

**Lymphomdiagnostik beim Hund mittels PARR mit
nachfolgender Schmelzkurvenanalyse**

von Imke Schöpfer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Lymphomdiagnostik beim Hund mittels PARR mit nachfolgender
Schmelzkurvenanalyse**

von Imke Schöpfer

aus Papenburg

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Johannes
Hirschberger

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Allen, die mich unterstützt haben

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Das maligne Lymphom des Hundes	3
1.1.	Inzidenz und Ätiologie	3
1.2.	Diagnostik und Klassifizierung des kaninen Lymphoms.....	4
1.2.1.	Zytologische Diagnostik	4
1.2.2.	Histologische Diagnostik	4
1.2.3.	Einteilung in anatomische Formen.....	5
1.2.3.1.	Das multizentrische Lymphom	5
1.2.3.2.	Das alimentäre Lymphom	5
1.2.3.3.	Das mediastinale Lymphom.....	6
1.2.3.4.	Das kutane Lymphom	6
1.2.3.5.	Andere Formen.....	7
1.2.4.	Staging.....	7
1.2.5.	Histologische und zytologische Klassifizierungssysteme.....	7
1.2.6.	Immunphänotypische Klassifizierung.....	9
1.3.	Therapie des multizentrischen Lymphoms	10
1.4.	Prognostische Faktoren beim multizentrischen Lymphom.....	11
2.	Die somatische Rekombination	12
2.1.	Der B-Zell-Rezeptor.....	12
2.2.	Aufbau des kaninen B-Zell-Rezeptors	13
2.3.	Der T-Zell-Rezeptor	14
2.4.	Aufbau des kaninen TCR γ	14
2.5.	Ablauf der V(D)J-Rekombination.....	15
3.	Klonalität in der Lymphomdiagnostik.....	17
3.1.	Molekulare Klonalitätsdiagnostik durch Analyse der Antigen- rezeptorarrangements	18
3.1.1.	PCR for Antigen Receptor Rearrangements (PARR)	18
3.1.1.1.	PARR mit nachfolgender Polyacrylamidgelelektrophorese	19
3.1.1.2.	PARR mit nachfolgendem Gene Scanning	20
3.1.1.3.	PARR mit Heteroduplexanalyse	20
3.1.1.4.	Die Schmelzkurvenanalyse	21

Inhaltsverzeichnis	VI
3.1.2. Southern Blotting	23
4. Die Anwendung der Klonalitätsdiagnostik in der Humanmedizin	23
4.1. Die Entwicklung der molekularbiologischen Lymphomdiagnostik in der Humanmedizin	23
4.2. Die Schmelzkurvenanalyse in der Humanmedizin	26
5. PARR in der Tiermedizin.....	29
5.1. Einführung.....	29
5.2. Die Entwicklung der Primer.....	31
5.3. Qualitative Sensitivität von PARR.....	34
5.3.1. Sensitivität in Abhängigkeit der verwendeten Primer.....	34
5.3.1.1. Sensitivität unter Verwendung der B- und T-Zell-Primer von Burnett et al.	34
5.3.1.2. Sensitivität unter Verwendung der B-Zell-Primer von Tamura et al.	35
5.3.1.3. Sensitivität unter Verwendung der B- und T-Zell-Primer von Vernau und Moore	35
5.3.1.4. Sensitivität unter Verwendung der T-Zell-Primer von Chaubert et al.	36
5.3.1.5. Sensitivität unter Verwendung der T-Zell-Primer Yagihara et al.	36
5.3.1.6. Sensitivität unter Verwendung der T-Zell-Primer von Keller und Moore.	36
5.3.2. Sensitivität in Abhängigkeit von der verwendeten Analysemethode der PCR-Produkte.....	36
5.4. Quantitative Sensitivität	38
5.5. Spezifität in klinischen Studien.....	39
5.6. Immunphänotypisierung mittels PARR	41
5.7. Die Bedeutung von PARR für Staging und Prognose.....	44
5.8. Die Schmelzkurvenanalyse in der Tiermedizin	46
III. PUBLIKATION	47
1. Letter of acceptance	47
2. Artikel.....	47
IV. DISKUSSION	61
1. Diskussion der einzelnen Ergebnisse.....	61
1.1. Berechnung des maximalen Fluoreszenzabfalls ΔF_{max} (%)	61
1.2. Die qualitative Sensitivität der SKA	66

Inhaltsverzeichnis	VII
1.3. Die Spezifität der SKA.....	68
1.4. Immunphänotypisierung mittels SKA.....	69
1.5. Untersuchung auf Beteiligung des peripheren Blutes	70
1.6. Die quantitative Sensitivität der SKA	71
1.7. Limitationen dieser Studie	72
2. Schlussbetrachtungen	72
V. ZUSAMMENFASSUNG	75
VI. SUMMARY	77
VII. LITERATURVERZEICHNIS	79
VIII. DANKSAGUNG	91

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AgNOR	Argentophile nukleoläre Organisationsregionen	SKA	Schmelzkurvenanalyse
CD	Cluster of differentiation	TCR β	T-cell receptor beta
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TCR γ	T-cell recetor gamma
FC	Flowzytometrie	T _m	Schmelztemperatur
HMGB1	High-mobility-Group-Protein B1	WHO	Weltgesundheitsorganisation
IBD	Inflammatory bowel disease		
Ig	Immunglobulin		
IHC	Immunhistochemie		
LINE	Long interspersed nuclear elements		
MRD	Minimal residual disease		
MultiROC-Analyse	Multivariate ROC-Analyse		
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese		
PARR	PCR for antigen receptor rearrangements		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
RAG	Rekombinationsaktivierendes Gen		
REAL	Revised European American Lymphoma		
ROC	Receiver Operating Characteristic		
RSS	Rekombinationssignalsequenzen		

I. EINLEITUNG

Das maligne Lymphom ist einer der häufigsten Tumoren des Hundes. Die Diagnose kann insbesondere bei den high-grade Tumoren in den meisten Fällen zytologisch erfolgen, nur selten ist eine histologische oder immunhistochemische Untersuchung nötig (VAIL & YOUNG, 2007). Seit Ende der 90er Jahre steht mit der PCR for Antigen Receptor Rearrangements (PARR) ein weiteres diagnostisches Verfahren zur Verfügung, das auf der Tatsache beruht, dass Tumorzellen monoklonale Zellen sind. Bei dieser molekularbiologischen Untersuchung werden die bei jedem Lymphozyten variablen Sequenzen der Antigenrezeptoren der B- und T- Lymphozyten amplifiziert und anschließend analysiert. Bei monoklonalen Tumorzellen sind die PCR-Produkte identisch, während sie sich bei polyklonalen Lymphozyten unterscheiden (VERNAU & MOORE, 1999; BURNETT et al., 2003).

Für die Analyse der PCR-Produkte stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Bei der häufig eingesetzten Gelelektrophorese werden die Produkte ihrer Größe nach aufgetrennt, so dass monoklonale Produkte alle gleich weit durch das Gel wandern und eine scharfe Bande sichtbar wird. Polyklonale Produkte sind unterschiedlich groß und wandern damit auch unterschiedlich weit durch das Gel, so dass statt einer Bande eine Schlierenbildung entsteht (BURNETT et al., 2003; AVERY & AVERY, 2004).

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin wird mittlerweile auch die Schmelzkurvenanalyse eingesetzt (XU et al., 2002; XU et al., 2004; YANG et al., 2005; UEMURA et al., 2007; LANGNER et al., 2014; XU et al., 2015). Bei dieser wird eine Echtzeit-PCR verwendet, bei der die doppelsträngigen PCR-Produkte mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Im Anschluss an die PCR-Amplifizierung wird die eigentliche Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die PCR-Produkte schrittweise erhitzt werden. Ist der Schmelzpunkt eines PCR-Produktes erreicht, zerfällt die Doppelhelix und das Gerät detektiert einen Abfall der Fluoreszenz.

In der Regel wird bei Anwendung der Schmelzkurvenanalyse nicht die Kurve des Fluoreszenzabfalls selbst ausgewertet, sondern die negative erste Ableitung des

Fluoreszenzabfalls: $-(dF/dT)/T$. Eine monoklonale Tumorpopulation zeigt in der Regel hohe und schmale Peaks, während polyklonale Proben flache und breite Peaks ergeben. Die Auswertung erfolgt gewöhnlich visuell unter Verwendung von subjektiven Kriterien, die zumeist die Höhe und/oder Breite der Funktion von $-(dF/dT)/T$ berücksichtigen (XU et al., 2002; XU et al., 2004; YANG et al., 2005; LANGNER et al., 2014; XU et al., 2015). Aufgrund dieser meist sehr variablen Kriterien wurde in einer humanmedizinischen Studie eine mathematische Analyse der Funktion von $-(dF/dT)/T$ vorgenommen (RETAMALES et al., 2007).

Da $-(dF/dT)/T$ jedoch die Ableitung der eigentlichen Fluoreszenzkurve ist, beinhaltet diese Funktion nicht mehr die Information über die Höhe der Anfangsfluoreszenz zu Beginn der Schmelzkurvenanalyse. Neben der Monoklonalität einer Probe beeinflusst diese jedoch maßgeblich die Höhe der Funktion $-(dF/dT)/T$.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, anhand einer mathematischen Auswertung der Kurve des originären Fluoreszenzabfalls eine objektive Auswertung der Schmelzkurvenanalyse zu ermöglichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das maligne Lymphom des Hundes

Das maligne Lymphom des Hundes ist ein Tumor, der meist aus lymphatischen Geweben wie zum Beispiel Lymphknoten, Milz und Leber hervorgeht. Darüber hinaus können jedoch auch fast alle anderen Gewebe von Lymphomen betroffen sein (VAIL & YOUNG, 2007).

1.1. Inzidenz und Ätiologie

Das maligne Lymphom ist einer der häufigsten Tumoren des Hundes. Die jährliche Inzidenzrate liegt zwischen 13 und 123 Fällen/100.000 Hunde (BACKGREN, 1965; DOBSON et al., 2002). Betroffen sind vor allem mittelalte und alte Hunde (PONCE et al., 2004; TESKE, 2005; MERLO et al., 2008). Während einige Studien keine Geschlechterprädisposition feststellten (TESKE, 1994a), gibt es Hinweise, dass weibliche Tiere, insbesondere intakte Hündinnen, seltener betroffen sind (VILLAMIL et al., 2009) (JAGIELSKI et al., 2002). In verschiedenen Studien konnten Rasseprädispositionen für Boxer, Bulldoggen, Bullmastiffs, Berner Sennenhunde, Airedale Terrier, Scottish Terrier, Bassets, Setter, Cocker Spaniel und Rottweiler festgestellt werden (PRIESTER & MCKAY, 1980; ONIONS, 1984; KELLER et al., 1993; TESKE, 1994a; EDWARDS et al., 2003; PASTOR et al., 2009; VAIL et al., 2013; VALLI et al., 2013).

Die Ätiologie des kaninen Lymphoms ist weitgehend unbekannt. Das Herbizid 2,4-Dichlorophenoxyacetic wurde als auslösender Faktor diskutiert (HAYES et al., 1991), in Folgestudien konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (CARLO et al., 1992; GARABRANT & PHILBERT, 2002). Genetische Einflüsse scheinen eine Rolle zu spielen, da innerhalb einiger Rassen bestimmte Immunphänotypen überrepräsentiert sind (MODIANO et al., 2005; PASTOR et al., 2009). Zwar konnten virale Partikel in Lymphomgewebe nachgewiesen werden, jedoch ist deren Bedeutung für die Pathogenese des kaninen Lymphoms bisher unklar (TOMLEY et al., 1983).

1.2. Diagnostik und Klassifizierung des kaninen Lymphoms

1.2.1. Zytologische Diagnostik

Am häufigsten kommen beim Hund mittel- bis hochgradige diffuse Lymphome vor (CARTER et al., 1986). Diese können in den meisten Fällen durch eine mikroskopische Untersuchung von entnommenen Feinnadelaspiraten diagnostiziert werden (SAPIERZYNSKI et al., 2010). Ein unveränderter Lymphknoten besteht zu 75 bis 95 % aus sogenannten kleinen Lymphozyten. Die Größe der Lymphozyten wird im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten beurteilt. Kleine Lymphozyten sind mit 7-10 µm Durchmesser kleiner als neutrophile Granulozyten, während mittelgroße Lymphozyten ihnen mit 9 bis 15 µm Durchmesser entsprechen. Lymphoblasten sind größer als ein neutrophiler Granulozyt und weisen einen deutlich sichtbaren Nukleolus auf. Die mittelgroßen Lymphozyten, Lymphoblasten, Plasmazellen, Granulozyten und Makrophagen stellen zusammen die restlichen 5 bis 25 % der Zellpopulation eines unveränderten Lymphknotens dar (COWELL, 2008). Bei reaktiven Lymphknoten herrscht ein sehr heterogenes Zellbild vor. Die kleinen Lymphozyten machen zwar noch mehr als 50 % der Zellpopulation aus, jedoch verschiebt sich das Zellbild als Reaktion auf eine Antigenstimulation zugunsten der Plasmazellen, mittelgroßen Lymphozyten und Lymphoblasten (CARTAGENA et al., 1992). Ein Lymphom kann sicher diagnostiziert werden, wenn mindestens 50 % der Zellen aus Lymphoblasten oder mittelgroßen Lymphozyten bestehen (COWELL, 2008). Unter dem Mikroskop fällt oft schon in kleiner Vergrößerung das monomorphe Zellbild auf. Kleinzellige Lymphome sind zytologisch schwierig zu diagnostizieren. Sie erfordern in der Regel eine histopathologische Untersuchung (COWELL et al., 2003). In sehr schwierigen Fällen kann auch diese durch immunhistochemische oder molekularbiologische Untersuchungen ergänzt werden. Auch in anderen Organen ist eine zytologische Untersuchung möglich.

1.2.2. Histologische Diagnostik

Für die histologische Untersuchung von Lymphknoten kann eine Hohlnadelbiopsie oder eine chirurgische Entnahme eines ganzen Lymphknotens durchgeführt werden. Vorteil der Hohlnadelbiopsie ist, dass sie häufig unter Lokalanästhesie durchgeführt werden kann. Aussagekräftiger ist jedoch die chirurgische Entfernung eines ganzen Lymphknotens, da hier die Architektur

besser beurteilt werden kann. Die entnommenen Proben werden in Formalin fixiert (VAIL et al., 2013).

1.2.3. Einteilung in anatomische Formen

Das klinische Stagingssystem der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für Lymphome bei Haustieren unterscheidet 6 anatomische Lokalisationen (OWEN, 1980).

- A) Multizentrisch/ generalisiert
- B) Alimentär/ gastrointestinal
- C) Thymus/ mediastinal
- D) Haut
- E) Leukämie, nur Blut und Knochenmark betroffen
- F) Andere Lokalisationen

1.2.3.1. Das multizentrische Lymphom

Das multizentrische Lymphom stellt mit 84 % die häufigste anatomische Form des kaninen Lymphoms dar (MADEWELL & THEILEN, 1987). Betroffene Tiere zeigen eine meist schmerzlose Lymphadenomegalie der peripheren Lymphknoten, die zu Beginn vor allem die Lymphonodi mandibulares und die Lymphonodi praescapulares betrifft und sich im weiteren Verlauf auf alle Körperlymphknoten ausbreiten kann. Weitere häufig betroffene Organe sind Leber und Milz, Knochenmark und Lunge (VAIL & YOUNG, 2007). Die meisten Tiere zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose keine klinischen Symptome. Zwischen 10 und 40 % der Tiere zeigen jedoch unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust, Anorexie oder Fieber (KELLER et al., 1993). Polyurie und Polydipsie kommen vor allem bei Patienten mit Hyperkalzämie vor. Zwischen 10 und 35 % Tiere mit Lymphom zeigen eine Hyperkalzämie, was besonders häufig bei T-Zell-Lymphomen vorkommt (MADEWELL, 1985; GREENLEE et al., 1990; ELLIOTT et al., 1991; TESKE, 1994b; MESSINGER et al., 2009; VAIL et al., 2013).

1.2.3.2. Das alimentäre Lymphom

Das alimentäre Lymphom wird auch als gastrointestinales Lymphom bezeichnet, und liegt bei etwa 5 - 7 % der Patienten vor (MADEWELL & THEILEN, 1987;

TAKANOSU & KAGAWA, 2015). Männliche Tiere sind häufiger betroffen als weibliche (PRIESTER & MCKAY, 1980; COUTO et al., 1989). Bei dieser Form treten die Tumoren am häufigsten im Dünndarm auf. Außerdem können Magen, mediastinale Lymphknoten, Milz und Leber betroffen sein (TESKE, 1994a; VAIL et al., 2013). Die meisten Tiere zeigen ein schlechtes Allgemeinbefinden und gastrointestinale Symptome wie Anorexie, Durchfall und Erbrechen. Meläna und Hämatochezie treten in etwa 45 % der Fälle auf (COUTO et al., 1989). Das alimentäre Lymphom kann diagnostisch eine Herausforderung darstellen, da es auch histologisch oft nicht von lymphoplasmazellulären Enteritiden zu unterscheiden ist (VAIL & YOUNG, 2007).

1.2.3.3. Das mediastinale Lymphom

Das mediastinale Lymphom tritt bei ca. 5 % der Patienten auf und ist gekennzeichnet durch eine Vergrößerung des Thymus und/oder mediastinaler Lymphknoten (MADEWELL & THEILEN, 1987). Diese Form ist sehr oft mit einem T-Zell-Immunphänotyp und mit einer Hyperkalzämie assoziiert (ROSENBERG et al., 1991; RUSLANDER, 1997). Häufige klinische Symptome sind Dyspnoe, Husten, Leistungsinsuffizienz, seltener auch Regurgitieren. Bei Kompression der Vena cava kann zusätzlich eine Ödembildung an Kopf, Hals und den Vordergliedmaßen auftreten (TESKE, 1994a; VAIL et al., 2013).

1.2.3.4. Das kutane Lymphom

Kutane Lymphome werden histologisch in epitheliotrope und nicht-epitheliotrope Formen eingeteilt. Am häufigsten kommen beim Hund epitheliotrope Lymphome vor, die von T-Lymphozyten ausgehen. Wie beim Menschen können verschiedene Formen des epitheliotropen Lymphoms unterschieden werden: Mykosis fungoides, pagetoide Retikulose und Sézary-Syndrom. Betroffen sind vor allem mittelalte und alte Patienten. Das klinische Erscheinungsbild ist sehr variabel, daher werden kutane Lymphome häufig mit Dermatitiden verwechselt (MOORE et al., 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997; DE LORIMIER, 2006; FONTAINE et al., 2010). Klinisch sind Knötchen, Plaques, Ulzera, Depigmentation, Alopezie, Erytheme oder eine exfoliative Dermatitis zu beobachten. Die Symptome können von ausgeprägtem Juckreiz begleitet werden, was besonders häufig beim Sézary-Syndrom zu finden ist. Die Läsionen können neben der kutanen Haut und den Pfotenballen auch mukokutane Übergänge wie

Maulhöhlenschleimhaut, Anus und Scheide mit einschließen (MOORE et al., 1994; TESKE, 2005; FONTAINE et al., 2009; FONTAINE et al., 2010).

1.2.3.5. Andere Formen

Okuläre Lymphome können je nach betroffener Struktur verschiedene Symptome hervorrufen. Laut einer Untersuchung an 94 Patienten zeigt etwa ein Drittel der Patienten mit multizentrischem Lymphom okuläre Veränderungen, am häufigsten eine Uveitis (KROHNE et al., 1987).

Lymphome des zentralen Nervensystems sind sehr selten (VAIL et al., 2013). Die Symptome hängen von der anatomischen Lokalisation des Tumors ab, weisen jedoch häufig auf ein multifokales Geschehen hin (COUTO et al., 1984).

1.2.4. Staging

Nach dem Stagingssystem der WHO werden 5 Stadien unterschieden, die wiederum, je nach Vorhandensein klinischer Symptome, in 2 Unterstadien eingeteilt werden (OWEN, 1980).

Stage I	Einzelner Lymphknoten oder lymphatisches Gewebe eines Organs betroffen (außer Knochenmark)
Stage II	Mehrere Lymphknoten einer Körperregion betroffen +/- Tonsillen
Stage III	Generalisierte Lymphknotenvergrößerung
Stage IV	Leber und/ oder Milz betroffen (+/- Stage III)
Stage V	Blut oder Knochenmark betroffen und/ oder anderes Organsystem betroffen (+/- Stage I-IV)
Substage a	Keine klinischen Symptome
Substage b	Klinische Symptomen vorhanden

1.2.5. Histologische und zytologische Klassifizierungssysteme

Es gibt verschiedenste Klassifizierungssysteme in der Tiermedizin, die aus der Humanmedizin übernommen und für die kaninen Lymphome adaptiert wurden. Verwendete Kriterien für die Zuordnung sind Wachstumsarchitektur,

Zellmorphologie, mitotischer Index und der Immunphänotyp.

Das Rappaport-System unterscheidet zwischen einer diffusen und folliculären Tumorarchitektur und zellmorphologisch zwischen gut differenzierten, schlecht differenzierten und so genannten „histiozytären“ Tumoren. Die Einteilung der Lymphome nach diesem Schema hat jedoch keine prognostische Relevanz gezeigt (WELLER et al., 1980).

Das Klassifizierungsschema der World Health Organization (WHO) basiert auf dem „revised European American lymphoma“ (REAL) System und bezieht den Immunphänotyp mit ein. 2011 veröffentlichten Valli et al. eine Studie über die Anwendung dieses Klassifizierungssystems beim Hund. 300 Proben wurden von 3 Hämatopathologen klassifiziert. 80 % der Tumoren konnten in nur 6 Kategorien eingeteilt werden. Nachfolgend wurden die Proben von 17 nicht auf die Hämatopathologie spezialisierten Pathologen untersucht. Die Übereinstimmung betrug insgesamt 83 %. Bei Beschränkung auf die 6 häufigsten Kategorien betrug die Übereinstimmung 87 % (VALLI et al., 2011). Zwei Jahre später folgte die Auswertung derselben Tumorphpopulation im Hinblick auf die prognostische Relevanz. Tiere mit low-grade Tumoren lebten signifikant länger als Tiere mit high-grade Tumoren. Die längste mediane Überlebenszeit hatten Hunde mit low-grade T-Zell-Lymphomen, am kürzesten lebten Patienten mit high-grade T-Zell-Tumoren. Bei Tieren mit diffusem, großzelligen B-Zell-Lymphom war die Mitoserate für die mediane Überlebenszeit prognostisch signifikant (VALLI et al., 2013).

Das Schema des National Cancer Institute (Working Formulation, 1982) berücksichtigt Wachstumsmuster (diffus oder folliculär), mitotischen Index und Zellmorphologie. Die Tumoren werden dabei in drei Malignitätsstufen eingeteilt: Low-grade, intermediate-grad und high-grade. Der Immunphänotyp wird nicht berücksichtigt (1982). Dieses System wurde eingeführt, da mittlerweile in der Humanmedizin eine Vielzahl von parallel verwendeten Klassifizierungssystemen vorhanden war und es dadurch schwierig wurde, die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Die Working Formulation sollte eine Übersetzungshilfe zwischen den vorhandenen Schemata sein (ROSENBERG, 1982). Die Working Formulation ist auch auf den Hund anwendbar. In tiermedizinischen Studien wurde die Eignung für die Klassifizierung des kaninen Lymphoms jedoch in

Frage gestellt, da ein Schwerpunkt auf das Wachstumsmuster (diffus vs. folliculär) gelegt wird, folliculäre Tumoren beim Hund aber sehr selten sind (CARTER et al., 1986; GREENLEE et al., 1990; VAIL et al., 2013).

Die überarbeitete Kiel-Klassifizierung berücksichtigt das Wachstumsmuster, die Zellmorphologie und den Immunphänotyp. Eine Einteilung erfolgt in high-grade und low-grade Tumoren (STANSFELD et al., 1988; LENNERT & FELLER, 1990). In Studien, die die Anwendbarkeit des Systems auf das kanine Lymphom untersuchten, wurde positiv bewertet, dass die Tumorarchitektur (diffus vs. nodulär/folliculär) hier im Vergleich zur Working Formulation eine eher untergeordnete Rolle spielt, wodurch eine bessere Unterscheidung der verschiedenen hochgradigen Lymphome möglich wird (GREENLEE et al., 1990; DOBSON et al., 2001).

Die überarbeitete Kiel-Klassifizierung und die Working Formulation haben beide eine prognostische Relevanz gezeigt. Nach beiden Systemen ist die große Mehrzahl der kaninen Lymphome vom Typ intermediate-grade oder high-grade. High-grade und intermediate-grade Tumoren sprechen besser auf eine Chemotherapie an, so dass öfter eine komplette Remission erreicht werden kann als bei low-grade Tumoren. Trotzdem haben low-grade Tumoren insgesamt auch bei einer weniger aggressiven Therapie eine bessere Prognose. Die meisten Lymphome des Hundes sind B-Zell-Tumoren (CARTER et al., 1986; DOBSON et al., 2001; VAIL & YOUNG, 2007)

1.2.6. Immunphänotypische Klassifizierung

Mittels monoklonaler Antikörper für CD-Oberflächenantigene (CD = cluster of differentiation) der B- und T-Lymphozyten können Lymphome immunphänotypisiert werden. Lymphome werden in T-Zell-Lymphome, B-Zell-Lymphome, gemischte BT-Zell-Lymphome und Null-Zell-Lymphome eingeteilt. Für den Nachweis von B-Zellen werden häufig CD79a und CD20 verwendet, während für T-Zellen CD3 verwendet wird (FERRER et al., 1993; MILNER et al., 1996; JUBALA et al., 2005). Die Untersuchung kann mittels Immunhistochemie, Flowzytometrie oder Immunzytochemie durchgeführt werden (CANIATTI et al., 1996; CULMSEE & NOLTE, 2002; MODIANO et al., 2005; WILKERSON et al., 2005; AULBACH et al., 2010; SAPIERZYNSKI, 2010;

COMAZZI & GELAIN, 2011).

Modiano et al. werteten 2005 10 größere Studien mit insgesamt 642 Tieren zur Immunphänotypisierung aus. Im Durchschnitt hatten 67 % der Tiere einen B-Zell-Tumor, 27 % einen T-Zell-Tumor und 4 % der Patienten hatten einen Null-Zell-Tumor oder einen Tumor, der ein Oberflächenantigen von B- und T-Zellen trug (MODIANO et al., 2005).

Das Vorkommen von BT-Zell-Tumoren scheint insbesondere von der Untersuchungsmethode abzuhängen. Bei der immunhistochemischen Untersuchung sind nur vereinzelte Fälle bekannt (THOMAS et al., 2001), während BT-Zell-Tumoren mit der Flowzytometrie häufiger diagnostiziert werden. In älteren Studien wurde mittels Flowzytometrie bei bis zu 65 % der Tumoren eine gleichzeitige Expression von B- und T-Zell-Markern nachgewiesen (APPELBAUM et al., 1984). Wilkerson et al. untersuchten 59 lymphatische Tumoren mittels Flowzytometrie. 51 % zeigten den B-Zell-Typ, 27 % exprimierten T-Zell-Marker und 22 % der Tumoren zeigten B- und T-Zell-Marker. Thalheim et al. untersuchten 62 Lymphome mittels Immunhistologie und Flowzytometrie. Immunhistochemisch waren 74 % vom B-Zell-Typ und 26 % vom T-Zell-Typ betroffen. Es gab keine BT-Zell-Tumoren oder Null-Zell-Tumoren. Mittels Flowzytometrie hingegen wurde bei 3% der Tumoren eine Koexpression von B- und T-Zellmarkern gefunden (THALHEIM et al., 2013).

1.3. Therapie des multizentrischen Lymphoms

Da das multizentrische Lymphom ein generalisierter Tumor ist und die meisten Patienten im fortgeschrittenen Stadium vorgestellt werden, ist die Therapie der Wahl eine Chemotherapie (ETTINGER, 2003).

Es werden Monotherapien und Polychemotherapien unterschieden. Das am häufigsten für eine Monochemotherapie verwendete Medikament ist Doxorubicin, das 5x im Abstand von jeweils 3 Wochen verabreicht wird. Hiermit werden mediane Überlebenszeiten von 6-8 Monaten erreicht (CARTER et al., 1987; VAIL et al., 2013).

Die besten Ergebnisse werden mit Polychemotherapieprotokollen erreicht, die Doxorubicin enthalten (CHUN, 2009). Am häufigsten werden sogenannte CHOP-Protokolle verwendet, die Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und

Prednisolon enthalten. Mit diesen Protokollen beträgt die mediane Überlebenszeit etwa 12 Monate (GREENLEE et al., 1990; KELLER et al., 1993; GARRETT et al., 2002).

Alternativ zu einer zytostatischen Chemotherapie ist auch eine Monotherapie mit Prednisolon möglich. Mit dieser wird in bis zu 43 % der Fälle eine Komplettremission erreicht. Diese ist jedoch nur von kurzer Dauer, so dass die gesamte Überlebenszeit trotzdem nur bei wenigen Monaten liegt. (SQUIRE et al., 1973).

Begleitend zur Chemotherapie kann eine Strahlentherapie eingesetzt werden. Durch eine in ein Chemotherapieprotokoll integrierte Halbkörperbestrahlung konnten bei 38 Hunden mit multizentrischem Lymphom verbesserte Remissions- und Überlebenszeiten erreicht werden. Die mediane Dauer der ersten Remission betrug 410 Tage, die mediane Überlebenszeit betrug 684 Tage (LURIE et al., 2009).

1.4. Prognostische Faktoren beim multizentrischen Lymphom

Der Immunphänotyp hat sich in den meisten Studien als prognostisch erwiesen. Tiere mit einem T-Zell-Typ haben eine schlechtere Prognose (APPELBAUM et al., 1984; GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994b; KIUPEL et al., 1999; DOBSON et al., 2001).

Auch die histologische Klassifizierung der Tumoren ist aussagekräftig für die zu erwartende Überlebenszeit. Low-grade Tumoren haben eine bessere Prognose als high-grade und intermediate-grade Tumoren (TESKE, 1994b; KIUPEL et al., 1999; VALLI et al., 2006; FLOOD-KNAPIK et al., 2012).

