die weitere Behandlung fanden wie unter 3.2.2.1 beschrieben statt.

3.2.2.4 Positivkontrollen

Für die Lymphozytenmarker CD3 und CD45R wurden Schnitte unveränderten Milz- und Lymphknotengewebes verwendet.

Positiv getestete Gewebeschnitte anderer Katzen dienten zur Kontrolle des Nachweises der FeLV-Antigene.

3.2.2.5 Auswertung

Bei den Lymphozytenmarkern wurde die Verteilung des Signals sowohl in der Zelle als auch im Schnitt, die Stärke des Signals und das Vorkommen nicht tumoröser Lymphozyten (B und T) beurteilt (s. Tab. 1). Bei der Verteilung des Signals im Zytoplasma wurde diffus und membran-assoziiert unterschieden. Die infiltrierenden B-Zellen wurden aufgrund ihrer immunhistologischen Reaktion mit anti-CD45R sowie topographisch als nicht neoplastische Lymphozyten identifiziert. Bei den T-Zellen war eine Identifikation der Population infiltrierender Lymphozyten nur durch morphologische Kriterien und nur falls die Tumorphosphore aus Blasten bestand möglich.

Die Einteilung der Katzen in FeLV-positiv und -negativ erfolgte aufgrund des Vorhandenseins bzw. der Abwesenheit des entsprechenden Signals.

Tabelle 1: Auswertung der Lymphozytenmarker.

Verteilung im Schnitt		Stärke		Nicht tumoröse Lymphozyten			
				T		B	
-	Keine Zellen	-	Kein Signal	-	Keine Zellen	-	Keine Zellen
(+)	Einzelne Zellen	(+)	Sehr schwaches Signal	(+)	Einzelne Zellen	(+)	Einzelne Zellen
+	Bis 30 % positive Lymphozyten	+	Schwaches Signal	+	Bis 30 % positive Lymphozyten	+	Bis 30 % positive Lymphozyten
++	30-60 % positive Lymphozyten	++	Mittleres Signal	++	30-60 % positive Lymphozyten	++	30-60 % positive Lymphozyten
+++	Über 60 % positive Lymphozyten	+++	Starkes Signal	+++	Über 60 % positive Lymphozyten	+++	Über 60 % positive Lymphozyten

3.3. Isolation von DNS

3.3.1 Isolation von DNS aus unfixiertem Gewebe

Die Isolation erfolgte mit dem *Puregene[®] DNA Purification Kit* (Gentra Systems, Minnesota, USA). Das Prinzip des Kits beruht auf der Lyse kernhaltiger Zellen mittels anionischer Detergenzien und Proteinase K. Die Proteine werden durch Salze präzipitiert. Anschließend wird die DNS mit Alkohol gefällt, gereinigt und in der zum Kit gehörenden Pufferlösung (TE-Puffer) rehydriert.

1. Gewebepreparation:

Das Gewebe wurde direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3. Material und Methoden

Ca. 75 mg Gewebe wurden mit einem sterilen Skalpell abgenommen und das Gewicht mittels Präzisionswaage (Mettler GmbH, Giessen) kontrolliert.

2. Zellyse:

Anschließend zermörserte man das Material in einem 1,5 ml Glaspistill (Carl Roth, Karlsruhe) unter Zugabe von 500 µl *Cell Lysis Solution*. Das Gewebe wurde durch leichtes Auf- und Abpipettieren mit der Lösung vermischt und in ein 14 ml Falcon-Tube (Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Frankreich) überführt. Die Zugabe von 500 µl *Cell Lysis Solution* wurde sooft wiederholt, bis insgesamt 3 ml der Lösung zugegeben waren.

3. Proteinase K-Behandlung:

Zu dem suspendierten Gewebe wurden 15 µl Proteinase K (10 mg/ml) (Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben, sorgfältig vermischt und über Nacht bei 55 °C inkubiert.

4. RNase-Behandlung:

Anschließend wurden 15 µl RNase A (4 mg/ml) (Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben, sorgfältig vermischt und bei 37 °C 20 min lang inkubiert.

5. Protein-Fällung:

Nach Abkühlen der Probe auf RT wurde 1 ml *Protein Precipitation Solution* zugegeben, auf höchster Stufe 20 s gevortext (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA) und bei 2000 x g 10 min zentrifugiert (Haereus, Hanau).

Nach Abnahme des Überstands wurde dieser in ein neues 14 ml Falcon-Tube überführt. Die Probe wurde erneut auf höchster Stufe gevortext, 5 min auf Eis gekühlt und bei 2000 x g 10 min lang zentrifugiert.

6. Fällern und Waschen der DNS:

Daraufhin fand die Überführung des Überstands in ein neues 14 ml Falcon-Tube statt, in dem sich bereits 3 ml 100 % Isopropanol (2-Propanol, Carl Roth, Karlsruhe) befanden. Das Vermischen erfolgte durch 50maliges Schwenken.

Die Probe wurde bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert, worauf die DNS als kleines, milchiges Pellet sichtbar wurde. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen.

Zu dem Pellet wurden 3 ml 70 % Äthanol (Carl Roth, Karlsruhe) gegeben und das verschlossene Falcon-Tube zum Vermischen mehrmals geschwenkt. Anschließend wurde die Probe bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert, der Äthanol vorsichtig abpipettiert und das Falcon-Tube mit der Öffnung nach unten aufgestellt, so dass das Pellet 30 min trocknen konnte.

7. Rehydrierung der DNS:

Es wurden 100-200 µl *DNA Rehydration Solution* zugegeben, durch kurzes Vortexen auf höchster Stufe gemischt und die DNS wurde über Nacht zum Lösen bei RT belassen.

3.3.2 Isolation von DNS aus formalin- oder äthanolfixiertem Gewebe

1. Fixation:

Das Gewebe wurde direkt nach Entnahme in 10 % Formalin (Carl Roth, Karlsruhe) oder 96 % Äthanol (Carl Roth, Karlsruhe) fixiert.

2. Waschen:

Um möglichst viel Formalin bzw. Äthanol aus der Probe zu entfernen, wurde das fixierte Gewebe unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Für in Formalin fixiertem Gewebe betrug die Waschzeit 3 Tage, für äthanolfixiertes 10 min.

3. Gewebepvorbereitung:

Gewebe wurde mit einem sterilen Skalpell abgenommen und mittels Präzisionswaage (Mettler GmbH, Giessen) ca. 150 mg abgewogen.

Die restlichen Schritte erfolgten wie unter 3.3.1.2 beschrieben.

3.3.3 Isolation von DNS aus formalin- oder äthanolfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

Zur Vorbereitung des Gewebes wurde das um die Probe herum gelegene Paraffin mit einer Mikrotomklinge (pfm Medical AG, Köln) abgeschabt, um eine Verunreinigung der Probe mit Paraffin möglichst gering zu halten.

Daraufhin wurden mit einem auf 2 µm Schnittdicke eingestellten Mikrotom (MICROM GmbH, Walldorf) je nach Durchmesser des Gewebes zwei bis zehn Schnitte angefertigt, diese per Hand mit einer Mikrotomklinge weiter zerkleinert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführt.

Zur Vermeidung einer Kontamination mit DNS, v.a. durch die zuvor bearbeiteten Proben, wurden die verwendeten Instrumente (Pinzette, Zahnstocher, abnehmbare Bestandteile des Mikrotoms) sorgfältig gereinigt und anschließend entweder bei 121 °C für 20 min autoklaviert (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim) oder bei 200 °C für eine Dauer von 6 h trockensterilisiert (Melag oHG Medizintechnik, Berlin). Es wurden nur neue, sterile Eppendorfgefäße und Mikrotomklingen verwendet. Die Abdeckung des Messerhalters des Mikrotoms erfolgte mit steriler Laborfolie (Carl Roth, Karlsruhe).

3.3.3.1 Isolation mit dem Puregene® DNA Purification Kit

1. Entparaffinierung:

Die Probe wurde in 600 µl Xylol-Ersatz (Roti-Histol®, Carl Roth, Karlsruhe) unter ständigem Mischen 5 min inkubiert. Darauf fand eine Zentrifugation bei 16000 x g für 2 min (Eppendorf GmbH, Hamburg) statt. Der Überstand wurde verworfen. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt.

Anschließend wurde das Pellet in 600 µl 100 % Äthanol resuspendiert, 5 min lang bei RT vermischt und bei 16000 x g 2 min lang zentrifugiert, der Überstand verworfen. Es fand eine einmalige Wiederholung dieser Schritte statt.

2. Zellyse:

Nach Zugabe von 600 µl *Cell Lysis Solution* wurde auf höchster Stufe für die Dauer von 1 min gevortext.

3. Proteinase K-Behandlung:

Danach erfolgte die Zugabe von 6 µl Proteinase K (10 mg/ml) zu dem Gewebe, die Probe wurde sorgfältig vermischt und anschließend bei 55 °C über Nacht inkubiert.

Daraufhin wurden 10 µl Proteinase K zugegeben, sorgfältig vermischt und nochmals über Nacht bei 55 °C inkubiert.

4. RNase A-Behandlung:

Es wurden 3 µl RNase A (4 mg/ml) zugegeben, sorgfältig vermischt und 20 min bei 37 °C inkubiert.

5. Proteinfällung:

Sobald die Probe auf RT abgekühlt war, was manuell kontrolliert wurde, wurden 200 µl *Protein Precipitation Solution* zugegeben, 30 s auf höchster Stufe gevortext und 10 min bei 2000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, die Probe 5 min auf Eis gekühlt, danach erneut auf höchster Stufe gevortext und 10 min bei 2000 x g zentrifugiert.

6. Fällern und Waschen der DNS:

Der Überstand wurde in ein mit 600 µl 100 % Isopropanol befülltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, durch 50 maliges Schwenken vermischt und bei 2000 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Die DNS, die am Boden des Eppendorfgefäßes ein milchiges Pellet formte, wurde mit 600 µl 70 % Äthanol durch 50 maliges Schwenken vermischt und 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Zum Trocknen wurde das Eppendorfgefäß 30 min bei RT mit schräg nach unten zeigender Öffnung aufgestellt.

7. Rehydrieren der DNS:

Es wurden 100 µl *DNA Hydration Solution* zu dem Pellet gegeben. Die Probe wurde sanft vermischt und über Nacht bei RT inkubiert, damit sich die DNS in dem Puffer lösen konnte.

3.3.3.2 Isolation mittels Hitzebehandlung, Chelex 100 und Chloroform

Diese Methode beruht auf einer Kombination zweier Protokolle (Coombs et al., 1999; Shi et al., 2004) zur Verbesserung der DNS-Isolation aus in Formalin fixiertem und paraffineingebettetem Gewebe, die bereits erfolgreich getestet und veröffentlicht wurde (Henrich, 2008).

1. Lösen des Paraffins:

497,5 µl 0,1 molare Natronlauge (Merck, Darmstadt) wurden mit 2,5 µl Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) versetzt (0,5 % Tween[®] 20 Lösung) und mit der Probe vermischt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation bei 96 °C für 20 min.

2. Proteinase K-Behandlung:

Das Material wurde mit 4 µl Proteinase K versetzt und 3 h bei 55 °C inkubiert.

3. RNase A-Behandlung:

Man kühlte die Probe auf RT ab, gab 15 µl RNase A (4 mg/ml) zu und inkubierte bei 37 °C 20 min.

4. Binden der DNS:

Zu der Probe wurden anschließend 500 µl 5 % Chelex 100-Suspension (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) in 10 mM Tris-Puffer (s. 9.3.2) zugefügt. Darauf erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei 96 °C.

Das Gefäß wurde 3-4mal sanft geschwenkt und bei 10500 x g 15 min zentrifugiert (Eppendorf GmbH, Hamburg). Darauf kühlte man die Probe auf Eis ab, bis das Paraffinwachs hart war. Dieses wurde darauf vorsichtig mit einem sterilen Zahnstocher entfernt; anschließend die Probe auf 45 °C erwärmt.

5. Waschen der DNS:

Nach Zugabe von 100 µl Chloroform-Isoamylalkohol (Carl Roth, Karlsruhe) wurde die Probe zum Vermischen sanft geschwenkt und anschließend bei 10500 x g 15 min lang zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Es fand eine zweimalige Wiederholung dieses Schrittes statt.

3.3.3.3 Isolation mittels *WaxFreeTMDNA*

Bei Anwendung des *WaxFreeTMDNA Kits* (TrimGen Corporation, Sparks, Maryland, USA) wurde die Probe mit 800 µl *Q-Solution* versetzt und 30-60 s auf höchster Stufe gevortext. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 55 °C für eine Dauer von 20 min. Danach wurde das Material 30 s auf höchster Stufe gevortext und bei 10000 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen.

Es wurde 1 ml *Wash Buffer* zugefügt und auf höchster Stufe 30 s gevortext, um das Pellet zu resuspendieren. Anschließend wurde die Probe bei 10000 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt.

Die Probe wurde mit 120 µl *WaxFreeTMresin* resuspendiert.

Falls es sich bei dem Gewebe um Muskulatur oder Haut handelte, wurde die Probe 60 s auf höchster Stufe gevortext, bei 95 °C 10 min inkubiert und anschließend auf RT abgekühlt.

Bei allen Proben wurden anschließend 7 µl *Enzyme Mix* zugegeben und auf höchster Stufe 5-10 s gevortext. Daran schloss sich eine Inkubation bei 95 °C für 10 min und eine Zentrifugation bei 10000 x g für 5 min an.

Sofort nach der Zentrifugation wurden 70 µl des Überstands vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen.

Es wurde 7 µl 10x TE-Puffer (im Kit enthalten) in einer Endkonzentration von 1x TE zugefügt.

3.3.4 Aufbewahrung der isolierten DNS

Die Lagerung der isolierten DNS fand unabhängig von der Isolationsmethode bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C statt.

3.4. Konzentrationsbestimmung von DNS

3.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Eine Möglichkeit, die Konzentration der DNS zu bestimmen, stellt die Messung mittels Photometer (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Maryland, USA) dar.

Bei einer Küvettendicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Extinktion von 1 etwa einer DNS-Konzentration von 50 µg/ml. Der Reinheitsgrad der DNS wird durch das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt. Er sollte ca. bei 1,8 liegen (Mühlhardt, 2002).

3.4.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Mittels Gellauf kann die Konzentration der Proben-DNS im Vergleich zu einem Längenstandard bestimmt werden, da die Fluoreszenz von Ethidiumbromid im UV-Licht (Wellenlänge von 254-320 nm) zu der Menge der DNS proportional ist (Sambrook, 1989).

3.5. Kontrolle der DNS-Integrität

3.5.1 Integritätskontrolle mittels Elektrophorese

Die Bestimmung der Integrität der DNS beruht darauf, dass kürzere Moleküle in einem elektrischen Feld in einem Gel mit entsprechender Porengröße schneller wandern als längere. Im Vergleich zu einem Längenstandard kann so die Länge der Proben-DNS bestimmt werden.

3.5.2 Integritätskontrolle mittels Kontrollfragmenten

Um den Grad der DNS-Degradation zu bestimmen, wurden Fragmente amplifiziert, die in etwa der Amplifikatlänge des diagnostischen Systems entsprachen.

Die entsprechenden Fragmente liegen außerhalb des T-Zell-Rezeptor-Genlokus.

Grundlage ist ein System zur Identifikation von Genloci, die als DNS-Marker fungieren (Menotti-Raymond et al. 2005). Es handelt sich um sogenannte *short-tandem repeat (STR) loci*, bei denen unterschiedlich viele Wiederholungen von Tri- und Tetranukleotidfolgen vorliegen. Dies erklärt die Spannweite der Länge der folgenden Amplifikate.

Zum einen wurde ein Primersystem verwendet, mit dem Amplifikate von 308 bis 336 bp erzeugt werden. Als *Senseprimer* diente FCA740-F2 und als *Antisenseprimer* FCA740-R2.

Zum anderen amplifizierte man 122 bis 175 bp lange Fragmente mit dem *Senseprimer* FCA742-F2 und dem *Antisenseprimer* FCA742-R2 (Menotti-Raymond et al. 2005). Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 3, die Reaktionsbedingungen (Multicycler PTC200, Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) sind in Tabelle 4 angegeben.

Die Visualisierung erfolgte mit 2 %igen Agarosegelen wie unter 3.9.1.1 beschrieben.

Diese Primersysteme sind in der Arbeitsgruppe etabliert und wurden an einer Vielzahl von Katzen getestet.

3. Material und Methoden

Tabelle 2: Sequenz der Primer zur Kontrolle der DNS-Integrität.

Primer	Sequenz
FCA740-F2	5`-CACTTTCTGAAGGAGCAGCA-3`
FCA740-R2	5`-AACCAAATGGGAGTTTGTGG-3`
FCA742-F2	5`-TCAATGTCTTGACAACGCATAA-3`
FCA742-R2	5`-AGGATTGCATGACCAGGAAC-3`

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermixes für die Amplifikation der Kontrollfragmente.

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Steriles H ₂ O		13,45 oder 12,45
10 x Reaction Buffer*	10 x	2
FCA740-F2/FCA742-F2	10 µM	1,5
FCA740-R2/FCA742-R2	10 µM	1,5
dNTP**	jeweils 10 mM	0,4
BioTherm™ DNS-Polymerase	5 U/µl	0,15
Template-DNS	Je nach Probe	1 oder 2
Gesamtvolumen		20

*vom Hersteller mit der Polymerase mitgelieferter Puffer

**dNTP: bestehend aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Konzentration je 100 mM); verdünnt auf je 10 mM mit sterilen Wasser.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der Kontrollfragmente.

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zahl der Wdh.
Denaturierung	95	2 min	1
Schmelzen	94	15 s	
Anlagern	59	45 s	35
Verlängern	72	60 s	
Abschließende Verlängerung	72	1 min	1
Kühlen	4	Bis zur Entnahme	

3.6. Diagnostik-Primer

Die Primer-Paare wurden mit dem Programm „GeneFisher 1.22“ anhand der von Weiss (2008) veröffentlichten Sequenzen (s. 9.1.3.1) ausgesucht. Beachtet wurden dabei folgende Kriterien (Mitsubishi, 1996a, 1996b):

- Länge von 18-30 Basen
- GC-Anteil von 40-60 %
- Nicht mehr als vier gleiche Basen aufeinander folgend
- Schmelztemperatur von 55-80 °C
- *Sense* und *Antisense* mit ähnlicher Schmelztemperatur

- Mindestens ein und maximal 3 G oder C am 3`-Ende für eine bessere Bindung und Elongation
- Keine Bildung von internen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln
- Geringe Komplementarität der Primer an den 3`-Enden
- Formel für die mittlere Schmelztemperatur:

$$2\text{ }^{\circ}\text{C} \times (n_A + n_T) + 4\text{ }^{\circ}\text{C} \times (n_G + n_C)$$

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Diejenigen Primer, die bei der Visualisierung mittels Sequencertechnik zum Einsatz kamen, synthetisierte die Firma Metabion GmbH (Martinsried) und markierte sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Der Fluoreszenzfarbstoff IRDye[®] 800 (LI-COR[®] Biosciences, Bad Homburg) zeigt eine maximale Absorption im infraroten Licht bei einer Wellenlänge von 795 nm und eine maximale Emission bei einer Wellenlänge von 819 nm.

3.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.7.1 Überprüfen der Diagnostik-Primer

3.7.1.1 Single-PCR

Die Amplifikation erfolgte mit der BioTherm[™] DNS-Polymerase (NatuTec, Frankfurt/Main), einer *Taq*-Polymerase. Die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes ist in Tabelle 5, Reaktionsbedingungen für die PCR sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes.

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Steriles H ₂ O		16,75
10 x Reaction Buffer*	10 x	2,5
MgCl ₂	25 mM	1
Senseprimer	10 µM	1
Antisenseprimer	10 µM	1
dNTP**	jeweils 10 mM	0,5
BioTherm [™] DNS-Polymerase	5 U/µl	0,25
Template-DNS	Je nach Probe	2
Gesamtvolumen		25

*vom Hersteller mit der Polymerase mitgelieferter Puffer

**dNTP: bestehend aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Konzentration je 100 mM); verdünnt auf je 10 mM mit sterilen Wasser.

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zahl der Wdh.
Denaturierung	94	2 min 50 s	1
Schmelzen	92	15 s	
Anlagern	Je nach Primer	15 s	35
Verlängern	72	25 s	
Abschließende Verlängerung	72	5 min	1
Kühlen	4	Bis zur Entnahme	

Die PCR-Versuche wurden mit Thermocyclern des Typs Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) durchgeführt.

Die Erfolgskontrolle fand, wie unter 3.9.1.2 beschrieben, mittels PAGE statt. Zusätzlich wurden einzelne Amplifikate aufgereinigt (s. 3.11.) und wie unter 3.12. beschrieben sequenziert.

3.7.1.2 Gradienten-PCR

Um die optimale Anlagerungstemperatur der Primer zu ermitteln, wurde die Gradientenoption des Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) genutzt. Mit ihr ist es möglich, 10 unterschiedliche Anlagerungstemperaturen innerhalb eines Temperaturintervalls von bis zu 20 °C zu testen (s. Tab. 7). Die Wahl des Temperaturintervalls stützte sich auf die errechnete Schmelztemperatur der Primer.

Tabelle 7: Temperaturintervall der Gradienten-PCR.

Temperaturinter- vall in °C	Position auf dem Heizblock									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
55-65	55	55,9	56,7	57,8	59,3	61	62,4	63,5	64,3	65

3.7.1.3 Multiplex-PCR

Bei Einsatz von mehr als einem Primerpaar wurde, um die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte zu vermeiden, das *QIAGEN® Multiplex PCR Kit* (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Das Kit besteht aus einem gebrauchsfertigen Mastermix mit Polymerase, Reaktionspuffer und Nukleotiden, so dass nur noch Primer und steriles Wasser zugefügt werden müssen. Außerdem soll mit diesem Kit laut Hersteller eine spezifische und effiziente Amplifikation mehrerer Produkte gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß möglich sein.

3. Material und Methoden

Bei der im Kit enthaltenen Polymerase (*HotStarTaq*[®] *DNA-Polymerase*) handelt es sich um eine *hotstart Taq*-Polymerase, die zunächst als inaktive Form vorliegt. Durch eine initiale Erwärmung auf 95 °C für 15 min wird das Enzym aktiviert.

Die Erhöhung der Spezifität beruht darauf, dass eine Fehlanlagerung der Primer sowie die Bildung von Primerdimeren während der Reaktionsvorbereitung und vor dem ersten Denaturierungsschritt verhindert werden.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist für die Primer aus *framework region 2* (FR2) in Tabelle 8 und für die Primer aus *framework region 3* (FR3) in Tabelle 9 dargestellt. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Sequenz der Primer und ihre Bindungsstellen sind in den Abbildungen 11 bis 18 unter 4.2.1 dargestellt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Multiplex-PCR-Ansatzes für die Primer aus FR2.

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (μ l)
Steriles H ₂ O		6,5 oder 5,5
<i>2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix</i>	10x	12,5
Primer 2f1 oder 2f1m	10 μ M	1
Primer 2f4	10 μ M	1
Primer 4r1 oder 4r1m	10 μ M	1
Primer 4r2	10 μ M	1
Primer 4r3 oder 4r3m	10 μ M	1
DNS	Je nach Probe	1 oder 2
Gesamtvolumen		25

Tabelle 9: Zusammensetzung des Multiplex-PCR-Ansatzes für die Primer aus FR3.

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (μ l)
Steriles H ₂ O		5,5 oder 4,5
<i>2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix</i>	10x	12,5
Primer 3f1 oder 3f1m	10 μ M	1
Primer 3f3 oder 3f3m	10 μ M	1
Primer 3f4	10 μ M	1
Primer 4r1 oder 4r1m	10 μ M	1
Primer 4r2	10 μ M	1
Primer 4r3 oder 4r3m	10 μ M	1
DNS	Je nach Probe	1 oder 2
Gesamtvolumen		25

3. Material und Methoden

Das sterile Wasser wurde je nach Konzentration der Proben-DNS eingesetzt. Lag die Konzentration nach photometrischer Messung bei 200 ng/ μ l oder darüber wurden bei Reaktion mit den Primern aus FR2 (zwei Primer) 6,5 bzw. bei den Primern aus FR3 (drei Primer) 5,5 μ l Wasser sowie 1 μ l DNS verdünnt oder unverdünnt hinzugefügt. Bei einer Konzentration unter 200 ng/ μ l mussten nach entsprechender Verdünnung 2 μ l DNS eingesetzt werden. Das Volumen an eingesetztem Wasser betrug demnach 5,5 bzw. 4,5 μ l.

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit	Zahl der Wdh.
Denaturierung	95	15 min	1
Schmelzen	94	30 s	
Anlagern	63,5	90 s	35
Verlängern	72	90 s	
Abschließende Verlängerung	72	5 min	1
Kühlen	4	Bis zur Entnahme	

3.7.1.4 Template

Zum Testen der Primer für das Diagnostiksystem diente Plasmid-DNS einiger von Weiss (2008) hergestellter Klone als Template (s. Tab. 11). Die Sequenzen der Klone sind unter 9.1.3.2 aufgelistet.

Tabelle 11: Name, Konzentration und Verdünnung der eingesetzten Plasmid-DNS.

Name	Konzentration (ng/ μ l)	Verdünnung	Senseprimer	Antisenseprimer
52.2	170	1 : 10000	2f1 oder 3f1	4r1
C1C23.19	440	1 : 20000	2f1 oder 3f1	4r1
PCR57.3.21	117	1 : 10000	2f1 oder 3f1	4r1
62.6	180	1 : 10000	2f1 oder 3f3	4r3
C1C23.20	220	1 : 20000	2f1 oder 3f3	4r1
C1C367.3	206	1 : 20000	2f4 oder 3f4	4r2
V4.1.3	320	1 : 20000	2f4 oder 3f4	4r2

Die DNS der einzelnen Plasmide wurde zum einen mit dem entsprechenden Primerpaar (s. 3.7.1.1), zum anderen unter Einsatz aller Primerpaare gleichzeitig (s. 3.7.1.2) amplifiziert, wobei die *Senseprimer* entweder aus FR2 oder aus FR3 eingesetzt wurden.

Um die Sensitivität der Reaktion zu testen, wurde die jeweilige Plasmid-DNS mit Fremd-DNS versetzt. Es handelte sich hierbei um DNS eines See-Saiblings (D153, 4502 ng/µl), die in der Arbeitsgruppe isoliert und verwendet wurde.

Je 1 µl der verdünnten Plasmid-DNS und 1 µl von D153 wurden eingesetzt.

Hiermit wurde auch getestet, ob eine Erhöhung der Anlagerungstemperatur notwendig wäre, um die Spezifität der Reaktion zu erhalten.

3.7.2 Amplifikation der DNS des Untersuchungsmaterials

3.7.2.1 Multiplex-PCR

Zur Amplifikation der CDR3 der Proben-DNS wurden zwei unterschiedliche Systeme angewandt.

Zum einen fand die Multiplex-PCR mit Reaktionsbedingungen und -zusammensetzung für die PAGE wie unter 3.7.1.3 beschrieben statt. Zum anderem wurden bei den Fällen S1204/09-1, S1126/08, S24/08, T4393/07, T296/07-1, T5035/06-1, T3105/06-1 und S1318/06, die bei Einsatz aller Senseprimer aus der V-Region einen Schmier zeigten, die drei in der J-Region gelegenen *Antisenseprimer* mit je nur einem *Senseprimer* aus der V-Region eingesetzt.

Die Proben wurden immer im Doppelansatz untersucht. Hierzu wurde der Mastermix in doppelter Menge in zwei Eppendorfgefäßen angesetzt und von der Proben-DNS die jeweils gleiche Menge in beide Ansätze pipettiert. Diese wurden daraufhin auf den zwei unterschiedlichen Blöcken eines Thermocyclers plaziert und mit dem gleichen Programm amplifiziert.

Als Negativkontrolle für die Reaktion wurde steriles Wasser anstatt des Templates verwendet.

3.7.2.2 Subgruppen-spezifische PCR

Zur Identifikation der in einer Probe vorkommenden unterschiedlichen Subgruppen und Varianten der ersten Subgruppe der V-Region wurde je ein Senseprimer mit je einem Antisenseprimer einzeln kombiniert.

Dies erfolgte zunächst mit der *BioThermTM DNS-Polymerase* (NatuTec, Frankfurt) wie unter 3.7.1.1 beschrieben. Bei dem Ausbleiben von Amplifikaten erfolgte eine Amplifikation mit dem *Multiplex PCR Kit* und der *HotStarTaq[®] DNA-Polymerase* (Qiagen GmbH, Hilden).

Bei der Negativkontrolle wurden alle Primer eingesetzt und steriles Wasser anstelle eines Templates verwendet.

In Abbildung 8 ist der Reaktionsansatz schematisch für die *Senseprimer* aus FR2 dargestellt und in Abbildung 9 für die *Senseprimer* aus FR3.

3. Material und Methoden

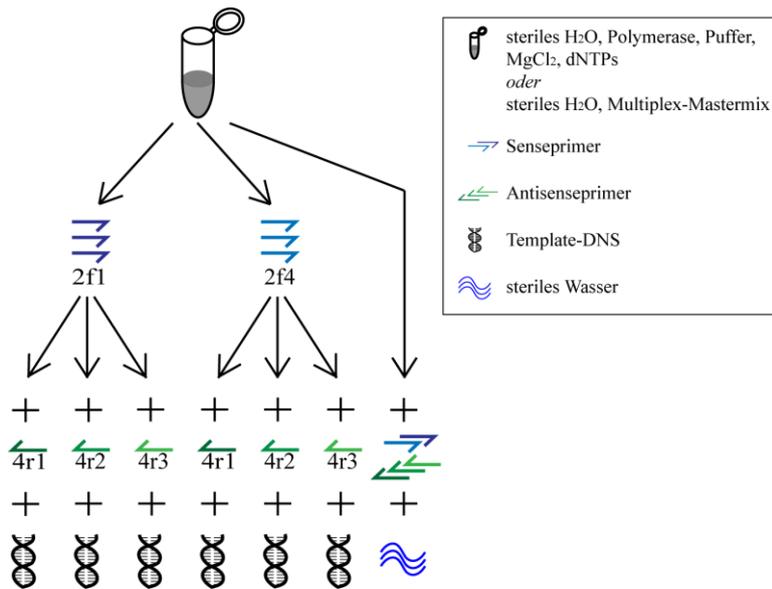


Abbildung 8: Schema des Reaktionsansatzes mit den *Senseprimern* aus FR2 für den Nachweis der verschiedenen Subgruppen.

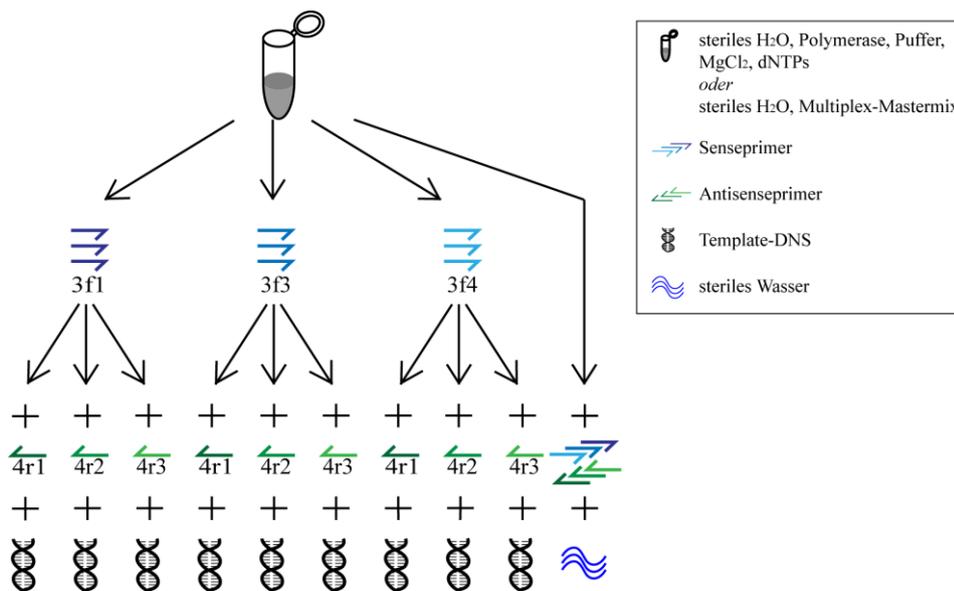


Abbildung 9: Schema des Reaktionsansatzes mit den *Senseprimern* aus FR3 für den Nachweis der verschiedenen Subgruppen bzw. Varianten.

Auch hier erfolgte die Ergebniskontrolle wie unter 3.9.1.2 beschrieben.

3.8. Heteroduplexanalyse (HDA)

Von jedem Amplifikat der Multiplex-PCR wurden 10 µl abgenommen und in ein neues PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden im Thermocycler 10 min bei 95 °C denaturiert, schnell auf 4 °C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur mindestens 1 h inkubiert.

Die Ergebnisse wurden in einer Polyacrylamidgelelektrophorese wie unter 3.9.1.2 beschrieben kontrolliert.

3.9. Kontrolle der PCR- und HDA-Ergebnisse

3.9.1 Elektrophorese

3.9.1.1 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der Elektrophoresekammer wurden 80, 100 oder 280 ml 0,5 x TBE durch Verdünnen der Ausgangskonzentration von 5 x TBE hergestellt.

Zu dem Puffer wurden 0,8, 1 oder 2,8 g Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) für ein 1 %iges Gel zugefügt. Für 2 und 2,5 %ige Gele erfolgte eine entsprechende Anpassung der Menge.

Zum Lösen wurde die Agarose in der Mikrowelle gekocht, auf 60-65 °C abgekühlt und entweder 3,3, 6,6 oder 22 µl 0,1 % Ethidiumbromid in Wasser (Carl Roth, Karlsruhe) hinzugefügt und gleichmäßig vermischt.

Das Gel wurde blasenfrei in die Plexiglasform gegossen und ein Kamm mit der entsprechenden Anzahl an Zähnen befestigt. Nach dem Aushärten wurde der Kamm vorsichtig gezogen, um ein Einreißen der Slots zu verhindern, und das Gel im Kühlschrank gekühlt.

Zur Integritäts- und Konzentrationsbestimmung wurden 1 %ige Agarosegele hergestellt. λ *Hind III* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) (s. Abb. 72 unter 9.2.1) wurde als Längenstandard eingesetzt und 1 und 10 µl Amplifikat mit einer entsprechenden Menge Ladepuffer in die Slots eingebracht.

Zur Kontrolle der *Colony-Screening-PCR* bei der Klonierung ausgewählter Proben dienten 2 %ige Agarosegele. Der eingesetzte Längenstandard war pUC19/*MSPI* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) (s. Abb. 73 unter 9.2.1). Für den Elektrophoreselauf wurden je 5 µl Amplifikat sowie 1 µl Ladepuffer verwendet.

Die Überprüfung der DNS-Integrität mittels Amplifikation von Kontrollfragmenten wurde mit 2,5 % Agarosegelen durchgeführt. Auch hier diente pUC19/*MSPI* als Längenstandard. Für den Lauf wurden 20 µl Amplifikat und 3,5 µl Ladepuffer gemischt. Von diesem Gemisch wurden 20 µl eingesetzt.

Als Ladepuffer diente immer 6 x *Orange DNA Loading Dye* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Dieser besteht aus Xylen Cyanol FF und Orange G. Laut Hersteller wandert Xylen Cyanol FF

auf Höhe von 3030 bp und Orange G auf Höhe von weniger als 50 bp, was der Kontrolle der Auftrennung dient.

Der Elektrophoreselauf erfolgte bei einer Spannung von 4 V/cm und einer auf maximal 500 mA begrenzten Stromstärke (PHERO-stab. 500, BIOTEC-FISCHER GmbH, Reiskirchen) für eine Dauer von 1,5 bis 2,5 h. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE eingesetzt.

3.9.1.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Ergebnisse der Amplifikation der Proben-DNS wurden mittels einer horizontalen PAGE unter Zusatz von SDS kontrolliert.

1. Gießvorrichtung:

Die Gießvorrichtung bestand aus einem Aluminiumblock (s. Abb. 10) wie von Henrich (2008) beschrieben. Sie stellt eine Modifikation der 2006 von Izzo et al. veröffentlichten Methode dar.

Der Aluminiumblock weist einen schmalen Rand sowie mehrere in einer Reihe angeordnete Stege auf und war auf der restlichen Fläche 1,5 mm tief eingefräst. Die Stege dienten der Erzeugung von Geltaschen, in die die Amplifikate einpipettiert werden konnten. Der Gießblock wurde nach spätestens drei hergestellten Gelen neu silikonisiert wie unter 3. beschrieben.

2. Gelträger:

Auf den Gießblock wurde eine Glasplatte der Größe DIN A4 (21 x 29,7 cm) (Radeberger Bilderrahmen GmbH, Radeberg) so plaziert, dass sie am oberen und unteren Rand auflag. Es erfolgte am unteren Rand eine weitere Befestigung mit Klemmen. Hierdurch wurden die für die Auspolymerisierung des Acrylamids notwendigen sauerstofffreien Bedingungen geschaffen.

Die Glasplatten wurden zuvor auf der Seite, die mit dem Gel in Kontakt kommt, wie unter 4. beschrieben silanisieren.

Die Gele hatten somit die Maße 0,15 x 21 x 25 cm.

3. Silikonisierung des Aluminiumblocks:

Der Aluminiumblock wurde mit einer Silikonlösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) benetzt und anschließend 90 min lang auf 120 °C erhitzt.

4. Silanisierung der Glasplatte:

Die Oberfläche wurde mehrmals gründlich gereinigt und abschließend mit A. dest. abgespült. 20 µl 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, München) wurde in einem 15 ml Falcon-Tube (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit 150 µl 10 %iger

3. Material und Methoden

Essigsäure (Carl Roth, Karlsruhe) vermischt und auf 5 ml mit 100 % Äthanol (Carl Roth, Karlsruhe) aufgefüllt. Die Oberfläche wurde gründlich mit der Lösung beschichtet und trocknete anschließend. Danach wurde ca. 1 ml Diethylether (Carl Roth, Karlsruhe) aufgetropft und die Oberfläche poliert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Daraufhin wurde ca. 1 ml 100 % Äthanol aufgetropft, die Oberfläche poliert und das Vorgehen ebenfalls dreimal wiederholt. Anschließend trocknete die Oberfläche.

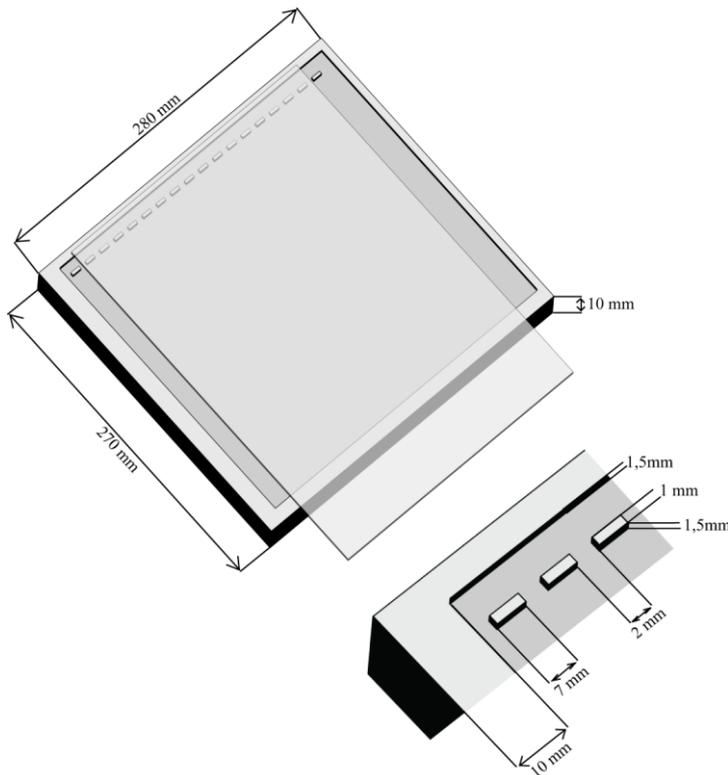


Abbildung 10: Schemazeichnung der Gießvorrichtung für die SDS-Polyacrylamidgele.

5. Herstellung der Polyacrylamidlösung:

26,25 ml 40 % Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung (Carl Roth, Karlsruhe) wurden mit 30 ml 5 x TBE (s. 9.3.3) und 91,26 ml A. dest. in einer Woulff'schen Flasche (Carl Roth, Karlsruhe) vermischt und mit einer Vakuumpumpe (KNF Neuberger GmbH, Freiburg) entgast. Für eine Erhöhung der Bandenschärfe erfolgte der Zusatz von 1,5 ml 10 % SDS (Carl Roth, Karlsruhe). Nach Zugabe von 225 μ l Tetramethylethylendiamid (TEMED) (Carl Roth, Karlsruhe) und 390 μ l 20 % Ammoniumpersulfat (Carl Roth, Karlsruhe) fand die Polymerisation statt.

6. Gießen des Gels:

Die Gellösung wurde an einer der offenen Seiten zwischen Aluminiumblock und Glasplatte langsam eingegossen, wobei zuerst der obere Teil mit den Stegen vollständig mit Gel

angefüllt sein musste, um eine Bildung von Luftblasen im Gel zu verhindern. Darauf wurde die Lösung entlang dem seitlichen Rand zu dem unteren Teil geführt, wodurch eine schräge Lauffront entstand. Die Lösung wurde durch die Wirkung der Kapillarkräfte in den restlichen Teil der Gießvorrichtung gezogen.

Die ideale Polymerisierungszeit betrug 35 min. Bei einer kürzeren Dauer war die Polymerisierung nicht vollständig, eine längere Dauer führte zu einem zu starken Anhaften des Gels an die Glasplatte.

Anschließend wurde die Glasplatte mitsamt Gel vorsichtig von dem Aluminiumblock gelöst und in einer Elektrophoresekammer entsprechender Größe befestigt.

7. Laufbedingungen:

Es wurden je 6 µl Amplifikat mit 2 µl *6 x Orange Loading Dye* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt und in die Slots pipettiert.

Als Längenstandard diente der *O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) (s. Abb. 74 unter 9.2.1). Als Laufpuffer diente 1 x TBE.

Zunächst wurde eine Spannung von 5,5 V/cm angelegt. Diese wurde jedoch in späteren Versuchen auf 7 V/cm erhöht, um eine bessere Auflösung zu erzielen. Die maximale Stromstärke betrug 500 mA (BIOTEC-FISCHER GmbH, Reiskirchen). Der Lauf erfolgte für eine Dauer von 9 h.

Um einem Erwärmen der Elektrophoresekammer entgegenzuwirken, fand der Lauf in einer Elektrophoresekammer mit Kühlfunktion (Desaga GmbH, Heidelberg) bei 10 °C oder in einem Kühlschranks statt.

8. Färben der Banden:

Das Gel wurde mit der Glasplatte in einem Färbebad mit 1 x TBE und 0,1 % Ethidiumbromid auf einem Rüttler (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG JKA®-Labortechnik, Staufen) 25 min lang gefärbt und anschließend 15 min lang in Leitungswasser entfärbt.

Das Volumen an Ethidiumbromid im Färbebad berechnete sich wie folgt:

$$X \text{ ml } 1 \text{ x TBE} + \frac{X}{2} \text{ µl Ethidiumbromid.}$$

Daraufhin wurde eine straff gespannte Angelschnur (Balzer GmbH, Lauterbach) zwischen Gel und Glasplatte durchgeführt, um das Gel zu lösen.

3.9.1.3 Visualisierung der DNS und Dokumentation

Die Banden wurden durch UV-Transillumination (Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich) bei 254 nm sichtbar gemacht und mit Kodak 1.0 „Digital Imaging“ (Eastman Kodak, Inc. USA) fotografisch dokumentiert.

3.9.2 Sequencer

3.9.2.1 Prinzip der Analyse mittels Sequencer

Mittels Einsatz eines Sequencers (LI-COR® Biosciences, Bad Homburg) wurde eine Einzelstrangdiagnostik durchgeführt. Durch diese Methode soll das Auftreten von Heteroduplexstrukturen vermieden und eine Trennschärfe von einer Base erreicht werden.

3.9.2.2 PCR-Bedingungen

Für die Visualisierung der Fragmente mittels Sequenceranalyse wurden die *Senseprimer* mit dem Fluoreszenzfarbstoff *IRDye® 800* markiert. Die Amplifikation der DNS erfolgte im Multiplexansatz unter Einsatz aller Primer. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle 12; die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Analyse mittels Sequencer.

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Steriles H ₂ O		3,5 oder 2,5
2x QUIAGEN Multiplex PCR Master Mix	10x	12,5
Primer 2f1mfluma	10 µM	1
Primer 2f4fluma	10 µM	1
Primer 3f1mfluma	10 µM	1
Primer 3f3mfluma	10 µM	1
Primer 3f4fluma	10 µM	1
Primer 4r1m	10 µM	1
Primer 4r2	10 µM	1
Primer 4r3m	10 µM	1
DNS	Je nach Probe	1 oder 2
Gesamtvolumen		25

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR bei der Sequenceranalyse.

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zahl der Wdh.
Denaturierung	95	15 min	1
Schmelzen	94	30 s	
Anlagern	63,5	90 s	29
Verlängern	72	90 s	
Abschließende Verlängerung	72	5 min	1
Kühlen	4	Bis zur Entnahme	

Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode wurde die Zyklenzahl von 35 auf 29 herabgesetzt, um die Amplifikation unspezifischer Produkte zu vermeiden.

3.9.2.3 Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung eines Sequencers

Es handelt sich im Gegensatz zu der PAGE, die mittels horizontal ausgerichteter Elektrophoresekammer durchgeführt wurde, um eine vertikale Gelelektrophorese.

1. Vorbereiten der Glasplatten

Die Glasplatten wurden mehrmals mit einem nicht fluoreszierenden Spülmittel (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München) gereinigt und anschließend mit A. dest. abgespült. Direkt vor Gebrauch erfolgte eine finale Reinigung mit 100 % Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe).

Auf der Fläche, auf der später der Haifischkamm lag, wurde die entsprechende Stelle der Glasplatten mit der Bindsilan-Arbeitslösung (s. 9.3.4) beschichtet und danach unter einem Abzug trocknen gelassen.

2. Herstellung der denaturierenden Polyacrylamidlösung:

In einem 100 ml Becherglas (Carl Roth, Karlsruhe) wurden 12,6 g Harnstoff (Carl Roth, Karlsruhe) unter ständigem Rühren in 3 ml 40 % Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung (Carl Roth, Karlsruhe), 3 ml 10 x TBE (s. 9.3.4) und 15 ml A. dest. gelöst. Daraufhin wurde die Lösung mit A. dest. auf 30 ml aufgefüllt und gemischt. Direkt vor dem Ausgießen fand der Zusatz von 225 µl 10 % APS (Carl Roth, Karlsruhe) und 22,5 µl TEMED (Carl Roth, Karlsruhe) statt.

3. Gießen des Gels:

Die Glasplatten wurden gemäß Gebrauchsanweisung nach Einlegen von 0,25 mm dicken Abstandhaltern in die entsprechenden Halterungen eingespannt. Die Gellösung wurde zwischen die schräg gehaltenen Glasplatten gegossen. Die Anpassung der Schräge der Glasplatten an das Laufverhalten der Gellösung erfolgte manuell. Zur Vermeidung einer Luftblasenbildung wurde die Gellösung am oberen Rand langsam von der linken zur rechten Seite geführt. So entstand eine schräge Lauffront.

Die Gießapparatur wurde daraufhin waagrecht abgelegt und der Haifischkamm mit der ununterbrochenen Seite ca. 0,5 cm tief in das Gel eingesteckt. Die Polymerisierungszeit betrug 30 min. Falls das Gel anschließend nicht sofort verwendet wurde, verbrachte man es in eine feuchte Kammer, um ein Austrocknen zu verhindern.

Direkt vor der Verwendung wurde der Haifischkamm gezogen, mit den Zähnen zum Gel hin wieder eingesteckt und das Gel mit den Puffertanks in die Elektrophoresekammer des Sequencers eingehängt.

4. Vorbereiten der PCR-Produkte:

Die PCR-Produkte wurden initial 1 : 40 mit der Arbeitslösung des selbst hergestellten Ladepuffers (*Gel Loading Dye Licor I*, s. 9.3.4) verdünnt. Einzelne Proben wurden in einem

zweiten Lauf je nach Intensität der Banden des Weiteren 1 : 20 oder 1 : 80 verdünnt. Die Proben wurden dann 3 min bei 95 °C denaturiert, anschließend schnell auf 4 °C heruntergekühlt und bis zu ihrer Verwendung auf dieser Temperatur gehalten.

5. Laufbedingungen:

Der Vorlauf fand bei 1500 V, 40 A und 51 °C für eine Dauer von 20 min statt.

Anschließend wurden 0,5 µl des PCR-Produkts und 1 µl des Längenstandards *IRDye 800 50-700* (LI-COR® Biosciences, Bad Homburg) (s. Abb. 75 unter 9.2.1) in die entsprechenden Slots pipettiert.

Der Lauf fand bei den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf für eine Dauer von 2 h statt.

6. Visualisierung und Dokumentation:

Die Detektion mittels Laser wurde direkt von einem an den Sequencer angeschlossenen Computer mit dem Programm *e-Seq™ DNA Sequencing Software Version 2.0* (LI-COR® Biosciences, Bad Homburg) aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die automatische Speicherung in Form einer TIF-Datei.

3.10. Klonierung von PCR-Produkten

3.10.1 Aufreinigung der DNS aus dem Gel

Zur Klonierung der ausgewählten PCR-Produkte wurden diese mittels PAGE wie unter 3.9.1.2 beschrieben aufgetrennt. Die Glasplatten wurden darauf mit der Gelseite nach unten auf einen UV-Transilluminator (Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich) gelegt und kurz bei 302 nm sichtbar gemacht, um die Lage der Banden auf der Glasplatte zu markieren. Anschließend wurde die Glasplatte umgedreht, das Gel an der markierten Stelle ausgeschnitten und in 0,2 ml 10 mM Tris gegeben, damit die DNS in die Lösung diffundieren konnte.

3.10.2 CloneJET™ PCR Cloning Kit

Die Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt.

Verwendet wurden *NovaBlue GigaSingles™* Kompetente Zellen (Novagen-Merck KGaA, Darmstadt). Dieser *Escherichia coli*-Stamm leitet sich vom Sicherheitsstamm K12 ab.

Als Klonierungsvektor diente der im Kit enthaltene *pJET1.2/blunt Cloning Vector*. Er enthält ein Lethalgen, das durch Insertion des DNS-Abschnitts in die Klonierungsstelle unterbrochen wird. Daher können sich nur Zellen vermehren, die rekombinierte Plasmide enthalten. Ein so genanntes blau/weiß-Screening wird überflüssig.

1. *Blunting* der PCR-Produkte

Da die *Taq*-Polymerase die Eigenschaft besitzt, Adenin-Überhänge am 3`-Ende zu erzeugen, mussten diese in einer *blunting*-Reaktion aufgefüllt werden.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Zusammensetzung des *blunting*-Reaktionsansatzes.

Reagenz	Volumen pro Ansatz (µl)
PCR-Produkt	1-4*
<i>10 X reaction buffer</i>	10
<i>DNA blunting enzyme</i>	1
<i>Nuclease-free water</i>	6-3
Gesamt	18

*Je nach Konzentration des PCR-Produkts.

Der Ansatz wurde 3-5 s auf mittlerer Stufe gevortext, 5 min bei 70 °C inkubiert und kurz auf Eis abgekühlt.

2. Ligation:

Für die Ligation wurde der Ansatz aus der *blunting*-Reaktion mit je 1 µl *pJET1.2/blunt cloning vector* (50 ng/µl) und *T4 DNA Ligase* (5 U/µl) durch 3-5 s langes Vortexen auf mittlerer Stufe vermischt, dann bei RT 15 min inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt.

3. Transformation:

Je 2,5 µl des gekühlten Ligations-Mixes wurden zu je einer Portion *NovaBlue GigaSingles™* Kompetente Zellen gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Inkubation der Zellen fand anschließend 5 min lang auf Eis statt. Darauf erfolgte durch Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für exakt 30 s die Transformation. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 250 µl *S.O.C. Medium* (Invitrogen GmbH, Darmstadt) verdünnt.

3.10.3 Kultivierung und Subkultivierung ausgewählter Kolonien

Von der Verdünnung wurden je einmal 25 µl und einmal 150 µl auf mit Ampicillin (Carl Roth, Karlsruhe) versetzte Agarnährböden (s. 9.3.5) ausplattiert.

Da der Vektor ein β-Lactamasegen, das zu einer Ampicillinresistenz führt, auf die Bakterienstämme überträgt, sorgt das Versetzen der Platten mit Ampicillin für eine Minimierung des Wachstums von nichttransformierten Bakterien.

Nach Trocknung der Platten bei RT erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht für ca. 15 h.

Von den Übernachtskulturen wurden Kolonien ausgewählt und jede Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher in jeweils 10 ml Flüssigkulturmedium (s. 9.3.5) überführt und bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA) bei 200 rpm inkubiert.

Gleichzeitig wurde der restliche an dem Zahnstocher haftende Anteil einer jeden Kultur in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 2 µl Flüssigkulturmedium überführt und durch Inkubation bei 94 °C für 10 min abgetötet.

3.10.4 Colony-Screening-PCR

Als Template für die *Colony-Screening-PCR* diente der in das Eppendorfgefäß überführte und abgetötete Anteil der Übernachtskultur. Die PCR wurde nach dem im *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) enthaltenen Protokoll durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 15 und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermixes für die *Colony-Screening-PCR*.

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Steriles H ₂ O		14,7
10 X <i>Taq</i> buffer	10x	2
pJET1.2 forward sequencing primer	10 µM	0,4
pJET1.2 reverse sequencing primer	10 µM	0,4
dNTP*	jeweils 10 mM	0,4
<i>Taq DNA Polymerase</i>	5 U/µl	1
DNS		2
Gesamt		20

*dNTP: bestehend aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Konzentration je 100 mM); verdünnt auf je 10 mM mit sterilen Wasser.

