

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Lymphozyten	3
2.1.1	Die Antigenrezeptoren von Lymphozyten.....	4
2.1.1.1	Der B-Zell-Rezeptor	4
2.1.1.2	Der T-Zell-Rezeptor	5
2.1.2	Mechanismen zur Erhöhung der Antigenrezeptordiversität von Lymphozyten	7
2.1.2.1	Somatisches DNS-Rearrangement.....	7
2.1.2.2	Somatische Hypermutation.....	10
2.1.3	Die Organisation der feline B- und T-Zellrezeptorgene.....	11
2.2	Lymphome.....	12
2.2.1	In der vorliegenden Studie verwendete Lymphome	12
2.2.1.1	T-Zell-Lymphome	12
2.2.1.1.1	Intestinales T-Zell-Lymphom	12
2.2.1.1.2	Kutanes epitheliotropes T-Zell-Lymphom	13
2.2.1.1.3	Nicht näher spezifiziertes peripheres T-Zell-Lymphom.....	13
2.2.1.2	B-Zell-Lymphome	14
2.2.1.2.1	Kleinzelliges B-Zell-Lymphom.....	14
2.2.1.2.2	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom.....	14
2.2.1.2.3	Plasmablastisches Lymphom.....	14
2.2.1.2.4	Follikuläres Lymphom.....	15
2.2.1.2.5	MALT-Lymphom.....	15
2.2.2	Lymphomdiagnostik	15
2.2.2.1	Zytologie und Histologie	16
2.2.2.2	Immunphänotypisierung	16
2.2.2.3	Andere Methoden der Lymphomdiagnostik	17
2.3	Klonalitätsdiagnostik	17
2.3.1	Prinzip der Methode	17
2.3.2	PCR-basierte Klonalitätsdiagnostik.....	18
2.3.2.1	Einsatz der PCR-basierten Klonalitätsdiagnostik in der Humanmedizin	21
2.3.2.2	Einsatz der PCR-basierten Klonalitätsdiagnostik in der Veterinärmedizin.....	23
2.3.2.2.1	PCR-basierte Klonalitätsdiagnostik bei der Katze	26
2.3.2.2.1.1	T-Zell-Lymphome	26
2.3.2.2.1.2	B-Zell-Lymphome	29
2.3.2.3	Grenzen der PCR-basierten Klonalitätsdiagnostik in Human- und Veterinärmedizin	33
3	Material und Methoden.....	36
3.1	Probenmaterial.....	36
3.1.1	Verwendete Lymphome.....	36

3.1.1.1	Kriterien zur Auswahl der verwendeten Lymphome.....	41
3.1.1.2	Histopathologische und immunhistologische Diagnose und Klassifikation	41
3.1.2	Kontrollen.....	44
3.1.2.1	Polyklonale Vergleichsgruppe.....	44
3.1.2.2	Klonale Kontrollen	46
3.2	Isolierung der DNS	46
3.2.1	FFPE-Gewebe.....	46
3.2.2	Zellkulturmateriel	47
3.2.3	Unfixiertes Gewebe	48
3.3	Überprüfung der DNS-Konzentration und -Qualität.....	49
3.3.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	49
3.3.2	Amplifikation von Probefragmenten	50
3.4	Amplifikation der Zielsequenzen	52
3.4.1	Primersysteme für T-Zell-Lymphome	53
3.4.1.1	Primer nach MOORE et al. (2005)	53
3.4.1.2	Primer nach WEISS et al. (2011)	54
3.4.1.3	Primer nach MOCHIZUKI et al. (2012)	58
3.4.1.4	Primer nach ROUT et al. (2019)	59
3.4.2	Primersysteme für B-Zell-Lymphome.....	60
3.4.2.1	Primer nach WERNER et al. (2005)	60
3.4.2.2	Primer nach HENRICH et al. (2009).....	61
3.4.2.3	Primer nach MOCHIZUKI et al. (2011)	62
3.4.2.4	Primer nach ROUT et al. (2019)	64
3.5	Kapillarelektrophorese.....	65
3.5.1	ABI Prism® 310 Genetic Analyser	65
3.5.1.1	Geräteaufbau.....	66
3.5.1.2	Vorbereitung der Proben.....	66
3.5.1.2.1	Fluoreszenzfarbstoffe	66
3.5.1.2.2	Vorverdünnung der Proben.....	67
3.5.1.2.3	Probenansatz	67
3.5.1.3	Injektions- und Laufbedingungen.....	68
3.5.2	Software-gestützte Datenanalyse.....	68
4	Ergebnisse	69
4.1	Auswertungssystem	69
4.1.1	Ergebniskategorien der Klonalitätstestung	69
4.1.2	Begriffsdefinitionen und Einschlusskriterien der Ergebniskategorien der Klonalitätstestung	71
4.1.2.1	Begriffsdefinitionen	71
4.1.2.1.1	Erwarteter Größenbereich.....	71
4.1.2.1.2	Unspezifische und spezifische Peaks.....	72
4.1.2.1.3	Fragliche DNS-Qualität.....	72