In mehreren Studien zeigten Tiere mit einem niedrigeren Tumorstadium nach WHO-Klassifizierung eine bessere Prognose als Tiere mit Stadium V (TESKE, 1994b; JAGIELSKI et al., 2002; MARCONATO et al., 2011). In anderen Studien bestand kein Zusammenhang zwischen Stage und Überlebenszeit (MACEWEN et al., 1987; GREENLEE et al., 1990; KIUPEL et al., 1999).

Das Substage der WHO-Klassifizierung hat in den meisten Studien prognostische Signifikanz gezeigt. Tiere mit klinischen Symptomen zum Diagnosezeitpunkt (Substage b) haben eine schlechtere Prognose (GREENLEE et al., 1990;

KELLER et al., 1993; TESKE, 1994b; GARRETT et al., 2002; JAGIELSKI et al., 2002; MARCONATO et al., 2011).

Die Bedeutung der Proliferationsmarker Ki-67 und der argentophilen nukleolären Organisationregionen (AgNOR) ist aktuell unklar, da es gegensätzliche Studienergebnisse gibt (VAIL et al., 2013).

Eine Monotherapie mit Kortikosteroiden vor Beginn der Chemotherapie kann zu einem verminderten Ansprechen auf die Chemotherapie führen (MARCONATO et al., 2011).

Während vor Beginn der Therapie vorliegende Zytopenien sich negativ prognostisch auswirken können (ZEMANN et al., 1998; MARCONATO et al., 2011), scheinen therapiebedingte Neutropenien sich positiv auf die Überlebenszeit auszuwirken (VAUGHAN et al., 2007; WANG et al., 2015).

Eine Hyperkalzämie hat sich in einigen Studien negativ prognostisch ausgewirkt (MARCONATO et al., 2011) (GREENLEE et al., 1990), in anderen nicht (KELLER et al., 1993).

2. Die somatische Rekombination

Lymphozyten können über ihre Antigenrezeptoren Antigene binden. Jeder Antigenrezeptor passt zu einem spezifischen Antigen. Durch die somatische Rekombination ist es möglich, dass unser Immunsystem trotz einer begrenzten Anzahl an Genen über 10^{11} Antigene erkennen und binden kann. Die Antigenrezeptoren, bei B-Lymphozyten ein Immunglobulin (Ig), bei T-Lymphozyten der T-Zell-Rezeptor (TCR), bestehen jeweils aus konstanten Regionen und aus variablen Regionen. Die variablen Regionen bilden die Antigenbildungsstellen.

2.1. Der B-Zell-Rezeptor

Bei B-Lymphozyten dient ein membranständiges Immunglobulinmolekül als Antigenrezeptor. Immunglobuline bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette besteht aus verschiedenen Domänen. Die

leichten Ketten bestehen aus einer einzelnen konstanten Domäne (C_L) und einer variablen Domäne (V_L), während die schweren Ketten aus 3 oder 4 konstanten Domänen (C_H 1-4) und einer variablen Domäne (V_H) bestehen. Zwischen C_{H1} und C_{H2} liegt die sogenannte hinge-Region. Anhand der konstanten Domäne werden bei den leichten Ketten die Subtypen κ und λ unterschieden. Die schweren Ketten werden gemäß der jeweiligen Immunglobulinklasse (IgA, IgD, IgE, IgG oder IgM) mit den entsprechenden griechischen Buchstaben bezeichnet (α , δ , ϵ , γ , μ). Die konstanten Domänen liegen am C-terminalen Ende des Moleküls und gehen in einen kurzen transmembranären Teil über. Die variable Domäne beider Ketten liegt am N-terminalen Ende. Eine Antigenbindungsstelle setzt sich jeweils aus der N-terminalen variablen Domäne einer leichten und einer schweren Kette zusammen, so dass jedes Immunglobulin über zwei Bindungsstellen verfügt; Immunglobuline sind somit bivalent. Jede variable Domäne ist in weitere Teilregionen unterteilt. Die drei sogenannten complementarity-determining regions CDR1, CDR2 und CDR3 sind hochvariabel und werden von den weniger variablen „framework regions“ (FR1, FR2, FR3 und FR4) flankiert.

Behandelt man Immunglobuline mit dem Enzym Papain, so spaltet es das Molekül in dieser Region, so dass zwei sogenannte Fab-Fragmente und ein Fc – Fragment entstehen. Ein Fab-Fragment besteht aus der gesamten leichten Kette, V_H und C_{H1} , und beinhaltet so die Antigenbindungsstelle. Als drittes Fragment entsteht das Fc-Fragment, das sich aus den konstanten Domänen C_{H2-4} zusammensetzt. (GALLY, 1973; TONEGAWA, 1985; BLACKWELL & ALT, 1989; JANEWAY CA JR, 2001; BERG et al., 2003a; BAUER & WALZOG, 2005).

2.2. Aufbau des kaninen B-Zell-Rezeptors

2005 wurde die Genomsequenzierung des Hundes veröffentlicht (LINDBLAD-TOH et al., 2005). Tamura et al. haben basierend auf dieser Gensequenzierung 2006 eine Studie veröffentlicht, in der die Sequenz der Gene, die für die schweren Ketten des Immunglobulins (immunoglobulin heavy chain = IgH) kodieren, untersucht wurde. Anhand der neu gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend neue Primer für PARR entwickelt. Auf Chromosom 8 wurde ein V-Gen gefunden, das aus 61 einzelnen Segmenten besteht. Im Gegensatz dazu wurde ein nur aus einem Segment bestehendes J-Gen identifiziert (TAMURA et

al., 2006).

2.3. Der T-Zell-Rezeptor

Der T-Zell-Rezeptor ist ein Heterodimer, das aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundenen Anteilen besteht. Die beiden Ketten werden als T_α und T_β bezeichnet. Wenige T-Lymphozyten exprimieren zwei andere Ketten: T_γ und T_δ . Wie beim B-Zell-Rezeptor werden auch hier innerhalb jeder Kette konstante und variable Regionen unterschieden. Hypervariable Sequenzen innerhalb der N-terminalen V-Region bilden die Antigenbindungsstelle (BERG et al., 2003a). Am C-terminalen Ende geht jede Kette in einen kurzen transmembranären und intrazellulären Abschnitt über. Der funktionelle T-Zell-Rezeptor besteht aus dem T-Zell-Rezeptor und dem CD3-Komplex und den ξ -Proteinen. Der CD3-Komplex besteht aus 2 ϵ -Ketten und jeweils einer γ - und δ -Kette. Dieser Komplex sowie die ξ -Proteine sind für die Signaltransduktion unerlässlich (JANEWAY CA JR, 2001; BERG et al., 2003a).

2.4. Aufbau des kaninen TCR γ

Nach Sequenzierung des Hundegenoms wurden mehrere Untersuchungen zur Struktur der Gene durchgeführt, die für den TCR γ kodieren. 2006 fanden Yagihara et al. 4 Signalsequenzen (signaling sequences, SS), 4 V-Segmente, 6 J-Segmente und 4 C-Segmente (YAGIHARA et al., 2007). 2010 entdeckten Chaubert et al. ein weiteres J-Segment (CHAUBERT et al., 2010). Massari et al. führten umfassende Untersuchungen zum Genlocus des TCR γ durch. Sie fanden insgesamt 40 Gene, angeordnet in 8 Kassetten, die jeweils nach dem konstanten C-Gen benannt werden. Jede der 8 Kassetten enthält die Grundeinheit V-J-J-C. Nur die letzte Kassette enthält kein V-Gen. Die Kassetten sind in derselben transkriptionalen Orientierung angeordnet. 8 der 16 V-Gene sind funktional und werden in 4 Subgruppen unterteilt. 8 V-Gene sind Pseudogene. Jede der 8 Kassetten enthält 2 J-Segmente, nur 7 davon sind funktional. Die funktionalen Gensequenzen sind 59 bis 60 Basenpaare lang. Am 3'-Ende befindet sich eine RNA-Splicing-Stelle, am 5'-Ende ist ein Rekombinationssignal lokalisiert. Sechs der acht C-Gene sind funktional (C2-C5, C7, C8). „Long interspersed nuclear elements“ (LINE1) machen etwa 20,56 % der Gesamtsequenz aus. Sie sind gleichmäßig über den gesamten Genlocus verteilt (MASSARI et al., 2009).

2.5. Ablauf der V(D)J-Rekombination

Das menschliche Immunsystem kann schätzungsweise ca. 10^{11} verschiedene Antigene erkennen und binden, obwohl nur eine begrenzte Anzahl von Genen zur Kodierung der Antigenrezeptoren zur Verfügung steht (JANEWAY CA JR, 2001; BERG et al., 2003a). Ermöglicht wird dies durch die sogenannte somatische Rekombination (TONEGAWA et al., 1974; HOZUMI & TONEGAWA, 1976; BRACK & TONEGAWA, 1977; BRACK et al., 1978; SEIDMAN & LEDER, 1978). Die Gene, die für die variable Domäne der Antigenrezeptoren kodieren, liegen in der Keimbahnkonfiguration in einer Tandemanordnung mehrerer Gensegmente vor. Es werden V-Gene (V für variable), D-Gene (D für diversity) und J-Gene (J für joining) unterschieden (EARLY et al., 1980; SCHILLING et al., 1980; THOMPSON et al., 1991; JANEWAY CA JR, 2001; JUNG & ALT, 2004). Die D-Gene kommen nur bei den schweren Ketten der Antikörper und bei der β - und δ -Kette des T-Zell-Rezeptors vor (THOMPSON et al., 1991; BASSING et al., 2002). Die einzelnen Gensegmente werden von Rekombinationssignalsequenzen (RSS) flankiert. Als RSS fungieren gut konservierte Sequenzen mit 7 (Heptamer) und 9 (Nonamer) Nucleotiden und ein sogenannten „Spacer“ mit einer weniger gut konservierten Sequenz von entweder 12 (+/-1) oder 23 (+/-1) Nucleotiden. Der Spacer liegt zwischen Heptamer und Nonamer. Diese RSS sind entscheidend für einen korrekten Ablauf der Rekombination. Ein Gensegment mit einem Spacer von 12 Nucleotiden kann nur mit einem Gensegment mit einem Spacer mit 23 Nucleotiden verbunden werden (12/23-Regel). Es gibt hin und wieder Abweichungen von dieser Regel, die für eine weitere Erhöhung der Rezeptorvielfalt sorgen (MAX et al., 1979; SAKANO et al., 1981; TONEGAWA, 1983; JANEWAY CA JR, 2001; BASSING et al., 2002).

Bei der V, J-Rekombination ist nur ein Rekombinationsschritt nötig, während die V, D, J-Rekombination in 2 Schritten erfolgt. Bei der leichten Kette des Ig wird zum Beispiel ein V-Gen mit einem J-Gen zusammengeführt und bildet so die V-Domäne einer Leichtkette. Diese wird anschließend mit dem C-Gen der C-Domäne verbunden. Bei der schweren Kette wird zunächst ein D-Gen mit einem J-Gen zusammengeführt. Anschließend wird ein V-Gen an den DJ-Komplex angeschlossen, bevor der so entstandene VDJ-Komplex mit dem C-Segment

verbunden wird. Für die Rekombination ist die V(D)J-Rekombinase entscheidend. Die Rekombinationsgene 1 und 2 (RAG 1, RAG 2) werden in Lymphozyten exprimiert, während diese ihre Antigenrezeptoren entwickeln (JANEWAY CA JR, 2001). RAG 1 und RAG 2 formen zusammen einen Komplex (RAG). Zwei dieser Komplexe binden unter Beachtung der 12/23-Regel an Rekombinationssignalsequenzen der Gensegmente, die miteinander verbunden werden sollen. Sie verursachen jeweils einen Einzelstrangbruch zwischen dem codierenden Gensegment und dem 5'-Ende der Heptamers der RSS. Das 3'-Ende des kodierenden Gensegments hydrolysiert die Bindung zwischen der kodierenden Sequenz und der RSS des zweiten Stranges. Zusätzlich wird eine sogenannte Haarnadelverbindung zwischen den beiden Einzelsträngen des kodierenden Gensegments geschaffen. Anschließend werden die beiden freiliegenden Enden der RSS miteinander verbunden. Die Haarnadelverbindung zwischen den Einzelsträngen der kodierenden Gensegmente wird wieder gelöst, wobei die Lösung an unterschiedlichen Stellen der Sequenz stattfinden kann. Anschließend werden in diesem Bereich Nukleotide durch eine Exonuklease entfernt. Die templateunabhängige Terminale Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) fügt nach dem Zufallsprinzip Nukleotide hinzu. Die DNA-Ligase IV verbindet abschließend die Enden der Einzelstränge der kodierenden Segmente zu einem Doppelstrang. Durch die verschiedenen Lokalisationen der Aufspaltung der Haarnadelverbindung und das Entfernen und Hinzufügen von einzelnen Nukleotiden wird die Vielfalt der Antigenrezeptoren weiter erhöht (MCBLANE et al., 1995; JANEWAY CA JR, 2001; BASSING et al., 2002; JUNG & ALT, 2004).

Weitere für die Rekombination wichtige Enzyme, die an der Reparatur des Doppelstrangbruchs beteiligt sind, sind die DNA-Ligase IV, Artemis und das DNA-PK-Holoenzyme (JANEWAY CA JR, 2001; HELMINK & SLECKMAN, 2012). Artemis öffnet die Haarnadelschleife vor Zusammenfügen der kodierenden Gensegmente. Das High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) fungiert als Kofaktor des RAG und verstärkt die Affinität, Gensegmente nach der 12/23-Regel zusammenzufügen (VAN GENT et al., 1997).

Eine Besonderheit des kaninen T-Zell-Rezeptors ist die Anordnung der Gene in 8 Kassetten. Keller et al. zeigten anhand von PCR-Untersuchungen an monoklonalen T-Zell-Neoplasien, dass bei den Tumorzellen nicht nur ein

einzelnes Rearrangement nachweisbar war, sondern in der Regel mehrere Rearrangements vorlagen, die simultan in den verschiedenen Kassetten während der somatischen Rekombination stattfinden (KELLER & MOORE, 2012a). Weiterhin führten sie eine Analyse der Muster der Rearrangements des TCR γ durch. Die insgesamt 55 klonalen Rearrangements von 12 T-Zell-Tumoren wurden sequenziert. Hierbei zeigte sich, dass die einzelnen Gene unterschiedlich häufig umarrangiert wurden. Bei den V-Genen waren es die Gene aus der Kasette 2, 3 und 7, die am häufigsten umarrangiert wurden. Genauso verhielt es sich mit den J-Genen der Kasette 2, 3 und 8. Auch zeigten die einzelnen V-Gene eine erhöhte Affinität, sich mit bestimmten J-Genen zu verbinden. Während die meisten V-Gene der Kassetten 2, 3, 4 und 5 sich mit einem J-Gen aus derselben Kasette verbanden, wurden V-Gene der 7. Kasette ausschließlich mit einem J-Gen der 8. Kasette zusammengefügt. Hierbei scheint die Sequenzhomologie der RSS eine wesentliche Rolle zu spielen. V-Gene mit ähnlichen RSS zeigten eine ähnliche Bindungsaffinität zu einer bestimmten RSS der J-Gene. Die „junctional regions“ der Rearrangements wurden ebenfalls analysiert. Bei den V-Genen wurden durchschnittlich 3,8 (0-14) Nukleotidbasen entfernt, bei den J-Genen wurden im Mittel 2,7 (0-10) Nukleotidbasen entfernt (KELLER & MOORE, 2012b). Bei einer der 12 T-Zell-Neoplasien lag ein besonderes Rearrangement vor. Ein V-Gen hat sich hierbei mit einem in 5'-Richtung („upstream“) gelegenen J-Gen verbunden. Dies ist normalerweise nur durch einen als Inversion bezeichneten Vorgang möglich, für den die Gene jedoch in entgegengesetzter transkriptionaler Richtung angeordnet sein müssen. Die Sequenzanalysen des TCR γ zeigen jedoch, dass alle Gene in derselben transkriptionalen Ausrichtung angelegt sind (MASSARI et al., 2009; KELLER & MOORE, 2012b).

3. Klonalität in der Lymphomdiagnostik

Tumorlymphozyten sind monoklonalen Ursprungs (LINDER & GARTLER, 1965; NOWELL, 1976; LEVY et al., 1977). Diese Eigenschaft wird bereits seit langem in der Humanmedizin bei der Diagnostik von Tumoren genutzt. So wurden zum Beispiel bei lymphatischen B-Zell-Tumoren die Leichtketten des Antigenrezeptors per Immunfluoreszenz untersucht. In normalen Geweben

kommen sowohl B-Zellen mit Leichtketten vom Typ κ als auch vom Typ λ vor, während bei monoklonalen Tumorzellen ein Leichtketten-Typ deutlich überwiegt. Die Sensitivität ist jedoch schlechter, wenn eine Infiltration mit normalen/reaktiven Lymphozyten vorliegt (AISENBERG & LONG, 1975; LEVY et al., 1977). Beim Hund überwiegen Leichtketten vom Typ λ deutlich, das Verhältnis $\lambda:\kappa$ beträgt etwa 91:9 (ARUN et al., 1996). Auch die Immunphänotypisierung kann auf diesem Wege durch Nachweis von bestimmten CD-Molekülen auf der Zelloberfläche von Lymphozyten zu einer Diagnosefindung beitragen. In einem Lymphom dominieren, je nach Immunphänotyp des Lymphoms, T- oder B-Zellen (APPELBAUM et al., 1984; GREENLEE et al., 1990; CANIATTI et al., 1996; SAPIERZYNSKI et al., 2012).

3.1. Molekulare Klonalitätsdiagnostik durch Analyse der Antigenrezeptorrearrangements

Die Sequenzen der variablen Antigenbindungsstellen der Lymphozyten können durch die Polymerasekettenreaktion gezielt vervielfältigt und durch verschiedene Analyseverfahren ausgewertet werden. Bei monoklonalen Tumorzellen stimmen die variablen Gensegmente der Antigenrezeptoren in ihrer Sequenz überein, während diese bei polyklonalen, nicht-tumorösen Lymphozyten individuell sind (LEVY et al., 1977). Die Analyse der PCR-Produkte kann auf verschiedene Arten erfolgen.

3.1.1. PCR for Antigen Receptor Rearrangements (PARR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt. Sie ermöglicht es, gezielt bestimmte DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Voraussetzung hierfür ist, dass die DNA-Sequenzen, die die Zielsequenz flankieren, bekannt sind. Anhand der bekannten Sequenzen wird ein Primerpaar hergestellt, das an die flankierenden Sequenzen bindet. Weiterhin werden die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate und eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Strangtrennung. Die Lösung wird für 15 Sekunden auf 95°C erhitzt, sodass die DNA-Doppelhelix denaturiert und in Einzelsträngen vorliegt. Anschließend erfolgt eine Abkühlung, damit die Primer mit den 3'-Enden der Einzelstränge hybridisieren können. Nach erneuter Erhitzung folgt die Elongationsphase, in der die hitzestabile DNA-Polymerase den

komplementären Strang in Richtung des 5'-Endes aufbaut (SAIKI et al., 1988; BERG et al., 2003c; MORTIMER & MÜLLER, 2003).

PARR beruht auf der Amplifizierung der Gensequenzen, die für die variablen Domänen der Antigenrezeptoren der Lymphozyten kodieren.

3.1.1.1. PARR mit nachfolgender Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchlaufen die PCR-Produkte ein Polyacrylamidgel, an das eine elektrische Spannung angelegt wird. Die Produkte durchwandern das Gel und werden dabei ihrer Größe und Ladung nach aufgetrennt. Kleine, negativ geladene Moleküle wandern schneller durch das Gel als große, positiv geladene Teilchen (BERG et al., 2003b).

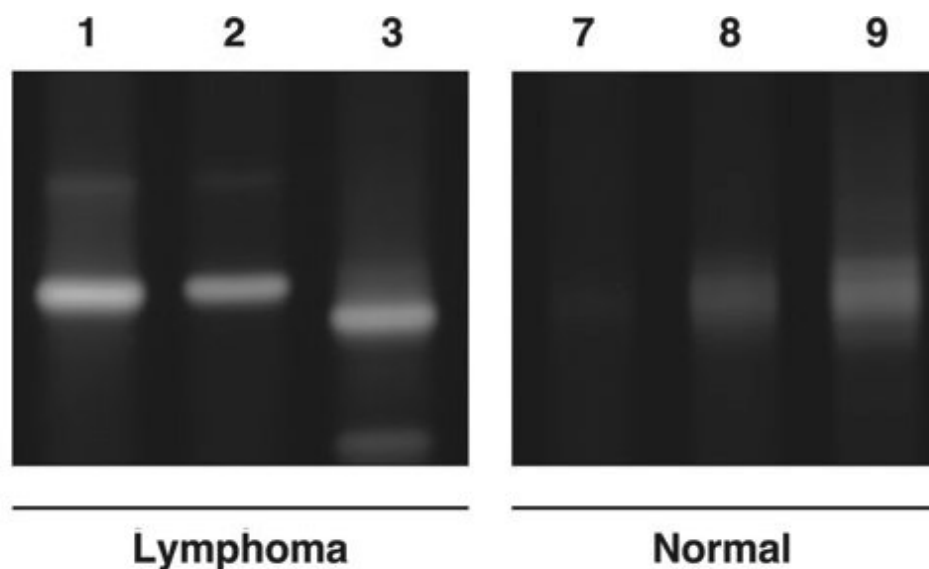


Abbildung 1

Polyacrylamidgelelektrophorese von 3 Lymphompatienten (Lane 1-3) und 3 Kontrolltieren (Lane 7-8).

Quelle: Ohmura et al. Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs (OHMURA et al., in press, accepted 2015).

Stimmen bei einer monoklonalen Lymphompopulation alle PCR-Produkte überein, laufen sie im elektrischen Feld gleich weit durch das Gel, so dass nach Anfärben des Gels unter UV-Strahlung eine gut begrenzte Bande sichtbar wird. Bei polyklonalen Proben sind die PCR-Produkte hingegen unterschiedlich groß, so dass sie im Gel unterschiedlich weit wandern und keine scharfe Bande sichtbar wird (TRAINOR et al., 1990).

Abbildung 1 zeigt die Polyacrylamidgelelektrophorese von 3 Lymphompatienten (Lane 1-3) und 3 Kontrolltieren (Lane 7-9). Bei den Lymphompatienten ist jeweils eine scharf abgrenzbare Bande zu sehen, während sich bei den Kontrolltieren unscharfe Schlieren zeigen.

3.1.1.2. PARR mit nachfolgendem Gene Scanning

Beim Gene Scanning werden für die PCR Primer verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen sind. Diese ermöglichen die Erkennung durch automatisierte Laser. Die denaturierten PCR-Produkte werden in Polyacrylamidgelen oder Kapillarpolymeren ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Fluoreszenzsignal wird dann mit einer Kamera eingefangen. Bei einer monoklonalen Probe führt dies zu einem einzelnen Peak, während polyklonale Proben multiple Peaks erzeugen, die eine gaußsche Verteilung aufweisen. Das Gene Scanning ist ein kostenintensives Verfahren, das jedoch in der humanmedizinischen Lymphomdiagnostik eine hohe Sensitivität bewiesen hat (VAN DONGEN et al., 2003; BOONE et al., 2013).

3.1.1.3. PARR mit Heteroduplexanalyse

Bei der Heteroduplexanalyse werden die PCR-Produkte nach der PCR bei einer niedrigen Temperatur (optimal 4°C) renaturiert, so dass anschließend Doppelstränge vorliegen. Doppelstränge bilden sich bei polyklonalen Proben auch zwischen unterschiedlichen Einzelsträngen aus, die zwar ähnliche V- und J-Segmente beinhalten, sich aber in ihrer „junctional region“ unterscheiden. Es entstehen sogenannte Heteroduplexe. Bei monoklonalen PCR-Produkten bilden sich aus den homologen Einzelsträngen Homoduplexe aus. Diese Homoduplexe laufen bei einer anschließenden Gelelektrophorese schneller durch das Gel als die Heteroduplexe. Da die Homoduplexe identisch sind, wandern sie alle gleich weit durch das Gel und es entsteht eine gut abgrenzbare einzelne Bande. Die

Heteroduplexe hingegen wandern alle unterschiedlich weit durch das Gel, so dass es zu einer Schlierenbildung kommt. Bei der Heteroduplexanalyse werden die PCR-Produkte zusätzlich zu ihrer Größe auch anhand der Sequenzvariabilität in der „junctional region“ aufgetrennt (VAN DONGEN et al., 2003; BOONE et al., 2013).

3.1.1.4. Die Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse wird mittels quantitativer Echtzeit-PCR im Anschluss an die herkömmliche PCR-Amplifizierung durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die PCR-Produkte nach der Amplifizierung nicht für die Analyse auf ein anderes Medium übertragen werden müssen. Stattdessen werden die zuvor abgekühlten PCR-Produkte im selben Gerät schrittweise auf eine bestimmte Temperatur erhitzt, bis der Schmelzpunkt der PCR-Produkte erreicht ist. Die Schmelztemperatur eines Produktes hängt dabei von der Länge, der Sequenz, dem Vorhandensein von Watson-Crick-Basenpaarungen und dem G:C-Gehalt ab. Im Gegensatz zur Gelelektrophorese können so auch gleich lange DNA-Sequenzen, die einen unterschiedlichen GC-Gehalt oder eine unterschiedliche GC-Verteilung aufweisen, voneinander differenziert werden (SANTALUCIA et al., 1996; RIRIE et al., 1997; REED et al., 2007; UEMURA et al., 2007; DUMOUSSEAU et al., 2012). Die PCR-Produkte sind bei dieser quantitativen Real-time PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie zum Beispiel SYBR Green markiert. Dieser fluoresziert, wenn die PCR-Produkte in Doppelsträngen vorliegen. Wenn der Schmelzpunkt eines PCR-Produktes erreicht wird, zerfällt die Doppelhelixstruktur, woraufhin ein Abfall der Fluoreszenz detektiert wird (RIRIE et al., 1997; WITTEWERT et al., 1997; REED et al., 2007).

Anhand der Schmelzkurvenanalyse kann eine monoklonale Lymphozytenpopulation von einer polyklonalen Population unterschieden werden. Handelt es sich bei den PCR-Produkten um vorwiegend monoklonale PCR-Produkte, erreichen diese alle bei derselben Temperatur ihren Schmelzpunkt und es kommt zu einer abrupten Abnahme des Fluoreszenzsignals. Bei einer polyklonalen Population hingegen erreichen die unterschiedlichen PCR-Produkte bei ganz verschiedenen Temperaturen ihren Schmelzpunkt, so dass das Fluoreszenzsignal kontinuierlich abnimmt. Die Schmelztemperatur T_m ist so definiert, dass 50 % der PCR-Produkte sich in der Doppelhelixstruktur befinden.

Anhand der Werte für die Höhe der Fluoreszenz bei den verschiedenen Messpunkten lässt sich der Fluoreszenzabfall graphisch darstellen.

Die Steigung des Fluoreszenzabfalls lässt sich anhand der negativen ersten Ableitung des Fluoreszenzabfalls ($-dF/dT$), aufgetragen gegen die Temperatur (T), graphisch darstellen. Abbildung 1 zeigt die Schmelzkurven von einer monoklonalen Lymphozytenpopulation und einer polyklonalen Lymphozytenpopulation. Bei dem Lymphom kommt es bei 80°C zu einem abrupten Abfall der Fluoreszenz, da hier fast alle PCR-Produkte denselben Schmelzpunkt haben und sich die Doppelhelixstruktur auflöst. Bei dem Kontrolltier hingegen liegen PCR-Produkte mit unterschiedlicher Schmelztemperatur vor, so dass ein gradueller Abfall der Fluoreszenz stattfindet (Abbildung 1a). Die negative erste Ableitung dieser Fluoreszenzkurven, aufgetragen gegen die Temperatur, ist in Abbildung 1b dargestellt. Aus dem abrupten Steigungsabfall bei dem Lymphom ergibt sich ein hoher und schmaler Peak. Bei dem Kontrolltier hingegen ist der Steigungsabfall graduell mit zwei steileren Abschnitten, woraus sich zwei flache und breite Peaks ergeben.

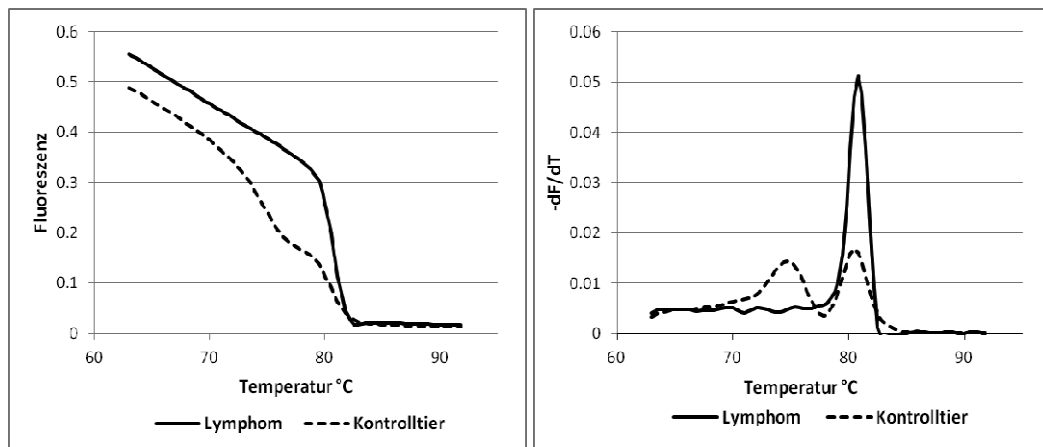


Abbildung 1a

Abbildung 1b

Abbildung 1. Schmelzkurven (Abbildung 1a) und die negative erste Ableitung der Schmelzkurve $-(dF/dT)$ (Abbildung 1b) einer monoklonalen Lymphompopulation (durchgezogene Linie) und einer polyklonalen Probe eines Kontrolltieres (gestrichelte Linie).