Tabelle 16: Reaktionsbedingungen der *Colony-Screening-PCR*.

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zahl der Wdh.
Denaturierung	95	3 min	1
Schmelzen	94	30 s	
Anlagern	60	30 s	30
Verlängern	72	60 s	
Abschließende Verlängerung	72	5 min	1
Kühlen	4	Bis zur Entnahme	

3.10.5 Aufbewahrung der ausgewählten Kulturen

Von den im Flüssigmedium inkubierten Übernachtskulturen wurde bei jenen, die laut Ergebnis der *Colony-Screening-PCR* ein Insert aufwiesen, je 800 µl in ein 150 µl Glyzerin (Carl Roth, Karlsruhe) enthaltendes 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt, vorsichtig vermischt und bei -80 °C eingefroren.

3.10.6 Präparation von Plasmid-DNS

Von den gleichen Übernachtskulturen wurde je 1 ml zur Isolation der Plasmid-DNS eingesetzt. Hierfür wurde das *nexttexTM Plasmid DNA Kit* (NextTex GmbH, Leverkusen) angewandt.

Zur Vorbereitung wurde eine im Kit enthaltene Säule mit 350 µl *PrepPuffer* versetzt, 5 min bei RT inkubiert, bei 350 x g 1 min lang zentrifugiert (Eppendorf GmbH, Hamburg) und anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

1 ml der Übernachtskultur wurde in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Das Pellet wurde in 130 µl Puffer P1, 5 µl Puffer P2 und 3 µl Lysozym (2 mg/ml) resuspendiert und 3-5 s auf mittlerer Stufe gevortext. Danach inkubierte die Lösung 5 min bei RT sowie 1 min bei 90 °C und kühlte anschließend auf RT ab.

15 µl RNase A wurden durch sanftes Auf- und Abpipettieren mit der Lösung vermischt und im Anschluss 3 min bei RT inkubiert.

Das gesamte Lysat wurde auf die vorbereitete Säule pipettiert, 3 min bei RT inkubiert und 1 min bei 700 x g zentrifugiert. Die DNS befand sich nun im unteren Teil des Eppendorfgefäßes und die Säule wurde verworfen.

Die Lagerung der isolierten Plasmid-DNS fand bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C statt.

3.11. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte, die für eine Sequenzierung ausgewählt worden waren, erfolgte durch eine Behandlung mit *ExoSAP-IT*[®] (MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

Das Prinzip dieser Methode ist eine Hydrolyse der überschüssigen Primer und dNTPs, so dass diese zu Nukleosiden und anorganischem Phosphat abgebaut werden.

ExoSAP-IT[®] besteht aus einer Exonuklease (20 U/μl) und einer alkalischen Phosphatase (1 U/μl), die im Verhältnis 1 : 2 angesetzt werden. Das Verhältnis PCR-Produkt zu *ExoSAP-IT*[®] sollte bei ca. 5 : 1 liegen. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen für die Aufreinigung der PCR-Produkte.

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit
Behandlung	37	15 min
Inaktivierung des Enzyms	80	15 min
Kühlen	4	Bis zur Entnahme

3.12. Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse

Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt.

Bei den Plasmiden erfolgte dies mit dem plasmidspezifischen *Antisenseprimer*.

Die PCR-Produkte des diagnostischen Systems wurden aufgrund ihrer geringen Länge mit den jeweiligen subgruppenspezifischen *Sense*- und *Antisenseprimern* der TRG sequenziert.

Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurde mit dem *BLAST-Search* Programm (NCBI, Bethesda, USA) und mit dem Programm *ClustalW* (EMBL-EBI, Heidelberg) vorgenommen.

3.13. Statistische Analyse

3.13.1 Datenaufbereitung

Die Angaben zu den Tieren, die histologische und immunhistologische Auswertung sowie die Versuchsergebnisse wurden für die statistischen Berechnungen in Zahlencodes transformiert.

3.13.2 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung

des Statistikprogrammepakete *BMDP/Dynamic, Release 8.1* (Dixon, 1993) und *Cytel Studio StatXact Version 9.0.0* durchgeführt.

Die Klonalitätsgruppen wurden als ordinal skalierte Werte eingeteilt, da diese in Bezug auf die Diagnostik in eine Rangfolge gebracht werden können. Ein monoklonales Ergebnis spricht für das Vorliegen einer Neoplasie (Goudie et al., 1990), bei einem oligoklonalen Ergebnis ist keine eindeutige Aussage zu treffen (Wainscoat and Fey, 1990; Balk et al., 1991) und ein polyklonales Ergebnis entspricht einem falsch negativen Ergebnis (McCarthy et al., 1992). Für die Gegenüberstellung der verschiedenen nominalen oder ordinal skalierten Merkmalen zu den Klonalitätsgruppen wurden Häufigkeitstabellen mit dem Programm *BDMP4F* erzeugt und mit dem Chi-Quadrat-Test oder dem verallgemeinerten exakten Test nach Fisher auf signifikante Zusammenhänge geprüft. Hierbei wurde das Programm *StatXact* verwendet.

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den verschiedenen ordinal skalierten Merkmalen mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) unter Verwendung des Programms *BMDP3D*.

Mit Hilfe der multiplen schrittweisen bzw. polytomen logistischen Regression unter Verwendung der Programme *BMDPLR* und *BMDPPR* sollte untersucht werden, ob die Klonalität mit den verschiedenen entweder ordinal skalierten oder nominalen Merkmalen in Zusammenhang steht und ob diese Merkmalen untereinander in Verbindung stehen. Dabei sollte ein Modell aufgefunden werden, welches die wichtigsten Einflussfaktoren enthält. Im ersten Schritt wurde zunächst überprüft, welchen Einfluss jede Variable für sich hat (roher Zusammenhang). Dabei wurden alle Variablen ausgezeichnet durch einen kleinen P-Wert, welche für sich alleine genommen mit der Zielgröße in Zusammenhang stehen. Die Variable mit dem kleinsten P-Wert wird in das Modell aufgenommen. Im zweiten Schritt wird überprüft, welche Variablen ebenfalls aufgenommen werden. Entscheidend ist ein P-Wert $\leq 0,05$.

Desweiteren wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Tests für den FeLV-Status und mittels Kruskal-Wallis Tests für die WHO-Klassifikation untersucht, ob sich die Variablen in Bezug auf die Klonalität unterscheiden.

Mittels exaktem zweiseitigem Test nach Fisher wurde die Unabhängigkeit zweier Ergebnisse bei Vorliegen weniger Beobachtungen ermittelt.

Die Sensitivität und Spezifität des diagnostischen Systems wurden mittels Vierfeldertafel berechnet.

3. Material und Methoden

Der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Isolation von DNS

Da bei in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe mit dem *Puregene*[®] *DNA Purification Kit* nur DNS geringer Qualität in Bezug auf die Amplifizierbarkeit gewonnen werden konnte, wurde diese Methode nur noch bei nicht eingebettetem Material angewandt.

Daher wurde die DNS aus 87 T-Zell-Lymphosarkomen zunächst mittels Hitzebehandlung, Chelex 100 und Chloroform isoliert. Bei der Kontrolle der DNS-Integrität wiesen hiervon 85 (98 %) eine Bande im Bereich von 175 bp auf. 20 Proben (24 %) zeigten eine deutliche und 5 (6 %) eine kaum noch detektierende Bande im Bereich von 300 bp.

Mit dem *WaxFree*TM *DNA Kit* wurde eine schnelle und wenig arbeitsaufwändige Isolationsmethode gefunden, deren Ergebnisse mit denen der letztgenannten Methode vergleichbar waren (s. Tab. 21 unter 9.1.1). Es wurde DNS aus 35 T-Zell-Lymphosarkomen isoliert. Alle (100 %) zeigten eine Bande bei 175 bp. Bei 11 (31 %) wurde außerdem eine Bande bei 300 bp amplifiziert.

Eine in Bezug auf das angewandte System vollständige Beurteilung der Klonalität ließ sich nur bei Proben, die beide Fragmentlängen aufwiesen, vornehmen. Diejenigen Proben, bei denen nur das 175 bp lange Fragment amplifizierbar war, reichte die Länge der Bruchstücke der DNS nicht für die Amplifikation mit den *Senseprimern* in FR2 aus.

Proben, die kein Fragment aufwiesen, wurden aufgrund der schlechten DNS-Qualität von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Alle Proben, die aus frischem Material, sowie die Proben, die aus in Äthanol oder in Formalin fixiertem, nicht eingebettetem Material isoliert wurden, wiesen Fragmente beider Längen auf. Eine Übersicht ist zusammen mit der Methode der DNS-Isolation in Tabelle 21 unter 9.1.1 aufgelistet.

4.2. Auswahl der Primer zur Klonalitätsdiagnostik

4.2.1 Vergleich mit den Sequenzen von Weiss (2008)

Durch Sequenzvergleich ließ sich feststellen, dass Sequenzanteile der *framework regions* (FRs) jeweils die geringste Variabilität zwischen den verschiedenen Subgruppen und Varianten aufwiesen. Diese wurden als Primerbindungsstellen ausgewählt, um die verschiedenen Subgruppen und ihre Varianten mit möglichst wenigen Primern zu amplifizieren.

Die Sequenzen wurden innerhalb und zwischen den einzelnen Subgruppen verglichen und daraufhin die Primer für die entsprechenden Subgruppen und Varianten ausgewählt.

4. Ergebnisse

Der Sequenzvergleich ist in den Abbildungen 12 bis 19 dargestellt.

Die Zusammensetzung der Namen der *Sense*- und *Antisenseprimer* wird in der folgenden Abbildung (Abb. 11) erklärt.

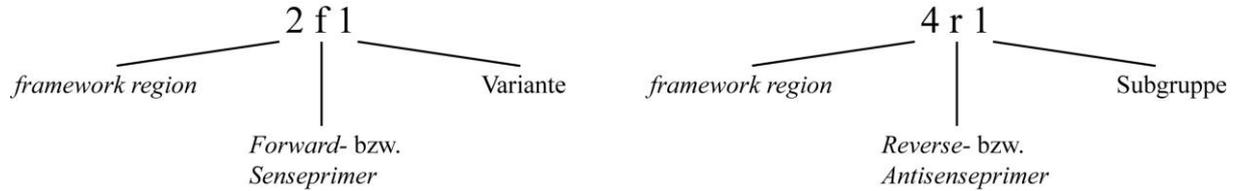


Abbildung 11: Namensbildung der Primer.

Um in FR2 die 3 Varianten der ersten Subgruppe mit nur einem Primer amplifizieren zu können, wurde bei diesem eine Degeneration am 3'-Ende eingeführt (s. Abb. 12). Degeneration bedeutet in diesem Fall, dass eine Mixtur aus 3 Primern eingesetzt wird, die sich in der einen Base (entweder T, A oder G) unterscheiden.

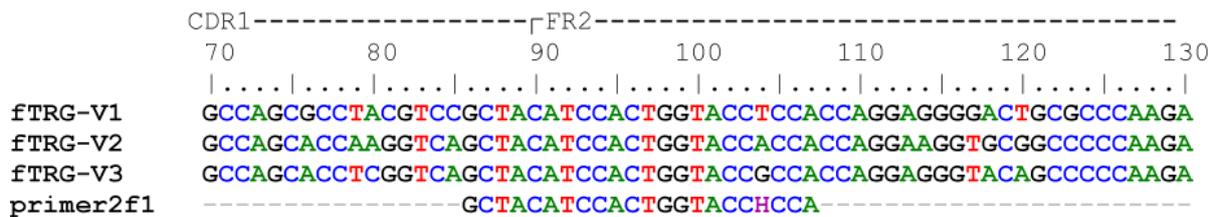


Abbildung 12: Vergleich der Sequenz der V-Regionen mit der Sequenz des *Senseprimers* der 1. Subgruppe in FR2.

Zur Amplifikation der zweiten Subgruppe der V-Regionen wurde in FR2 ein eigener Primer generiert (s. Abb. 13).

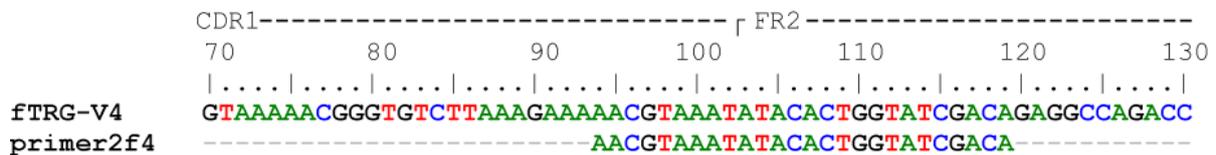


Abbildung 13: Vergleich der Sequenz der V-Regionen mit der Sequenz des *Senseprimers* der 2. Subgruppe in FR2.

In FR3 konnte in der ersten Subgruppe kein Sequenzabschnitt gefunden werden, der die Amplifikation mit nur einem Primer ermöglichte. Daher wurden nur die ersten beiden Varianten in einem Primer (3f1) zusammengefasst (s. Abb. 14); für die dritte Variante wurde ein eigener Primer (3f3) generiert (s. Abb. 15).

4. Ergebnisse

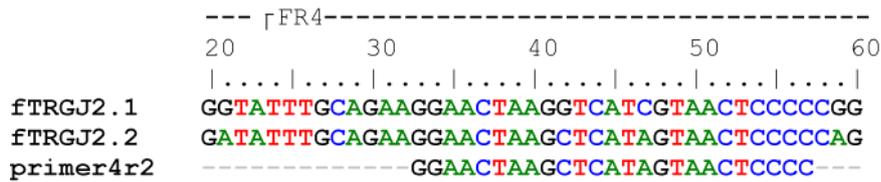


Abbildung 18: Vergleich der Sequenz der J-Regionen mit der Sequenz des *Antisenseprimers* der 2. Subgruppe in FR4.

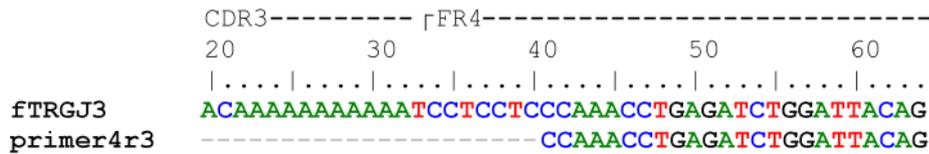


Abbildung 19: Vergleich der Sequenz der J-Regionen mit der Sequenz des *Antisenseprimers* der 3. Subgruppe in FR4.

4.2.2 Modifikation der Diagnostikprimer

Bei Kombination jeweils eines *Sense*- mit einem *Antisenseprimer* (s. Abb. 28 und 29 unter 4.6.) konnte gezeigt werden, dass die Primer 3f1 und 3f3 nicht variantenspezifisch sind. Allerdings amplifizierten beide Primer auch unterschiedliche Klone und mussten somit beibehalten werden. Daher glich man die Länge der jeweiligen Primer innerhalb jeder *framework region* aneinander an, so dass bei der Multiplex-PCR keine zusätzlichen Banden, die durch die unterschiedliche Länge der Primer verursacht wurden, auftreten konnten. Die Länge der *Senseprimer* aus FR2 betrug daraufhin 26 b, die der *Senseprimer* aus FR3 25 b und die der *Antisenseprimer* 25 b. Die Sequenzen der modifizierten Primer sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Zur Auswertung des diagnostischen Systems wurden in der Multiplex-PCR nur die mit den modifizierten Primern erzielten Ergebnisse verwendet.

Tabelle 18: Sequenzen und Orientierung der modifizierten Primer zur Amplifikation der CDR3. Die Modifikationen sind fett und rot hervorgehoben.

Primer	Sequenz (5'-3')	Orientierung	Position
2f1m	GTCAG GCTACATCCACTGGTACCDCCA	Sense	1. Subgruppe, 1. Variante FR2
3f1m	GAAGA GCGACGAGGGCGTGACTAC	Sense	1. Subgruppe, 1. Variante FR3
3f3m	GAAGAG CGATGAGGGAGTGATTAC	Sense	1. Subgruppe, 3. Variante FR3
4r1m	TATCT GTGACCCTGAGCAGTGTGCC	Antisense	1. Subgruppe FR4
4r3m	TCTGTA ATCCAGATCTCAGGTTTGG	Antisense	3. Subgruppe FR4

4.2.3 Überprüfung der Diagnostikprimer

4.2.3.1 Auswahl der Anlagerungstemperatur

Mittels Gradienten-PCR konnten über den Temperaturbereich von 55 bis 65 °C gleich starke Amplifikate erzielt werden. Mit 63,5 °C wurde eine relativ hohe Anlagerungstemperatur ausgewählt. Auf diese Weise wurde die Spezifität der Reaktion erhalten, ohne die Effizienz der Amplifikation zu vermindern.

4.2.3.2 Sensitivität und Spezifität der Diagnostik-Primer

Bei Amplifikation der ausgewählten Klone von Weiss (2008) wurde mit dem jeweils entsprechendem Primerpaar (s. Tab. 11 unter 3.7.1.3) eine deutliche Bande sichtbar, jedoch waren auch Fragmente mit Primerkombinationen, die spezifisch für andere Varianten sein sollten, amplifizierbar (s. Abb. 20 und 21). Das bedeutet, dass die Primer nicht spezifisch an die jeweiligen Klone binden.

In der Multiplex-PCR trat jedoch bei jedem Klon nur eine reproduzierbare Bande auf (s. Abb. 22), was auf die Längengleichung der Primer zurückzuführen ist. Somit wurde nachgewiesen, dass keine zusätzlichen Amplifikate durch den Einsatz mehrerer Primer auftreten.

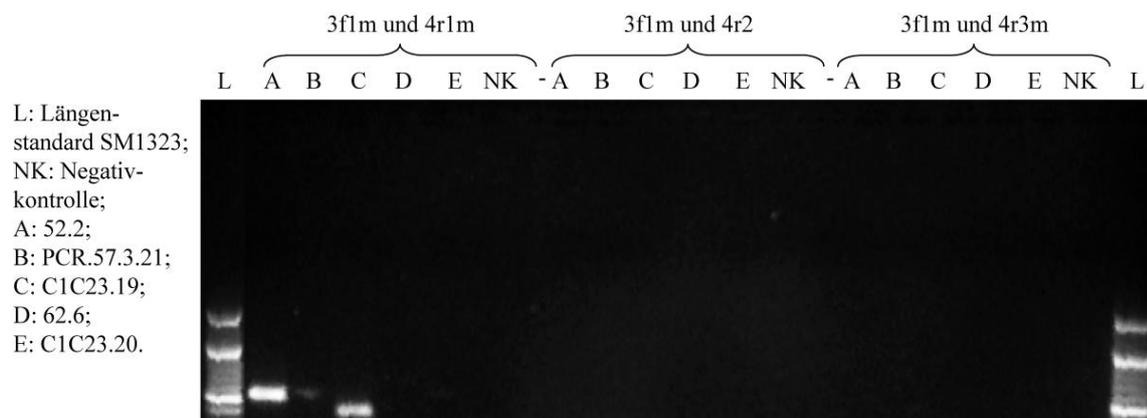


Abbildung 20: Amplifikation der ausgewählten Klone mit *Senseprimer* 3f1m und den *Antisenseprimern*. Erwartet wurde je eine Bande bei 3f1m und 4r1m für A (Klon 52.2), B (Klon PCR57.3.21) und C (Klon C1C23.19). Mit den anderen Primerkombinationen wurden wie erwartet keine Amplifikate erzielt. Die Banden liegen auf einer Höhe von 80-100bp. Die unterschiedlichen Längen kommen durch die unterschiedliche Länge der CDR3 der Klone zustande.

4. Ergebnisse

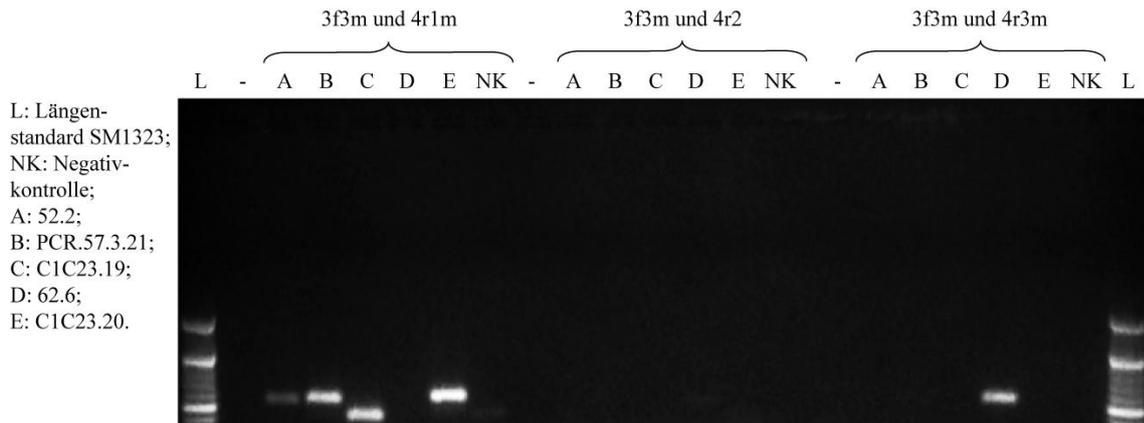


Abbildung 21: Amplifikation der ausgewählten Klone mit *Senseprimer* 3f3m und den *Antisenseprimern*. Erwartet wurde je eine Bande bei 3f3m und 4r1m für E (Klon C1C23.20) sowie 3f3m und 4r3m D (Klon 62.6). Die Banden bei 3f3m und 4r1m A (Klon 52.2), B (Klon PCR57.3.21) und C (Klon C1C23.19) zeigen, dass mit dem *Senseprimer* 3f3 auch Klone der 1. Variante der 1. Subgruppe amplifiziert werden. Mit den anderen Primerkombinationen wurden wie erwartet keine Amplifikate erzielt. Die Banden liegen auf einer Höhe von 80-120 bp. Die unterschiedlichen Längen kommen durch die unterschiedliche Länge der CDR3 der Klone zustande.

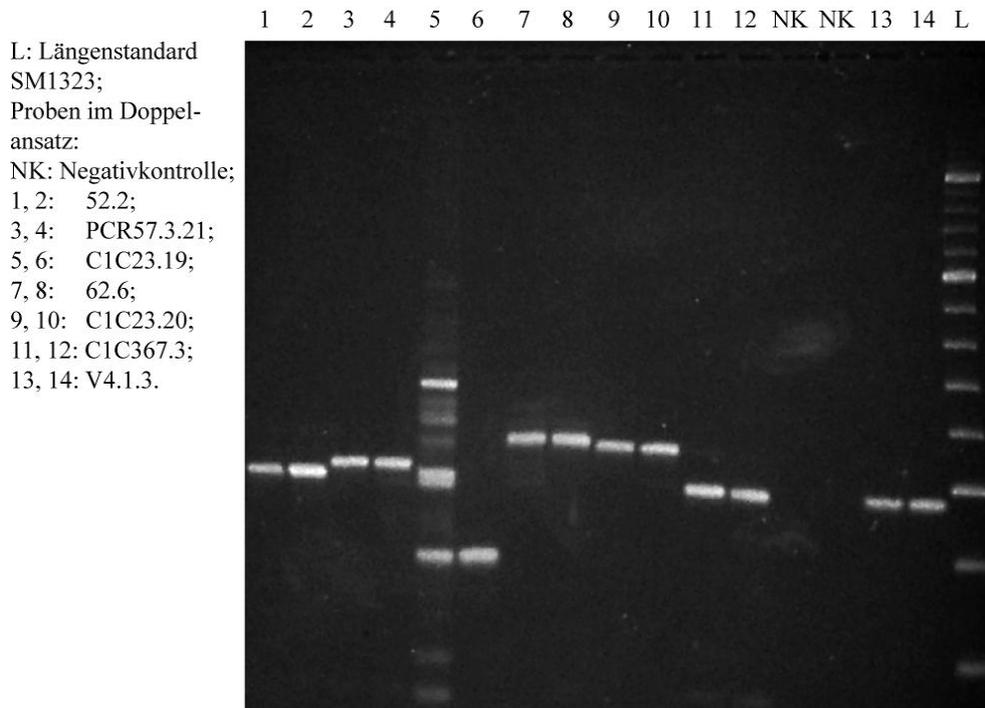


Abbildung 22: Amplifikation der ausgewählten Klone in der Multiplex-PCR. Bei allen Klonen ließ sich eine Bande auf einer Höhe zwischen 80 und 120 bp reproduzierbar amplifizieren. Bei Klon C1C23.19 (Lane 5) traten desweiteren mehrere nicht reproduzierbare Banden auf.

4.3. Überprüfung der Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR

4.3.1 Menge des eingesetzten Templates

Ob sich die Menge der eingesetzten DNS auf die Anzahl der erhaltenen Banden auswirkt, wurde exemplarisch an einer aus Frischmaterial isolierten Probe (S24/08) überprüft. Es wurden jeweils 10 ng, 20 ng, 100 ng und 200 ng DNS eingesetzt.

4. Ergebnisse

Die Anzahl der Banden blieb bei allen Verdünnungen gleich (s. Abb. 23). Die Menge der eingesetzten DNS hat in diesen Größenordnungen keinen Einfluss auf die Anzahl der Banden.

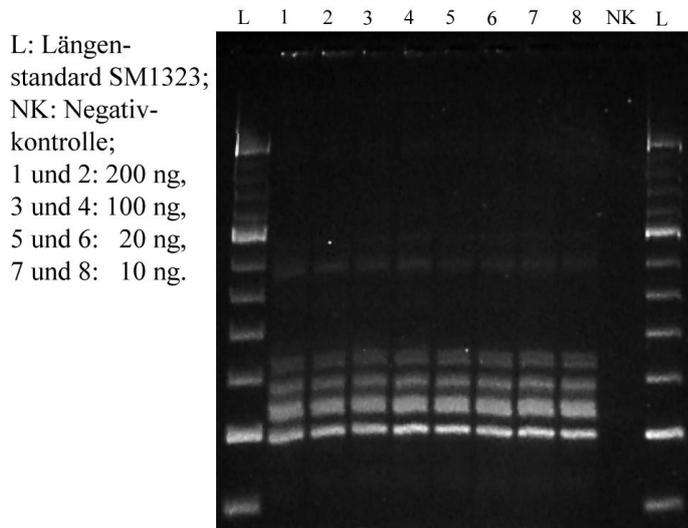


Abbildung 23: Amplifikation von Fall S24/08 in einer Verdünnungsreihe. Trotz starker Verdünnung des Templates ergaben sich keine Änderungen in der Zahl der amplifizierten Banden.

Für die weiteren Versuche wurde eine Endkonzentration von 200 ng ausgewählt, da bei der DNS, die aus in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material isoliert worden ist, davon ausgegangen werden muss, dass aufgrund der Degradation der DNS nur eine eingeschränkte Menge von Fragmenten ausreichender Länge zur Verfügung steht.

4.3.2 Elongationszeit

Es wurden verschiedene Elongationszeiten (15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s) getestet. Da sich jeweils die gleiche Anzahl an Fragmenten amplifizieren ließ (s. Abb. 24), wurde mit 90 s eine relativ lange Elongationszeit ausgewählt, um die Amplifikation aller auftretenden Fragmente sicherzustellen. Die Elongationszeit hat in dem getesteten Umfang keinen Einfluss auf die Anzahl der Banden.

4. Ergebnisse

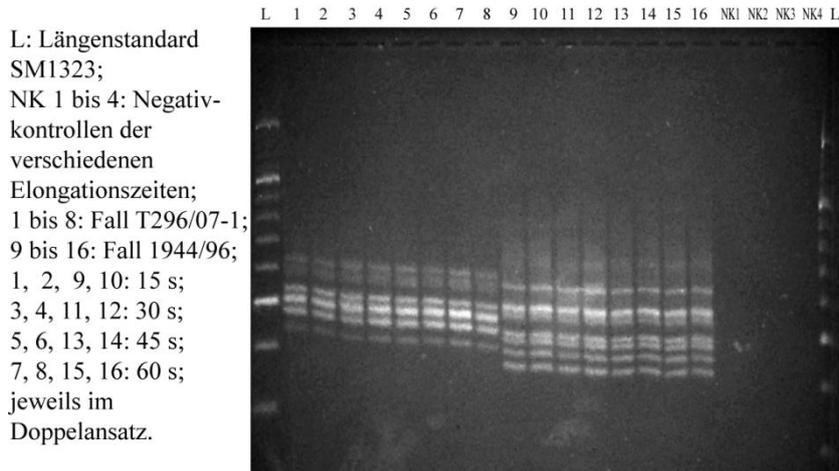


Abbildung 24: Auswirkung verschiedener Elongationszeiten auf die Anzahl der erhaltenen Banden bei zwei Tumoren (T296/07-1: 1 bis 8; 1944/96: 9 bis 16). Es zeigte sich keine Veränderung in der Anzahl der amplifizierten Banden trotz veränderter Elongationszeiten.

4.4. Elektrische Feldstärke der PAGE

Ursprünglich wurde eine elektrische Feldstärke von 5,5 V/cm für eine Dauer von 9 h angelegt. Da hierbei nur eine unzureichende Auftrennung der Banden erreicht wurde, wurde die elektrische Feldstärke bei gleichbleibender Dauer auf 7 V/cm erhöht. Bei einer weiteren Erhöhung erwärmten sich Puffer und Gel aufgrund der hohen Spannung trotz Kühlung stark, so dass eine Unschärfe der Banden eintrat und daher hiervon abgesehen wurde. Ein Vergleich der beiden elektrischen Feldstärken ist in Abbildung 25 dargestellt.

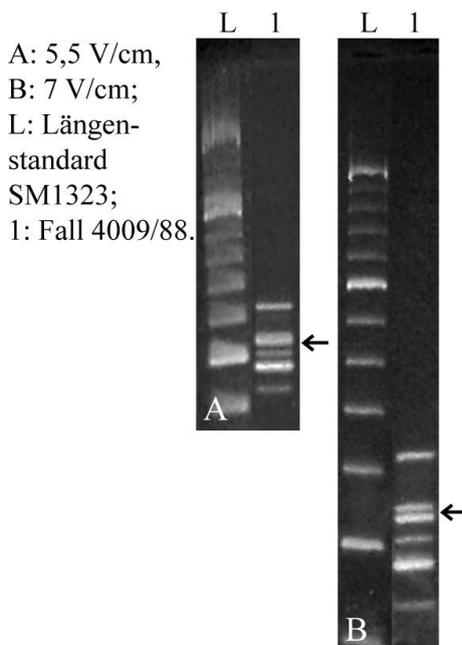


Abbildung 25: Vergleich der bei der PAGE eingesetzten elektrischen Feldstärken. Bei einer elektrischen Feldstärke von 5,5 V/cm (Bild A) erschien die zweitoberste Bande als einzelne sehr starke Bande (schwarzer Pfeil). Bei einer elektrische Feldstärke von 7 V/cm (Bild B) wurde jedoch deutlich, dass tatsächlich 2 Banden vorlagen.

Außerdem wurde die in dem bereits bestehenden Diagnostiksystem angegebene Spannung von 150 V für eine Dauer von 2 h 20 min (Moore et al., 2005) mit der hier angewandten elektrische Feldstärke verglichen. Die Reaktionsbedingungen der PCR wurden entsprechend dem veröffentlichten Protokoll durchgeführt (Moore et al., 2005). Dieser Vergleich ist in Abbildung 26 dargestellt.

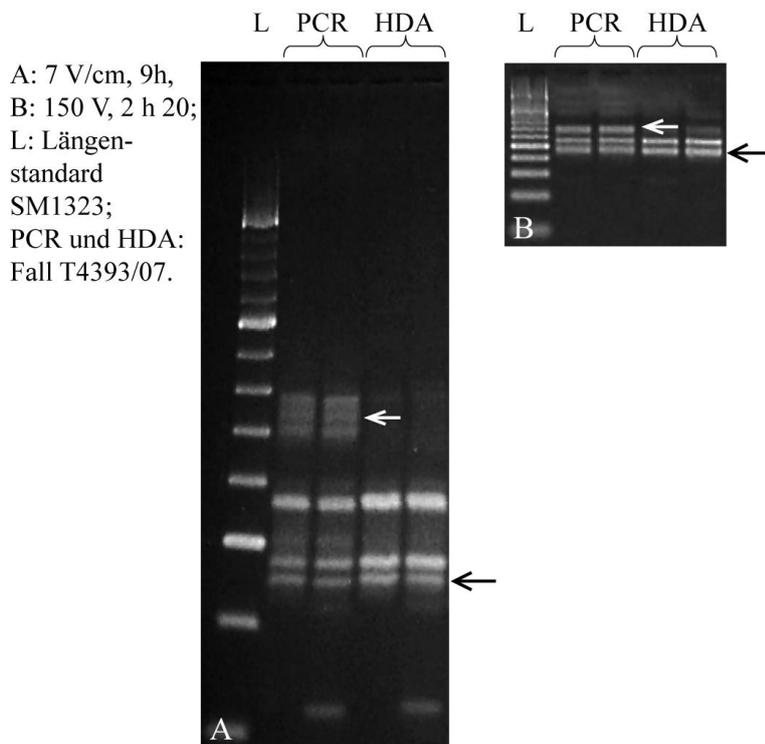


Abbildung 26: Vergleich des Laufverhaltens bei unterschiedlichen elektrischen Feldstärken zwischen dem veröffentlichten (B) und dem hier eingesetzten System (A). Oberhalb des Referenzbereichs sind in A drei Banden (weißer Pfeil) und in B eine Bande zu sehen. Im erwarteten Referenzbereich wurden in A drei (schwarzer Pfeil) und in B zwei Banden detektiert.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass die elektrische Feldstärke kombiniert mit der Laufdauer die Anzahl der detektierten Banden und damit die Interpretation der molekularbiologischen Ergebnisse im Hinblick darauf, ob das Vorliegen eines Tumors angenommen wird oder nicht, bestimmt.

4.5. Ergebnisse der untersuchten Proben in der Multiplex-PCR

4.5.1 T-Zell-Lymphosarkome

Anhand der Ergebnisse der Multiplex-PCR in Kombination mit der HDA sowie in einigen Fällen (s. 4.6.) anhand der Ergebnisse der Subgruppen-spezifischen PCR wurde die Auswertung vorgenommen.

25 der Proben (23 %) wiesen eine Bande, 21 (20 %) 2 Banden, 38 (36 %) 3 und mehr Banden auf und bei 23 (21 %) wurde ein „Schmier“ nachgewiesen. Die Häufigkeit der einzelnen Klonalitätsgruppen ist in Abbildung 27 dargestellt. Eine vollständige Auflistung der Ergebnisse ist in Tabelle 21 unter 9.1.1 dargestellt. Die Abbildungen 76 bis 85 unter 9.2.2.1 zeigen die Ergebnisse der PAGE.

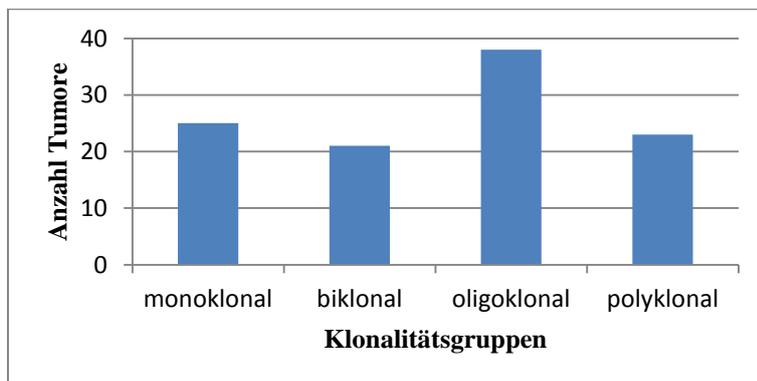


Abbildung 27: Häufigkeitsverteilung der Klonalitätsgruppen.

4.5.2 B-Zell-Lymphosarkome

Bei 7 Proben (35 %) wurde ein „Schmier“, bei 8 Proben (40 %) nichts und bei 5 Proben (25 %) wurden mehrere nicht reproduzierbare Banden nachgewiesen (s. Abb. 86 und 87 unter 9.2.2.2). Eine vollständige Auflistung ist in Tabelle 25 unter 9.1.2 dargestellt.

Bei humanen B-Zell-Lymphosarkomen traten in bis zu 75 % der untersuchten Fälle klonale Rekombinationen der TRG auf (Trainor et al., 1991). Da in der hier vorgelegten Studie keines der B-Zell-Lymphosarkome eine klonale Rekombination der TRG aufwies, wurde mittels exaktem zweiseitigem Test nach Fisher überprüft, ob sich diese Ergebnisse signifikant unterscheiden. Da $p < 0,0001$ war, wurde ein statistisch höchst signifikanter Unterschied nachgewiesen.

4.5.3 Polyklonale Kontrollen

Bei 17 Proben (85 %) wurde ein „Schmier“ detektiert (s. Abb. 88 und 89 unter 9.2.2.3) Bei 3 Proben (15 %) jedoch wurden Banden über einem starken Hintergrundschmier oder einer Leiter nachgewiesen (s. Abb. 28). Dies wurde als oligoklonal interpretiert.

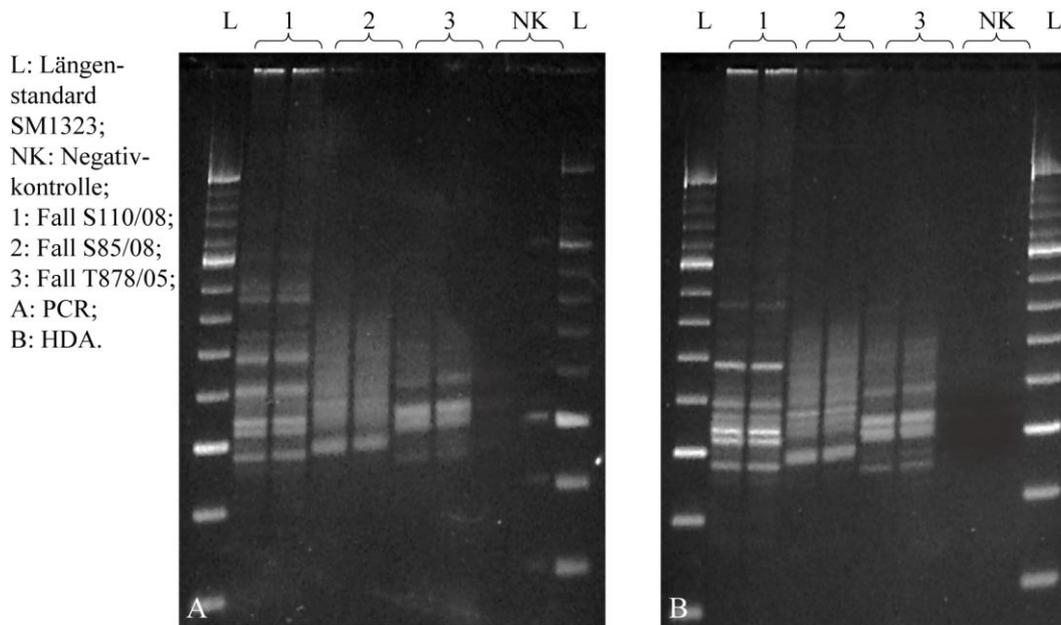


Abbildung 28: Kontrollgewebe mit oligoklonalem Muster.

Die Probe S110/08 stammt aus dem Dünndarm. Histologisch wurde die Diagnose einer chronischen Enteritis gestellt. Es lassen sich nach Heteroduplexanalyse vier deutliche Banden über einer Leiter von schwächeren Banden detektieren.

Fall S85/08 stammt ebenfalls aus dem Dünndarm. Aufgrund der fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen konnte keine histologische Diagnose gestellt werden. Das Material wurde ausgewählt, um den Einfluss postmortaler Veränderungen zu untersuchen. Nach Heteroduplexanalyse ist eine deutliche Bande unterhalb einer Leiter von Banden zu sehen.

Im Fall T878/05 wurde Gewebe eines Mesenteriallymphknotens untersucht. Histologisch wurde eine lymphatische Hyperplasie diagnostiziert, das Vorliegen einer IBD diskutiert. Mittels Heteroduplexanalyse sind zwei starke und zwei schwache Banden über einem Hintergrundschmier zu erkennen.

Es wurde also Oligoklonalität bei reaktiv bzw. durch Fäulnis verändertem, jedoch nichttumörösem Gewebe nachgewiesen.

Eine vollständige Auflistung der Ergebnisse ist in Tabelle 25 unter 9.1.2 dargestellt.

4.5.4 Sensitivität und Spezifität des diagnostischen Systems

Als Sensitivität wurde der Anteil der T-Zell-Lymphosarkome, die ein mono-, bi- und oligoklonales Ergebnis aufwiesen, an den insgesamt untersuchten T-Zell-Lymphosarkomen berechnet. Dies ergab 81,2 %.

Der Anteil der Kontrollen und B-Zell-Lymphosarkome mit polyklonalem Ergebnis an den insgesamt untersuchten Kontrollen und B-Zell-Lymphosarkomen ergab die Spezifität. Diese lag bei 92,5 %.

4.6. Amplifikation der einzelnen Subgruppen

Eine Übersicht über die Anzahl der aufgetretenen Kombinationen der Subgruppen der V- und J-Gensegmente gibt die Abbildung 29 wieder. Für die Auswertung wurden die mit den Primern der verschiedenen Varianten der ersten Subgruppe der V-Gensegmente (Primer 3f1 und 3f3) erzielten Ergebnisse zusammen gezählt (s. V1, Abb. 29), da diese Primer nicht Varianten-spezifisch waren. Es trat zum Teil nur eine Bande pro Probe auf, zum Teil fanden sich aber auch mehrere Banden pro Kombination und mehrere Kombinationen pro Probe (s. Abb. 30 und 31). Eine genaue Auflistung ist in Tabellen 23 und 24 unter 9.1.1 wiedergegeben.

Das bedeutet, dass in manchen Proben mehrere Klone oder rearrangierte Allele vorlagen.

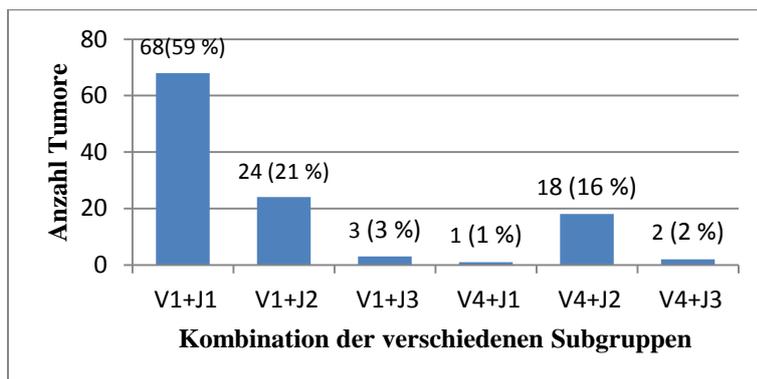


Abbildung 29: Kombinationshäufigkeit der Subgruppen der V- und J-Gensegmente. V1 beinhaltet die Tumoren, bei denen Banden mit den Primern 2f1, 3f1 oder 3f3 aufgetreten sind.

4. Ergebnisse

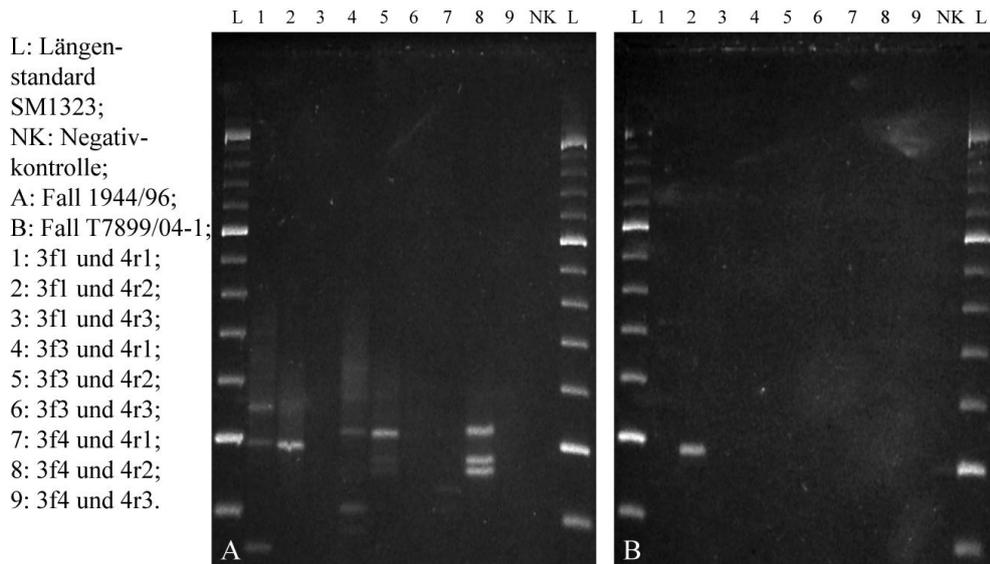


Abbildung 30: Amplifikation der einzelnen Subgruppen.

Bei Fall 1944/96 (A) war mit den Primern 3f1 und 4r2 (2) sowie 3f3 und 4r2 (5) jeweils eine deutliche Bande amplifizierbar. Mit den Primern 3f4 und 4r2 (8) wurden 3 Banden nachgewiesen. Des Weiteren traten bei 3f1 und 4r1 (1) sowie 3f3 und 4r1 (4) mehrere schwache Banden auf.

Bei Fall T7899/04-1 (B) ist nur mit den Primern 3f1 und 4r2 (2) eine Bande amplifizierbar.

Da bei 36 Proben mehrere Banden auf etwa derselben Höhe bei verschiedenen Primer-Kombinationen auftraten (s. Abb. 31), wurden diese Amplifikate aufgereinigt und sequenziert. Dies diente der Überprüfung, ob es sich bei diesen Banden um ein und denselben Klon handelte, der durch mehrere Primer amplifiziert wurde.

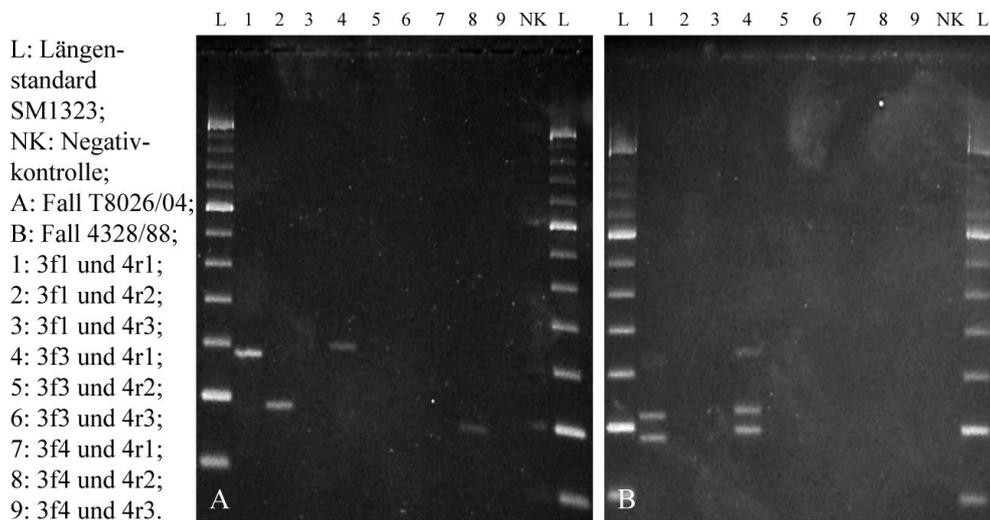


Abbildung 31: Banden derselben Größe bei verschiedenen Kombinationen.

Bei Fall T8026/04 (A) trat bei den Primern 3f1 und 4r1 (1) sowie 3f3 und 4r1 (4) bzw. 3f1 und 4r2 (2) sowie 3f3 und 4r2 (5) je eine Bande auf ca. derselben Größe auf.

Bei Fall 4328/88 (B) waren je zwei Banden ca. gleicher Größe mit den Primern 3f1 und 4r1 (1) bzw. 3f3 und 4r1 (4) amplifizierbar.

Durch Sequenzvergleich konnte bei 3 dieser Proben nachgewiesen werden, dass die *Senseprimer* 3f1 und 3f3 nicht spezifisch für die entsprechenden Varianten der 1. Subgruppe

4. Ergebnisse

der V-Region sind, da durch diese Primer derselbe Klon amplifiziert wurde (s. Abb. 32). Bei einer dieser Proben wurde nachgewiesen, dass die *Antisenseprimer* 4r1 und 4r2 subgruppenspezifisch waren, da mit ihnen nur unterschiedliche Klone amplifiziert wurden (s. Abb. 33).

```
      10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
----CCATACCCATCATACCACTCCGGAGGCTTCCCAGGCAGCACAGTAGTACACGCCCTCGTCG----
CCAGCCATACCCATCATACCACTCCGGAGGCTTCCCAGGCAGCACAGTAATACACTCCCTCATCGCTC
```

Abbildung 32: Vergleich der Sequenz der Amplifikate von Fall T8026/04, die mit dem *Senseprimer* 3f1 bzw. 3f3 gewonnen wurden (Sequenzierung mit dem *Antisenseprimer* 4r1) (siehe Abb. 20A). Dunkelgrau unterlegt ist die Sequenz von 3f1 und hellgrau von 3f3.

```
      10      20      30      40      50
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
--GCTGGGCTTACAAAGTATTTGGTGCTGGCACACTGCTCAGGGT-----
GGCTGGAT---CATGGTATTTGCAGAAGGAAC TAAGCTCATAGTAACTCCCC
```

Abbildung 33: Vergleich der Sequenz der Amplifikate von Fall T5035/06-2, die mit dem *Antisenseprimer* 4r1 bzw. 4r2 gewonnen wurden (Sequenzierung mit dem *Senseprimer* 3f1). Dunkelgrau unterlegt ist die Sequenz von 4r1 und hellgrau von 4r2.

Bei einigen Proben, bei denen sich mittels Multiplex-PCR lediglich ein „Schmier“ feststellen ließ, ergab sich bei Einsatz nur jeweils eines Primerpaares ein anderes Ergebnis. Mit einer Primerkombination wurde eine Bande und mit den anderen Primerkombinationen ein „Schmier“ bzw. eine Leiter amplifiziert (s. Abb. 34).

4. Ergebnisse

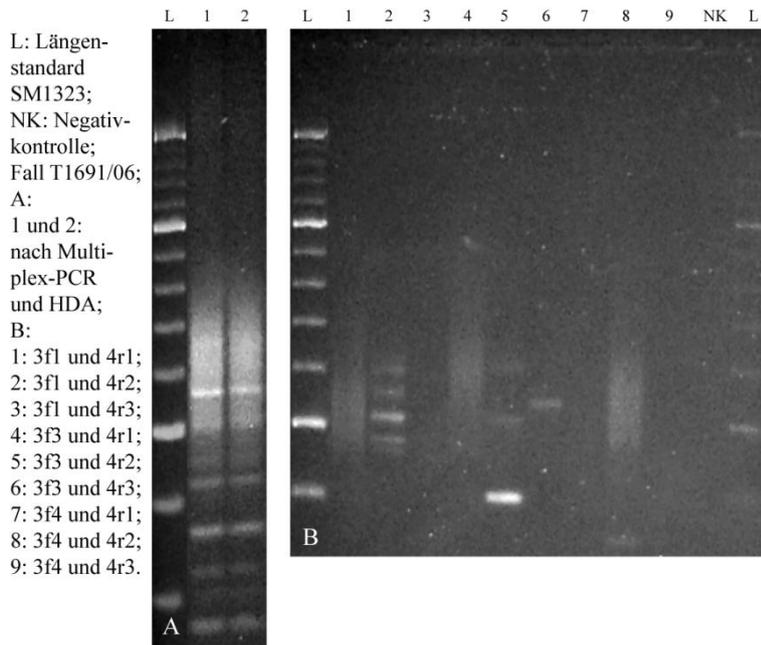
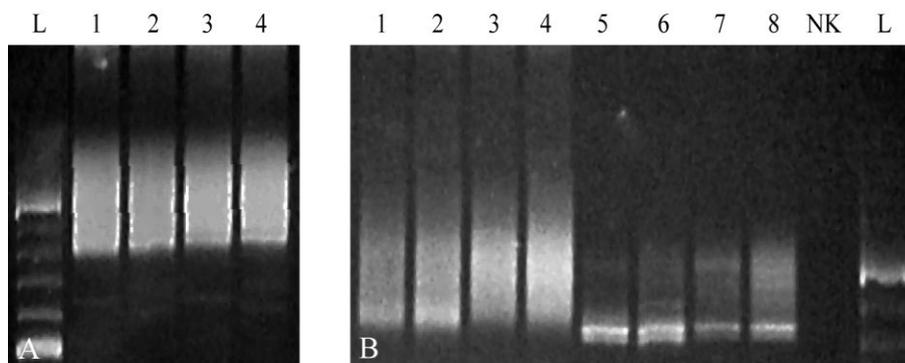


Abbildung 34: Verdecken distinkter Banden durch Hintergrundschmier am Bsp. von Fall T1691/06. Nach Multiplex-PCR (A) waren ein „Schmier“ sowie eine Leiter von Banden zu sehen. Bei der Amplifikation mit je einem *Sense*- und einem *Antisenseprimer* (B) wurde bei den Kombinationen 3f1 und 4r1 (1), 3f3 und 4r1 (4) sowie 3f4 und 4r2 (8) ein „Schmier“ sichtbar. Bei der Kombination von 3f1 und 4r2 (2) wurde eine Bandenleiter amplifiziert. Bei der Kombination von 3f3 und 4r2 (5) trat jedoch eine deutliche und bei der Kombination von 3f3 und 4r3 (6) eine schwache Bande auf.

Dies war auch bei einer der Proben der Fall, die unter Einsatz von jeweils einem *Senseprimer* mit allen *Antisenseprimern* amplifiziert wurden (s. Abb. 35).



