

Differenzierung der kaninen intestinalen Lymphome von Enteritiden
mittels Klonalitätsanalyse anhand einer Polymerasekettenreaktion für
Antigen-Rezeptor-Gen-Rearrangement - PARR

von Shunya Ohmura

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

Differenzierung der kaninen intestinalen Lymphome von Enteritiden
mittels Klonalitätsanalyse anhand einer Polymerasekettenreaktion für
Antigen-Rezeptor-Gen-Rearrangement - PARR

von Shunya Ohmura

aus Tokio

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

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Das kanine gastrointestinale Lymphom	3
1.1. Vorkommen und klinisches Bild	3
1.2. Ätiologie und Prädisposition	4
1.3. Diagnostisches Vorgehen	5
1.4. Prognostische Faktoren und Prognose	6
1.5. Histologisches Bild und Immunphänotyp.....	6
2. Weitere Diagnostik	9
2.1. Immunhistochemie.....	9
2.1.1. Phänotyp-Marker	9
2.1.1.1. CD3	9
2.1.1.2. CD20.....	10
2.1.1.3. CD79.....	10
2.2. PARR.....	10
2.2.1. Prinzip.....	11
2.2.2. Sensitivität	14
2.2.3. Spezifität	14
2.2.4. Heteroduplex-Analyse	15
2.2.5. PARR beim kaninen gastrointestinalen Lymphom	16
3. Verteilung der intestinalen Lymphozyten	17
3.1. Physiologische Verteilung	17
3.2. Verteilung bei IBD.....	17
4. Komparativer Aspekt.....	18
4.1. Humanes gastrointestinales Lymphom	18
4.1.1. B-Zell-Lymphom	18
4.1.1.1. Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)	18
4.1.1.2. Marginalzonenlymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom)	19
4.1.1.3. Folikuläres Lymphom.....	19
4.1.1.4. Mantelzell-Lymphom	19

4.1.2. T-Zell-Lymphom	20
4.1.2.1. Enteroopathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom (EATL)	20
4.1.2.2. Extranodales Natürliche-Killer (NK)-Zell-/T-Zell-Lymphom (ENKTL)	21
III. PUBLIKATION	22
IV. DISKUSSION	40
1. Charakteristika der Hunde mit intestinalem Lymphom	40
2. Anatomische Lokalisation	40
3. PARR	
3.1. Einflüsse der DNA-Extraktion von FFPE-Geweben auf die PCR	40
3.2. B-Zell-Primer	41
3.3. T-Zell-Primer	42
3.4. Heteroduplex-Analyse	42
3.5. Sensitivität und Spezifität	43
4. Korrelation der Phänotypen zwischen PARR und IHC	45
5. Zusammenhang zwischen anatomischen Lokalisationen und Phänotypen....	46
6. Phänotypen und Betrachtung zur Prognose	47
7. Epithelotropismus	48
8. Ätiologische Betrachtung	49
9. Zukünftige Perspektiven	53
V. ZUSAMMENFASSUNG	55
VI. SUMMARY	57
VII. LITERATURVERZEICHNIS	59
VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
IX. TABELLENVERZEICHNIS	74
X. DANKSAGUNG	75

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Bp	Basenpaar
CDR	Komplementaritäts-Determinierende Region
DAB	Diaminobenzidine
D-Gen	Diversity-Gen
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EATL	Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
EBV	Epstein-Barr-Virus
ENKTL	Extranodales NK-/T-Zell-Lymphom
EUS-FNA	Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration
FFPE	Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettet
GIT	Gastrointestinaltrakt
IBD	Inflammatory bowel disease
IgH	Immunglobulin-Schwer-Kette
IgL	Immunglobulin-Leicht-Kette
IHC	Immunhistochemie
J-Gen	Joining-Gen
LPE	Lymphoplasmazelluläre Enteritis
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MRD	Minimale Resterkrankung
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche-Killer-Zelle
PAGE	Polyakrylamidgel-Elektrophorese
PARR	PCR für Antigen-Rezeptor-Gen-Rearrangement
PCR	Polymerasekettenreaktion
RCD	Refractory celiac disease
TCR	T-Zell-Rezeptor
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
V-Gen	Variable-Gen

I. EINLEITUNG

Das kanine intestinale Lymphom ist eine primäre lymphatische Neoplasie, die im Intestinaltrakt in den Lokalisationen Dünndarm und Dickdarm mit absteigender Häufigkeit auftritt (Couto *et al.*, 1989, Coyle und Steinberg, 2004). Diese extranodale Form, zusammen mit dem gastrischen Lymphom, kommt nach der multizentrischen am zweithäufigsten vor und macht ca. 5-7 % aller kaninen Lymphomfälle aus (Couto *et al.*, 1989). Das kanine intestinale Lymphom weist im Vergleich zur multizentrischen Form eine extrem schlechte Prognose auf. In Kombinations-Chemotherapie-Protokollen mit oder ohne operativer Entfernung des primären Tumors wurde eine mediane Überlebenszeit von 77 Tagen berichtet (Rassnick *et al.*, 2009).

Die Diagnose des kaninen intestinalen Lymphoms erfolgt durch morphologische Untersuchungen wie der Zytologie von per Feinnadelaspiration (FNA) entnommenen Zellmaterialien oder der Histopathologie von endoskopisch oder laparatomisch entnommenen Biopaten. Allerdings sind wegen der ähnlichen histopathologischen Bilder zwischen intestinalen Lymphomen und Enteritiden, vor allem lymphoplasmazellulärer Enteritis (LPE), diese völlig unterschiedlichen Erkrankungen nur schwierig differenzierbar, vor allem wenn Aspirate oder endoskopische Proben zur morphologischen Untersuchung verwendet werden (Evans *et al.*, 2006, Kleinschmidt *et al.*, 2006). Zur definitiven Diagnose ist daher meist eine histopathologische Untersuchung von laparatomisch entnommenen Volldarmbiopaten mit oder ohne Immunhistochemie erforderlich, vor allem um die Invasivität der Tumorzellen in den tieferen Darmschichten beurteilen zu können. Aufgrund der geringeren Invasivität der Prozedur und höheren Praktikabilität wird in der Praxis die endoskopische Probenentnahme bevorzugt. Diese Gewebeproben können jedoch die Beurteilung erschweren, weil endoskopische Gewebeproben meist nur oberflächliches Gewebe, Darmmukosa, enthalten und die Orientierung der Gewebestruktur im Paraffinblock nur schwierig zu interpretieren ist (Evans *et al.*, 2006, Washabau *et al.*, 2010).