3.1.2. Southern Blotting

Beim Southern Blotting werden die PCR-Produkte zunächst mit Restriktionsenzymen behandelt, die bestimmte Sequenzen erkennen und die DNA-Doppelhelix an definierten Stellen schneiden. Die Restriktionsfragmente werden anschließend mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Es folgt die Hybridisierung mit einer mit einem Radioisotop markierten Sonde. Die Sonde muss komplementär zu der Sequenz des Ig oder des TCR γ sein. Das an die Sonde gebundene Restriktionsfragment wird schließlich durch ein Autoradiogramm sichtbar gemacht (BERG et al., 2003c; GAZZOLA et al., 2014). Das Southern Blotting gilt aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität als Goldstandard in der Humanmedizin zur Unterscheidung von monoklonalen und polyklonalen Lymphozytenpopulationen. Da die Methode jedoch im Vergleich zur PARR einige Nachteile aufweist, wird sie zunehmend von ihr verdrängt (VAN DONGEN & WOLVERS-TETTERO, 1991b, 1991a; REZUKE et al., 1997; VAN DONGEN et al., 2003).

4. Die Anwendung der Klonalitätsdiagnostik in der Humanmedizin

4.1. Die Entwicklung der molekularbiologischen Lymphomdiagnostik in der Humanmedizin

Das Southern Blotting galt lange Zeit aufgrund ihrer hohen Sensitivität und sehr hohen Spezifität als Goldstandard der molekularen Lymphomdiagnostik. (REZUKE et al., 1997; VAN DONGEN et al., 2003; LANGERAK et al., 2012). 1990 haben Trainor et al. die erste Studie über die Anwendung einer Polymerasekettenreaktion bei B-Zell-Neoplasien veröffentlicht. Neben verschiedenen B-Zelllinien wurden auch 23 B-Zell-Neoplasien untersucht. Alle B-Zelllinien und 19 von 23 Tumoren zeigten eine monoklonale Lymphozytenpopulation, während untersuchte T-Zelllinien sowie reaktive und normale Lymphknotenpopulationen negativ waren (TRAINOR et al., 1990). 1991 folgte die Entwicklung eines Protokolls für T-Zell-Neoplasien (TRAINOR et al., 1991). Obwohl das Southern Blotting eine bessere qualitative Sensitivität zeigte,

wurde PARR aufgrund zahlreicher Vorteile und aufgrund der guten Spezifität als erster diagnostischer Schritt empfohlen, ggf. ergänzt durch Southern Blotting, sollte die PARR negativ ausgefallen sein (REZUKE et al., 1997; LANGERAK et al., 2001). Vorteile von PARR sind, dass die Methode nur wenig DNA benötigt und somit auch anhand von Feinnadelaspiraten durchgeführt werden kann. Alternativ können im Gegensatz zum Southern Blotting auch in Paraffin fixierte Proben verwendet werden. Zudem ist die Methode schneller und einfacher durchzuführen und es werden keine Radioisotope benötigt. Während das Southern Blotting eine sehr hohe qualitative Sensitivität aufweist, weist die PARR eine höhere quantitative Sensitivität auf, kann also auch vor einem starken polyklonalen Hintergrund die monoklonalen Rearrangements nachweisen. Das Detektionslimit vor polyklonalem Hintergrund liegt beim Southern Blotting bei etwa 5 bis 10%, während es bei PARR zwischen < 1% und 5% liegt (TRAINOR et al., 1990; VAN DONGEN & WOLVERS-TETTERO, 1991a; REZUKE et al., 1997; VAN DONGEN et al., 2003; LANGERAK et al., 2012). Die qualitative Sensitivität war lange Zeit im Vergleich zum Southern Blotting deutlich niedriger und je nach Studie und verwendeten Primern starken Schwankungen unterworfen. 2001 führten Arber et al. eine Multi-Center-Studie durch, in der 29 Proben (16 Proben mit bereits extrahierter DNA, 13 Proben, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet waren) geblindet von 24 verschiedenen Laboren auf ein klonales T-Zell-Rearrangement untersucht wurden. 13 Labore führten zusätzlich ein Southern Blotting mit einigen oder allen Proben durch. 21 Labore untersuchten mittels PCR auf ein Rearrangement des TCR γ , zwei Labore untersuchten auf ein Rearrangement des T-Zell-Rezeptor beta (TCR β). Bei den 14 Proben, die mittels Southern Blotting auf ein TCR β -Rearrangement untersucht wurden, gab es bei 4 Proben unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Laboren. Eine Ursache hierfür wurde nicht gefunden. Mittels PCR für TCR γ wurden 78 % der T-Zell-Tumoren detektiert. Während die Sensitivität für Proben mit extrahierter DNA bei 85 % lag, betrug diese bei in Paraffin eingebetteten Proben 66 %. Die einzelnen Labore hatten vor der Teilnahme an der Studie Sensitivitäten für Ihren Test zwischen 75 % und 95 % angegeben. Die Spezifität der PCR lag bei 96 %. Die Verwendung der Kapillarelektrophorese als Analyseverfahren und die anorganische Extraktion in Paraffin fixierter Proben führten zu einer erhöhten Sensitivität bei Abnahme der Spezifität (ARBER et al.,

2001).

2002 wurde eine ähnliche Studie zum Nachweis von B-Zell-Tumoren durchgeführt. Es wurden 29 Proben (16 Proben mit extrahierter DNA und 13 in Paraffin eingebettete Proben) von 19 Laboren ausgewertet. 14 Labore führten auch Southern Blotting mit einem Teil der Proben oder mit allen Proben durch. Sensitivität und Spezifität des Southern Blotting betragen 100 %. Die Sensitivität der PCR lag bei 63 %. Wie auch in anderen Studien war die Sensitivität bei folliculären Lymphomen (55 %) signifikant schlechter als für die anderen B-Zell-Lymphome (84 %). Die Sensitivität der einzelnen Labore war extrem variabel und bewegte sich zwischen 20 % und 90 %. Bei den T-Zell-Lymphomen wurde in 6,3 % der Fälle ein falsch positives Ergebnis erzielt. In den einzelnen Laboren bewegte sich die Falschpositivrate zwischen 0 und 25 % (BAGG et al., 2002). Wie in der Studie von Arber et al. war die Sensitivität bei Paraffin-fixierten Proben schlechter.

Aufgrund der sehr variablen Protokolle und Ergebnisse wurde das BIOMED-2 Projekt ins Leben gerufen, das von der Organisation „EuroClonality“ durchgeführt wird. Diese ist eine Abteilung der „European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology (ESLHO)“. 2003 wurde ein neues PCR-Protokoll vorgestellt, das eine verbesserte Sensitivität zeigte und ein durch Zurverfügungstellung aller Primer eine standardisierte Anwendung für Forschungseinrichtungen weltweit anbieten sollte. Für dieses Protokoll wurden eine Multiplex-PCR mit 107 Primern entwickelt. Außerdem wurden Richtlinien für die Interpretation der Ergebnisse erstellt. Das Protokoll ist ausgelegt für die Analyse der PCR-Produkte durch Gene Scanning oder Heteroduplexanalyse, die sich in vorherigen Studien sowohl durch eine hohe Sensitivität auch eine hohe Spezifität ausgezeichnet hatten (VAN DONGEN et al., 2003). Die Sensitivität des Protokolls betrug bei B-Zell-Tumoren bei 99 % und bei T-Zell-Tumoren 94 % (VAN KRIEKEN et al., 2007). Genauere Angaben zur Spezifität wurden nicht gemacht.

Nachfolgend wurde das Protokoll von anderen Arbeitsgruppen verwendet. Die beobachteten Sensitivitäten und Spezifitäten waren recht unterschiedlich. Während einige Studien die hohe Sensitivität des Protokolls mit Werten zwischen 89 und 98 % bestätigten (LIU et al., 2007; GHORBAN et al., 2014; HUMME et

al., 2014; GHORBAN et al., 2015), zeigten andere Arbeitsgruppen niedrigere Sensitivitäten: In einer Studie von 2014 wurden Proben von 91 Patienten untersucht. Die Sensitivität bei den B-Zell-Tumoren lag bei 74 %, die Spezifität lag bei 87 %. Bei den T-Zell-Tumoren betrug Sensitivität und Spezifität 91 % und 54 % (KOKOVIC et al., 2014). In einer Folgestudie derselben Arbeitsgruppe wurden 37 B-Zell-Lymphome, 26 T-Zell-Lymphome und 29 reaktive Proliferationen mit den B-Zell-Primern untersucht. Die Sensitivität bei B-Zell-Tumoren lag bei 81 %. Die Spezifität betrug je nach Primerset zwischen 85 und 96 % bei den T-Zell-Lymphomen und zwischen 86 und 97 % bei den reaktiven Läsionen (KOKOVIC et al., 2015). In einer weiteren Studie mit 78 B-Zell-Tumoren, 80 T-Zell-Tumoren und 61 reaktiven Proliferationen lag die Sensitivität bei den B-Zell-Tumoren bei 96 %, und bei den T-Zell-Tumoren bei 84 %. Die Spezifität betrug 93 % (KIM et al., 2013). Miyata-Takata et al. untersuchten 100 T-Zell-Lymphome und 63 Kontrollproben (B-Zell-Tumoren und reaktive Läsionen) mit den T-Zell-Primern und erreichten eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 100 % (MIYATA-TAKATA et al., 2014). Auch Jia et al. berichteten für B-Zell-Tumoren eine etwas niedrigere Sensitivität von 86 % bei einer Spezifität von 82 % (JIA et al., 2014).

4.2. Die Schmelzkurvenanalyse in der Humanmedizin

Die erste Studie zum Nachweis monoklonaler Antigenrezeptorarrangements wurde 2001 vorgestellt. Gutzmer et al. untersuchten 22 T-Zell-Lymphome und 26 Patienten mit Dermatitis mit drei verschiedenen Methoden:

- Thermocycler-PCR (Peltier ThermoCycler 200, MJ Research, Watertown, MA) mit nachfolgender PAGE
- LightCycler-PCR (LightCycler, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) mit nachfolgender PAGE
- LightCycler-PCR mit nachfolgender SKA

Proben wurden als monoklonal definiert, wenn nach der Gelelektrophorese eine oder zwei klar abgrenzbare Banden sichtbar waren. In der Schmelzkurvenanalyse musste die negative erste Ableitung der Schmelzkurve - dF/dT , aufgetragen gegen die Temperatur, einen einzelnen Peak aufweisen. Mehrere Peaks waren als oligoklonal definiert und viele verschiedene Peaks oder

ein Plateau waren als negativ definiert. Die Proben wurden visuell ausgewertet. Bei sichtbaren Peaks oder einem Plateau wurden durch die Gerätesoftware mittels „best fit Analyse“ die Schmelztemperatur (T_m) und die Standardabweichung berechnet. Die Peakanzahl wurde für diese Analyse auf 1 gesetzt. Die qualitative Sensitivität bei ThermoCycler und PAGE betrug 68 %, wobei 2 Proben ein biklonales Ergebnis zeigten. Die Analyse mittels LightCycler und PAGE zeigte bei einem weiteren Patienten ein monoklonales Ergebnis an und somit eine Sensitivität von 73 %. Die LightCycler-PCR mit SKA erkannte 13 von 22 Lymphomen als monoklonal (58 %). Die Spezifität war bei allen Verfahren bei 100 %. Die quantitative Sensitivität wurde anhand von Verdünnungsreihen untersucht. DNA einer Tumorzelllinie wurde in DNA von mononukleären Zellen des peripheren Blutes verdünnt. Für ein monoklonales Ergebnis war ein Tumorzellanteil von 1 bis 3 % (ThermoCycler-PCR mit PAGE), 1 % (LightCycler-PCR mit PAGE) bzw. 10 % (LightCycler-PCR mit SKA) nötig (GUTZMER et al., 2001).

In den folgenden Jahren wurden verschiedene Kriterien für die visuelle Auswertung der SKA entwickelt. 2002 veröffentlichten Xu et al. eine Studie zur Detektion von IgH-Generearrangements mittels LightCycler-System. Die Kriterien für die visuelle Auswertung der Schmelzkurvenanalyse waren Peakhöhe und -breite. Ein monoklonaler Peak musste mindestens doppelt so hoch und höchstens halb so breit sein wie ein Peak einer polyklonalen Probe einer Tonsille. Anhand von 130 Proben mit Verdacht auf B-Zell-Neoplasie wurden Sensitivität und Spezifität von MCA und PAGE miteinander verglichen. Die relative Sensitivität und Spezifität betrug jeweils 100 %. Im Vergleich zum Southern Blotting betrug Sensitivität und Spezifität der MCA 58 % und 100 %. Das Detektionslimit lag in Verdünnungsreihen bei 12,5 % (XU et al., 2002). Zwei Jahre später folgte eine weitere Studie von Xu et al. zum Nachweis von B-Zell Tumoren. Wieder wurden Peakhöhe und -breite als Kriterium herangezogen, allerdings nicht mehr im Vergleich zu einer polyklonalen Probe. Stattdessen musste die Höhe eines monoklonalen Peaks das Doppelte der Peakbreite betragen. Relative Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur PAGE betrug 92 % und 100 % (XU et al., 2004). Kummalue et al. benutzten 2010 dieselben Kriterien für die visuelle Auswertung der MCA. Während mittels Gene Scanning und Heteroduplex-PCR mit nachfolgender PAGE alle 26 Lymphome erkannt wurden,

zeigte die MCA eine Sensitivität von 88 %. Das Detektionslimit wurde mit 0,78 % angegeben (KUMMALUE et al., 2010). Yang et al. benutzten bei der Untersuchung von T-Zell-Tumoren als Auswertungskriterium auch die Höhe der Peaks, die bei monoklonalen Proben eineinhalb mal so hoch sein musste wie bei einer polyklonalen Tonsillenprobe. Statt der Peakbreite führten sie als Kriterium ein, dass die Schmelztemperatur T_m bei monoklonalen Ergebnissen mindestens 1,5°C höher sein musste als bei polyklonalen Proben. In ihrer Studie zeigte die MCA im Vergleich mit der PAGE eine relative Sensitivität von 100 % und eine relative Spezifität von 97 %. Im Vergleich zum Goldstandard Southern Blotting lag die Sensitivität bei 71 %, das Detektionslimit betrug zwischen 12,5 % und 6,25 % (YANG et al., 2005). Andere Studien haben auch die Form der Peaks mit in die Auswertung einbezogen. So entwickelten Dobbs und Earls 2003 die Kriterien, dass ein monoklonaler Peak symmetrisch und deutlich zu erkennen sein musste, bei wiederholter Untersuchung eine ähnliche Form aufweisen sollte und sich die Schmelztemperatur T_m nur um 0,2°C unterscheiden durfte. Außerdem wurde festgelegt, dass der Peak keine signifikante Schulter aufweisen sollte, wobei diese als signifikant eingestuft wurde, wenn sie mindestens halb so hoch wie der Gesamtpeak war. Neben einer Klassifizierung als negativ und positiv wurde die Diagnose „indeterminate“ (= nicht zu ermitteln) eingeführt. Im direkten Vergleich mit der PAGE erreichte die MCA eine relative Sensitivität von 89 % und eine relative Spezifität von 100 %. Verglichen mit der histologischen Diagnose betrug die Sensitivität 54 %. Das Detektionslimit wurde mit 50 % angegeben (DOBBS & EARLS, 2003). Uemura et al. verwendeten ähnliche Kriterien. Monoklonale Peaks mussten deutlich erkennbar, hoch und oben schmal zulaufend sein und durften ebenfalls keine signifikante Schulter aufweisen, wobei diese nicht näher definiert wurde. Außerdem musste die T_m der Probe reproduzierbar sein. Breite, flache Peaks, Peaks mit einer deutlichen Abweichung der T_m und Peaks mit signifikanter Schulter oder einer Schulter rechts des höchsten Punktes der Kurve wurden als „indeterminate“ klassifiziert. Die Sensitivität der MCA lag mit 74 % und war höher als bei der Gelelektrophorese (61 %) (UEMURA et al., 2007).

2015 folgte eine weitere Studie von Xu et al., in der neue Auswertungskriterien vorgestellt wurden. Anhand von 17 Patienten mit reaktiver Hyperplasie wurde für die verschiedenen Primer die Höhe der negativen ersten Ableitung $-(dF/dT)$,

aufgetragen gegen die Temperatur, ermittelt. Alle Proben hatten $-(dF/dT)$ -Werte von $< 3,5$ (FR2-Primer) und $< 2,5$ (FR3-Primer). Diese Werte wurden als Grenzwert für die Unterscheidung von monoklonalen und polyklonalen Proben festgesetzt. Sensitivität und Spezifität betragen 70 % und 100 %. Die MCA war auch hier sensitiver als die Gelelektrophorese. Das Detektionslimit lag bei 3,125 % (XU et al., 2015).

Aufgrund der Vielzahl der verwendeten Kriterien für die visuelle Auswertung der Schmelzkurvenanalyse setzten Retamales et al. sich zum Ziel, eine objektivere Methode zur Auswertung der MCA zu entwickeln. Sie nutzten dabei die Tatsache, dass sich die Kurve der negativen ersten Ableitung des Fluoreszenzabfalls $-(dF/dT)$ durch eine mathematische Funktion beschreiben lässt. Mit der Software des LightCycler-Systems wurde eine „one peak area“-Analyse durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Berechnung der Likelihood ratio (LR). Anhand von 10 sicher diagnostizierten Lymphomen und 10 Patienten mit chronischer Gastritis wurden „one peak area“-Werte von 3,0 (+/- 0,82) für die Lymphome ermittelt. Bei den Gastritispatienten betrug dieser Wert hingegen 7,69 (+/-2,4). Die von ihnen angestrebte LR =1 wurde bei einem Wert von 4,64 gefunden. Dementsprechend wurde dieser Wert als Grenzwert zur Unterscheidung von monoklonalen und polyklonalen Proben herangezogen. Die Sensitivität der Methode betrug 95 % bei einer Spezifität von 100 %. Das Detektionslimit lag bei 1,56 % (RETAMALES et al., 2007).

5. PARR in der Tiermedizin

5.1. Einführung

Der Einsatz von PAAR in der Veterinärmedizin wurde 1999 zum ersten Mal von Verneau et al. beschrieben. In ihrer Studie wurden die Immunphänotypen kaniner Leukämien näher charakterisiert. Allerdings war der Einsatz allein auf den Nachweis von T-Zell-Neoplasien beschränkt. Es wurden Primer für den TCR γ -Locus entwickelt, mit denen insgesamt neun Tiere untersucht wurden: Zwei Hunde mit TCR $\gamma\delta$ -CLL, ein Hund mit TCR $\alpha\beta$ -CLL, ein Hund mit reaktiver LGL-Lymphozytose, hervorgerufen durch eine Ehrlichiose-Infektion und fünf weitere Kontrolltiere ohne Auffälligkeiten im Blutbild. Alle CLL-Proben zeigten ein

positives Ergebnis, während die Kontrolltiere inklusive des Hundes mit der Ehrlichiose-Infektion ein negatives Ergebnis zeigten. Wie in der Humanmedizin zuvor beschrieben, konnte auch bei dem Tier mit TCR $\alpha\beta$ -CLL mit den Primern für den TCR γ -Locus ein klonales Rearrangement nachgewiesen werden (VERNAU & MOORE, 1999).

Die erste veterinärmedizinische Studie, die sich primär mit PARR in der Lymphomdiagnostik beim Hund beschäftigte, folgte 2003. Es wurden 77 Hunde mit lymphatischer Neoplasie und 24 Kontrolltiere untersucht (BURNETT et al., 2003). In dieser Studie wurden 4 verschiedene Primer entwickelt. Der Primer C μ amplifiziert die konstante Region von IgM und wurde als Positivkontrolle eingesetzt, um nachzuweisen, dass genügend DNA in ausreichender Qualität vorhanden war. Weiterhin wurden zwei B-Zell-Primer (CB1 und CB2) und ein T-Zell-Primer (TCR γ) entwickelt. Das Ergebnis wurde als klonal angesehen, wenn nach der Gelelektrophorese eine oder mehrere gut differenzierbare Banden sichtbar waren. Proben mit keiner sichtbaren Bande oder mit einer leiterähnlichen Schliere wurden als negativ befundet. Ein klonales Rearrangement wurde in 91 % der lymphatischen Neoplasien und in 4 % der Kontrolltiere gefunden. Da nur Proben mit zytologisch oder histologisch eindeutigen Ergebnis verwendet wurden, postulierten die Autoren, dass die Sensitivität unter klinischen Bedingungen niedriger sein könnte (BURNETT et al., 2003). Die Sensitivität des Verfahrens war auch von dem Ursprung des getesteten Gewebes abhängig. Wurden die Tumorzellen in Verdünnungsreihen mit nicht lymphatischem Gewebe vermischt, war die Detektionsgrenze niedriger als bei Verdünnung der Tumorzellen in lymphatisches Gewebe wie Milz oder Lymphknoten. Das einzige Tier aus der Kontrollgruppe, das eine klonale T-Zell-Proliferation zeigte, hatte zum damaligen Zeitpunkt eine Panzytopenie und einen erhöhten Ehrlichiosetiter. Nach Therapie mit Doxycyclin normalisierte sich das Blutbild und das Tier war nach zwei Jahren klinisch unauffällig. Die PARR wurde nicht wiederholt. Anhand von 43 lymphatischen und plasmazellulären Neoplasien mit bekanntem Immunphänotyp wurde die Übereinstimmung zwischen dem Immunphänotyp und dem klonalen Rearrangement überprüft. Von 25 B-Zell-Neoplasien zeigten 24 Tumoren ein klonales Rearrangement mit einem B-Zell-Primer, ein Tier zeigte kein klonales Rearrangement. Von 18 T-Zell-Tumoren hatten 3 Tumoren in der PARR ein polyklonales Ergebnis, 14 Tiere zeigten ein monoklonales Ergebnis mit

dem T-Zell Primer und ein Tier zeigte ein monoklonales Rearrangement mit einem B-Zell-Primer und einem T-Zell-Primer. Wie auch in der Humanmedizin bekannt, zeigte auch bei Burnett 1 von 3 untersuchten myeloischen Leukämien ein monoklonales Rearrangement (BURNETT et al., 2003).

5.2. Die Entwicklung der Primer

Burnett et al. hatten Primer für B- und T-Zellen entwickelt, bevor die Genomaufschlüsselung des Hundes vorlag. Er gewann RNA von Milzzellen eines gesunden Hundes und entwickelte cDNA-Klone, indem er Primer verwendete, die an die Sequenz des Exon 1 des kaninen C μ banden (BURNETT et al., 2003). Er sequenzierte fünf Klone. Alle Klone hatten eine konservierte DNA-Sequenz in der V-Domäne, die mit einem einzigen Primer (CB1) amplifiziert werden konnten. Weiterhin wurden 2 verschiedene Sequenzen der J-Segmente identifiziert, die mit den Primern CB2 und CB3 amplifiziert werden konnten.

Die T-Zell Primer wurden für TCR γ -Gene entwickelt. In humanmedizinischen Studien wurde gezeigt, dass TCR γ einfacher zu detektieren ist, da er relativ einfach aufgebaut ist und in den meisten T-Zellen umarrangiert wird, unabhängig davon, ob es sich um $\alpha\beta$ T-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen handelt (VAN DONGEN et al., 2003; JOACHIMS et al., 2006; KELLER & MOORE, 2012a). Burnett et al. gewannen T-Zellen aus Thymusgewebe eines gesunden Hundes. Ein Primer wurde in Anlehnung an die V-Sequenzen von Rindern und Kaninchen designt, die eine stark konservierte Sequenz am 3'-Ende von V γ zeigten. Mit dem so designten Primer wurden erneut 5 cDNA-Klone erzeugt. Die Sequenzierung zeigte zwei J-Sequenzen und eine V-Sequenz, so dass auch hier 2 Primer für die J-Sequenz (TCR γ 1, TCR γ 2) und ein Primer für die V-Region (TCR γ 3) entwickelt wurden.

Während die 3 TCR γ -Primer zusammen verwendet werden können, können CB2 und CB3 jeweils nur mit CB1 kombiniert werden, aber nicht miteinander. CB1 und CB2 wurden zu dem Primerprodukt IgH major zusammengefasst und CB1 und CB3 wurden zu dem Produkt IgH minor zusammengefasst (BURNETT et al., 2003).

Auch Verneau et al. hatten durch Sequenzanalyse von 40 TCR γ -VJ-Klonen Konsensus-Primer entwickelt (VERNAU & MOORE, 1999).

Durch die fortschreitende Sequenzanalyse des Hundegenoms wurde es möglich, spezifischere Primer zu entwickeln, die potentiell mehr umarrangierte Sequenzen erkennen konnten. 2005 entwickelten Tamura et al. anhand der Genomdatenbank einen neuen B-Zell-Primer, mit dem alle fünf von ihnen untersuchten B-Zell-Lymphome erkannt wurden (TAMURA et al., 2006).

Yagihara et al. identifizierten 2006 durch Sequenzanalysen vier verschiedene V- und C-Gene und 6 J-Gene. Die V- und J-Gene konnten aufgrund einer Sequenzähnlichkeiten jeweils zu zwei Gruppen zusammengefasst werden, so dass jeweils 2 Primer für die V- und J-Gene designt wurden: V γ a, V γ b, J γ a und J γ b. Die Primerkombination V γ a-J γ b detektierte acht von elf T-Zell-Lymphomen, die Primerkombination V γ b-J γ b detektierte die restlichen 3 T-Zell-Lymphome, so dass insgesamt alle elf T-Zell-Lymphome erkannt wurden. Eine Kombination von V γ a oder V γ b mit J γ a führte in keinem Fall zu einem positiven Ergebnis. Es gab kein falsch positives Ergebnis mit einem der Primer bei einem der getesteten Kontrolltiere (B-Zell-Tumoren und Tiere mit normalen oder hyperplastischen Lymphknoten). Die sieben B-Zell-Lymphome wurden alle korrekt mit den von Tamura entwickelten Primern erkannt (YAGIHARA et al., 2007).

2010 wurden die Primer von Yagihara et al. durch weitere Sequenzierungsstudien weiter optimiert. Die Primersequenzen von V γ a und J γ b wurden um 3 Nukleotide zu ihrem 5`-Ende verschoben und die Primersequenz von J γ a wurde zu ihrem 3`-Ende verschoben. Die Sensitivität betrug bei 20 epitheliotropen T-Zell-Lymphomen 95 %, bei 14 nicht epitheliotropen Lymphomen betrug sie 71 % (CHAUBERT et al., 2010).

Kurz zuvor hatten Massari et al. 2009 die vollständige Struktur des T-Zell-Rezeptors γ (TCR γ) veröffentlicht. Er besteht aus 40 Genen, die in 8 Kassetten angeordnet sind, die insgesamt 6 funktionale C-Gene, 8 funktionale V-Gene und 7 funktionale J-Gene enthalten (MASSARI et al., 2009). Keller et al. führten 2012 eine Studie zu den Rearrangement-Mustern des kaninen TCR γ durch und entwickelten hierbei eine neue Multiplex-PCR (KELLER & MOORE, 2012a, 2012b). Für jedes V-Gen wurden spezifische Primer entwickelt. Die J-Gene wiesen zum Teil eine stark konservierte Sequenz auf, so dass hier nicht für jedes einzelne Gen ein spezifischer Primer entwickelt werden konnte, sondern zum Teil „consensus primer“ verwendet werden mussten. Jeder individuelle Primer für ein

V-Gen wurde zusammen mit Multiplex-J-Primern anhand von polyklonaler Thymus-DNA getestet. V-Primer, mit denen ein polyklonales Ergebnis in der Elektrophorese erzielt wurde, wurden anschließend zusammen in einer Multiplex-PCR zusammen getestet, um so die optimale Primerkombination zu ermitteln. Auf diese Weise wurde ein Standard-Primerset entwickelt, das aus 6 „forward“- und 6 „reverse“-Primern besteht und zusammen in einem Röhrchen verwendet werden kann. Sie entwickelten zusätzlich ein zweites Primerset mit 12 genspezifischen Primern für die V-Gene, die in Dreiergruppen auf 4 Röhrchen aufgeteilt wurden und jeweils zusammen mit den 6 „reverse“-Primern des Standard-Primersets verwendet wurden. Dieses zweite Primerset kann dazu verwendet werden, die umarrangierten V-Gene zu identifizieren.

Im Anschluss wurden 12 T-Zell-Neoplasien mit dem neu entwickelten Standard-Primerset untersucht. Alle 12 Tumoren wurden erkannt.

Eine weitere Erkenntnis der Untersuchungen von Keller et al. war, dass alle 12 von ihnen untersuchten T-Zell-Neoplasien zwischen 3 und 6 monoklonale Rearrangements aufwiesen. Diese können dadurch entstehen, dass die Gene des TCR γ beim Hund in Kassetten angeordnet vorliegen. Während der somatischen Rekombination kann es durch diese spezielle Anordnung zu simultanen Rearrangements kommen.

Aufgrund der multiplen Banden im Gel waren die einzelnen Banden zum Teil schwierig voneinander zu differenzieren, insbesondere dann, wenn im Hintergrund polyklonale Schlieren vorhanden waren (KELLER & MOORE, 2012a).

2015 wurde die Eignung der bisher von Burnett et al., Valli und Vernau, Chaubert et al., Yagihara et al. und Keller et al. entwickelten T-Zell-Primer zur Diagnostik des kaninen intestinalen Lymphoms untersucht. Von 39 T-Zell-Lymphomen wurden insgesamt 32 (82 %) mit den Primern von Keller et al. als monoklonal erkannt. Die Primer von Valli und Vernau detektierten 21 %, die Primer von Yagihara et al. und Burnett et al. erkannten jeweils 67 % und die Primer von Chaubert et al. erkannten 74 % der Tumoren als monoklonal (TAKANOSU & KAGAWA, 2015).

5.3. Qualitative Sensitivität von PARR

Die Sensitivität von PARR hängt von verschiedenen Faktoren ab. Neben der Primerwahl und der Analysemethode der PCR-Produkte spielt auch die Herkunft des Tumorgewebes eine Rolle. Die qualitative Sensitivität von PARR in den bisher veröffentlichten Studien liegt zwischen 17 % und 100 % (TAMURA et al., 2006; KELLER & MOORE, 2012a; TAKANOSU & KAGAWA, 2015). In einem Reviewartikel von 2009 berichtete Avery nach Untersuchung von über 800 Patienten im Labor der Colorado State University eine Sensitivität von 75 %. Die genaue Methode wurde nicht beschrieben (AVERY, 2009).