Längenstandard: SM1323; NK: Negativkontrolle;
A: *Senseprimer* aus FR2 und *Antisenseprimer* (1 und 2: Multiplex-PCR; 3 und 4: HDA);
B: 1 bis 4: 2f1 und *Antisenseprimer* (1 und 2: Multiplex-PCR, 3 und 4: HDA);
5 bis 8: 2f4 und *Antisenseprimer* (5 und 6: Multiplex-PCR, 7 und 8: HDA);

Abbildung 35: Amplifikation von Fall S1126/08 mittels Multiplex-PCR und nach *Senseprimern* aufgeteilt. Mittels Multiplex-PCR (A) wurde ein „Schmier“ amplifiziert. Nach Aufteilung der *Senseprimer* war mit 2f1m weiterhin ein „Schmier“, bei 2f4 jedoch eine deutliche Bande vor einem Hintergrundschmier zu sehen (B).

In diesen Fällen wurden distinkte Banden in der Multiplex-PCR durch den starken Hintergrundschmier überdeckt.

4.7. Auswirkung von Fäulnis- und Fixationsprozessen auf das diagnostische System

Zur Überprüfung der Auswirkungen entsprechender Prozesse wurde ein T-Zell-Lymphosarkom (S24/08), bei dem unfixiertes Material vorlag, untersucht.

In Tabelle 19 ist die Behandlung der Probe dargestellt. Die Lagerung in Leitungswasser bei Raumtemperatur diente der Nachstellung natürlicher Fäulnisprozesse.

Tabelle 19: Angewendete Fixationsmethoden und Fäulniszeiten. Die Bezeichnungen A bis O entsprechen den Lanes in den folgenden Elektrophoreseabbildungen.

Prozessierung vor der Isolation	0 Tage in Wasser	3 Tage in Wasser	7 Tage in Wasser
Unbehandelt/frisch	A	F	K
In Äthanol fixiert	B	G	L
In Formalin fixiert	C	H	M
EFPE	D	I	N
FFPE	E	J	O

Um die Auswirkungen dieser Prozesse zu veranschaulichen, wurde die isolierte DNS direkt auf einem Agarosegel aufgetrennt (s. Abb. 36). Die längsten Bruchstücke zeigten die frischen, nicht eingebetteten Proben (A, B, C). Mit zunehmender Zeit in Leitungswasser wurden die Bruchstücke kürzer (F, G, H und K, L, M) und es trat ein sogenanntes Laddering auf, das durch die residuale Tätigkeit der endogenen Endonuklease hervorgerufen wird (Wyllie, 1980). Diese spaltet die DNS in den internukleosomalen Regionen in Bruchstücke, die ein Vielfaches von ca. 180 bp lang sind. Zwischen frischen und fixierten, nichteingebetteten Proben ergab sich kein merklicher Unterschied. Die Bruchstücke nach Einbettung waren die kürzesten. Sie wiesen bis auf Probe E eine Länge unter 500 bp auf.

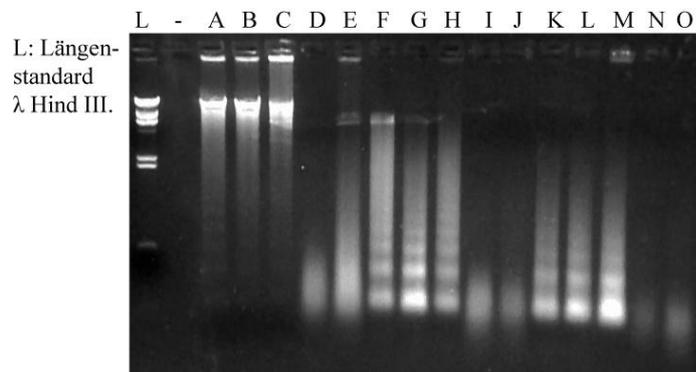


Abbildung 36: Auftrennung der isolierten DNS des T-Zell-Lymphosarkoms S24/08 mittels Gelelektrophorese (A bis O: s. Tab. 19).

4. Ergebnisse

Sowohl postmortale Veränderungen als auch der Einbettungsprozess führen zu einer geringeren Qualität der DNS in Bezug auf die Amplifikation.

Um die Grenzen für das diagnostische System präzisieren zu können, wurde die DNS-Integrität durch Amplifikation von Kontrollfragmenten überprüft. Ein positives Ergebnis in Bezug auf das Auftreten von Amplifikaten mit einer Länge von 175 bp ist Voraussetzung für den Einsatz im System mit den *Senseprimern* aus FR3, ein positives Ergebnis in Bezug auf das Auftreten von Amplifikaten mit einer Länge von 300 bp für den Einsatz im System mit den *Senseprimern* aus FR 2. Bei allen Probesteilen konnte das Fragment mit einer Länge von 175 bp amplifiziert werden (s. Abb. 37).

Bei den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben ließ sich keine Bande oder eine kaum detektierbare Bande bei 300 bp nachweisen.

Die äthanolfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben zeigten unterschiedliche Ergebnisse bei 300 bp. Die frisch fixierten Proben wiesen eine deutliche Bande auf, während die Banden nach 3 und 7 Tagen in Wasser schlechter zu detektieren waren (s. Abb. 38).

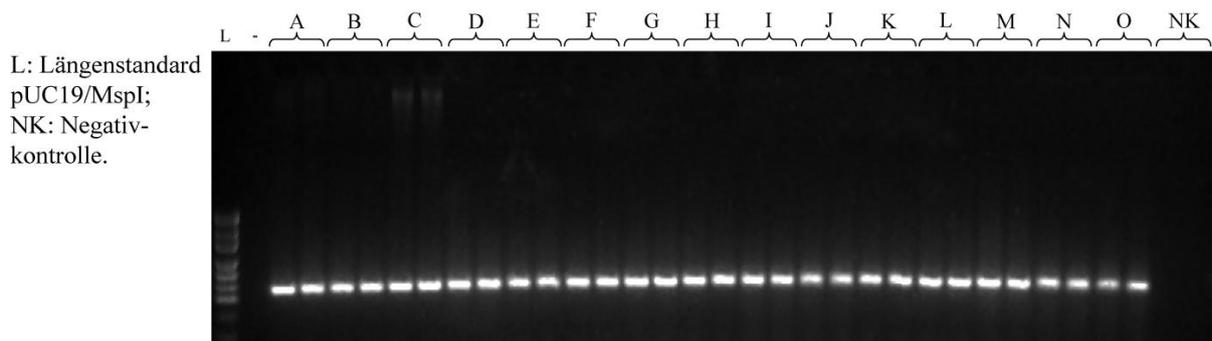


Abbildung 37: Überprüfung der DNS-Integrität des T-Zell-Lymphomsarkoms S24/08 mittels Amplifikation des 175 bp-Kontrollfragments im Doppelansatz. Bei allen Proben war ein Fragment mit einer Größe von ca. 175 bp zu sehen (A bis O: s. Tab. 19).

4. Ergebnisse

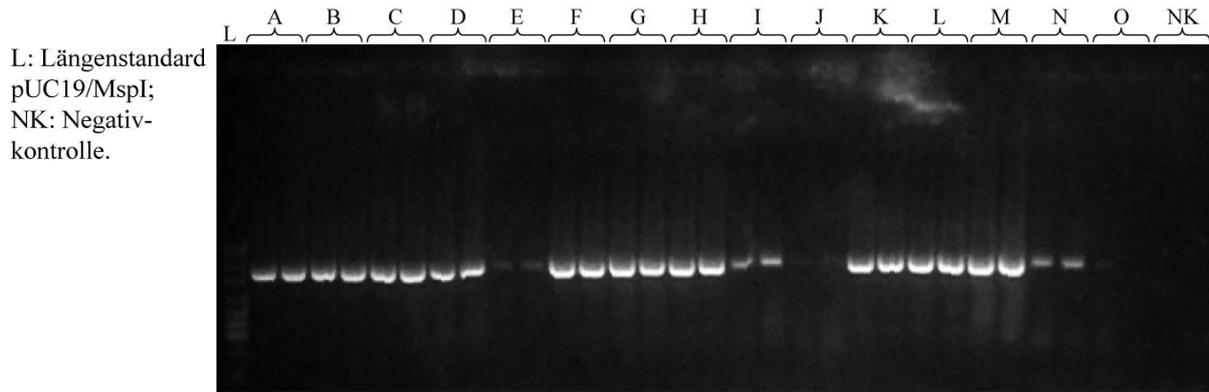


Abbildung 38: Überprüfung der DNS-Integrität des T-Zell-Lymphosarkoms S24/08 mittels Amplifikation des 300 bp-Kontrollfragments im Doppelansatz. Bei den in Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Proben wurde eine kaum detektierbare (E, J) oder keine (O) Bande amplifiziert. Bei den in Äthanol fixierten, in Paraffin eingebetteten Proben trat eine Abschwächung der Intensität der Bande nach 3- (I) bzw. 7-tägiger (N) Lagerung in Leitungswasser bei RT auf (A bis O: s. Tab. 19).

Entsprechend konnte mit den *Senseprimern* aus FR3 des Diagnostiksystems bei allen Proben die gleiche Anzahl an Banden amplifiziert werden (s. Abb. 39). Mit den *Senseprimern* aus FR2 wurden jedoch bei dem in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Material keine reproduzierbaren Banden, bei dem äthanolfixierten und in Paraffin eingebetteten Material eine verringerte Anzahl an Banden nachgewiesen (s. Abb. 40).

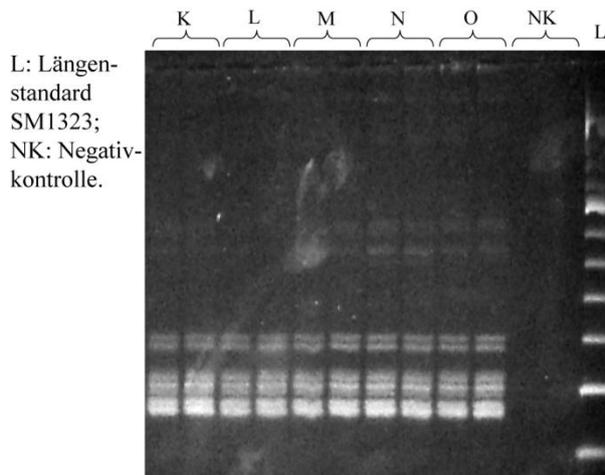


Abbildung 39: Auswirkungen der Prozessierung auf das Diagnostiksystem mit *Senseprimern* aus FR3 bei T-Zell-Lymphosarkom S24/08. Es waren bei allen Proben deutliche Banden gleicher Anzahl amplifizierbar. Exemplarisch sind hier die Proben dargestellt, die vor der Fixierung 7 Tage in Leitungswasser bei RT lagerten (K bis O: s. Tab. 19).

4. Ergebnisse

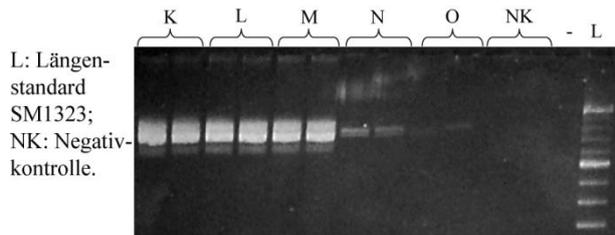


Abbildung 40: Auswirkungen der Prozessierung auf das Diagnostiksystem mit den *Senseprimern* aus FR2 bei T-Zell-Lymphosarkom S24/08. Es ließen sich nur bei den nicht in Paraffin eingebetteten Proben Banden gleicher Intensität und Zahl amplifizieren. Bei den in Äthanol fixierten, in Paraffin eingebetteten Proben wurden eine deutliche und eine kaum detektierbare Bande nachgewiesen. Die in Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Proben wiesen keine Banden auf. Exemplarisch sind hier die Proben dargestellt, die vor der Fixierung 7 Tage in Leitungswasser bei RT lagerten (K bis O: s. Tab. 19).

Dies ergibt, dass die Fixation, der Einbettungsprozess sowie der Zustand der Probe vor Fixation einen Einfluss auf die Detektierbarkeit und die Anzahl der Banden und somit auf Aussagekraft des diagnostischen Systems haben.

4.8. Auftreten von Banden außerhalb des erwarteten Größenbereichs

Bei 9 Tumoren wurden nach Multiplex-PCR mit den *Senseprimern* aus FR3 Banden mit einer Größe von 150 bis 190 bp festgestellt, die nach HDA nicht mehr zu detektieren waren. Um die Herkunft dieser Banden aufzuklären, wurde eine entsprechende Bande bei Fall T4219/05-2 (s. Abb. 41) aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, kloniert und sequenziert.

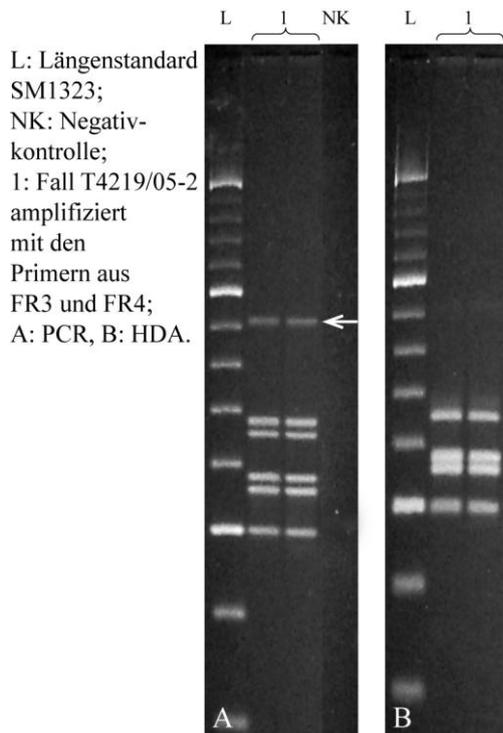


Abbildung 41: Fall T4219/05-2 nach PCR. Markiert ist eine Bande bei ca. 185 bp (weißer Pfeil, A). Diese ist nach HDA nicht mehr zu detektieren (B).

Bei Sequenzvergleich der Klone traten zwei Sequenzen wiederholt auf. Das Sequenzalignment wurde mit dem *ClustalW*-Algorithmus (<http://www.clustal.org>) berechnet und zeigte, dass Anfangs- und Endteil jeweils identisch waren und die Sequenzen sich nur im Mittelteil, sowohl in der Länge als auch der Basenzusammensetzung, unterscheiden. Bei einer nachfolgenden *BLAST*-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) konnten die entsprechenden Sequenzen der FR3, der CDR3 und der FR4 des felinen TRG zugeordnet werden. Die Abbildung 42 zeigt den Vergleich beider häufig vorkommender Sequenzen inklusive der Primerbindungsstellen.

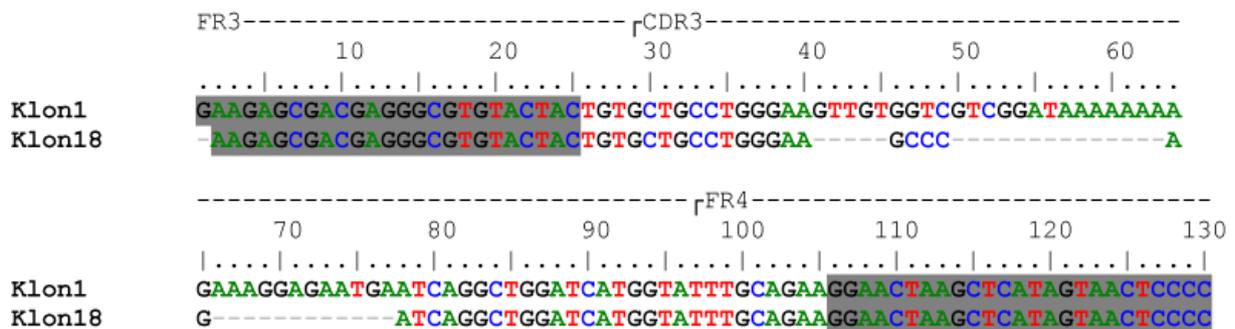


Abbildung 42: Darstellung der häufig vorkommenden Sequenzen aus einer Bande oberhalb des erwarteten Größenbereichs. Grau unterlegt ist die Sequenz des *Senseprimers* 3f1m bzw. des *Antisenseprimers* 4r2. Klon 1 und Klon 18 unterscheiden sich jeweils in der Mitte der CDR3, sowohl in der Basensequenz als auch in der -anzahl.

Aufgrund der identischen Anfangs- und Endteile eignen sich die beiden Sequenzen zur Bildung einer Heteroduplexstruktur.

4.9. Untersuchung der Herkunft der oligoklonalen Banden

4.9.1 Klonierung und Sequenzierung aller Banden eines oligoklonalen Tumors

Bei 40 % der T-Zell-Lymphosarkome traten 3 oder mehr Banden als Ergebnis der Multiplex-PCR auf. Um die Herkunft der Banden zu untersuchen, wurden bei dem exemplarisch ausgewählten Fall 761/93 nach Multiplex-PCR und HDA sowie Auftrennung mittels PAGE vier Banden detektiert (s. Abb. 43). Diese wurden mit absteigender Größe als A bis D bezeichnet, aus dem Gel ausgeschnitten, kloniert und mit dem Plasmid-spezifischen *Antisenseprimer* sequenziert.

4. Ergebnisse



Abbildung 43: Fall 761/93 nach Multiplex-PCR und HDA. Bande A liegt auf Höhe von 115 bp, Bande B auf Höhe von 105 bp, Bande C auf Höhe von 100 bp und Bande D auf Höhe von 95 bp.

Das Sequenzalignment erfolgte mit *ClustalW*.

Bei A, C und D wiesen alle 5 sequenzierten Klone jeweils die gleiche Sequenz auf. Bei B zeigten lediglich 3 Klone dieselbe Sequenz. Die Fragmente A und B wurden, wie sich herausstellte, mit den Primern 3f1m und 4r1m amplifiziert; die Fragmente C und D hingegen mit den Primern 3f1m und 4r2.

In Abbildung 44 sind die Sequenzen der Klone mit den Primerbindungsstellen aufgezeigt und in den Abbildungen 45 bis 47 ist ein Alignment der Sequenzen der vier Banden miteinander mittels *ClustalW* dargestellt.

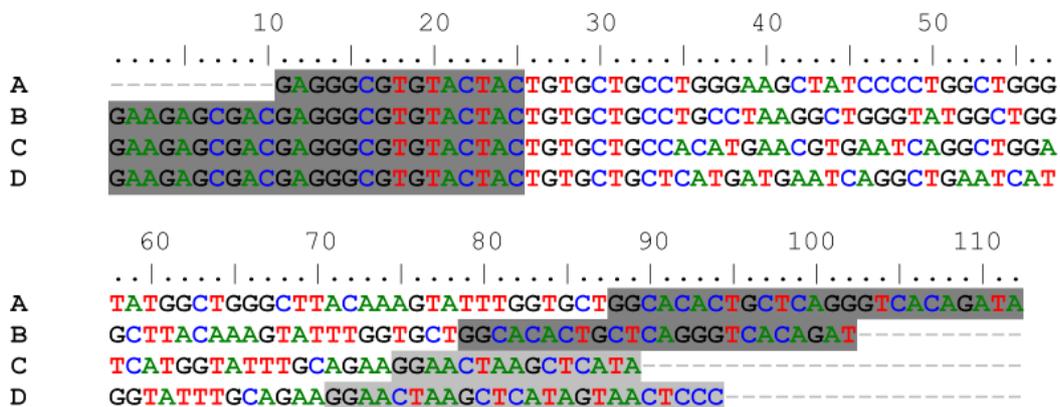


Abbildung 44: Sequenzen der Banden von Fall 761/93. Dunkelgrau unterlegt sind der *Senseprimer* 3f1m und der *Antisenseprimer* 4r1m. Hellgrau unterlegt ist der *Antisenseprimer* 4r2.

4. Ergebnisse

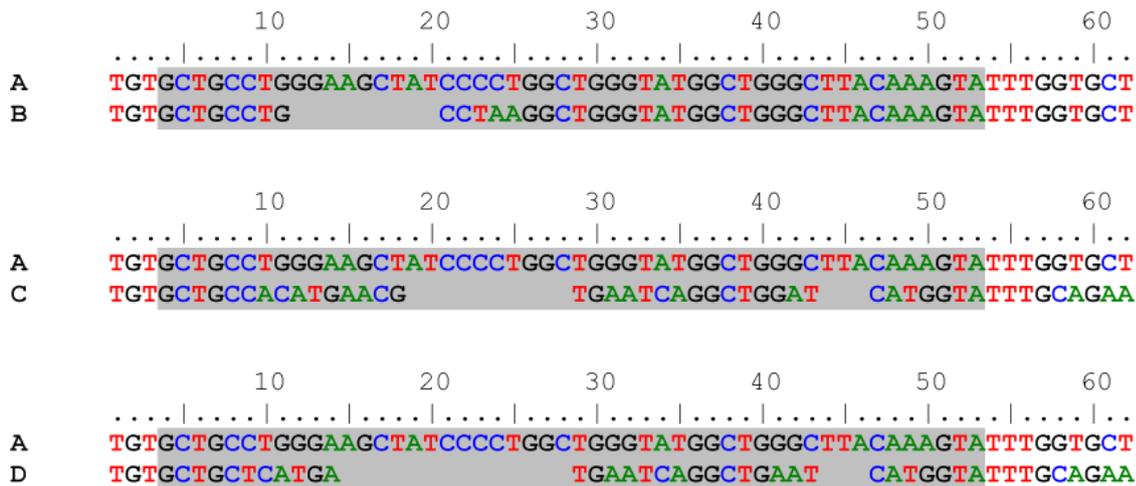


Abbildung 45: Vergleich der Sequenz der Bande A mit den Banden B, C, D. Grau unterlegt ist die CDR3. Die Sequenz von Bande B ist 9 Basen kürzer als die von A, ansonsten unterscheidet sich die Sequenz in zwei Basen. Die Sequenz von Bande C ist 13 Basen, die Sequenz von Bande D 17 Basen kürzer als die von A. Die Sequenzen unterscheiden sich stark.

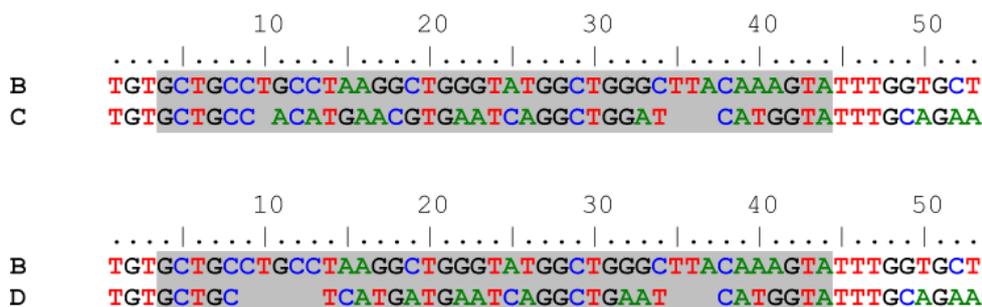


Abbildung 46: Vergleich der Sequenz von Bande B mit den Banden C und D. Grau unterlegt ist die CDR3. Die Sequenz von Bande C ist 4 und die Sequenz von Bande D 8 Basen kürzer als die von B. Die Sequenzen unterscheiden sich stark.

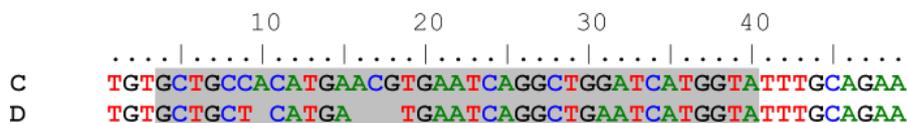


Abbildung 47: Vergleich der Sequenz von Bande C mit Bande D. Grau unterlegt ist die CDR3. Die Sequenz von Bande D ist 4 Basen kürzer als die von C. Ansonsten sind die Sequenzen identisch.

Die vier Banden repräsentieren vier unterschiedliche Klone.

4.9.2 Visualisierung der PCR-Produkte mittels Sequencer

Bei 8 Tumoren (S1204/09-1, S1126/08, S24/08, T4393/07, T296/07-1, T5035/06-1, T3105/06-1, S1318/06) wurden in vorangegangenen Versuchen die *Senseprimer* aus FR2 und FR3 zusammen mit den *Antisenseprimern* aus FR4 gleichzeitig eingesetzt. Da sich hierbei

4. Ergebnisse

keine veränderten Ergebnisse im Vergleich zu dem Einsatz von *Senseprimern* aus nur einer FR ergaben, wurde für den Nachweis mittels Sequencer bei allen Tumoren die Primer aus FR2, FR3 und FR4 gleichzeitig eingesetzt. Dies diente dazu, die Zahl an benötigten Reaktionen zu verringern.

Nach Multiplex-PCR der T-Zell-Lymphosarkome wurde bei 17 Katzen (16 %) eine Bande, bei 20 Katzen (19 %) zwei und bei 30 Katzen (28 %) drei und mehr Banden nachgewiesen. Bei den Proben von 5 Katzen (5 %) wurde ein „Schmier“ detektiert. Die Proben von 35 Katzen (32 %) zeigten kein Amplifikat.

Es wurde eine deutlichere Auftrennung, v.a. der Banden, die mit den *Senseprimern* aus FR2 amplifiziert wurden, erzielt, wie der Vergleich zwischen PAGE und Sequencer bei Fall S1204/09 zeigt (s. Abb. 48).

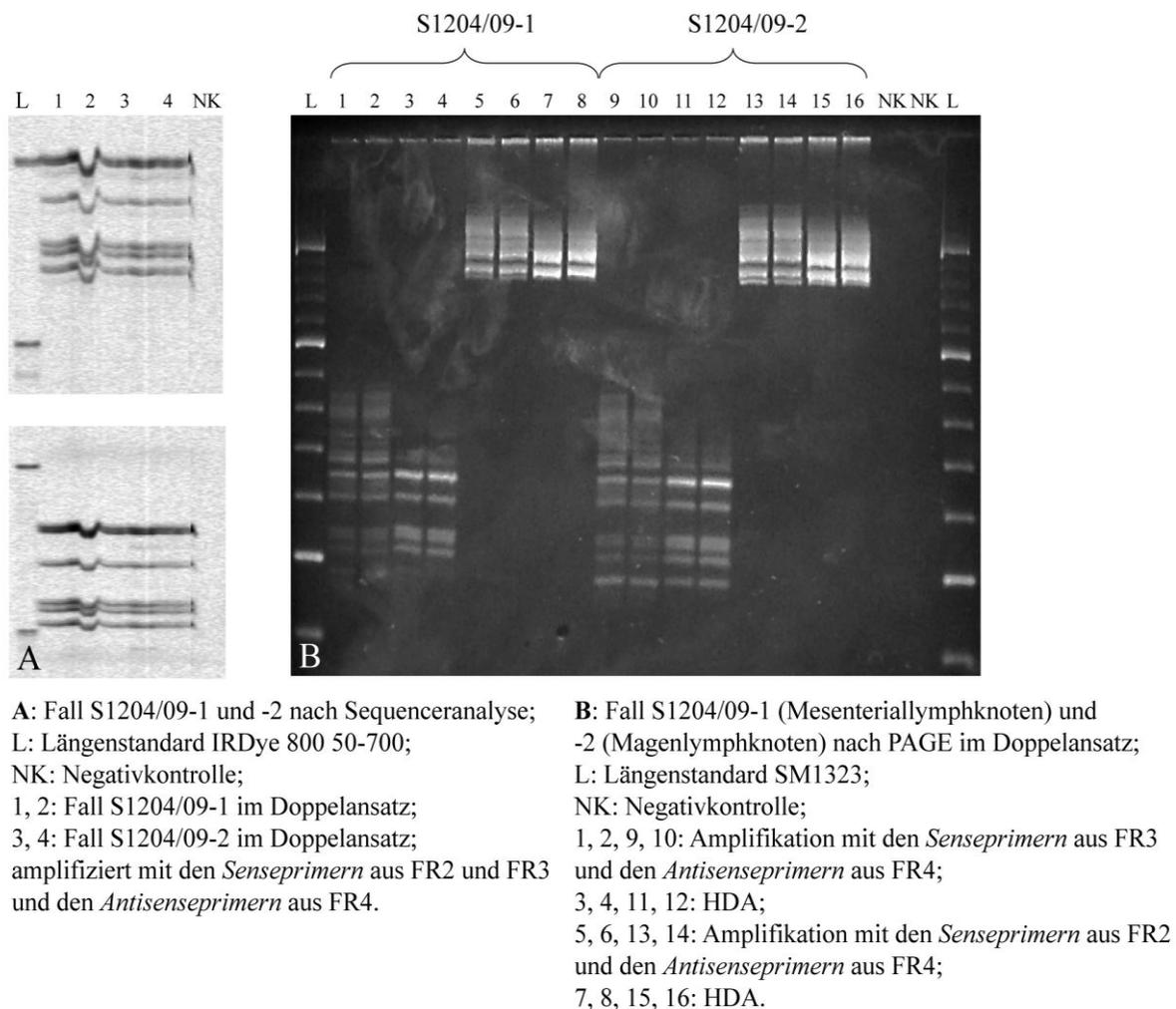


Abbildung 48: Vergleich von Fall S1204/09 nach Auftrennung mittels Sequencer und mittels PAGE. Bei Auftrennung von Fall S1204/09 mittels Sequencer (A) waren bei Amplifikation mit den *Senseprimern* aus FR2 und aus FR3 jeweils fünf Banden zu erkennen. Bei Auftrennung mittels PAGE (B) war nach HDA bei Amplifikation mit den *Senseprimern* aus FR2 ein „Schmier“ zu sehen, bei Amplifikation mit den *Senseprimern* aus FR3 zeigten sich eine deutliche sowie 6 schwache Banden.

Weitere Ergebnisse sind in den Abbildungen 90 bis 94 unter 9.2.3 dargestellt.

Die erhaltenen Banden konnten zur Vereinfachung der Auswertung mit dem Programm *Gene ImagIR 4.05* (Scanalytics, Inc.) in Kurven überführt werden (s. Abb. 49).

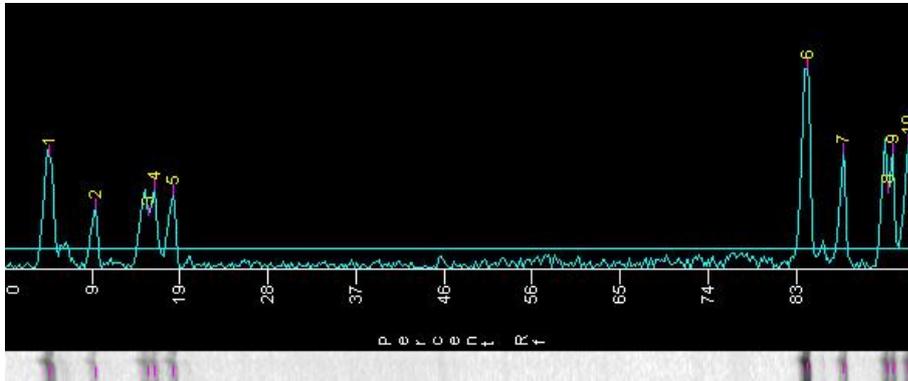


Abbildung 49: Ergebnis für Fall S1204/09 nach Sequenceranalyse.

4.10. Fall T989/08

4.10.1 Sequenzierung

Bei dieser Probe war mit den *Senseprimern* aus FR3 nur ein Schmier amplifizierbar, mit dem *Senseprimer* 2f1 aus FR2 jedoch eine deutliche Bande. Um die Ursache für die fehlende Amplifizierbarkeit mit den *Senseprimern* aus FR3 zu analysieren, wurde das Amplifikat aufgereinigt und sequenziert. Durch Sequenzanalyse wurde ein 9 Basen langer Abschnitt identifiziert, der dem Mittelteil des Primers 3f1 entspricht. Da die Sequenz 5` und 3` vor diesem Abschnitt nicht derjenigen der restlichen Basen von 3f1 entspricht, konnten keine Primerbindung und auch keine Amplifikation erfolgen.

Die Sequenz ist in Abbildung 50 dargestellt.

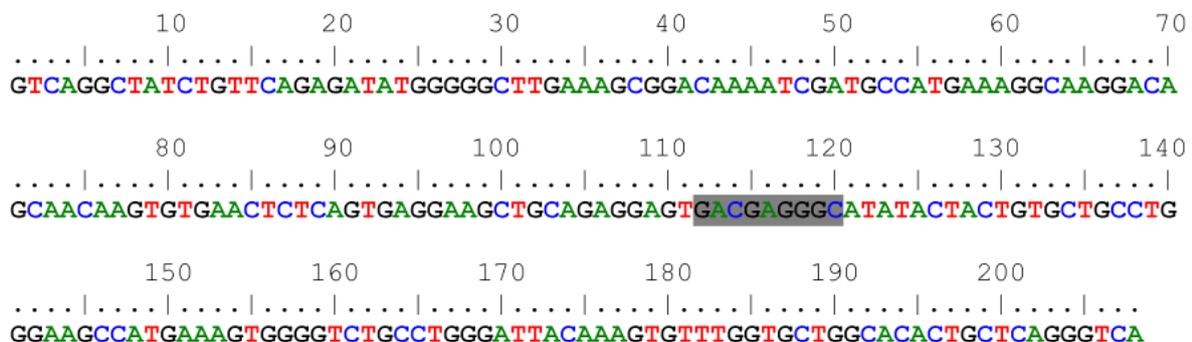


Abbildung 50: Sequenz des mit den Primern aus FR2 und FR4 amplifizierten Fragments von Fall T989/08 nach Sequenzierung mit dem *Senseprimer* 2f1. Grau unterlegt sind die vorhandenen Sequenzanteile von *Senseprimer* 3f1.

4.10.2 Klonierung der mit den modifizierten Primern erhaltenen Banden

Bei Amplifikation von Fall T989/08 mit den modifizierten Primern des Diagnostiksystems war eine schwach detektierbare Bande (Bande 2) reproduzierbar zu amplifizieren (s. Abb. 51), die ca. 40 bp unter der mit den ursprünglichen Primern amplifizierten starken Bande (Bande 1) lag. Nach Amplifikation mit den Primerkombinationen der einzelnen Subgruppen stellte sich heraus, dass beide Fragmente mit dem *Senseprimer* 2f1m und dem *Antisenseprimer* 4r1m amplifiziert wurden.

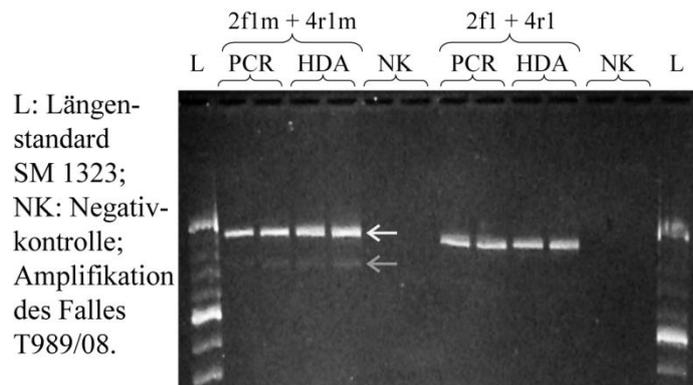


Abbildung 51: Vergleich der Amplifikation des Falles T989/08 mit den Primern 2f1m und 4r1m bzw. 2f1 und 4r1. Der obere Pfeil zeigt die Position von Bande 1 und der untere Pfeil diejenige von Bande 2 an. Der Größenunterschied der starken Banden, die mit den unterschiedlichen Primerpaaren amplifiziert wurden, ergibt sich daraus, dass das modifizierte Primerpaar 2f1m und 4r1m zusammen neun Basen länger ist.

Die beiden mit den modifizierten Primern detektierten Banden wurden nach PAGE aus dem Gel ausgeschnitten, kloniert und sequenziert.

Der Vergleich der Sequenzen der beiden Banden mit *ClustalW* zeigt, dass es sich hierbei um zwei unterschiedliche Klone handelte (s. Abb. 52).

zugeordnet. 5 Tumoren (4 %) wurden als *Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma*, 42 Tumoren (40 %) als *Extranodal/peripheral T-cell lymphoma* klassifiziert. 1 Tumor (1 %) war ein *Angiocentric lymphoma*, 27 Tumoren (25 %) waren *Intestinal T-cell lymphomas*. In den Abbildungen 95 bis 103 unter 9.2.4.1 sind die Histologie und Immunhistologie der einzelnen Typen dargestellt.

Abbildung 54 zeigt die Korrelation zwischen den Klonalitätsgruppen und der Klassifikation gemäß WHO. Aufgrund der großen Zahl der Typen lag nach Berechnung des Chi-Quadrat-Tests ein zu geringer Erwartungswert vor. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte daher mit dieser Methode nicht berechnet werden. Deshalb wurde der verallgemeinerte Test nach Fisher angewandt. Mit einem p-Wert von 0,48 lag keine statistische Signifikanz vor. Zusätzlich wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt, um zu überprüfen, ob zwischen den verschiedenen Einteilungen nach der WHO-Klassifikation ein Unterschied in Bezug auf die Klonalität besteht. Auch hierbei lag keine statistische Signifikanz vor ($p = 0,40$).

Die Tagebuchnummer, das Alter, die Rasse, das Geschlecht, das betroffene Gewebe, der FeLV-Status und die histologische Diagnose sind in Tabelle 21 unter 9.1.1 aufgelistet.

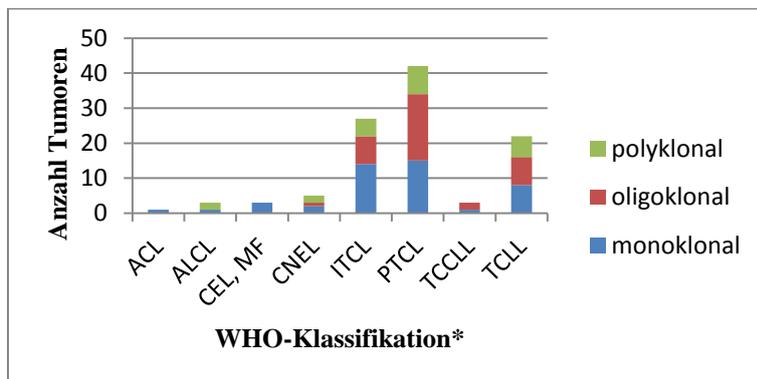


Abbildung 54: Korrelation zwischen dem Vorkommen der Klonalitätsgruppen und der Klassifikation gemäß WHO.

*ACL: *Angiocentric lymphoma*; ALCL: *Anaplastic large cell lymphoma*; CEL, MF: *Cutaneous epitheliotropic lymphoma, mycosis fungoides type*; CNEL: *Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma*; ITCL: *Intestinal T-cell lymphoma*; PTCL: *Extranodal/peripheral T-cell lymphoma*; TCCLL: *T-cell chronic lymphocytic lymphoma*; TCLL: *T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma*.

4.11.1.2 Bewertung der histologisch und immunhistologisch erhobenen Merkmale

Bei den T-Zell-Lymphosarkomen wurde histologisch und immunhistologisch der Nekrosegrad, die Zellreife, die Verteilung des immunhistologischen Signals des Antikörpers CD3 in den einzelnen Zellen sowie im Gewebeschnitt, die Reaktionsstärke und das Vorliegen nicht tumoröser Lymphozyten untersucht. Eine Übersicht ist in Tabelle 22 unter 9.1.1 dargestellt.

4. Ergebnisse

Die Auswertung wurde, wie in Tabelle 1 unter 3.2.2.5 aufgelistet, vorgenommen.

Abbildungen 55 bis 59 stellen die Assoziation dieser Parameter mit den Klonalitätsgruppen dar.

Mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman war kein Zusammenhang mit der Klonalität statistisch abzusichern (Nekrose: $r_s = -0,06$; $p = 0,51$; Zellreife: $r_s = -0,07$; $p = 0,49$; Verteilung des immunhistologischen Signals im Zytoplasma: $r_s = 0,02$; $p = 0,78$; Verteilung des immunhistologischen Signals im Gewebe: $r_s = -0,11$; $p = 0,27$; Reaktionsstärke des immunhistologischen Signals: $r_s = 0,12$; $p = 0,24$). Mittels multipler schrittweiser logistischer Regression wurde kein Einfluss auf die Klonalität festgestellt (s. Tab. 20 unter 4.11.1.4).

Bei Betrachtung des Nekrosegrades fällt jedoch auf, dass bei einem sehr starken Ausmaß an Nekrose fast ausschließlich monoklonale Ergebnisse auftreten (s. Abb. 55).

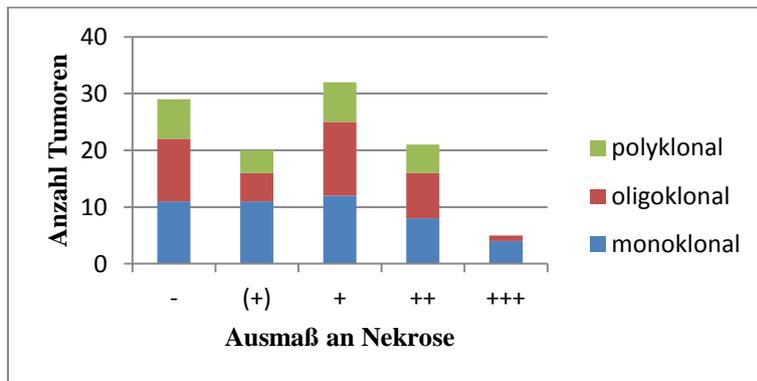


Abbildung 55: Assoziation des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit dem histologisch festgestellten Ausmaß an Nekrose.

64 % der Tumore bestanden aus Blasten (s. Abb. 56), was ein Anzeichen von Unreife darstellt. Bezogen auf die Klonalitätsgruppen ist die Verteilung relativ ausgewogen.

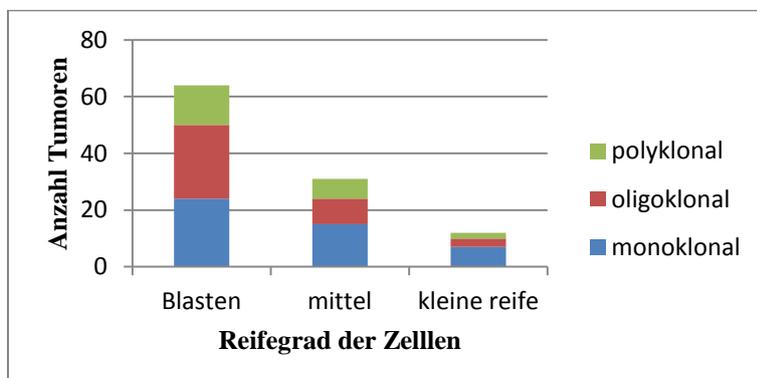


Abbildung 56: Assoziation des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit der histologisch festgestellten Zellreife.

4. Ergebnisse

Die diffuse Verteilung der immunhistologischen Reaktion des Antikörpers CD3 überwiegt mit 90 % (s. Abb. 57). Auch dies wird als ein Anzeichen von Unreife interpretiert und ist bei einem malignen Tumor zu erwarten.

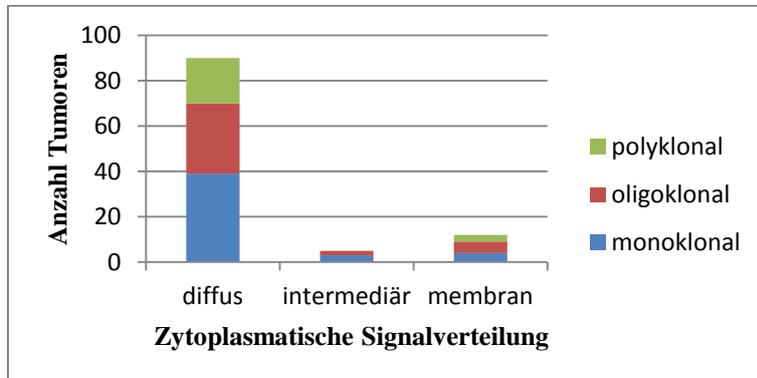


Abbildung 57: Zusammenhang des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit der immunhistologisch festgestellten Verteilung der immunhistologischen Reaktion des Antikörpers CD3 im Zytoplasma (membran= membranassoziiert).

Bei 8 % der Tumoren zeigte nur ein geringer Teil des Gewebeschnitts eine immunhistologische Reaktion (s. Abb. 58). Bei der überwiegenden Mehrheit reagiert über die Hälfte des Gewebeschnitts immunhistologisch.

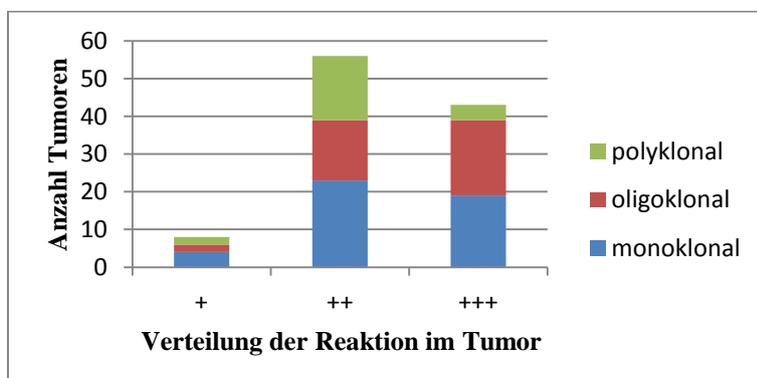


Abbildung 58: Assoziation des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit der immunhistologisch festgestellten Verteilung der Reaktion im Tumor (+: bis 30 %; ++: 30-60 %; +++: über 60 %).

90 % der Tumore zeigten eine mittlere Reaktionsstärke des Antikörpers CD3 (s. Abb. 59). Eine starke Reaktion trat häufig bei reifen Zellen auf, eine sehr schwache bei nicht differenzierten. Bezogen auf die Klonalitätsgruppen ergibt sich eine relativ gleichmäßige Verteilung.

4. Ergebnisse

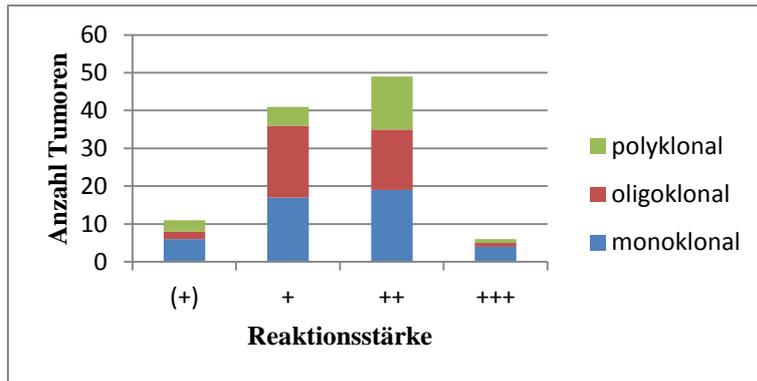


Abbildung 59: Assoziation des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit der immunhistologisch festgestellten Stärke der Reaktion des Antikörpers CD3.

Ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Klonalitätsgruppen und den reaktiven T- und B-Zellen wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman untersucht. Für beide Parameter ergab sich ein schwach positiver Zusammenhang (reaktive T-Zellen: $r_s=0,22$ bei $p=0,02$; reaktive B-Zellen: $r_s=0,33$ bei $p=0,0005$). Das bedeutet, dass bei steigender Zahl reaktiver Lymphozyten eher (bzw. im Mittel) ein oligoklonales bzw. polyklonales Ergebnis vorliegt. Des Weiteren wurde mit Hilfe der multiplen schrittweisen logistischen Regression ein Einfluss der reaktiven T- und B-Zellen bei Betrachtung des rohen Zusammenhangs festgestellt (s. Tab. 20 unter 4.11.1.4). Im zweiten Schritt wurde die Variable reaktive B-Zellen aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass im nächsten Schritt die Variable reaktive T-Zellen keinen signifikanten Einfluss mehr hat, nachdem die Variable reaktive B-Zellen bereits ins Modell aufgenommen wurde. Das heißt, dass ein Zusammenhang zwischen den reaktiven T- und B-Zellen besteht sowie zwischen diesen und der Klonalität. Abbildungen 60 und 61 stellen die Korrelation dieser Parameter mit den Klonalitätsgruppen dar.

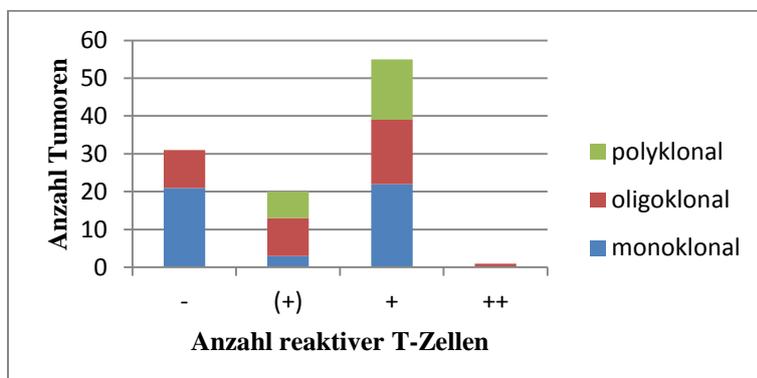


Abbildung 60: Korrelation des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit der histologisch und immunhistologisch festgestellten Anzahl an reaktiven T-Zellen.

4. Ergebnisse

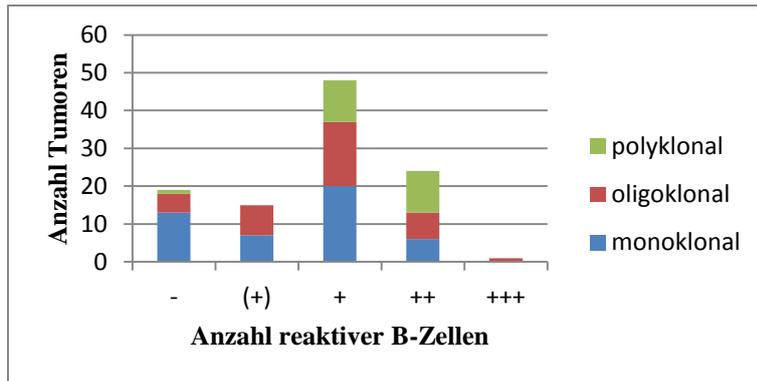


Abbildung 61: Korrelation des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit der histologisch und immunhistologisch festgestellten Anzahl an reaktiven B-Zellen.

4.11.1.3 Anamnestische Daten

4.11.1.3.1 FeLV-Status

Bei 41 (38 %) Katzen wiesen die T-Zell-Lymphosarkome eine positive und bei 66 (62 %) eine negative immunhistologische Reaktion auf FeLV auf. Von den FeLV-positiven Tumoren waren 14 (34 %) monoklonal, 15 (37 %) oligoklonal und 12 (29 %) polyklonal. Bei den FeLV-negativen Tumoren waren 32 (48 %) monoklonal, 23 (35 %) oligoklonal und 11 (17 %) polyklonal (s. Abb. 62).

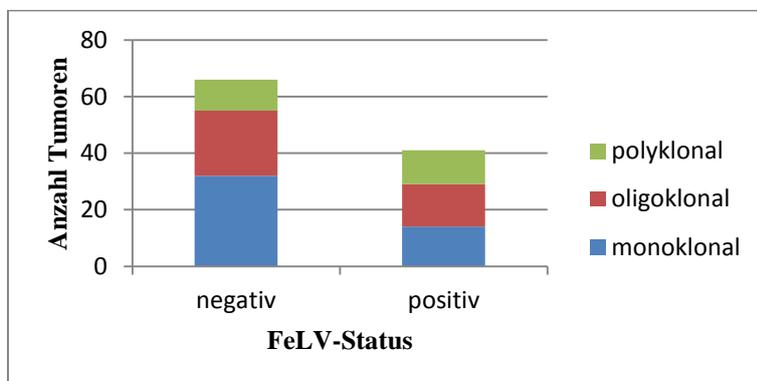


Abbildung 62: Zusammenhang des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit dem FeLV-Status.

Bei den polyklonalen Tumoren ist jeweils ca. die Hälfte FeLV-positiv, während der Prozentsatz bei den monoklonalen Tumoren bei 30% liegt (s. Abb. 63). Mittels verallgemeinertem exakten Test nach Fisher konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden ($p=0,23$). Bei Berücksichtigung der Rangordnung mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Test konnten ebenfalls keine statistische signifikanten Unterschiede ermittelt werden ($p=0,09$). Mit diesen zwei Testverfahren wurde geprüft, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Klonalitätsgruppen in Bezug auf den FeLV-Status vorliegt.

4. Ergebnisse

Da jedoch bei dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test eine Tendenz vorlag, wurde mit Hilfe der multiplen schrittweisen logistischen Regression überprüft, ob der FeLV-Status einen Einfluss auf die Klonalität bei Betrachtung des bereinigten Zusammenhangs hat. Der FeLV-Status wurde als zweite Variable nach den reaktiven B-Zellen mit einem P-Wert von 0,03 in das Modell aufgenommen. Somit wurde ein Einfluss auf die Klonalität bestätigt.

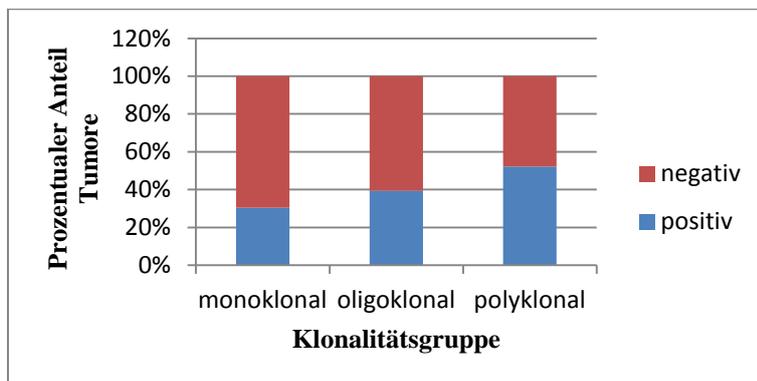


Abbildung 63: Prozentualer Anteil persistierend FeLV-positiver Tiere mit T-Zell-Lymphosarkomen der verschiedenen Klonalitätsgruppen (FeLV-Status: negativ/positiv).