Um die Diagnosestellung mit endoskopisch entnommenen Gewebeproben zu verbessern, wurde die Wertigkeit der Klonalitätsanalyse mithilfe Polymerasekettenreaktion für Antigen-Rezeptor-Gen-Rearrangement (PARR) bei

kaninen gastrointestinalen Lymphomen untersucht. Nach Fukushima und Kollegen zeigte sich eine erheblich niedrigere Sensitivität bei kaninen gastrointestinalen Lymphomen im Vergleich zur primären Studie nach Burnett und Kollegen, in der die Wertigkeit der PARR-Analyse zur Detektion der lymphatischen Neoplasien wie lymphatische Leukämien und multizentrische Lymphome getestet wurde (Burnett *et al.*, 2003, Fukushima *et al.*, 2009). Die Sensitivität der PARR-Analyse ist vor allem abhängig von der Zellpopulation im Hintergrund, die in der PARR-Analyse unvermeidlich eingeschlossen wird. Burnett und Kollegen zeigten hierzu, dass Monoklonalität nachgewiesen werden konnte, wenn Desoxyribonukleinsäure (DNA) von lymphatischen Neoplasien in die von einem nicht-lymphatischen Gewebe (Leber) bis 0,1 % im Verhältnis eingemischt wurde. Wenn andererseits DNA von lymphatischen Neoplasien in die von lymphatischen Geweben (Milz und Thymus) eingemischt wurde, konnte Monoklonalität nur bis 1 % beziehungsweise 10 % im Verhältnis identifiziert werden (Burnett *et al.*, 2003). Die niedrigere Sensitivität nach Fukushima und Kollegen kann daher der Koexistenz reaktiver Lymphozyten zugeschrieben werden, da LPE meist mit neoplastischen Lymphozyten einhergeht (Couto *et al.*, 1989, Fukushima *et al.*, 2009).

Die Hypothese der nachfolgenden retrospektiven Studie ist daher, dass die PARR-Analyse bei kaninen intestinalen Lymphomen zur Detektion der neoplastischen Lymphozyten genauso diagnostisch wertvoll ist, wie bei lymphatischen Leukämien und multizentrischen Lymphomen, allerdings nur, wenn zur PARR-Analyse repräsentative Materialien mit neoplastischen Zellen eingeschlossen werden können. Zu diesem Zweck wurden Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete (FFPE) Volldarmproben verwendet. Auf Gewebeschnitten wurde ein repräsentativer Bereich fokussiert und markiert, in dem neoplastische Lymphozyten reichlich vorhanden waren. Aus dem entsprechenden Bereich der FFPE-Blöcke wurde DNA extrahiert, um zur PARR-Analyse eine möglichst geringe Anzahl der reaktiven Lymphozyten einzuschließen. Das primäre Ziel der vorliegenden Studie ist, die Wertigkeit der PARR-Analyse zur Differenzierung der kaninen intestinalen Lymphome von Enteritiden zu überprüfen. Ein sekundäres Ziel ist die Bestimmung der Phänotypen bei kaninen intestinalen Lymphomen mittels PARR-Analyse und Immunhistochemie, deren systematische Darstellung in der Literatur nur wenig beschrieben ist.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das kanine gastrointestinale Lymphom

Da in der Literatur meist kanine gastrische und intestinale Lymphome zusammen beschrieben werden, werden hier auch kanine intestinale Lymphome samt gastrischen Lymphomen erläutert.

1.1. Vorkommen und klinisches Bild

Einer Studie zufolge macht das gastrointestinale Lymphom bei Hunden ca. 6 % aller gastrointestinalen Tumoren aus (Patnaik *et al.*, 1977). Nach dem multizentrischen Lymphom ist das gastrointestinale Lymphom die zweithäufigste Form und beträgt ca. 5-7 % aller kaninen Lymphom-Fälle (Couto *et al.*, 1989). Rüden scheinen häufiger betroffen zu sein. Obwohl auch junge Hunde erkranken, sind meist Hunde im mittleren und hohen Alter betroffen (Couto *et al.*, 1989, Coyle und Steinberg, 2004, Frank *et al.*, 2007, Rassnick *et al.*, 2009).

Gegenüber der multizentrischen Form fehlt normalerweise beim gastrointestinalen Lymphom eine Vergrößerung der peripheren Lymphknoten (Couto *et al.*, 1989, Frances *et al.*, 2013, Miura *et al.*, 2004, Rassnick *et al.*, 2009). Der Dünndarm ist am häufigsten betroffen, gefolgt von Magen und Dickdarm (Couto *et al.*, 1989, Coyle und Steinberg, 2004). Tumor-Läsionen manifestieren sich meist mit diffuser Verbreitung im Gastrointestinaltrakt (GIT), sie können dennoch als multifokale oder lokale Verdickung der Darmschichten auftreten (Couto *et al.*, 1989, Coyle und Steinberg, 2004, Frances *et al.*, 2013, Miura *et al.*, 2004). In fortgeschrittenen Erkrankungsstadien wurde ein transmurales Einwachsen mit Darmperforation beobachtet, infolgedessen auch die Entwicklung einer Peritonitis möglich ist (Couto *et al.*, 1989). Regionale Metastasen sind nicht selten und deren Lokalisationen umfassen mesenteriale Lymphknoten, die Leber, die Milz sowie in seltenen Fällen auch das Knochenmark (Couto *et al.*, 1989, Coyle und Steinberg, 2004, Frank *et al.*, 2007, Rassnick *et al.*, 2009). Hunde mit einem gastrointestinalen Lymphom zeigen unspezifische klinische Bilder wie Lethargie, Gewichtsverlust, Inappetenz, Erbrechen oder Durchfall (Couto *et al.*, 1989, Frances *et al.*, 2013, Frank *et al.*, 2007, Rassnick *et al.*, 2009). Bei der Palpation kann in einigen Fällen eine intra-abdominale Masse getastet oder abdominale

Schmerzhaftigkeit hervorgerufen werden (Couto *et al.*, 1989). Bei der hämatologischen Untersuchung können Anämien oder Neutrophilien mit oder ohne Linksverschiebung erkannt werden. Serologisch sind am meisten Hypoproteinämie sowie Hypalbuminämie durch Durchfall und Malabsorption auffällig (Couto *et al.*, 1989, Frances *et al.*, 2013, Frank *et al.*, 2007, Miura *et al.*, 2004, Rassnick *et al.*, 2009). Bei der Röntgen-Untersuchung des Abdomens mit einem Kontrastmittel können unregelmäßige Oberflächen der Darmmukosa und in seltenen Fällen obstruktive Areale beobachtet werden. Eine komplette Obstruktion des Darms ist aber sehr selten (Couto *et al.*, 1989, Frances *et al.*, 2013). Sonographisch können eine Verdickung und ein Verlust der Darmschichten sowie vergrößerte abdominale Lymphknoten gefunden werden, aber diese Befunde sind nicht spezifisch für das gastrointestinale Lymphom (Frances *et al.*, 2013). Endoskopisch kann eine Pflasterstein-ähnliche Erscheinung oder eine unregelmäßig veränderte Darmmukosa mit fleckigem Erythem, die auch bei LPE auftreten kann, erkannt werden. In seltenen Fällen kann auch eine solitäre Masse gefunden werden (Miura *et al.*, 2004).