5.3.1. Sensitivität in Abhängigkeit der verwendeten Primer

Eine genaue Differenzierung zwischen der Sensitivität der einzelnen B- und T-Zell-Primer ist anhand der Studien oft schwierig, da in vielen Studien nicht der Immunphänotyp von allen Proben bekannt war und somit nur eine gemeinsame Sensitivität von den verwendeten B- und T-Zell Primern angegeben werden konnte (BURNETT et al., 2003; MODIANO et al., 2005; LANA et al., 2006).

Lediglich für die T-Zell-Primer veröffentlichten Takanosu und Kagawa eine vergleichende Studie zur Sensitivität der Primer von Burnett et al, Chaubert et al., Yagihara et al, Vernau und Moore und Keller et. al., in der die Primer von Keller et al. die höchste Sensitivität erreichten (TAKANOSU & KAGAWA, 2015).

5.3.1.1. Sensitivität unter Verwendung der B- und T-Zell-Primer von Burnett et al.

Burnett et al. untersuchten mit PARR und nachfolgender PAGE 77 lymphatische Neoplasien und erreichten eine Sensitivität von 91 % (BURNETT et al., 2003). Wilkerson et al. untersuchten mit demselben Protokoll 7 Lymphompatienten, von denen 6 (86 %) als monoklonal erkannt wurden (WILKERSON et al., 2005). Lana et al. testeten 86 lymphatische Tumoren, die Sensitivität betrug 72 % (LANA et al., 2006). Kaneko et al. untersuchten 4 alimentäre Lymphome, von denen alle erkannt wurden (KANEKO et al., 2009a). Thalheim et al. modifizierten die Methode von Burnett et al., indem sie im Anschluss an die PCR keine PAGE durchführten, sondern die PCR-Produkte einer Heteroduplex-Analyse mit anschließender Auftrennung mittels Kapillargelelektrophorese unterzogen. Die Sensitivität betrug bei 62 untersuchten Tumoren 74 % (THALHEIM et al., 2013).

Langner et al. verwendeten für die Untersuchung von 40 Lymphomen ebenfalls die Primer von Burnett et al. und verglichen zwei Analysemethoden (PAGE und SKA) miteinander. Die Sensitivitäten betragen 90 % (PAGE) und 95 % (SKA) (LANGNER et al., 2014). In einer Untersuchung von 39 gastrointestinalen T-Zell-Tumoren mittels PARR und Heteroduplexanalyse erkannten die Primer 67 % der Tumoren (TAKANOSU & KAGAWA, 2015). In der Studie von Gentilini et al. wurden 96 Tumoren mittels PARR und Gene Scanning untersucht. Die Primer von Burnett et. al identifizierten 90 % der Proben als monoklonal (GENTILINI et al., 2009).

5.3.1.2. Sensitivität unter Verwendung der B-Zell-Primer von Tamura et al.

Tamura et al. führten Genom-Studien zum B-Zell-Rezeptor durch und entwickelten Primer, die 5 von 5 Lymphome korrekt diagnostizieren konnten, während die Primer von Burnett et. al nur 4 von 5 dieser Tumoren erkannten (TAMURA et al., 2006). In der Studie von Gentilini et al. war die Detektionsrate der Primer von Tamura et al. jedoch niedriger als die der Primer von Burnett et al. (GENTILINI et al., 2009). Yagihara et al. konnten mit den Primern 4 von 5 B-Zell-Tumoren nachweisen (YAGIHARA et al., 2009).

5.3.1.3. Sensitivität unter Verwendung der B- und T-Zell-Primer von Vernau und Moore

Vernau und Moore entwickelten die T-Zell-Primer für die Untersuchung von 9 T-Zell-Leukämien, die Sensitivität betrug 100 % (VERNAU & MOORE, 1999). Nachfolgend wurden 50 indolente B- und T-Zell-Lymphome mit den T-Zell-Primern und eigens neu entwickelten B-Zell-Primern untersucht, von denen 80 % erkannt wurden (VALLI et al., 2006). O'Brien et al. untersuchten 34 B-Zell-Tumoren, 73 % zeigten ein positives Ergebnis (O'BRIEN et al., 2013). In einer Studie mit Anwendung der Heteroduplexanalyse wurden 7 von 10 Tumoren korrekt als monoklonal diagnostiziert (THILAKARATNE et al., 2010). Keller et al. testeten 12 T-Zell-Neoplasien, von denen nur 2 (17 %) mit den Primern von Vernau und Moore erkannt wurden (KELLER & MOORE, 2012a). Takanosu und Kagawa berichteten eine ähnliche Detektionsrate von 21 % bei der Untersuchung von intestinalen T-Zell-Lymphomen mittels PARR und Heteroduplexanalyse mit nachfolgender PAGE (TAKANOSU & KAGAWA, 2015).

5.3.1.4. Sensitivität unter Verwendung der T-Zell-Primer von Chaubert et al.

Chaubert et al. untersuchten mit ihren neu entwickelten T-Zell-Primern 34 T-Zell-Lymphome, von denen 85 % positiv waren (CHAUBERT et al., 2010). Takanosu et al. detektierten in ihrer Studie 74 % von 39 intestinalen T-Zell-Tumoren (TAKANOSU & KAGAWA, 2015).

5.3.1.5. Sensitivität unter Verwendung der T-Zell-Primer Yagihara et al.

Yagihara et al. entwickelten ihre T-Zell-Primer unter Verwendung der Hundegenom-Datenbank. In ihrer Studie konnten alle 11 getesteten Tumoren mit 2 Primerpaaren als klonal diagnostiziert werden (YAGIHARA et al., 2007.). In einer späteren Studie wurden 15 von 16 T-Zell-Lymphomen erkannt (94 %). In der Flowzytometrie hatten von diesen 16 Lymphomen 12 ein typisches und 4 ein aberrantes Expressionsmuster von CD-Molekülen (YAGIHARA et al., 2009). Die Detektionsrate in der Studie von Takanosu und Kagawa lag bei 67 % (TAKANOSU & KAGAWA, 2015).

5.3.1.6. Sensitivität unter Verwendung der T-Zell-Primer von Keller und Moore

Keller et al. detektierten mit den von ihnen entwickelten Primern 12/12 T-Zell-Lymphomen (KELLER & MOORE, 2012a). In einer nachfolgenden Studie zum Vergleich aller existierenden T-Zell-Primer wurden 30 intestinale T-Zell-Tumoren untersucht, die Sensitivität mit den Primern von Keller et al. betrug 82 % und war höher als die Sensitivität mit den anderen getesteten T-Zell-Primern. Während Keller und Moore die Kapillarelektrophorese verwendet hatten, benutzten Takanosu und Moore eine Heteroduplexanalyse mit nachfolgender PAGE für die Analyse der PCR-Produkte (TAKANOSU & KAGAWA, 2015).

5.3.2. Sensitivität in Abhängigkeit von der verwendeten Analysemethode der PCR-Produkte

Die am häufigsten verwendete Methode zur Analyse der PCR-Produkte ist in der Tiermedizin die Gelelektrophorese, meistens durchgeführt mittels Polyacrylamidgelen (BURNETT et al., 2003; KELLER et al., 2004; MODIANO et al., 2005; WILKERSON et al., 2005; LANA et al., 2006; KANEKO et al., 2009b; KANEKO et al., 2009a; CHAUBERT et al., 2010), seltener mittels

Agarosegelen (VERNAU & MOORE, 1999; TAMURA et al., 2006). Während Vernau und Moore in der ersten tiermedizinischen PARR-Studie und auch Tamura et al. 4%ige Agarosegele verwendeten (VERNAU & MOORE, 1999; TAMURA et al., 2006), stellten Chaubert et al. in ihrer Studie fest, dass 2%ige Agarosegele nicht in der Lage waren, die PCR-Produkte ausreichend zu separieren (CHAUBERT et al., 2010). Auch die Arbeitsgruppe von Vernau und Moore verwendete in ihrer Folgestudie Polyacrylamidgele (VALLI et al., 2006). Yagihara et al. verwendeten in ihren Studien für die PCR-Produkte der TCR γ -Gene Polyacrylamidgele, während sie für die PCR-Produkte der B-Zell-Primer 4%ige Agarosegele verwendeten (YAGIHARA et al., 2007; YAGIHARA et al., 2009). Die Sensitivität von einer PARR mit nachfolgender PAGE ohne Heteroduplexanalyse liegt in den verschiedenen Studien zwischen 72 und 100 % (BURNETT et al., 2003; WILKERSON et al., 2005; LANA et al., 2006; KANEKO et al., 2009a).

In Anlehnung an die Humanmedizin wurde auch in der Tiermedizin zunehmend die Heteroduplexanalyse verwendet, um Pseudoklonalität und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden (VAN DONGEN et al., 2003; TAKANOSU et al., 2010). Die Heteroduplexanalyse gefolgt von einer PAGE wurde insbesondere bei der Untersuchung von gastrointestinalen Lymphomen häufig verwendet. Fukushima et al. untersuchten unter Verwendung der Primer von Burnett et al. und Verneau und Moore endoskopisch gewonnene Proben von 12 alimentären Lymphomen, von denen 67 % als monoklonal erkannt wurden (FUKUSHIMA et al., 2009). Ohmura et al. analysierten 29 intestinale Lymphome mit den B-Zell-Primern von Burnett et al. und den T-Zell-Primern von Chaubert et al. Die Sensitivität betrug 76 % (OHMURA et al., in press, accepted 2015). Thilakarathne et al. wendeten ebenfalls die Heteroduplexanalyse an, um 10 multizentrische Lymphome mit den von Vernau und Moore entwickelten Primern zu untersuchen. 7 von 10 Tumoren zeigten ein monoklonales Ergebnis (THILAKARATNE et al., 2010). 2015 folgte eine Untersuchung von 39 gastrointestinalen T-Zell-Lymphomen, in der die Detektionsraten der bisher entwickelten T-Zell-Primer vergleichend getestet wurden. Die Detektionsraten bewegten sich zwischen 21 % mit den Primern von Vernau und Moore und 82 % mit den Primern von Keller und Moore (TAKANOSU & KAGAWA, 2015).

Eine weitere Analysemethode der PCR-Produkte ist das Gene Scanning. Gentilini et al. führten 2009 eine Studie an 96 Lymphompatienten (überwiegend nodale Lymphome) durch. Neben den Primern von Burnett et al. und Tamura et al. wurden neue Primer entwickelt. Insgesamt wurden 9 Primersets verwendet, die Sensitivität betrug 98 % (GENTILINI et al., 2009). Goto-Koshino et al. untersuchten 2015 15 multizentrische und 13 gastrointestinale Lymphome mittels Gene Scanning, die Sensitivität betrug jeweils 93 % und 85 %. (GOTO-KOSHINO et al., 2015). Hiyoshi et al. analysierten endoskopisch gewonnene Proben von 21 gastrointestinalen Lymphomen, die Sensitivität betrug 76 % (HIYOSHI et al., 2015). In den beiden zuletzt genannten Studien wurden neben neu entwickelten B- und T-Zell-Primern die B-Zell-Primer von Burnett et al., Tamura et al. und Gentilini et al. verwendet. Als zusätzliche T-Zell-Primer wurden die von Burnett et al. und Yagihara et al. entwickelten Primer benutzt.

Vereinzelt wurde in der Tiermedizin auch die Kapillarelektrophorese zur Analyse der PCR-Produkte verwendet. Thalheim et al. erreichten bei der Untersuchung von 62 lymphatischen Tumoren mit Heteroduplexanalyse und nachfolgender Kapillarelektrophorese mit den Primern von Burnett et al. eine Sensitivität von 76 % (THALHEIM et al., 2013). Auch Keller und Moore benutzten bei der Entwicklung ihrer Multiplex-PCR die Kapillarelektrophorese und konnten so 12 von 12 Tumoren detektieren (KELLER & MOORE, 2012a).

5.4. Quantitative Sensitivität

Die quantitative Sensitivität von PARR bezeichnet die Fähigkeit des Tests auch bei Verdünnung der Tumorzellen in polyklonales Gewebe die Tumorzellen detektieren zu können. Burnett et al. stellten fest, dass bei Verdünnung der reinen Tumor-DNA bis zu einer Menge von nur 0,1 ng noch ein positives Ergebnis erzielt werden konnte. Auch bei Verdünnung in nicht-lymphatische DNA von Leberzellen konnte bei einem Tumoranteil von 0,1 % der Tumor nachgewiesen werden. Bei Verdünnung der Tumor-DNA eines B-Zell-Tumors in lymphatische DNA einer normalen Milz lag das Detektionslimit bei 1 %. Nach Verdünnung von DNA eines T-Zell-Tumors in die DNA eines normalen Thymus betrug das Detektionslimit hingegen 10 % (BURNETT et al., 2003).

Yamazaki et al. verbesserten die Sensitivität der PARR so, dass sie auch zur

Erkennung einer sogenannten minimal residual disease (MRD, Rückstände kleiner Mengen Tumorzellen im Blut unter Chemotherapie) geeignet war. Nach einer ersten PCR mit den Primern von Burnett mit anschließender PAGE, wurden die PCR-Produkte in Klonvektoren eingebracht und anschließend sequenziert. Anhand dieser Sequenzierung wurden für das jeweilige Rearrangement spezifische Primer entwickelt. Die PCR-Produkte dieser Primer wurden in einer Real-time-PCR mit dem Fluorochrom FAM amplifiziert. Anhand dieser Daten wurde eine Standardkurve generiert, um so die Anzahl der PCR-Produkte quantifizieren zu können. Das Detektionslimit konnte durch dieses Verfahren auf 0,01 % gesenkt werden (YAMAZAKI et al., 2008).

Keller und Moore testeten anhand von T-Zelllinien die quantitative Sensitivität ihrer Multiplex-PCR. Mit der Zelllinie CLGL90, die 3 monoklonale Rearrangements zeigte, wurden Verdünnungsreihen angelegt. Es zeigte sich, dass die hohe qualitative Sensitivität zu Lasten der quantitativen Sensitivität ging. Bei Verwendung des entwickelten Standard-Primersets in einer Multiplex-PCR, lagen die Detektionsgrenzen für die 3 monoklonalen Rearrangements bei 50 %, 25 % und 5 %. Unter Verwendung der für diese Rearrangements spezifischen Primer in einer Simplex-PCR war das Detektionslimit mit 50 %, 10 % und 1 % deutlich niedriger. Zusätzlich war die Detektionsrate niedriger, wenn der spezifische Primer nur wenige, selten vorkommende Rearrangements erkannte. Auch die Amplikongröße der monoklonalen PCR-Produkte spielte eine Rolle. Wenn diese sich von der Amplikongröße des polyklonalen Hintergrundes deutlich unterschied, war die Erkennungsrate höher (KELLER & MOORE, 2012a).

5.5. Spezifität in klinischen Studien

In den verschiedenen Studien liegt die Spezifität zwischen 96 % (BURNETT et al., 2003) und 100 % (TAMURA et al., 2006; GENTILINI et al., 2009; CHAUBERT et al., 2010; THILAKARATNE et al., 2010; LANGNER et al., 2014; OHMURA et al., in press, accepted 2015).

Bei Burnett et al. zeigte 1 von 24 Kontrolltieren ein monoklonales Rearrangement für TCR γ in einer Probe aus dem Knochenmark. Das Tier litt unter einer Ehrlichioseinfektion (BURNETT et al., 2003). Vernau und Moore untersuchten ebenfalls ein Tier mit Ehrlichioseinfektion, das in ihrer Studie jedoch ein

oligoklonales Ergebnis zeigte (VERNAU & MOORE, 1999). Burnett et al. testeten auch eine akute myeloische Leukämie, die ein monoklonales IgH-Rearrangement aufwies. Da dies jedoch in der Humanmedizin häufiger vorkommt, wurde dieses Tier nicht als Kontrolltier mitgezählt.

Avery berichtete in einem Reviewartikel von 2009 über 141 Hunde mit positivem PARR-Ergebnis im Labor der Colorado State University ohne zytologischen oder histologischen Nachweis eines Lymphoms (unveröffentlichte Daten). Die Tiere waren über ein Jahr nach der PCR-Untersuchung nachverfolgt worden. 94 % der Tiere entwickelten innerhalb des folgenden Jahres einen lymphatischen Tumor. Von den restlichen 8 Tieren litten 2 Tiere an einer Ehrlichiose und zeigten eine klonale T-Zell-Population. Jeweils 1 Tier mit Lyme Disease, Rocky Mountain spotted fever und Bartonellose zeigte eine monoklonale B-Zell-Population (AVERY, 2009).

Bei der Untersuchung von Darmproben von Tieren mit Enteritis wurden häufiger monoklonale Lymphozytenpopulationen nachgewiesen. Kaneko et al. untersuchten 4 enterale Lymphome, 4 Karzinome und 69 Tiere mit Enteritis mit der Methode von Burnett et al. Alle Lymphome waren korrekt positiv und die Karzinome zeigten alle ein negatives Ergebnis. Von den 69 Kontrolltieren zeigten 6 Patienten eine monoklonale T-Zell-Population. Bei 2 dieser 6 Patienten wurde nachfolgend ein Lymphom diagnostiziert. Die mediane Überlebenszeit der Enteritispatienten mit positivem PARR-Ergebnis war signifikant kürzer als bei den Enteritispatienten mit negativem PARR-Ergebnis (KANEKO et al., 2009a).

Hiyoshi et al. untersuchten 21 enterale Lymphome und 117 Patienten mit Enteritis mittels Gene Scanning. Für die PCR wurden B- und T-Zell-Primer aus jeweils 3 verschiedenen Studien benutzt. Die Enteritis wurde histologisch in 3 Schweregrade eingeteilt. Das Vorliegen von kleinzelligen Lymphomen innerhalb dieser Gruppe konnte histologisch nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Sensitivität betrug 76 %. Bei 51 % der Tiere mit Enteritis war das Ergebnis der PARR monoklonal. 40 Tiere zeigten eine monoklonale T-Zell-Population, 2 Tiere eine monoklonale B-Zellpopulation und 6 Tiere wiesen einen gemischten Immunphänotyp mittels PARR auf. Besonders die Tiere mit einer schwergradigen Enteritis zeigten gehäuft ein positives Ergebnis. Die mediane Überlebenszeit zwischen Enteritis-Patienten mit und ohne monoklonales Ergebnis war statistisch

nicht signifikant unterschiedlich.

Olivero et al. wiesen bei 8/47 Hunden mit inflammatory bowel disease (IBD) eine monoklonale Lymphozytenpopulation nach. Ein positives PARR-Ergebnis war mit einem hohen Schweregrad der Entzündung und einer schlechten Prognose assoziiert (OLIVERO & GENTILINI, 2011).

Ohmura et al. erreichten mittels Heteroduplexanalyse eine Spezifität von 100 % (OHMURA et al., in press, accepted 2015).

5.6. Immunphäotypisierung mittels PARR

Die PARR kann grundsätzlich 4 verschiedene Ergebnisse zeigen. Sie kann negativ sein, ein monoklonales B- oder T-Zell-Rearrangement aufweisen oder aber einen gemischten Immunphänotyp zeigen (= BT). Die Übereinstimmung von PARR mit der Immunhistochemie (IHC) oder Flowzytometrie (FC) liegt je nach Studie und Patientengut zwischen 63 und 100 %. In den meisten Studien ist das Ergebnis der PARR zuverlässig, wenn ein monoklonales Ergebnis für entweder IgH oder TCR γ vorliegt (BURNETT et al., 2003; LANA et al., 2006; THALHEIM et al., 2013). Das Vorkommen von gemischten Immunphänotypen (BT) ist in den Studien sehr variabel und liegt zwischen 0 und 26 % (VALLI et al., 2006; YAGIHARA et al., 2009).

Burnett et al. untersuchten 18 bekannte T-Zell-Neoplasien und 25 bekannte B-Zell-Tumoren mit PARR. 14 von 18 T-Zell-Tumoren zeigten ein positives Ergebnis mit den T-Zell-Primern, 3 Tumoren hatten ein polyklonales Ergebnis und 1 Tumor zeigte eine monoklonale B- und T-Zellpopulation (BT). Bei den B-Zell-Tumoren stimmten die Ergebnisse von Flowzytometrie und PARR bei 24 von 25 Tumoren überein, 1 Fall war negativ. Die Übereinstimmung lag insgesamt bei 88 %. Wenn nur Fälle mit einbezogen wurden, in denen PARR ein monoklonales Ergebnis anzeigte, betrug die Übereinstimmung 97 %, bei Außerachtlassen der Probe mit dem BT-Immunphänotyp 100 % (BURNETT et al., 2003).

Bei Lana et al. betrug die Übereinstimmung zwischen PARR und Immunhistochemie (IHC) oder Flowzytometrie (FC) für B-Zell-Tumoren 97 % und für T-Zell-Tumoren 93 %. Wie bei Burnett et al. wurden Tiere mit einem BT-Immunphänotyp beobachtet. Und auch Lana et al. stellten fest, dass der

Immunphänotyp bei allen Proben, die ein monoklonales Ergebnis für entweder ein B- oder T-Zell-Rearrangement zeigten, mit der IHC oder FC übereinstimmte (LANA et al., 2006).

Chaubert et al. untersuchten 34 T-Zell-Lymphome und 12 B-Zell-Lymphome. Die Sensitivität betrug 80 %. Bei allen Proben, die ein positives Ergebnis zeigten, stimmte auch der Immunphänotyp mit der Voruntersuchung überein (CHAUBERT et al., 2010).

In einer Studie zur Prävalenz von B- und T-Zell-Lymphomen unter den verschiedenen Hunderassen wurden 166 Hunde zusätzlich zur PARR mit FC oder IHC untersucht. Unter Miteinbeziehung der negativen PARR-Ergebnisse (2 B-Zell-Tumoren und 5 T-Zell-Tumoren) und der beiden T-Zell-Tumoren, die ein positives Ergebnis mit den B- und T-Zell-Primern zeigten, lag die Übereinstimmung wie bei Lana et al. für B- und T-Zell-Tumoren bei 97 % und 93 % (MODIANO et al., 2005).

Yagihara et al. führten eine Studie zur Übereinstimmung zwischen Flowzytometrie und PAAR bei kleinzelligen lymphatischen Leukämien durch. Mittels Flowzytometrie wurden 12 T-Zell-Lymphome, 5 B-Zell-Lymphome und 14 aberrante Lymphome (4 T-Zell-Lymphome mit aberrantem Expressionsmuster, 9 BT-Zell-Lymphome, 1 Null-Zell-Lymphom) ermittelt. Alle 12 typischen T-Zell-Lymphome waren auch molekularbiologisch T-Zell-Neoplasien. Bei den B-Zell-Lymphomen war ein Tumor in der PARR negativ. 3 von 4 aberranten T-Zell-Lymphomen waren auch in der PARR positiv mit den T-Zell-Primern, 1 Tumor war komplett negativ. Von den 9 BT-Zell-Lymphomen zeigten 6 Tumoren ein monoklonales T-Zell-Rearrangement, ein Tumor ein monoklonales B-Zell-Rearrangement und 2 Tumoren waren negativ. Der Tumor, der in der Flowzytometrie vollkommen negativ war, zeigte in der PARR einen B-Zell-Immunphänotyp. Die Übereinstimmung betrug insgesamt 61 %, bei Außerachtlassen der in der PARR negativen Tiere betrug sie 70 % (YAGIHARA et al., 2009).

Thalheim et al. untersuchten 62 Lymphome mittels Flowzytometrie, Immunhistochemie und PARR. Die Immunhistochemie wurde als Goldstandard angesehen und die beiden anderen Methoden wurden sowohl miteinander als auch

mit der Immunhistochemie verglichen. Die IHC ergab 46 B-Zell-Lymphome und 16 T-Zell-Lymphome. Die PARR erkannte 46 von 62 Tumoren (74 %). 31 der 46 B-Zell-Tumoren und 13 der 16 T-Zell-Tumoren wurden korrekt diagnostiziert. 13 B-Zell-Tumoren und 3 T-Zell-Tumoren waren negativ. Jeweils 1 B- und 1 T-Zell-Tumor zeigten in der PARR einen gemischte BT-Immunphänotyp, ein weiterer B-Zell-Tumor war positiv für ein monoklonales T-Zell-Rearrangement. Insgesamt betrug die Übereinstimmung 70 %. Wenn nur die positiven PARR-Ergebnisse mit einbezogen wurden, lag die Übereinstimmung bei 93 %. Die Flowzytometrie war positiv in 61 von 62 Fällen (98 %) und diagnostizierte alle 16 T-Zell-Lymphome und 42 von 46 B-Zell-Lymphomen korrekt. Von den übrigen 4 B-Zell-Lymphomen, wurden 2 als BT-Zell-Tumoren und 1 als T-Zell-Tumor diagnostiziert. Die Übereinstimmung betrug 94 %. Beim Vergleich von PARR und Flowzytometrie stimmten 63 % der Ergebnisse überein (THALHEIM et al., 2013).

Thilakarathne et al. führten eine Studie zum Nachweis der MRD während der Chemotherapie durch. Hierfür wurden initial Blut und Lymphknoten untersucht. 7 von 10 Tieren zeigten ein positives Ergebnis. Es wurden durch die PARR 2 B-Zell-Lymphome, 2 T-Zell-Lymphome und zwei BT-Zell-Lymphome ermittelt. Der siebte Patient zeigte einen unterschiedlichen Immunphänotyp in Blut (T) und Lymphknoten (B). Nach der Chemotherapie waren die Lymphknoten in Remission, so dass nur noch das Blut getestet werden konnte. Der Immunphänotyp im Blut war bei diesem Tier konstant. Nach der Chemotherapie wurde bei einem der BT-Tumoren nur noch ein monoklonales Rearrangement mit dem B-Zell-Primer nachgewiesen (THILAKARATNE et al., 2010).

Wilkerson et al. untersuchten in ihrer Studie zur Immunphänotypisierung von Lymphomen und Leukämien unter anderem 7 Proben, die mittels Immunhistochemie und Flowzytometrie einen gemischten Immunphänotyp aufwiesen. Die Übereinstimmung betrug hier 0 %, da 4 Tumoren ein monoklonales T-Zell-Rearrangement zeigten, 2 Tumoren ein monoklonales B-Zell-Rearrangement. Die letzte Probe war negativ (WILKERSON et al., 2005).

5.7. Die Bedeutung von PARR für Staging und Prognose

Die Bedeutung von PARR für das Staging und die Prognose wurde von mehreren Studien untersucht. 2004 untersuchten Keller et al., ob Tumorzellen im peripheren Blut mittels PARR häufiger nachgewiesen werden können als durch eine zytologische Untersuchung. Nach standardisierter zytologischer Untersuchung waren 57 % von 28 Blutaussstrichen positiv oder fraglich positiv für das Vorliegen neoplastischer Lymphozyten. Nach Untersuchung des peripheren Blutes mittels PARR waren 89 % der Proben positiv (KELLER et al., 2004).

Lana et al. führten eine weitere Untersuchung zur Eignung von PARR für das Staging durch. Von 86 Patienten hatten 62 ein positives Ergebnis im Lymphknoten (Sensitivität 72 %). Von diesen 62 Patienten gehörten 50 Patienten (80 %) dem klinischen Stadium 3 oder 4 an, 20 % dem Stadium 5. Mittels PARR wurden bei 79 % der Patienten Tumorzellen im Blut nachgewiesen. Bei 1 Patienten mit zytologischem Nachweis von Tumorzellen war PARR negativ. Der Unterschied der medianen Überlebenszeit zwischen Patienten mit und ohne Nachweis von Tumorzellen im peripheren Blut mittels PARR war nicht statistisch signifikant (LANA et al., 2006).

Die Bedeutung eines positiven PARR-Ergebnisses für die Prognose von Tieren mit Enteritis ist unklar. In einer Studie hatten diese Patienten eine signifikant kürzere Überlebenszeit als Enteritispatienten mit negativem PARR-Ergebnis (KANEKO et al., 2009a). In einer zweiten Studie konnte dies nicht bestätigt werden (HIYOSHI et al., 2015).

2008 entwickelten Yamazaki et al. eine Methode, um die quantitative Sensitivität zu verbessern und verbliebene Tumorzellen im Blut von Lymphompatienten zu detektieren und zu quantifizieren. Blut von 7 Hunden mit Lymphom wurde vor Beginn der Chemotherapie und dann während der Chemotherapie regelmäßig auf verbliebene Tumorzellen untersucht. Das Ergebnis wurde mit der klinischen Remission, gemessen an der Größe der Lymphknoten, und mit einem manuellen Differentialblutbild verglichen. Anstieg und Abfallen von MRD und Lymphknotenvolumen verliefen bei allen Patienten weitgehend parallel. Bei keinem der Patienten wurde eine molekulare Remission nachgewiesen, auch nicht, während sie klinisch in kompletter Remission waren (YAMAZAKI et al., 2008). Zwei Jahre später folgte eine zweite Studie, in der die MRD-Level von 17

Hunden in kompletter Remission bis zur klinischen Rezidivierung überwacht wurden. Bei allen Hunden sank die MRD unter der Chemotherapie zunächst ab. Die Höhe der MRD am Ende der Chemotherapie war prognostisch für die Remissionsdauer. Die Tiere wurden je nach Höhe der MRD bei Abschluss der Chemotherapie in 3 Gruppen eingeteilt. Tiere mit einer hohen, mittleren und niedrigen MRD hatte eine mediane Remissionsdauer von 30, 190 und 400 Tagen (YAMAZAKI et al., 2010).

2011 folgte eine Studie von Sato et al., in der die MRD bei 20 Hunden mit B-Zell-Tumor nach Abschluss der Chemotherapie alle 2 bis 4 Wochen gemessen und mit dem klinischen Remissionsstatus verglichen wurde. 15 der 20 Hunde bekamen während dieser Überwachungsperiode ein Rezidiv nach median 120 Tagen. Bei 14 von diesen 15 Hunden war schon mindestens 2 Wochen vor dem klinischen Rezidiv ein Anstieg der MRD zu beobachten, median bereits 42 Tage vor Rezidivierung. Bei keinem der 5 Hunde ohne Rezidiv wurde ein Anstieg der MRD festgestellt (SATO et al., 2011a).