4.11.1.3.2 Alter der Tiere

Die Tiere waren zwischen 2,5 Monaten und 19 Jahren alt. Zur besseren Übersicht wurden sie in Altersgruppen von 0-2, 3-10 und >10 Jahre eingeteilt. Da alle T-Zell-Lymphosarkome immunhistologisch auf das Vorliegen einer FeLV-Infektion getestet wurden, wurde diese Einteilung entsprechend einer Studie zur FeLV-Infektion bei Sektionskatzen gewählt (Suntz et al., 2010). FeLV-Infektionen treten vor allem bei jungen (0-2 Jahre) und mittelalten (3-10 Jahre), weniger bei alten (>10 Jahre) Katzen auf. 23 Tiere waren zwischen 0 und 2 Jahren alt, bei diesen waren 5 Tumoren (22 %) monoklonal, 10 (43 %) oligoklonal und 8 (35 %) polyklonal. 44 Tiere waren zwischen 3 und 10 Jahre alt, bei diesen waren 20 Tumoren (45 %) monoklonal, 16 (36 %) oligoklonal und 8 (18 %) polyklonal. 25 Tiere fielen in die Altersgruppe über 10 Jahre. Aus dieser Gruppe waren 14 Tumoren (56 %) monoklonal, 6 (24 %) oligoklonal und 5 (20 %) polyklonal. Bei 15 Tieren konnte kein Alter ermittelt werden (s. Abb. 64). Diese Tiere wurden daher bei der weiteren statistischen Aufarbeitung nicht berücksichtigt. In Abbildung 65 wird deutlich, dass in der Altersgruppe über 10 Jahre auffällig viele Tumoren ein monoklonales Ergebnis aufweisen, während der Anteil oligoklonaler Ergebnisse stark sinkt. Dies wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman überprüft. Um einen Informationsverlust bei der statistischen Aufarbeitung zu vermeiden, wurde hierbei mit dem Alter in Jahren und nicht mit den Altersgruppen gearbeitet. Es wurde ein schwacher negativer Zusammenhang nachgewiesen ($r_s = -0,314$ bei $p = 0,0002$).

4. Ergebnisse

Das heißt mit steigendem Alter liegen im Mittel eher monoklonale Ergebnisse vor. Der Einfluss des Alters auf die Klonalität unter Einbeziehung anderer Variablen wurde des Weiteren mit Hilfe der multiplen schrittweisen logistischen Regression untersucht. Das Alter wurde dabei als zweite Variable nach den reaktiven B-Zellen in das Modell aufgenommen (s. Tab. 20 unter 4.11.1.4). Dadurch wurde ein Einfluss auf die Klonalität bestätigt. Im nächsten Schritt der Berechnung hatte die Variable FeLV keinen signifikanten Einfluss, nachdem die Variable Alter bereits ins Modell aufgenommen wurde. Es besteht somit ein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem FeLV-Status.

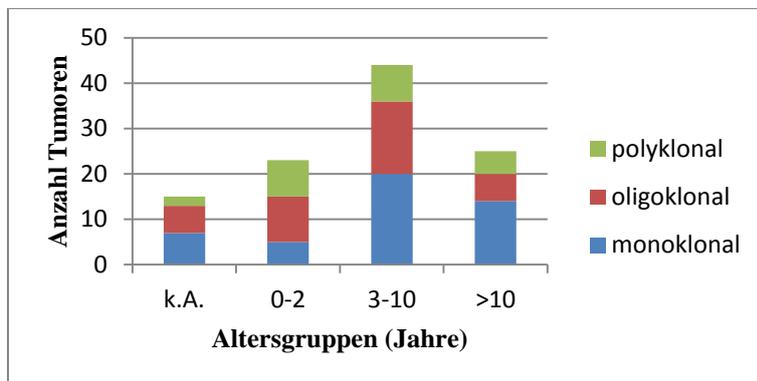


Abbildung 64: Vorkommen der Klonalitätsgruppen in den verschiedenen Altersgruppen (in Jahren, k.A. = keine Angabe).

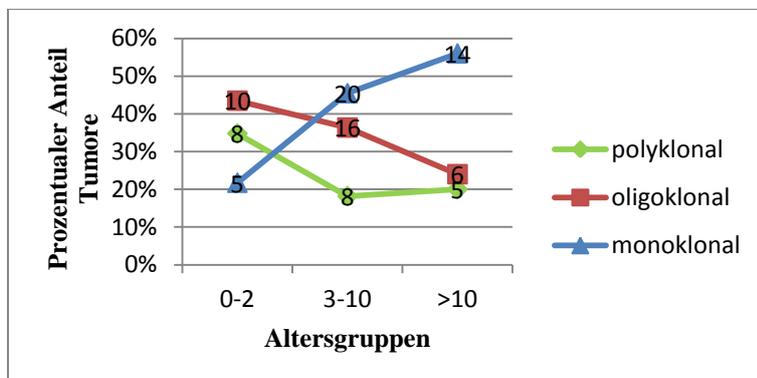


Abbildung 65: Prozentuale Verteilung der Klonalitätsgruppen nach Altersgruppen (in Jahren; Zahlen im Symbol = Anzahl Katzen).

Zum Vergleich des Alters mit dem FeLV-Status wurden die Katzen in Abbildung 66 zur besseren Übersicht wieder in die Altersgruppen eingeteilt. Für die statistische Auswertung wurde mit dem Alter in Jahren gearbeitet, um einen Informationsverlust zu vermeiden. Es wird deutlich, dass der Anteil FeLV-negativer Katzen im Alter von über 10 Jahren stark ansteigt und der FeLV-positiver stark abfällt. Somit besteht eine Korrelation zwischen Alter, FeLV-Status und Klonalität.

4. Ergebnisse

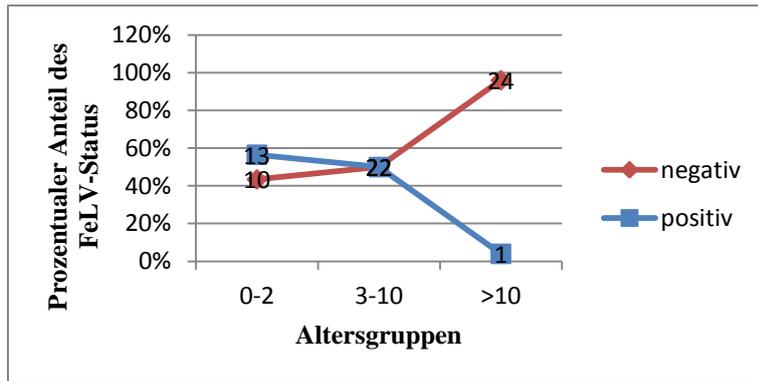


Abbildung 66: Prozentuale Verteilung der FeLV-negativen und -positiven Tumoren nach Altersgruppen (in Jahren; Zahlen im Symbol = Anzahl Katzen).

4.11.1.3.3 Geschlecht der Tiere

11 Tiere waren männlich. Davon wiesen 3 (28 %) einen monoklonalen, 4 (36 %) einen oligoklonalen und 4 (36 %) einen polyklonalen Tumor auf. 42 Tiere waren männlich kastriert. 20 Tumoren (48 %) dieser Tiere waren monoklonal, 13 (31 %) oligoklonal und 9 (21 %) polyklonal. 13 Tiere waren weiblich. 4 Tumoren (31 %) dieser Tiere wiesen ein monoklonales, 6 (46 %) ein oligoklonales und 3 (23 %) ein polyklonales Ergebnis auf. 29 Tiere waren weiblich kastriert. Davon zeigten 13 (45 %) monoklonale, 11 (38 %) oligoklonale und 5 (17 %) polyklonale Tumoren (s. Abb. 67). Bei 12 Tieren konnte das Geschlecht nicht ermittelt werden. Diese Tiere wurden daher bei der weiteren statistischen Aufarbeitung nicht berücksichtigt. Eine statistisch signifikante Beziehung zwischen den Klonalitätsgruppen und dem Geschlecht konnte mittels exaktem Test nach Fisher nicht nachgewiesen werden ($p=0,76$).

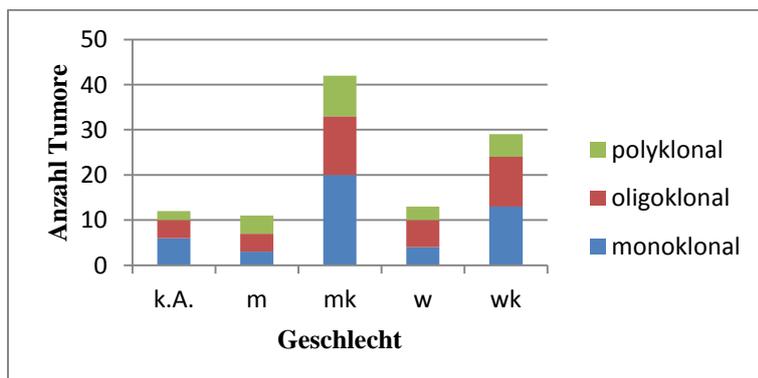


Abbildung 67: Korrelation des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit dem Geschlecht (k.A. = keine Angabe).

4.11.1.3.4 Rasse der Tiere

74 Tiere gehörten der Rasse Europäisch Kurzhaar an, 4 Katzen waren jeweils Perser oder Siamkatzen, 2 Katzen waren Domestic Longhair, 1 Katze gehörte jeweils der Rasse Maine Coon, Norwegische Waldkatze, Orientalisch Kurzhaar bzw. Russisch Blau an und bei 19 Katzen war die Rasse unbekannt. Letztere wurden daher bei der weiteren statistischen Aufarbeitung nicht berücksichtigt. Eine statistisch signifikante Beziehung zwischen den Klonalitätsgruppen und der Rasse konnte mittels exaktem Test nach Fisher nicht nachgewiesen werden ($p=0,63$).

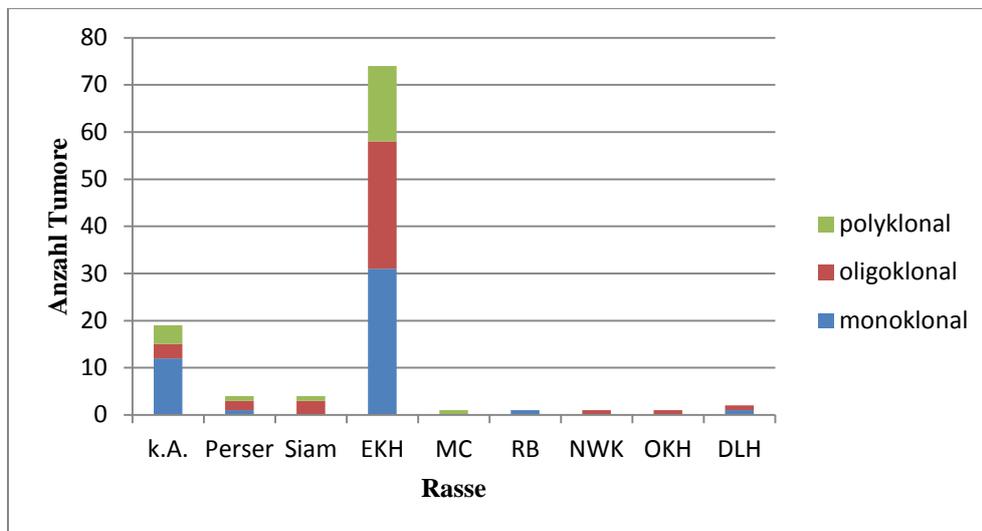


Abbildung 68: Korrelation des Vorkommens der Klonalitätsgruppen mit der Rasse (k.A. = keine Angabe, EKH = Europäisch Kurzhaar, MC = Maine Coon, RB = Russisch Blau, NWK = Norwegische Waldkatze, OKH = Orientalisch Kurzhaar, DLH = Domestic Longhair).

4.11.1.4 Untersuchung mittels logistischer Regression

Die multiple schrittweise logistische Regression wurde verwendet, um das Vorliegen eines Zusammenhangs zwischen der Klonalität und den nominalen oder ordinal skalierten Merkmalen sowie zwischen den Merkmalen untereinander zu überprüfen.

Das Vorgehen und die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

4. Ergebnisse

Tabelle 20: Anwendung der multiplen schrittweisen logistischen Regression.

Merkmal*	P-Wert	Veränderung		P-Wert	
		Aufnahme	Veränderung		
QuDNS	0,0861		0,1602		
Alter	0,0021		0,0002	Alter	0,0002
FeLV	0,0410		0,0116		0,3859
ZR	0,0600		0,0457		0,3240
Nekrose	0,7041		0,8753		0,7319
rT	0,0329		0,7392		0,6605
rB	0,0018	rB	0,0018		0,0001
Zytop.	0,9305		0,9484		0,7379
Stärke	0,8720		0,8189		0,9490
Vert.	0,8720		0,6645		0,9789

*QuDNS: Qualität der DNS; ZR: Zellreife; rT: Anzahl reaktiver T-Zellen; rB: Anzahl reaktiver B-Zellen; Zytop.: Verteilung der immunhistologischen Reaktion im Zytoplasma; Stärke: Stärke der immunhistologischen Reaktion; Vert.: Verteilung der immunhistologischen Reaktion im Tumor.

Im ersten Schritt wurden alle Merkmale einzeln der Klonalität gegenübergestellt. Die Merkmale mit $p \leq 0,05$ (Alter, FeLV, rT, rB) wiesen einen Zusammenhang auf. Im zweiten Schritt wurde das Merkmal mit dem kleinsten P-Wert (rB) in das Modell aufgenommen. Darauf wurde eine Veränderung der P-Werte der anderen Merkmale festgestellt. Als nächstes Merkmal wies das Alter den kleinsten P-Wert auf. Daher wurde das Alter als nächstes Merkmal in das Modell aufgenommen. Dies führte zur Beendigung des Verfahrens, da kein weiteres Merkmal einen P-Wert von unter 0,05 aufwies.

Es wurden insgesamt 107 Katzen untersucht. In Bezug auf die in Tabelle 20 dargestellten Merkmale wiesen 91 Katzen vollständige Angaben auf. Daher wurden zunächst nur diese mittels dieser Methode untersucht. Bei Untersuchung aller Merkmale (zusätzlich Rasse, Geschlecht, Organ, WHO) waren die Angaben nur bei 76 Katzen vollständig vorhanden. Bei Untersuchung dieser 76 Katzen mittels multipler schrittweiser logistischer Regression wurde lediglich rB in das Modell aufgenommen.

4.11.2 B-Zell-Lymphosarkome

4.11.2.1 Einteilung nach WHO-Klassifikation

20 Tumore zeigten eine für B-Zell-Lymphozyten spezifische immunhistologische Reaktion. Entsprechend der WHO-Kriterien wurden 3 Tumore (15 %) als *Follicular center cell lymphoma II* (s. Abb. 105 unter 9.2.4.2) klassifiziert, während die Mehrheit von 17 Tumoren

(85 %) dem *Diffuse large B-cell lymphoma* (s. Abb. 104 unter 9.2.4.2) zugeordnet werden konnte.

Die Tagebuchnummer, das Alter, die Rasse, das veränderte Gewebe, die histologische Diagnose und die Methode der DNS-Isolation sind in Tabelle 25 unter 9.1.2 dargestellt.

4.11.3 Polyklonales Kontrollgewebe

Bei allen 10 Lymphknoten wurde eine lymphatische Hyperplasie festgestellt; bei einer Probe (T9788/07-1) die Vorstufe eines Lymphosarkoms vermutet.

Der Thymus war bei allen 5 ausgewählten Katzen ohne besonderen Befund.

Bei einer Probe ließ sich der Darm aufgrund postmortalen Veränderungen nicht mehr beurteilen und war bei einer weiteren Probe ohne besonderen Befund. Bei einer anderen Probe wies der Darm eine lymphatische Hyperplasie und bei zwei Proben eine chronische Enteritis auf.

Die Tagebuchnummer, das Alter, die Rasse, das Geschlecht, das veränderte Gewebe, die histologische Diagnose und die Methode der DNS-Isolation sind in Tabelle 25 unter 9.1.2 dargestellt.

5 Diskussion

5.1. Ziel der Arbeit und Voraussetzungen

Ziel der Arbeit war es, eine molekularbiologische Methode zur Unterstützung der Diagnose morphologisch nicht eindeutig bestimmbarer T-Zell-Lymphosarkome zu entwickeln. Dafür wurden histologisch und immunhistologisch klassifizierte T-Zell-Lymphosarkome sowie Kontrollgewebe mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein klonal rearrangierter Gene des T-Zellrezeptor γ (TRG) untersucht. Als Voraussetzung hierfür mussten Primer generiert werden, die rearrangierte TRG detektieren.

5.1.1 Diagnostikprimer

Als Grundlage für die Auswahl der Primer für das diagnostische System dienten die von Weiss veröffentlichten Sequenzen der feline TRG (Weiss, 2008), da das Genom der Katze noch nicht vollständig analysiert ist. Das Vorkommen weiterer TRG kann daher nicht ausgeschlossen werden (Weiss et al., 2008; Weiss et al., 2010).

Da die Anlagerung des C-Gensegments an das VJ-Gensegment erst nach Transkription in RNS stattfindet (Rezuke et al., 1997) und die Diagnostik auch an in Formalin fixierten, paraffineingebetteten Proben möglich sein sollte, wurden die Primerbindungsstellen aus dem V- und J-Gensegment gewählt, so dass DNS als Template eingesetzt werden konnte. Hierdurch war die Amplifikation der CDR3 als Basis für die Bestimmung der Klonalität sichergestellt (Tonegawa, 1983) und es konnten Bereiche aufgefunden werden, deren Homologie den Einsatz von Konsensusprimern zuließ.

Diese Bereiche lagen im V-Gensegment in *framework region* (FR) 2 und FR3 für die *Senseprimer* und im J-Gensegment in FR4 für die *Antisenseprimer*.

In der FR2 wurde je ein Primer pro Subgruppe eingesetzt, ebenso wie in der FR3, jedoch musste hier für die dritte Variante der ersten Subgruppe ein zusätzlicher Primer generiert werden. Bei den *Antisenseprimern* wiederum erwies sich ein Primer pro Subgruppe als ausreichend. Diese wenigen Primer eigneten sich für den Einsatz in einer Multiplex-PCR, wobei für die *Senseprimer* aus den zwei FRs jeweils ein eigener Ansatz verwendet wurde.

Der Einsatz von *Senseprimern* in zwei verschiedenen FRs erhöht die Wahrscheinlichkeit, Amplifikate zu erhalten, falls in einem der FRs keine Bindung mit den Primern möglich ist (Bagg et al., 2002). Dies wurde in dem hier angewandten System bestätigt, da einige Proben PCR-Produkte nur mit den *Senseprimern* aus FR3, andere wiederum nur mit den *Senseprimern* aus FR2 aufwiesen (siehe beispielsweise Fall T989/08 unter 4.10.1).

5.1.2 Einteilungskriterien der Ergebnisse

Es wurden nur Banden ausgewertet, die innerhalb des erwarteten Größenbereichs lagen. Dieser betrug für die mit dem *Senseprimer* aus FR3 und dem *Antisenseprimer* aus FR4 amplifizierten PCR-Produkte 70-120 bp und für die mit dem *Senseprimer* aus FR2 und dem *Antisenseprimer* aus FR4 amplifizierten Produkte 250-290 bp (Weiss et al., 2008).

PCR-Produkte, die oberhalb des Referenzbereichs lagen, konnten als Heteroduplexstrukturen identifiziert werden (s. 5.1.3.1).

Die Amplifikationsmuster wurden nach einer Modifikation des Schemas von Hoeve (Hoeve et al., 2000) eingeteilt:

- Monoklonal monoallelisch

Eine scharf abgegrenzte, reproduzierbare Bande innerhalb des erwarteten Größenbereichs, entweder als einziges Produkt oder über einem Schmier als Hintergrund.

- Monoklonal biallelisch oder biklonal

Zwei scharf abgegrenzte, reproduzierbare Banden innerhalb des erwarteten Größenbereichs, entweder als einziges Produkt oder über einem Schmier als Hintergrund.

- Oligoklonal

Drei oder mehr scharf abgegrenzte, reproduzierbare Banden innerhalb des erwarteten Größenbereichs, entweder als einziges Produkt oder über einem Schmier als Hintergrund.

- Polyklonal

Ein Schmier oder eine Leiter von Banden innerhalb des erwarteten Größenbereichs oder kein Amplifikat.

- Pseudoklonal

Eine oder mehr scharf abgegrenzte, nicht reproduzierbare Banden (Werner et al., 2005).

5.1.3 Auftrennung der PCR-Produkte

Die TRG besitzen anders als die TRB, die TRD und die IGH keine D-Gensegmente und weisen daher nach der Rekombination nur eine N-Region zwischen dem V- und J-Gensegment auf, während die TRB, die TRD und die IGH zwei aufweisen (Coad et al., 1996, , 1997; Hayday et al., 1985; Lieber, 1991). Des Weiteren wurde bei den humanen TRG

eine limitierte Anzahl an V-, J- und C-Gensegmenten festgestellt, was zu einer geringeren junktionalen Diversität führt, im Gegensatz zu den TRA, die aus 100 V-Gensegmenten, 50-100 J-Gensegmenten und einem C-Gensegment aufgebaut sind (Coad et al., 1997; Lieber, 1991).

Die Struktur der TRG ist daher von Vorteil für das Generieren weniger Konsensusprimer zum Nachweis der verschiedenen Subgruppen (Lorenzen et al., 1994; Signoretti et al., 1999; Witzens et al., 1997). Es ergibt sich jedoch der Nachteil, dass falsch positive/klonale Ergebnisse bei einer ungenügenden Auflösung der PCR-Produkte erhalten werden können, wie dies bei der Auftrennung mittels Agarosegelen nachgewiesen wurde (Signoretti et al., 1999; Witzens et al., 1997). Dies ist auch der Grund, warum sich die TRG nicht für einen Einsatz beim Southern Blot eignet (Coad et al., 1997; Cossman et al., 1988; Greiner et al., 1995; Pelicci et al., 1985).

Es mussten daher Auftrennungsverfahren gefunden werden, die zum einen eine Auflösung eines Längenunterschieds von einer Base sicherstellen, zum anderen für den Einsatz in der Veterinärmedizin aufgrund relativ einfacher Handhabung und moderater Kosten geeignet sind.

Hierzu gehören die Heteroduplexanalyse von PCR-Produkten mit anschließender Auftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und die Auftrennung denaturierter PCR-Produkte mittels Sequenceranalyse.

5.1.3.1 Heteroduplexanalyse (HDA) und Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

5.1.3.1.1 Heteroduplexanalyse

Das Ziel der Heteroduplexanalyse ist es, das Vorliegen von Heteroduplexmolekülen aufzudecken. Diese können zu einer scheinbar vermehrten Anzahl von Banden im Referenzbereich führen (Langerak et al., 1997).

Das Prinzip besteht darin, PCR-Produkte zu denaturieren und anschließend kontrolliert abkühlen zu lassen (Offermans et al., 1995). Hierdurch erhält man eine klare Trennung von Homoduplexmolekülen, die aus zwei DNS-Strängen mit kongruenter, komplementärer Sequenz bestehen, und Heteroduplexmolekülen, die nur im Anfangs- und Endbereich identisch in Länge und Sequenz sind, sich aber in der Mitte unterscheiden. Dies führt zu einer veränderten Sekundärstruktur (s. Abb. 69), die sich in veränderten Laufeigenschaften auf einem Gel äußert (Bottaro et al., 1994; Offermans et al., 1995; van Dongen et al., 2003).

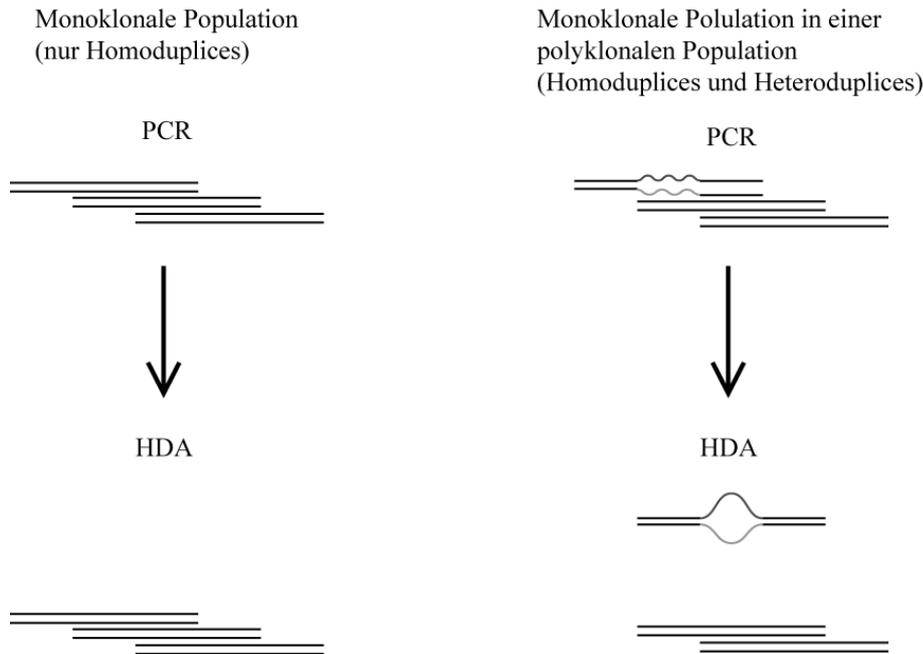


Abbildung 69: Schema der Heteroduplexanalyse bei Auftrennung der Produkte mittels PAGE.

Die Heteroduplexmoleküle können daraufhin identifiziert und von der Bewertung ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass sich Heteroduplexstrukturen bilden, wenn die Lymphozytenpopulation aus mehr als einem Klon besteht (Bottaro et al., 1994; van Dongen et al., 2003). Diese Methode ist besonders nützlich bei der Analyse von Genloci mit einer eingeschränkten junktionalen Diversität wie den TRG (van Dongen et al., 2003).

Bei dem angewandten Diagnostiksystem ergab die Heteroduplexanalyse zwei unterschiedliche Veränderungen der aufgetrennten PCR-Produkte.

Zum einen führte diese Technik zum Wegfall von Banden, die oberhalb des Referenzbereichs lagen. Durch Klonieren entsprechender Banden des Tumors T4219/05-2 konnte exemplarisch aufgezeigt werden, dass sich die Sequenzen potentiell zur Bildung von Heteroduplexstrukturen eignen, da sie sich in dem Mittelteil ihrer CDR3 in Länge und Sequenz unterscheiden, der Anfangs- und Endteil der CDR3 sowie der zwischen den Primerbindungsstellen liegende Anteil der FR3 und FR4 jedoch identisch ist (s. Abb. 41 unter 4.8.).

Zum anderen wurden die Banden innerhalb des Referenzbereichs deutlicher und besser voneinander abgegrenzt (s. Tumor T8472/05 und 761/93 unter 9.2.3.1, Abb. 79 und 82).

5.1.3.1.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Polyacrylamidgele sind in der Auflösung kleiner PCR-Produkte den Agarosegelen überlegen (Day and Humphries, 1994). Jedoch ist selbst bei der PAGE der Einsatz hoher Feldstärken

und Laufdauer notwendig, um eine ausreichende Auftrennung zu erhalten (Offermans et al., 1995).

Die bei dem Diagnostiksystem angewandte Feldstärke und Laufdauer wurde deshalb ausgewählt, weil bei einer geringeren Feldstärke keine vollständige Auftrennung der PCR-Produkte stattfand (s. 4.4.). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die bei dem bereits bestehenden System angewandte Feldstärke und Laufdauer bei oligoklonalen Populationen keine ausreichende Auflösung aufwies (s. Abb. 26 unter 4.4) (Moore et al., 2005). Bei den Heteroduplices (s. Abb. 26, weißer Pfeil), die sich oberhalb des Referenzbereichs befanden, konnte mit der geringeren Feldstärke und Laufdauer nur eine statt drei Banden detektiert werden. Hier kann man eine Auswirkung auf die Auftrennung der Produkte, die mit den *Senseprimern* aus FR2 amplifiziert wurden, ableiten. Da diese noch länger sind, ist eine noch geringere Auftrennung zu erwarten. Auch bei den Produkten, die mit den *Senseprimern* aus FR3 (s. Abb. 26, schwarzer Pfeil) amplifiziert wurden, konnten für die Interpretation wichtige Unterschiede in der Auflösung beobachtet werden. In diesem Fall wurden bei der geringeren Feldstärke und Laufdauer zwei Banden detektiert. Diese würden laut dem bereits bestehenden System als monoklonal biallelisch rearrangierte Population bezeichnet und somit dahingehend interpretiert werden, dass ein Tumor vorliegt (Moore et al., 2005). Durch die stärkere Auflösung wurde jedoch deutlich, dass es sich tatsächlich um eine oligoklonale Population handelt, da nun drei Banden detektiert wurden. Dies führte dazu, dass eine eindeutige Interpretation dieser Probe nicht mehr möglich war (s. 5.2.3).

5.1.3.2 Sequencer

Bei dieser Technik erfolgt die Auftrennung der PCR-Produkte ebenfalls mittels eines Polyacrylamidgels. Durch den Einsatz von Formamid, Harnstoff und hohen Temperaturen werden jedoch Bedingungen erzeugt, welche die im Vorfeld denaturierten PCR-Produkte in diesem Zustand bewahren (Goudie et al., 1990; Linke et al., 1997; Meier et al., 2001). Die Problematik der Heteroduplexbildung entfällt somit bei dieser Technik. Da nur entweder der *Sense-* oder der *Antisenseprimer* fluoreszenzmarkiert ist, wird jeweils nur ein Strang nachgewiesen (Linke et al., 1997; Meier et al., 2001).

Außerdem ist die Feldstärke um ein beinahe 10-faches höher als bei der PAGE. Daher kann die Laufdauer deutlich verkürzt werden (Goudie et al., 1990; van Dongen et al., 2003). Es werden Amplifikate klar erkannt, die sich in der Länge um nur eine Base unterscheiden (Witzens et al., 1997).

Bei der für dieses Diagnostiksystem angewandten Methode betrug die Laufzeit nur zwei Stunden, was eine Reduktion um sieben Stunden im Vergleich zu dem ursprünglich angewandten System darstellt.

Von Nachteil sind jedoch die höheren Kosten, die bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer und Größenmarker anfallen.

Bei Anwendung dieser Nachweismethode in der vorliegenden Studie fiel auf, dass bei einem hohen Prozentsatz der Proben (32 %) kein Amplifikat nachgewiesen werden konnte. Dies kann auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden.

Zum einen wurden die *Senseprimer* aus den FR2 und FR3, anders als bei den vorhergehenden Versuchen, gleichzeitig in der Multiplex-PCR eingesetzt, um die Zahl an benötigten Reaktionen zu verringern. Da die Bindungsaffinität des Primers 2f1m aufgrund der eingefügten Degenerationen schwächer ist als die der Primer 3f1m und 3f3m, ist es möglich, dass die *Antisenseprimer* vorwiegend Amplifikate mit den *Senseprimern* aus FR3 erzeugen. Bei den Proben, die in den vorhergehenden Versuchen mit den *Senseprimern* aus FR2 schwache Banden aufwiesen, erhält man hier daher keine Amplifikate.

Zum anderen wurde aufgrund der hohen Sensitivität des Sequencers die Zyklenzahl verringert, um eine zu starke Detektion des Hintergrunds zu vermeiden. Das kann jedoch dazu führen, dass bei Proben, die zuvor nur eine schwache Bande oder einen schwach sichtbaren Schmier gezeigt haben, kein Amplifikat mehr detektiert werden kann.

5.1.4 Auswirkungen der postmortalen Veränderungen und Fixationsprozesse

Da bei Einsatz von in Formalin fixiertem, paraffineingebettetem Material Veränderungen in der Integrität der isolierten DNS bekannt sind (Bagg et al., 2002; Ferrer et al., 2007; Meier et al., 2001), wurden mögliche Auswirkungen der postmortalen Veränderungen und der Fixation an unfixiertem Material überprüft (s. 4.7.).

Die schwerwiegendsten Veränderungen entstanden durch den Einbettungsprozess. Bei der Überprüfung der DNS-Integrität mittels Amplifikation von Kontrollfragmenten konnte bei den in Formalin fixierten, paraffineingebetteten Proben kein 300 bp-Kontrollfragment amplifiziert werden. Dies bedeutet, dass die DNS dieser Probe ungeeignet für den Einsatz der *Senseprimer* aus FR2 ist, da hierfür eine ausreichende Menge an Template mit einer Länge von mindestens 250 bp vorhanden sein muss.

Die in Äthanol fixierten Proben wiesen mit zunehmenden postmortalen Veränderungen ein immer schwächeres Amplifikat bei 300 bp auf. Dies ist auf die „natürlichen Zersetzungsprozesse“ der DNS zurückzuführen (Wyllie, 1980). Es wurde bei Amplifikation

mit den *Senseprimern* in FR2 statt der oligoklonalen Population eine monoklonale Population detektiert. Daraus ergeben sich erhebliche Auswirkungen auf den Einsatz in dem angewandten Diagnostiksystem, da dies zu falsch positiven Ergebnissen führt.

Bei der Fixation von Geweben in Formalin wird die Vernetzung der DNS mit Proteinen als hauptsächliches Hindernis bei der Isolation der DNS angesehen (Brutlag et al., 1969; Jackson, 1978; Williams et al., 1999). In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass bei in Formalin fixierten, aber uneingebetteten Proben DNS von ähnlicher Qualität gewonnen werden konnte wie bei unfixierten Proben.

Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

Der Einsatz des *Senseprimers* aus der FR3 ist für den Einsatz bei eingebettetem Material besser geeignet als der *Senseprimer* aus FR2. Bei guter Erhaltung nur weniger Klone aufgrund einer geringen DNS-Integrität kann das Bild einer reproduzierbar monoklonalen Population entstehen. Die DNS muss daher vor Einsatz in dem diagnostischen System auf ihre Integrität überprüft werden. Bei einer nicht ausreichenden Integrität kann die Klonalitätsanalyse mittels PCR nicht zuverlässig ausgewertet werden.

5.2. T-Zell-Lymphosarkome

5.2.1 Monoklonale monoallelische Populationen

22 % der histologisch und immunhistologisch als T-Zell-Lymphosarkom klassifizierten Proben wiesen eine Bande als Amplifikat auf. Dies wird als Hinweis auf das Vorliegen einer Neoplasie interpretiert (Goudie et al., 1990; Moore et al., 2005; Signoretti et al., 1999; Yu and Alaibac, 1996). Grundlage hierfür ist die Theorie der klonalen Evolution der Tumorzellpopulationen, die besagt, dass ein Tumor von einer einzelnen Ursprungszelle ausgeht (Nowell, 1976).

Das Vorliegen einer monoklonalen Population darf jedoch nicht ohne die makroskopischen, histologischen und immunhistologischen Ergebnisse als Neoplasie interpretiert werden.

Eine Ursache hierfür ist darin zu sehen, dass das Rearrangement der TRG nicht linienspezifisch ist. Es zeigen also auch B-Zell-Lymphosarkome klonale Rekombinationen (Trainor et al., 1991). Dieser als Linienpromiskuität bezeichnete Vorgang tritt je nach Studie bei 5 bis 75 % der humanen B-Zell-Lymphosarkome auf (Diss et al., 1995; Han et al., 2004; Meleshko et al., 2005; Pelicci et al., 1985; Theriault et al., 2000; Trainor et al., 1991).

Zum anderen kann durch entsprechende postmortale Veränderungen und Fixationsprozesse ein monoklonales Bild hervorgerufen werden (s. Abb. 40, N, unter 4.7.). Dieses Phänomen

wird auf eine abnehmende Anzahl an Zielsequenzen, bei denen die Integrität der DNA erhalten ist, zurückgeführt.

Des Weiteren existieren beim Mensch klinisch gutartige Proliferationen, die klonalen Ursprungs sind, wie z.B. die CD8+ T-Lymphozytose, gutartige monoklonale Gammopathien und gutartige kutane T-Zellproliferationen wie die lymphomatoide Papulose (van Dongen et al., 2003).

Die T-Zell-Lymphosarkome mit monoklonalem PCR-Ergebnis wurden entsprechend ihres histologischen und immunhistologischen Erscheinungsbildes sowie ihres monoklonalen Rearrangements in der PCR als *Anaplastic large cell lymphoma* (1), *Angiocentric lymphoma* (1), *Cutaneous epitheliotropic lymphoma, mycosis fungoides type* (1), *Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma* (1), *Intestinal T-cell lymphoma* (10), *Peripheral T-cell lymphoma* (6), *T-cell chronic lymphocytic lymphoma* (1) und *T-cell lymphoblastic lymphoma* (3) diagnostiziert.

5.2.2 Monoklonale biallelische bzw. biklonale Populationen

Bei 19 % der histologisch und immunhistologisch als T-Zell-Lymphosarkom klassifizierten Proben wurden nach PCR und Heteroduplexanalyse zwei Banden detektiert. Dies ist bei der Analyse der Klonalität sowohl bei B-Zell- als auch bei T-Zell-Lymphosarkomen ein häufig vorkommendes Ergebnis (Baumgartner et al., 2003; Lynas and Howe, 1998; Trainor et al., 1991; zur Stadt et al., 2001). In der überwiegenden Anzahl der Fälle wird es als Rearrangement beider Allele einer klonalen Population interpretiert (Henrich et al., 2009; Yagihara et al., 2007; Yu and Alaibac, 1996).

Als diploide Zellen sind Lymphozyten generell in der Lage, durch den Prozess des Rearrangements zwei rekombinierte Rezeptorgene an einem Genlokus zu erzeugen. Ursprünglich wurde angenommen, dass auch die T-Zell-Rezeptorgene dem allelischen Ausschluss unterworfen sind. Dieser vom Immunsystem entwickelte Mechanismus sollte eine effiziente Auswahl des Lymphozytenrepertoires und eine strenge Kontrolle der Lymphozytenspezifität sicherstellen (Uematsu et al., 1988).

Im Falle des TRA wurde jedoch nachgewiesen, dass beide Rezeptorgene ein offenes Leseraster einhalten können und die Zelle zwei Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren kann (Heath and Miller, 1993; Malissen et al., 1988). Die Rearrangements auf den verschiedenen Allelen können Gensegmente aus unterschiedlichen Subgruppen aufweisen (Malissen et al., 1988). Als Erklärung dafür, dass ein allelischer Ausschluss nicht zustande kommt, wurden zwei Hypothesen aufgestellt. Zum einen kann möglicherweise die Bildung

eines $\alpha\beta$ -Dimers mit der exprimierten α -Kette nicht erfolgen; daher rearrangierte das andere Allel. Zum anderen könnte die positive Selektion des gebildeten Dimers im Thymus fehlgeschlagen sein (Malissen et al., 1988). Letzteres wurde durch die Feststellung, dass die Transkription von RAG 1 und 2 erst nach der positiven Selektion eingestellt wird, unterstützt (Borgulya et al., 1992).

Auch bei den TRB konnte gezeigt werden, dass sie dem allelischen Ausschluss entgehen können und Lymphozyten vorliegen, die zwei β -Proteinketten auf der Oberfläche tragen. Als Ursache wurde entweder das synchrone Rearrangement beider Allele oder der Zugang des β -Lokus zu dem Rekombinase-Komplex zu einem ungewöhnlich späten Zeitpunkt in der Entwicklung vermutet (Davodeau et al., 1995).

Die Regulation des allelischen Ausschlusses der TRG ist beim Menschen ebenfalls ineffizient oder sogar nicht vorhanden (Davodeau et al., 1993). $\gamma\delta$ -T-Zellen, die zwei funktionale γ -Ketten auf ihrer Oberfläche exprimieren, kommen daher häufig vor. Bei der Maus jedoch ist der allelische Ausschluss effizienter und die überwiegende Mehrheit der T-Zellen besitzt nur eine γ -Kette auf der Oberfläche (Boucontet et al., 2005).

In Bezug auf die humanen TRD wurde nachgewiesen, dass ein Prozess des allelischen Ausschlusses stattfindet, da das zweite Allel jeweils nur ein unvollständiges Rearrangement zeigt (Couedel et al., 2004).

Aufgrund des inkompletten allelischen Ausschlusses ist es daher auch bei Tumoren grundsätzlich möglich, dass beide Allele der TRG rearrangiert sind, funktionell oder nicht funktionell.

Eine Interpretation von zwei Banden in einem Tumor als monoklonale biallelische Population ist daher mit der Einschränkung zulässig, dass eine solche Population mittels PCR nicht von einer biklonalen Population unterschieden werden kann. Der Nachweis der Biklonalität eines Lymphosarkoms ist möglich, indem die verschiedenen Klone mittels *Laser Capture Microdissection* isoliert, die PCR-Produkte sequenziert und auf verwandte klonale Rearrangements und Onkogene betreffende Rearrangements untersucht werden (Fend et al., 1999). Mit dieser Methode wurden bei B-Zell-Lymphosarkomen biklonale Populationen nachgewiesen, die jedoch nur selten vorkommen. Auch bei dem Fall einer *T-cell large granular leukemia* beim Mensch konnte mittels Nachweis von nicht verwandten Rearrangements und unterschiedlichen Phänotypen die Diagnose einer biklonalen Population gestellt werden (Prochorec-Sobieszek et al., 2008). Somit wird jedoch auch das Vorliegen einer biklonalen Population als Tumor interpretiert.

Eine eindeutige Interpretation von zwei verschiedenen langen PCR-Produkten bei einem Tumor ist daher nicht möglich. Die monoklonal biallelische Interpretation kann auf Grund der Vorkommenshäufigkeit jedoch bevorzugt werden. Die Tumoren mit einem Ergebnis von zwei Banden wurden daher der Gruppe der monoklonalen Tumoren zugeordnet.

Die T-Zell-Lymphosarkome, die in der PCR zwei Banden aufwiesen, wurden entsprechend ihres histologischen und immunhistologischen Erscheinungsbildes sowie ihres monoklonal biallelischen Rearrangements in der PCR als *Cutaneous epitheliotropic lymphoma, mycosis fungoides type* (2), *Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma* (1), *Intestinal T-cell lymphoma* (4), *Peripheral T-cell lymphoma* (9) und *T-cell lymphoblastic lymphoma* (5) diagnostiziert.

5.2.3 Oligoklonale Populationen

41 % der histologisch und immunhistologisch als T-Zell-Lymphosarkom klassifizierten Proben wiesen drei bis sieben reproduzierbare Banden auf. Dieser Prozentsatz liegt deutlich höher als bei den meisten bisherigen Studien (Han et al., 2004; Linke et al., 1997; Meleshko et al., 2005; Shah et al., 2009). Lediglich bei der akuten lymphoblastischen Leukämie des Menschen wurde 20 bis 30 % Oligoklonalität nachgewiesen (Moreira et al., 2001).

Bei einem oligoklonalen Ergebnis ist mittels PCR keine eindeutige Aussage im Hinblick darauf zu treffen, ob es sich um neoplastische oder reaktive T-Zellpopulationen handelt.

– Argumente für einen Tumor

Die Analyse von Tumoren stellt meist eine Momentaufnahme dar; der ursprüngliche Zustand bei Entstehung des Tumors kann nicht mehr nachvollzogen werden (Heim et al., 1988). Tumore können zum Untersuchungszeitpunkt extensive genetische Veränderungen erfahren haben und eine Auswahl von Subklonen kann erfolgt sein (Wainscoat and Fey, 1990).

Eine mögliche Ursache der Oligoklonalität ist die sogenannte genetische Divergenz von Tumoren (Heim et al., 1988). Dies wird durch die Hypothese der klonalen Evolution von Peter Nowell begründet (Nowell, 1976). Das entsprechende Modell zeigt, dass sich aus einer ursprünglich monoklonalen Tumorphosphonpopulation aufgrund ihrer genetischen Instabilität und des Selektionsdrucks Subklone entwickeln. Von diesen besitzen wiederum einige wenige Selektionsvorteile und bilden ihrerseits Subpopulationen.

Als Mechanismen kommen bei Lymphosarkomen eine erhaltene Rekombinase-Aktivität, wobei biologisch verwandte Klone entstehen würden, oder ein Ersatz von V-Gensegmenten in Frage (de Haas et al., 2001; Moreira et al., 2001).

Durch experimentelle Infektion von Katzen mit FeLV wurden klonale, jedoch auch oligoklonale T-Zell-Lymphosarkome hervorgerufen (Onions et al., 1987). Die Oligoklonalität nach Infektion mit onkogenen Viren ist zu erwarten, da viele Zellen gleichzeitig infiziert werden und daher einige eine maligne Transformation erleben können (O'Keefe et al., 2004).

Mit Hilfe der multiplen schrittweisen logistischen Regression wurde bei den in dieser Studie untersuchten Tumoren statistisch nachgewiesen, dass ein Zusammenhang zwischen dem FeLV-Status und der Klonalität besteht. Bei Vorliegen von monoklonalen Tumoren waren die Tiere eher FeLV-negativ, während die FeLV-positiven Tiere eher oligo- und polyklonale Tumore aufwiesen. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem FeLV-Status ermittelt. Ältere Tiere waren eher FeLV-negativ. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (Englert et al., 2012; Jackson et al., 1993).

In der Humanmedizin kommt Oligoklonalität bei Kindern vor, die an akuten lymphoblastischen Leukämien erkrankt sind. Es wurde eine Veränderung in der Intensität der einzelnen Subklone sowie das Auftreten scheinbar neuer Subklone nach Chemotherapie und bei anschließenden Rückfällen beobachtet (de Haas et al., 2001). Daraus folgerte man, dass Faktoren, die klonale Diversität fördern, zu einem aggressiveren Phänotyp führen. Dafür spricht auch, dass eine genetische Instabilität mit dem Vorhandensein von Blasten assoziiert wurde (Moreira et al., 2001).

Auch bei dem angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphosarkom beim Mensch, einer aggressiven Tumorform, wurden oligoklonale Populationen nachgewiesen (Shah et al., 2009). Mittels der diagnostisch angewandten PCR ist kein Einzelzellursprung einer oligoklonalen Population nachweisbar. Dieser kann jedoch über Chromosomenanalyse erfolgen. Wenn die verschiedenen Klone jeweils eine identische Mutation, wie Translokationen oder Punktmutationen, aufweisen, ist ein Einzelzellursprung wahrscheinlich (Wainscoat and Fey, 1990).

Ein Vorliegen von Subklonen ist auch anzunehmen, wenn durch Sequenzierung nachgewiesen werden kann, dass identische Gensegmente rearrangiert sind und sich die CDR3 nur wenig unterscheidet (Linke et al., 1997).

Bei Fall 761/93 wurden exemplarisch für die oligoklonalen Fälle alle aufgetretenen Banden kloniert und sequenziert (s. 4.9.1). Vergleicht man die Sequenzen, so zeigt sich, dass die Unterschiede der Sequenz der CDR3 vor allem zwischen den Banden A und B sowie C und D nur gering sind (s. Abb. 45-47 unter 4.9.1). Hier ist eine Entstehung von Subklonen als Ursache der oligoklonalen Population theoretisch möglich. Dies macht auch der Vergleich der Sequenzen in einem phylogenetischen Diagramm deutlich (s. Abb. 70).



Abbildung 70: Phylogenetisches Diagramm der Klone von Fall 761/93 zur Klärung der Divergenz. Erstellt durch das Programm *ClustalW*.

Noch deutlicher wird dies beim Vergleich mit weiteren Sequenzen von T-Zellklonen (s. Abb. 71). Das phylogenetische Diagramm lässt den Schluss zu, dass die Klone 93-761-A und -B sowie 93-761-C und -D jeweils von einem gemeinsamen Klon abstammen könnten.

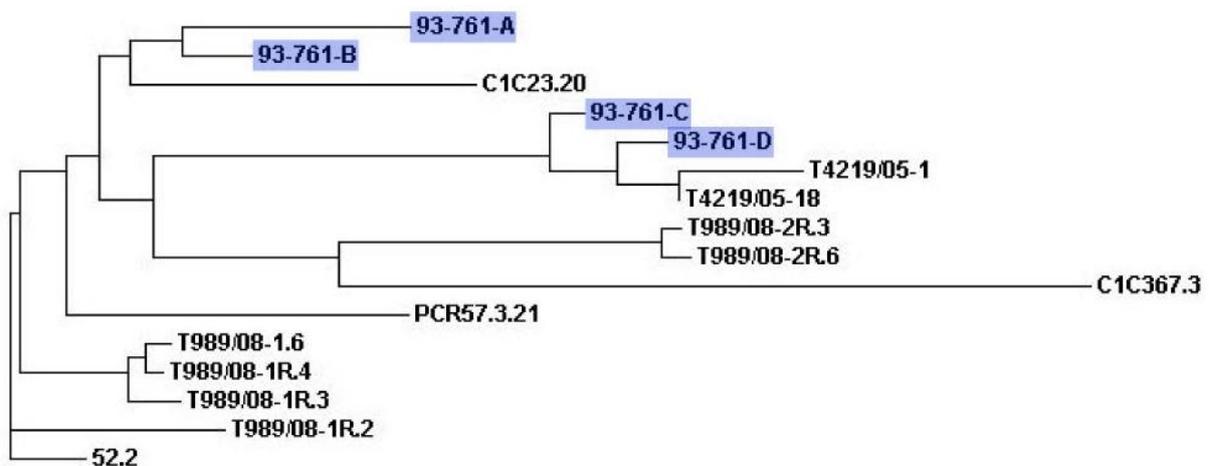


Abbildung 71: Phylogenetisches Diagramm der Klone von Fall 761/93 im Vergleich mit Klonen von Fall T4219/05-2 und T989/08 sowie mit Klonen zur Identifizierung der Sequenz des TRG (Weiss et al., 2008). Erstellt durch das Programm *ClustalW*.

Weiterhin zeigt dieses Ergebnis, dass tatsächlich jede Bande einen eigenen Klon darstellt und der hohe Prozentsatz oligoklonaler Ergebnisse nicht auf dem Vorliegen artifizieller Banden (Heteroduplices, Pseudoklonalität) beruht.

Zwei weitere Untersuchungsergebnisse dieser Studie sprechen dafür, dass unterschiedliche Klone vorliegen. Zum einen wiesen bei Amplifikation der verschiedenen Subgruppen (s. Tab. 22 unter 9.1.1) 30 Proben Amplifikate in mehreren Subgruppen auf. Zum anderen blieb der Prozentsatz oligoklonaler Proben bei Analyse mittels Sequencer gleich. Da hier Einzelstränge aufgrund ihrer Länge aufgetrennt werden, kann das Vorliegen von Heteroduplexstrukturen ausgeschlossen werden.

Oligoklonalität kann auch erklärt werden, wenn die hypothetische Organisation des felines TRG-Locus in Clustern betrachtet wird (Weiss, 2008). Es ist theoretisch denkbar, dass innerhalb mehrerer Cluster gleichzeitig ein Rearrangement, z.B. aufgrund einer erhaltenen Rekombinaseaktivität, auftritt.

Dafür spricht, dass in der für die einzelnen Subgruppen spezifischen PCR bei allen Proben, die Amplifikate in mehreren Subgruppenkombinationen aufwiesen (30), das Rearrangement tatsächlich innerhalb mehrerer der theoretischen Cluster stattfand (s. Tab. 22 unter 9.1.1). Diese Auswertung ist jedoch mit der Einschränkung zu betrachten, dass nur die Kombination verschiedener Subgruppen und nicht der einzelnen Varianten detektiert werden konnte. Beim Rind, bei dem der TRG-Locus ebenfalls in Clustern organisiert ist, wurde durch RNA-Analyse der TRG zweier Rinder nachgewiesen, dass alle VJC-Kombinationen bis auf eine innerhalb der Cluster stattfinden (Herzig et al., 2006).

Schaf und Rind besitzen des Weiteren zwei TRG-Loci, die getrennt voneinander auf dem selben Chromosom liegen (Miccoli et al., 2003). Es wurde vermutet, dass die Koordination der Expression durch ein für die Entwicklung spezifisches Muster gewährleistet wird. Falls die Katze ebenfalls zwei Loci besitzt und die Koordination der Expression im Tumor ausgeschaltet ist, würde die Möglichkeit, dass Rearrangements simultan in beiden Loci auftreten, bestehen.

– Argumente für einen reaktiven Prozess

Es wurde bereits nachgewiesen, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten klonale und oligoklonale T-Zellpopulationen aufweisen können. Bei Plattenepithelkarzinomen zeigten die infiltrierenden T-Lymphozyten klonale Expansionen, was auf eine antigenbedingte Selektion der T-Zellen, die eine Tumor-spezifische Zytotoxizität aufweisen, zurückgeführt wurde (Caignard et al., 1994). Oligoklonale T-Zellpopulationen wurden auch im Zusammenhang mit Melanomen nachgewiesen (Puisieux et al., 1994).

In der hier vorgelegten Studie wurden die Tumore mittels Histologie und Immunhistologie voruntersucht. Bei zahlreichen Tumoren wurden morphologisch und immunhistologisch reaktive Lymphozyten festgestellt. Während die Unterscheidung der reaktiven von den neoplastischen Lymphozyten bei den B-Zellen mittels Anwendung der Immunhistologie durch einen positiven Nachweis von CD45R recht einfach ist, kann eine Unterscheidung bei den T-Zellen nur erfolgen, falls es sich bei den Tumorzellen morphologisch um Blasten handelt. Bei vielen intestinalen T-Zell-Lymphosarkomen ist das z.B. nicht der Fall, sondern es handelt sich um kleine, reife, neoplastische Lymphozyten.