1.2. Ätiologie und Prädisposition

Die Ätiologie des kaninen gastrointestinalen Lymphoms ist weitgehend unbekannt. Basierend auf dem Auftreten von neoplastischen Lymphozyten und einer LPE wurde eine Assoziation der Entwicklung des gastrointestinalen Lymphoms mit der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (inflammatory bowel disease, IBD) vermutet, aber nicht bestätigt (Couto *et al.*, 1989). Bei einer Rasse-spezifischen Enteropathie (Basenji-Enteropathie) wurde eine nachfolgende Entwicklung eines gastrointestinalen Lymphoms beschrieben (Breitschwerdt *et al.*, 1982, MacLachlan *et al.*, 1988). Trotz dieser initialen Berichte können in der Literatur dennoch keine weiteren Berichte über die mögliche Rasse-Prädisposition für das gastrointestinale Lymphom bei dieser Rasse gefunden werden.

In der Literatur gibt es zwei Studien, die auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen IBD und einer Entwicklung des gastrointestinalen Lymphoms hinweisen. Eine wesentliche Studie zur Analyse der Klonalität bei Hunden mit IBD mittels Gene-Scanning zeigte beispielweise eine verringerte Diversität der Lymphozyten im Darm, die nicht nur eine oligoklonale, sondern sogar eine monoklonale Lymphozytenpopulation aufwies. Außerdem berichteten die Autoren dieser Studie nachträglich, dass ein Hund mit IBD, der Monoklonalität aufgezeigt hatte, im

späteren Zeitpunkt ein gastrointestinales Lymphom entwickelte (Olivero *et al.*, 2011). Die andere Studie, die immunhistochemisch eine anti-apoptotische Zellpopulation bei Hunden mit IBD analysierte, zeigte, dass es sich bei der anti-apoptotischen Zellpopulation nicht um B-Zellen, sondern um T-Zellen handelt (Jergens *et al.*, 2014). Allerdings wurde in der Humanmedizin beschrieben, dass Patienten mit IBD (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) kein signifikant oder nur ein gering erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Lymphoms besitzen (Askling *et al.*, 2005).

1.3. Diagnostisches Vorgehen

Die Diagnose des kaninen gastrointestinalen Lymphoms erfolgt mit morphologischer Begutachtung wie Zytologie und Histopathologie. Die Aussagekraft der morphologischen Untersuchung ist abhängig von der Zellularität und davon, bis zu welchem Grad die Darmschichten und die Gewebestruktur erhalten sind (Washabau *et al.*, 2010). Für die Probengewinnung gibt es drei Methoden: perkutane Feinnadelaspiration (FNA), Endoskopie und Laparatomie. Jede Methode hat ihre Vor- und Nachteile. FNA erfolgt unter einer sonographischen Darstellung der gezielten Region. Diese Methode ist ohne Narkose leicht durchführbar und gering invasiv, aber die entnommenen Proben sind so klein, dass eine Differenzierung zwischen Enteritiden und Lymphomen nicht eindeutig erfolgen kann (Bonfanti *et al.*, 2006). Die endoskopische Probenentnahme bedarf einer Narkose, ist aber relativ gering invasiv. Mit dieser Methode ist eine direkte Visualisierung der Läsionen möglich, die Probenentnahme ist jedoch meist auf die Darmoberfläche (Mukosa) begrenzt (Evans *et al.*, 2006, Kleinschmidt *et al.*, 2006). Die laparatomische Probenentnahme ist sehr invasiv. Wegen eines schlechten Ernährungszustandes der Hunde mit einem gastrointestinalen Lymphom kann die laparatomische Probenentnahme mit einem erhöhten Risiko perioperativer sowie postoperativer Komplikationen verbunden sein (Bonfanti *et al.*, 2006). Diese Methode ermöglicht aber als Einzige eine Probenentnahme der Volldarmwandschichten.

Bei den mit FNA entnommenen Proben ist die Begutachtung auf die Zell-Morphologie begrenzt. Außerdem können die endoskopischen Proben nicht genug Material liefern, um zwischen LPE und gastrointestinalen Lymphomen eindeutig differenzieren zu können (Kleinschmidt *et al.*, 2006, Washabau *et al.*, 2010). Zur definitiven Diagnose ist daher eine histopathologische Untersuchung der

Volldarmwandschichten unabdingbar.

1.4. Prognostische Faktoren und Prognose

Die Prognose des kaninen gastrointestinalen Lymphoms ist trotz Einsatz eines Kombinations-Chemotherapie-Protokolls mit oder ohne chirurgischer Entfernung des primären Tumors extrem schlecht. Frank und Kollegen zeigten eine mediane Überlebenszeit von 13 Tagen bei 30 primären gastrointestinalen Lymphomen. Rassnick und Kollegen berichteten eine mediane Überlebenszeit von 44 Tagen bei 18 gastrointestinalen Lymphomen, unter denen jedoch fünf multizentrische Lymphome eingeschlossen waren (Frank *et al.*, 2007, Rassnick *et al.*, 2009). Die geschätzte Wahrscheinlichkeit des Überlebens von sechs und zwölf Monaten nach Beginn der Chemotherapie lag bei 25 % beziehungsweise 18 % (Rassnick *et al.*, 2009). Trotz der schlechten Prognose des kaninen gastrointestinalen Lymphoms wurden jedoch auch einzelne Langzeit-Überlebende beschrieben. Hierbei scheinen kolorektale Lymphome eine bessere Prognose aufzuweisen. Ein Hund mit einem kolorektalen Lymphom, der mit einer Chemotherapie behandelt wurde, blieb fünf Jahre nach Beginn der Therapie in der Remission (Couto *et al.*, 1989). Ein dreijähriger Dachshund mit einem solitären rektalen Lymphom, der mit einer Chemotherapie ohne operative Entfernung des primären Tumors behandelt wurde, war nach ca. einem Jahr noch am Leben (Miura *et al.*, 2004). Ferner waren zwei Hunde mit einem kolorektalen Lymphom, von denen einer mit einer Chemotherapie inklusive einer operativen Entfernung behandelt wurde, und der Andere nur mit Prednison therapiert wurde, nach 84 beziehungsweise 31 Monaten noch am Leben (Frank *et al.*, 2007).

Einer klinischen Studie zufolge scheint der B-Zell-Phänotyp eine Tendenz zu einer besseren Prognose zu haben. Dies war allerdings statistisch nicht signifikant (Rassnick *et al.*, 2009). Als andere positive prognostische Faktoren wurden das Erreichen der kompletten oder partiellen Remission mit einer Chemotherapie und das Nichtvorhandensein eines Durchfalls bei den initialen klinischen Bildern beschrieben (Rassnick *et al.*, 2009).