4.1.2.1.4	Reproduzierbare und nicht reproduzierbare Peaks	72
4.1.2.1.5	Mehrere Peaks	72
4.1.2.1.6	Hintergrundrauschen.....	73
4.1.2.1.7	Kleine Peaks/geringe Peakhöhe.....	73
4.1.2.2	Einschlusskriterien der Kategorien.....	73
4.1.2.2.1	„Keine (spezifischen) Peaks“	73
4.1.2.2.2	„Ein oder zwei (kleine) spezifische reproduzierbare Peaks“.....	74
4.1.2.2.3	„Mehrere spezifische reproduzierbare Peaks“	74
4.1.2.2.4	„Mit Hintergrund“	75
4.1.2.2.5	„Ein oder zwei spezifische nicht reproduzierbare Peaks“	75
4.1.2.2.6	„Gauss-Kurve“.....	75
4.1.2.2.7	„Mehrere spezifische nicht reproduzierbare Peaks“.....	76
4.1.2.2.8	„Zu keiner Kategorie gehörend“	76
4.2	DNS-Konzentration und -Qualität	79
4.2.1	Ergebnisse der photometrischen Bestimmung der DNS-Konzentration und Reinheit.....	79
4.2.2	Ergebnisse der Probeamplifikation mit Primerpaar glcIVex12f und glcIV12r	79
4.2.3	Ergebnisse der Probeamplifikation mit Primerpaar FCA740-F2 und FCA740-R2	79
4.2.4	Ergebnisse der Probeamplifikation mit Primerpaar AR-fw und AR-rev.....	79
4.3	Amplifikation der Zielsequenzen	80
4.3.1	T-Zell-Lymphome (TCRy-Gen-Rearrangement)	80
4.3.1.1	Amplifikation mit den Primern von MOORE et al. (2005).....	80
4.3.1.1.1	Erwarteter Größenbereich der TRG-Amplifikate	80
4.3.1.1.2	Ergebnisse der Untersuchung der Kontrollproben	80
4.3.1.1.3	Ergebnisse der Untersuchung der T-Zell-Lymphome	80
4.3.1.1.4	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Primern von MOORE et al. (2005)	81
4.3.1.2	Amplifikation mit den Primern von WEISS et al. (2011)	81
4.3.1.2.1	Erwarteter Größenbereich der TRG-Amplifikate	82
4.3.1.2.2	Ergebnisse der Untersuchung der Kontrollproben	82
4.3.1.2.3	Ergebnisse der Untersuchung der T-Zell-Lymphome	83
4.3.1.2.4	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Primern von WEISS et al. (2011)	84
4.3.1.3	Amplifikation mit den Primern von MOCHIZUKI et al. (2012)	87
4.3.1.3.1	Erwarteter Größenbereich der TRG-Amplifikate	87
4.3.1.3.2	Ergebnisse der Untersuchung der Kontrollproben	87
4.3.1.3.3	Ergebnisse der Untersuchung der T-Zell-Lymphome	88
4.3.1.3.4	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Primern von MOCHIZUKI et al. (2012)	88
4.3.1.4	Amplifikation mit den Primern von ROUT et al. (2019)	90
4.3.1.4.1	Erwarteter Größenbereich der TRG-Amplifikate	91