In den Fällen, in denen reaktive Lymphozyten nachgewiesen werden konnten, wurde mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und der multiplen schrittweisen logistischen Regression ein Zusammenhang zwischen den reaktiven Zellen und der Klonalität

nachgewiesen. Bei durch Morphologie und Immunhistologie bestimmter steigender Zahl reaktiver Zellen lag eher ein oligo- bzw. polyklonales Ergebnis vor.

Dies kann entweder dahingehend interpretiert werden, dass eine eigentlich monoklonale Tumorphosphopulation aufgrund der Anwesenheit reaktiver Lymphozyten verdeckt wird, oder dass oligo- und polyklonale Tumore stärker immunologisch angegriffen werden. Hierbei könnte ein Zusammenhang mit einer FeLV-Infektion bestehen, da dieser Faktor auch mit dem Auftreten oligo- bzw. polyklonaler Tumore in Verbindung steht.

Klonale T-Zellpopulationen zeigten auch Patienten mit Autoimmunerkrankungen bei Analyse der TRG (Witzens et al., 1997).

Des Weiteren gibt es oligoklonale $\alpha\beta$ -T-Zellpopulationen bei humanen intestinalen intraepithelialen Lymphozyten (Balk et al., 1991; Van Kerckhove et al., 1992). Es wurde vermutet, dass ihr Ligand bei Entzündungen, Infektionen und maligner Transformation exprimiert wird.

Oligoklonale T-Zellpopulationen wurden auch im peripheren Blut von klinisch gesunden, über 65 Jahre alten Menschen, nachgewiesen (Posnett et al., 1994). Diese Populationen blieben über einen längeren Zeitraum bestehen und wiesen keine Anzeichen einer malignen Transformation auf. Man nimmt an, dass diese Klone entweder durch einen wiederholten Kontakt mit bestimmten Antigenen entstanden sind oder dass es sich um autoreaktive Zellen handelt (Posnett et al., 1994).

Auch bei erwachsenen Menschen wurde eine deutliche klonale Dominanz weniger TCR-Transkripte festgestellt (Hingorani et al., 1993). In einem Fall führte man dies auf eine kurz zuvor erfolgte Immunisierung zurück, bei den anderen Fällen vermutete man eine Interaktion mit Umweltfaktoren. Dies wird dadurch bekräftigt, dass eine solche Dominanz im Nabelschnurblut von Säuglingen nicht nachgewiesen werden konnte (Hingorani et al., 1993).

Bereits bei klinisch gesunden Kindern wurden oligoklonale T-Zellpopulationen im peripheren Blut gefunden, die über einen gewissen Zeitraum stabil blieben (Wedderburn et al., 2001). Hier wurde vermutet, dass diese klonalen Expansionen infolge chronischer viraler Infektionen entstehen.

In der hier vorgelegten Studie wiesen drei reaktive Veränderungen bzw. Gewebe ohne Veränderung oligoklonale Populationen auf (s. Abb. 28 unter 4.5.3). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der statistischen Auswertung kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass bei einigen der untersuchten Tumoren ein Teil der aufgetretenen Banden auf reaktive T-Zellpopulationen zurückzuführen ist und dadurch ein monoklonales Ergebnis überdeckt werden kann.

– Definition Oligoklonal

Die durch Hoeve aufgestellte Definition von drei oder mehr Banden als oligoklonal (Hoeve et al., 2000) wurde bei der Katze eingeschränkt auf drei bis fünf Banden (Moore et al., 2005). Dies wurde jedoch nicht begründet und es wurde auch keine Definition für den Fall von sechs oder mehr reproduzierbaren Banden aufgestellt.

Eine Interpretation der Proben als oligoklonal, die drei bis sieben Banden als Ergebnis aufzeigten, kann dennoch als gerechtfertigt angesehen werden, solange das Ergebnis reproduzierbar ist. Hierbei ist nämlich zu beachten, dass die tatsächliche Anzahl an Klonen bei einem oligoklonalen Muster nach Multiplex-PCR nicht zweifelsfrei zu bestimmen ist.

Wenn bei einem Tumor zwei Banden als Ergebnis auftreten, wird meist ein monoklonales, biallelisches Rearrangement angenommen (Henrich et al., 2009; Yagihara et al., 2007; Yu and Alaibac, 1996). Genauso besteht bei einem oligoklonalen Tumor die Möglichkeit, dass mehrere Klone Rearrangements auf beiden Allelen zeigen. So können beispielsweise bei Nachweis von vier Banden in einem Tumor vier verschiedene Klone vorliegen. Genauso ist es jedoch denkbar, dass zwei Klone vorliegen, die jeweils beide Allele rearrangiert haben.

– Bandenstärke

Teilweise wurde auch die Bandenstärke als Interpretationskriterium angeführt. Es wurden nur Banden, die die gleiche Intensität aufwiesen, in die Bewertung aufgenommen (Lorenzen et al., 1994).

Gegen dieses Bewertungskriterium spricht, dass die Intensität der erhaltenen Banden von der Sequenzhomologie mit den eingesetzten Primern und damit der Bindungsaffinität zu ihnen abhängt (Mitsuhashi, 1996a, 1996b). Gerade durch den Einsatz von subgruppenspezifischen Primern ist es möglich, dass weniger häufig vorkommende (Trainor et al., 1991; van Dongen et al., 2003) oder bei der Katze auch nicht bekannte Subgruppen leichte Unterschiede in ihrer Nukleotidzusammensetzung zu den Primern aufweisen und daher schwächer amplifiziert werden.

Dies ist auch die Ursache für die Amplifikation einer zweiten Bande bei Fall T989/08 nach Modifikation der Primer (s. 4.10.2). Beim Vergleich der Sequenz der unteren Bande mit der des ursprünglichen Primers 2f1 und des modifizierten Primers 2f1m mit Hilfe des Programms *ClustalW* wurde festgestellt, dass der Primer 2f1 sich in der 5'-Region von der Sequenz des Klons unterschied. Die Verlängerung des Primers 2f1m am 5'-Ende führte dazu, dass er in dieser Region der Sequenz des Klons gleich und dieser amplifiziert wurde.

Des Weiteren wurde gerade eine unterschiedliche Intensität, wenn sie als unterschiedliches Mengenverhältnis der Klone interpretiert wurde, als Argument für die Entstehung von Subklonen aus einer bereits bestehenden klonalen Population und damit für das Vorliegen einer Oligoklonalität verwendet (Moreira et al., 2001).

Grundsätzlich kann bei Anwendung einer konventionellen PCR (End-Point-PCR) nur eine qualitative Aussage getroffen werden. Um die PCR-Produkte zu quantifizieren, ist die Durchführung einer quantitativen PCR nötig.

– Überprüfung einer Artefaktbildung

Es ist aufgrund der hohen Sensitivität der PCR nicht auszuschließen, dass bei Vorliegen einer sehr geringen Zahl polyklonaler T-Zellen, entweder aufgrund geringer Probengröße oder starker Verdünnung der Proben, ein pseudomono- oder -oligoklonales Ergebnis erzielt wird (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Hoeve et al., 2000; van Dongen et al., 2003). Dies wird auf die begünstigte Amplifikation der nur eingeschränkt vorhandenen Zielsequenzen zurückgeführt. Mit Hilfe einer Analyse von Doppelansätzen kann jedoch überprüft werden, ob das Ergebnis reproduzierbar ist.

Da in dieser Studie alle Proben im Doppelansatz analysiert wurden und die oligoklonalen Fälle gleichbleibende, reproduzierbare Banden aufwiesen, sind pseudooligoklonale Ergebnisse sehr unwahrscheinlich.

Bei den oligoklonalen Proben war aufgrund der PCR keine eindeutige Zuordnung zu einer neoplastischen oder einer reaktiven Veränderung möglich. Im Zusammenhang mit ihrem histologischen und immunhistologischen Erscheinungsbild wurden sie als *Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma* (1), *Intestinal T-cell lymphoma* (8), *Peripheral T-cell lymphoma* (19), *T-cell chronic lymphocytic lymphoma* (2) und *T-cell lymphoblastic lymphoma* (8) diagnostiziert.

5.2.4 Polyklonale Populationen

Bei 18 % der histologisch und immunhistologisch als T-Zell-Lymphosarkom klassifizierten Proben konnte lediglich ein Schmier – entstanden durch eine Infiltration polyklonaler Lymphozyten (McCarthy et al., 1992) – oder auch gar kein Produkt amplifiziert werden.

Bei einem morphologisch und immunhistologisch eindeutig diagnostizierten T-Zell-Lymphosarkom kann dieses falsch negative Ergebnis verschiedene Ursachen haben.

Zum einen ist es denkbar bzw. sogar wahrscheinlich, dass die Transkripte, welche die Basis für die Generierung der Primer bilden, nicht alle existierenden V- und J-Gensegmente des TRG repräsentieren (Lorenzen et al., 1994). Die Primer wären daher von vorneherein nicht in der Lage, alle klonal rearrangierten TRG zu amplifizieren (Weiss et al., 2008; Weiss et al., 2010).

Auch der Einsatz von subgruppenspezifischen Primern spielt hierbei möglicherweise eine Rolle, denn sie zeigen nicht die gleiche Homologie zu allen Gensegmenten (Trainor et al., 1991; van Dongen et al., 2003). Dies kann zum einen, wie unter 5.2.3 beschrieben, zu einer unterschiedlich starken Amplifikation einzelner Varianten, zum anderen aber auch zu falsch negativen Ergebnissen führen, falls die Amplifikation gänzlich misslingt.

Zum anderen können Translokationen, Inversionen oder Deletionen in den Primerbindungsstellen aufgetreten sein, die diese so stark verändert haben, dass keine Bindung durch die Primer mehr möglich ist (Trainor et al., 1991; Wu et al., 1995).

Dies wurde bei Fall T989/08 nachgewiesen. Nur mit den *Senseprimern* aus FR2, jedoch nicht mit denen aus FR3, war ein Amplifikat zu erzielen (s. 4.10.1). Nach Sequenzierung des Amplifikats konnte im Bereich der FR3 lediglich ein neun Basen messender Sequenzanteil des entsprechenden Primers nachgewiesen werden, wodurch keine adäquate Bindung mehr möglich war.

Mutationen speziell in der FR3 kommen unter anderem aufgrund somatischer Hypermutationen vor; ein Prozess, der bislang nur bei den Immunglobulinen nachgewiesen wurde und zu einer besseren Antigenerkennung führen soll (McCarthy, 1997). Hierbei handelt es sich jedoch um Punktmutationen. Daher trifft dieser Prozess als Ursache für die Mutation bei Fall T989/08 sehr wahrscheinlich nicht zu.

Des Weiteren liegen die TRG bei Mensch und Maus bei der Mehrzahl, jedoch nicht bei allen $\alpha\beta$ -T-Zellen, rearrangiert vor (Chien et al., 1984; Coad et al., 1997; Ferrero et al., 2006; Heilig and Tonegawa, 1987; Theodorou et al., 1994). Dies bedeutet, dass auch T-Zellen ohne rearrangierte TRG vorkommen, und somit eine systemimmanente Rate an falsch negativen Ergebnissen erwartet werden muss. Dies kann durch eine gleichzeitige Analyse der TRG und der TRB umgangen werden, wie es beim Mensch in einigen Studien durchgeführt wurde (Diss et al., 1995; McCarthy et al., 1992; Theodorou et al., 1994; van Dongen et al., 2003; Witzens et al., 1997).

Als weitere mögliche Ursache für das Vorliegen eines polyklonalen Ergebnisses wurde das Auftreten von Transrearrangements bei Lymphozyten gesunder Menschen und bei Menschen, die unter Ataxie-Teleangiektasie leiden, nachgewiesen (Lipkowitz et al., 1990). Das

V-Gensegment der TRG rearrangierte mit dem J-Gensegment der TRB. Dies kann durch den zeitlich nahen Ablauf der Rekombination beider Rezeptorgene zustande kommen (Strominger, 1989). Denkbar sind daher auch Transrearrangements zwischen den TRG und den TRD (Lorenzen et al., 1994).

Außerdem kommt als Erklärung eine Proliferation von sehr unreifen Lymphozyten in Betracht, bei denen sich die TRG noch in der Keimbahnkonfiguration befinden (Signoretti et al., 1999; Theodorou et al., 1996; Weiss et al., 1988). Ein entsprechender Fall wurde bei einem Menschen mit chronischer prolymphoider Leukämie nachgewiesen (Lima et al., 1994). Die Tumorzellen zeigten einen sehr unreifen Phänotyp mit einer Expression von zytoplasmatischem CD3, CD34 und CD38 und es konnte kein Rearrangement festgestellt werden. Man untersuchte jedoch nur die TRB. Weitere entsprechende Fälle wurden bei peripheren T-Zell-Lymphosarkomen nachgewiesen, bei denen dies teilweise auf einen unreifen Phänotyp zurückzuführen war (Gaulard et al., 1990). Es trat jedoch auch bei reifen Lymphozyten auf (Weiss et al., 1988). Hier wurden als weitere Erklärungsmöglichkeiten die Deletion von den rearrangierten Genen und das Vorliegen eines polyklonalen Tumors diskutiert.

Bei den Proben, bei denen mittels PCR kein Rearrangement nachgewiesen werden konnte, trugen die PCR-Ergebnisse nicht zur Diagnostik bei. Aufgrund ihres histologischen und immunhistologischen Erscheinungsbildes wurden sie als *Anaplastic large cell lymphoma* (2), *Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma* (2), *Intestinal T-cell lymphoma* (5), *Peripheral T-cell lymphoma* (8) und *T-cell lymphoblastic lymphoma* (6) diagnostiziert.

5.2.5 Vorkommenshäufigkeit bestimmter Kombinationen von V- und J-Gensegmenten

An 83 Fällen wurden die Kombinationshäufigkeit und die -verteilung der verschiedenen Subgruppen der V- und J-Gensegmente überprüft.

Dazu wurden die erste und zweite Variante der ersten Subgruppen der V-Gensegmente in der FR3 mit dem gemeinsamen *Senseprimer* 3f1 amplifiziert. Bei diesem Primer und dem *Senseprimer* 3f3, eingesetzt zur Amplifikation der dritten Variante, stellte sich durch Sequenzvergleich mehrerer Amplifikate heraus, dass diese nicht spezifisch für ihre jeweiligen Varianten waren (s. 4.6). Die zweite Subgruppe wurde mit dem Primer 3f4 amplifiziert. In der FR2 wurden alle Varianten der ersten Subgruppe mit dem Primer 2f1 und alle der zweiten mit dem Primer 2f4 amplifiziert. Ebenso fand die Amplifikation der drei Subgruppen der J-Gensegmente mit jeweils einem Primer (4r1, 4r2, 4r3) statt. Es ist daher nicht möglich, die

Kombinationshäufigkeit der einzelnen Varianten auszuwerten, sondern nur die der unterschiedlichen Subgruppen.

In Abbildungen 29 unter 4.6 ist eine Übersicht über das Vorkommen der Kombinationen dargestellt.

Die Kombinationshäufigkeit bei den untersuchten Tumoren stimmt in etwa mit derjenigen der Klone, die von Weiss generiert wurden, überein (Weiss, 2008). Kombinationen mit der dritten (J3) Subgruppe traten bei Weiss nicht und in der hier vorgelegten Studie nur vereinzelt auf. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die entsprechenden Kombinationen bei spontan auftretenden Tumoren zwar vorkommen, jedoch nur sehr selten.

Des Weiteren unterstützt dieses Ergebnis die Hypothese der Anordnung des feline TRG in Klustern mit der Einschränkung, dass nicht die einzelnen Varianten nachgewiesen werden können (s. Abb. 6 unter 2.1.5.2.1.3.8).

5.3. B-Zell-Lymphosarkome

Es wurden 20 B-Zell-Lymphosarkome untersucht.

Bei 7 Fällen wurde ein polyklonales Ergebnis erzielt. Dies kann auf das Vorhandensein tumorinfiltrierender T-Zell-Lymphozyten oder, falls Lymphknoten tumorös verändert waren, auf die residenten T-Zellpopulationen zurückgeführt werden.

5 Tumoren wiesen ein pseudoklonales Ergebnis auf. Hierbei traten nicht reproduzierbare Banden auf. Ursächlich für dieses Phänomen wird ein Mangel an Ziel-DNS angenommen (Werner et al., 2005). Da nur wenige amplifizierbare T-Zellklone vorhanden sind, werden sie bevorzugt amplifiziert und es werden Banden sichtbar (Elenitoba-Johnson et al., 2000). Da es sich jedoch um eine zufällige Auswahl handelt, sind die Ergebnisse nicht reproduzierbar und können durch einen Doppelansatz erkannt werden.

Bei 8 Tumoren waren weder Banden noch ein Schmier nachweisbar. Das Auftreten eines entsprechenden Ergebnisses ist durch das Fehlen infiltrierender T-Lymphozyten und das fehlende Rearrangement der TRG in den B-Lymphozyten zu erklären. Theoretisch wäre das Vorkommen rearrangierter TRG in B-Zell-Lymphosarkomen aufgrund der unter 5.2.1 beschriebenen Linienpromiskuität möglich. Das Ergebnis steht daher im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie feline Lymphosarkome von Weiss, bei der 6 von 27 B-Zell-Lymphosarkomen rearrangierte TRG aufwiesen (Weiss et al., 2011). Mittels exaktem zweiseitigem Test nach Fisher wurde des Weiteren nachgewiesen, dass das Ergebnis der vorliegenden Studie einen statistisch höchst signifikanten Unterschied im Vergleich zu den

humanen B-Zell-Lymphosarkomen, bei denen bei 75 % rearrangierte TRG festgestellt wurden (Trainor et al., 1991), aufweist.

5.4. Polyklonale Kontrollgewebe

17 der 20 Kontrollgewebe wiesen nach PCR ein polyklonales Bild auf. Bei den lymphatischen Hyperplasien ist dies auf antigenisch breitgefächerte, reaktive Lymphozytenpopulationen zurückzuführen. In Darm und Thymus wurde dieses Bild durch die residente, unveränderte Lymphozytenpopulation hervorgerufen.

Bei den Fällen S110/08, S85/08 und T878/05 wurden oligoklonale bzw. mehrere klonal expansive Lymphozytenpopulationen über einem aus einer Leiter oder einem Schmier bestehenden Hintergrund detektiert. Die durchgeführte Heteroduplexanalyse bestätigte das Ergebnis der PCR.

Da bei Fall S110/08 histologisch eine chronische Enteritis diagnostiziert wurde, kann das Vorliegen klonal expansiver Populationen auf die wiederholte antigenische Stimulation mit wenigen bestimmten Erregern zurückgeführt werden (s. 5.2.3) (Balk et al., 1991; Van Kerckhove et al., 1992).

Fall S85/08 konnte aufgrund der fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen histologisch nicht untersucht werden. Mittels PCR wurde jedoch nachgewiesen, dass entsprechende Veränderungen zu einer Verringerung der Bandenzahl führen können (s. Abb. 40 unter 4.8.). Bei Fall S85/08 besteht daher die Möglichkeit, dass das oligoklonale Ergebnis einen Artefakt darstellt.

Auch bei der lymphatischen Hyperplasie eines Mesenteriallymphknotens (Fall T878/05) ist davon auszugehen, dass klonale Expansionen einiger Lymphozytenpopulationen auftraten. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang das histologisch vermutete Vorliegen einer IBD, was jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden kann.

5.5. Vergleich mit bestehenden Diagnostiksystemen

Moore et. al. wiesen in einer Studie aus 2005 drei unterschiedliche Familien im V-Gensegment der TRG nach, die sie als TRGV γ 1, TRGV γ 2 und TRGV γ 3 bezeichneten. Diese stimmen mit den drei Varianten fTRGV1 bis -V3 der ersten Subgruppe des V-Gensegments von Weiss (Weiss, 2008) überein. Die von Weiss entdeckte zweite Subgruppe wurde bei Moore et. al. (2005) nicht nachgewiesen.

Die von Moore et. al. (2005) beschriebenen Varianten des J-Gensegments gleichen am ehesten den Varianten in der ersten Subgruppe von Weiss (2008). Für die zweite und dritte Subgruppe von Weiss existieren bei Moore et. al. (2005) keine analogen Vertreter.

Moore et. al. (2005) setzten je einen degenerierten Konsensusprimer in FR3 und FR4 ein, deren Struktur der von Primer 3f1 und 3f3 bzw. 4r1 ähnelt. Somit können die Klone, die aus der zweiten Subgruppe der V-Gensegmente bzw. der zweiten oder dritten Subgruppe der J-Gensegmente stammen, nicht detektiert werden.

Sie untersuchten ausschließlich intestinale Lymphosarkome (Moore et al., 2005). Bei 78 % wurde ein mono- bzw. biklonales und bei 11 % ein oligoklonales Ergebnis erzielt. Das geringere Vorkommen von oligoklonalen Ergebnissen kann teilweise auf die eingesetzte Feldstärke und Laufdauer zurückgeführt werden, mit der unter Umständen nicht alle oligoklonalen Populationen detektiert werden konnten. Das in der hier vorgelegten Studie verwendete System stellt daher eine Optimierung in Bezug auf die Auftrennung der PCR-Produkte (s. Abb. 26 unter 4.4.) und den Nachweis zusätzlicher Subgruppen dar.

Kiupel et. al. (2010) verwendeten bei der molekularbiologischen Untersuchung intestinaler Tumore und bei Fällen von IBD die von Moore et. al. (2005) veröffentlichten Primer. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden jedoch Agarosegele statt Polyacrylamidgelen verwendet und die Laufspannung betrug nur 100 V für eine Dauer von ein bis zwei Stunden. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass sich Agarosegele aufgrund der ungenügenden Auflösung, vor allem bei relativ kleinen Fragmenten (Day and Humphries, 1994), nicht zum Nachweis der Klonalität bei Lymphosarkomen eignen (Kneba et al., 1994).

Mittels eines weiteren Systems wurden von einer anderen Arbeitsgruppe 19 T-Zell-Lymphosarkome, 27 B-Zell-Lymphosarkome sowie 10 reaktive Kontrollgewebe untersucht (Weiss et al., 2011). Dieses System baut auf einer Amplifikation mit Primern, die in den FR1, FR2 und FR4 liegen, auf. Bei 68 % der T-Zell-Lymphosarkome wurde Klonalität nachgewiesen, allerdings unterschied man nicht zwischen mono- und biklonalen Ergebnissen. Im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten System traten keine oligoklonalen Ergebnisse bei T-Zell-Lymphosarkomen auf. Dies müsste jedoch durch eine größere Fallzahl verifiziert werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den verschiedenen Systemen besteht in dem fehlenden Vorkommen von T-Zell-Lymphosarkomen, die klonale Rekombinationen in der zweiten Subgruppe der V-Gensegmente zeigen (Weiss et al., 2011). In der hier vorliegenden Studie war dies bei 18 % der untersuchten T-Zell-Lymphosarkome der Fall. Der Nachweis klonaler Rekombinationen in dieser Subgruppe kann auf die höhere Fallzahl zurückgeführt werden.

Des Weiteren traten bei Weiss bei Amplifikation mit den *Antisenseprimern* der zweiten und dritten Subgruppe der J-Gensegmente monoklonale Ergebnisse bei 86 % der hyperplastischen Lymphknoten auf. Dies wurde mit der geringen Längenvariation dieser Subgruppen begründet (Weiss et al., 2011). Das Ergebnis steht im Gegensatz zu den in der hier vorgelegten Studie erhaltenen Ergebnissen. Lediglich 15 % der Kontrollgewebe wiesen oligoklonale Populationen über einem Hintergrundschmier auf. Der Unterschied kann unter Umständen wiederum auf eine zu geringe Feldstärke und Laufdauer in dem System von Weiss (4 V/cm für eine Dauer von 2,5 h) zurückgeführt werden (Weiss et al., 2011). Gerade bei langen Amplifikaten, wie sie mit *Senseprimern* in FR1 oder FR2 produziert werden, ist eine ausreichend hohe Feldstärke und Laufdauer essentiell für die Unterscheidung von monoklonalen und polyklonalen Populationen (s. Abb. 25 unter 4.4.).

Daraus folgt, dass ein großer Unterschied zwischen den veröffentlichten Systemen und dem in dieser Arbeit angewandten in der Auflösung der Amplifikate besteht, da durch diese die Anzahl sichtbarer Banden maßgeblich beeinflusst werden kann.

5.6. Anwendung des diagnostischen Systems

Am besten eignet sich für den Einsatz in dem in der vorgelegten Studie angewandten System frisches oder gefrorenes Material zur DNS-Isolierung. Falls nur eingebettetes Material zur Verfügung steht, ist es zwingend notwendig, die Integrität und Amplifizierbarkeit der isolierten DNS mittels Kontrollgenen zu überprüfen (van Dongen et al., 2003).

Die Proben können zunächst im Doppelansatz mittels Multiplex-PCR getestet werden. Bei Auftreten eines oligo- oder polyklonalen Ergebnisses sollte eine Einzelamplifikation der verschiedenen Subgruppen durchgeführt werden. Dadurch kann im ersten Fall das Vorliegen von verwandten Klonen aufgrund der Verwendung ähnlicher V- und J-Gensegmente überprüft werden. Hingegen können bei einem scheinbar polyklonalen Ergebnis klonale Populationen, die durch einen Schmier aufgrund einer starken Hintergrundpopulation verdeckt sind, nachgewiesen werden.

Bei oligoklonalen Ergebnissen können alle auftretenden Populationen kloniert und sequenziert werden, um für die Untersuchung einer eventuell zukünftig entstehenden minimalen Resterkrankung klonspezifische Primer herzustellen (de Haas et al., 2001; Moreira et al., 2001).

Falls mittels Heteroduplexanalyse, vor allem bei Verwendung der *Senseprimer* in FR2, keine ausreichende Auflösung der erhaltenen Amplifikate erreicht wird, empfiehlt sich der Einsatz eines Sequencers.

Das hier vorgestellte diagnostische System wies eine Sensitivität von 79 % und eine Spezifität von 93 % auf.

6. Zusammenfassung

Lymphosarkome stellen die bei Katzen am häufigsten vorkommende Tumorform dar. Bei einer zweifelhaften Diagnose mittels Histologie und Immunhistologie kann die Untersuchung durch den Nachweis klonal rearrangierter Rezeptorgene mittels PCR gestützt werden. Dieser Nachweis erfolgt bei T-Zell-Lymphosarkomen zumeist über die Untersuchung der Gene des T-Zellrezeptor γ (TRG); bei der Katze wurde dieses Rezeptorgen am ausführlichsten analysiert.

Anhand der bereits nachgewiesenen Sequenzen der felines TRG wurden Primer in zwischen den verschiedenen Varianten homologen Bereichen generiert, um unter Einsatz möglichst weniger Primer klonale Populationen in einer Multiplex-PCR nachzuweisen. Als Template dienten histologisch und immunhistologisch diagnostizierte T-Zell-Lymphosarkome, B-Zell-Lymphosarkome sowie reaktive Veränderungen und Normalgewebe.

Als ein wichtiger Einflussfaktor im Hinblick auf die Anzahl der zu detektierenden Banden und damit der Interpretierbarkeit der Ergebnisse erwies sich die Auflösung der PCR-Produkte. Bei den T-Zell-Lymphosarkomen wiesen 43 % ein monoklonales und 36 % ein oligoklonales Ergebnis auf. Bei 21 % der Proben wurde ein polyklonales oder kein Rearrangement detektiert.

Die Entscheidung, ob eine neoplastische oder eine reaktive T-Zell-Population vorliegt, kann durch das entwickelte System gestützt werden, da das Vorliegen einer monoklonalen Population für das Vorliegen eines Tumors spricht.

Eine Einschränkung ergibt sich, falls ein oligoklonales Ergebnis nachgewiesen wird, da entsprechende Populationen bei Tumoren und reaktiven Veränderungen vorliegen können. Eine weitere Einschränkung stellt das Auftreten polyklonaler Ergebnisse bzw. eine fehlende Amplifikation dar. Als Ursache hierfür kommen die unvollständige Analyse des felines Genoms und das sich daraus ergebende Auftreten weiterer Sequenzvarianten der felines TRG in Frage.

Für die Diagnose eines Lymphosarkoms ist daher die gemeinsame Interpretation der Ergebnisse der histologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchungen notwendig.

7. Summary

Lymphoma is the most frequently occurring neoplastic lesion in the cat. If it is not possible to make an unambiguous diagnosis by the use of histological and immunohistochemical methods, examination could be extended by detecting clonally rearranged receptor genes using PCR. In most cases, also in the cat, the genes of the T-cell receptor γ (TRG) are examined.

On the basis of previously analyzed sequences of the feline TRG, primers were designed to bind highly homologous regions in order to detect clonal populations in a multiplex PCR reaction with as few primers as possible. Histologically and immunohistochemically diagnosed T-cell lymphomas, B-cell lymphomas, reactive lesions and normal tissues were investigated.

The resolution of the PCR-products by gel electrophoresis was identified as an important parameter with regard to the number of bands detected and hence the interpretation of the results.

In T-cell lymphomas monoclonal results were detected in 43 % and oligoclonal results in 36 %. In 21 % of the samples a polyclonal result or no rearrangement could be demonstrated. The developed system is helpful in discriminating a neoplastic from reactive T-cell populations if a monoclonal result is obtained.

One limitation is the presence of an oligoclonal result as this is reported to occur in neoplastic as well as in reactive lesions. Another limitation is the occurrence of a polyclonal result or the failure of detecting any amplification at all. This could be due to the fact that the feline genome is only partially analyzed and further yet unknown and therefore undetected variants of the feline TRG could exist.

In conclusion, diagnosis of lymphomas could be made more reliable by interpreting the results of histology, immunohistochemistry, and molecular biology in combination.

8. Literaturverzeichnis

- Abramson, S., Miller, R.G., Phillips, R.A., 1977, The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* 145, 1567-1579.
- Akhtardanesh, B., Ziaali, N., Sharifi, H., Rezaei, S., 2010, Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray and household cats in Kerman-Iran: seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. *Res Vet Sci* 89, 306-310.
- Alexander, P., 1985, Do cancers arise from a single transformed cell or is monoclonality of tumours a late event in carcinogenesis? *Br J Cancer* 51, 453-457.
- Allison, J.P., McIntyre, B.W., Bloch, D., 1982, Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. *J Immunol* 129, 2293-2300.
- Allison, T.J., Winter, C.C., Fournie, J.J., Bonneville, M., Garboczi, D.N., 2001, Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 411, 820-824.
- Alt, F.W., Baltimore, D., 1982, Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4118-4122.
- Alt, F.W., Oltz, E.M., Young, F., Gorman, J., Taccioli, G., Chen, J., 1992, VDJ recombination. *Immunol Today* 13, 306-314.
- Anderson, M.M., Luring, A.S., Burns, C.C., Overbaugh, J., 2000, Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science* 287, 1828-1830.
- Avery, P.R., Avery, A.C., 2004, Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Vet Clin Pathol* 33, 196-207.
- Bagg, A., Braziel, R.M., Arber, D.A., Bijwaard, K.E., Chu, A.Y., 2002, Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. *J Mol Diagn* 4, 81-89.
- Balk, S.P., Ebert, E.C., Blumenthal, R.L., McDermott, F.V., Wucherpfennig, K.W., Landau, S.B., Blumberg, R.S., 1991, Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Science* 253, 1411-1415.
- Barrs, V.R., Beatty, J.A., 2012, Feline alimentary lymphoma: 1. Classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics. *J Feline Med Surg* 14, 182-190.
- Bassing, C.H., Swat, W., Alt, F.W., 2002, The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, 45-55.
- Baumgartner, A.K., Zettl, A., Chott, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Starostik, P., 2003, High frequency of genetic aberrations in enteropathy-type T-cell lymphoma. *Lab Invest* 83, 1509-1516.
- Beebe, A.M., Dua, N., Faith, T.G., Moore, P.F., Pedersen, N.C., Dandekar, S., 1994, Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J Virol* 68, 3080-3091.
- Benacerraf, B., Germain, R.N., 1978, The immune response genes of the major histocompatibility complex. *Immunol Rev* 38, 70-119.
- Benveniste, R.E., Sherr, C.J., Todaro, G.J., 1975, Evolution of type C viral genes: origin of feline leukemia virus. *Science* 190, 886-888.
- Borgulya, P., Kishi, H., Uematsu, Y., von Boehmer, H., 1992, Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles. *Cell* 69, 529-537.
- Bottaro, M., Berti, E., Biondi, A., Migone, N., Crosti, L., 1994, Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 83, 3271-3278.

- Boucontet, L., Sepulveda, N., Carneiro, J., Pereira, P., 2005, Mechanisms controlling termination of V-J recombination at the TCRgamma locus: implications for allelic and isotypic exclusion of TCRgamma chains. *J Immunol* 174, 3912-3919.
- 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 U S A* 87, 8536-8540.
- Boveri, T., 2008, Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci* 121 Suppl 1, 1-84.
- Braun, M.J., Deininger, P.L., Casey, J.W., 1985, Nucleotide sequence of a transduced myc gene from a defective feline leukemia provirus. *J Virol* 55, 177-183.
- Brenner, M.B., McLean, J., Dialynas, D.P., Strominger, J.L., Smith, J.A., Owen, F.L., Seidman, J.G., Ip, S., Rosen, F., Krangel, M.S., 1986, Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322, 145-149.
- Bridgford, E.C., Marini, R.P., Feng, Y., Parry, N.M., Rickman, B., Fox, J.G., 2008, Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol* 123, 106-113.
- Briscoe, K.A., Krockenberger, M., Beatty, J.A., Crowley, A., Dennis, M.M., Canfield, P.J., Dhand, N., Lingard, A.E., Barrs, V.R., 2011, Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of 53 Cases of Feline Lymphoplasmacytic Enteritis and Low-Grade Alimentary Lymphoma. *J Comp Pathol* 145, 187-198.
- Brutlag, D., Schlehuber, C., Bonner, J., 1969, Properties of formaldehyde-treated nucleohistone. *Biochemistry* 8, 3214-3218.
- Burnet, F.M., 1976, A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin* 26, 119-121.
- 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.
- Caignard, A., Dietrich, P.Y., Morand, V., Lim, A., Pannetier, C., Leridant, A.M., Hercend, T., Even, J., Kourilsky, P., Triebel, F., 1994, Evidence for T-cell clonal expansion in a patient with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 54, 1292-1297.
- Chien, Y., Becker, D.M., Lindsten, T., Okamura, M., Cohen, D.I., Davis, M.M., 1984, A third type of murine T-cell receptor gene. *Nature* 312, 31-35.
- Chien, Y.H., Iwashima, M., Kaplan, K.B., Elliott, J.F., Davis, M.M., 1987, A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 327, 677-682.
- Cho, K., Youn, H.Y., Okuda, 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.
- Coad, J.E., Olson, D.J., Lander, T.A., Mc, G.R., 1996, Molecular Assessment of Clonality in Lymphoproliferative Disorders: I. Immunoglobulin Gene Rearrangements. *Mol Diagn* 1, 335-355.
- Coad, J.E., Olson, D.J., Lander, T.A., Mc, G.R., 1997, Molecular Assessment of Clonality in Lymphoproliferative Disorders: II. T-cell Receptor Gene Rearrangements. *Mol Diagn* 2, 69-81.
- Coffman, R.L., Weissman, I.L., 1981, B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* 289, 681-683.
- Concannon, P., Pickering, L.A., Kung, P., Hood, L., 1986, Diversity and structure of human T-cell receptor beta-chain variable region genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6598-6602.

- 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.
- Cossman, J., Zehnbauser, B., Garrett, C.T., Smith, L.J., Williams, M., Jaffe, E.S., Hanson, L.O., Love, J., 1991, Gene rearrangements in the diagnosis of lymphoma/leukemia. Guidelines for use based on a multiinstitutional study. *Am J Clin Pathol* 95, 347-354.
- Couedel, C., Lippert, E., Bernardeau, K., Bonneville, M., Davodeau, F., 2004, Allelic exclusion at the TCR delta locus and commitment to gamma delta lineage: different modalities apply to distinct human gamma delta subsets. *J Immunol* 172, 5544-5552.
- Crichton, G.W., 1969, Lymphosarcoma in the cat. *Vet Rec* 84, 329-331.
- Cytel Studio StatXact Version 9.0.0, 2010, Statistical Software for Exact Nonparametric Interference, User Manual. CYTEL Inc., Cambridge, MA 02139, U.S.A.
- Davis, M.M., Bjorkman, P.J., 1988, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
- Davodeau, F., Peyrat, M.A., Houde, I., Hallet, M.M., De Libero, G., Vie, H., Bonneville, M., 1993, Surface expression of two distinct functional antigen receptors on human gamma delta T cells. *Science* 260, 1800-1802.
- Davodeau, F., Peyrat, M.A., Romagne, F., Necker, A., Hallet, M.M., Vie, H., Bonneville, M., 1995, Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes. *J Exp Med* 181, 1391-1398.
- Day, I.N., Humphries, S.E., 1994, Electrophoresis for genotyping: microtiter array diagonal gel electrophoresis on horizontal polyacrylamide gels, hydrolink, or agarose. *Anal Biochem* 222, 389-395.
- de Haas, V., Verhagen, O.J., von dem Borne, A.E., Kroes, W., van den Berg, H., van der Schoot, C.E., 2001, Quantification of minimal residual disease in children with oligoclonal B-precursor acute lymphoblastic leukemia indicates that the clones that grow out during relapse already have the slowest rate of reduction during induction therapy. *Leukemia* 15, 134-140.
- Dean, G.A., Reubel, G.H., Moore, P.F., Pedersen, N.C., 1996, Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. *J Virol* 70, 5165-5169.
- Diss, T.C., Watts, M., Pan, L.X., Burke, M., Linch, D., Isaacson, P.G., 1995, The polymerase chain reaction in the demonstration of monoclonality in T cell lymphomas. *J Clin Pathol* 48, 1045-1050.
- Dixon, W. J. (chief editor), 1993, *BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- Dorn, C.R., Taylor, D.O., Hibbard, H.H., 1967, Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am J Vet Res* 28, 993-1001.
- 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 U S A* 54, 864-869.
- Ellermann, V., Bang, O., 1908. Experimentelle Leulämie bei Hühnern, *Centralbl. f. Bakteriol.* etc. Abt. I. Orig. Bd. XLVI: 595-609.
- El-Zimaity, H.M., Wotherspoon, A., de Jong, D., 2005, Interobserver variation in the histopathological assessment of malt/malt lymphoma: towards a consensus. *Blood Cells Mol Dis* 34, 6-16.
- 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.

- 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.
- Englert, T., Lutz, H., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2012, Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany. *J Feline Med Surg* 14, 392-398.
- Evans, S.E., Bonczynski, J.J., Broussard, J.D., Han, E., Baer, K.E., 2006, Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc* 229, 1447-1450.
- Fend, F., Quintanilla-Martinez, L., Kumar, S., Beaty, M.W., Blum, L., Sorbara, L., Jaffe, E.S., Raffeld, M., 1999, Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclonal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *Am J Pathol* 154, 1857-1866.
- 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* 17, 297-303.
- Ferrero, I., Mancini, S.J., Grosjean, F., Wilson, A., Otten, L., MacDonald, H.R., 2006, TCRgamma silencing during alphabeta T cell development depends upon pre-TCR-induced proliferation. *J Immunol* 177, 6038-6043.
- Fialkow, P.J., 1979, Clonal origin of human tumors. *Annu Rev Med* 30, 135-143.
- Fox, J.G., Wang, T.C., 2007, Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 117, 60-69.
- Francis, D.P., Cotter, S.M., Hardy, W.D., Jr., Essex, M., 1979, Comparison of virus-positive and virus-negative cases of feline leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 39, 3866-3870.
- Gabor, L.J., Jackson, M.L., Trask, B., Malik, R., Canfield, P.J., 2001, Feline leukaemia virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 79, 476-481.
- Garbe, A.I., von Boehmer, H., 2007, TCR and Notch synergize in alphabeta versus gammadelta lineage choice. *Trends Immunol* 28, 124-131.
- Gaulard, P., Bourquelot, P., Kanavaros, P., Haioun, C., Le Couedic, J.P., Divine, M., Goossens, M., Zafrani, E.S., Farcet, J.P., Reyes, F., 1990, Expression of the alpha/beta and gamma/delta T-cell receptors in 57 cases of peripheral T-cell lymphomas. Identification of a subset of gamma/delta T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 137, 617-628.
- Gill, J.I., Gulley, M.L., 1994, Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement. *Hematol Oncol Clin North Am* 8, 751-770.
- 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.
- Gleich, S.E., Krieger, S., Hartmann, K., 2009, Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J Feline Med Surg* 11, 985-992.
- 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.
- Greiner, T.C., Raffeld, M., Lutz, C., Dick, F., Jaffe, E.S., 1995, Analysis of T cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. Correlation with tumor-specific sequences. *Am J Pathol* 146, 46-55.
- Groh, V., Strominger, J.L., 1990, Developmental biology of T cells expressing the gamma delta T-cell receptor. *Res Immunol* 141, 685-687.
- Gulino, S.E., 1992, Chromosome abnormalities and oncogenesis in cat leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 64, 149-157.
- Han, X.Q., He, L., Shong, L.Y., Jiang, H.Y., Zhu, M.G., Zhao, T., 2004, Investigation of T-cell receptor-gamma gene rearrangement in gastrointestinal lymphomas by PCR-SSCP analysis. *World J Gastroenterol* 10, 995-999.
- Hayday, A.C., Saito, H., Gillies, S.D., Kranz, D.M., Tanigawa, G., Eisen, H.N., Tonegawa, S., 1985, Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell* 40, 259-269.
- Heath, W.R., Miller, J.F., 1993, Expression of two alpha chains on the surface of T cells in T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 178, 1807-1811.
- Heilig, J.S., Tonegawa, S., 1987, T-cell gamma gene is allelically but not isotypically excluded and is not required in known functional T-cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8070-8074.
- Heim, S., Mandahl, N., Mitelman, F., 1988, Genetic convergence and divergence in tumor progression. *Cancer Res* 48, 5911-5916.
- Henrich, M., Hecht, W., Weiss, A.T., Reinacher, M., 2009, A new subgroup of immunoglobulin heavy chain variable region genes for the assessment of clonality in feline B-cell lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol* 130, 59-69.
- Henrich, M.A., 2008, Entwicklung einer PCR-gestützten Klonalitätsdiagnostik bei B-Zell-Lymphomen der Katze. Inaugural-Dissertation Vet.med., Gießen.
- Herzig, C., Blumerman, S., Lefranc, M.P., Baldwin, C., 2006, Bovine T cell receptor gamma variable and constant genes: combinatorial usage by circulating gammadelta T cells. *Immunogenetics* 58, 138-151.
- Hewitt, S.L., Chaumeil, J., Skok, J.A., 2010, Chromosome dynamics and the regulation of V(D)J recombination. *Immunol Rev* 237, 43-54.
- Hingorani, R., Choi, I.H., Akolkar, P., Gulwani-Akolkar, B., Pergolizzi, R., Silver, J., Gregersen, P.K., 1993, Clonal predominance of T cell receptors within the CD8+ CD45RO+ subset in normal human subjects. *J Immunol* 151, 5762-5769.
- Hoeve, M.A., Krol, A.D., Philippo, K., Derksen, P.W., Veenendaal, R.A., Schuurin, E., Kluin, P.M., van Krieken, J.H., 2000, Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *Mol Pathol* 53, 194-200.
- Hsu, P.I., Lai, K.H., Hsu, P.N., Lo, G.H., Yu, H.C., Chen, W.C., Tsay, F.W., Lin, H.C., Tseng, H.H., Ger, L.P., Chen, H.C., 2007, Helicobacter pylori infection and the risk of gastric malignancy. *Am J Gastroenterol* 102, 725-730.
- Huebner, R.J., Todaro, G.J., 1969, Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64, 1087-1094.
- 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. doi: 10.1186/1742-4933-3-7.

- Jackson, M.L., Haines, D.M., Meric, S.M., Misra, V., 1993, Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can J Vet Res* 57, 269-276.
- Jackson, V., 1978, Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent. *Cell* 15, 945-954.
- Jarrett, O., 1971, Virology and host range of feline leukemia virus. *J Am Vet Med Assoc* 158, Suppl 2:1032+.
- Jarrett, O., Edney, A.T., Toth, S., Hay, D., 1984, Feline leukaemia virus-free lymphosarcoma in a specific pathogen free cat. *Vet Rec* 115, 249-250.
- Jarrett, O., Laird, H.M., Hay, D., 1973, Determinants of the host range of feline leukaemia viruses. *J Gen Virol* 20, 169-175.
- Jarrett, W.F., Crawford, E.M., Martin, W.B., Davie, F., 1964, A Virus-Like Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 202, 567-569.
- Jarrett, W.F., Mackey, L.J., 1974, Neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues. *Bull World Health Organ* 50, 21-34.
- Jerne, N.K., 1955, The Natural-Selection Theory of Antibody Formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 849-857.
- Jung, D., Alt, F.W., 2004, Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116, 299-311.
- Kipar, A., Kremendahl, J., Jackson, M.L., Reinacher, M., 2001, Comparative examination of cats with feline leukemia virus-associated enteritis and other relevant forms of feline enteritis. *Vet Pathol* 38, 359-371.
- Kiupel, M., Smedley, R.C., Pfent, C.M., Xie, Y., Xue, Y., Wise, A.G., Devaul, J.M., Maes, R.K., 2011, Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Vet Pathol* 48, 212-222.
- Kneba, M., Bolz, I., Linke, B., Bertram, J., Rothaupt, D., Hiddemann, W., 1994, Characterization of clone-specific rearrangement T-cell receptor gamma-chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Blood* 84, 574-581.
- Lafaille, J.J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y., Tonegawa, S., 1989, Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59, 859-870.
- Langerak, A.W., Szczepanski, T., van der Burg, M., Wolvers-Tettero, I.L., van Dongen, J.J., 1997, Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 11, 2192-2199.
- Leder, P., 1982, The genetics of antibody diversity. *Sci Am* 246, 102-115.
- Lefranc, M.P., 2001, Nomenclature of the human T cell receptor genes. *Curr Protoc Immunol* Appendix 1, Appendix 10.
- Levesque, K.S., Bonham, L., Levy, L.S., 1990, flvi-1, a common integration domain of feline leukemia virus in naturally occurring lymphomas of a particular type. *J Virol* 64, 3455-3462.
- Lewis, S., Gellert, M., 1989, The mechanism of antigen receptor gene assembly. *Cell* 59, 585-588.
- Lewis, S.M., 1994, P nucleotides, hairpin DNA and V(D)J joining: making the connection. *Semin Immunol* 6, 131-141.
- Lieber, M.R., 1991, Site-specific recombination in the immune system. *Faseb J* 5, 2934-2944.
- Lima, M., Coutinho, J., Orfao, A., Macedo, A.L., San Miguel, J.F., Justica, B., 1994, Chronic prolymphocytoid leukaemia with an unusual immature immunophenotype. *J Clin Pathol* 47, 461-463.
- Linder, D., Gartler, S.M., 1965, Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science* 150, 67-69.

- Linke, B., Bolz, I., Fayyazi, A., von Hofen, M., Pott, C., Bertram, J., Hiddemann, W., Kneba, M., 1997, Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia* 11, 1055-1062.
- Lipkowitz, S., Stern, M.H., Kirsch, I.R., 1990, Hybrid T cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-telangiectasis lymphocytes. *J Exp Med* 172, 409-418.
- Lippman, S.M., Miller, T.P., Spier, C.M., Slymen, D.J., Grogan, T.M., 1988, The prognostic significance of the immunotype in diffuse large-cell lymphoma: a comparative study of the T-cell and B-cell phenotype. *Blood* 72, 436-441.
- Lorenzen, J., Jux, G., Zhao-Hohn, M., Klockner, A., Fischer, R., Hansmann, M.L., 1994, Detection of T-cell clonality in paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 3, 93-99.
- Loupal, G., Pfeil, C., 1984, [Tumors in the intestinal tract of cats with special reference to nonhematopoietic growths]. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 97, 208-213.
- 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.
- Lynas, C., Howe, D., 1998, Simple, reliable detection of T cell clones by PCR-LIS-SSCP analysis of TCRgamma rearrangement. *Mol Cell Probes* 12, 41-48.
- Malissen, M., Trucy, J., Letourneur, F., Rebai, N., Dunn, D.E., Fitch, F.W., Hood, L., Malissen, B., 1988, A T cell clone expresses two T cell receptor alpha genes but uses one alpha beta heterodimer for allorecognition and self MHC-restricted antigen recognition. *Cell* 55, 49-59.
- Massari, S., Bellahcene, F., Vaccarelli, G., Carelli, G., Mineccia, M., Lefranc, M.P., Antonacci, R., Ciccarese, S., 2009, The deduced structure of the T cell receptor gamma locus in *Canis lupus familiaris*. *Mol Immunol* 46, 2728-2736.
- Matiasovic, J., Andryskova, R., Karasova, D., Toman, M., Faldyna, M., 2009, The structure and functional analysis of canine T-cell receptor beta region. *Vet Immunol Immunopathol* 132, 282-287.
- 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.P., 1997, Molecular diagnosis of lymphomas and associated diseases. *Cancer Metastasis Rev* 16, 109-125.
- McCarthy, K.P., Sloane, J.P., Kabarowski, J.H., Matutes, E., Wiedemann, L.M., 1991, The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 138, 821-828.
- McCarthy, K.P., Sloane, J.P., Kabarowski, J.H., Matutes, E., Wiedemann, L.M., 1992, A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor-gamma chain gene. *Diagn Mol Pathol* 1, 173-179.
- 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.
- Meier, V.S., Ruffe, A., Gudat, F., 2001, Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11;14) and t(14;18), in a single reaction by a four-color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis: a method for the rapid molecular diagnosis of lymphoproliferative disorders applicable to fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, blood, and bone marrow aspirates. *Am J Pathol* 159, 2031-2043.
- Meleshko, A.N., Lipay, N.V., Stasevich, I.V., Potapnev, M.P., 2005, Rearrangements of IgH, TCRD and TCRG genes as clonality marker of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Exp Oncol* 27, 319-324.

- 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.
- Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L., 1983, Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J Exp Med* 157, 705-719.
- Miccoli, M.C., Antonacci, R., Vaccarelli, G., Lanave, C., Massari, S., Cribiu, E.P., Ciccarese, S., 2003, Evolution of TRG clusters in cattle and sheep genomes as drawn from the structural analysis of the ovine TRG2@ locus. *J Mol Evol* 57, 52-62.
- Mitsuhashi, M., 1996a, Technical report: Part 1. Basic requirements for designing optimal oligonucleotide probe sequences. *J Clin Lab Anal* 10, 277-284.
- Mitsuhashi, M., 1996b, Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *J Clin Lab Anal* 10, 285-293.
- 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.
- Moreira, I., Papaioannou, M., Mortuza, F.Y., Gameiro, P., Palmisano, G.L., Harrison, C.J., Prentice, H.G., Mehta, A.B., Hoffbrand, A.V., Foroni, L., 2001, Heterogeneity of VH-JH gene rearrangement patterns: an insight into the biology of B cell precursor ALL. *Leukemia* 15, 1527-1536.
- Mülhardt, C., 2006, *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 5. Auflage, 41-42.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999, *Veterinary Virology*, Third Edition, Elsevier, San Diego, California, USA.
- Neil, J.C., Hughes, D., McFarlane, R., Wilkie, N.M., Onions, D.E., Lees, G., Jarrett, O., 1984, Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias. *Nature* 308, 814-820.
- Nowell, P.C., 1976, The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- O'Keefe, C.L., Plasilova, M., Wlodarski, M., Risitano, A.M., Rodriguez, A.R., Howe, E., Young, N.S., Hsi, E., Maciejewski, J.P., 2004, Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol* 172, 1960-1969.
- 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.
- Offermans, M.T., Sonneveld, R.D., Bakker, E., Deutz-Terlouw, P.P., de Geus, B., Rozing, J., 1995, Denaturing and non-denaturing gel electrophoresis as methods for the detection of junctional diversity in rearranged T cell receptor sequences. *J Immunol Methods* 181, 101-114.
- Okuda, M., Umeda, A., Sakai, T., Ohashi, T., Momoi, Y., Youn, H.Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1994, Cloning of feline p53 tumor-suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors. *Int J Cancer* 58, 602-607.
- Onions, D., Lees, G., Forrest, D., Neil, J., 1987, Recombinant feline viruses containing the myc gene rapidly produce clonal tumours expressing T-cell antigen receptor gene transcripts. *Int J Cancer* 40, 40-45.

- Pardoll, D.M., Fowlkes, B.J., Bluestone, J.A., Kruisbeek, A., Maloy, W.L., Coligan, J.E., Schwartz, R.H., 1987, Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 326, 79-81.
- 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., Ho, E.W., Brown, M.L., Yamamoto, J.K., 1987, Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 235, 790-793.
- Pelicci, P.G., Knowles, D.M., 2nd, Dalla Favera, R., 1985, Lymphoid tumors displaying rearrangements of both immunoglobulin and T cell receptor genes. *J Exp Med* 162, 1015-1024.
- Picker, L.J., Butcher, E.C., 1992, Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10, 561-591.
- Posnett, D.N., Sinha, R., Kabak, S., Russo, C., 1994, Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 179, 609-618.
- Pringle, C.R., 1999, Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch Virol* 144, 421-429.
- Prochorec-Sobieszek, M., Chelstowska, M., Rymkiewicz, G., Majewski, M., Warzocha, K., Maryniak, R., 2008, Biclonal T-cell receptor gammadelta+ large granular lymphocyte leukemia associated with rheumatoid arthritis. *Leuk Lymphoma* 49, 828-831.
- Puisieux, I., Even, J., Pannetier, C., Jotereau, F., Favrot, M., Kourilsky, P., 1994, Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J Immunol* 153, 2807-2818.
- Ragaini, L., Aste, G., Cavicchioli, L., Boari, A., 2003, Inflammatory bowel disease mimicking alimentary lymphosarcoma in a cat. *Vet Res Commun* 27 Suppl 1, 791-793.
- Ramos-Vara, J.A., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelack, B., Czub, S., Piero, F.D., Dial, S., Ehrhart, E.J., Graham, T., Manning, L., Paulsen, D., Valli, V.E., West, K., 2008, Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 20, 393-413.
- Raulet, D.H., Garman, R.D., Saito, H., Tonegawa, S., 1985, Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314, 103-107.
- Reinacher, M., 1997, Praxisrelevante Tumoren bei der Katze, *Prakt. Tierarzt*, coll. *Vet. XXVII*, 10 – 12.
- 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., Gwynn, S.R., Lauring, A.S., Linenberger, M.L., Overbaugh, J., 1996, Viral genetic variation, AIDS, and the multistep nature of carcinogenesis: the feline leukemia virus model. *Leukemia* 10, 1867-1869.
- 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 U S A* 90, 10788-10792.
- Royer, H.D., Reinherz, E.L., 1987, T lymphocytes: ontogeny, function, and relevance to clinical disorders. *N Engl J Med* 317, 1136-1142.

- Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H.N., Tonegawa, S., 1984, Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309, 757-762.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989: *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed, 6.6-6.7, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.
- Sarma, P.S., Log, T., 1973, Subgroup classification of feline leukemia and sarcoma viruses by viral interference and neutralization tests. *Virology* 54, 160-169.
- Secker-Walker, L.M., 1985, The meaning of a clone. *Cancer Genet Cytogenet* 16, 187-188.
- Shah, Z.H., Harris, S., Smith, J.L., Hodges, E., 2009, Monoclonality and oligoclonality of T cell receptor beta gene in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *J Clin Pathol* 62, 177-181.
- Sheldon, G.H., Grant, C.K., Cotter, S.M., Gardner, M.B., Hardy, Jr., W.D., DiGiacomo, R.F., 1990. Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: A retrospective study (1968-1988), *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 3: 623-630.
- 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.
- 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.
- Siu, G., Clark, S.P., Yoshikai, Y., Malissen, M., Yanagi, Y., Strauss, E., Mak, T.W., Hood, L., 1984, The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell* 37, 393-401.
- Smith, J.W., Townsend, D.E., Sparkes, R.S., 1971, Genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the study of carcinoma of the cervix. *Cancer* 28, 529-532.
- Spits, H., Lanier, L.L., Phillips, J.H., 1995, Development of human T and natural killer cells. *Blood* 85, 2654-2670.
- Stow, P., Key, L., Chen, X., Pan, Q., Neale, G.A., Coustan-Smith, E., Mullighan, C.G., Zhou, Y., Pui, C.H., Campana, D., 2010, Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115, 4657-4663.
- Strominger, J.L., 1989, Developmental biology of T cell receptors. *Science* 244, 943-950.
- Suntz, M., Failing, K., Hecht, W., Schwartz, D., Reinacher, M., 2010, High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. *Vet Immunol Immunopathol* 136, 71-80.
- Taghon, T., Rothenberg, E.V., 2008, Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alpha and TCR-gammadelta T cell development. *Semin Immunopathol* 30, 383-398.
- Terry, A., Fulton, R., Stewart, M., Onions, D.E., Neil, J.C., 1992, Pathogenesis of feline leukemia virus T17: contrasting fates of helper, v-myc, and v-tcr proviruses in secondary tumors. *J Virol* 66, 3538-3549.
- Theodorou, I., Bigorgne, C., Delfau, M.H., Lahet, C., Cochet, G., Vidaud, M., Raphael, M., Gaulard, P., Farcet, J.P., 1996, VJ rearrangements of the TCR gamma locus in peripheral T-cell lymphomas: analysis by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Pathol* 178, 303-310.
- Theodorou, I., Raphael, M., Bigorgne, C., Fourcade, C., Lahet, C., Cochet, G., Lefranc, M.P., Gaulard, P., Farcet, J.P., 1994, Recombination pattern of the TCR gamma locus in human peripheral T-cell lymphomas. *J Pathol* 174, 233-242.

- Theriault, C., Galoin, S., Valmary, S., Selves, J., Lamant, L., Roda, D., Rigal-Huguet, F., Brousset, P., Delsol, G., Al Saati, T., 2000, PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases. *Mod Pathol* 13, 1269-1279.
- Tonegawa, S., 1983, Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Trainor, K.J., Brisco, M.J., Wan, J.H., Neoh, S., Grist, S., Morley, A.A., 1991, Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 78, 192-196.
- Uematsu, Y., Ryser, S., Dembic, Z., Borgulya, P., Krimpenfort, P., Berns, A., von Boehmer, H., Steinmetz, M., 1988, In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 52, 831-841.
- 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, Second Series Volume VIII, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 11-67.
- Van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Bruggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, 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.
- Van Kerckhove, C., Russell, G.J., Deusch, K., Reich, K., Bhan, A.K., DerSimonian, H., Brenner, M.B., 1992, Oligoclonality of human intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 175, 57-63.
- 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.
- Vernooij, B.T., Lenstra, J.A., Wang, K., Hood, L., 1993, Organization of the murine T-cell receptor gamma locus. *Genomics* 17, 566-574.
- Wainscoat, J.S., Fey, M.F., 1990, Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res* 50, 1355-1360.
- Walton, R.M., Hendrick, M.J., 2001, Feline Hodgkin's-like lymphoma: 20 cases (1992-1999). *Vet Pathol* 38, 504-511.
- Waly, N.E., Gruffydd-Jones, T.J., Stokes, C.R., Day, M.J., 2005, Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *J Comp Pathol* 133, 253-260.
- Wedderburn, L.R., Patel, A., Varsani, H., Woo, P., 2001, The developing human immune system: T-cell receptor repertoire of children and young adults shows a wide discrepancy in the frequency of persistent oligoclonal T-cell expansions. *Immunology* 102, 301-309.
- Weiss, A. Th. A., 2008: Untersuchungen zur Charakterisierung des felinen T-Zell-Rezeptors γ . Ph.D.-Thesis Vet.med., Gießen.
- Weiss, A.T., Hecht, W., Henrich, M., Reinacher, M., 2008, Characterization of C-, J- and V-region-genes of the feline T-cell receptor gamma. *Vet Immunol Immunopathol* 124, 63-74.

- Weiss, A.T., Hecht, W., Reinacher, M., 2010, Feline T-Cell Receptor gamma V- and J-Region Sequences Retrieved from the Trace Archive and from Transcriptome Analysis of Cats. *Vet Med Int* 2010, 953272.
- Weiss, A.T., Klopffleisch, R., Gruber, A.D., 2011, T-Cell Receptor gamma Chain Variable and Joining Region Genes of Subgroup 1 are Clonally Rearranged in Feline B- and T-Cell Lymphoma. *J Comp Pathol* 144, 123-134.
- Weiss, L.M., Picker, L.J., Grogan, T.M., Warnke, R.A., Sklar, J., 1988, Absence of clonal beta and gamma T-cell receptor gene rearrangements in a subset of peripheral T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 130, 436-442.
- 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.
- Willard, M.D., 1999, Feline inflammatory bowel disease: a review. *J Feline Med Surg* 1, 155-164.
- Williams, C., Ponten, F., Moberg, C., Soderkvist, P., Uhlen, M., Ponten, J., Sitbon, G., Lundeberg, J., 1999, A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 155, 1467-1471.
- Witzens, M., Mohler, T., Willhauck, M., Scheibenbogen, C., Lee, K.H., Keilholz, U., 1997, Detection of clonally rearranged T-cell-receptor gamma chain genes from T-cell malignancies and acute inflammatory rheumatic disease using PCR amplification, PAGE, and automated analysis. *Ann Hematol* 74, 123-130.
- 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.
- Wyllie, A.H., 1980, Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Yagihara, H., Tamura, K., Isotani, M., Ono, K., Washizu, T., Bonkobara, M., 2007, Genomic organization of the T-cell receptor gamma gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 375-382.
- Yamazaki, J., Baba, K., Goto-Koshino, Y., Setoguchi-Mukai, A., Fujino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2008, Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 321-331.
- Yu, R.C., Alaibac, M., 1996, A rapid polymerase chain reaction-based technique for detecting clonal T-cell receptor gene rearrangements in cutaneous T-cell lymphomas of both the alpha beta and gamma delta varieties. *Diagn Mol Pathol* 5, 121-126.
- Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C., 1974, Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.
- zur Stadt, U., Rischewski, J., Schneppenheim, R., Kabisch, H., 2001, Denaturing HPLC for identification of clonal T-cell receptor gamma rearrangements in newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Clin Chem* 47, 2003-2011.

9. Anhang

9.1. Tabellen

9.1.1 T-Zell-Lymphosarkome

Tabelle 21: Tagebuchnummer (Tgbnr.), Rasse, Alter, Geschlecht, Organ, FeLV-Status, DNS-Qualität (A1/A2 = Verhältnis der Extinktion bei 260° zu der bei 280° bei der photometrischen Messung), Amplifikation von Kontrollfragmenten (MS175bp, MS300bp), Methode der DNS-Isolation, WHO-Klassifikation, Anzahl der Banden, Klonalitätsgruppe der T-Zell-Lymphosarkome (k.A. = keine Angabe).

Tgbnr.	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Organ	FeLV	DNS-Qualität (A1/A2)	MS 175bp	MS 300bp	Isolation	WHO	Anzahl Banden	Gruppe Final
S1204/09-1	EKH	7	mk	MesLK	pos.	1.756	Bande	Bande	Gentra	TCLL	5	oligo
S1204/09-2	EKH	7	mk	MagenLK	pos.	1.764	Bande	Bande	Gentra	TCLL	6	oligo
S1204/09-3	EKH	7	mk	MandLK	pos.	1.742	Bande	Bande	Gentra	TCLL	5	oligo
S1204/09-4	EKH	7	mk	Leber	pos.	1.767	Bande	Bande	Gentra	TCLL	6	oligo
S1204/09-5	EKH	7	mk	KM	pos.	1.718	Bande	Bande	Gentra	TCLL	5	oligo
S1204/09-6	EKH	7	mk	Milz	pos.	1.733	Bande	Bande	Gentra	obB	6	oligo
S1204/09-7	EKH	7	mk	Darm	pos.	1.730	Bande	Bande	Gentra	obB	6	oligo
S1126/09	EKH	8	wk	Präkardiales Mittelfell	pos.	1.778	Bande	Bande	Gentra	k.A.	1	mono
T989/08	k.A.	k.A.	m	Haut	neg.	1.761	Bande	Bande	Gentra	CNEL	2	bi
S24/08	Perser	0,6	w	Thymus	neg.	1.762	Bande	Bande	Gentra	TCLL	3	oligo
T5140/07	k.A.	15	wk	Haut	pos.	1.602	Bande	Nichts	T20/Chelex	CNEL	0	poly
T4596/07	EKH	k.A.	k.A.	Darm	neg.	1.495	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	3	oligo
T4393/07	EKH	5	mk	ventr. Kehlkopf	pos.	1.547	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL, MLT	2	bi
T3111/07-1	k.A.	k.A.	k.A.	Darm	pos.	1.435	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	2	bi
T3111/07-2	k.A.	k.A.	k.A.	Fett	pos.	1.418	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	2	bi
T2101/07	Siam	k.A.	k.A.	Rücken	neg.	1.360	Bande	Nichts	WaxFree	PTCL, MLT	0	poly
T2086/07-1	EKH	11	mk	Haut	neg.	1.553	Bande	Nichts	T20/Chelex	CNEL	0	poly
T2086/07-2	EKH	11	mk	Muskulatur	neg.	1.500	Bande	Nichts	T20/Chelex	CNEL	0	poly
T1511/07	EKH	12	wk	Leber	neg.	1.467	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	1	mono
T853/07	Perser	k.A.	k.A.	Darm	neg.	1.246	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	1	mono
T296/07-1	EKH	k.A.	k.A.	UV	pos.	1.571	Bande	Bande	WaxFree	TCLL	1	mono
T8031/06	EKH	2	mk	Leber	neg.	1.348	Bande	Nichts	WaxFree	PTCL, MLT	5	oligo
T6478/06	k.A.	8	mk	LK	neg.	1.421	Bande	Nichts	T20/Chelex	ITCL	0	poly
T5718/06	MC	14	wk	Darm	neg.	1.310	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	0	poly
T5035/06-1	EKH	8	mk	Darm, Netz	neg.	1.297	Bande	Bande	WaxFree	ITCL	3	oligo
T4957/06	EKH	11	m	Darm, LK	neg.	1.479	Bande	Nichts	WaxFree	PTCL, MLT	2	bi
T4831/06	EKH	k.A.	mk	Brusthöhle	pos.	1.498	Bande	Nichts	WaxFree	PTCL, MLT	4	oligo
T4229/06	EKH	1	w	LK	neg.	1.399	Bande	Nichts	WaxFree	TCLL	0	poly
T3980/06	EKH	2	mk	LK	pos.	1.521	Bande	Nichts	WaxFree	TCLL	0	poly
T3494/06	EKH	14	m	LK	neg.	1.548	Bande	Nichts	WaxFree	TCLL	0	poly
T3105/06-1	EKH	15	mk	Darm	neg.	1.414	Bande	Bande	WaxFree	ITCL	1	mono
T2559/06	EKH	9	mk	Darm	neg.	1.344	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	1	mono
T1691/06	EKH	13	wk	Muskulatur	neg.	1.315	Bande	Nichts	WaxFree	PTCL, MLT	1	mono
S1318/06	EKH	12	wk	Darm	neg.	1.745	Bande	Bande	Gentra	ITCL	0	poly
T706/06	EKH	k.A.	wk	Darm	neg.	1.375	Bande	Nichts	WaxFree	ALCL	1	mono
T610/06	k.A.	3	wk	LK	pos.	1.529	Bande	Bande	WaxFree	TCLL	2	bi
S372/06-1	k.A.	1	m	KM	neg.	1.647	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	3	oligo
S372/06-2	k.A.	1	m	Milz	neg.	1.660	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	3	oligo
S372/06-3	k.A.	1	m	Leber	neg.	1.583	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	3	oligo
S372/06-4	k.A.	1	m	LK	neg.	0.883	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	3	oligo

Fortsetzung nächste Seite

9. Anhang

Tabelle 21 (Fortsetzung): Tagebuchnummer (Tgbnr.), Rasse, Alter, Geschlecht, Organ, FeLV-Status, DNS-Qualität (A1/A2 = Verhältnis der Extinktion bei 260° zu der bei 280° bei der photometrischen Messung), Amplifikation von Kontrollfragmenten (MS175bp, MS300bp), Methode der DNS-Isolation, WHO-Klassifikation, Anzahl der Banden, Klonalitätsgruppe der T-Zell-Lymphosarkome (k.A.= keine Angabe).

Tgbnr.	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Organ	FeLV	DNS-Qualität (A1/A2)	MS 175bp	MS 300bp	Isolation	WHO	Anzahl Banden	Gruppe Final
T107/06	k.A.	8	mk	Darm	neg.	1.379	Bande	Nichts	T20/Chelex	ITCL	1	mono
T74/06-1	k.A.	9	mk	Darm	neg.	1.438	Bande	Nichts	T20/Chelex	ITCL	1	mono
T18/06-1	k.A.	0,7	k.A.	LK	neg.	1.505	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	1	mono
T8645/05-2	EKH	14	wk	LK	neg.	1.558	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCCLL	4	oligo
T8472/05	EKH	k.A.	k.A.	Haut	neg.	1.586	Bande	Nichts	T20/Chelex	CEL, MF	2	bi
T8065/05-2	EKH	k.A.	k.A.	Darm	neg.	1.400	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	3	oligo
T7808/05-1	k.A.	8	mk	Darm	neg.	1.426	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	5	oligo
T5634/05	EKH	10	mk	Haut	neg.	1.412	Bande	Bande	WaxFree	CNEL	3	oligo
T4281/05-1	EKH	10	wk	Darm	neg.	1.185	Bande	Nichts	WaxFree	ITCL	1	mono
T4261/05	EKH	9	mk	Lunge	neg.	1.525	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL, MIT	2	bi
T4219/05-2	EKH	10	mk	Nickhaut	neg.	1.464	Bande	Bande	WaxFree	PTCL, MLT	2	bi
T3558/05	RB	14	w	Haut	neg.	1.572	Bande	Nichts	T20/Chelex	Angiocentric L	1	mono
T2791/05	k.A.	13	mk	Haut	neg.	1.326	Bande	Nichts	WaxFree	CNEL	1	mono
T2747/05	NWK	7	mk	Auge	neg.	0.952	Bande	Nichts	WaxFree	PTCL, MLT	3	oligo
T1769/05-1	EKH	14	mk	Darm	neg.	0.629	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL, MLT	1	mono
T1769/05-2	EKH	14	mk	Niere	neg.	0.643	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL, MLT	1	mono
T1769/05-3	EKH	14	mk	Leber	neg.	1.054	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL, MLT	1	mono
S1017/05-1	EKH	8	mk	Herz	pos.	0.302	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL, MLT	2	bi
S1017/05-2	EKH	8	mk	ME	pos.	0.950	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL, MLT	1	mono
S1017/05-4	EKH	8	mk	Magen	pos.	0.598	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL, MLT	1	mono
S1017/05-5	EKH	8	mk	KM	pos.	1.309	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL, MLT	0	poly
T808/05-1	EKH	13	mk	Darm	neg.	1.512	Bande	Bande	WaxFree	ITCL	4	oligo
T808/05-3	EKH	13	mk	Netz	neg.	1.342	Bande	Bande	WaxFree	ITCL	2	bi
S106/05-1	OKH	6	w	LK	neg.	0.872	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	4	oligo
S106/05-2	OKH	6	w	Leber	neg.	1.131	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	4	oligo
S106/05-3	OKH	6	w	Thymus	neg.	1.151	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	4	oligo
S106/05-4	OKH	6	w	KM	neg.	0.978	Bande	Bande	T20/Chelex	TCLL	2	bi
S106/05-5	OKH	6	w	Milz	neg.	0.493	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	4	oligo
T9205/04	EKH	k.A.	k.A.	LK	neg.	1.216	Bande	Nichts	WaxFree	TCLL	3	oligo
T8060/04	EKH	12	wk	Haut	neg.	1.355	Bande	Nichts	WaxFree	PTCL, MLT	3	oligo
T8026/04	EKH	14	wk	Haut	neg.	1.444	Bande	Bande	WaxFree	CEL, MF	2	bi
T7899/04-1	EKH	17	wk	Darm	neg.	1.525	Bande	Bande	WaxFree	ITCL	1	mono
T7899/04-2	EKH	17	wk	Darm	neg.	1.093	Bande	Bande	WaxFree	ITCL	1	mono
T7511/04	k.A.	k.A.	k.A.	LK	neg.	1.506	Bande	Nichts	WaxFree	TCLL	0	poly
T6581/04	EKH	11	mk	LK	neg.	1.471	Bande	Nichts	WaxFree	TCLL	3	oligo
S1771/04-1	EKH	4,5	w	Thymus	pos.	1.228	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	2	bi
S1771/04-3	EKH	4,5	w	LK	pos.	0.899	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	2	bi
S1205/04-3	k.A.	k.A.	k.A.	LK	neg.	0.877	Nichts	Nichts	T20/Chelex	TCCLL	1	mono
S1454/03-1	EKH	5,5	wk	Milz	pos.	0.577	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	3	oligo
S1454/03-2	EKH	5,5	wk	LK	pos.	0.571	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	3	oligo
S915/03-1	EKH	7	mk	Darm	pos.	0.426	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL, MLT	2	bi
S915/03-2	EKH	7	mk	Milz	pos.	0.542	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL, MLT	2	bi
S915/03-3	EKH	7	mk	Niere	pos.	1.065	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL, MLT	2	bi
S156/03	EKH	5	wk	Mediastinum	pos.	1.102	Nichts	Nichts	T20/Chelex	TCCLL	4	oligo
399/00	EKH	3	w	Mediastinum	pos.	1.501	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	3	oligo

Fortsetzung nächste Seite

9. Anhang

Tabelle 21 (Fortsetzung): Tagebuchnummer (Tgbnr.), Rasse, Alter, Geschlecht, Organ, FeLV-Status, DNS-Qualität (A1/A2 = Verhältnis der Extinktion bei 260° zu der bei 280° bei der photometrischen Messung), Amplifikation von Kontrollfragmenten (MS175bp, MS300bp), Methode der DNS-Isolation, WHO-Klassifikation, Anzahl der Banden, Klonalitätsgruppe der T-Zell-Lymphosarkome (k.A.= keine Angabe).

Tgbnr.	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Organ	FeLV	DNS-Qualität (A1/A2)	MS 175bp	MS 300bp	Isolation	WHO	Anzahl Banden	Gruppe Final
1379/99	EKH	15	wk	Darm	neg.	1.545	Bande	Nichts	T20/Chelex	ITCL	1	mono
358/99	EKH	0,7	w	Niere, Leber, LK	pos.	1.545	Bande	Bande	T20/Chelex	ALCL	0	poly
1989/98	EKH	7,5	wk	Darm	neg.	1.455	Bande	Bande	T20/Chelex	ITCL	0	poly
1275/98	EKH	2	mk	Darm, LK, Leber	neg.	1.423	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL	0	poly
908/98	EKH	3	mk	Mediastinum	pos.	1.528	Bande	Bande	T20/Chelex	TCLL	0	poly
394/97	EKH	2	m	Mediastinum	pos.	1.514	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	3	oligo
1944/96	EKH	3	m	LK, Thymus, Darm, Milz, Fett	pos.	1.341	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL	7	oligo
994/96	EKH	9	wk	Lunge, Leber, Milz, KM, LK	pos.	1.527	Bande	Bande	T20/Chelex	ITCL	2	bi
15/96	EKH	0,7	m	Darm	pos.	1.600	Bande	schwach	T20/Chelex	ITCL	0	poly
835/95	Perser	5	wk	Ösophagus	neg.	1.643	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL	0	poly
1883/94	EKH	k.A.	m	Milz, Darm, LK, Fett	pos.	1.549	Bande	Bande	T20/Chelex	ITCL	3	oligo
1028/94	EKH	10	w	Lk, Leber, Niere, Lunge	pos.	1.537	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	2	bi
217/94	EKH	0,75	w	Mediastinum	neg.	1.590	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	3	oligo
4005/93	k.A.	9	wk	Milz	neg.	1.597	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL	4	oligo
2019/93	k.A.	13	wk	Darm, Leber	neg.	1.712	Bande	Bande	T20/Chelex	ITCL	1	mono
1062/93	k.A.	19	wk	Gehirn, RM	neg.	1.602	Bande	Bande	T20/Chelex	ITCL	2	bi
761/93	Siam	2	w	Thymus	neg.	1.572	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL	4	oligo
93/93	EKH	13	mk	Darm	neg.	1.553	Bande	Nichts	T20/Chelex	ITCL	6	oligo
6114/92	k.A.	7	wk	Darm, LK	pos.	1.685	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	4	oligo
1357/92	EKH	10	mk	Niere, Milz, Leber, Lunge, Darm	pos.	1.429	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	0	poly
752/92	EKH	2	w	Gehirn	pos.	1.163	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	1	mono
280/92	EKH	10	wk	Darm	neg.	1.591	Bande	Nichts	T20/Chelex	ITCL	4	oligo
4559/91	EKH	3	mk	Darm, Milz, LK	pos.	1.640	Bande	schwach	T20/Chelex	PTCL	0	poly
3484/91	EKH	10	wk	Milz, Niere	neg.	1.635	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	1	mono
813/91	EKH	1	wk	Mediastinum	pos.	1.541	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	4	oligo
484/91	EKH	2	mk	Mediastinum	pos.	1.341	Bande	schwach	T20/Chelex	PTCL	0	poly
7385/90	EKH	8	mk	Haut	neg.	1.521	Bande	Nichts	T20/Chelex	CEL, MF	1	mono
5258/90	EKH	4	mk	Mediastinum	pos.	1.672	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	2	bi
2958/90	EKH	8	mk	Leber, Milz	neg.	1.547	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	1	mono
2155/90	EKH	12	mk	Darm	neg.	1.495	Bande	Nichts	T20/Chelex	ITCL	3	oligo
1945/90	Perser	5	mk	Niere	neg.	1.463	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	3	oligo
1584/90	EKH	8	mk	Leber, Thymus, Muskel	neg.	1.507	Bande	Nichts	T20/Chelex	TCLL	2	bi
738/90	EKH	k.A.	k.A.	Thymus	pos.	1.494	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	3	oligo
6752/89	EKH	4	m	Milz, LK	pos.	1.593	Bande	schwach	T20/Chelex	PTCL	0	poly
6277/89	EKH	7	wk	Darm, Pankreas, LK	neg.	1.702	Bande	Bande	T20/Chelex	PTCL	2	bi
6088/89	EKH	2	w	Darm, LK	pos.	1.658	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	0	poly
2556/89	EKH	1,5	mk	Thymus	pos.	1.418	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	2	bi
2548/89	DSH	0,8	mk	Milz, Leber	pos.	1.662	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	1	mono
5525/88	SIM	1	mk	Mediastinum	neg.	1.677	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	5	oligo
4328/88	SIM	1	w	Mediastinum	pos.	1.705	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	3	oligo

Fortsetzung nächste Seite

9. Anhang

Tabelle 21 (Fortsetzung): Tagebuchnummer (Tgbnr.), Rasse, Alter, Geschlecht, Organ, FeLV-Status, DNS-Qualität (A1/A2 = Verhältnis der Extinktion bei 260° zu der bei 280° bei der photometrischen Messung), Amplifikation von Kontrollfragmenten (MS175bp, MS300bp), Methode der DNS-Isolation, WHO-Klassifikation, Anzahl der Banden, Klonalitätsgruppe der T-Zell-Lymphosarkome (k.A.= keine Angabe).

Tgbnr.	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Organ	FeLV	DNS-Qualität (A1/A2)	MS 175bp	MS 300bp	Isolation	WHO	Anzahl Banden	Gruppe Final
4009/88	EKH	5	mk	Mediastinum	pos.	1.606	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	7	oligo
2600/88	k.A.	13	mk	Darm	neg.	1.610	Bande	Nichts	T20/Chelex	ITCL	2	bi
2535/88	DLH	1	wk	Niere, Leber, Milz, LK	neg.	1.712	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	5	oligo
7409/87	k.A.	3	mk	LK	pos.	1.638	Bande	schwach	T20/Chelex	PTCL	0	poly
162/87	DLH	11	mk	Leber	neg.	1.418	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	1	mono
8287/84	EKH	1	m	LK, Muskel, Milz	pos.	1.651	Bande	Nichts	T20/Chelex	ALCL	0	poly
6343/84	EKH	0,2	m	Niere, LK	pos.	1.500	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	3	oligo
3668/83	EKH	3	wk	Milz	pos.	1.627	Bande	Nichts	T20/Chelex	PTCL	4	oligo

9. Anhang

Tabelle 22: Tagebuchnummer (Tgbnr.), WHO-Klassifikation, Zellreife (ZR), Nekrosegrad, Anzahl reaktiver T- (rT) bzw. B-Zellen (rB), Verteilung der immunhistologischen Reaktion in der Zelle (Zytop.) bzw. im Tumor (Vert.), Stärke der immunhistologischen Reaktion (k.A. = keine Angabe).

Tgbnr.	WHO	ZR	Nekrose	rT	rB	Zytop.	Stärke	Vert.
S1204/09-1	TCLL	Blasten	(+)	+	+	diffus	++	+++
S1126/09	k.A.	Blasten	+++	-	-	diffus	(+)	++
T989/08	CNEL	Blasten	(+)	-	-	diffus	++	++
S24/08	TCLL	Blasten	++	-	-	diffus	+	+++
T5140/07	CNEL	Blasten	++	(+)	+	diffus	++	+++
T4596/07	ITCL	Blasten	-	-	(+)	intermediär	++	+++
T4393/07	PTCL	Blasten	+++	-	(+)	intermediär	++	+++
T3111/07-1	ITCL	Blasten	+	-	(+)	diffus	++	+++
T2101/07	PTCL	mittel	++	(+)	+	diffus	+	++
T2086/07-1	CNEL	Blasten	+	+	+	diffus	++	+++
T1511/07	TCLL	mittel	+++	-	-	diffus	+	+
T853/07	ITCL	Blasten	+	+	+	diffus	++	+++
T296/07-1	TCLL	Blasten	+	-	-	diffus	+	+++
T8031/06	PTCL	Blasten	(+)	(+)	(+)	Zellgrenze	+	+++
T6478/06	ITCL	Blasten	++	+	++	diffus	(+)	++
T5718/06	ITCL	kleine reife L	-	+	++	diffus	++	+++
T5035/06-1	ITCL	Blasten	++	-	+	diffus	++	+++
T4957/06	PTCL	mittel	(+)	-	+	diffus	+	++
T4831/06	PTCL	Blasten	+++	-	-	diffus	+	+++
T4229/06	TCLL	Blasten	+	+	++	diffus	++	++
T3980/06	TCLL	Blasten	+	(+)	++	Zellgrenze	++	++
T3494/06	TCLL	Blasten	(+)	+	+	diffus	(+)	++
T3105/06-1	ITCL	kleine reife L	-	+	(+)	diffus	++	++
T2559/06	ITCL	Blasten	+	(+)	+	diffus	+	+++
T1691/06	PTCL	Blasten	++	++	++	diffus	(+)	++
S1318/06	ITCL	mittel	-	+	-	diffus	(+)	++
T706/06	ALCL	Blasten	+	-	-	diffus	(+)	+++
T610/06	TCLL	mittel	+	+	+	Zellgrenze	++	+
S372/06-1	TCLL	mittel	-	-	-	intermediär	++	+++
T107/06	ITCL	mittel	++	-	-	diffus	(+)	+++
T74/06-1	ITCL	Blasten	(+)	-	(+)	diffus	+	++
T18/06-1	TCLL	Blasten	(+)	+	+	intermediär	++	++
T8645/05-2	TCCLL	mittel	-	+	++	Zellgrenze	++	+++
T8472/05	CEL,MF	kleine reife L	+	(+)	+	diffus	++	+++
T8065/05-2	ITCL	Blasten	-	+	+	intermediär	++	+++
T7808/05-1	ITCL	Blasten	+	+	+	diffus	++	+++
T5634/05	CNEL	Blasten	+	+	+	diffus	+	+++
T4281/05-1	ITCL	Blasten	++	+	+	diffus	++	++
T4261/05	PTCL	Blasten	+	-	-	Zellgrenze	++	++
T4219/05-2	PTCL	mittel	++	-	(+)	diffus	+++	+++
T3558/05	Angiocentric L	Blasten	++	+	+	diffus	++	++
T2791/05	CNEL	kleine reife L	-	+	++	diffus	+++	+++
T2747/05	PTCL	Blasten	+	(+)	+	diffus	+	+++
T1769/05-1	PTCL	Blasten	++	+	-	diffus	+	+++
S1017/05-1	PTCL	Blasten	-	-	-	diffus	+	+
T808/05-3	ITCL	Blasten	++	-	-	diffus	++	++
S106/05-1	TCLL	mittel	-	-	+	diffus	++	+++
T9205/04	TCLL	mittel	+	+	++	diffus	++	++

Fortsetzung nächste Seite

9. Anhang

Tabelle 22 (Fortsetzung): Tagebuchnummer (Tgbnr.), WHO-Klassifikation, Zellreife (ZR), Nekrosegrad, Anzahl reaktiver T- (rT) bzw. B-Zellen (rB), Verteilung der immunhistologischen Reaktion in der Zelle (Zytop.) bzw. im Tumor (Vert.), Stärke der immunhistologischen Reaktion (k.A. = keine Angabe).

Tgbnr.	WHO	ZR	Nekrose	rT	rB	Zytop.	Stärke	Vert.
T8060/04	PTCL	Blasten	+	+	+	diffus	++	+++
T8026/04	CEL,MF	kleine reife L	(+)	+	+	Zellgrenze	+++	+++
T7899/04-1	ITCL	kleine reife L	(+)	+	(+)	diffus	+	+++
T7511/04	TCLL	kleine reife L	-	+	++	diffus	++	++
T6581/04	TCLL	Blasten	(+)	(+)	+	diffus	+	+++
S1771/04-1	TCLL	Blasten	+	-	+	diffus	+	++
S1205/04-3	TCCLL	mittel	(+)	-	+	diffus	+	++
S1454/04-1	TCLL	mittel	(+)	+	++	diffus	+	++
S915/04-1	PTCL	kleine reife L	-	(+)	(+)	diffus	++	+++
S156/04	TCCLL	kleine reife L	-	-	-	diffus	++	++
399/00	PTCL	Blasten	+	(+)	(+)	diffus	+	++
1379/99	ITCL	kleine reife L	+	-	+	diffus	++	++
358/99	ALCL	mittel	(+)	(+)	+	Zellgrenze	++	++
1989/98	ITCL	Blasten	++	+	+	diffus	+	++
1275/98	PTCL	mittel	-	+	++	diffus	+	++
908/98	TCLL	Blasten	+	+	+	diffus	+	++
394/97	TCLL	Blasten	++	(+)	(+)	diffus	+	++
1944/96	PTCL	Blasten	-	(+)	-	diffus	++	+++
994/96	ITCL	mittel	+	+	+	diffus	++	++
15/96	ITCL	Blasten	++	(+)	+	diffus	++	+
835/95	PTCL	Blasten	+	(+)	+	diffus	++	+
1883/94	ITCL	Blasten	++	+	4	Zellgrenze	++	++
1028/94	PTCL	mittel	++	+	++	diffus	+++	+++
217/94	PTCL	Blasten	+	+	+	diffus	+	+++
4005/93	PTCL	Blasten	+	+	++	diffus	+	++
2019/93	ITCL	mittel	(+)	+	+	diffus	+	++
1062/93	ITCL	mittel	(+)	-	+	diffus	++	++
761/93	PTCL	mittel	+	(+)	+	diffus	+	+++
93/93	ITCL	mittel	++	+	++	diffus	++	++
6114/92	PTCL	Blasten	++	+	+	diffus	+	++
1357/92	TCLL	mittel	+	+	++	diffus	++	++
752/92	PTCL	mittel	-	+	-	diffus	(+)	++
280/92	ITCL	kleine reife L	+	(+)	+	Zellgrenze	+++	++
4559/91	PTCL	mittel	(+)	+	+	diffus	++	++
3484/91	PTCL	Blasten	++	+	++	diffus	+	++
813/91	PTCL	mittel	-	-	(+)	diffus	++	+++
484/91	PTCL	mittel	+	(+)	+	diffus	+	+++
7385/90	CEL,MF	Blasten	-	+	++	diffus	++	++
5258/90	TCLL	Blasten	+++	-	-	diffus	+	++
2958/90	PTCL	Blasten	-	+	+	diffus	+	+++
2155/90	ITCL	Blasten	(+)	-	(+)	diffus	+	++
1945/90	TCLL	Blasten	-	+	+	diffus	+	++
1584/90	TCLL	mittel	(+)	+	+	diffus	+	++
738/90	PTCL	mittel	+	(+)	(+)	diffus	(+)	+++
6752/89	PTCL	Blasten	-	+	++	diffus	++	++
6277/89	PTCL	Blasten	-	+	+	diffus	+	++
6088/89	PTCL	Blasten	(+)	+	++	diffus	++	++
2556/89	PTCL	Blasten	+	+	+	diffus	(+)	+++

Fortsetzung nächste Seite

9. Anhang

Tabelle 22 (Fortsetzung): Tagebuchnummer (Tgbnr.), WHO-Klassifikation, Zellreife (ZR), Nekrosegrad, Anzahl reaktiver T- (rT) bzw. B-Zellen (rB), Verteilung der immunhistologischen Reaktion in der Zelle (Zytop.) bzw. im Tumor (Vert.), Stärke der immunhistologischen Reaktion (k.A. = keine Angabe).

Tgbnr.	WHO	ZR	Nekrose	rT	rB	Zytop.	Stärke	Vert.
2548/89	PTCL	Blasten	-	+	+	Zellgrenze	++	++
5525/88	PTCL	Blasten	-	-	(+)	diffus	+	++
4328/88	PTCL	Blasten	+	-	-	Zellgrenze	+	+
4009/88	PTCL	kleine reife L	-	+	+	diffus	++	++
2600/88	ITCL	mittel	-	+	++	diffus	+	+
2535/88	PTCL	Blasten	-	+	++	diffus	+	+
7409/87	PTCL	Blasten	-	+	++	Zellgrenze	+++	++
162/87	PTCL	mittel	(+)	-	++	diffus	(+)	+++
8287/84	ALCL	Blasten	-	+	++	diffus	++	++
6343/84	PTCL	Blasten	+	+	+	diffus	++	++
3668/83	PTCL	mittel	++	(+)	+	diffus	+	+++

9. Anhang

Tabelle 23: Nachweis der einzelnen Subgruppen mit den Primern aus FR3 und FR4. Die Zahlen entsprechen der Anzahl nachgewiesener Banden bei der jeweils verwendeten Primerkombination (Tgbnr. = Tagebuchnummer).

Tgbnr.	3f1+4r1	3f1+4r2	3f1+4r3	3f3+4r1	3f3+4r2	3f3+4r3	3f4+4r1	3f4+4r2	3f4+4r3
S24/08	3	1							
T4596/07	2			2					
T4393/07	2	2		1					
T3111/07-1	2			1					
T853/07	1								
T296/07-1	3	2		3					
T8031/06	5	1		1					
T5035/06-1	2	1		2					
T4957/06	3								
T4831/06	3			1					
T3105/06-1	1								
T2559/06	1			1					
T1691/06	Schmier	5		Schmier	3	1		Schmier	
T706/06	1								
S372/06-1	2							1	
T107/06	1								
T74/06-1	1								
T8645/05-2	4			3					
T8472/05	1							2	
T8065/05-2	1			1					
T7808/05-1	1	2							
T4281/05-1								1	
T4261/05	2								
T4219/05-2		2		3	2				
T2791/05								1	
T2747/05									
S1017/05-1	3			3					
T808/05-3	5	1							
S106/05-3	1	1		3					
T8060/04	1							1	
T8026/04	1	1		1				1	
T7899/04-1		1							
T6581/04	1								
S1771/04-1	1	1							
S1205/04-3									1
S1454/03-1	2								
S915/03-1	3			1					
S156/03	2			2				2	
399/00	2			2				1	
1379/99									
394/97	2			2					
1944/96	3	1		2	1			3	
994/96	2								
1883/94	2	1		1	1		1	1	
1028/94	1			1					
217/94	3			1					
4005/93	3			3					
2019/93	3			2				1	
1062/93	4			2				1	

Fortsetzung nächste Seite

9. Anhang

Tabelle 23 (Fortsetzung): Nachweis der einzelnen Subgruppen mit den Primern aus FR3 und FR4. Die Zahlen entsprechen der Anzahl nachgewiesener Banden bei der jeweils verwendeten Primerkombination (Tgbnr. = Tagebuchnummer).

Tgbnr.	3f1+4r1	3f1+4r2	3f1+4r3	3f3+4r1	3f3+4r2	3f3+4r3	3f4+4r1	3f4+4r2	3f4+4r3
761/93	4	3		4	3				
93/93	4			2					
6114/92	3			2					
1357/92	3			2					
752/92	1								
280/92	4	2		2					
3484/91						1			
813/91	3							1	
7385/90								1	
5258/90	1			2					
2958/90	1								
2155/90	4			3					
1945/90	3	2		2	1				
1584/90	3	1		2	1				
738/90	3	2		3					
6277/89		2							
2556/89	3								
2548/89	1								
5525/88	1	1		3				3	
4328/88	3			3					
4009/88	8			6				1	1
2600/88			4						
2535/88	3	1		3					
162/87								1	
6343/84	1	2		1				1	
3668/83	3			1					

Tabelle 24: Nachweis der einzelnen Subgruppen mit den Primern aus FR2 und FR4. Die Zahlen entsprechen der Anzahl nachgewiesener Banden bei der jeweils verwendeten Primerkombination (Tgbnr. = Tagebuchnummer).

Tgbnr.	2f1+4r1	2f1+4r2	2f1+4r3	2f4+4r1	2f4+4r2	2f4+4r3
T989/08	2					
T1511/07					1	
T610/06	2					
T18/06-1						
T5634/05	1					
T3558/05						
T1769/05-1				1		
T9205/04	1					

9.1.2 B-Zell-Lymphosarkome und Kontrollen

Tabelle 25: Tagebuchnummer (Tgbnr.), Alter, Rasse, Geschlecht, Organ, FeLV-Status, Methode der DNS-Isolation, WHO-Klassifikation/histologische Diagnose, Klonalitätsgruppe der B-Zell-Lymphosarkome und der reaktiven Veränderungen (k.A. = keine Angabe).

Tgbnr.	Alter (Jahre)	Rasse	Geschlecht	Organ	FeLV	Isolation	WHO/Histo	Gruppe Final
B-Zelllymphosarkome								
T8581/07-1	5	EKH	mk	Lk	k.A.	T20/Chelex	follicular center cell lymphoma II	pseudo
T6850/07-1	7	EKH	mk	Unterhaut	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	nichts
T6286/07	k.A.	EKH	k.A.	Herz	neg.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	pseudo
T5735/07-1	k.A.	EKH	k.A.	Darm	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	pseudo
T85/07-2	k.A.	MC	k.A.	Lk	neg.	T20/Chelex	follicular center cell lymphoma II	poly
T5953/06	10	k.A.	mk	Niere	neg.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	poly
T5912/06	3	EKH	mk	Lk	pos.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	pseudo
T5518/06	12	EKH	wk	Unterhaut	neg.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	pseudo
T2949/06	15	k.A.	wk	Unterhaut	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	poly
T2561/06	10	EKH	wk	Magen	pos.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	nichts
T1573/06-1	10	EKH	wk	Unterhaut	neg.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	nichts
T1484/06	k.A.	k.A.	m	Lk	neg.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	nichts
T8787/05-1	4	MC	mk	Niere	neg.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	nichts
T8602/05-1	10	k.A.	wk	Caecum	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	nichts
T7777/05	10	k.A.	mk	Unterhaut	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	nichts
T7654/05-2	k.A.	EKH	k.A.	Magen	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	nichts
T3642/05	k.A.	Karthäuser	w	Lk	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	poly
T2822/05	11	EKH	m	Unterhaut	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	poly
T2074/05-2	9	EKH	w	Auge	k.A.	T20/Chelex	diffuse large B-cell lymphoma	poly
T980/05	7	EKH	mk	Unterhaut	k.A.	T20/Chelex	follicular center cell lymphoma II	poly
Polyklonale Kontrollen								
T454/08	2	MC	w	LK	k.A.	T20/Chelex	follikuläre Hyperplasie	poly
T368/08-3	13	EKH	mk	LK	k.A.	T20/Chelex	follikuläre Hyperplasie	poly
S253/08	0,7	EKH	w	LK	k.A.	Puregene	follikuläre Hyperplasie	poly
S144/08	0,6	EKH	m	Thymus	k.A.	Puregene	obB	poly
S133/08	9	MC	w	Darm	k.A.	Puregene	Fibrose, lymphoplasmazelluläre Infiltration	poly
S132/08	1	k.A.	m	Thymus	k.A.	Puregene	obB	poly
S118/08	0,2	Perser	k.A.	Thymus	k.A.	Puregene	obB	poly
S110/08	k.A.	EKH	wk	Darm	k.A.	Puregene	chronische Enteritis	oligo
S85/08	14	EKH	mk	Darm	k.A.	Puregene	forgeschrüttene postmortale Veränderungen	oligo
S84/08	0,4	Heilige Birma	mk	Thymus	k.A.	Puregene	obB	poly
S71/08	2	EKH	mk	Thymus	k.A.	Puregene	obB	poly
S69/08	k.A.	EKH	mk	Darm	k.A.	Puregene	obB	poly
T9788/07-1	1	MC	wk	LK	k.A.	T20/Chelex	ausgeprägte Hyperplasie (Vorstadium Lyphom?)	poly
S593/07-1	0,5	NWK	m	LK	neg.	Puregene	follikuläre Hyperplasie	poly
S593/07-2	0,5	NWK	m	Darm	neg.	Puregene	follikuläre Hyperplasie	poly
T7974/05	0,3	EKH	w	LK	k.A.	T20/Chelex	pyogranulomatöse Lymphadenitis, follikuläre Hyperplasie	poly
T7547/05	14	EKH	w	LK	k.A.	T20/Chelex	follikuläre Hyperplasie	poly
T1600/05	0,6	EKH	w	LK	k.A.	T20/Chelex	follikuläre Hyperplasie	poly
S1412/05	1,3	Karthäuser	w	LK	neg.	T20/Chelex	follikuläre Hyperplasie	poly
T878/05	15	k.A.	mk	LK	k.A.	T20/Chelex	follikuläre Hyperplasie	oligo

9.1.3 Sequenzen

9.1.3.1 Veröffentlichte Sequenz des felinen TRG (Weiss, 2008)

Vergleich der felinen V-Regionen:

```
fTRG-V1: 1 GCGATCAGTC TGA CTCAGCG G---GCTGTG GTGGTGGAGC GCGTGGGTGG CTTGGCCACC
fTRG-V2: 1 GCGATCAGCC TGGGGCAGCC C---TCTATG GTCGTGGCGC AGGCAGGCCG CTCAGCCACT
fTRG-V3: 1 GCGATCAGTG TGGAGCAGCC A---GCCGTG GTGGTGGCAC GTGCAGGCAG CTGGGCCACA
fTRG-V4: 1 ---ATTTTCA TAACACAATT CGTACCATCC ATTACCAAGA AAAAAAGGAAA CACAGCATTT

fTRG-V1: 61 CTGGGGTGCA AAGCCAGCAC CAAGGTCAGC TAC----- -----ATCCA CTGGTACCAC
fTRG-V2: 61 CTGTCCTGCC AAGCCAGCGC CTACGTCCGC TAC----- -----ATCCA CTGGTACCCTC
fTRG-V3: 61 CTGCCCTGCA AAGCCAGCAC CTCGGTCAGC TAC----- -----ATCCA CTGGTACCCTC
fTRG-V4: 61 TTAGAATGCC AAGTAAAAAC GGGTGTCTTA AAGAAAAACG TAAATATACA CTGGTATCGA

fTRG-V1: 121 CACCAGGAGG GGA CTGCGCC CAAGAGGATC CTCATGCTGG ACATGTCAAG GTTATCTGTG
fTRG-V2: 121 CACCAGGAAG GTGCGGCCCC CAAGAGGCTC CTCAGACTGG ACATGTCCGG AACGTTTGTG
fTRG-V3: 121 CACCAGGAGG GTACAGCCCC CAAGAGGATC CTCATGCTGG ATATGTCCAG CTCATATGTG
fTRG-V4: 121 CAGAGGCCAG ACCAGCCTCT AAAACGCATT CTGTATATTT CCTCAAATGA AAATGTG---

fTRG-V1: 181 CAGAGATATG GGGGCTTGAA AGCGGACAAA ATCGATGCCA AGAAAGGCCA GGAAAGCAAC
fTRG-V2: 181 CAGAAAGATG GGGGCCTGAA TGAGGACAAA GTCAATGCCA AGAGGGGCCA GGGTAGCAAC
fTRG-V3: 181 ACCAAAGATG GTGTCTTGAC AGCAGACAAG GTCCACGCCA AGAAAGGCCA GGATAGCACA
fTRG-V4: 181 GTCCACGAAC AAGGTATTAG TGAGGAAAAA TATGAAGCCA GGAAACGACA GAGGGATTTG

fTRG-V1: 241 AGCTGTGAAC TGTCACTGAA GAAGCTGCAG AAGAGCGACG AGGGCGTGTA C TACTGTGCT
fTRG-V2: 241 AGCTGTGACC TGTCCGTGCT GGAGCTGGAG AAGAGCGACG AGGGCGTGTA C TACTGTGCT
fTRG-V3: 241 AGCTCTAACC TGTGCTGCT GAAGCTGGCG AAGAGCGATG AGGGAGTGTA T TACTGTGCT
fTRG-V4: 241 CCAGCGAGCC TGAGGATACA CAAAATTAGT GAGGAGGATG CTGGTCTGTA T TACTGCGCC

fTRG-V1: 301 GCCTGGGA
fTRG-V2: 301 GCCTGGGA
fTRG-V3: 301 GTTTGGGA
fTRG-V4: 301 TGCTGGGA
```

Vergleich der felinen J-Regionen:

```
fTRGJ1.1: 1 -----TG GGTATGGCTG GGCTTACAAA GTATTTGGTG CTGGCACACT GCTCAGGGTC
fTRGJ1.2: 1 -----GGTTG GGTATGGCTG GGCCACAAA GTGTTCCGGTCT CTGGCACACT GCTCAGGGTC
fTRGJ1.3: 1 -GGTATGGCT GGTATAGCTG GGGCAACAAA GTGTTCCGGTCT CTGGCACACT GCTCAGGGTC
fTRGJ1.4: 1 -----TG GGTATGGTTG GGCCACAAA GTGTTCCGGC CTGGCACACT GCTCAGGGTC
fTRGJ1.5: 1 -----ATT GGTATAGCTG GGACCACAAA GTGTTTGGTCT CTGGCACACT GCTCAGGGTC
fTRGJ2.1: 1 ----- -TGAATCAGG CTGGATCATG GTATTTGCAG AAGGAACTAA GGTCATCGTA
fTRGJ2.2: 1 ----- ATGAACCAGG CTGGATCAAG ATATTTGCAG AAGGAACTAA GCTCATAGTA
fTRGJ3: 1 TATTATGGAT GGGGATCTA CAAAAAATAA AATCCTCCTC CCAAACCTGA GATCTGGATT

fTRGJ1.1: 61 ACAG-----
fTRGJ1.2: 61 ACAG-----
fTRGJ1.3: 61 ACAG-----
fTRGJ1.4: 61 ACAG-----
fTRGJ1.5: 61 ACAG-----
fTRGJ2.1: 61 ACTCCCCCGG
fTRGJ2.2: 61 ACTCCCCCGG
fTRGJ3 : 61 ACAG-----
```

9.1.3.2 Veröffentlichte Sequenz der Klone (Weiss, 2008), die zur Überprüfung der Primer für das diagnostische System verwendet wurden.