1.5. Histologisches Bild und Immunphänotyp

In der ersten systematischen Deskription der kaninen gastrointestinalen Lymphome wurden 20 Fälle des primären gastrointestinalen Lymphoms inklusive fünf Fälle der multizentrischen Form mit GIT-Beteiligungen histopathologisch

untersucht. Die primären anatomischen Lokalisationen umfassten den Magen (40 %), den Dünndarm (47 %) und den Dickdarm (13 %). Histopathologisch wurden sie durch diffuse Infiltrate der ungekerbten Zellen in die Submukosa und Lamina propria gekennzeichnet. LPE war meist mit neoplastischen Lymphozyten vergesellschaftet und die entzündete Mukosa überdeckte die in der Submukosa liegenden lymphomatösen Läsionen. Ein besonderes Merkmal in dieser Studie ist, dass neoplastische Lymphozyten von der Submukosa zu stammen schienen, was im Gegensatz zu einer nachfolgenden Studie steht (Couto *et al.*, 1989). Eine andere systematische Studie mit 44 Fällen des primären gastrointestinalen Lymphoms zeigte nämlich einen ausgeprägten Epitheliotropismus, der nur bei T-Zell-Lymphomen beobachtet wurde (Coyle und Steinberg, 2004). Zwei andere Studien ermittelten ebenfalls Epitheliotropismus bei kaninen gastrointestinalen T-Zell-Lymphomen (French *et al.*, 1996, Ozaki *et al.*, 2006). Histopathologische Bilder der kaninen gastrointestinalen Lymphome wurden in der Studie von Coyle und Steinberg näher dargestellt und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Entgegen der früheren Vermutung, dass das kanine gastrointestinale Lymphom primär aus B-Zellen entstünde, zeigten Coyle und Steinberg, dass 75 % der Fälle vom T-Zell-Phänotyp, 10 % vom B-Zell-Phänotyp und 15 % vom nicht-B-nicht-T-Zell-Phänotyp waren (Coyle und Steinberg, 2004). Zwei nachfolgende klinische Studien berichteten eine ähnliche Prävalenz des T-Zell-Phänotyps bei kaninen gastrointestinalen Lymphomen (63 % für T-zellig gegenüber 37 % für B-zellig) (Frank *et al.*, 2007, Rassnick *et al.*, 2009).

Ferner wurde eine Sonderform der kaninen gastrointestinalen T-Zell-Lymphome mit ausgeprägter eosinophiler Infiltration beschrieben (Marchetti *et al.*, 2005, Ozaki *et al.*, 2006). Beim gastrointestinalen B-Zell-Lymphom wurde auch eine besondere Form mit der Mott-Zell-Differenzierung berichtet (De Zan *et al.*, 2009, Kodama *et al.*, 2008, Stacy *et al.*, 2009). Die Existenz des primären gastrointestinalen Natürliche-Killer (NK)-Lymphoms wurde in einem Fallbericht vorgestellt, wobei allerdings keine eindeutige Immunphänotypisierung durchgeführt wurde (Snead, 2007).

Tab. 1: Histopathologische Charakteristika der kaninen gastrointestinalen Lymphome nach Coyle und Steinberg, 2004.

Immunphänotyp	Nukleus	Zytoplasma	Chromatin	Nukleolus	Mitose (/ 400 x Feld)	Sonstige
CD3 ⁺	pleomorph (rund, polygonal, reniform) mittel-hochgradige Anisokaryose	gering-mäßig, amphophil-basophil	diffus dicht, getüpfelt granulös, basophil	selten	3-4	Epitheliotropismus
CD20 ⁺	rund, ovoid mittelgradige Anisokaryose	gering	stark basophil	unauffällig	< 1	Tingible-Body-Makrophagen Starry-Sky- (Sternenhimmel) Erscheinung Follikuläre Struktur
CD3 ⁺ /CD20 ⁺ (gemischt)	pleomorph (rund, ovoid, polygonal) hochgradige Anisokaryose	gering	verklumpt	1	2-3 oder < 1	Anaplastische Zellen
CD3 ⁻ /CD20 ⁻	pleomorph (rund, ovoid, polygonal) hochgradige Anisokaryose	gering	mittelgradig basophil, verklumpt	1-2	1	Zellen mit Karyomegalie

2. Weitere Diagnostik

2.1. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung ist nicht nur zur Diagnose der Tumoren, sondern auch zur Identifizierung des Gewebsursprungs eines Tumors unabdingbar. Bei Lymphomen ist der Nutzen der Immunphänotypisierung enorm (Mason und Gatter, 1987). Das Prinzip basiert auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Die zur Antigen-Detektion verwendeten Antikörper unterscheiden sich durch die Herstellungsprozedur und ihre Eigenschaften in polyklonal und monoklonal (Leenaars und Hendriksen, 2005, Lipman *et al.*, 2005). Obwohl der monoklonale Antikörper nur ein Epitop erkennt und damit konsistent ein bestimmtes Antigen detektieren kann, kann er für Veränderungen des Antigens wie Glykosylierung oder Degeneration anfällig sein. Andererseits ist der polyklonale Antikörper für die Veränderungen des Antigens nicht so anfällig wie der monoklonale Antikörper, da er von verschiedenen Plasmazellen produziert wird und somit heterogene Epitope erkennen kann (Lipman *et al.*, 2005).

Bei der routinemäßigen immunhistologischen Untersuchung werden ein primärer Antikörper, der das zu detektierende Molekül erkennt, und ein sekundärer Antikörper, der das Spezies-Immunglobulin des primären Antikörpers erkennt, verwendet. Der sekundäre Antikörper kann im Voraus biotinyliert werden. Das Biotin besitzt eine hohe Affinität für das Avidin, das ebenfalls vorab mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt werden kann. Insgesamt wird ein Peroxidase-Komplex am gezielten Antigen abgelagert. Zur Visualisierung des Ziel-Moleküls kommt meist ein Chromogen 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) zum Einsatz. DAB formt in Anwesenheit von Peroxidase und Wasserstoffperoxid ein unlösliches braunes Polymer, das unter dem Mikroskop veranschaulicht werden kann (Heyderman, 1979).

2.1.1. Phänotyp-Marker

2.1.1.1. CD3

CD3 besteht aus fünf Polypeptiden und bildet zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) den TCR-Komplex (Rezuke *et al.*, 1997). Zur Aktivierung des TCR ist die CD3-Exprimierung auf der Zellmembran notwendig (Smith-Garvin *et al.*, 2009). CD3 exprimieren Thymozyten und T-Zellen, die sich bereits dem

Reifungsprozess unterzogen haben (Rezuke *et al.*, 1997). Die Wertigkeit der Immunhistochemie mit dem CD3-Antikörper zur Diagnosestellung des Lymphoms sowie zur Immunphänotypisierung der T-Zelllinie wurde auch in der Veterinärmedizin bestätigt (Ferrer *et al.*, 1992, Fournel-Fleury *et al.*, 2002).

2.1.1.2. CD20

CD20 wird essentiell bei der B-Zelllinie, vor allem, von Prä-B-Zellen und reife B-Zellen exprimiert (Rezuke *et al.*, 1997). Als dessen Funktion wird eine Kalzium-Transduktion zur Signal-Übermittlung vermutet (Bubien *et al.*, 1993). Zur Identifizierung der B-Zell-Lineage wird der CD20-Antikörper auch in der Veterinärmedizin erfolgreich eingesetzt (Jubala *et al.*, 2005).