In einer zweiten Studie überwachten Sato et al. das Ansprechen der MRD nach Gabe der Chemotherapeutika Vincristin, Cyclophosphamid und Doxorubicin. Nach der ersten Gabe dieser Medikamente zeigten nach Vincristingabe 100 %, nach Cyclophosphamidgabe 52 % und nach Doxorubizinapplikation 96 % der Patienten ein Abfallen der MRD. Nach der dritten Gabe von Vincristin und der jeweils zweiten Gabe von Cyclophosphamid und Doxorubicin sank die MRD bei 20 %, 25 % und 74 % der Patienten. Es zeigte sich, dass Vincristin besonders in der Anfangsphase der Chemotherapie eine gute Ansprechrate hatte und Doxorubicin insgesamt die beste Wirksamkeit besaß. Cyclophosphamid hatte eine schwächere Wirkung. Insbesondere schwere Hunde sprachen schlechter an, was dafür spricht, dass die Dosierung anhand der Körperoberfläche in m² bei großen Hunden möglicherweise zu einer Unterdosierung führt. Die mediane Überlebenszeit war bei Tieren, die nicht gut auf Cyclophosphamid ansprachen, mit 234 Tagen signifikant kürzer als bei den anderen Tieren, die median 424 Tage überlebten (SATO et al., 2011b).

5.8. Die Schmelzkurvenanalyse in der Tiermedizin

Die erste Studie über die Anwendung der Schmelzkurvenanalyse beim Hund wurde 2014 von Langner et al. vorgestellt. Es wurden 30 B-Zell-Lymphome, 10 T-Zell-Lymphome sowie 9 Tiere mit einer reaktiven Hyperplasie untersucht. Für die PCR wurden die von Burnett et al. entwickelten Primer verwendet (BURNETT et al., 2003). Ein monoklonaler Peak musste symmetrisch sein. Außerdem musste die maximale Peakhöhe von $-(dF/dT)/T$ ein für jeden Primer festgelegtes Zahlenverhältnis im Vergleich zu der maximalen Peakhöhe einer normalen lymphatischen Probe aufweisen. Die Messung der Peakhöhe erfolgte einheitlich vom Nullpunkt bis zum höchsten Punkt des Peaks. Alle Proben wurden mit der MCA und einer PAGE untersucht. Die Spezifität betrug bei beiden Methoden 100 %. Die Sensitivität beim Nachweis von B-Zell-Tumoren war bei der MCA mit 100 % höher als bei der PAGE (93 %). Bei den T-Zell-Tumoren zeigten beide Verfahren eine Sensitivität von 80 %. Mittels MCA war die Detektionsgrenze in Verdünnungsreihen niedriger als bei der PAGE, so dass neben der erhöhten qualitativen Sensitivität auch eine erhöhte quantitative Sensitivität festgestellt werden konnte. Das Detektionslimit bei B-Zell-Tumoren betrug mit dem Primer IgH major 9,38 %, mit dem Primer IgH minor 12,5 % und mit den T-Zell-Primern 18,5 % (LANGNER et al., 2014). Das Detektionslimit mit der PAGE war im Vergleich höher.

III. PUBLIKATION

1. Letter of acceptance

From: david.argyle@ed.ac.uk

Subject: Veterinary and Comparative Oncology - Decision on Manuscript VCO-2015-096.R1
30-Oct-2015

Dear Dr. Schöpfer,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Melting curve analysis in canine lymphoma by calculating maximum fluorescence decrease" in its current form for publication in Veterinary and Comparative Oncology.

Thank you for your fine contribution and on behalf of the Editors of Veterinary and Comparative Oncology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Yours sincerely,

Prof. David Argyle
Co-Editor, Veterinary and Comparative Oncology
david.argyle@ed.ac.uk

Date Sent: 30-Oct-2015

2. Artikel

Melting curve analysis in canine lymphoma by calculating maximum fluorescence decrease

I. Schöpfer¹, S. Ohmura¹, B. Rütgen², H. Tsujimoto³, K. Weber¹ and J. Hirschberger¹

¹Clinic of Small Animal Medicine, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

²Department of Pathobiology, Clinical Pathology, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

³Department of Veterinary Internal Medicine, Graduate School of Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Abstract

PARR is widely used in the diagnostics of canine lymphoma. In human and veterinary medicine, melting curve analysis (MCA) has successfully been introduced to facilitate the process. Since visual interpretation of melting curves can be rather subjective, the purpose of this study was to develop an objective interpretation of melting curves by calculating the maximum fluorescence decrease (dF_{\max}) within a defined rise of temperature. Lymph node aspirates and blood of 34 dogs with lymphoma and 28 control dogs were tested. 27/34 lymphoma cases were correctly detected to be monoclonal (sensitivity 79%). 2/28 control dogs showed a monoclonal rearrangement (specificity 93%). B- and T-cell neoplasia were still detectable using DNA amount as low as 10 ng. In serial dilutions of tumor DNA with DNA of normal tonsils, the detection limit was 25% for B-cell lymphomas and 100% for T-cell lymphoma, suggesting that PCR conditions could still be optimized.

Introduction

In the last 15 years, polymerase chain reaction (PCR) for antigen receptor rearrangements (PARR) has been established as a reliable adjunct method in diagnosing canine lymphoma.^{1–7} The principle of PARR relies on the fact that lymphoma cells are, depending on the used primer sets, monoclonal, biclonal or oligoclonal, whereas cell populations in non-neoplastic lymphoproliferative disorders are polyclonal.^{8–10} This procedure can reach a sensitivity and specificity as high as 97 and 100%.¹ Furthermore, PARR can be used for immunophenotyping and it holds promise for identifying and monitoring minimal residual disease which could enable the clinician to adapt the treatment protocol to the needs of each individual lymphoma patient which might result in a better prognosis.^{11–14} In human medicine,

PARR is extensively used as a fast screening test for lymphatic neoplasia, and attempts have been made to facilitate the procedure. By introducing melting curve analysis (MCA), it became possible to amplify DNA sequences and characterize them in a one-step procedure which eliminates the need for subsequent gel electrophoresis.^{14–19} For MCA, a quantitative real-time PCR is performed. After each cycle, the DNA amount can be measured *via* fluorescence markers like SYBR® green which bind to double-stranded DNA. Then, PCR products are heated step by step. Each double-stranded PCR product has its specific melting point depending on size, sequence, G-C-yield and Watson–Crick base pairing. As soon as the melting point is reached, the double strands begin to separate and fluorescence decreases. A monoclonal amplicon of a hematopoietic malignant population shares one

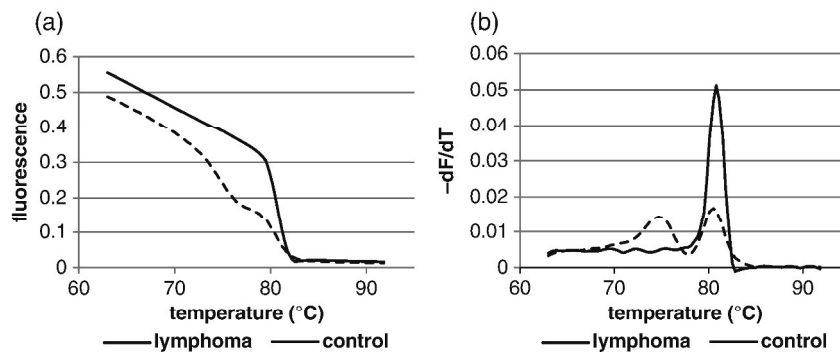
2 I. Schöpfer *et al.*

Figure 1. Melting curves and negative first derivatives of melting curves of a monoclonal lymphoma case and a polyclonal control case. (A) Melting curves from fine needle aspirates of a B-cell lymphoma (continuous line) and a control animal (dashed line). Fluorescence (vertical axis) is plotted against temperature (horizontal axis). (B) The negative first derivative of the melting curves (vertical axis) of Fig. 1A, plotted against temperature (horizontal axis). This curve is usually used for visual interpretation.

distinct melting temperature. After reaching this temperature during the gradual heating process, the curve shows a steep fluorescence decrease while the polyclonal amplicons of control animals reach their melting point at different temperatures, resulting in a gradual fluorescence decrease. Usually, MCA is evaluated visually by plotting the negative first derivative $-\Delta F/\Delta T$ against temperature.^{16–18} By definition, the negative first derivative describes the gradient of a curve. The steeper the original melting curve, the narrower the peak of the resulting negative first derivative. A monoclonal lymphoma case shows a single high and narrow peak resulting from the steep decline of the melting curve. Polyclonal samples on the other hand show one or more small broad peaks representing a less steep decline of fluorescence.

Fig. 1A shows the melting curves of lymph node DNA from a B-cell lymphoma (continuous line) and a control case (dashed line), both amplified with B-cell primer IgH major.¹ The fluorescence is plotted against temperature. The monoclonal amplicons of the lymphoma case reach their specific melting point at 79 °C leading to a steep decline in fluorescence. The control case on the other hand shows a gently declining curve because its polyclonal amplicons reach their melting points at different temperatures. Fig. 1B shows the negative first derivatives of the same curves, plotted against temperature.

In many cases, it seems to be sufficient to compare height and width of the negative first derivative

of lymphoma samples and control cases to distinguish between monoclonal lymphoma samples and polyclonal control cases.^{16,17,20}

As there can be a wide variety of shape of the negative first derivatives, it can be challenging to define objective criteria for visual interpretation.^{15,21} Furthermore, the height of the negative first derivative depends on the amount of DNA that is present in the sample at the beginning of the heating process. Fig. 2 shows two possible melting curves (Fig. 2A) and their negative first derivatives (Fig. 2B). The curves represent samples of the same animal that contain different amounts of DNA after the amplification process, just before heating cycles are started. The continuous line represents a relative DNA content of 1 at the beginning of the heating cycles while the dashed line represents a sample with a relative DNA content of 0.5. It is shown that the negative first derivative of the same monoclonal sample shows a different height if different amounts of DNA are present at the beginning of the heating process. On the other hand, the maximum relative fluorescence decrease ΔF_{\max} (%) would be identical for both curves because the fluorescence decrease is correlated to the fluorescence present at the beginning of the heating process. In reality, the difference should not be too critical in the majority of cases, because the PCR is not a linear process and the amounts of DNA after amplification cycles only differ slightly, even if twice as much DNA is present at the beginning of the amplification. However, it still seems reasonable to choose a mathematic approach

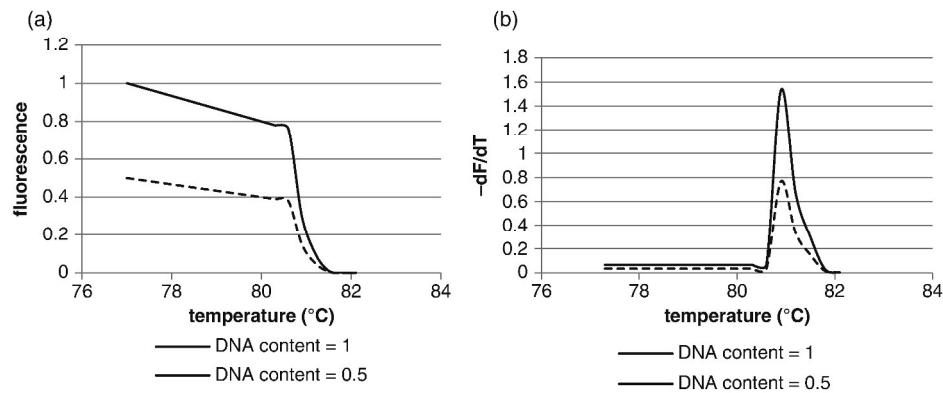


Figure 2. Correlation between DNA amount present after PCR amplification before heating cycles for MCA are started and the height of negative first derivatives. (A) Possible melting curves of samples containing DNA of the same animal; (B) negative first derivatives of the melting curves of Fig. 2A. Continuous line: relative DNA amount = 1, dashed line: relative DNA amount = 0.5.

for evaluating melting curves to avoid inaccuracies. Efforts to standardize the interpretation of melting curves have already been made in human medicine. Retamales et al. used the LightCycler data analysis software to calculate one peak area under the curve and then used the likelihood ratio to distinguish between polyclonal and monoclonal samples.²¹

Just recently, MCA was presented as a sensitive and specific diagnostic tool in veterinary medicine by using it in canine lymphoma.²⁰

Purpose of this study was to improve the objective interpretation of the data also in the field of veterinary medicine. For this reason, samples of 34 dogs with lymphomas and 28 control dogs were analysed by MCA. The main hypothesis was that by calculating the maximum fluorescence decrease within a certain rise of temperature during MCA, it is possible to develop a very simple but still objective method to interpret melting curves.

Materials and methods

Patient samples

A total of 34 client-owned dogs presented with lymphatic neoplasia between April 2010 and April 2012 to the oncology service of the clinic of small animal medicine, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany, were included in this study.

Blood and lymph node specimens were collected from 28/34 dogs with multicentric high-grade lymphoma. A total of 21/28 dogs were diagnosed

by cytology alone. In 7 out of the 28 cases, cytology was complemented by histopathology.

Six additional dogs were represented by other lymphoma entities. Blood and lymph node aspirates of 2/6 dogs with multicentric follicular lymphoma, 1/6 dogs with Sézary syndrome because of epitheliotropic T-cell lymphoma and 1/6 dogs with high-grade intestinal lymphoma were tested. All these cases were diagnosed by histopathology. In 2/6 dogs, a mediastinal lymphoma showing pleural effusion was diagnosed using cytology. One of these two dogs had a high-grade lymphoma. The tumour of the other dog consisted of intermediate-sized cells, a grading was not performed. This dog also showed involvement of peripheral lymph nodes so that a lymph node aspirate was tested in addition to blood and pleural effusion.

Dogs were included in the control group if they had a mild to marked lymph node enlargement as a result of any condition other than lymphoma. If lymphoma could not be ruled out by cytology, histopathology or imaging, cases were included only if they were negative on follow-up for at least 1 year. If dogs were not presented for follow-up after 12 months, the owners or referring veterinarians of those patients were interviewed through telephone about the general health status of the patient and development of the formerly enlarged lymph nodes. Twenty-eight dogs met these inclusion criteria. In 14 cases, lymph node aspirates and peripheral blood were available for analysis, while

4 I. Schöpfer *et al.***Table 1.** Animals within the control group: lymph node cytology, underlying condition, tissue tested by MCA, result MCA. The number in brackets represents the number of affected animals

Lymph node cytology	Underlying condition (number of cases)	Tissue tested by MCA (number of cases)	Result MCA
Reactive lymph node	Tributary tumour (4)	Blood, lymph node (3)	X
		Lymph node (1)	X
	Transient enlargement, unknown reason (2)	Blood, lymph node (1)	X
		Lymph node (1)	X
	Tributary inflammation (5)	Blood, lymph node (3)	X
		Lymph node (2)	X
Leishmania species	Anaplasmosis (1)	Blood, lymph node	X
	Leishmaniasis (2)	Blood, lymph node (1)	X
		Lymph node (1)	X
Lymph node metastasis	Leishmaniasis (1)	Lymph node	B
Lymphadenitis	Mast cell tumour (4)	Blood, lymph node (2)	X
		Lymph node (2)	X
Lymphadenitis	Histiocytic sarcoma (1)	Blood, lymph node	X
	Eosinophilic lymphadenitis (2)	Lymph node	X
Normal lymph node	Neutrophilic lymphadenitis (1)	Lymph node	X
		Tributary osteosarcoma (1)	Blood, lymph node
	Normal lymph node	Transient enlargement, unknown reason (1)	Blood, lymph node
Tributary chronic inflammation, renal amyloidosis, positive ELISA SNAP® test for Anaplasma phagocytophilum (1)			Blood
Not performed		Myeloid leukaemia (1)	Lymph node
Not performed	Chronic Ehrlichiosis (1)	Blood	X
Not performed		Blood, bone marrow	X

X = no clonal rearrangement, B = clonal rearrangement after amplification with B-cell primer IgH major. Animals with a clonal rearrangement are highlighted by heavy print.

in another 12 cases, only lymph node aspirates were obtained. In two cases, only blood or blood and bone marrow were tested. These animals suffered from conditions known to cause false-positive test results (ehrlichiosis and myeloid leukaemia). All samples were collected during routine diagnostic workup of patients to confirm or rule out lymphoma (for detailed information, see Table 1).

Collection and preparation of samples

Lymph node samples for cytology and MCA were taken *via* fine needle aspiration using a 20-gauge needle and a 5-ml syringe (both B. Braun, Melsungen, Germany). To avoid blood contamination, only a slight vacuum was applied. From each dog with lymphoma, two to three aspirates were taken. Mandibular lymph nodes were spared in lymphoma patients since they often show a reactive pattern because of proximity to the oral cavity. One aspirate was used for cytological diagnosis. Aspirates

designated for PARR were stored in RNAprotect Cell Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) at -21°C . Peripheral blood was mixed with RBC lysis buffer (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). After centrifugation for 5 min at $2000 \times g$ (Multifuge 3 L-R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), the supernatant was discarded and the remaining white blood cells were resuspended in $200 \mu\text{l}$ phosphate-buffered solution (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples were stored at -21°C . No formalin-fixed samples were used for MCA.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was available for 10 dogs with lymphoma. IHC was performed following the avidin-peroxidase procedure by four different accredited laboratories: Tierpathologie von Bomhard (München, Germany), Institute of Veterinary Pathology LMU Munich (Munich, Germany),

Table 2. Primary antibodies used for IHC

Antigen	Primary antibody
CD3	Polyclonal rabbit anti-human A 0452, DAKO, Hamburg, Germany
	Monoclonal mouse anti-human, M 7254, DAKO, Hamburg, Germany
CD20	Monoclonal rabbit anti-human, RB-9013-P, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
CD79a	Monoclonal mouse anti-human M7051, DAKO, Hamburg, Germany
	Monoclonal mouse anti-human MAK 2538, Linaris, Dossenheim, Germany

IDEXX VetMedLab (Ludwigsburg, Germany) and Laboklin (Bad Kissingen, Germany). The used antibodies are shown in Table 2.

DNA extraction

DNA from lymph node aspirates and peripheral blood was extracted using commercial kits following the manufacturer's instructions. For lymph node specimens, effusions and the aspiration of the intestinal lymphoma QIAamp® DNA mini kit (Qiagen®) was used, whereas QIAamp® DNA micro kit (Qiagen®) was applied for peripheral blood. DNA concentration was measured photometrically (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). Highly concentrated samples were diluted to a concentration of 100 ng DNA μl^{-1} . All samples were stored at -21°C .

PCR for antigen receptor rearrangements

Amplification of T-cell receptor gamma (TCR γ) and immunoglobulin sequences was performed on the basis of previously published methods.¹ The following three primer sets were used: the primer C μ amplifies the constant region of IgM and was used as a positive control to ensure that DNA of sufficient quality was present in all samples. Primer sets IgH major and TCR γ were used to amplify the rearrangements of the immunoglobulin heavy chain gene and the TCR γ gene. PCR was performed using the 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). A total of 1 μl of genomic DNA (10–100 ng) was amplified with 0.2 μl of each primer using QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, Qiagen. Total reaction

volume was 30 μl . Initially, HotStarTaq®, Qiagen, DNA Polymerase was activated at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of the subsequent cycling profile: denaturation at 95°C for 15 s, annealing and synthesis at 60°C for 1 min. For MCA, PCR products were denatured at 95°C for 15 s and then heated from 60°C up to 95°C with an increase of temperature of 1°C min^{-1} . Fluorescence decrease was measured after each increase of temperature of 0.3°C . A negative control (ultra pure water) and positive controls consisting of B-cell line CLBL-1²² and T cell line CL 1²³ were included in each run.

Interpretation of MCA

The principle of MCA is based on the fact that monoclonal amplicons will share one specific melting point at a distinct temperature. After reaching this temperature, amplicons start melting which leads to a sudden decrease of fluorescence. Polyclonal samples consist of a mixture of different lymphocytes, with each amplicon reaching its melting point at a different temperature. Thus, the melting curves of monoclonal samples are steeper compared with polyclonal samples, and the percentage of the overall fluorescence decrease within a defined increase of temperature should be higher in monoclonal samples than in polyclonal samples. Using the raw data of the original melting curves, the percentage of the fluorescence decrease was quantified by calculating the percentage fluorescence decrease ΔF (%) within a certain increase of temperature (ΔT):

$$\Delta F (\%) = \frac{F(T) - F(T + \Delta T)}{F(T_0)} \times 100$$

This was repeated for each point of temperature at which fluorescence was measured. The maximum fluorescence decrease (ΔF_{max}) within the defined temperature increase ΔT was compared between lymphatic neoplasms and non-neoplastic samples. Using multivariate Receiver Operating Characteristic analysis (MultiROC analysis) as described by Shultz,²⁴ a threshold was defined to distinguish monoclonal from polyclonal conditions. Overall, there are three variables (threshold for IgH major, threshold for TCR γ and ΔT). Therefore, the results of several MultiRoc analyses were compared. Although a false-negative test result in cases in

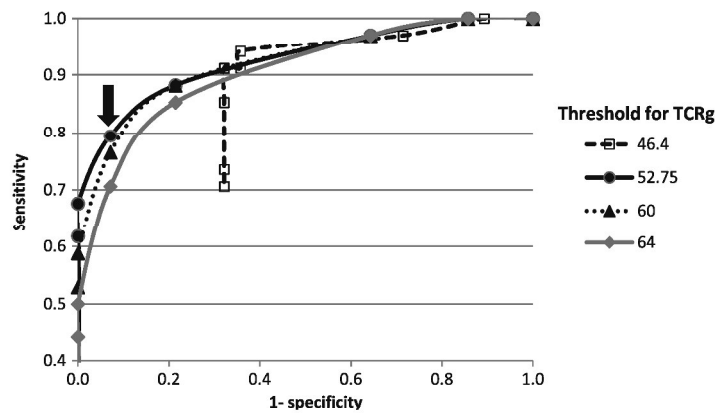
6 I. Schöpfer *et al.*

Figure 3. MultiROC analysis for different thresholds for IgH major and TCR γ within $\Delta T = 4^\circ\text{C}$. The y-axis displays sensitivity, the x-axis displays 1-specificity. Each line represents the ROC analysis for a fixed threshold for TCR γ combined with different thresholds for IgH major. The thresholds for IgH major are between 0 and 100%, represented by the symbols within every line. Fixed thresholds for TCR γ : dashed line = 46.4%, black continuous line = 52.75%, dotted line = 60%, grey continuous line = 64%. The black arrow pointed at the ROC analysis for TCR $\gamma = 52.75\%$ (black continuous line) marks the point at which the threshold for IgH major is set to 46.4%.

which lymphoma is highly suspected will always result in additional tests like histology or IHC, a false-positive result can easily lead to an unnecessary chemotherapy with serious consequences for the patient. Thus, a ΔT value and the thresholds for IgH major and TCR γ were chosen, that resulted in a high specificity on the cost of a lower sensitivity.

Limit of detection

To evaluate the sensitivity of the used protocol, DNA of the lymphoma cell lines CLBL-1²² and CL-1²³ were analysed using different amounts of DNA (200, 100, 50 and 10 ng). Furthermore, lymphoma cell line DNA was gradually diluted into DNA of normal tonsils. Relative amounts of tumour cell line DNA were 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 and 0.78%.

Statistical analysis

Multivariate ROC analysis was performed to establish the thresholds for TCR γ and IgH major according to a method of Shultz.²⁴ The results of sensitivity and specificity for MCA in comparison with the results of cytology and histology were then analysed by Chi-squared test and Fisher's exact test. A $P < 0.05$ was considered significant. Confidence intervals (CI) of 95% were determined for

sensitivity and specificity. All statistical calculations were performed using Excel.

Results

MultiROC analysis

After performing multiROC analysis, a sensitivity and specificity within the intended range were found after setting ΔT to 4°C . The threshold of ΔF_{max} for IgH major was set to 46.6%. Samples that were amplified with IgH major and showed a maximum decrease of fluorescence (ΔF_{max}) of 46.4% or more within an increase of temperature (ΔT) of 4°C were considered monoclonal. For the T-cell primer TCR γ , the threshold was set to 52.75%.

Fig. 3 shows four curves gained by MultiROC analysis. The continuous line represents a fixed threshold of 52.75% combined with different possible thresholds for IGH major. The black arrow is directed at the data point which represents the combination of the established thresholds for TCR γ and IgH major.

It is noticeable that the curves do not originate from the x,y coordinates 0,0, which curves in a traditional ROC analysis always do. This is especially evident for the dashed line. This curve represents a fixed threshold of ΔF_{max} for TCR γ of 46.4% which

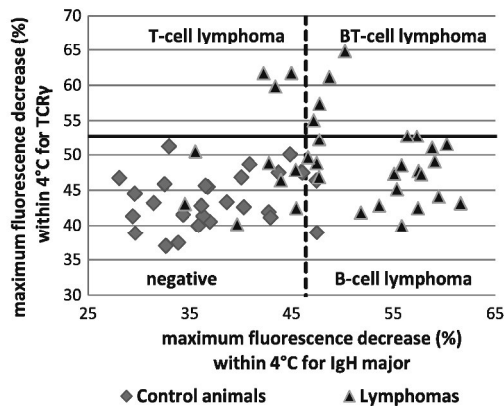


Figure 4. Dot plot of all tested animals using MCA. The x-axis shows ΔF_{\max} (%) for IgH major, the y-axis shows ΔF_{\max} (%) for TCR γ . Dashed line: threshold for IgH major set to 46.4%. Samples on the right side of the dashed line have a monoclonal rearrangement of IgH. Continuous line: threshold for TCR γ set to 52.75%. Samples above the line ($\Delta F_{\max} \geq 52.75\%$) have a monoclonal rearrangement of TCR γ . Samples within the right upper quadrant have a monoclonal rearrangement for both, IgH major and TCR γ , ($n = 4$, including one case with an opponent immunophenotype in blood and lymph node). Specimens within the left upper quadrant show a monoclonal rearrangement of TCR γ ($n = 3$) whereas samples in the lower right quadrant have a monoclonal rearrangement of IgH ($n = 22$, 20 lymphomas and 2 control cases). The lower left quadrant shows animals with polyclonal rearrangements ($n = 33$, 26 control cases and 7 lymphoma cases).

is combined with different thresholds of ΔF_{\max} for IgH major. The unusual origin is because of the fact that two variables are combined.²⁴ As the threshold of ΔF_{\max} for TCR γ of 46.4% is set very low, about 70% of the lymphoma samples are automatically diagnosed as positive and 32% of the control samples are falsely diagnosed as positive as well.

Patient samples

The distribution of values for ΔF_{\max} of lymphoma and control cases in relation to the applied thresholds for IgH major and TCR γ is shown in Fig. 4. The dashed line marks the threshold for IgH major ($\Delta F_{\max} = 46.6\%$), the continuous line represents the threshold for TCR γ ($\Delta F_{\max} = 52.75\%$).

Using the established criteria, MCA detected 27 of 34 lymphomas to be monoclonal and 26 of 28 control samples to be polyclonal. Sensitivity and specificity of MCA were 79% (95% CI 65–93%) and 93% (95% CI 84–100%), respectively.

Within the group of the 28 multicentric high-grade lymphomas MCA detected 22 to be monoclonal (79%). A total of 17 of 22 dogs had a monoclonal rearrangement in lymph node and blood (77%), 3 dogs had a monoclonal rearrangement only in the lymph node and 2 dogs were positive only in the peripheral blood. In total, 19/22 dogs (86%) with high-grade multicentric lymphoma showed involvement of the blood. MCA detected 17 B-cell lymphomas (77%), 2 T-cell lymphomas (9%) and 2 lymphomas with monoclonal rearrangements for both, IgH major and TCR γ (9%). One dog had an opponent immunophenotype in blood (TCR γ) and lymph node (IgH major). Table 3 summarizes the results of this patient group. Six animals showed polyclonal rearrangements in blood and lymph node.

In the group of six patients that suffered from different types of lymphoma, one multicentric follicular lymphoma showed polyclonal rearrangements in blood and lymph node. The other follicular lymphoma was positive for a monoclonal B-cell population in blood and lymph node. Both patients with mediastinal lymphoma showed a polyclonal population in their pleural effusion. One of these dogs had a monoclonal B-cell population in its blood whereas in the other patient with lymph node involvement, a monoclonal B-cell population was found in the lymph node. The patient with high-grade intestinal lymphoma tested positive for a monoclonal lymphatic population with IgH major and TCR γ in the abdominal lymph node. The patient with Sézary syndrome showed a monoclonal T-cell population in the peripheral blood (see Table 4).

Altogether, MCA detected 20 B-cell lymphomas, 3 T-cell lymphomas and 3 lymphomas with concurrent monoclonal rearrangement of the TCR γ and B-cell receptor. The fourth dog showed an inconsistent immunophenotype with a monoclonal B-cell population in its lymph node and a monoclonal T-cell population in its blood.

IHC of lymph node biopsies was available in 10 lymphoma cases. Eight animals had B-cell lymphoma whereas two dogs suffered from T-cell lymphoma. The results of MCA were identical to IHC in seven of ten cases. Two of the eight B-cell lymphomas were negative after MCA. In one

8 I. Schöpfer *et al.***Table 3.** Results of 22/28 multicentric high-grade lymphomas tested by MCA showing one or two monoclonal rearrangements

Monoclonal rearrangement	IgH major	TCR γ	IgH major + TCR γ	Blood TCR γ , lymph node IgH major
Blood and lymph node	13	2	1	1
Lymph node only	3	0	0	0
Blood only	1	0	1	0

Table 4. MCA results of the lymphoma patients that suffered from various kinds of lymphoma. Not shown: one follicular lymphoma which showed no monoclonal rearrangement at all

Study cases	Follicular lymphoma, multicentric	High-grade mediastinal lymphoma	Mediastinal lymphoma with multicentric involvement	High-grade intestinal lymphoma	Cutaneous lymphoma with Sézary syndrome
Material tested					
Blood	B	B	Negative	Negative	T
Lymph node	B		B	BT	Negative
Pleural effusion		Negative	Negative		

B = positive for a monoclonal rearrangement of immunoglobulin heavy chain gene, T = monoclonal rearrangement of TCR γ gene.

T-cell lymphoma, a dog with intestinal lymphoma, there was a positive result for both, the TCR γ and the immunoglobulin receptor in blood and lymph node.

In the control group, 2 of 28 dogs (7%) showed a false positive result. One dog with a reactive lymph node as a result of leishmaniasis had a monoclonal B-cell proliferation in its lymph node. Blood was not tested. The other dog suffered from a tributary chronic inflammation of its paw, a severe glomerulopathy, gastric ulcerations and had recently been treated for anaplasmosis after a positive result in a SNAP[®] test (SNAP[®] 4Dx[®] Plus, IDEXX, Westbrook, ME, USA). This dog showed a monoclonal B-cell proliferation in its blood but not in its lymph node.