52.2

```

1 CGAAGCAGAA CCATGCTGGG TCCCCTCGCC CTCCTGTGTG CCCTCCTGTT TCCAGGTGGC
61 GTGGCAGCGA TCAGCCTGAC TCAGCGGGCT GTGGTGGTGG AGCGCGTGGG TGGCTTGGCC
121 AACCTGTCCT GCCAAGCCAG CGCCTCCGTC AGCTACATCC ACTGGTACCT CCACCAGGAG
181 GGGACTGCGC CCAAGAGGAT CCTCAGGCTG GACATGTCAA GGTATCTGT GCAGAAGTAT
241 GGGGGCTTGG AAGCGGACAA AATCGATGCC AAGAAAGGCA AGGAAAGCAA CAGCTGTGAA
301 CTGTCAGTGA AGAAGCTGCA GAAGAGCGAC GAGGGCGTGT ACTACTGTGC TGCCTGGGAC
361 GGGTATGGCT GGGCTTACAA AGTATTTGGT GCTGGCACAC TGCTCAGGGT CACAGATAAA
421 AATCCTGATG AAGACACTTC TCCCAAGCCC ACAATTTTTT TTACTTCAAT TGCTGAAGTA
481 AACCTCCAT

```

C1C23.19

```

1 GGGGGATAGG GGGCCCTCTG CCACCCACCC AGTCTCCTTC CAGCAGGTGC AGCTGGGAGG
61 TCACCTTGGG CTTCTCTCCA CAGGTGGGAA GCAGAACCAT GCTGGGTCCC CTCGCCTTCC
121 TGTGCGCCCT CCTGTTTTCC GGCAGCTGGG CAGCGATCAG CCTGGGGCAG CCCTCTATGG
181 TCGTGGCGCA GGCAGGCCGC TCAGCCACTC TGGGGTGCAA AGCCAGCACC AAGGTCAGCT
241 ACATCCACTG GTACCACCAC CAGGAAGGTG CGGCCCCCAA GAGGCTCCTC AGACTGGACA
301 TGTCCGGAAC GTTTGTGCAG AAAGATGGGG GCCTGAATGA GGACAAAAGT AATGCCAAGA
361 GGGGCAAGGG TAGCAACAGC TGTGACCTGT CCGTGCTGGA GCTGGAGAAG AGCGACGAGG
421 GCGTGTACTA CTGTGCTGCC CACAAAGTGT TCGGTCCTGG CACTGTGCTC AGGGTCACAG
481 CTAAGGCCC TGATGAAGAC ACTTCCCCCA AGCCCACGAT TTTTCTTCTT TCAATTGCTG
541 AAAGAAAAC CCACAAGGCT GGAACGTATC TTTGTCTTCT TGAGGATTTT TTCCCTGATG
601 TTATCAATGT AGATTGAAAG AGAAAAATGG CAGAGTAATA TTGAAATCCC AGCAGGGAAA
661 CAAATCACGA

```

PCR57.3.21

```

1 CATCCACTGG TACCTCCACC AGGAAGGTGC GGCTCCCAAG AGGCTCCTCA GACTGGACAT
61 GTCCGGAACG TTTGTGAAGA AAGATGGGGG CCTGAATGAG GACAAAAGTCA ATGCCAAGAG
121 GGGCAAGGGT AGCAACAGCT GTGACCTGTC CGTGCTGGAG CTGGAGAAGA GCGACGAGGG
181 CGTGTACTAC TGTGCTGCCT GGGAAAGCTGG GTATGGCTGG GCCACAAAAG TGTTCGGTCC
241 TGGCACACTG CTCAGGGTTA CAGCTAAAAG CCCTGATGAA GACTTCCC CCAAGCCCAC
301 GATTTTTCTT CTTTCAATTG CTGAAAGAAA ACTCCACAAG GCTGGAACGT ATCTTTGTCT
361 TCTTGAGGAT TTTTCCCTG ATGTTATCAA TGTAGATTGG AAAGAGAAAA ATGGCAGAGT
421 AATATTGAAA TCCCAGCAGG GAAACACCAT G

```

62.6

```

1 GGAAGCAGAA CCATGCTGGG TCCCCTCGCC TTCCTGTGCG CCCTCCTGTT TCCCGGTGAT
61 GTGGCAGCGA TCACTGTGGA GCAGCCAGCC GTGGTGGTGG CACGTGCAGG CAGCTGGGCC
121 AACTGCCCTT GCAAAGCCAG TATTTCCGGT AGCTACATCC ACTGGTACCG CCACCAGGAG
181 GGTACAGCCC CCAAGAGGAT CCTCATGCTG GATATGTCCA GTCATATGT GACCAAAGAT
241 GGTGTCTTGA CAGCAGACAA GGTCCACGCC AAGAAAGGCA AGGATAGCAC AAGCTCTAAC
301 CTGTTGCTGC TGAAGCTGGC GAAGAGCGAT GAGGGAGTGT ATTACTGTGC TGTTTGGGAA
361 GATCAGAGTT TTGCGGGGGG ATCTACAAAA AAAAAATCCT CCTCCCAAAC CTGAGATCTG
421 GATTACAGAT GAACGTCCTG TTGAGAACAT TTCCCCAAAG CCTACAATTT TTC

```

9. Anhang

C1C23.20

```
1 GGGGGATAGG GGCAGCTGGG AGGTCACCCT GGGCTTCTCT CCACCAGCGG GGAAGCAGAA
61 CCATGCTGGG TCCCCTCGCC TTCCTGTGCG CCCTCCTGTT TCCCGGTGAT GTGGCAGCGA
121 TCAGTGTGGA GCAGCCAGCC GTGGTGGTGG CACGTGCAGG CAGCTGGGCC AACTGCCCT
181 GCAAAGCCAG CACCTCGGTC AGCTACATCC ACTGGTACCG CCACCAGGAG GGTACAGCCC
241 CCAAGAGGAT CCTCATGCTG GATATGTCCA GTCATATGT GACCAAAGAT GGTGTCTTGA
301 CAGCAGACAA GGTCCACGCC AAGAAAGGCA AGGATAGCAC AAGCTCTAAC CTGTTGCTGC
361 TGAAGCTGGC GAAGAGCGAT GAGGGAGTGT ATTACTGTGC TGTTTGGGAA GATAGTTATT
421 GGTATAGCTG GGACCACAAA GTGTTTGGTC CTGGCACACT GCTCAGGGTC ACAGATAAAA
481 ATCCTGATGA AGACACTTCT CCCAAGCCCA CAATTTTTCT TCCTTCAATT GCTGAAGTAA
541 ACCTCCATAA GGCTGGAACA TATCTTCTC TTCTTGAGGA TTTTTTCCCT GATGTTATCG
601 AGATAGATTG GAAAGAACAG GATGGCAAAA CAATTCTGAC GTCCCAACAG GGAAACACCA
661 TGAAGACTAA GGACACATAC
```

C1C367.3

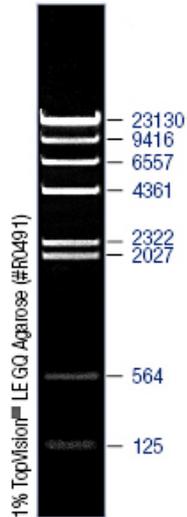
```
1 GGGGGATAGG GGCTCTTACG GCAACAGCCA CCAGATCTGC GCTGTGATCA GCCCCGTATT
61 CAACCACCTC TCCTGACAAG TGCTGGCAGA ATGTGGCTCC TGTCCCGGCT GGTCCCTGGT
121 GCCTCCCTTT GCAGCTATAC AAGTGGAGGC ATTTTCATAA CACAATTCGT ACCATCCATT
181 ACCAAGAAAA AAGGAAACAC AGCATTTTTA GAATGCCAAG TAAAAACGGG TGTCTTAAAG
241 AAAACGTAA ATATACTG GTATCGACAG AGGCCAGACC AGCCTCTAAA ACGCATTTCTG
301 TATATTTCTT CAAATGAAAA TGTGGTCCAC GAACAAGGTA TTAGTGAGGA AAAATATGAA
361 GCCAGGAAAC GACAGAGGGA TTTGCCAGCG AGCCTGAGGA TACACAAAAT TAGTGAGGAG
421 GATGCTGGTC TGTATTACTG CGCCTGCTGG GATGAATCAG GCTGGATCAA GATATTTGCA
481 GAAGGAACTA AGCTCATAGT AACTCCCCCG GATAAAAGCC CTGATGAAGA CACTTCCCCC
541 AAGCCACGA TTTTTCTTCC TTCACCTGCT GAAAGAACAC TCCAT
```

V4.1.3

```
1 GTATTCAACC ACCTCTCCTG ACAAGTGCTG GCAGAATGTG GTCCTGTGCC CGGCTGGTCC
61 TGGTGGCCTC CTTTTGCAGC TATACAAGTG GAGGCATTTT CATAACACAA TTCGTACCAT
121 CCATTACCAA GAAAAAAGGA AACACAGCAT TTTTAGAATG CCAAGTAAAA ACGGGTGTCT
181 TAAAGAAAAA CGTAAATATA CACTGGTATC GACAGAGGCC AGACCAGCCT CTAAAACGCA
241 TTCTGTATAT TTCCTCAAAT GAAAATGTGG TCCACGAACA AGGTATTAGT GAGGAAAAAT
301 ATGAAGCCAG GAAACGACAG AGGGATTTGC CAGCGAGCCT GAGGATACAC AAAATTAGTG
361 AGGAGGATGC TGGTCTGTAT TACTGCGCCT GCTGGGATGA ATCAGGCTGG ATCAAGATAT
421 TTGCAGAAGG AACTAAGCTC ATAGTAACTC CCCCAGATAA AAGCCCTGAT GAAGACACTT
481 CCCCCAAGCC CACGATTTTT CTTCTTTCAC CTGCTGAAAG AACACTCCAT AAGACTGGAA
541 CATATCTTTC TCTTCTTGAG GATT
```

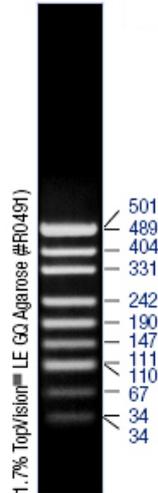
9.2. Abbildungen

9.2.1 Verwendete Längenstandards



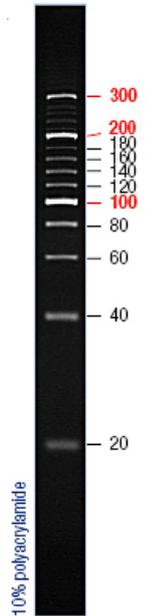
0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

Abbildung 72: λ Hind III mit Angabe der Länge der Banden in bp (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)



0.5µg/lane, 8cm length gel,
1XTBE, 5V/cm, 1.5h

Abb. 73: pUC19/MSPI mit Angabe der Längen der Banden in bp (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)



0.5 µg/lane,
20 cm length gel,
1X TBE, 8 V/cm, 3 h

Abb. 74: SM1323, O'Range Ruler™ 20 bp DNA Ladder mit Angabe der Länge der Banden in bp (MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

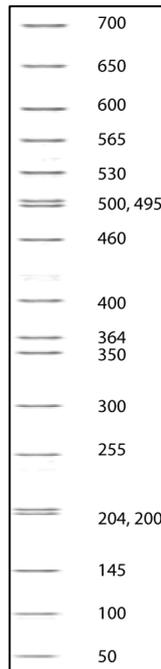
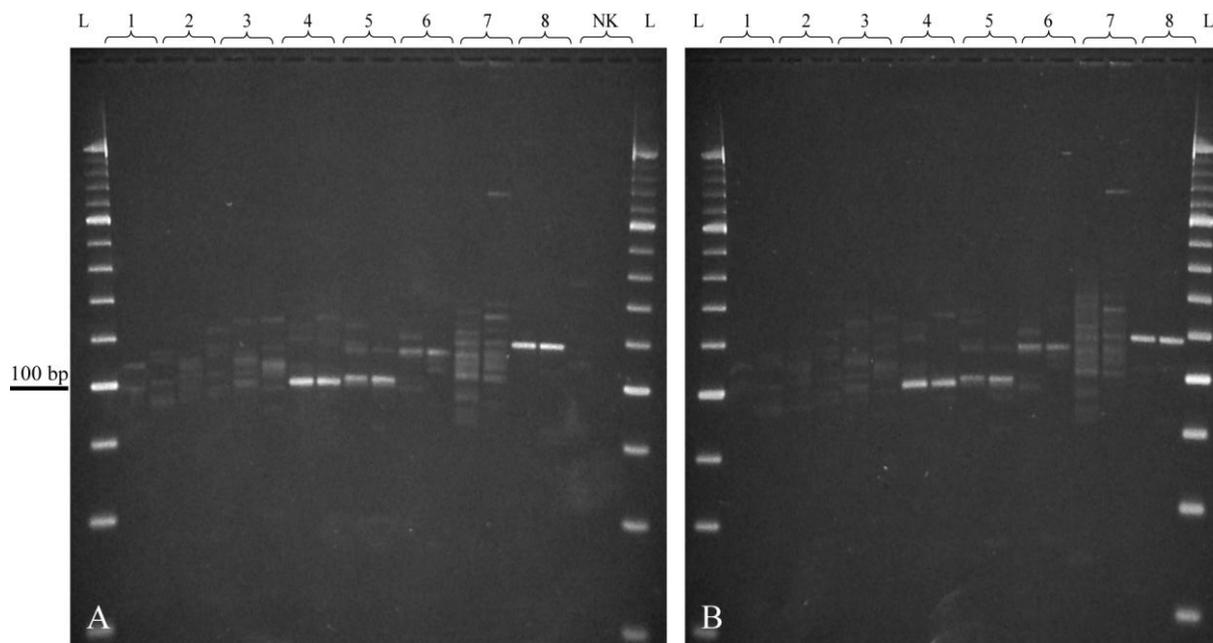


Abb. 75: IRDye 800 50-700 mit Angabe der Länge der Banden in b (LI-COR® Biosciences, Bad Homburg)

9.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

9.2.2.1 T-Zell-Lymphosarkome

In Abbildungen 76 bis 84 sind die Ergebnisse der Multiplex-PCR der T-Zell-Lymphosarkome, amplifiziert mit den *Senseprimern* aus FR3 und den *Antisenseprimern* aus FR4, an Beispielen dargestellt.



L: Längenstandard SM1323; NK: Negativkontrolle;

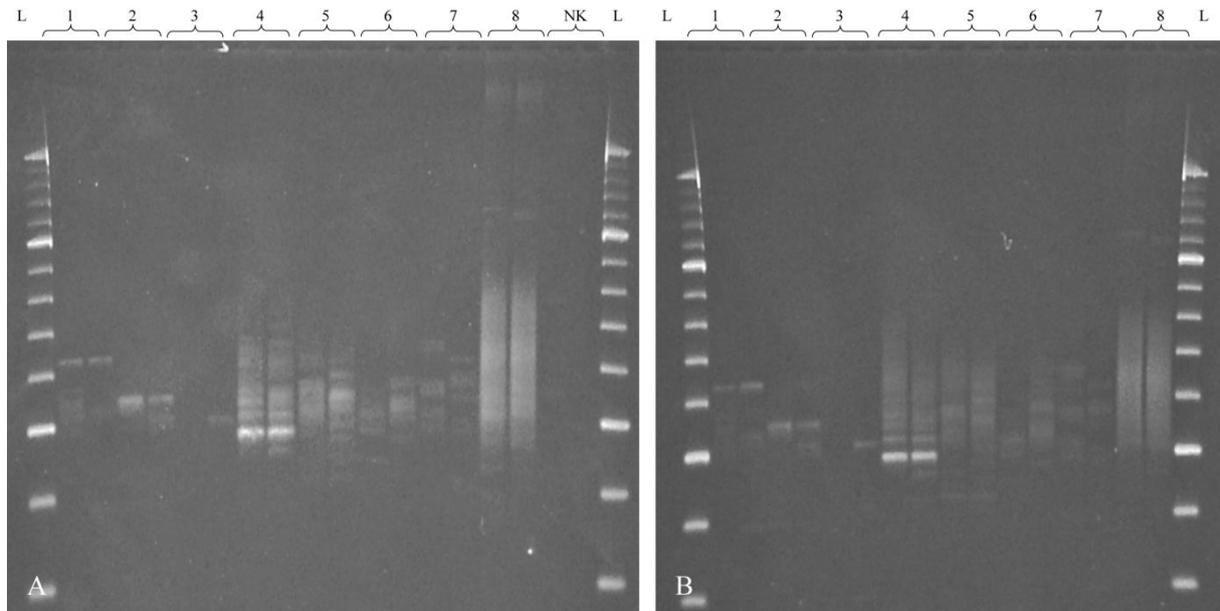
1: Fall T5140/07; 2: Fall T2101/07; 3: Fall T2086/07-1; 4: Fall T853/07;

5: Fall T3105/06-1; 6: Fall T2559/06; 7: Fall S1318/06; 8: Fall T706/06;

A: PCR; B: HDA.

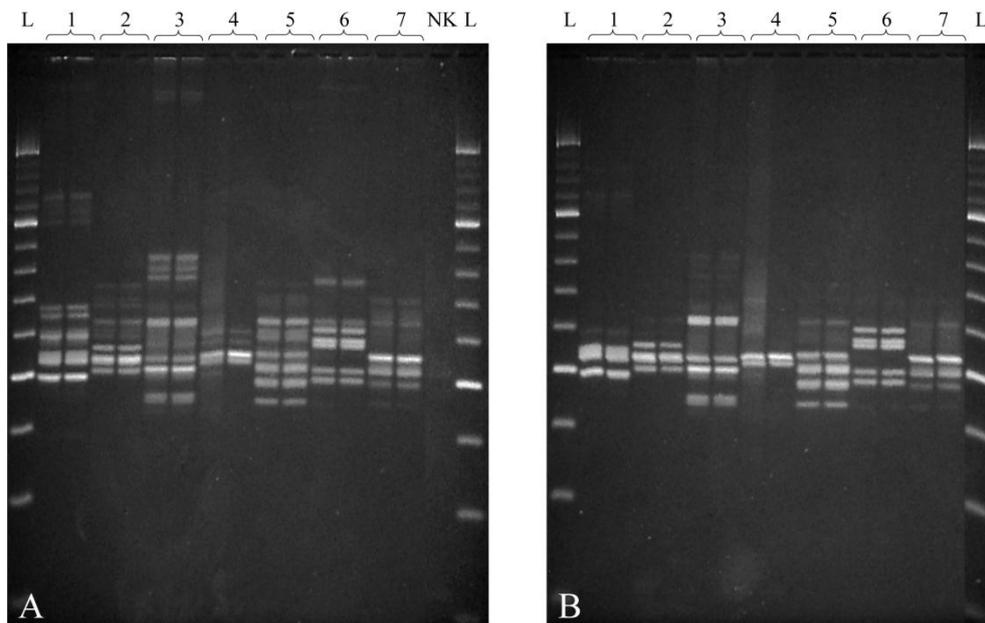
Abbildung 76: Fall T5140/07: nicht reproduzierbare Banden, pseudoklonal; Fall T2101/07: nicht reproduzierbare Banden, pseudoklonal; Fall T2086/07-1: nicht reproduzierbare Banden, pseudoklonal; Fall T853/07: 1 Bande, monoklonal; Fall T3105/06-1: 1 Bande, monoklonal; Fall T2559/06: 1 Bande, monoklonal; Fall S1318/06: Leiter, polyklonal; Fall T706/06: 1 Bande, monoklonal. Der schwarze Balken am linken Bildrand kennzeichnet die Referenzbande bei 100 bp.

9. Anhang



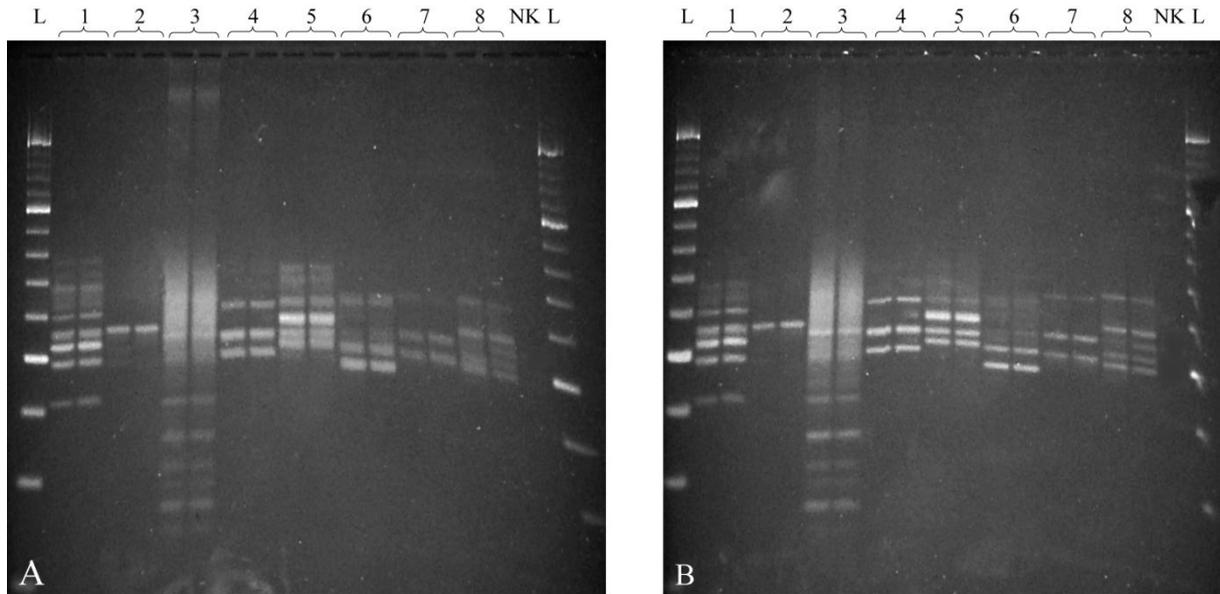
L: Längenstandard SM1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall T107/06; 2: Fall T74/06-1; 3: Fall T4281/05-1; 4: Fall T2791/05;
 5: Fall T7511/04; 6: Fall 358/99; 7: Fall 1989/98; 8: Fall 1275/98;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 77: Fall T107/06: 1 Bande, monoklonal; Fall T74/06-1: 1 Bande, monoklonal; Fall T4281/05-1: Schmier, polyklonal (monoklonal bei Amplifikation mit *Senseprimern* aus FR2); Fall T2791/05: 1 Bande, monoklonal; Fall T7511/04: Schmier, polyklonal; Fall 358/99: Schmier, polyklonal; Fall 1989/98: Schmier, polyklonal; Fall 1275/98: Schmier, polyklonal.



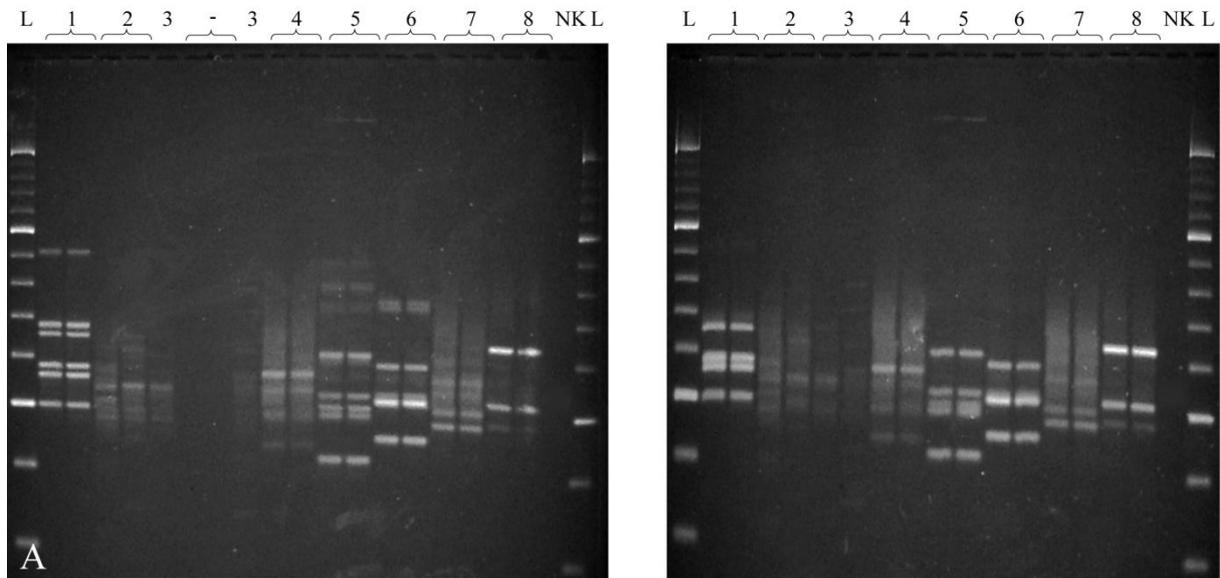
L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall S24/08; 2: Fall T4596/07; 3: Fall T4393/07; 4: Fall T3111/07-1;
 5: Fall T296/07-1; 6: Fall T8031/06; 7: Fall T5035/06-1;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 78: Fall S24/08: 3 Banden, oligoklonal; Fall T4596/07: 3 Banden, oligoklonal; Fall T4393/07: 4 Banden, oligoklonal; Fall T3111/07-1: 2 Banden, biklonal; Fall T296/07-1: 5 Banden, oligoklonal; Fall T8031/06: 5 Banden, oligoklonal; Fall T5035/06-1: 3 Banden, oligoklonal.



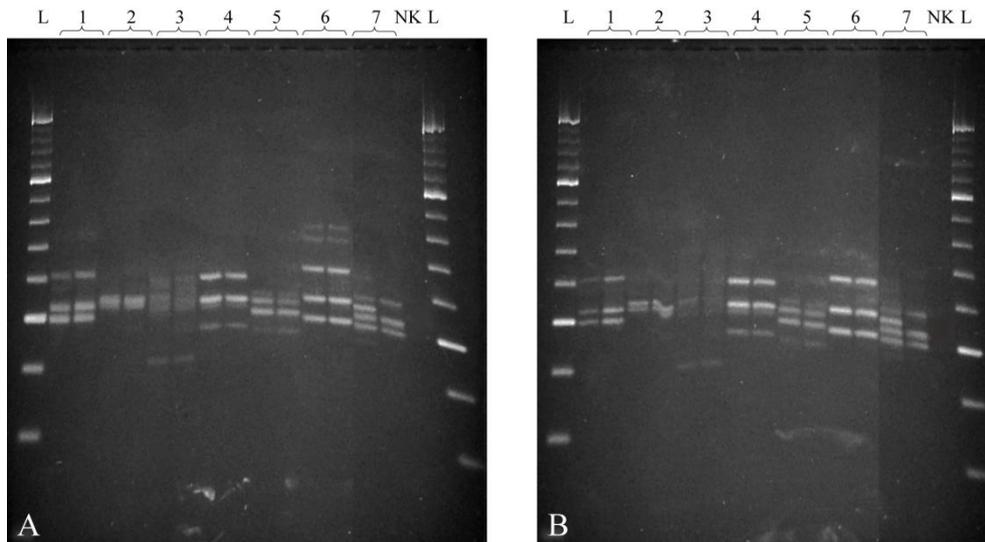
L: Längenstandard SM1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall T4831/06; 2: Fall T2559/06; 3: Fall T1691/06; 4: Fall S372/06-1;
 5: Fall T8645/05-2; 6: Fall T8472/05; 7: Fall T8065/05-2; 8: Fall T7808/05-1;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 79: Fall T4831/06: 4 Banden, oligoklonal; Fall T2559/06: 1 Bande, monoklonal; Fall T1691/06: 1 Bande unter Schmier (s. Abb. 30 unter IV. 6.), monoklonal; Fall S372/06-1: 3 Banden, oligoklonal; Fall T8645/05-2: 4 Banden, oligoklonal; Fall T8472/05: 2 Banden, biklonal; Fall T8065/05-2: 3 Banden, oligoklonal; Fall T7808/05-1: 5 Banden, oligoklonal.



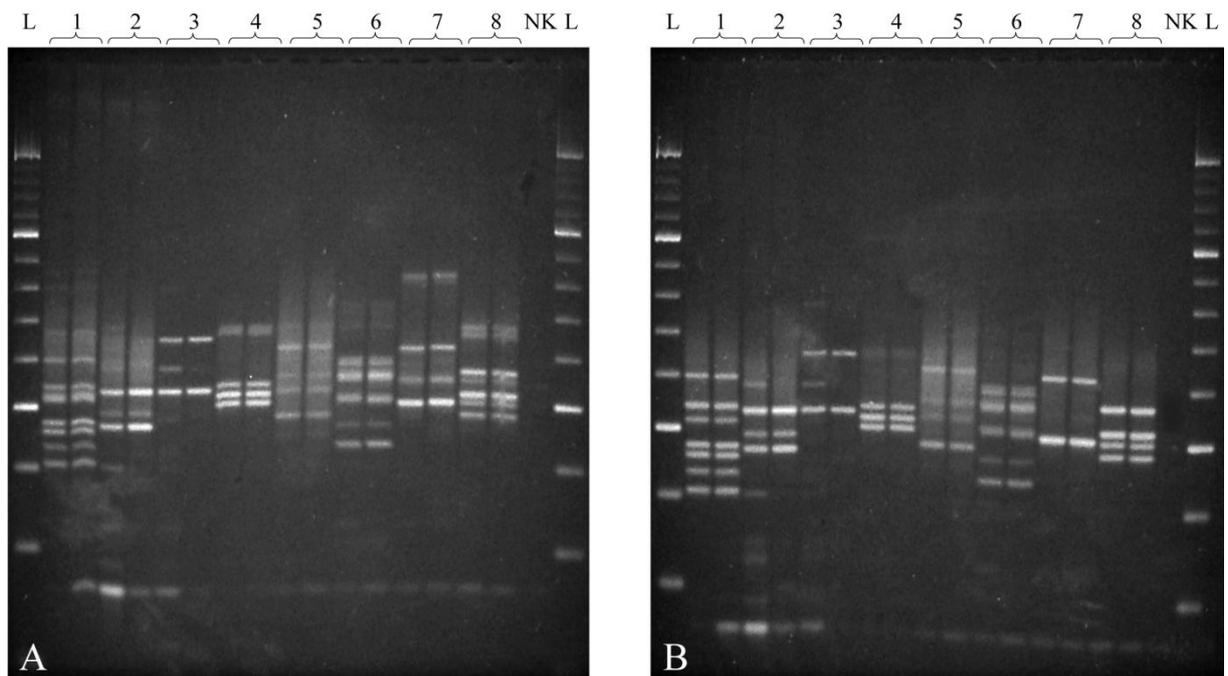
L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall T4219/05-2; 2: Fall T2747/05; 3: Fall T1769/05-2; 4: Fall S1017/05-1;
 5: Fall T808/05-3; 6: Fall S106/05-3; 7: Fall T8060/04; 8: Fall T8026/04;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 80: Fall T4219/05-2: 4 Banden, oligoklonal; Fall T2747/05: 3 Banden, oligoklonal; Fall T1769/05-2: Schmier, polyklonal (monoklonal bei Amplifikation mit *Senseprimern* aus FR2); Fall S1017/05-1: 2 Banden, biklonal; Fall T808/05-3: 5 Banden, oligoklonal; Fall S106/05-3: 4 Banden, oligoklonal; Fall T8060/04: 3 Banden, oligoklonal; Fall T8026/04: 2 Banden, biklonal.



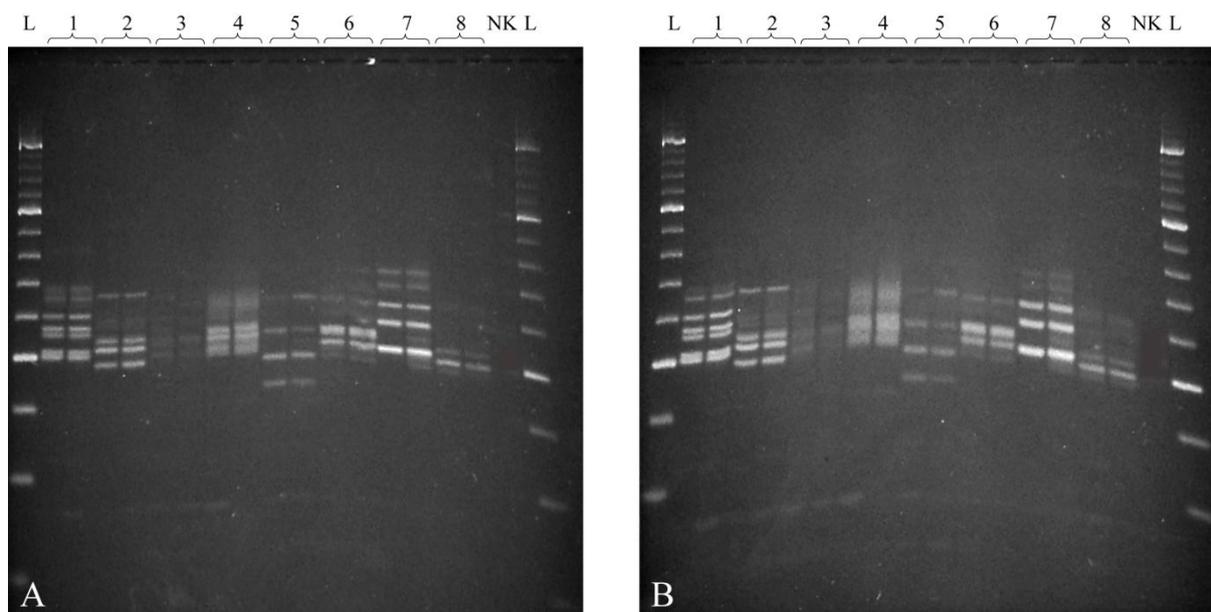
L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall T6581/04; 2: Fall S1771/04-1; 3: Fall S915/03-1; 4: Fall S915/03-3;
 5: Fall S156/03; 6: Fall 399/00; 7: Fall 394/97;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 81: Fall T6581/04: 3 Banden, oligoklonal; Fall S1771/04-1: 2 Banden, biklonal; Fall S915/03-1: 2 Banden, biklonal; Fall S915/03-3: 2 Banden, biklonal; Fall S156/03: 4 Banden, oligoklonal; Fall 399/00: 3 Banden, oligoklonal; Fall 394/97: 3 Banden, oligoklonal, sowie eine nicht reproduzierbare pseudoklonale Bande.



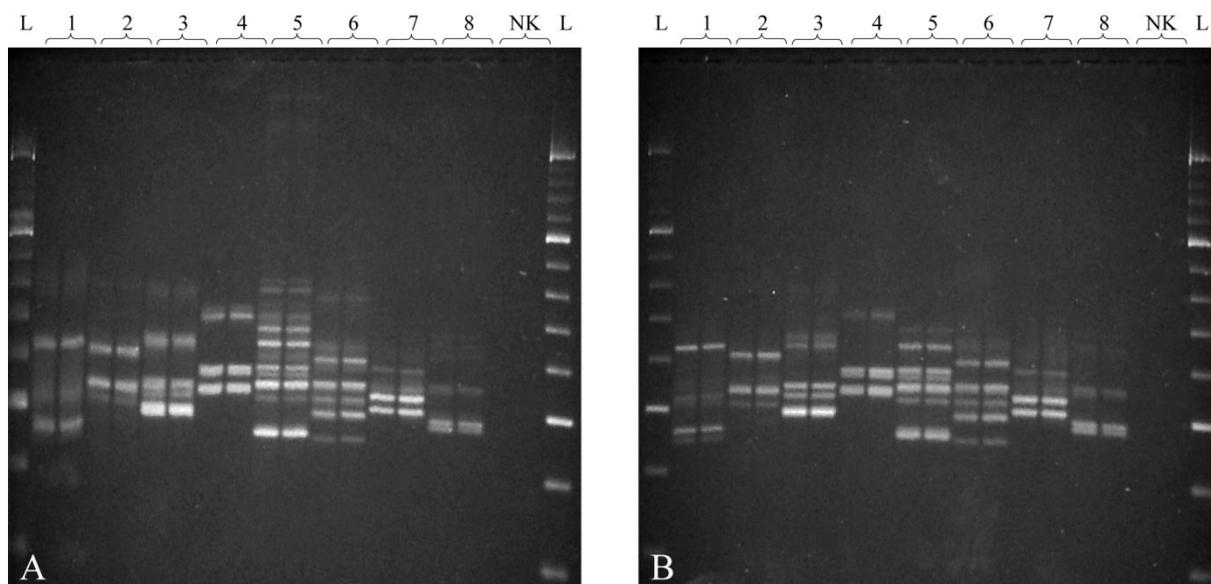
L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall 1944/96; 2: Fall 1883/94; 3: Fall 1028/94; 4: Fall 217/94;
 5: Fall 4005/93; 6: Fall 2019/93; 7: Fall 1062/93; 8: Fall 761/93;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 82: Fall 1944/96: 7 Banden, oligoklonal; Fall 1883/94: 3 Banden, oligoklonal; Fall 1028/94: 2 Banden, biklonal, sowie eine nicht reproduzierbare pseudoklonale Bande; Fall 217/94: 3 Banden, oligoklonal; Fall 4005/03: 4 Banden, oligoklonal; Fall 2019/93: 6 Banden, oligoklonal (monoklonal bei Amplifikation mit *Senseprimern* aus FR2); Fall 1062/93: 2 Banden, biklonal; Fall 761/93: 4 Banden, oligoklonal.



L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall 93/93; 2: Fall 6114/92; 3: Fall 1357/92; 4: Fall 280/92;
 5: Fall 813/91; 6: Fall 5258/90; 7: Fall 2155/90; 8: Fall 1945/90;
 A: PCR; B: HDA.

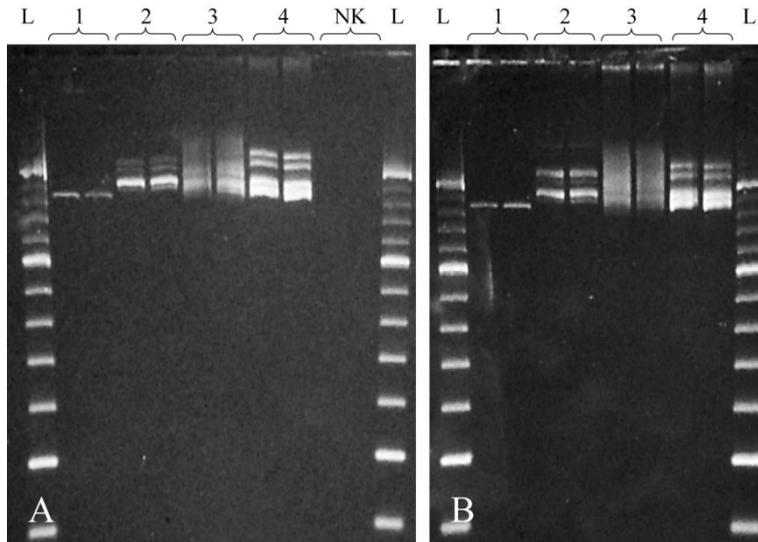
Abbildung 83: Fall 93/93: 6 Banden, oligoklonal; Fall 6114/92: 4 Banden, oligoklonal; Fall 1357/92: Schmier, polyklonal; Fall 280/92: 4 Banden, oligoklonal; Fall 813/91: 4 Banden, oligoklonal; Fall 5258/90: 2 Banden, biklonal; Fall 2155/90: 3 Banden, oligoklonal; Fall 1945/90: 3 Banden, oligoklonal.



L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall 1584/90; 2: Fall 738/90; 3: Fall 5525/88; 4: Fall 4328/88;
 5: Fall 4009/88; 6: Fall 2535/88; 7: Fall 6343/84; 8: Fall 3668/83;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 84: Fall 1584/90: 2 Banden, biklonal; Fall 738/90: 3 Banden, oligoklonal; Fall 5525/88: 5 Banden, oligoklonal; Fall 4328/88: 3 Banden, oligoklonal; Fall 4009/88: 7 Banden, oligoklonal; Fall 2535/88: 5 Banden, oligoklonal; Fall 6343/84: 3 Banden, oligoklonal; Fall 3668/83: 4 Banden, oligoklonal.

In Abbildung 85 sind die Ergebnisse der Multiplex-PCR der T-Zell-Lymphosarkome, amplifiziert mit den *Senseprimern* aus FR2 und den *Antisenseprimern* aus FR4, an einigen Beispielen dargestellt.

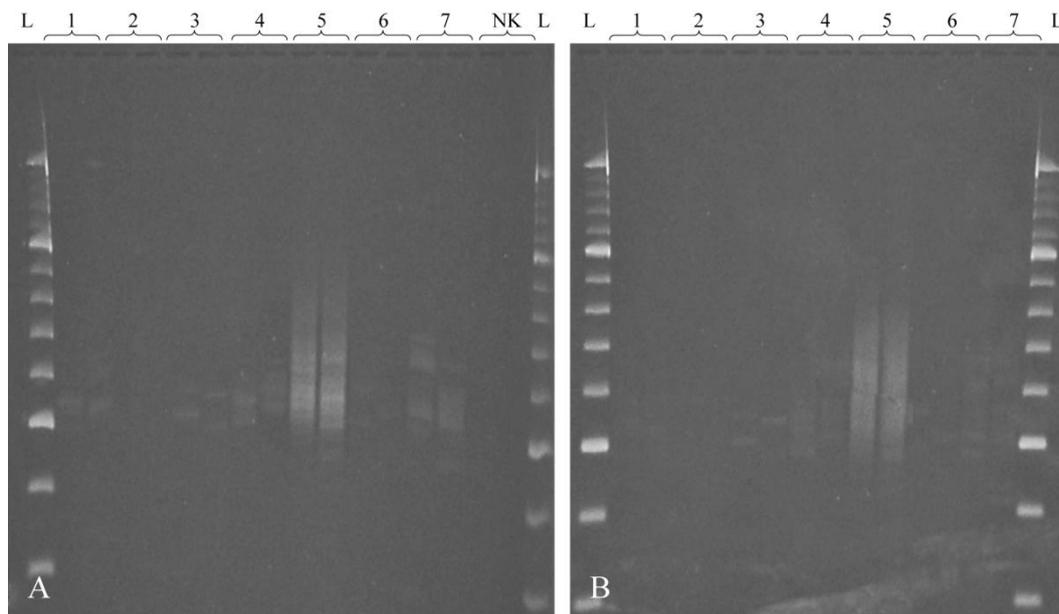


L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall T1511/07; 2: Fall T4219/05-2;
 3: Fall 1275/98; 4: Fall 761/93;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 85: Fall T1511/07: 1 Bande, monoklonal; Fall T4219/05-2: 2 Banden, biklonal; Fall 1275/98: Schmier, polyklonal; Fall 761/93: 2 Banden über einem Schmier, biklonal.

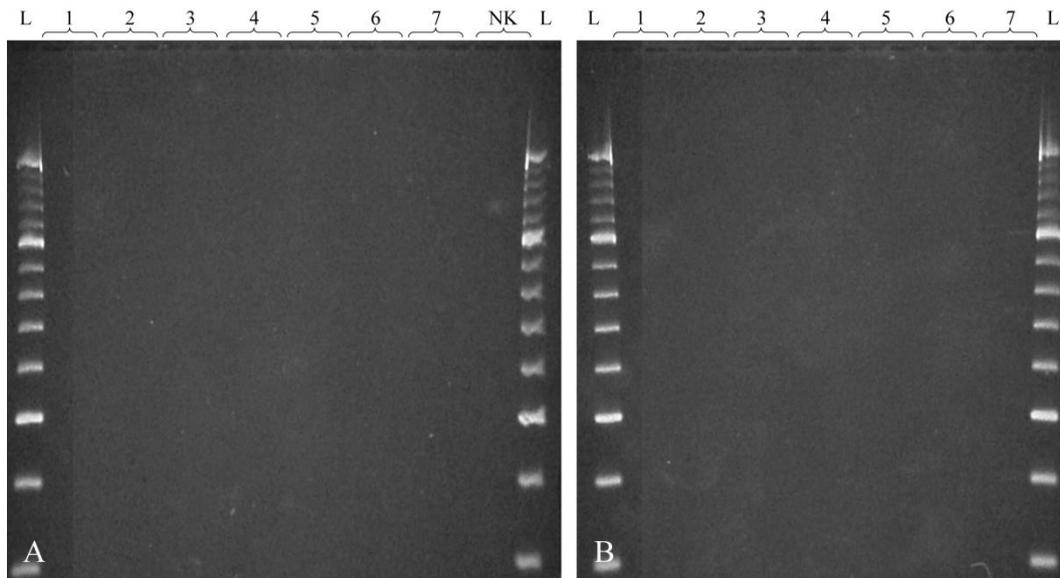
9.2.2.2 B-Zell-Lymphosarkome

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Multiplex-PCR mit den Primern aus FR3 und FR4 bzw. FR2 und FR4 exemplarisch dargestellt.



L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall T8581/07-1; 2: Fall T6850/07-1; 3: Fall T6286/07; 4: Fall T5735/07-1;
 5: Fall T85/07-2; 6: Fall T5912/06; 7: Fall T5518/06;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 86: Fall T8581/07-1: mehrere nicht reproduzierbare Banden, pseudoklonal; Fall T6850/07-1: kein Amplifikat; Fall T6286/07: mehrere nicht reproduzierbare Banden, pseudoklonal; Fall T5735/07-1: mehrere nicht reproduzierbare Banden, pseudoklonal; Fall T85/07-2: Schmier, polyklonal; Fall T5912/06: mehrere nicht reproduzierbare Banden, pseudoklonal; Fall T5518/06: mehrere nicht reproduzierbare Banden, pseudoklonal.

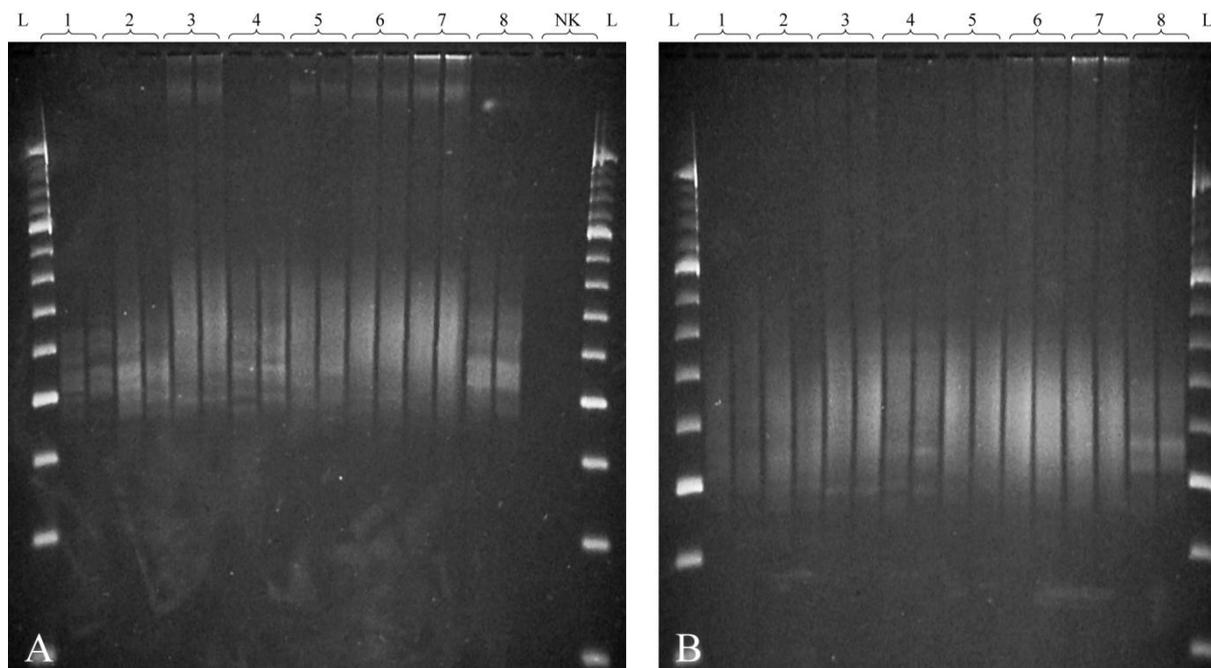


L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
1: Fall T2561/06; 2: Fall T1573/06-1; 3: Fall T1484/06; 4: Fall T8787/05-1;
5: Fall T8602/05; 6: Fall T7777/05; 7: Fall T7654/05;
A: PCR; B: HDA.

Abbildung 87: Fall T2561/06: kein Amplifikat; Fall T1573/06-1: kein Amplifikat; Fall T1484/06: kein Amplifikat; Fall T8787/05-1: kein Amplifikat; Fall T8602/05: kein Amplifikat; Fall T7777/05: kein Amplifikat; Fall T7654/05: kein Amplifikat.

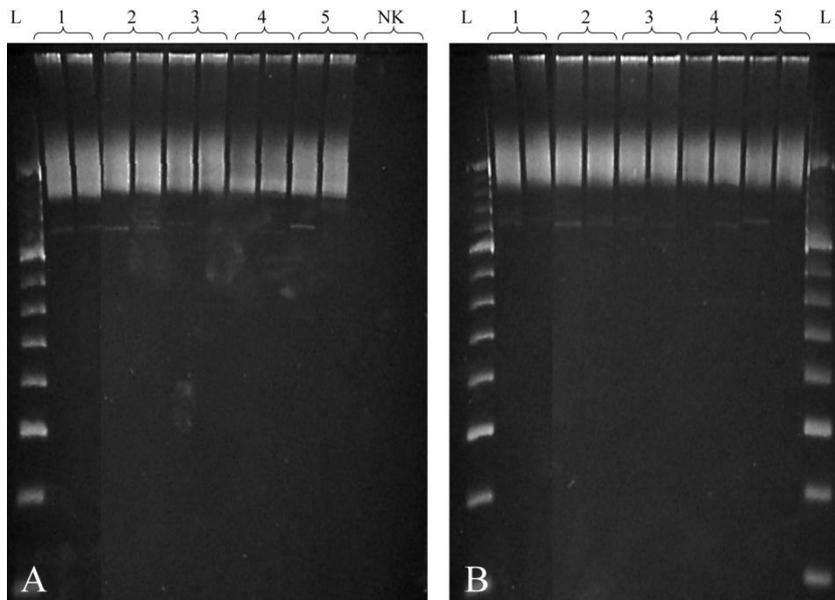
9.2.2.3 Polyklonale Kontrollen

Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele der reaktiven Veränderungen, amplifiziert mit dem Primern aus FR3 und FR4 bzw. FR2 und FR4, die polyklonale Ergebnisse aufweisen. Die Proben, die oligoklonale Ergebnisse aufweisen, sind unter 4.5.3 in Abbildung 28 dargestellt.



L: Längenstandard SM 1323; NK: Negativkontrolle;
 1: Fall T454/08; 2: Fall T368/08-3; 3: Fall S253/08; 4: Fall T9788/07-1;
 5: Fall S144/08; 6: Fall S132/08; 7: Fall S118/08; 8: Fall S133/08;
 A: PCR; B: HDA.

Abbildung 88: Amplifikation mit den *Senseprimern* aus FR3 und den *Antisenseprimern* aus FR4. Alle Proben zeigen nach PCR und HDA im Doppelansatz einen Schmier.



L: Längenstandard SM1323; NK: Negativkontrolle;
1: Fall S593/07(LK); 2: Fall S84/08; 3: Fall S71/08;
4: Fall S69/08; 5: Fall S593/07(Darm);
A: PCR; B: HDA.

Abbildung 89: Amplifikation mit den *Senseprimern* aus FR2 und den *Antisenseprimern* aus FR4. Alle Proben zeigen nach PCR und HDA im Doppelansatz einen Schmier.

9.2.3 Sequencer

Die Abbildungen 90 bis 94 stellen die Ergebnisse der Auflösung der PCR-Produkte mittels Sequencer dar. Am unteren Bildrand (kleiner als 50 b) ist jeweils der sogenannte Primerschmier zu sehen. Dieser wird aus ungebundenen fluoreszenzmarkierten Primern gebildet, die aufgrund ihrer geringen Größe am schnellsten durch das Gel wandern.

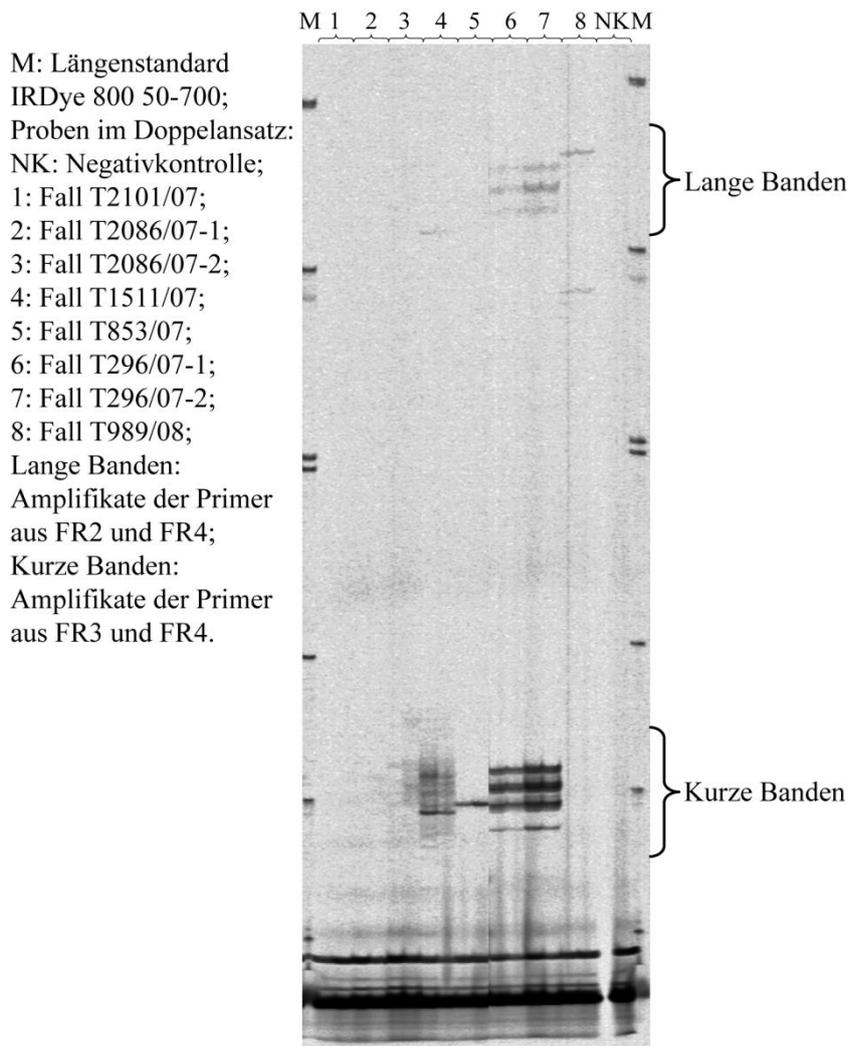


Abbildung 90: Ergebniskontrolle der PCR mittels Sequencer. Fall T2101/07: Schmier, polyklonal; Fall T2086/07-1 und -2: Schmier, polyklonal; Fall T1511/07: 1 Bande, monoklonal; Fall T853/07: 1 Bande, monoklonal; Fall T296/07-1 und -2: 3 Banden, oligoklonal; Fall T989/08: 2 Banden, biklonal.

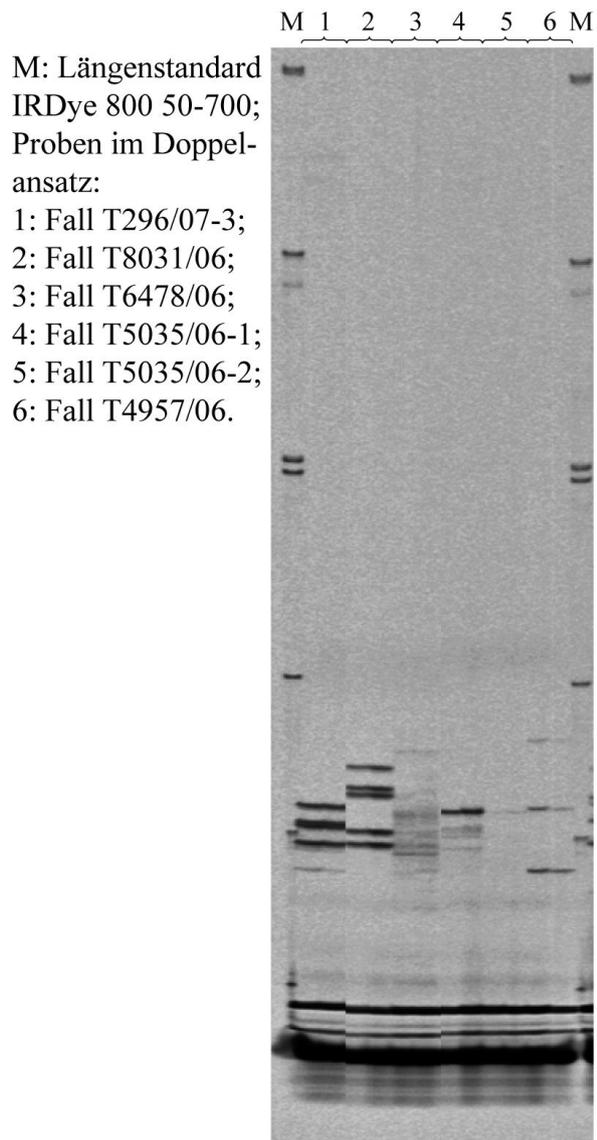


Abbildung 91: Ergebniskontrolle der PCR mittels Sequencer. Fall T296/07-3: 3 Banden, oligoklonal; Fall T8031/06: 5 Banden, oligoklonal; Fall T6478/06: 1 Bande, monoklonal; Fall T5035/06-1: 1 Bande, monoklonal; Fall T5035/06-2: kein Amplifikat, polyklonal; Fall T4957/06: 2 Banden, biklonal.