2.1.1.3. CD79

CD79 wird in CD79a und CD79b unterteilt und sie bilden zusammen ein Heterodimer. Funktionell ist es die Entsprechung von CD3 der T-Zelle (Dylke *et al.*, 2007). Während CD20 erst im Stadium der Prä- und reife-B-Zell-Phase exprimiert wird, wird CD79 schon im Stadium der Progenitor-Phase, vor der Aufstellung des Immunglobulin-V-Gens sowie der Produktion der Immunglobulin M (IgM)-Ketten, exprimiert (Reth, 1992). Aufgrund dessen kann mit dem CD79-Antikörper ein breiteres Spektrum der B-Zell-Lineage als mit dem CD20-Antikörper identifiziert werden (Coyle und Steinberg, 2004, Jones *et al.*, 1993).

2.2. PARR

Die PARR-Analyse ist sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin gut etabliert. In der Veterinärmedizin kommt die PARR-Analyse zur Diagnosestellung lymphatischer Neoplasien wie Lymphome und lymphatische Leukämien, zur Bestimmung des Tumor-Stadiums, zur Detektion der minimalen Resterkrankung (MRD) und zur Entdeckung des Frühstadiums der kutanen Lymphome zum Einsatz (Affolter *et al.*, 2009, Burnett *et al.*, 2004, Burnett *et al.*, 2003, Chaubert *et al.*, 2010, Gentilini *et al.*, 2009, Keller *et al.*, 2004, Lana *et al.*, 2006, Langner *et al.*, 2014, Sato *et al.*, 2011a, Sato *et al.*, 2011b, Sato *et al.*, 2013, Tamura *et al.*, 2006, Thilakarathne *et al.*, 2010, Valli *et al.*, 2006, Yagihara *et al.*, 2007, Yagihara *et al.*, 2009, Yamazaki *et al.*, 2010). Weil das für die PARR-Analyse benötigte Material genomische DNA ist, kann ein Vorhandensein neoplastischer Lymphozyten mit einer winzigen Menge der Proben wie FNA-Material analysiert werden. Des Weiteren kann gleichzeitig zur

Diagnosestellung der lymphatischen Neoplasien eine Phänotypisierung (B- oder T-Zell-Phänotyp) durchgeführt werden (Rezuke *et al.*, 1997).

2.2.1. Prinzip

Die PARR-Analyse basiert auf einer molekularbiologischen Eigenschaft, die nur bei Lymphozyten spezifisch vorhanden ist (Raulet, 1989, Schatz *et al.*, 1992). Der Antigen-Rezeptor fungiert bei Lymphozyten als Erkennungsmolekül für eine Unmenge verschiedener Antigene. Das Immunglobulin im Fall der B-Lymphozyten sowie TCR im Fall der T-Lymphozyten weisen eine extrem hohe Diversität auf, um alle möglichen Antigene zu erkennen (Tonegawa, 1983). Das Immunglobulin besitzt zwei Einheiten: Die Immunglobulin-Schwer-Kette (IgH) und die Immunglobulin-Leicht-Kette (IgL). Jeweils zwei Moleküle werden zusammengesetzt, um ein Y-Form-Protein zu bilden. Das Immunglobulin hat zwei funktionelle Domänen inne, die variable Region, die Antigene erkennt, und die konstante Region, die mit der Bindung mit der Zellmembran sowie Komplementen assoziiert ist (Lipman *et al.*, 2005, Tonegawa, 1983) (Abb. 1).

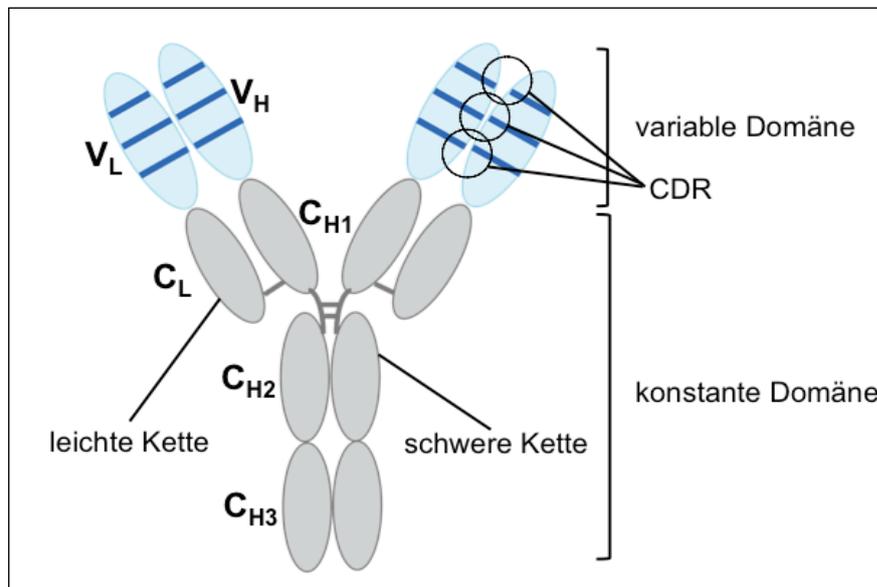


Abb. 1: Schematische Darstellung der Immunglobulin-Struktur.

CDR: Komplementaritäts-determinierende Region, C_H: konstante Domäne der schweren Ketten, C_L: konstante Domäne der leichten Ketten, V_H: variable Domäne der schweren Ketten, V_L: variable Domäne der leichten Ketten

Bei Menschen unterscheiden sich neun Immunglobulin-Klassen durch die konstanten Regionen und umfassen IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD und IgE (Kinoshita und Honjo, 2001). Der TCR hat dagegen vier unterschiedliche Ketten (α -, β -, γ -, δ -Kette) und bildet zwei Heterodimere, entweder eine $\alpha\beta$ -Kette oder $\gamma\delta$ -Kette, die ebenfalls die variable und die konstante Region besitzen (Raulet, 1989).

Um die variable Region zu bilden, werden während des Reifungsprozesses der Lymphozyten drei Gene, variable-Gen (V), diversity-Gen (D) und joining-Gen (J) im Fall von IgH, TCR β und TCR δ , und zwei Gene, V- und J-Gen im Fall von IgL, TCR α und TCR γ rekombiniert (Abb. 2).

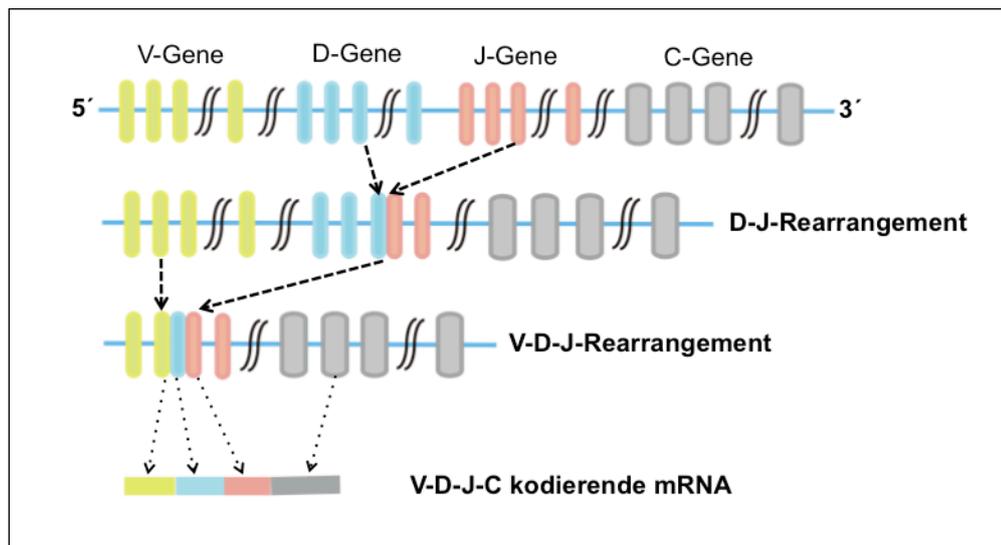


Abb. 2: Schematische Darstellung der V-D-J-Rekombination.