For statistical analysis, sensitivity and specificity of the used protocol compared with cytology/histology were each tested by Fisher's exact test and Chi-square test. Sensitivity and specificity were highly significant ($P < 0.0001$).

Limit of detection

Different amounts of pure tumour cell line DNA between 10 and 200 ng were amplified. DNA of the B-cell line CLBL-1²² was amplified with primer IgH major, and DNA of the T-cell line CL-1²³ was amplified with TCR γ . In both cell lines, 10 ng were

still detected to be monoclonal when maximum fluorescence decrease was determined. When DNA of lymphoma cell lines was gradually diluted into DNA of normal tonsils, a peak within the expected melting temperature for B-cell line CLBL-1 was still detectable at a dilution of 3.125%, although at 12.5%, a second peak arose at a lower temperature. At the dilution of 3.125%, peak was already as high as the peak at the expected melting temperature (Fig. 5A). When calculation of the maximum fluorescence decrease was performed, samples were positive at a tumour cell DNA content of 25%. After dilution of T-cell line CL-1 into DNA of a normal tonsil, a visible peak within the expected melting temperature was still seen at 6.25%, but at 50% tumour cell DNA content, a second peak arose at a lower temperature (Fig. 5B). When maximum fluorescence decrease was calculated, samples that contained 50% tumour cell DNA were considered polyclonal.

Discussion

MCA is used extensively in human medicine to detect monoclonal rearrangements in lymphatic neoplasia.^{14–19} Compared with conventional PCR with subsequent gel electrophoresis, MCA offers the advantage of a reduced risk for cross-contamination between samples because amplification and analysis

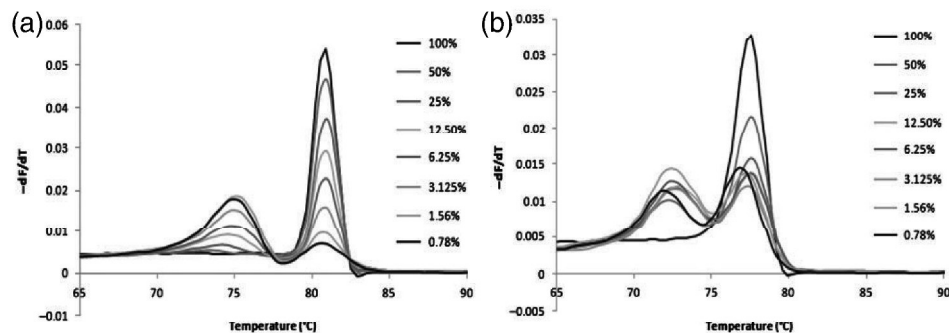


Figure 5. MCA of the serial dilution of tumour cell lines into DNA of a normal tonsil. Tumour cell content: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 and 0.78%. The y-axis shows the negative first derivative of the melting curves plotted against temperature (x-axis). (A) B-cell line CLBL-1 serially diluted and amplified with primer set IgH major. (B) T-cell line CL-1 serially diluted and amplified with primer set TCR γ .

are performed in a one-step procedure. Although Southern blot remains the gold standard for detecting monoclonal rearrangements in lymphoid neoplasia, it is very expensive, requires large amounts of DNA, is not applicable to fixed tissues and requires the use of radioactive materials. Therefore, PARR is used as a first-step procedure. Eventually, samples that are negative are retested by Southern blot.^{25–27}

One problem of MCA remains the visual interpretation of MCA since rather subjective criteria have usually been used in previous studies. Xu et al., Kummalue et al. and Steiff et al. defined a sample to be monoclonal, if the peak was at least twice the height and less than one-half of the width of a polyclonal sample of a normal tonsil.^{16,19,28} Yang demanded a monoclonal peak to be 1.5 times the height of a polyclonal sample from a tonsil. They also included the melting temperature (T_m), which had to be at least 1.5 °C higher than the T_m of a polyclonal tonsil.¹⁷ Height and width do seem to be useful criteria; however, they should not be used as sole criteria because the height is also dependent on the amount of DNA that is present in the sample after amplification. Even when the same amount of DNA is used for all samples at the beginning of the amplification process, the amounts still can vary after amplification. The higher the quantity of DNA at the beginning of the heating process, the higher the fluorescence F_0 at the beginning and the higher the decrease of fluorescence within a certain rise of temperature.

Another problem arises when peaks show a shoulder. Dobbs et al. took this variation of shape

into consideration and defined a peak as positive if it was distinct, easily identifiable and showed no significant shoulder. A shoulder was significant if it was more than half the height of the peak. Samples showing such a phenomenon were considered intermediate.¹⁸

In this study, a new approach was made to interpret melting curves relying on calculating the maximum fluorescence decrease (ΔF_{max}) within a defined rise of temperature (ΔT). This method offers an objective interpretation which automatically includes every possible variation of shape of melting curves and different amounts of DNA. The generated cut-offs for each primer are probably not transferable to other protocols but can easily be established.

In this study, sensitivity and specificity of MCA were 79 and 93%, respectively. The first veterinary study using PARR with subsequent MCA reported a sensitivity of 90%,²⁰ while in human medicine sensitivities between 58 and 95% have been described.^{16,17,19,21} False-negative results can occur when primers do not anneal to the targeted gene segments of lymphoma cells. As only three out of the four primer sets, presented by Burnett et al.,¹ were used in this study, the sensitivity might have been higher if the fourth primer IgH minor had been added.

Furthermore, one of the lymphomas that tested negative was a follicular lymphoma. In human medicine, mature B-cell disorders such as follicular lymphomas had false-negative results because hybridization of consensus primers was inadequate

10 I. Schöpfer *et al.*

because of the alterations of the sequences amplified by the primers. In one study, 65% of follicular lymphomas were negative after amplification with framework region III (FRIII) primers, whereas 82% of non-follicular lymphomas were positive.²⁹ To our knowledge, there have been no larger studies on this subject in veterinary medicine, but Valli *et al.* tested four follicular lymphomas by PARR. They all tested positive for the immunoglobulin receptor, two of them were also positive for TCR γ .³⁰

Sensitivities up to 97% have been reported in previous veterinary studies which evaluated the sensitivity of PARR followed by conventional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). However, it was already predicted, that in clinical practice, the sensitivity might be lower because of factors like extent of disease and cellularity of the samples.¹ This was confirmed in a review of Avery, published in 2009, in which unpublished data of the laboratory of the Colorado State University were reported. About 75% of approximately 800 cases were correctly detected to be monoclonal.³¹ Thalheim *et al.* had a similar sensitivity of 74%.³² Both studies used the primer sets of Burnett *et al.* which were also used in this study.¹

In 2009, Massari *et al.* presented the complete genomic structure of the canine TCR γ locus.³³ Subsequently, Keller *et al.* analysed the rearrangement patterns of the canine TCR γ locus in T-cell lymphomas and developed a new clonality assay using multiplex primers which were able to detect 12/12 T-cell lymphomas.^{34,35} The use of these multiplex primers might have improved the sensitivity.

The specificity in this study was 93%. False-positive results can have several reasons. Pseudoclonality can occur when the tested tissue contains only few normal lymphocytes or if the DNA is of poor quality. Furthermore, the presence of distinct infectious diseases can cause a clonal rise of lymphocytes.³⁶

In this study, 2 out of 28 control dogs showed a monoclonal B-cell population. One dog suffered from leishmaniasis, diagnosed *via* lymph node cytology and serology. The dog had a monoclonal B-cell population in its lymph node. Blood was not tested. After a follow-up of 3 years, the dog was still alive with no signs of lymphoma. The

lymphadenomegaly had dissolved. The second dog showed a monoclonal B-cell rearrangement in its blood while the lymph node tested negative. This dog had renal amyloidosis, gastric ulcerations and had recently been treated for anaplasmosis by the referring veterinarian after it was tested positive for *Anaplasma phagocytophilum* antibodies by SNAP[®] test. The PCR for *Anaplasma* spp. was negative at time of presentation at our facility. The aspirated lymph node was enlarged because of a chronic inflammation on its paw. One month later, this dog was euthanized because of this inflammation. The autopsy confirmed a chronic inflammation of the paw, gastric ulcerations and renal amyloidosis. There was no evidence of lymphatic neoplasia in any tissue. These two cases were classified as false positive.

In veterinary medicine, there have been reports of dogs that suffered from *Ehrlichia canis* infections showing a monoclonal T-cell population.^{1,31} Avery reported in 2012 that 141 of 800 dogs tested positive for a monoclonal rearrangement but did not show any cytological or histological evidence of lymphoma. A total of 94% of these dogs developed a lymphoma within the following 12 months. Of the remaining 6%, two dogs were seropositive for *E. canis*. Three dogs that tested positive for Rocky Mountain spotted fever, Lyme disease and Bartonellosis showed a monoclonal B-cell population. The overall specificity was 94%.³¹ The one dog within our control group, that was known to be seropositive for *E. canis* tested negative by MCA.

When results of IHC and MCA were compared, there was a concordance in 7 out of 10 cases. Two B-cell lymphomas showed no clonal rearrangement at all. One immunohistochemically diagnosed T-cell lymphoma showed a positive result for both, the TCR γ and the immunoglobulin heavy chain in blood and lymph node. Two other cases, for which immunophenotyping had not been performed, showed the same result. This phenomenon of cross-lineage has already been described in several other veterinary studies^{1,7,30,37–39} and is also well known in human medicine.

One case was especially interesting as it showed an opponent immunophenotype in blood (T) and lymph node (B). A possible explanation might be that the dog had a B-cell lymphoma

that only involved the lymph nodes in combination with a false-positive result in the blood, for example because of pseudo-clonality or a concurrent infectious disease. The contrary condition is less likely because the dog had a profound lymphadenomegaly with an unequivocal cytological diagnosis of lymphoma. The blood smear of this dog was cytologically without pathological findings. Unfortunately, tests for infectious diseases had not been performed.

When peripheral blood of lymphoma patients was tested by MCA, 81% of the samples were positive. This result is similar to a study designed by Keller et al. who tested blood of 28 lymphoma cases by PARR with subsequent gel electrophoresis. They found 89% of 28 blood samples to be positive for a monoclonal lymphatic proliferation by PARR.³

The detection limit with the used protocol was higher than expected. When tumour cell line CLBL-1 was diluted into normal tonsil and amplified with primer set IgH major, a tumour content of 12.5% was already negative. The result for tumour cell line CL 1 after amplification with TCR γ was even higher. A tumour content of 50% was already negative. This suggests that the PCR conditions might not have been ideal, and additional testing is needed to improve the detection limit. Although the sensitivity was within the expected range, the presented protocol is clearly not suited to detect minimal residual disease. The fact that the detection limit for TCR is higher than for IgH major has been observed in several other studies too.^{1,20} As Langner et al., we also detected that the peak of the background smear was higher for TCR γ than for IgH major (Fig. 4).

Conclusion

DNA of 34 lymphoma cases and 28 control cases was tested by MCA which was interpreted by calculating the maximum fluorescence decrease within a defined rise of temperature. Sensitivity (79%) and specificity (93%) were within the expected range. Although evaluation of the detection limit suggested that PCR conditions could still be optimized, introduction of calculation of maximum fluorescence decrease offers an objective interpretation of MCA.

Acknowledgements

This study was funded by the Akademie fuer Tiergesundheit e.V. and the Gesellschaft zur Foerderung Kynologischer Forschung.

References

1. Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver CS, Moore PF and Avery AC. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology* 2003; **40**: 32–41.
2. Chaubert P, Baur Chaubert AS, Sattler U, Forster U, Bornand V, Suter M, et al. Improved polymerase chain reaction-based method to detect early-stage epitheliotropic T-cell lymphoma (mycosis fungoides) in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2010; **22**: 20–29.
3. Keller RL, Avery AC, Burnett RC, Walton JA and Olver CS. Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Veterinary Clinical Pathology* 2004; **33**: 145–149.
4. Kaneko N, Tanimoto T, Morimoto M, Hayashi T, Shimokawa Miyama T, Hiraoka H, et al. Use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue and single-strand conformation polymorphism analysis for polymerase chain reaction of antigen receptor rearrangements in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2009; **71**: 535–538.
5. Kaneko N, Yamamoto Y, Wada Y, Shimokawa Miyama T, Hiraoka H, Itamoto K, et al. Application of polymerase chain reaction to analysis of antigen receptor rearrangements to support endoscopic diagnosis of canine alimentary lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2009; **71**: 555–559.
6. Vernau W and Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999; **69**: 145–164.
7. Lana SE, Jackson TL, Burnett RC, Morley PS and Avery AC. Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006; **20**: 329–334.
8. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; **194**: 23–28.

12 I. Schöpfer *et al.*

9. Linder D and Gartler SM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science* 1965; **150**: 67–69.
10. Trainor K, Brisco M, Story C and Morley A. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 1990; **75**: 2220–2222.
11. Thilakarathne DN, Mayer MN, MacDonald VS, Jackson ML, Trask BR and Kidney BA. Clonality and phenotyping of canine lymphomas before chemotherapy and during remission using polymerase chain reaction (PCR) on lymph node cytologic smears and peripheral blood. *The Canadian Veterinary Journal* 2010; **51**: 79–84.
12. Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, *et al.* Evaluation of cytoreductive efficacy of vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin in dogs with lymphoma by measuring the number of neoplastic lymphoid cells with real time polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; **25**: 285–291.
13. Yamazaki J, Takahashi M, Setoguchi A, Fujino Y, Ohno K and Tsujimoto H. Monitoring of minimal residual disease (MRD) after multidrug chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma: a proof-of-concept pilot study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010; **24**: 897–903.
14. Uemura A, Mori S, Sugahara K, Akamatsu N, Tsuruda K, Tsukasaki K, *et al.* Rapid and high-resolution detection of IgH gene rearrangements using PCR and melting curve analysis. *International Journal of Laboratory Hematology* 2007; **29**: 200–207.
15. Gutzmer R, Mommert S, Kiehl P, Wittmann M, Kapp A and Werfel T. Detection of clonal T cell receptor gamma gene rearrangements in cutaneous T cell lymphoma by LightCycler-polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 2001; **116**: 926–932.
16. Xu D, Du J, Schultz C, Ali A and Ratech H. Rapid and accurate detection of monoclonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangement by DNA melting curve analysis in the LightCycler System. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2002; **4**: 216–222.
17. Yang XY, Xu D, Du J, Kamino H, Rakeman J and Ratech H. Rapid detection of clonal T-cell receptor beta gene rearrangements in T Cell lymphomas using the LightCycler-polymerase chain reaction with DNA melting curve analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2005; **7**: 81–88.
18. Dobbs LJ and Earls L. Clonality analysis of B-cell lymphoproliferative disorders using PCR and melting curve analysis. *Diagnostic Molecular Pathology* 2003; **12**: 212–223.
19. Kummalue T, Chuphrom A, Sukpanichanant S and Pongpruttipan T. Detection of monoclonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangement (FR3) in Thai malignant lymphoma by high resolution melting curve analysis. *Diagnostic Pathology* 2010; **5**: 31.
20. Langner K, Joetzke A, Nerschbach V, Eberle N, Schuberth H-J, Koy M, *et al.* Detection of clonal antigen receptor gene rearrangement in dogs with lymphoma by real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *BMC Veterinary Research* 2014; **10**: 1.
21. Retamales E, Rodriguez L, Guzman L, Aguayo F, Palma M, Backhouse C, *et al.* Analytical detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in gastric lymphoid infiltrates by peak area analysis of the melting curve in the LightCycler System. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2007; **9**: 351–357.
22. Rütgen BC, Hammer SE, Gerner W, Christian M, de Arespacochaga AG, Willmann M, *et al.* Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leukemia Research* 2010; **34**: 932–938.
23. Momoi Y, Okai Y, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H and Hasegawa A. Establishment and characterization of a canine T-lymphoblastoid cell line derived from malignant lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997; **59**: 11–20.
24. Shultz EK. Multivariate receiver-operating characteristic curve analysis: prostate cancer screening as an example. *Clinical Chemistry* 1995; **41**(8 Pt 2): 1248–1255.
25. Sioutos NMD, Bagg AMD, Michaud GYMD, Irving SGP, Hartmann DPPD, Siragy H, *et al.* Polymerase chain reaction versus Southern blot hybridization. Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements [Review]. *Diagnostic Molecular Pathology* 1995; **4**: 8–13.
26. Bagg A, Braziel RM, Arber DA, Bijwaard KE and Chu AY. Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2002; **4**: 81–89.
27. Arber DA. Molecular diagnostic approach to non-Hodgkin's lymphoma. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2000; **2**: 178–190.

28. Steiff JN, Neubauer A, Stolte M and Wündisch T. Clonality analyses in gastric MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). *Pathology, Research and Practice* 2006; **202**: 503–507.
29. Abdel-Reheim FA, Edwards E and Arber DA. Utility of a rapid polymerase chain reaction panel for the detection of molecular changes in B-cell lymphoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 1996; **120**: 357–363.
30. Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS and Moore PF. Canine indolent nodular lymphoma. *Veterinary Pathology* 2006; **43**: 241–256.
31. Avery A. Molecular diagnostics of hematologic malignancies. *Topics in Companion Animal Medicine* 2009; **24**: 144–150.
32. Thalheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE and Suter SE. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; **27**: 1509–1516.
33. Massari S, Bellahcene F, Vaccarelli G, Carelli G, Mineccia M, Lefranc M, *et al.* The deduced structure of the T cell receptor gamma locus in *Canis lupus familiaris*. *Molecular Immunology* 2009; **46**: 2728–2736.
34. Keller S and Moore P. Rearrangement patterns of the canine TCRgamma locus in a distinct group of T cell lymphomas. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012; **145**: 350–361.
35. Keller S and Moore P. A novel clonality assay for the assessment of canine T cell proliferations. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012; **145**: 410–419.
36. Avery PR and Avery AC. Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Veterinary Clinical Pathology* 2004; **33**: 196–207.
37. Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, *et al.* Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Research* 2005; **65**: 5654–5661.
38. Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, Bettini G and Famigli-Bergamini P. GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; **127**: 47–56.
39. Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garrett L, *et al.* Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005; **106**: 179–196.

IV. DISKUSSION

Die Klonalitätsdiagnostik anhand des Nachweises monoklonaler Antigenrezeptorarrangements spielt eine große Rolle in der humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Lymphomdiagnostik (BURNETT et al., 2003; VAN DONGEN et al., 2003; CHAUBERT et al., 2010). Während in der Humanmedizin auch die Schmelzkurvenanalyse etabliert ist, gibt es in der Veterinärmedizin erst eine Studie über die Verwendung dieser Methode (LANGNER et al., 2014). Wie in den meisten humanmedizinischen Studien wurde hier jedoch auch eine visuelle Auswertung der SKA vorgenommen, die zu Ungenauigkeiten führen kann.

Der Vorteil der Schmelzkurvenanalyse ist, dass PCR und Analyse der PCR-Produkte in einem Arbeitsschritt erfolgen, wodurch das Risiko für eine Kreuzkontamination der Proben sinkt. Zusätzlich ist weniger manuelle Arbeit erforderlich. In vergleichenden Untersuchungen in der Humanmedizin betrug die relative Sensitivität zwischen Gelelektrophorese und SKA zwischen 88 und 100 %. Die relative Spezifität betrug 100% (GUTZMER et al., 2001; XU et al., 2002; XU et al., 2004; KUMMALUE et al., 2010). Ziel dieser Studie war es, durch Berechnung des maximalen Fluoreszenzabfalls ΔF_{\max} (%) innerhalb einer definierten Temperaturerhöhung ΔT eine neue Methode zur objektiven Auswertung der SKA zu etablieren.

1. Diskussion der einzelnen Ergebnisse

1.1. Berechnung des maximalen Fluoreszenzabfalls ΔF_{\max} (%)

Das Prinzip beruht darauf, dass der Fluoreszenzabfall während der SKA quantifiziert wird. Durch eine einfache Kalkulation, die zum Beispiel mittels Excel erfolgen kann, wird der maximale Fluoreszenzabfall ΔF_{\max} (%) innerhalb einer Temperatursteigerung ΔT berechnet. Bei einer rein monoklonalen Probe erreichen die PCR-Produkte alle bei derselben Temperatur ihre Schmelztemperatur und es kommt zu einem abrupten Fluoreszenzabfall innerhalb einer geringen Temperaturerhöhung ΔT . Bei einer polyklonalen Probe hingegen erreichen die unterschiedlichen PCR-Produkte bei unterschiedlichen

Temperaturen ihren Schmelzpunkt, so dass es zu einem graduellen und viel flacheren Temperaturabfall kommt (siehe Abbildung 2). Der Wert für ΔF_{\max} (%) ist somit bei einer polyklonalen Probe geringer als bei einer monoklonalen Probe.

In den bisherigen Studien wurde eine Vielzahl an Kriterien für die meist visuelle Auswertung verwendet. Für diese Auswertung wurde die Kurve der negativen ersten Ableitung des Fluoreszenzabfalls, aufgetragen gegen die Temperatur - $(dF/dT)/T$, benutzt. In den meisten Fällen wurden Höhe und Breite eines Peaks als Kriterium herangezogen, oft im Vergleich zur Höhe und Breite eines Peaks einer polyklonalen Kontrollprobe. In der Studie von Xu et al. aus dem Jahr 2002 musste ein monoklonaler Peak doppelt so hoch sein wie der Peak einer polyklonalen Tonsille und durfte höchstens halb so breit sein (XU et al., 2002). In einer nachfolgenden Studie derselben Arbeitsgruppe von 2004 wurde der Peak nicht mehr im Vergleich zu einem Peak einer polyklonalen Kontrolle ausgewertet. Stattdessen musste der Peak doppelt so hoch wie breit sein. Zusätzlich musste die Peakform zuverlässig reproduzierbar sein (XU et al., 2004). In anderen Studien wurden die Auswertungskriterien der ersten Studie von Xu et al. aufgegriffen. KUMMALUE et al. benutzten dieselben Kriterien (KUMMALUE et al., 2010). Bei Yang et al. musste ein monoklonaler Peak 1,5 x so hoch sein wie ein polyklonaler Referenzpeak einer Tonsille. Ein weiteres Kriterium war, dass der Unterschied von ΔT_m zwischen einer polyklonalen Tonsille und einer monoklonalen Probe $\geq 1,5^\circ\text{C}$ betragen sollte (YANG et al., 2005). Xu et. al zeigten 2015 jedoch, dass die T_m der Lymphome in ihrer Studie bei median $86,4^\circ\text{C}$ (Spanne 84 bis 88°C) lag. Die mediane T_m der Kontrollen bewegte sich mit $86,1^\circ\text{C}$ (Spanne 83 bis 89°C) in einem damit überlappendem Bereich, so dass ΔT_m als Kriterium nicht sinnvoll erscheint (XU et al., 2015).

Höhe und Breite sind wertvolle Kriterien, da ein hoher und schmaler Peak der Funktion $-(dF/dT)/T$ einen steilen Fluoreszenzabfall während der SKA repräsentiert. Jedoch ist die Messung der absoluten Höhe und Breite der Schmelzkurvenpeaks nur eine Näherung. Die Höhe des Peaks hängt nicht nur davon ab, ob die Probe aus einer monoklonalen Population besteht. Auch der DNA-Gehalt, der am Beginn der Erhitzungsphase der SKA in der Probe vorhanden ist, spielt eine Rolle. Abbildung 3 zeigt mögliche Fluoreszenzkurven von 2 Proben mit unterschiedlichem DNA-Gehalt nach Abschluss der PCR. Der

prozentuelle Grad des Fluoreszenzabfalls ist bei beiden Kurven zwischen den einzelnen Temperaturschritten gleich, spiegelt also zwei identisch zusammengesetzte Proben wider. Trotzdem ist der Peak von $-(dT/dF)/T$ bei der Probe mit dem doppelten Fluoreszenzgehalt bei gleicher Breite höher. Bei visueller Auswertung der Kurven anhand der Messung von Höhe und Breite einer Kurve, erweckt die höhere Kurve den Eindruck von der Zusammensetzung her „monoklonaler“ zu sein als die niedrigere Kurve. Bei Berechnung des maximalen Fluoreszenzabfalls wird dagegen die Anfangsfluoreszenz vor Beginn der SKA mit einberechnet, so dass auch im Beispiel aus Abbildung 3 der Wert von ΔF_{\max} (%) bei beiden Proben identisch ist.

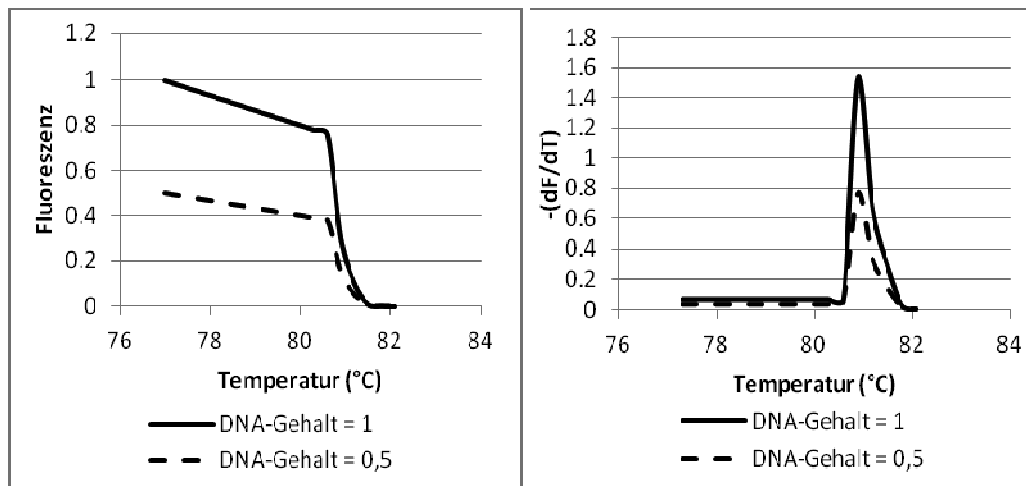


Abbildung 3a

Abbildung 3b

Abbildung 3: Verhältnis zwischen DNA-Gehalt am Beginn der SKA und der Höhe des Peaks von $-(dT/dF)/T$. Die durchgezogene Linie stellt den Kurvenverlauf einer Probe mit dem relativen DNA-Gehalt von 1 dar, während die gestrichelte Linie einen relativen DNA-Gehalt von 0,5 widerspiegelt.

Abbildung 3a zeigt die Kurve des Fluoreszenzabfalls während der SKA, aufgetragen gegen die Temperatur.

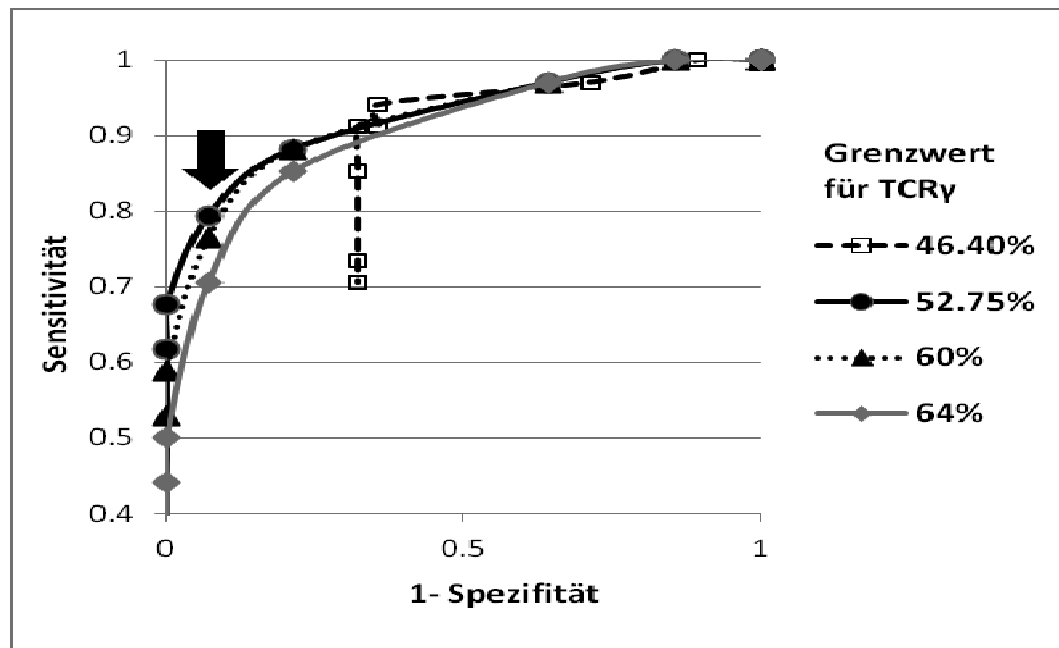
Abbildung 3b zeigt den Verlauf der negativen ersten Ableitung $-(dT/dF)/T$ der Kurven aus Abbildung 2a

Da die PCR kein linearer Prozess ist, liegt auch bei unterschiedlichen DNA-Gehalten vor Beginn der PCR nach Abschluss der PCR in der Regel kein so deutlicher Unterschied an Fluoreszenzsignal vor wie in dem aufgeführten Beispiel. In den meisten Fällen wird dieser Fehler daher nur minimal ins Gewicht fallen. Das Beispiel verdeutlicht aber, dass es sinnvoll ist, die Höhe des Peaks der Funktion $-(dT/dF)/T$ ins Verhältnis zur Höhe der Fluoreszenz bei Beginn der SKA zu setzen.

Auch die verschiedenen Formen, die der Peak von $-(dT/dF)/T$ annehmen kann, wurden in einigen Studien berücksichtigt. Dobbs und Earls legten fest, dass ein monoklonaler Peak eng, symmetrisch und bei konstanter T_m reproduzierbar sein musste. Breite Peaks und Peaks mit einer Schulter von der Höhe $\geq 0,5x$ der Höhe des Gesamtpeaks wurden als unklar definiert (DOBBS & EARLS, 2003). Auch Uemura et al. definierten, dass ein Peak keine deutliche Schulter haben durfte, ohne diese näher zu spezifizieren (UEMURA et al., 2007). Bei Berechnung von ΔF_{max} (%) werden die verschiedenen Formen automatisch berücksichtigt.