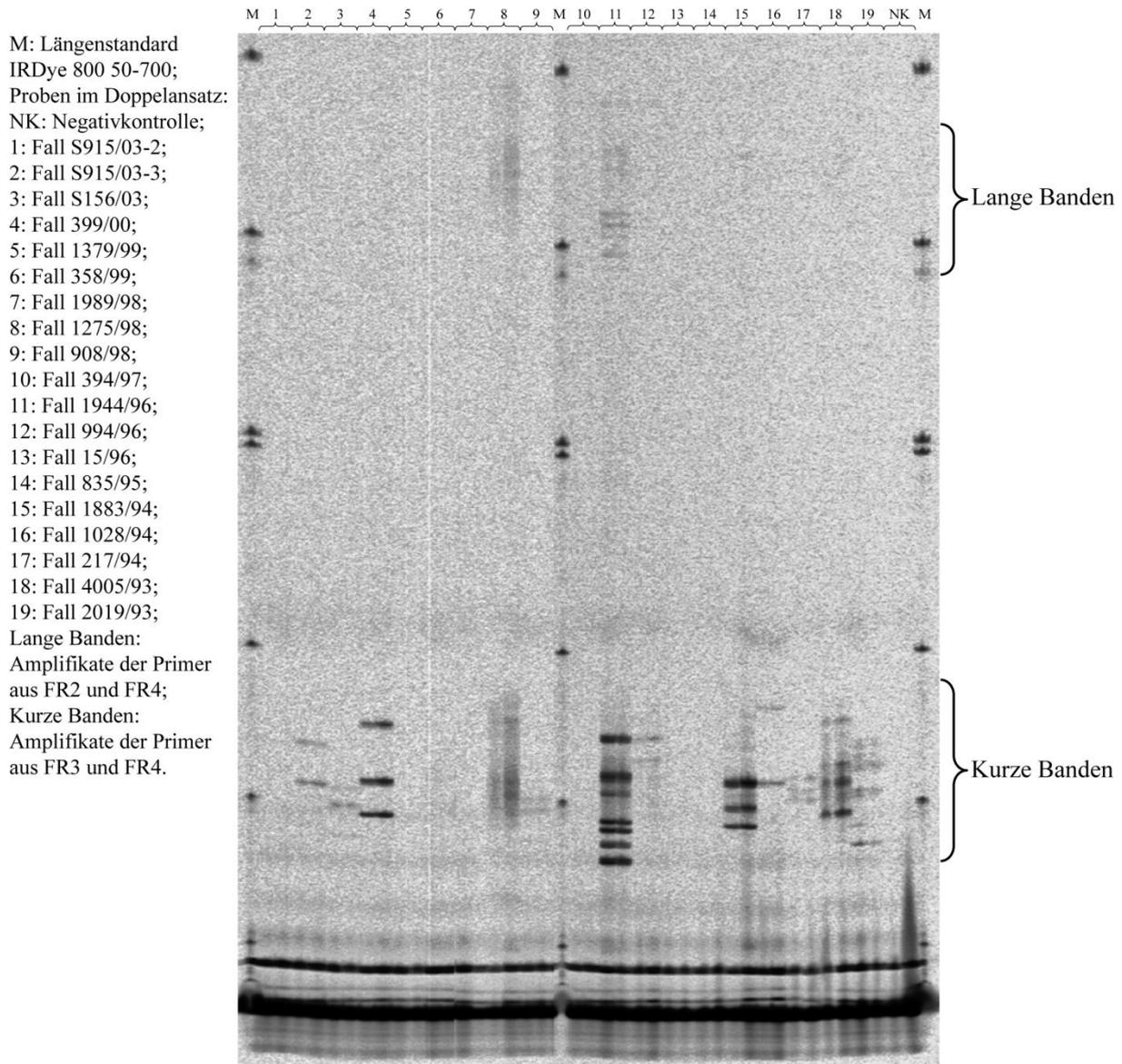


Abbildung 92: Ergebniskontrolle der PCR mittels Sequencer. Fall S915/03-2: kein Amplifikat, polyklonal; Fall S915/03-3: 2 Banden, biklonal; Fall S156/03: 2 Banden, biklonal; Fall 399/00: 3 Banden, oligoklonal; Fall 1379/99: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 358/99: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 1989/98: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 1275/98: Schmier, polyklonal; Fall 908/98: 2 Banden, biklonal; Fall 394/97: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 1944/96: 7 Banden, oligoklonal; Fall 994/96: 2 Banden, biklonal; Fall 15/96: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 835/95: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 1883/94: 3 Banden, oligoklonal; Fall 1028/94: 1 Bande, monoklonal; Fall 217/94: 3 Banden, oligoklonal; Fall 4005/93: 4 Banden, oligoklonal; Fall 2019/93: 5 Banden, oligoklonal.

9. Anhang

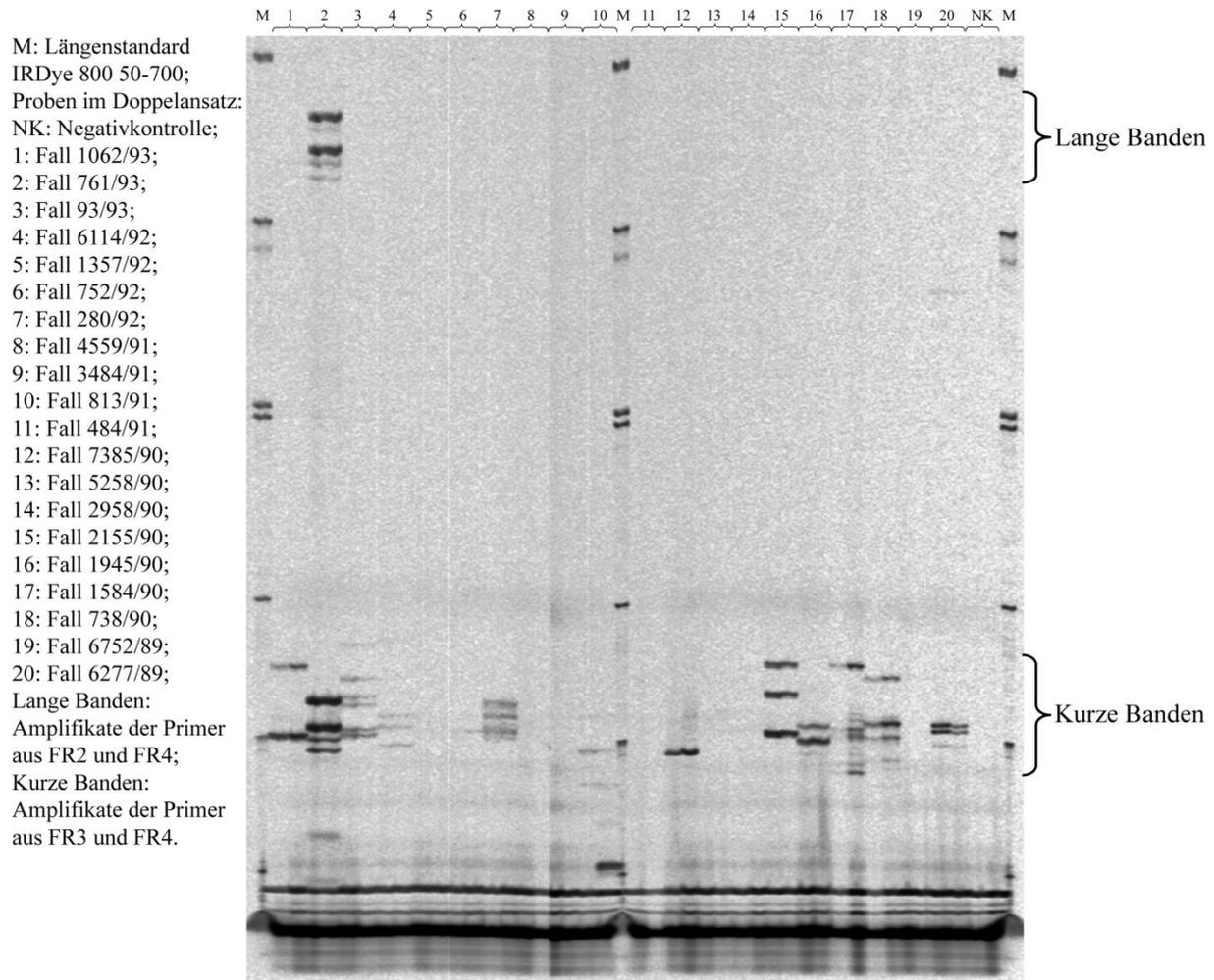


Abbildung 93: Ergebniskontrolle der PCR mittels Sequencer. Fall 1062/93: 2 Banden, biklonal; Fall 761/93: 4 Banden, oligoklonal; Fall 93/93: 6 Banden, oligoklonal; Fall 6114/92: 3 Banden, oligoklonal; Fall 1357/92: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 752/92: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 280/92: 3 Banden, oligoklonal; Fall 4559/91: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 3484/91: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 813/91: 3 Banden, oligoklonal; Fall 484/91: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 7385/90: 1 Bande, monoklonal; Fall 5258/90: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 2958/90: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 2155/90: 3 Banden, oligoklonal; Fall 1945/90: 2 Banden, biklonal; Fall 1584/90: 1 Bande, monoklonal; Fall 738/90: 3 Banden, oligoklonal; Fall 6752/89: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 6277/89: 2 Banden, biklonal.

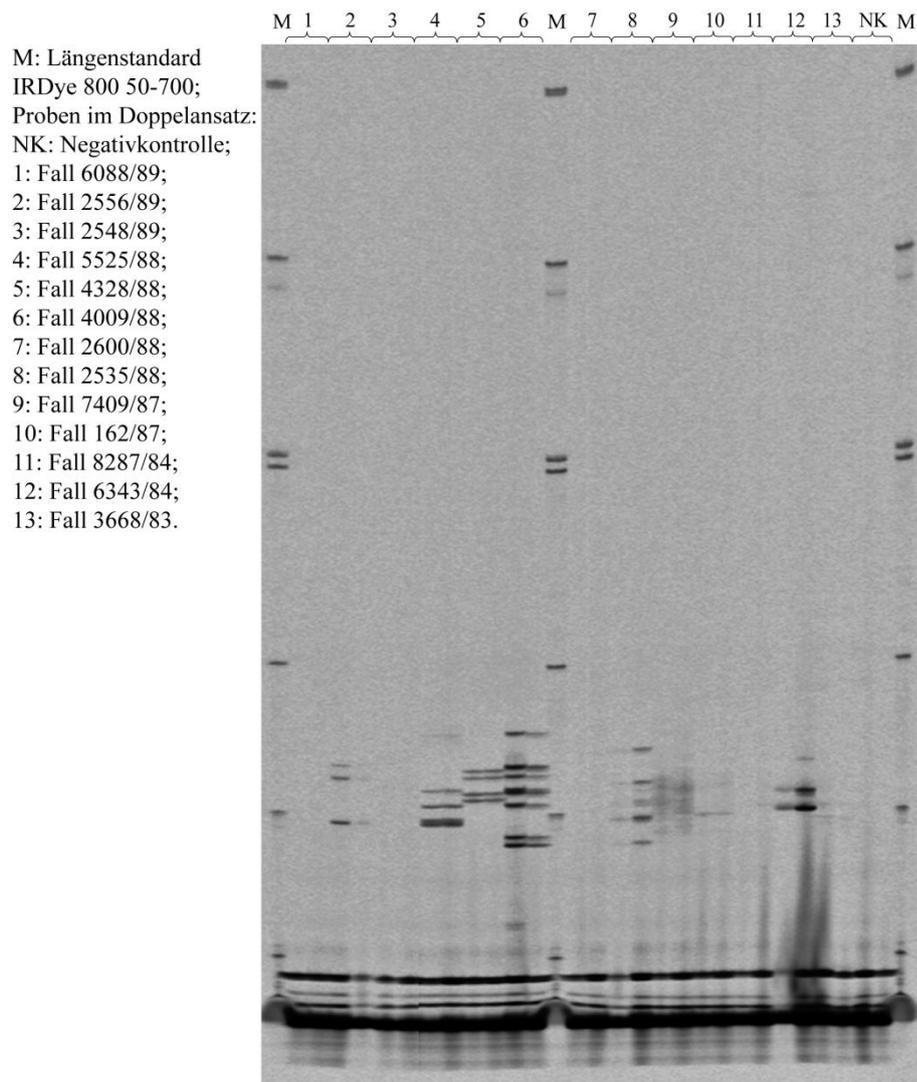


Abbildung 94: Ergebniskontrolle der PCR mittels Sequencer. Fall 6088/89: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 2556/89: 3 Banden, oligoklonal; Fall 2548/89: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 5525/88: 4 Banden, oligoklonal; Fall 4328/88: 4 Banden, oligoklonal; Fall 4009/88: 7 Banden, oligoklonal; Fall 2600/88: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 2535/88: 5 Banden, oligoklonal; Fall 7409/87: Schmier, polyklonal; Fall 162/87: 1 Bande, monoklonal; Fall 8287/84: kein Amplifikat, polyklonal; Fall 6343/84: 2 Banden, biklonal; Fall 3668/83: kein Amplifikat, polyklonal.

9.2.4 Histologie und Immunhistologie

9.2.4.1 T-Zell-Lymphosarkome

Pro nach WHO klassifiziertem Tumor ist in den folgenden Abbildungen jeweils ein Beispiel in der HE-Färbung sowie der immunhistologischen Reaktion mit den Antikörpern CD3 und CD45R dargestellt.

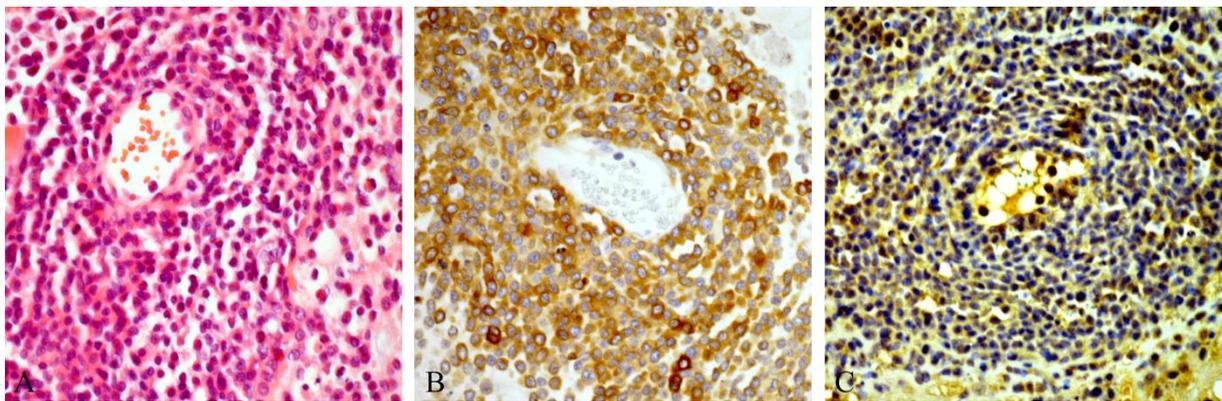


Abbildung 95: *Angiocentric lymphoma*, Fall T3558/05 (A: HE, B: IHC CD3, C: IHC CD45R; 400x).

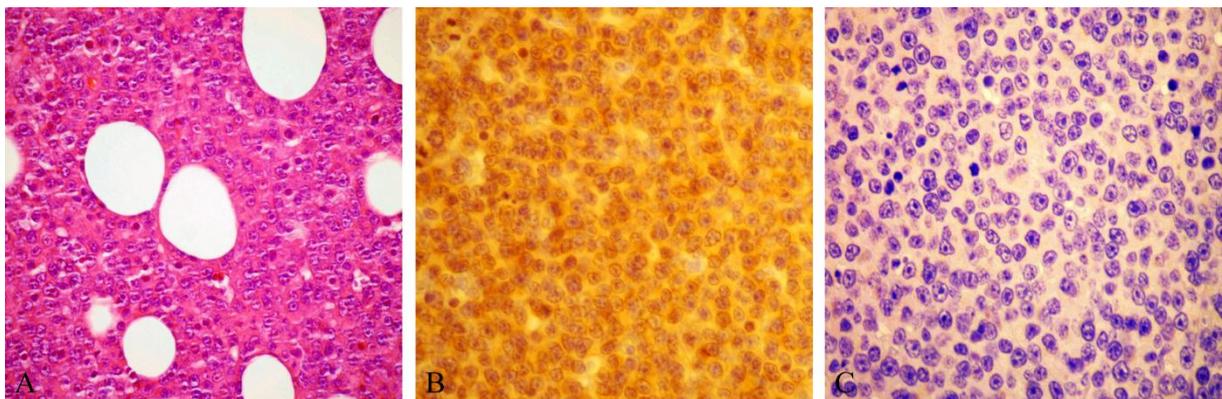


Abbildung 96: *Anaplastic large cell lymphoma*, Fall T706/06 (A: HE, B: IHC CD3, C: IHC CD45R; 400x).

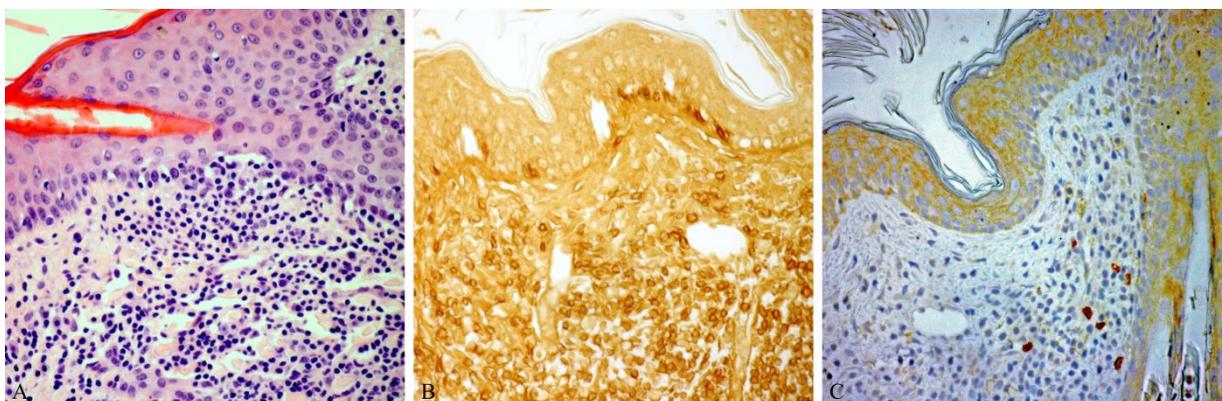


Abbildung 97: *Cutaneous epitheliotropic lymphoma, mycosis fungoides type*, Fall T8060/04 (A: HE, B: IHC CD3, C: IHC CD45R; 400x).

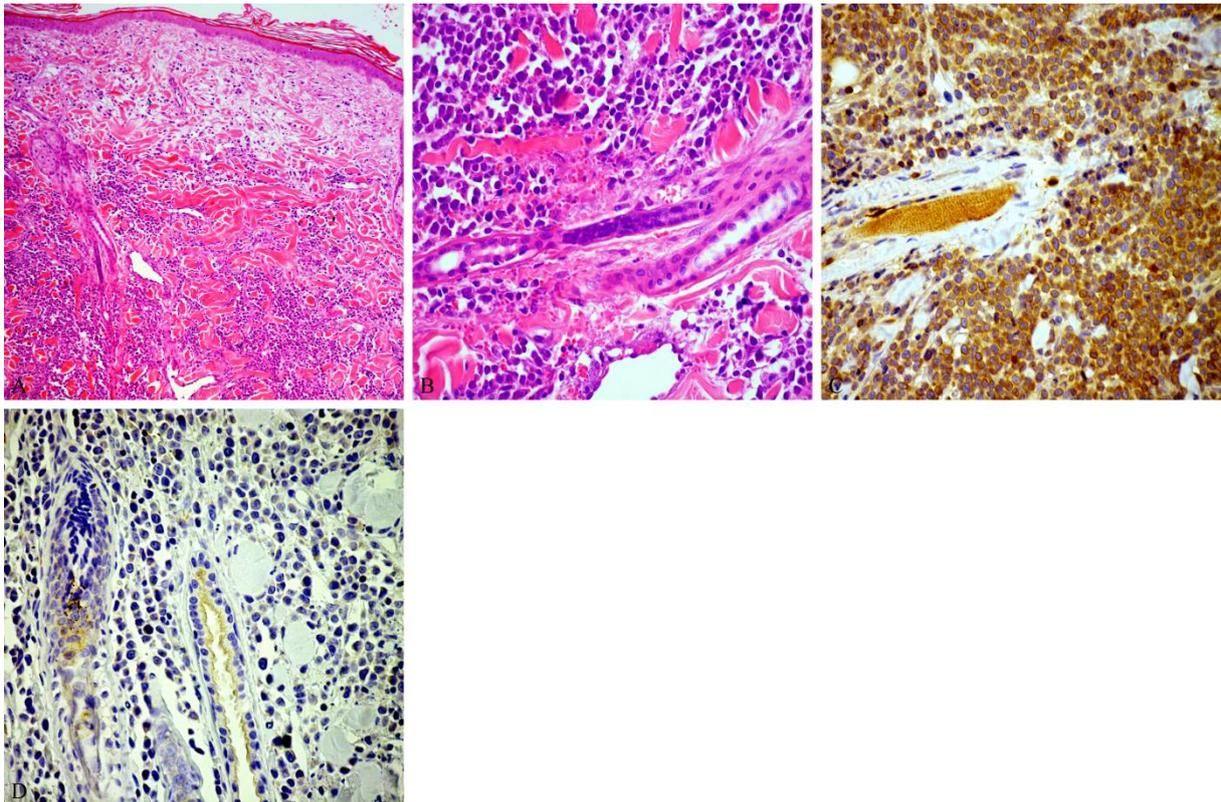


Abbildung 98: *Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma*, Fall T5634/05 (A: HE; 100x; B: HE; 400x, C: IHC CD3, D: IHC CD45R; 400x).

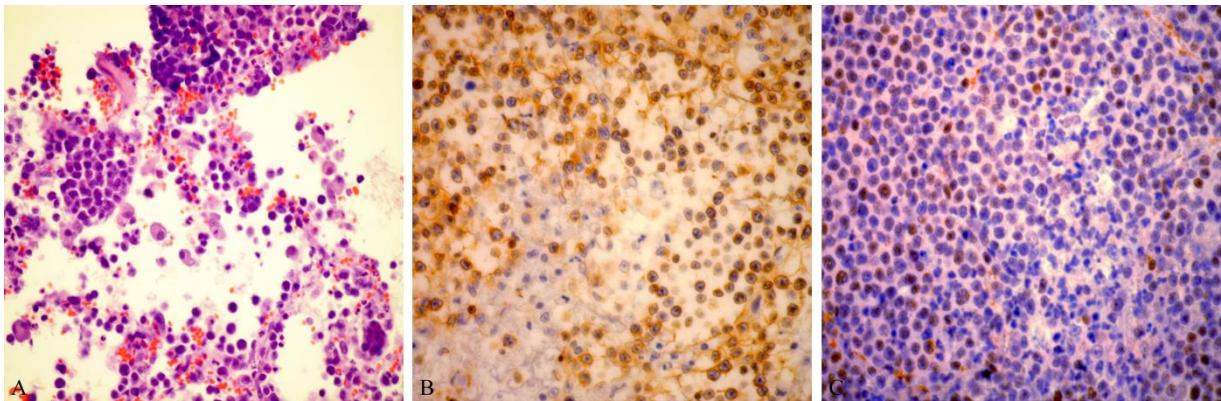


Abbildung 99: *Peripheral T-cell lymphoma*, mixed inflammatory type, Fall T4261/05 (A: HE, B: IHC CD3, C: IHC CD45R; 400x).

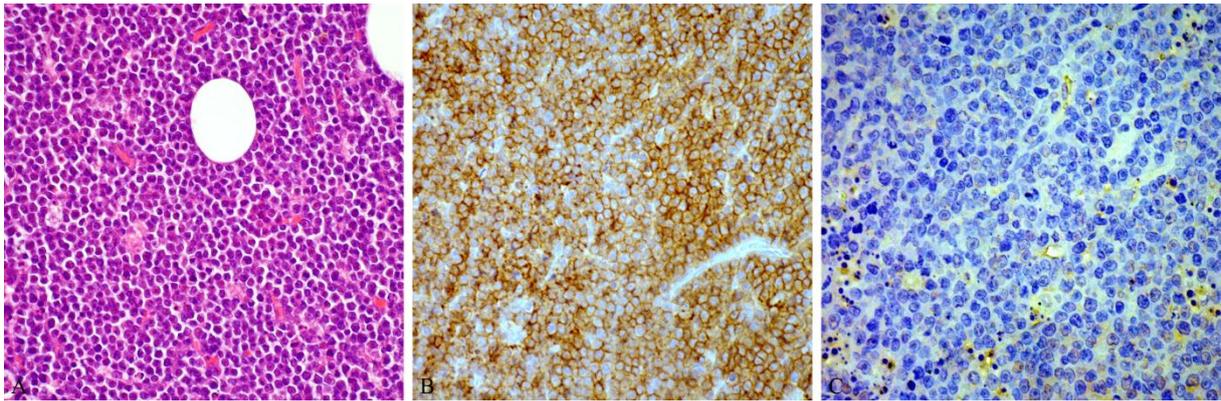


Abbildung 100: *Peripheral T-cell lymphoma*, mixed lymphoid type, Fall T4831/06 (A: HE, B: IHC CD3, C: IHC CD45R; 400x).

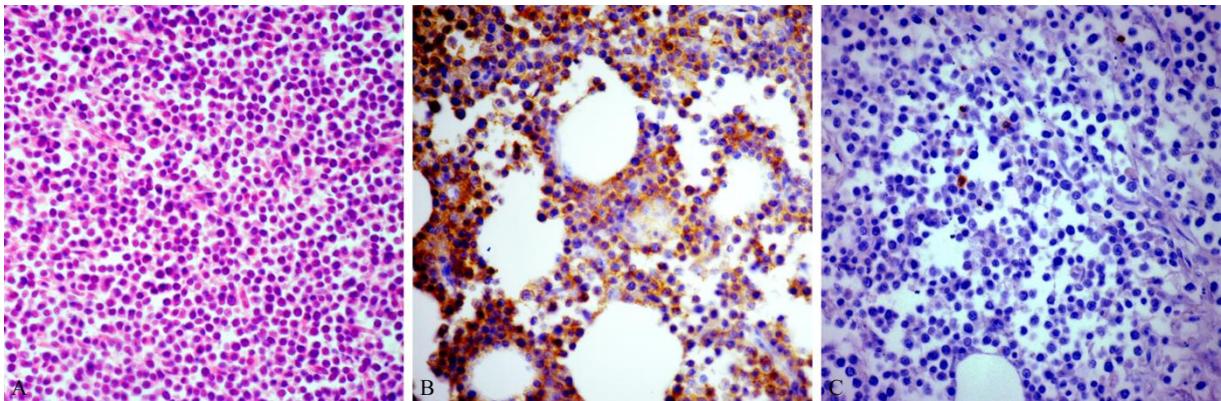


Abbildung 101: *T-cell chronic lymphocytic leukemia*, Fall S156/03 (A: HE, B: IHC CD3, C: IHC CD45R; 400x).

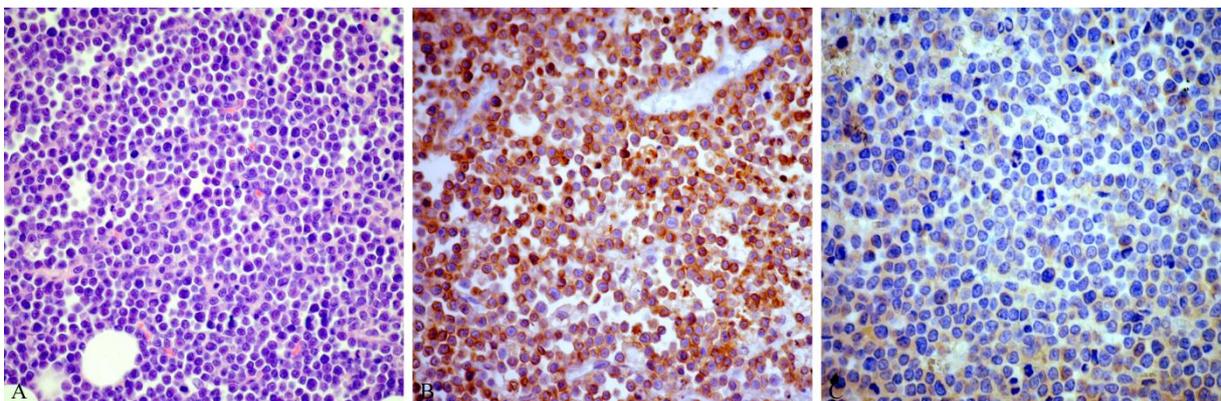


Abbildung 102: *T-cell lymphoblastic lymphoma*, Fall T296/07-1 (A: HE, B: IHC CD3, C: IHC CD45R; 400x).

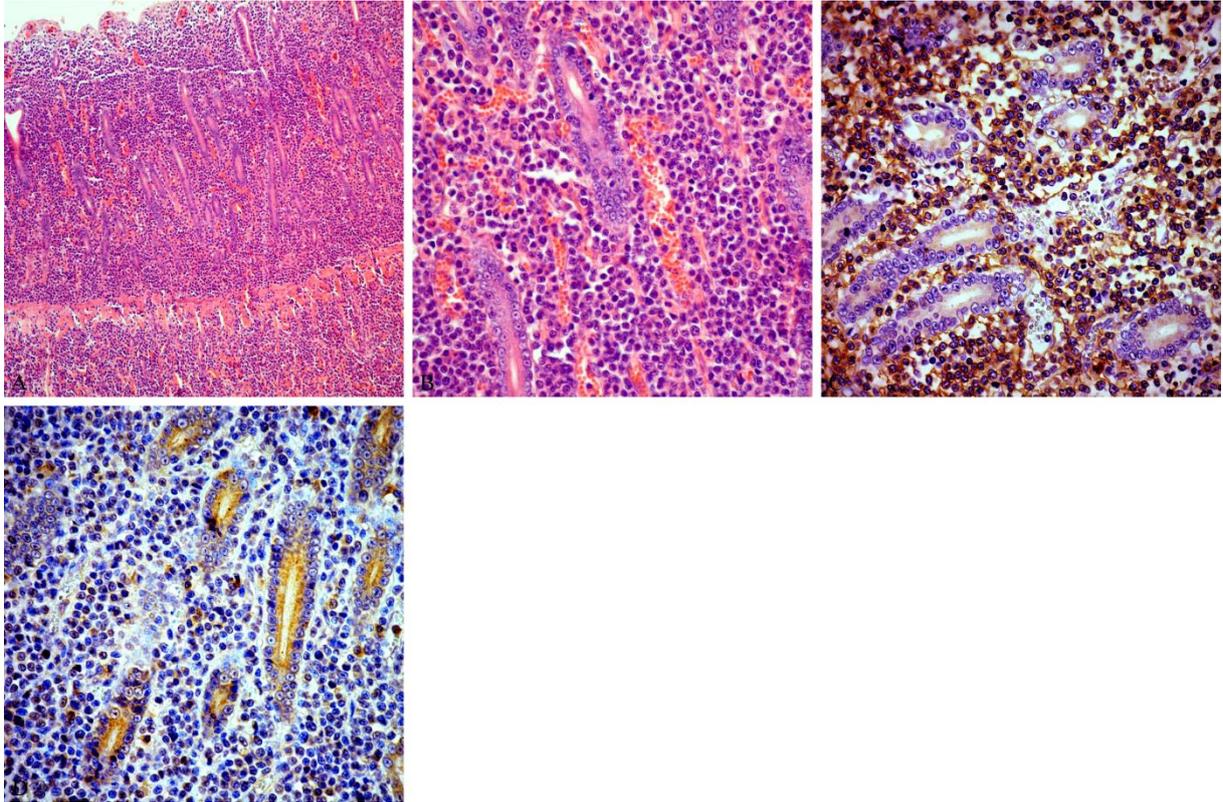


Abbildung 103: *Intestinal T-cell lymphoma*, Fall T74/06-1 (A: HE; 100x; B: HE, C: IHC CD3, D: IHC CD45R; 400).

9.2.4.2 B-Zell-Lymphosarkome

Pro nach WHO klassifiziertem Tumor ist in den folgenden Abbildungen jeweils ein Beispiel in der HE-Färbung sowie der immunhistologischen Reaktion zu den Antikörpern CD3 und CD45R dargestellt.

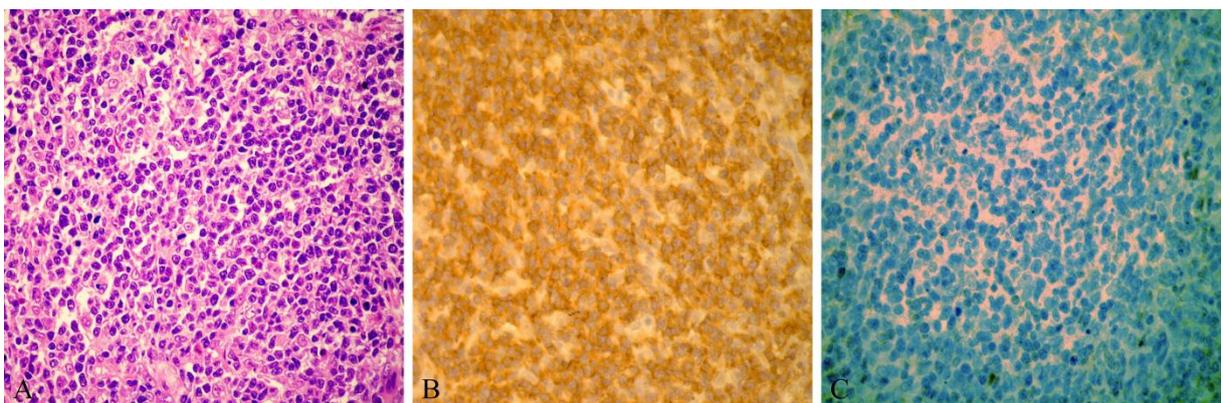


Abbildung 104: *Diffuse large B-cell lymphoma*, Fall T5953/06 (A: HE, B: IHC CD45R, C: IHC CD3; 400x).

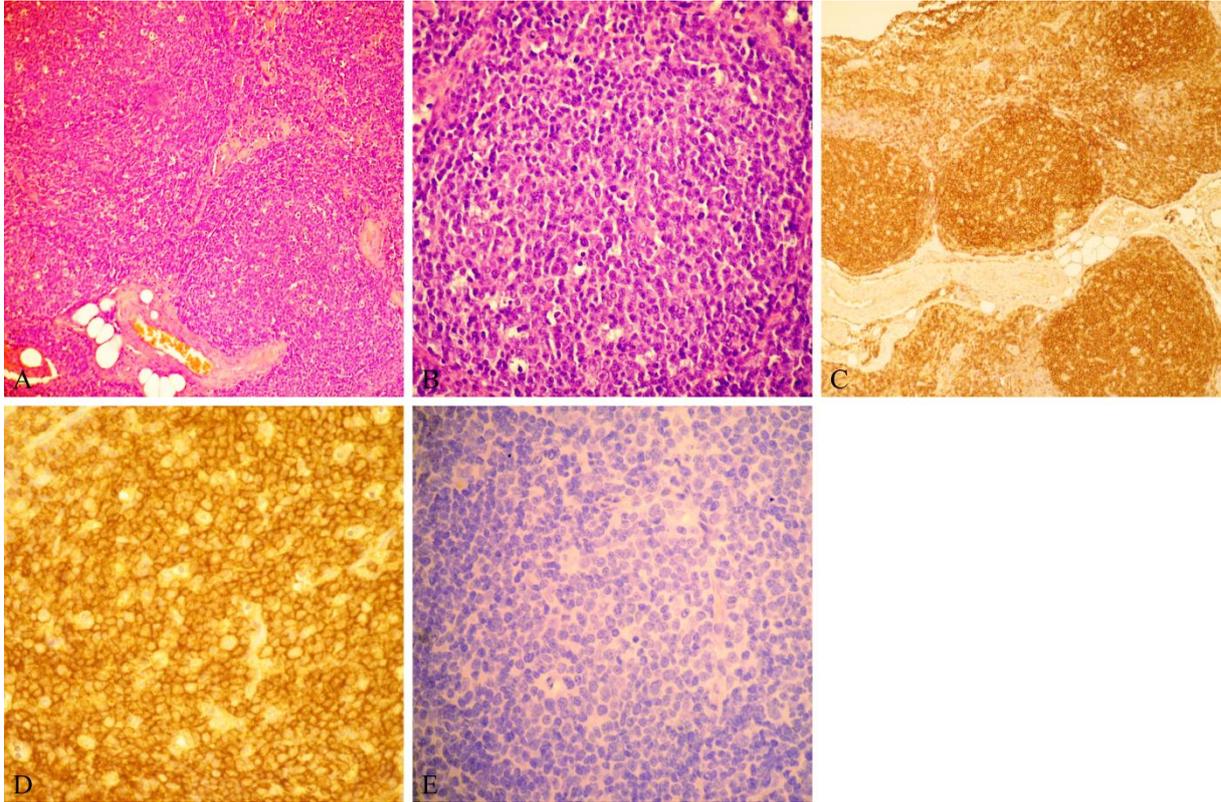


Abbildung 105: *Follicular center cell lymphoma*, type II, Fall T85/07-2 (A: HE; 100x; B: HE; 400x; C: IHC CD45R; 100x; D: IHC CD45R; 400x; E: IHC CD3; 400x).

9.3. Lösungen und Puffer

9.3.1 Immunhistologie

Schweineserum

Vollblut von Schweinen wurde 2-4 h sedimentiert und darauf 10 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend abgenommen und filtriert. Zur Konservierung wurde 0,05 % Merthiolat (Sigma-Aldrich, München) zugesetzt. Die Lagerung fand bei -20 °C statt.

Pferdeserum

Vollblut gesunder Pferde wurde 2-4 h sedimentiert und darauf 10 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend abgenommen und portioniert. Die Lagerung fand bei -20 °C statt.

DAB

100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen, mittels Magnetrührer mischen, filtrieren und direkt vor Gebrauch 70 µl 30 % H₂O₂ zugeben.

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol

A. bidest ad 1000 ml

ca. 500 ml 0,1 M HCl (zum Einstellen des pH-Werts)

Kardasewitsch

200 ml 25 % Ammoniaklösung

800 ml 70 % Äthanol

Papanicolaous Arbeitslösung

Papanicolaous Hämatoxilin und A. dest. 1 : 10 mischen und filtrieren.

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)

– Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure):

21,01 g C₆H₈O₇ x H₂O

1000 ml A. bidest.

- Stammlösung B (0,1 M Natriumacetat):

29,41 g $C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$

1000 ml A. bidest.

- Arbeitslösung:

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml A. bidest. auf 500 ml auffüllen und mittels Magnetrührer mischen. pH-Wert mit 1 N HCl einstellen.

TBS, pH 7,8

- Stammlösung:

60,57 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

610 ml A. bidest.

Ca. 390 ml 1 N HCl (zum Einstellen des pH-Werts)

- Arbeitslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8 % NaCl in A. bidest.

pH 7,8

9.3.2 Isolation von DNS

10 mM Tris

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

ad 100 ml A. dest

gründlich vermischen bis alle Feststoffe gelöst sind und bei 121 °C 20 min autoklavieren.

9.3.3 Elektrophorese

5 x TBE (Sambrook et al., 1989)

54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

27,5 g Borsäure (MW 61,83)

4,15 g EDTA·Na₂ 2 H₂O (MW 372,24)

ad 1000 ml A. dest.

gründlich vermischen bis alle Feststoffe gelöst sind und bei 121 °C 20 min autoklavieren.

9.3.4 Sequencer

Bindesilan

= 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat

– Stammlösung:

50 µl Bindesilan

10 ml 100 % Äthanol

gründlich vermischen und bei 4 °C in einer Braunglasflasche lagern.

– Arbeitslösung:

100 µl Stammlösung

100 µl 10 % Essigsäure

gründlich vermischen.

10 x TBE

107,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

55 g Borsäure (MW 61,83)

7,4 g EDTA·Na₂ 2 H₂O (MW 372,24)

ad 1000 ml A. dest.

gründlich vermischen bis alle Feststoffe gelöst sind und bei 121 °C 20 min autoklavieren.

Gel Loading Dye Licor I

– Stammlösung:

12,5 ml Formamid

0,5 ml 0,5 M EDTA·Na₂ 2 H₂O (pH 8,0-8,3)

78 mg Fuchsin

sorgfältig vermischen, bei 4 °C lagern.

– Arbeitslösung:

14,4 ml Formamid

0,6 ml Stammlösung

sorgfältig vermischen, bei 4 °C lagern.

9.3.5 Klonierung

LB Agar (Agarnährböden)

20 g Fertigmedium

500 ml A. dest.

autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen und 1,5 ml Ampicillin (50 mg/1,5 ml) zugeben. In sterile Petrischalen füllen, erstarren lassen und bei 4 °C lagern.

LB Medium (Flüssigkulturmedium)

12,5 g Fertigmedium

500 ml A. dest.

autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen und bei 4 °C lagern. Direkt vor Verwendung pro 100 ml 200 µl Ampicillin (50 mg/ml) zugeben.

9.4. Bezugsquellen für Chemikalien und Laborgeräte

Balzer GmbH, Lauterbach

Monofile Schnur, 12062/030

Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Frankreich

Falcon-Tube, round-bottom, 14 ml

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Chelex 100 resin, 142-1253

BIOTEC-FISCHER GmbH, Reiskirchen

PHERO-stab. 500

Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf

Biozym LE Agarose, 840004

Multicycler PTC 200

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

40 % Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung (Rotiphorese[®] Gel 40 (19 : 1)), 3030.1

Aluminiumfolie 2596.1

Ammonia solution, reinst (NH₃), 5460.1

Ampicillin Natriumsalz, K029.1
APS \geq 98 % p.a., 9592.3
Becherglas Rotilabo® Griffinbecher 100 ml 2873.1
Borsäure p.a., 6943.3
Diethylether \geq 99,5 %, Ph.Eur., 8810.1
EDTA-Dinatrium-Dihydrat p.a., 8043.1
Essigsäure-n-butylester \geq 99 %, 4600.2
Äthanol 96 %, mit 1 % Methylethylketon vergällt, T171.1
Äthanol, Rotipuran® p.a., 9065.4
Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml), 2218.2
Formaldehyd säurefrei \geq 37 %, P733.3
Formamid \geq 99,5 % p.a., 6749.1
Fuchsin basisch, 3256.1
Glaspistill Mikromoerser G3, 0298.1
Glyzerin Rotipuran® min. 99,5 % p.a., 3783.1
Harnstoff CH₄N₂O, 7638.2
Isopropanol (2-Propanol), 9866.4
LB Agar (Luria/Miller), X969.2
LB Medium (Luria/Miller), X968.2
Methanol Rotipuran® \geq 99,8 %, 4627.1
Proteinase K, 7528.4
Ribonuklease A, 7156.1
Roti®-Chloroform/Isoamylalkohol, X984.1
Roti-Histol®, 6640.3
SDS, 2326.2
TEMED 99 % p.a., 2367.3
Woulffsche Flasche, E576.1
Zitronensäure-Monohydrat (C₆H₈O₇ x H₂O), 6490

Cedarlane Lab., Hornby, Ontario, USA

Ratte anti-Maus CD45R-Antigen (Klon B220 (Ly5)), CL 8990AP

ClustalW

<http://www.clustal.org/>

Custom Monoclonals International, Sacramento, USA

α gp70, C11D8-2I

α p27, PF12J-10A

Desaga GmbH, Heidelberg

DESAPHOR HE 200, 146552

Frigostat, 80091

DakoCytomatation, Hamburg

Kaninchen anti-human CD3, A0452

Kaninchen anti-Maus IgG PO, PO161

Kaninchen Immunoglobulin, X0936

Kaninchen-PAP, Z0113

Schwein anti-Kaninchen IgG, Z0196

Target Retrieval Solution (pH 9), S2368

DIANOVA GmbH, Hamburg

Bovines Serum Albumin, 001-000-161

Target Unmasking Fluid, SP-0025

Eastman Kodak, Inc. USA

Kodak-Gel Documentation System Version 1.0

Eppendorf GmbH, Hamburg

Eppendorfszentrifuge 5415C

Genra Systems, Minnesota, USA (Vertrieb über Biozym, Oldendorf)

Puregene[®] DNA Purification Kit, 202005

Gesellschaft für Labortechnik GmbH (GfL), Burgwedel

Plastikküvetten, Typ 1013

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim

Varioklav[®] Dampfsterilisator Typ 500 EV

Haereus, Hanau

Zentrifuge-Laborfuge 400R

Invitrogen GmbH, Darmstadt

S.O.C. Medium, 15544-034

Janke & Kunkel GmbH & Co. KG JKA[®]-Labortechnik, Staufen

Schüttler HS 501 D

Keutz, Reiskirchen

Flachgel Elektrophoresekammer „Midi“, horizontal, 0030191-00

Gießvorrichtung, 0030191-03

KNF Neuberger GmbH, Freiburg

Membran-Vakuumpumpe, N 035AN.18

LI-COR[®] Biosciences, Bad Homburg

e-Seq[™] DNA Sequencing Software, Version 2.0

IRDye 800 50-700bp, 4200-60

LI-COR Global Edition IR² DNA Analyzer Gene Reader 4200

Life Science International, Frankfurt/Main

Coverplates[®], 721100013

Linaris, Wertheim-Bettingen

Ratte IgG2a, ITC1212

MAGV GmbH, Rabenau

1 x Petrischalen, ohne Nocken, 632180

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

CloneJET[™] PCR Cloning Kit, K1232

Exonuclease I (Exo I) (20U/μl), EN0581

λ Hind III, SM0103

pUC19/*MSPI*, SM0223

O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder, SM1323

6 x Orange DNA Loading Dye, R0631

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (1U/μl), EF0511

Melag oHG Medizintechnik, Berlin (Vertrieb über H. Kretschmer, Gießen)

Heißluftsterilisator Typ 225

Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach (Vertrieb über H. Kretschmer, Gießen)

Wasserbad W270

Menzel Gläser, Braunschweig

SuperFrost*/Plus-Objektträgern, 041300

E. Merck, Darmstadt

HCl, 1 M/1, 109970

NaCl krist., 106400.0250

Papanicolaous Lösung 1b, 9254

Perhydrol® 30 % H₂O₂ p.a., 7210

Mettler GmbH, Gießen

Präzisionswaage PM 4600 Delta Range

MICROM GmbH, Walldorf

Mikrotom Microm HM 335 E

NatuTec, Frankfurt/Main

Biotherm™ DNS-Polymerase, GC-022-022

NCBI

BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

**New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA (Vertrieb durch MAGV GmbH,
Rabenau-Londorf)**

Schüttler innova 2000

Vortexer Heidolph REAX 2000

NextTex GmbH, Leverkusen

nexttecTM Plasmid DNA Isolation Kit for Bacteria (E.coli), 30.250

Novagen-Merck KGaA, Darmstadt

NovaBlue GigaSinglesTM Competent Cells, 70181

PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

dNTP-Set, Art.-Nr. 20-2010

pfm Medical AG Köln

Mikrotomklinge Feather S35

Quelle GmbH & Co.KG, Gießen

Mikrowellengerät Privileg 7020

Quiagen GmbH, Hilden

QIAGEN[®] Multiplex PCR Kit

Radeberger Bilderrahmen GmbH, Radeberg

21 cm x 29,7 cm (DIN A4) Rahmenloser Bildhalter Normalglas, 300450

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Eppendorfgefäße, Safeseal Gefäß, 72.706

Falcon Tube 15 ml, 62.554.502

Pipettenspitzen Biosphere Fil. TIP 10 µl farblos, 70.1116.210

Pipettenspitzen Biosphere Fil. TIP 100 µl gelb, 70.760.212

Pipettenspitzen Biosphere Fil. TIP 200 µl gelb, 70.760.213

Pipettenspitzen Biosphere Fil. TIP 1250 µl farblos, 70.1186.210

Scanalytics, Inc., Fairfax, USA

Gene ImagIR 4.05

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Silicone Solution SERVA, 35130

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), D-5637

Natriumzitrat purum, p.a. (C₆H₅O₇Na₃ x H₂O), 71406

Spülmittel, nicht fluoreszierend, Micro-90® concentrated cleaning solution, ZZ81565-1EA

3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat-Lösung, 065K0694

Tween®20, P9416

Sigma-Aldrich Laborchemie, Seelze

Imidazol, 56750

Natriumzitrat purum p.a., 71406

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trisma Base), 93352

Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Maryland, USA

UV-1202 UV-VIS-Spectrophotometer

TrimGen Corporation, Sparks, Maryland, USA (Vertrieb durch Biomol GmbH, Hamburg)

WaxFree™ DNA, WF-50

Vector Laboratories

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Alkalische Phosphatase, PK 4000

Kaninchen anti-Ratte IgG (H + L, absorbed in mouse), BA 4001

Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich

UV-Transluminator 254 nm

UV-Transluminator 302 nm

Vogel GmbH & Co. KG, Giessen

Paraffin, Paraplast, Histo-comp[®], Schmelzpunkt 56-58 °C

Einbettautomat TissueTec[®] VIP, Miles Scientific

Einbettautomat TissueTec[®] VIP[™] JrEL, Sakura

Eindeckautomat TissueTec[®], Mod. 4765

10. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest.	aqua bidestillata
A. dest.	aqua destillata
ALCL	<i>Anaplastic large cell lymphoma</i>
APS	Ammoniumpersulfat
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CEL, MF	<i>Cutaneous epitheliotropic lymphoma, mycosis fungoides type</i>
CNEL	<i>Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma</i>
D	= Adenin, Guanin und Thymin (Base, die nicht Cytosin ist)
DAB	3,3`-Diaminobenzidintetrahydrochlorid Dihydrat
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EFPE	äthanolfixiert, in Paraffin eingebettet
EKH	Europäisch Kurzhaar
FelV	Felines Leukämievirus
FFPE	in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
fluma	fluoreszenzmarkiert
FR	<i>framework region</i>
G	Guanin
HDA	Heteroduplexanalyse
HE	Hämatoxylin-Eosin
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
ITCL	<i>Intestinal T-cell lymphoma</i>
kb	Kilobasen
LK	Lymphknoten
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MC	Maine Coon

10. Abkürzungsverzeichnis

min	Minute/Minuten
mA	Miliampere
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
N	Normal
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NWK	Norwegische Waldkatze
p.a.	per analysen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Ph.Eur.	Pharmacopoea Europaea, Europäisches Arzneibuch
PTCL	<i>Extranodal/peripheral T-cell lymphoma</i>
RAG	<i>recombinase activating gene</i>
RNAse A	Ribonuklease A
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/Sekunden
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline
TCCLL	<i>T-cell chronic lymphocytic lymphoma</i>
TCLL	<i>T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamid
TRA	Gene des T-Zell-Rezeptor- α
TRB	Gene des T-Zell-Rezeptor- β
TRD	Gene des T-Zell-Rezeptor- δ

10. Abkürzungsverzeichnis

TRG	Gene des T-Zell-Rezeptor- γ
TUF	Target Unmasking Fluid
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
UV	ultraviolett
V	Volt
Wdh.	Wiederholung/Wiederholungen
WHO	World Health Organization

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Reinacher für die Vergabe des Themas, die freundliche Unterstützung und Betreuung bei der Anfertigung der Doktorarbeit und die Bereitstellung dieses abwechslungsreichen und tollen Arbeitsplatzes.

Tausend Dank an Werner Hecht für die wertvolle Betreuung, das immer offene Ohr und die Erhörung der Hilferufe. Ohne seine Unterstützung wäre diese Durchführung dieser Arbeit sicher nicht möglich gewesen.

Danke an Manfred Henrich als erfahrendem Lymphosarkom-Forscher für die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit, an Kernt Köhler für die Einarbeitung in die Klassifikation der Lymphomsarkome und die Bereitstellung zahlreichen Materials, an Alexander Weiss für die Einarbeitung zu Beginn der Arbeit und die Hilfe von der Ferne.

Herr Prof. Burkhardt und Frau Prof. Christiane Herden danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme im Institut.

Bei Herrn Prof. Failing und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für statistische Aufarbeitung der Daten.

Ein riesengroßes Dankeschön an Silke Engel für die technische Hilfe bei der Arbeit, die wunderbare Unterstützung in allen Bereichen des Lebens und die Sicherstellung einer ausreichenden Kaffeinzufuhr.

Vielen Dank an Diana Klotz, Silke Ganz und Sabine Wack für die technische Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit.

Allen weiteren Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern, allen voran Cordula, Corinna und Sabrina, möchte ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Institut danken.

11. Danksagung

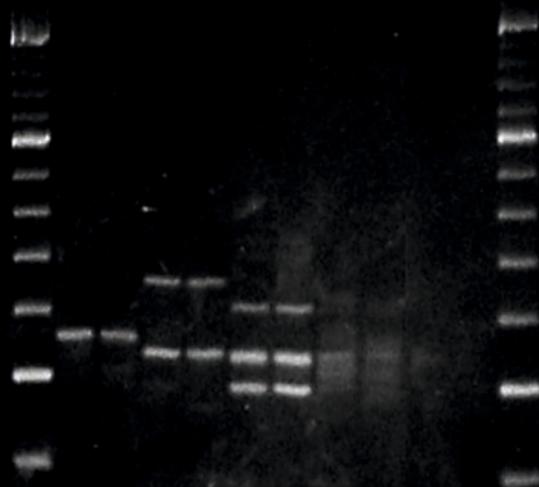
Für die große Unterstützung, das der Arbeit entgegen gebrachte Interesse und ihre Geduld möchte ich von ganzem Herzen Björn, meinen Eltern Georg und Elisabeth, meinen Geschwistern Andreas, Stefan und Bettina sowie meinen „Schwiegereltern in spe“ Dieter und Christa danken.

12. Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorliegende 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.

Ulrike Roxane Fischer



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6080-0



9 783835 196080 0