V-Gene: variable Gene, D-Gene: diversity-Gene, J-Gene: joining-Gene, C-Gene: constant-Gene. mRNA: messenger RNA (Ribonukleinsäure)

Außerdem werden zufälligerweise nicht-kodierende Basen ausgelöscht oder hinzugefügt, um weiter die Diversität zu erhöhen (Raulet, 1989, Schatz *et al.*, 1992). Infolgedessen besitzen alle Lymphozyten die für Individuen hoch spezifischen Basenlängen und -sequenzen in der sogenannten Komplementaritäts-determinierenden Region (CDR1-3). Dieser Region nebeneinander liegend kommt eine bei den Basensequenzen relativ konservierte, sogenannte Framework-Region vor, die sich für die Erstellung der Primer eignet. Ein Forward-Primer auf der Framework-Region des V-Gens und ein Reverse-Primer auf der sequenziell gut konservierten Region des J-Gens werden erstellt, damit ein Amplikon auf der CDR, vor allem gezielt auf die CDR3, amplifiziert werden kann (Rezuke *et al.*,

1997, Tamura *et al.*, 2006, Yagihara *et al.*, 2007). Weil bei den somatischen Zellen außer Lymphozyten keine Genrekombination stattfindet, bleibt bei ihnen das Immunglobulin- und TCR-Gen in der Keimbahn-Konfiguration, bei der das V- und J-Gen miteinander so weit entfernt sind, dass mit den obengenannten Primern keine Amplifikation erfolgt (Rezuke *et al.*, 1997).

PCR-Produkte können je nach deren Basenlänge und damit deren Abwanderungsgeschwindigkeit auf der Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mit einem UV-Illuminator visualisiert werden. Neoplastische lymphatische Zellen weisen genetisch eine monoklonale Zell-Population auf, reaktive Lymphozyten dagegen eine polyklonale Zellpopulation. Dementsprechend können neoplastische lymphatische Zellen auf der Gel-Elektrophorese als ein Band oder zwei Bänder, die auf eine Gen-Rekombination der beiden Allele hindeuten, dargestellt werden. Reaktive Lymphozyten weisen hingegen ein Abstrich-Muster (Smear) auf (Abb. 3).

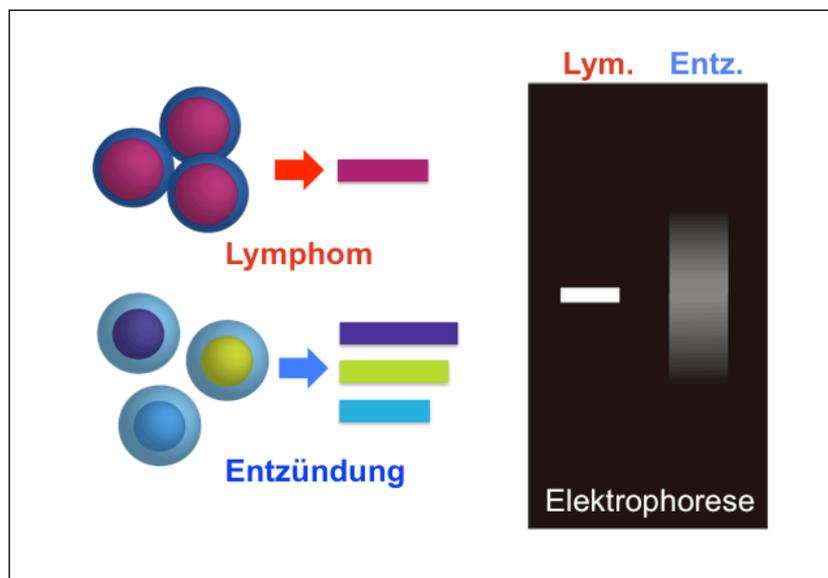


Abb. 3: Schematische Darstellung der PARR-Analyse.

Neoplastische monoklonale Lymphozyten werden auf der Gel-Elektrophorese als ein Band (oder zwei Bänder) dargestellt (Bahn links, Lym.). Reaktive polyklonale Lymphozyten weisen hingegen ein Abstrich-Muster (Smear) auf (Bahn rechts, Entz.).

Die PARR-Analyse ermöglicht somit eine relativ objektive Beurteilung (Langerak *et al.*, 2012). Neben der konventionellen Gel-Elektrophorese-basierten Methode werden in letzter Zeit auch das Gene-Scanning, das auf der

Kapillarelektrophorese beruht, und die Schmelzkurvenanalyse, die mit Real-Time-PCR kombiniert wird, eingeführt (Gentilini *et al.*, 2009, Langner *et al.*, 2014).

2.2.2. Sensitivität

Die Sensitivität der PARR-Analyse zur Detektion neoplastischer Lymphozyten wurde je nach den verwendeten Primern und den analytischen Methoden unterschiedlich dargelegt und liegt zwischen 66,7 % bis 99,7 % (Fukushima *et al.*, 2009, Gentilini *et al.*, 2009). Die Sensitivität hängt von zwei Faktoren ab: Erstens geht es um die Fähigkeit der verwendeten Primer, sich an die Ziel-Sequenzen anlagern zu können. Weil umfangreiche Sequenzdaten der rekombinierten Antigen-Rezeptor-Gene bei Hunden noch fehlen, ist es zurzeit schwierig, mit der PARR-Analyse alle rekombinierten Antigen-Rezeptor-Gene zu detektieren. Deshalb ist es unvermeidbar, dass ein falsch-negatives Ergebnis auftritt (Keller und Moore, 2012). Zweitens geht es darum, eine Monoklonalität in Anwesenheit der nicht-neoplastischen Lymphozyten detektieren zu können (Keller und Moore, 2012). Hierzu spielt der Ursprung der Gewebeproben, lymphatisch oder nicht-lymphatisch, eine große Rolle. Beispielweise konnte eine Monoklonalität detektiert werden, wenn DNA von Zellen einer lymphatischen Neoplasie in die eines nicht-lymphatischen Gewebes (Leber) im Verhältnis bis zu 1:1000 eingemischt wurde. Wenn dagegen DNA von Zellen einer lymphatischen Neoplasie in die von lymphatischem Gewebe (Milz und Thymus) eingemischt wurde, stieg der Schwellenwert auf 1:100 beziehungsweise 1:10 im Verhältnis an (Burnett *et al.*, 2003). Ferner kann die Art der für die Elektrophorese verwendeten Gele auch die PARR-Sensitivität beeinflussen. Aufgrund der besseren Auftrennungsfähigkeit weist das Polyakrylamidgel eine bessere Sensitivität als das Agarosegel auf (Gonzalez *et al.*, 1999).