Retamales et al. haben aufgrund der Probleme bei der visuellen Auswertung eine mathematische Auswertung entwickelt, bei der die One-Peak-Area unter der Kurve von $-(dF/dT)/T$ berechnet wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Likelihood ratio (RETAMALES et al., 2007). Diese Methode ermöglicht eine objektivere Auswertung als die visuelle Messung von Höhe und Breite. Da sie aber auf die Kurve von $-(dF/dT)/T$ angewendet wird, bezieht diese Methode ebenfalls nicht die Anfangsfluoreszenz mit ein und kann so zu kleinen Abweichungen führen.

In dieser Studie wurden Grenzwerte für ΔF_{max} (%) zum Nachweis von B- und T-Zell-Lymphomen ermittelt. Für den B-Zell-Primer betrug der Wert 46,4 %, für den T-Zell-Primer 52,75 %. Proben mit einem ΔF_{max} (%) \geq dieser Werte wurden als monoklonal diagnostiziert. Die Grenzwerte wurden mittels ROC-Analyse ermittelt, bei der die Sensitivität gegen 1-Spezifität aufgetragen wurde. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für eine MultiROC-Analyse.



MultiROC-Analyse für verschiedene ΔF_{\max} (%) -Grenzwerte für die Primer IgH major und TCR γ innerhalb einer Temperaturerhöhung $\Delta T = 4^{\circ}\text{C}$. Die Y-Achse zeigt die Sensitivität, die X-Achse 1-Spezifität. Jede Kurve zeigt eine ROC-Analyse mit einem festgelegten Grenzwert für TCR γ in Kombination mit verschiedenen Grenzwerten für IgH major. Die Grenzwerte für IgH major liegen zwischen 0 und 100%. Festgesetzte Grenzwerte für TCR γ : gestrichelte Linie = 46,4 %, schwarze durchgezogene Linie = 52,75 %, gepunktete Linie = 60 %, graue durchgezogene Linie = 64 %. Der schwarze Pfeil markiert den Punkt, an dem die für diese Studie gewählten Grenzwerte von IgH major = 46,4 % und TCR γ = 52,75 % kombiniert sind.

Je nach Wahl der Grenzwerte ergeben sich verschiedene Sensitivitäten und Spezifitäten. Bei der Wahl sehr niedriger Grenzwerte ergibt sich eine sehr hohe Sensitivität, die zu Lasten der Spezifität geht. Die Grenzwerte wurden bewusst so gewählt, dass eine möglichst hohe Spezifität erzielt wird, da ein falsch positives Ergebnis für einen Patienten möglicherweise schwere Folgen in Form einer unnötigen oder, im Falle einer Infektionskrankheit als Ursache der Lymphadenomegalie, sogar gefährlichen Chemotherapie nach sich ziehen könnte. Ein falsch negatives Ergebnis wird hingegen in der Regel bei klinisch hochgradigem Lymphomverdacht weitere Untersuchungen wie eine histologische oder immunhistologische Untersuchung nach sich ziehen.

Neben ΔF_{\max} (%) ist auch ΔT , der Temperaturbereich innerhalb dessen der Fluoreszenzabfall gemessen wird, eine Variable. Bei einem sehr großen Temperaturbereich ist keine Unterscheidung zwischen monoklonalen und polyklonalen Proben möglich, da bei beiden die Fluoreszenz gegen 0 abfallen wird. Bei sehr kleinen Werten besteht wiederum das Problem, dass auch bei polyklonalen Proben etwas steilere Abschnitte des Fluoreszenzabfalls beobachtet werden können. Auch diese Variable wurde mittels MultiROC-Analyse erarbeitet. Die besten Ergebnisse für Sensitivität und Spezifität lagen bei einem $\Delta T = 4^{\circ}\text{C}$ vor.

1.2. Die qualitative Sensitivität der SKA

Mit den durch die ROC-Analyse festgelegten Grenzwerten betrug die Sensitivität in dieser Studie 79%. 22 von 28 multizentrischen high-grade Lymphomen waren positiv in der SKA. Von den 6 Tieren mit anderen Lymphomen (1x kutanes Lymphom mit Sèzary-Syndrom, ein intestinales Lymphom, zwei folliculäre Lymphome, 2 Tiere mit mediastinalem Lymphom) waren alle bis auf ein folliculäres Lymphom positiv. Die Sensitivität in den tiermedizinischen Studien beträgt bis zu 100% (TAMURA et al., 2006; KELLER & MOORE, 2012a). Bei den Studien mit einer sehr hohen Sensitivität handelt es sich jedoch meistens um Studien, in denen unter idealen Bedingungen anhand kleiner Fallzahlen ein neues PCR-Protokoll etabliert wurde. In den Studien von Keller und Moore und Tamura et al. wurden jeweils 12 bzw. 5 Tiere untersucht (TAMURA et al., 2006; KELLER & MOORE, 2012a). Die Sensitivität in Studien mit höheren Fallzahlen liegt in den meisten Studien zwischen 70 und 86 % (LANA et al., 2006; CHAUBERT et al., 2010; O'BRIEN et al., 2013; THALHEIM et al., 2013; OHMURA et al., in press, accepted 2015).

Burnett et al. erreichten in Ihrer Studie mit 77 lymphatischen Tumoren eine Sensitivität von 91%, postulierten jedoch, dass diese hohe Sensitivität unter Routinebedingungen wahrscheinlich nicht aufrecht zu erhalten sein würde (BURNETT et al., 2003). Gentilini et al. erreichten ebenfalls eine sehr hohe Sensitivität von 98 %. Im Gegensatz zu Burnett verwendeten Sie für ihre Studie statt der Gelelektrophorese das Gene Scanning, das auch in der Humanmedizin bessere Resultate erzielt als die Gelelektrophorese (VAN DONGEN et al., 2003). Außerdem verwendeten Gentilini et al. zusätzlich zu den Primern von Burnett et

al. die Primer von Tamura et al. und weitere, selbst entwickelte Primer (GENTILINI et al., 2009). Auch Goto-Koshino et al. erzielten mit dem Gene Scanning unter Verwendung von B-Zell-Primern aus 3 Studien und einem T-Zell-Primer eine hohe Sensitivität von 89 % (GOTO-KOSHINO et al., 2015).

Avery erwähnte in einem Reviewartikel die Sensitivität des Labors der Colorado State Universität nach Untersuchung von über 800 Tieren. Die Sensitivität wurde mit 75 % angegeben (AVERY, 2009).

Eines der in dieser Studie negativen Lymphome war ein folliculäres Lymphom. In der Humanmedizin ist die Sensitivität bei der Untersuchung von folliculären Lymphomen zum Teil drastisch schlechter als bei nicht-folliculären Lymphomen. In einer Studie betrug die Sensitivität bei nicht-folliculären Lymphomen 82 %, während die Sensitivität bei folliculären Tumoren nur 65 % betrug (ABDELREHEIM et al., 1996). In der Tiermedizin gibt es bislang wenige Daten über die Sensitivität von PARR bei folliculären Lymphomen. Valli und Moore testeten jedoch 4 folliculäre Lymphome, die alle positiv waren (VALLI et al., 2006).

Langner et al. erreichten bei der Untersuchung von 40 Lymphomen mittels SKA eine Sensitivität von 95 %. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie wurde bei Langner et al. zusätzlich zum B-Zell-Primer IgH major auch der zweite B-Zell-Primer von Burnett et al. verwendet, IgH minor. 2 der 30 B-Zell-Lymphome bei Langner et al. wurden nur von IgH minor erkannt. Möglicherweise wäre auch in der vorliegenden Studie die Sensitivität durch Einsatz des zweiten B-Zell-Primers höher gewesen.

Nach Veröffentlichung der Primer von Burnett et al. wurden durch Sequenzanalysen und durch zunehmende Erkenntnisse über die Topographie des TCR γ -Lokus und des BCR-Lokus neue Primer entwickelt, die mehr Rearrangements detektieren können sollten als die von Vernau und Burnett entwickelten Primer (TAMURA et al., 2006; YAGIHARA et al., 2007; MASSARI et al., 2009; CHAUBERT et al., 2010; KELLER & MOORE, 2012b, 2012a). In einer vergleichenden Studie zur Sensitivität der T-Zell-Primer zeigten die Primer von Burnett et al. eine Sensitivität von 67 %. Die Primer von Chaubert et al. erreichten eine Sensitivität von 74 %, die Primer von Vernau und Moore zeigten eine sehr niedrige Sensitivität von nur 21 % und die Primer von Keller

und Moore detektierten 82 % (TAKANOSU & KAGAWA, 2015). Der Einsatz der Primer von Keller und Moore hätte die Sensitivität der SKA erhöhen können.

1.3. Die Spezifität der SKA

Die Spezifität in der vorliegenden Studie betrug 93 %. 2 von 28 Kontrolltieren hatten eine monoklonale B-Zell-Population. Einer der Hunde war an einer Leishmaniose erkrankt, die zytologisch in den vergrößerten Lymphknoten nachweisbar war. Der Lymphknoten war in der SKA positiv mit dem B-Zell-Primer, Blut wurde nicht untersucht. Der Hund wurde aufgrund seiner Leishmaniose therapiert und war 3 Jahre nach Entnahme der Proben bei gutem Allgemeinbefinden. Die Lymphadenomegalie hatte sich zurückgebildet.

Bei dem zweiten Patienten wurden Blut und Lymphknoten untersucht. Der Hund litt an einer chronischen Entzündung an der Pfote mit tributärer Lymphadenomegalie. Zusätzlich zeigte er eine Glomerulopathie, Magenulzera und war kürzlich gegen eine Anaplasiose behandelt worden, die mittels SNAP-Test diagnostiziert worden war. Eine bei Vorstellung eingeleitete Anaplasmen-PCR war negativ. Dieser Patient hatte eine monoklonale B-Zell-Population im Blut, der reaktive Lymphknoten war polyklonal. Der Hund wurde einen Monat nach Vorstellung eingeschläfert. In der Sektion wurde eine renale Amyloidose diagnostiziert. Die Magenulzera und die chronische Entzündung der Pfote wurden bestätigt. In keinem Organ wurde ein Hinweis auf ein Lymphom gefunden.

Eine mögliche Ursache für falsch positive Ergebnisse der PARR ist die sogenannte Pseudoklonalität. Diese kann auftreten, wenn in einer Probe nur wenige Lymphozyten vorhanden sind oder die DNA von schlechter Qualität ist.

Bei reaktiven Veränderungen kann es vorkommen, dass durch Antigenstimulation bestimmte Subklone dominieren. In der Humanmedizin ist dies zum Beispiel bei Patienten mit Epstein-Barr-Virus oder Autoimmunerkrankungen bekannt (ENGELS et al.; VAN DONGEN et al., 2003). In der Tiermedizin sind mehrere Fälle von monoklonalen und oligoklonalen PARR-Ergebnissen bei Tieren mit Infektionskrankheiten aufgetreten. In der Studie von Burnett et al. zeigte ein Hund mit positivem Antikörpertiter für Ehrlichia canis eine monoklonale T-Zell-Population im Knochenmark. Die Ehrlichiose wurde therapiert. Nach 2 Jahren war der Hund klinisch unauffällig ohne einen Hinweis auf ein Lymphom

(BURNETT et al., 2003). In einer anderen Studie zeigte ein Patient mit Ehrlichioseinfektion ein oligoklonales Ergebnis (VERNAU & MOORE, 1999). Avery berichtete 2009 in einem Reviewartikel über 141 Hunde, die im Labor der Colorado State Universität ein positives PARR-Ergebnis gezeigt hatten, ohne dass ein zytologischer oder histologischer Hinweis auf ein Lymphom vorlag. 133 Tiere entwickelten innerhalb eines Jahres ein Lymphom. 2 Tiere mit Ehrlichiose hatten eine monoklonale T-Zell-Proliferation im Lymphknoten. 3 weitere Tiere mit Bartonellose, Rocky Mountain spotted fever und Lyme disease zeigten eine monoklonale B-Zell-Population (AVERY, 2009).

Bei Burnett et al. zeigte zusätzlich ein Tier mit akuter myeloischer Leukämie eine monoklonale B-Zell-Proliferation (BURNETT et al., 2003).

In der vorliegenden Studie wurden Blut und Knochenmark von einem Patient mit Ehrlichioseinfektion und Blut von einem Hund mit myeloischer Leukämie untersucht. Beide Tiere zeigten ein polyklonales Ergebnis.

1.4. Immunphänotypisierung mittels SKA

Insgesamt wurden innerhalb der Gruppe der 22 PARR-positiven multizentrischen high-grade Lymphome 17 B-Zell-Lymphome (77 %), 2 T-Zell-Lymphome (9 %), 2 BT-Zell-Lymphome (9 %) und 1 Lymphom (5 %) mit gegensätzlichem Immunphänotyp in Blut und Lymphknoten diagnostiziert. Der Anteil der B-Zell-Lymphome entspricht denen anderer Studien (MODIANO et al., 2005). Die T-Zell-Lymphome erscheinen mit 9 % im Vergleich zu immunhistochemischen Studien unterrepräsentiert. Dies ergibt sich durch das Vorliegen von 2 BT-Zell-Tumoren und einem Tumor mit gegensätzlichem Immunphänotyp in Blut (T) und Lymphknoten (B). Der BT-Immunphänotyp wurde immunhistochemisch nur in einzelnen Fällen diagnostiziert (THOMAS et al., 2001), kommt bei Immunphänotypisierung mittels PCR jedoch regelmäßig vor (BURNETT et al., 2003; MODIANO et al., 2005; LANA et al., 2006; VALLI et al., 2006; GENTILINI et al., 2009; THILAKARATNE et al., 2010; O'BRIEN et al., 2013; THALHEIM et al., 2013; HIYOSHI et al., 2015; OHMURA et al., in press, accepted 2015).

Es gibt in der Literatur einen weiteren Fall, in dem ein Hund in Blut und Lymphknoten einen gegensätzlichen Immunphänotyp gezeigt hat. Thilakarathne et

al. berichteten von einem Hund, der genau wie der Hund in dieser Studie im Blut eine monoklonale T-Zell-Population zeigte, während im Lymphknoten eine klonale B-Zell-Population nachzuweisen war. Unter Remission der Lymphknoten durch Chemotherapie wurde das Blut erneut untersucht, die klonale T-Zell-Population war weiterhin nachweisbar (THILAKARATNE et al., 2010). Für dieses Phänomen gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Es könnte sich um ein B-Zell-Lymphom im Lymphknoten ohne Beteiligung des peripheren Blutes gehandelt haben. Die monoklonale T-Zell-Population könnte entweder durch Pseudoklonalität oder reaktiv bedingt gewesen sein. In der Humanmedizin sind bei gesunden älteren Patienten und bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen im Blut monoklonale T-Zell-Proliferationen auch ohne Hinweis auf lymphatische Neoplasie nachgewiesen worden (POSNETT et al., 1994). Bei dem Patienten in dieser Studie war der Blutaussstrich zytologisch unauffällig. Es gab keine spezifischen Hinweise für eine Infektionskrankheit, allerdings waren auch keine gezielten Untersuchungen mittels Antigen- oder Antikörpernachweis durchgeführt worden.

Die Ergebnisse von Immunhistochemie und PARR konnten bei 10 Patienten verglichen werden. Die Übereinstimmung betrug 70 %. 2 von 10 Tieren zeigten ein polyklonales Ergebnis in der SKA. Bei einem dritten Patienten mit immunhistochemisch diagnostiziertem T-Zell-Lymphom zeigte die SKA gleichzeitig eine monoklonale Proliferation mit dem B-Zell-Primer und mit dem T-Zell-Primer. Dieses Phänomen wird als „cross lineage“ bezeichnet, kommt in der Humanmedizin und der Tiermedizin häufiger vor (BURNETT et al., 2003; MODIANO et al., 2005; LANA et al., 2006; VALLI et al., 2006; GENTILINI et al., 2009; THILAKARATNE et al., 2010; THALHEIM et al., 2013).

Wie in vielen anderen Studien war auch in dieser Studie das Ergebnis der PCR zuverlässig, sofern nur ein positives Ergebnis mit einem B- oder T-Zell-Primer vorlag (BURNETT et al., 2003; LANA et al., 2006; CHAUBERT et al., 2010).

1.5. Untersuchung auf Beteiligung des peripheren Blutes

81 % der 27 SKA-positiven Lymphompatienten zeigten eine monoklonale lymphatische Population im peripheren Blut. Innerhalb der Gruppe mit multizentrischem high-grade Lymphom zeigten 86 % eine Beteiligung des Blutes.

Keller et al. untersuchten 2004 das Blut von 28 Lymphompatienten und fanden mit 89 % eine ähnliche Inzidenz positiver Blutproben (KELLER et al., 2004).

1.6. Die quantitative Sensitivität der SKA

Zur Untersuchung der quantitativen Sensitivität wurde die DNA von den Tumorzelllinien CLBL-1 (RÜTGEN et al., 2010) und CL-1 (MOMOI et al., 1997) in die DNA einer normalen Tonsille verdünnt. Das Detektionslimit war höher als erwartet. Bei Verdünnung der T-Zelllinie CL-1 war die SKA bereits ab einer Verdünnung von 1:1 negativ. Bei der B-Zelllinie CLBL-1 war das Detektionslimit niedriger. Ein Tumorzellgehalt von 25 % ergab noch ein positives Ergebnis. Auch bei Langner et. al zeigte sich ein Unterschied zwischen B- und T-Zell-Primern. Ein positives Ergebnis wurde mit dem Primer IgH major noch bei einem Tumorzellanteil von median 9,38 %, mit dem Primer IgH minor bei 12,5 % und mit den T-Zell-Primern bei 18,5 % gesehen (LANGNER et al., 2014).

In humanmedizinischen Studien über die SKA wurden Detektionslimits zwischen 0,25 % und 50 % angegeben (DOBBS & EARLS, 2003; UEMURA et al., 2007). Die meisten Detektionsgrenzen liegen $\leq 12,5$ % (XU et al., 2002; XU et al., 2004; YANG et al., 2005), einige sogar ≤ 5 % (UEMURA et al., 2007; KUMMALUE et al., 2010). Diese niedrigen Detektionsgrenzen erklären sich jedoch anhand der in den Studien festgelegten Definitionen eines Detektionslimits. Die Studien definierten ein positives Ergebnis für die Verdünnungsreihen so, dass lediglich ein sichtbarer Peak bei der zu erwartenden Schmelztemperatur erkennbar sein musste, unabhängig von der Höhe des Peaks und der Höhe der Peaks des polyklonalen Hintergrundes (GUTZMER et al., 2001; YANG et al., 2005; UEMURA et al., 2007; KUMMALUE et al., 2010). Durch diese Kriterien wurden Peaks als positiv bewertet, die unter der Anwendung der sonst geltenden Kriterien wie Höhe und Breite nicht als monoklonal definiert worden wären. Bei Anwendung dieser Definition ohne Berechnung des maximalen Fluoreszenzabfalls ΔF_{\max} (%) würden die Detektionsgrenzen für IgH major und TCR γ in der vorliegenden Studie bei 3,125 % und 6,25 % liegen.

Xu et. al benutzten 2015 absolute Grenzwerte für die Höhe der Peaks als Kriterium zur Unterscheidung zwischen monoklonalen und polyklonalen Proben. Auch bei Anwendung dieser Grenzwerte konnten Detektionslimits von 3,125 %

für die verwendeten Primer beobachtet werden (XU et al., 2015).

Bei Retamales et al. lag das Detektionslimit bei Anwendung der mathematischen Kriterien ebenfalls bei einem niedrigen Wert von 1,56 % (RETAMALES et al., 2007).

Insgesamt erscheint die Schmelzkurvenanalyse wie auch die PARR mit anschließender Gelelektrophorese nicht für die Detektion einer MRD geeignet, solange keine tumorspezifischen Primer verwendet werden.

1.7. Limitationen dieser Studie

Die PCR wurde nur bei wenigen Proben zur Evaluierung des Protokolls in Doppelansätzen durchgeführt. Eine Untersuchung aller klinischen Proben in Doppelansätzen hätte die Reproduzierbarkeit des Protokolls besser belegen können.

Die T-Zell-Primer, die in dieser Studie verwendet wurden, sind mittlerweile nicht mehr die Primer der Wahl, da durch zunehmende Kenntnisse über die Gensequenz des TCR γ optimierte Primer designt werden konnten. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie waren bereits die optimierten Primer von Chaubert et al. publiziert worden. Deren Einsatz hätte die Sensitivität des verwendeten Protokolls erhöhen können. Allerdings lagen die meisten Erfahrungen zu den Primern von Burnett et al. vor, so dass diese für die vorliegende Studie gewählt wurden. Es wäre jedoch interessant und sinnvoll gewesen, zumindest die in der vorliegenden Studie negativen Lymphome noch einmal mit den neueren Primern zu untersuchen.

Gerade im Hinblick auf die Spezifität wäre es sinnvoll gewesen von allen Patienten einen Infektionsstatus zu erheben.

2. Schlussbetrachtungen

Die SKA hat gegenüber der Gelelektrophorese die Vorteile, dass das Risiko für eine Kreuzkontamination der Proben verringert wird und weniger Arbeitsschritte erforderlich sind, da PCR und Auswertung in einem Gerät erfolgen.

Zusätzlich bietet sich bei der SKA die Möglichkeit einer objektiven Auswertung

an, da bei der quantitativen real-time-PCR eine mathematische Funktion ermittelt wird.

Anhand der Berechnung des maximalen Fluoreszenzabfalls ΔF_{\max} (%) innerhalb einer definierten Temperatursteigerung ΔT wurde ein mathematisches Verfahren zur objektiven Auswertung der SKA etabliert. Die qualitative Sensitivität und Spezifität waren mit 79 % und 93 % im zu erwartenden Bereich, jedoch deuten die verhältnismäßig hohen Detektionslimits des Protokolls darauf hin, dass das gewählte PCR-Protokoll noch weiter optimiert werden könnte.

Durch die Miteinbeziehung der Anfangsfluoreszenz ist die Berechnung spielen auch unterschiedliche DNA-Mengen zu Beginn der Schmelzkurvenanalyse keine Rolle.

Die in dieser Studie ermittelten Grenzwerte für ΔF_{\max} (%) können wahrscheinlich nicht von anderen Institutionen übernommen werden, können aber durch eine Multi-ROC-Analyse für jedes Protokoll auf einfachem Wege ermittelt werden.

Ein interessanter Aspekt bei Anwendung des Protokolls auf klinische Fälle war, dass 2 Kontrolltiere mit Nachweis einer Leishmanioseinfektion und zumindest einer vorausgegangenen Anaplasloseinfektion ein falsch positives Ergebnis zeigten. Dies unterstützt noch einmal, dass der Nachweis monoklonaler Antigenrezeptorarrangements nicht als alleiniges Kriterium für die Diagnose eines malignen Lymphoms herangezogen werden sollte. Es sollte immer auch eine zytologische oder histologische Untersuchung erfolgen. Insbesondere in fraglichen Fällen kann PARR als zusätzlicher Test sinnvoll eingesetzt werden, wobei immer auch der Infektionsstatus eines Tieres zu berücksichtigen ist. Es ist sinnvoll bei unklarer zytologischer/histologischer Untersuchung und positivem PARR-Ergebnis bestimmte Infektionskrankheiten wie die Leishmaniose, Ehrlichiose und Anaplaslose auszuschließen.

Für die Immunphänotypisierung kann PARR mit kleinen Einschränkungen eingesetzt werden. Wie in anderen Studien konnte auch in dieser Studie gezeigt werden, dass das Ergebnis der PARR weitgehend zuverlässig ist, solange nur ein monoklonales Ergebnis mit einem der beiden Primer erzielt wird.

Ein interessantes Anwendungsgebiet der PARR stellt die Detektion der MRD dar. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Höhe der MRD nach Abschluss der Chemotherapie prognostisch relevant war. Anhand des MRD-Levels kann auch das Ansprechen des Tumors auf verschiedene Zytostatika nachvollzogen werden. Dadurch könnte möglicherweise eine individuelle Anpassung der Chemotherapie für jeden Patienten vorgenommen werden. Aufgrund der Kosten und des Aufwandes wird dieses Verfahren wahrscheinlich vorerst wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten bleiben. Ob die SKA für diese Untersuchungen geeignet ist, müsste anhand der Verwendung tumorspezifischer Primer überprüft werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die PCR for Antigen Receptor Rearrangements (PARR) ist mittlerweile fester Bestandteil in der Lymphomdiagnostik beim Hund. Während die Analyse der PCR-Produkte anfangs überwiegend mittels Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt wurde, stehen heute weitere Analyseverfahren zur Verfügung.

Eines dieser Verfahren ist die Schmelzkurvenanalyse, bei der mittels Echtzeit-PCR die PCR-Amplifikate durch Fluorochrome detektiert werden. Die Schmelzkurvenanalyse folgt im Anschluss an die PCR-Amplifizierung. Die PCR-Produkte werden schrittweise erhitzt, bis sie ihren Schmelzpunkt erreichen und bei Zerfall der Doppelhelixstruktur ein Abfall der Fluoreszenz detektiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein mathematisches Verfahren zur objektiven Auswertung der Schmelzkurvenanalyse entwickelt. Das Verfahren beruht auf der Berechnung des maximalen Fluoreszenzabfalls ΔF_{\max} (%) innerhalb einer definierten Temperaturerhöhung ΔT . Anhand dieser Methode wurden zur Unterscheidung von monoklonalen und polyklonalen Proben Grenzwerte für ΔF_{\max} (%) für jeden Primer entwickelt.

Bei der üblichen visuellen Auswertung der Funktion der negativen ersten Ableitung $-(\Delta F/\Delta T)/T$ wurden in der Regel subjektive Kriterien zur Auswertung herangezogen. Die Auswertung der negativen ersten Ableitung der Fluoreszenzkurve statt der Fluoreszenzkurve selbst birgt die Fehlerquelle, dass die Höhe der Anfangsfluoreszenz vor Beginn der Schmelzkurvenanalyse nicht mit einbezogen wird. Dadurch kann es zu Ungenauigkeiten kommen. Der Vorteil der hier präsentierten mathematischen Auswertung liegt darin, dass objektive mathematische Kriterien verwendet werden und die Kurve des Fluoreszenzabfalls direkt ausgewertet wird, so dass auch die Anfangsfluoreszenz mit einbezogen wird.

Bei der Untersuchung von 34 Lymphompatienten und 28 Kontrolltieren ergaben sich eine Sensitivität von 79 % und eine Spezifität von 93 %. 2 der 28 Kontrolltiere zeigten ein falsch-positives Ergebnis. Einer dieser Patienten zeigte eine Infektion mit Leishmaniose, der andere war wegen eines positiven Anaplasma-Antikörpernachweises kürzlich mit Doxycyclin therapiert worden.

Das Detektionslimit in Verdünnungsreihen war bei Berechnung von ΔF_{\max} (%) sehr hoch. Die Proben zeigten bereits bei einem Tumor-DNA-Anteil von 12,5 % (B-Zell Primer IgH major) und 50 % (T-Zell-Primer TCR γ) ein polyklonales Ergebnis. Bei Anwendung der in der Humanmedizin für die Bewertung des Detektionslimits üblichen Kriterien lag das Detektionslimit bei 3,125 % für den B-Zell-Primer und bei 6,25 % für den T-Zell-Primer.

Wie bereits in anderen Studien zur PARR gezeigt wurde, ist auch die SKA zur Immunphänotypisierung nur dann geeignet, wenn ein monoklonales Ergebnis für entweder den B-Zell-Rezeptor oder den T-Zell-Rezeptor gamma vorliegt.

Es ist empfehlenswert, die Lymphomdiagnose nicht allein auf das Ergebnis der PARR zu stützen, sondern diese durch Zytologie oder Histologie zu ergänzen. Bei positivem Ergebnis der PCR und negativer Zytologie/Histologie sollte der Infektionsstatus des Tieres erhoben werden.

VI. SUMMARY

PCR for Antigen Receptor Rearrangements has become a well-established diagnostic tool for canine lymphoma. In the beginning, analysis of PCR products has been performed predominantly by polyacrylamide gel electrophoresis. Today, there is a wide variety of procedures available.

One of these procedures is melting curve analysis, which detects fluorochrome-labeled PCR products by real-time PCR. After PCR amplification, the PCR products are heated gradually until their melting temperature is reached. At that temperature the double helix of the PCR products melts which is detected by a decrease in fluorescence.

In this study, a mathematical approach for objective interpretation of melting curve analysis is presented. This method relies on the calculation of the maximum fluorescence decrease ΔF_{\max} (%) within a defined rise of temperature ΔT . Applying this method, thresholds were defined for each primer to distinguish monoclonal samples from polyclonal samples.

Usually, melting curve analysis is interpreted visually using the negative first derivative of the fluorescence decrease $-(dF/dT)/T$ by applying rather subjective criteria. Using the negative first derivative of the fluorescence decrease instead of the fluorescence decrease itself, presents the following disadvantage: The fluorescence amount which is present at the beginning of the heating process is left out of the interpretation. This can lead to inaccuracies. The advantage of the mathematical approach, presented in this study, is that the original curve of the fluorescence decrease is used. Therefore, the above-mentioned inaccuracies are avoided.

Samples of 34 lymphoma patients and 28 control animals were analyzed. Sensitivity and specificity were 79 and 93 %, respectively. 2 out of the 28 control patients showed a false-positive result. One of these patients was affected by Leishmaniasis, the other one had recently been treated with Doxycycline due to detection of a positive serology for Anaplasmosis.

To evaluate the detection limit of the protocol monoclonal DNA was serially

diluted into polyclonal DNA. The detection limit was rather high when calculation of ΔF_{max} (%) was applied. Samples with a tumor cell content of 50 % and 12.25 % already showed as negative when amplified with the T-cell primer TCR γ and the B-cell primer IgH major. When criteria were applied which are commonly used in human medicine to evaluate the quantitative sensitivity, the detection limit was 6,25 % for the T-cell primer and 3.125 % for the B-cell primer.

As already shown in previous studies, this PARR-based assay appeared to be reliable in predicting the immunophenotype as long as there is only one positive result with either the B-cell primer or the T-cell primer.