4.3.1.4.2	Ergebnisse der Untersuchung der Kontrollproben	91
4.3.1.4.3	Ergebnisse der Untersuchung der T-Zell-Lymphome	91
4.3.1.4.4	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Primern von ROUT et al. (2019).....	92
4.3.1.5	Gegenüberstellung der untersuchten Primer-Systeme zum Nachweis von TCRγ-Klonalität	93
4.3.2	B-Zell-Lymphome (IGHV-, unvollständiges IGH-DJ-, IGL- und IGKDE-Gen-Rearrangement).....	96
4.3.2.1	Amplifikation mit den Primern von WERNER et al. (2005)	96
4.3.2.1.1	Erwarteter Größenbereich der IGHV-Amplifikate	96
4.3.2.1.2	Ergebnisse der Untersuchung der Kontrollproben	96
4.3.2.1.3	Ergebnisse der Untersuchung der B-Zell-Lymphome.....	97
4.3.2.1.4	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Primern von WERNER et al. (2005)	97
4.3.2.2	Amplifikation mit den Primern von HENRICH et al. (2009)	101
4.3.2.2.1	Erwarteter Größenbereich der IGHV-Amplifikate	101
4.3.2.2.2	Ergebnisse der Untersuchung der Kontrollproben	101
4.3.2.2.3	Ergebnisse der Untersuchung der B-Zell-Lymphome.....	102
4.3.2.2.4	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Primern von HENRICH et al. (2009)	102
4.3.2.3	Amplifikation mit den Primern von MOCHIZUKI et al. (2011)	105
4.3.2.3.1	Erwarteter Größenbereich der IGHV-Amplifikate	105
4.3.2.3.2	Ergebnisse der Untersuchung der Kontrollproben	106
4.3.2.3.3	Ergebnisse der Untersuchung der B-Zell-Lymphome.....	106
4.3.2.3.4	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Primern von MOCHIZUKI et al. (2011).....	107
4.3.2.4	Amplifikation mit den Primern von ROUT et al. (2019)	111
4.3.2.4.1	Erwarteter Größenbereich der IGHV-, IGKDE- und IGL-Amplifikate	112
4.3.2.4.2	Ergebnisse der Untersuchung der Kontrollproben	112
4.3.2.4.3	Ergebnisse der Untersuchung der B-Zell-Lymphome.....	113
4.3.2.4.4	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse mit den Primern von ROUT et al. (2019)	113
4.3.2.5	Gegenüberstellung der untersuchten Primersysteme zum Nachweis von IGHV-, IGKDE- und IGL-Klonalität	118
5	Diskussion	121
5.1	Ziel der Arbeit.....	121
5.2	Allgemeine Einflussfaktoren auf die PCR-basierte Klonalitätsdiagnostik und ihre Bedeutung für die Ergebnisse dieser Studie.....	121
5.2.1	Präanalytische und analytische Phase.....	121
5.2.1.1	Voruntersuchungen.....	121
5.2.1.2	Probenauswahl	122
5.2.1.3	Isolierung der DNS	122
5.2.1.4	Auswahl der PCR-Targets	125

5.2.1.5	Durchführung der PCR	127
5.2.1.6	GeneScan-Analyse.....	129
5.2.2	Auswertungsphase	130
5.3	Analyse der Klonalitätsergebnisse der verschiedenen Primersysteme	133
5.3.1	Primersysteme zum Nachweis von T-Zell-Klonalität (TCR γ -Gen-Rearrangement).....	133
5.3.1.1	Testergebnisse des Primersystems von MOORE et al. (2005).....	133
5.3.1.2	Testergebnisse des Primersystems von WEISS et al. (2011)	134
5.3.1.3	Testergebnisse des Primersystems von MOCHIZUKI et al. (2012)	136
5.3.1.4	Testergebnisse des Primersystems von ROUT et al. (2019)	137
5.3.1.5	Gesamtbetrachtung der getesteten Primersysteme zum Nachweis von T-Zell-Klonalität.....	138
5.3.2	Primersysteme zum Nachweis von B-Zell-Klonalität	141
5.3.2.1	Testergebnisse des Primersystems von WERNER et al. (2005)	141
5.3.2.2	Testergebnisse des Primersystems von HENRICH et al. (2009)	142
5.3.2.3	Testergebnisse des Primersystems von MOCHIZUKI et al. (2011)	143
5.3.2.4	Testergebnisse des Primersystems von ROUT et al. (2019)	143
5.3.2.5	Gesamtbetrachtung der getesteten Primersysteme zum Nachweis von B-Zell-Klonalität.....	145
5.3.3	Übertragung der Studienergebnisse auf die Klonalitätsdiagnostik im Routineeinsatz an FFPE-Gewebe der Katze.....	147
5.4	Ergebnisse im Vergleich zur bisherigen Studienlage	148
5.5	Ausblick.....	149
6	Zusammenfassung.....	151
7	Summary.....	153
8	Literaturverzeichnis.....	154
9	Abkürzungsverzeichnis	170
10	Tabellenverzeichnis.....	173
11	Abbildungsverzeichnis.....	175
12	Anhang	177
12.1	Tabellen	177
12.2	Sequenzen der als Amplifikationskontrolle verwendeten Plasmide (HENRICH et al. 2009)	295
12.3	Verwendete Materialien.....	295
12.3.1	Herkunfts nachweise von Laborgeräten und Einmalartikeln.....	295
12.3.2	Herkunfts nachweise von Chemikalien, Enzymen, Antikörpern, Seren und Kits.....	300

12.3.3	Herstellungsweise von Lösungen, Puffern, Gelen sowie Gerätezubehör	303
12.3.3.1	Immunhistologie	303
12.3.3.2	DNS-Extraktion	304
12.3.3.3	ABI Prism® 310 Genetic Analyser	305
12.3.3.3.1	Glaskapillare	305
12.3.3.3.2	Pufferlösung	305
12.3.3.3.3	Polymer	305
12.3.3.4	Agarosegelektrophorese	305
13	Eigene Publikationen	307
14	Danksagung	308