2.2.3. Spezifität

Die Spezifität der PARR-Analyse liegt meist beinahe bei 100 %. Diese sollte jedoch in einigen Fällen zusammen mit dem klinischen Bild vorsichtig interpretiert werden (Avery, 2009). Diesbezüglich wurde berichtet, dass eine Infektion mit *Ehrlichia canis* mit einer oligoklonalen oder monoklonalen Proliferation der T-Zellen verbunden sein kann (Burnett *et al.*, 2003, Vernau und Moore, 1999). Ferner kann, wenn das DNA-Material nur in geringer Menge

vorhanden ist, eine unreproduzierbare Oligo-Monoklonalität, eine sogenannte Pseudoklonalität, auftreten (Elenitoba-Johnson *et al.*, 2000). Des Weiteren weist das Keimzentrum der Lymphknoten, in dem eine reaktive Proliferation der B-Zellen stattfindet, ein limitierendes Repertoire der B-Zellen auf. Mithilfe der Mikrodissektion der Keimzentren wurde mit der PARR-Analyse eine Oligo-Monoklonalität nachgewiesen (Iijima *et al.*, 2000). Schließlich wurde aufgrund der dauerhaften Stimulierung der Immunzellen bei älteren Menschen im Vergleich zu jüngeren öfter eine Oligoklonalität oder Monoklonalität der Lymphozyten nachgewiesen (Cook und Beverley, 2001). Daher wird der alleinige Einsatz der PARR-Analyse zur Diagnostik der lymphatischen Neoplasien nicht empfohlen und PARR-Ergebnisse sollen im Zusammenhang mit dem klinischen Bild, möglichst auch mit morphologischen Untersuchungen interpretiert werden.

2.2.4. Heteroduplex-Analyse

Mit dieser Analyse können PCR-Produkte auf der Gel-Elektrophorese nicht nur auf Basis der Basenlänge, sondern auch der Basensequenzen aufgetrennt werden (Cook und Beverley, 2001). Diese Methode beruht auf der Konformationsveränderung der Polynukleotide, die durch eine erneute Denaturierung und anschließende Rehybridisierung der PCR-Produkte induziert wird (Langerak *et al.*, 1997). Nach dem Abschluss der PCR bilden sich homogene PCR-Produkte, die komplementär identisch sind. Wenn das DNA-Material von genetisch heterogener Zellpopulation wie reaktiven Lymphozyten stammt, bestehen die PCR-Produkte aus in der Basenlänge und -sequenz verschiedenen Polynukleotiden, die zu diesem Zeitpunkt komplementär noch identisch sind. Durch die erneute Denaturierung und Rehybridisierung erscheinen zwei Arten von Produkten: Der Homoduplex, der komplementär komplett identisch ist, und der Heteroduplex, der komplementär unidentisch ist. Der ein DNA-Strang eines Heteroduplex ist mit dem Komplementärstrang in der Basenlänge und -sequenz nicht identisch außer den Primer-Sequenzen. In dieser sequenziell unidentischen Region entsteht eine Konformationsveränderung (Wölbung). Auf der Gel-Elektrophorese migrieren Heteroduplexe langsamer als Homoduplexe (Abb. 4). Somit kann ein polyklonales Muster wesentlich zweifelsfreier als ohne Heteroduplex-Analyse dargestellt werden (Cook und Beverley, 2001, Gonzalez *et al.*, 1999, Groenen *et al.*, 2008, Langerak *et al.*, 1997). Die wichtigere Rolle der Heteroduplex-Analyse bei PARR ist die Differenzierung eines unspezifischen

Bandes vom reproduzierbaren Band, denn ein unspezifisches Band, das durch eine zufällige Amplifikation hergestellt wird, kann durch die Bildung der Heteroduplexe verschwinden. Damit kann ein falsch-positives Ergebnis (Pseudoklonalität) ausgeschlossen werden (Takanosu *et al.*, 2010).

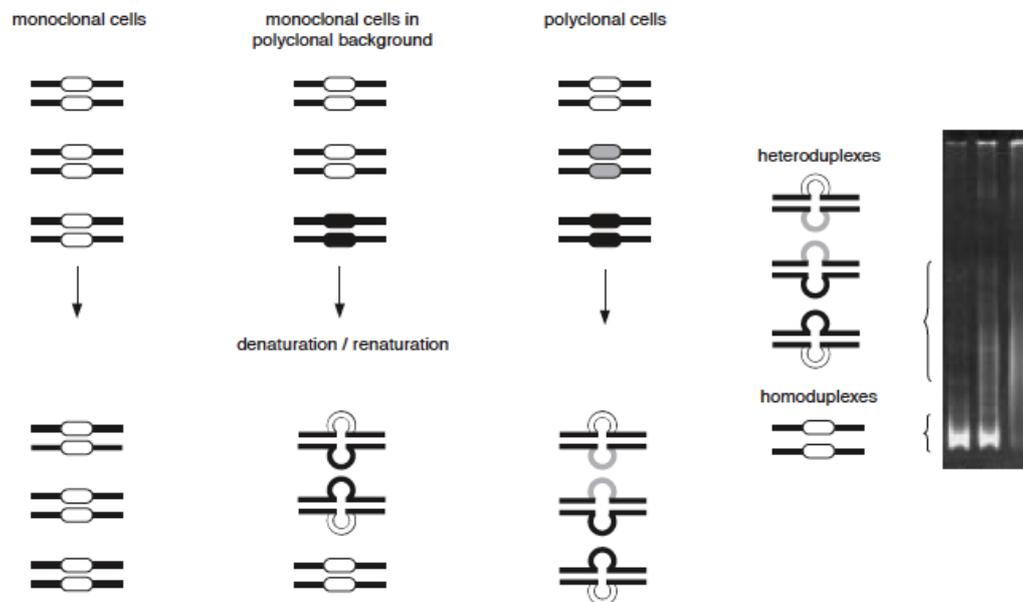


Abb. 4: Schematische Darstellung der Heteroduplex-Analyse nach Langerak *et al.*, 1997.

Vor der Denaturierung und Rehybridisierung der PCR-Produkte sind die Basensequenzen der junktionalen Region der PCR-Produkte komplementär zugeordnet (oben links). Durch die Denaturierung und Rehybridisierung wird eine Duplex-Formation induziert (unten links). Die junktionale Region von Homoduplexen ist komplementär richtig zugeordnet (monoklonale Zellen), während die von Heteroduplexen komplementär nicht richtig zugeordnet ist (monoklonale Zellen in polyklonalen Zellen sowie polyklonale Zellen). Bei Heteroduplexen entsteht eine Konformationsveränderung (Wölbung), durch die auf der Gel-Elektrophorese Heteroduplexe langsamer als Homoduplexe migrieren (rechts).