It is advisable not to base the diagnosis of a lymphoma solely on a positive result in PARR-based protocols. Results of cytology and histology should always be included. If PARR is positive while cytology and histology show a negative result, the infection status of the patient should be evaluated.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Reheim FA, Edwards E, Arber DA. Utility of a rapid polymerase chain reaction panel for the detection of molecular changes in B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120: 357-63.
- Aisenberg AC, Long JC. Lymphocyte surface characteristics in malignant lymphoma. *Am J Med* 1975; 58: 300-6.
- ANONYMUS. National cancer institute sponsored study of classifications of non-hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-35.
- Appelbaum FR, Sale GE, Storb R, Charrier K, Deeg HJ, Graham T, Wulff JC. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. *Hematol Oncol* 1984; 2: 151-68.
- Arber DA, Brazier RM, Bagg A, Bijwaard KE. Evaluation of T cell receptor testing in lymphoid neoplasms: results of a multicenter study of 29 extracted DNA and paraffin-embedded samples. *J Mol Diagn* 2001; 3: 133-40.
- Arun SS, Breuer W, Hermanns W. Immunohistochemical examination of light-chain expression (lambda/kappa ratio) in canine, feline, equine, bovine and porcine plasma cells. *Zentralbl Veterinarmed A* 1996; 43: 573-6.
- Aulbach AD, Swenson CL, Kiupel M. Optimized processing of fine-needle lymph node biopsies for automated immunostaining. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 383-8.
- Avery A. Molecular Diagnostics of Hematologic Malignancies. *Top Compan Anim Med* 2009; 24: 144-50.
- Avery PR, Avery AC. Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Vet Clin Pathol*. 2004; 33: 196-207.
- Backgren A. Lymphatic leukemia in dogs: an epizootiological clinical and haematological study. *Acta Vet scand* 1965; 6(suppl 1): 3-12.
- Bagg A, Brazier RM, Arber DA, Bijwaard KE, Chu AY. Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. *J Mol Diagn* 2002; 4: 81-9.
- Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 2002; 109 Suppl: S45-55.
- Bauer C, Walzog B. Abwehrmechanismen des Körpers. In: *Physiologie*, 5th edn. Klinke R, Bauer C, eds. Stuttgart: Thieme 2005: 237-45.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Guglielmi J, Held A, Kuhlmann-Krieg S, Pfeiffer-Guglielmi B, Seidler L, Vogel S, Von Der Saal K. Das Immunsystem. In: *Biochemie*, 5th edn: Spektrum Akad. Verlag 2003a: 1013-46.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Die Erforschung der Proteine. In: *Biochemie*, 5th edn: Spektrum Akad. Verlag 2003b: 85-127.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Guglielmi J, Held A, Kuhlmann-Krieg S, Pfeiffer-Guglielmi B, Seidler L, Vogel S, Von Der Saal K. Erforschung der Gene. In: *Biochemie*, 5 edn: Spektrum Akad. Verlag 2003c: 159-88.
- Blackwell TK, Alt FW. Mechanism and Developmental Program of Immunoglobulin Gene Rearrangement in Mammals. *Annu Rev Genet*

-
- 1989; 23: 605-36.
- Boone E, Verhaaf B, Langerak AW (2013) *Lymphoma: Methods and Protocols*, 1 edn
- Brack C, Tonegawa S. Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5652-6.
- Brack C, Hiramata M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 1978; 15: 1-14.
- Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver CS, Moore PF, Avery AC. Diagnosis of Canine Lymphoid Neoplasia Using Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes. *Vet Pathol* 2003; 40: 32-41.
- Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol* 1996; 33: 204-12.
- Carlo GL, Cole P, Miller AB, Munro IC, Solomon KR, Squire RA. Review of a study reporting an association between 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and canine malignant lymphoma: Report of an expert panel. *Regul Toxicol Pharmacol* 1992; 16: 245-52.
- Cartagena N, Jr., Katz RL, Hirsch-Ginsberg C, Childs CC, Ordonez NG, Cabanillas F. Accuracy of diagnosis of malignant lymphoma by combining fine-needle aspiration cytology with immunocytochemistry and in selected cases, Southern blotting of aspirated cells: a tissue-controlled study of 86 patients. *Diagn Cytopathol* 1992; 8: 456-64.
- Carter R, Harris C, Withrow S, et al. Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen. *J Am Anim Hosp Assoc* 1987; 53: 587-96.
- Carter RF, Valli VE, Lumsden JH. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. *Can J Vet Res* 1986; 50: 154-64.
- Chaubert P, Baur Chaubert AS, Sattler U, Forster U, Bornand V, Suter M, Welle M. Improved polymerase chain reaction-based method to detect early-stage epitheliotropic T-cell lymphoma (mycosis fungoides) in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens of the dog. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 20-9.
- Chun R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? *Top Companion Anim Med* 2009; 24: 157-62.
- Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J* 2011; 188: 149-55.
- Couto CG, Cullen J, Pedroia V, Turrel JM. Central nervous system lymphosarcoma in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 809-13.
- Couto CG, Rutgers HC, Sherding RG, Rojko J. Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *J Vet Intern Med* 1989; 3: 73-8.
- Cowell RL, Dorsey KE, Meinkoth JH. Lymph node cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 47-67, v.
- Cowell RL (2008) *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*, 3rd edn. Mosby
- Culmsee K, Nolte I. Flow cytometry and its application in small animal oncology. *Methods Cell Sci* 2002; 24: 49-54.
- de Lorimier L-P. Updates on the Management of Canine Epitheliotropic

-
- Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; 36: 213-28.
- Dobbs L, Earls L. Clonality analysis of B-cell lymphoproliferative disorders using PCR and melting curve analysis. *Diagn Mol Pathol* 2003; 12: 212 - 23.
- Dobson J, Samuel S, Milstein H, al e. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Animal Pract* 2002; 43: 240-6.
- Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, Tom BD. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract* 2001; 42: 377-84.
- Dumousseau M, Rodriguez N, Juty N, Le Novere N. MELTING, a flexible platform to predict the melting temperatures of nucleic acids. *BMC Bioinformatics* 2012; 13: 101.
- Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 1980; 19: 981-92.
- Edwards DS, Henley WE, Harding EF, Dobson JM, Wood JLN. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol* 2003; 1: 200-6.
- Elliott J, Dobson JM, Dunn JK, Herrtage ME, Jackson KF. Hypercalcaemia in the dog: a study of 40 cases. *J Small Anim Pract* 1991; 32: 564-71.
- Engels K, Oeschger S, Hansmann M-L, Hillebrand M, Kriener S. Bone marrow trephines containing lymphoid aggregates from patients with rheumatoid and other autoimmune disorders frequently show clonal B-cell infiltrates. *Hum Pathol* 38: 1402-11.
- ESLHO. European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology. <http://www.eslho.org/usr/index.php>.
- Ettinger SN. Principles of treatment for feline lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract* 2003; 18: 98-102.
- Ferrer L, Fondevila D, Rabanal R, Tarres J, Ramis A. Immunohistochemical detection of CD3 antigen (pan T marker) in canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 616-20.
- Flood-Knapik KE, Durham AC, Gregor TP, Sanchez MD, Durney ME, Sorenmo KU. Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Vet Comp Oncol* 2012;
- Fontaine J, Bovens C, Bettenay S, Mueller RS. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 1-14.
- Fontaine J, Heimann M, Day MJ. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases. *Vet Dermatol* 2010; 21: 267-75.
- Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, Chabanne L, Delverdier A, Bryon PA, Felman P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Pathol* 1997; 117: 35-59.
- Fukushima K, Ohno K, Koshino-Goto Y, Uchida K, Nomura K, Takahashi M, Nakashima K, Fujino Y, Tsujimoto H. Sensitivity for the detection of a clonally rearranged antigen receptor gene in endoscopically obtained biopsy specimens from canine alimentary lymphoma. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 1673-6.
- Gally J. Structures of immunoglobulins. In: *The Antigens*. M S, ed. New York: 1973: 573 pp.
- Garabrant DH, Philbert MA. Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)

- Epidemiology and Toxicology. *Crit Rev Toxicol* 2002; 32: 233-57.
- Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 704-9.
- Gazzola A, Mannu C, Rossi M, Laginestra MA, Sapienza MR, Fuligni F, Etebari M, Melle F, Sabattini E, Agostinelli C, Bacci F, Sagramoso Sacchetti CA, Pileri SA, Piccaluga PP. The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Ther Adv Hematol* 2014; 5: 35-47.
- Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, Bettini G, Famigli-Bergamini P. GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 127: 47-56.
- Ghorbian S, Jahanzad I, Javadi GR, Sakhinia E. Evaluation diagnostic usefulness of immunoglobulin light chains (Igkappa, Iglambda) and incomplete IGH D-J clonal gene rearrangements in patients with B-cell non-Hodgkin lymphomas using BIOMED-2 protocol. *Clin Transl Oncol* 2014; 16: 1006-11.
- Ghorbian S, Jahanzad I, Javadi GR, Sakhinia E. Evaluation of IGK and IGL molecular gene rearrangements according to the BIOMED-2 protocols for clinical diagnosis of Hodgkin lymphoma. *Hematology* 2015;
- Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Sato M, Nakashima K, Hiyoshi S, Fujiwara-Igarashi A, Maeda S, Nakamura K, Uchida K, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Construction of a multicolor GeneScan analytical system to detect clonal rearrangements of immunoglobulin and T cell receptor genes in canine lymphoid tumors. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 165: 81-7.
- Greenlee P, Filippa D, Quimby F, Patnaik A, Calvano S, Matus R, Kimmel M, Hurvitz A, Lieberman P. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 1990; 66: 480 - 90.
- Gutzmer R, Mommert S, Kiehl P, Wittmann M, Kapp A, Werfel T. Detection of clonal T cell receptor gamma gene rearrangements in cutaneous T cell lymphoma by LightCycler-polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 926-32.
- Hayes HM, Tarone RE, Cantor KP, Jessen CR, McCurnin DM, Richardson RC. Case-Control Study of Canine Malignant Lymphoma: Positive Association With Dog Owner's Use of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicides. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1226-31.
- Helmink BA, Sleckman BP. The Response to and Repair of RAG-Mediated DNA Double Stranded Breaks. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 175-202.
- Hiyoshi S, Ohno K, Uchida K, Goto-Koshino Y, Nakashima K, Fukushima K, Kanemoto H, Maeda S, Tsujimoto H. Association between lymphocyte antigen receptor gene rearrangements and histopathological evaluation in canine chronic enteropathy. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 165: 138-44.
- Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73: 3628-32.
- Humme D, Lukowsky A, Gierisch M, Haider A, Vandersee S, Assaf C, Sterry W, Mobs M, Beyer M. T-cell receptor gene rearrangement analysis of sequential biopsies in cutaneous T-cell lymphomas with the Biomed-2 PCR reveals transient T-cell clones in addition to the tumor clone. *Exp Dermatol* 2014; 23: 504-8.

-
- Jagielski D, Lechowski R, Hoffmann-Jagielska M, Winiarczyk S. A Retrospective Study of the Incidence and Prognostic Factors of Multicentric Lymphoma in Dogs (1998–2000). *J Vet Med A* 2002; 49: 419-24.
- Janeway CA Jr TP, Walport M, et al. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th edn New York: Garland Science 2001:
- Jia CW, Sun J, Gu YM, Zhang TT, Liu MY, Chen J, Lu ZH. Application of the BIOMED-2 standardized primer system for the diagnosis of primary gastric B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *APMIS* 2014; 122: 873-9.
- Joachims ML, Chain JL, Hooker SW, Knott-Craig CJ, Thompson LF. Human alpha beta and gamma delta thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR beta expression, and gamma delta developmental potential--differences between men and mice. *J Immunol* 2006; 176: 1543-52.
- Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VE, Getzy DM, Fosmire SP, Coffey D, Bellgrau D, Modiano JF. CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet Pathol* 2005; 42: 468-76.
- Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 2004; 116: 299-311.
- Kaneko N, Yamamoto Y, Wada Y, Shimokawa Miyama T, Hiraoka H, Itamoto K, Mizuno T, Nakaichi M, Takahashi T, Watari T, Okuda M. Application of polymerase chain reaction to analysis of antigen receptor rearrangements to support endoscopic diagnosis of canine alimentary lymphoma. *J Vet Med Sci* 2009a; 71: 555-9.
- Kaneko N, Tanimoto T, Morimoto M, Hayashi T, Shimokawa Miyama T, Hiraoka H, Itamoto K, Une S, Mizuno T, Okuda M. Use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue and single-strand conformation polymorphism analysis for polymerase chain reaction of antigen receptor rearrangements in dogs. *J Vet Med Sci* 2009b; 71: 535-8.
- Keller ET, MacEwen EG, Rosenthal RC, Helfand SC, Fox LE. Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 1993; 7: 289-95.
- Keller RL, Avery AC, Burnett RC, Walton JA, Olver CS. Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Vet Clin Pathol* 2004; 33: 145-9.
- Keller S, Moore P. A novel clonality assay for the assessment of canine T cell proliferations. *Vet Immunol Immunopathol* 2012a; 145: 410 - 9.
- Keller S, Moore P. Rearrangement patterns of the canine TCRgamma locus in a distinct group of T cell lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol* 2012b; 145: 350 - 61.
- Kim Y, Choi YD, Choi C, Nam JH. Diagnostic Utility of a Clonality Test for Lymphoproliferative Diseases in Koreans Using the BIOMED-2 PCR Assay. *Korean J Pathol* 2013; 47: 458-65.
- Kiupel M, Teske E, Bostock D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol* 1999; 36: 292-300.
- Kokovic I, Novakovic BJ, Cerkovnik P, Novakovic S. Clonality analysis of lymphoid proliferations using the BIOMED-2 clonality assays: a single institution experience. *Radiol Oncol* 2014; 48: 155-62.
- Kokovic I, Jezersek Novakovic B, Novakovic S. Diagnostic value of immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement analysis in B-cell lymphomas. *Int J Oncol* 2015; 46: 953-62.

-
- Krohne S, Vestre W, Richardson RC (1987) Prevalence of ocular involvement in dogs with multicentric lymphoma: Prospective evaluation of 94 cases. *Am College Vet Ophth.* 68-84
- Kummalue T, Chuphrom A, Sukpanichanant S, Pongpruttipan T. Detection of monoclonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangement (FR3) in Thai malignant lymphoma by High Resolution Melting curve analysis. *Diagn Pathol* 2010; 5: 31.
- Lana S, Jackson T, Burnett R, Morley P, Avery A. Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 329 - 34.
- Langerak AW, van Krieken JHJM, Wolvers-Tettero ILM, Kerkhof E, Mulder AH, Vrints LWMA, Coebergh JW, Schuurin E, Kluin PM, van Dongen JJM. The role of molecular analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol* 2001; 54: 565-7.
- Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, Boone E, Carter GI, Catherwood M, Davi F, Delfau-Larue MH, Diss T, Evans PAS, Gameiro P, Garcia Sanz R, Gonzalez D, Grand D, Håkansson Å, Hummel M, Liu H, Lombardia L, Macintyre EA, Milner BJ, Montes-Moreno S, Schuurin E, Spaargaren M, Hodges E, van Dongen JJM. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012; 26: 2159-71.
- Langner K, Joetzke A, Nerschbach V, Eberle N, Schuberth H-J, Koy M, Nolte I, Betz D. Detection of clonal antigen receptor gene rearrangement in dogs with lymphoma by real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *BMC Vet Res* 2014; 10: 1.
- Lennert K, Feller AC (1990) *Histopathology of non-Hodgkin Lymphomas: (based on the updated Kiel classification)*. Springer-Verlag
- Levy R, Warnke R, Dorfman RF, Haimovich J. The monoclonality of human B-cell lymphomas. *J Exp Med* 1977; 145: 1014-28.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, deJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin C-W, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli K-P, Parker HG, Pollinger JP, Searle SMJ, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Lander ES. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005; 438: 803-19.
- Linder D, Gartler SM. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Mosaicism: Utilization as a Cell Marker in the Study of Leiomyomas. *Science* 1965; 150: 67-9.
- Liu H, Bench AJ, Bacon CM, Payne K, Huang Y, Scott MA, Erber WN, Grant JW, Du MQ. A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology. *Br J Haematol* 2007; 138: 31-43.
- Lurie DM, Gordon IK, Theon AP, Rodriguez CO, Suter SE, Kent MS. Sequential low-dose rate half-body irradiation and chemotherapy for the treatment of canine multicentric lymphoma. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1064-70.

-
- MacEwen EG, Hayes AA, Matus RE, Kurzman I. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). *J Am Vet Med Assoc* 1987; 190: 564-8.
- Madewell BR. Hematologic and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 1985: 235-40.
- Madewell BR, Theilen GH. Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. In: *Veterinary Cancer Medicine*, 2nd edn. Theilen GH, Madewell BR, eds. Philadelphia: Lea & Febiger 1987:
- Marconato L, Stefanello D, Valenti P, Bonfanti U, Comazzi S, Roccabianca P, Caniatti M, Romanelli G, Massari F, Zini E. Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238: 480-5.
- Massari S, Bellahcene F, Vaccarelli G, Carelli G, Mineccia M, Lefranc M, Antonacci R, Ciccarese S. The deduced structure of the T cell receptor gamma locus in *Canis lupus familiaris*. *Mol Immunol* 2009; 46: 2728 - 36.
- Max EE, Seidman JG, Leder P. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 3450-4.
- McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, Romeo C, Cuomo CA, Gellert M, Oettinger MA. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 1995; 83: 387-95.
- Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, Ratto A, Sambucco PL, Sestito V, Tanara G, Bocchini V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 976-84.
- Messinger JS, Windham WR, Ward CR. Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998-2003). *J Vet Intern Med* 2009; 23: 514-9.
- Milner RJ, Pearson J, Nesbit JW, Close P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-mixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. *Onderstepoort J Vet Res* 1996; 63: 309-13.
- Miyata-Takata T, Takata K, Yamanouchi S, Sato Y, Harada M, Oka T, Tanaka T, Maeda Y, Tanimoto M, Yoshino T. Detection of T-cell receptor γ gene rearrangement in paraffin-embedded T or natural killer/T-cell lymphoma samples using the BIOMED-2 protocol. *Leuk Lymphoma* 2014; 55: 2161-4.
- Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, Avery PR, Lindblad-Toh K, Ostrander EA, Cutter GC, Avery AC. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res* 2005; 65: 5654-61.
- Momoi Y, Okai Y, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A. Establishment and characterization of a canine T-lymphoblastoid cell line derived from malignant lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 59: 11-20.
- Moore PF, Olivry T, Naydan D. Canine cutaneous epitheliotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T cells. *Am J Pathol* 1994; 144: 421-9.
- Mortimer CE, Müller U. *Naturstoffe und Biochemie*. In: *Chemie*, 8 edn. Stuttgart: 2003: 615-6.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:

23-8.

- O'Brien D, Moore PF, Vernau W, Peuroi JR, Rebhun RB, Rodriguez CO, Jr., Skorupski KA. Clinical characteristics and outcome in dogs with splenic marginal zone lymphoma. *J Vet Intern Med* 2013; 27: 949-54.
- Ohmura S, Leipig M, Schopper I, Hergt F, Weber K, Rutgen BC, Tsujimoto H, Hermanns W, Hirschberger J. Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs. *Vet Comp Oncol* in press, accepted 2015;
- Olivero DT, Maria Elena, Gentilini F. Reduced diversity of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in chronic inflammatory gastrointestinal diseases in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 337-45.
- Onions DE. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 909-12.
- Owen LN (1980) *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals*. World Health Organization
- Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Fournel-Fleury C, Ponce F. Genetic and Environmental Risk Indicators in Canine Non-Hodgkin's Lymphomas: Breed Associations and Geographic Distribution of 608 Cases Diagnosed throughout France over 1 Year. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 301-10.
- Ponce F, Magnol JP, Ledieu D, Marchal T, Turinelli V, Chalvet-Monfray K, Fournel-Fleury C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J* 2004; 167: 158-66.
- Posnett D, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy" [published erratum appears in *J Exp Med* 1994 Mar 1;179(3):1077]. *J Exp Med* 1994; 179: 609-18.
- Priester WA, McKay FW (1980) *The occurrence of tumors in domestic animals*. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 597-608.
- Retamales E, Rodriguez L, Guzman L, Aguayo F, Palma M, Backhouse C, Argandona J, Riquelme E, Corvalan A. Analytical detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in gastric lymphoid infiltrates by peak area analysis of the melting curve in the LightCycler System. *J Mol Diagn* 2007; 9: 351-7.
- Rezuke WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin Chem* 1997; 43: 1814-23.
- Ririe K, Rasmussen R, Wittwer C. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154 - 60.
- Rosenberg MP, Matus RE, Patnaik AK. Prognostic Factors in Dogs with Lymphoma and Associated Hypercalcemia. *J Vet Intern Med* 1991; 5: 268-71.
- Rosenberg S. National cancer institute sponsored study of classifications of non-

- hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-35.
- Rütgen BC, Hammer SE, Gerner W, Christian M, de Arespacochaga AG, Willmann M, Kleiter M, Schwendenwein I, Saalmuller A. Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leuk Res* 2010; 34: 932-8.
- Ruslander D. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo* 1997; 11: 169-72.
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.
- Sakano H, Kurosawa Y, Weigert M, Tonegawa S. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1981; 290: 562-5.
- SantaLucia J, Jr., Allawi HT, Seneviratne PA. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry* 1996; 35: 3555-62.
- Sapierzynski R. Practical aspects of immunocytochemistry in canine lymphomas. *Pol J Vet Sci* 2010; 13: 661-8.
- Sapierzynski R, Micun J, Jagielski D, Jurka P. Cytopathology of canine lymphomas (100 cases). *Pol J Vet Sci* 2010; 13: 653-9.
- Sapierzynski R, Dolka I, Fabisiak M. High agreement of routine cytopathology and immunocytochemistry in canine lymphomas. *Pol J Vet Sci* 2012; 15: 247-52.
- Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Increase in minimal residual disease in peripheral blood before clinical relapse in dogs with lymphoma that achieved complete remission after chemotherapy. *J Vet Intern Med* 2011a; 25: 292 - 6.
- Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Evaluation of cytoreductive efficacy of vincristine, cyclophosphamide, and Doxorubicin in dogs with lymphoma by measuring the number of neoplastic lymphoid cells with real-time polymerase chain reaction. *J Vet Intern Med* 2011b; 25: 285-91.
- Schilling J, Clevinger B, Davie JM, Hood L. Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments. *Nature* 1980; 283: 35-40.
- Seidman JG, Leder P. The arrangement and rearrangement of antibody genes. *Nature* 1978; 276: 790-5.
- Squire RA, Bush M, Melby EC, Neeley LM, Yarbrough B. Clinical and pathologic study of canine lymphoma: clinical staging, cell classification, and therapy. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 565-74.
- Stansfeld AG, Diebold J, Kapanci Y, Kelényi G, Lennert K, Mioduszevska O, Noel H, Rilke F, Sundstrom C, Van Unnik JAM, Wright DH. UPDATED KIEL CLASSIFICATION FOR LYMPHOMAS. *The Lancet* 1988; 331: 292-3.
- Takanosu M, Tadika T, Kobayashi T. Heteroduplex polymerase chain reaction is essential for canine receptor rearrangement analysis. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 760-3.
- Takanosu M, Kagawa Y. Comparison of primer sets for T-cell clonality testing in canine intestinal lymphoma. *J Vet Diagn Invest* 2015; 27: 645-50.

-
- Tamura K, Yagihara H, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 110: 163-7.
- Teske E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q* 1994a; 16: 209-19.
- Teske E. Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: an update. *Vet Q* 1994b; 16 Suppl 1: 29S-31S.
- Teske E. Hämatopoetische Tumoren. In: *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen*, 2nd edn. Kessler M, ed.: Parey im MVS 2005: 477-509.
- Thalheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE, Suter SE. Lymphoma Immunophenotype of Dogs Determined by Immunohistochemistry, Flow Cytometry, and Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements. *J Vet Intern Med* 2013: n/a-n/a.
- Thilakarathne D, Mayer M, MacDonald V, Jackson M, Trask B, Kidney B. Clonality and phenotyping of canine lymphomas before chemotherapy and during remission using polymerase chain reaction (PCR) on lymph node cytologic smears and peripheral blood. *Can Vet J* 2010; 51: 79 - 84.
- Thomas R, Smith KC, Gould R, Gower SM, Binns MM, Breen M. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers. *Chromosome Res* 2001; 9: 649-57.
- Thompson SD, Manzo AR, Pelkonen J, Larche M, Hurwitz JL. Developmental T cell receptor gene rearrangements: Relatedness of the α/β and γ/δ T cell precursor. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1939-50.
- Tomley FM, Armstrong SJ, Mahy BW, Owen LN. Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants. *Br J Cancer* 1983; 47: 277-84.
- Tonegawa S, Steinberg C, Dube S, Bernardini A. Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71: 4027-31.
- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-81.
- Tonegawa S. The molecules of the immune system. *Sci Am* 1985; 253: 122-31.
- Trainor K, Brisco M, Story C, Morley A. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 1990; 75: 2220-2.
- Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78: 192-6.
- Uemura A, Mori S, Sugahara K, Akamatsu N, Tsuruda K, Tsukasaki K, Hirakata Y, Atogami S, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. Rapid and high-resolution detection of IgH gene rearrangements using PCR and melting curve analysis. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 200-7.
- Vail D, Young K (2007) Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: *Small animal clinical oncology*, 4th edn. Eds Withrow S, MacEwen E. W.B. Saunders Company, Philadelphia
- Vail DM, Pinkerton ME, Young K. Hematopoietic Tumors. In: *Small animal clinical oncology*, 5th edn. St. Louis: Duncan, L 2013: 608-37.
- Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS, Moore PF. Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol* 2006; 43: 241-56.
- Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, Johnson Y, Jones C, Kiupel M, Labelle P, Lester S, Miller

-
- M, Moore P, Moroff S, Roccabianca P, Ramos-Vara J, Ross A, Scase T, Tvedten H, Vernau W. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol* 2011; 48: 198-211.
- Valli VE, Kass PH, Myint MS, Scott F. Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Vet Pathol* 2013; 50: 738-48.
- van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991a; 198: 1-91.
- van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clin Chim Acta* 1991b; 198: 93-174.
- van Dongen JJM, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R, van Krieken JHJM, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-317.
- van Gent DC, Hiom K, Paull TT, Gellert M. Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *The EMBO Journal* 1997; 16: 2665-70.
- van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, Morgan GJ, Parreira A, Molina TJ, Cabecadas J, Gaulard P, Jasani B, Garcia JF, Ott M, Hannsmann ML, Berger F, Hummel M, Davi F, Bruggemann M, Lavender FL, Schuurin E, Evans PA, White H, Salles G, Groenen PJ, Gameiro P, Pott C, Dongen JJ. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; 21: 201-6.
- Vaughan A, Johnson JL, Williams LE. Impact of chemotherapeutic dose intensity and hematologic toxicity on first remission duration in dogs with lymphoma treated with a chemoradiotherapy protocol. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1332-9.
- Vernau W, Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 145-64.
- Villamil JA, Henry CJ, Hahn AW, Bryan JN, Tyler JW, Caldwell CW. Hormonal and Sex Impact on the Epidemiology of Canine Lymphoma. *J Cancer Epidemiol* 2009; 2009: 591753.
- Wang SL, Lee JJ, Liao AT. Chemotherapy-induced neutropenia is associated with prolonged remission duration and survival time in canine lymphoma. *Vet J* 2015; 205: 69-73.
- Weller RE, Holmberg CA, Theilen GH, Madewell BR. Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcoma. *Am J Vet Res* 1980; 41: 1310-4.
- Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garrett L, Barber L, Avery A. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;

-
- 106: 179-96.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22: 176-81.
- Xu D, Du J, Schultz C, Ali A, Ratech H. Rapid and accurate detection of monoclonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangement by DNA melting curve analysis in the LightCycler System. *J Mol Diagn* 2002; 4: 216 - 22.
- Xu D, Du J, Kamino H, Ratech H. Rapid diagnosis of clonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in cutaneous B-cell lymphomas using the LightCycler-Polymerase Chain Reaction with DNA melting curve analysis. *Am J Dermatopathol* 2004; 26: 385-9.
- Xu D, Yang Z, Zhang D, Wu W, Guo Y, Chen Q, Cui W. Rapid detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement by PCR and melting curve analysis using combined FR2 and FR3 primers. *Diagn Pathol* 2015; 10: 140.
- Yagihara H, Tamura K, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. 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* 2007; 115: 375-82.
- Yagihara H, Uematsu Y, Koike A, Tamura K, Isotani M, Yamaguchi T, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Immunophenotyping and gene rearrangement analysis in dogs with lymphoproliferative disorders characterized by small-cell lymphocytosis. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21: 197-202.
- Yamazaki J, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 126: 321 - 31.
- Yamazaki J, Takahashi M, Setoguchi A, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Monitoring of Minimal Residual Disease (MRD) after Multidrug Chemotherapy and Its Correlation to Outcome in Dogs with Lymphoma: A Proof-of-Concept Pilot Study. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 897-903.
- Yang X, Xu D, Du J, Kamino H, Rakeman J, Ratech H. Rapid detection of clonal T-cell receptor-beta gene rearrangements in T-Cell lymphomas using the LightCycler-polymerase chain reaction with DNA melting curve analysis. *J Mol Diagn* 2005; 7: 81 - 8.
- Zemann BI, Moore AS, Rand WM, Mason G, Ruslander DM, Frimberger AE, Wood CA, L'Heureux DA, Gliatto J, Cotter SM. A combination chemotherapy protocol (VELCAP-L) for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 465-70.

VIII. DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. Johannes Hirschberger dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, dieses interessante Thema zu bearbeiten. In seiner herzlichen Art hat er immer Zeit für eine Diskussion über die Thematik gefunden und hat diese Arbeit durch konstruktive Anregungen maßgeblich vorangetrieben.

Frau Dr. Karin Weber möchte ich dafür danken, dass sie die labortechnische Betreuung meiner Dissertation übernommen hat.

Karsten Meyer möchte ich für die unermüdliche Nachhilfe in der Kurvendiskussion danken, die es mir erst ermöglicht hat, diese Arbeit durchzuführen.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden Shunya Ohmura und Nadine Holtermann, die mir bei der Probenentnahme geholfen haben. Dem gesamten Team der Medizinischen Kleintierklinik danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Für das fleißige und oft unter Zeitdruck stattgefundene Korrekturlesen danke ich Nikolaus Breer, Verena Schöpfer und Karsten Meyer.