2.2.5. PARR beim kaninen gastrointestinalen Lymphom

In der Literatur können nur zwei Studien gefunden werden, in denen die Wertigkeit der PARR-Analyse zur Differenzierung der kaninen gastrointestinalen Lymphome von Gastroenteritiden erprobt wurde. Obwohl in einer Studie die Anzahl der gastrointestinalen Lymphome auf vier Fälle begrenzt war, berichtete sie von einer Sensitivität von 100 % (Kaneko *et al.*, 2009b). In der anderen Studie mit zwölf gastrointestinalen Lymphom-Fällen wurde eine Sensitivität von 66,7 %

festgestellt, die allerdings wesentlich niedriger war als die primäre Studie, in der die PARR-Analyse für 77 lymphatische Tumoren getestet wurde (Burnett *et al.*, 2003, Fukushima *et al.*, 2009). Fukushima und Kollegen vermuteten, dass die niedrigere Sensitivität der PARR-Analyse bei kaninen gastrointestinalen Lymphomen den mit neoplastischen Lymphozyten gemischten reaktiven polyklonalen Lymphozyten zugeschrieben werden kann.

3. Verteilung der intestinalen Lymphozyten

Da LPE oft mit neoplastischen Lymphozyten einhergeht, ist hier die Verteilung der intestinalen Lymphozyten im physiologischen und inflammatorischen Zustand zu erläutern.

3.1. Physiologische Verteilung

Physiologisch verteilen sich Lymphozyten im ganzen GIT, der das größte Gewebe der Immunabwehr aufweist (Stokes und Waly, 2006). Lymphozyten befinden sich üblicherweise in der Mukosa. Je nach der histologischen Region (Epithel, Lamina propria, Zotten, Krypten) weisen sie bestimmte Immunphänotypen auf. Intraepitheliale Lymphozyten sind essentiell CD3⁺-T-Zellen und der CD8⁺-überwiegt den CD4⁺-Phänotyp (Elwood *et al.*, 1997, German *et al.*, 1999a, Luckschander *et al.*, 2009, Sonea *et al.*, 2000). Ferner kommt TCRαβ⁺ mehr als TCRγδ⁺ vor (German *et al.*, 1999b, Sonea *et al.*, 2000). Es gibt auch eine kleine Population der CD4⁻CD8⁻-T-Zellen, die wahrscheinlich TCRγδ⁺ besitzen (German *et al.*, 1999b, Luckschander *et al.*, 2009, Sonea *et al.*, 2000). In der Lamina propria kommen dagegen mehr CD4⁺- als CD8⁺-positive Lymphozyten vor (Elwood *et al.*, 1997, German *et al.*, 1999a, Sonea *et al.*, 2000). TCRαβ⁺ kann im Epithel und in der Lamina propria nachgewiesen werden, TCRγδ⁺ ist hingegen überwiegend im Epithel lokalisiert (German *et al.*, 1999b). B-Zellen und Plasmazellen befinden sich wesentlich in der Lamina propria und tendenziell sammeln sie sich vermehrt in der Krypten-Region als in der Zotten-Region an, während sich T-Zellen vermehrt in der Zotten-Region als in der Krypten-Region befinden (Elwood *et al.*, 1997, German *et al.*, 1999a).

3.2. Verteilung bei IBD

In einer Zell-Quantifizierungs-Studie, in der die Anzahl der Immunzellen und deren Subpopulation histopathologisch ausgewertet und mit einer gesunden

Kontroll-Gruppe verglichen wurde, konnte gezeigt werden, dass sich Lymphozyten bei IBD entsprechend der physiologischen Verteilung vermehren. In der Lamina propria vermehren sich IgG⁺-Plasmazellen, CD4⁺-Zellen und TCRαβ⁺-Zellen. Die Anzahl der CD8⁺- und TCRγδ⁺-Zellen schien jedoch nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Im Epithel war die Anzahl der CD3⁺-T-Zellen signifikant höher als bei der Kontroll-Gruppe, aber paradoxerweise konnte keine erhöhte Anzahl der T-Zell-Subpopulation (CD4⁺, CD8⁺, TCRαβ⁺, TCRγδ⁺) identifiziert werden, was an den Schwierigkeiten bei der Quantifizierung der Zellen auf dem Gefrierschnitt lag (German *et al.*, 2001). Ebenfalls wurde bei der lymphoplasmazellulären Kolitis eine signifikant erhöhte Anzahl der Lymphozyten (CD3, CD79a) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe bestätigt (Stonehewer *et al.*, 1998).

4. Komparativer Aspekt

4.1. Humanes gastrointestinales Lymphom

Das humane gastrointestinale Lymphom macht 30-40 % aller extranodalen Lymphom-Fälle aus (Freeman *et al.*, 1972, Otter *et al.*, 1989). In der Literatur wird beschrieben, dass der Magen die am häufigsten befallene Lokalisation mit 50-80 % der Fälle gefolgt vom Dünndarm und Dickdarm ist (Koch *et al.*, 2001). Beim humanen gastrointestinalen Lymphom überwiegt das B-Zell-Lymphom gegenüber dem T-Zell-Lymphom. Bei gastrischen Lymphomen tritt der T-Zell-Phänotyp sehr selten auf, während bei Dünndarm-Lymphomen der T-Zell-Phänotyp mit 25 % der Fälle öfter gesehen wird (Koch *et al.*, 2001, Koch *et al.*, 2005).

4.1.1. B-Zell-Lymphom

4.1.1.1. Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom ist mit ca. 55 % aller gastrointestinalen Lymphom-Fälle der häufigste Subtyp (Koch *et al.*, 2001). Histopathologisch wird es durch diffus verteilte großzellige Zellen mit vesikulärem Chromatin und prominenten Nukleoli gekennzeichnet. Grundsätzlich kann das DLBCL histopathologisch und immunhistologisch leicht identifiziert werden (Burke, 2011).

4.1.1.2. Marginalzonenlymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom)

Das Marginalzonenlymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes, zusammen mit dem DLBCL, ist einer der häufigsten Subtypen und macht ca. 40 % der gastrointestinalen Lymphom-Fälle aus (Koch *et al.*, 2001). Die Entstehung des gastrischen MALT-Lymphoms ist ätiologisch mit der Infektion von *Helicobacter pylori* eng assoziiert (Wotherspoon *et al.*, 1993). Histopathologisch zeigen sich Infiltrate der neoplastischen Zellen mit Zentrozyten-ähnlicher Morphologie um Follikel in der Marginalzone herum. Ein Merkmal des MALT-Lymphoms ist die epitheliale Invasion in die Krypten, sogenannte lymphoepitheliale Läsion (Isaacson und Spencer, 1987). Die neoplastischen Lymphozyten besitzen typischerweise CD20⁺ und zeigen eine aberrante Expressierung von CD43 (Isaacson und Du, 2005).

4.1.1.3. Follikuläres Lymphom

Das gastrointestinale follikuläre Lymphom wird meist als Einbeziehung der nodalen Erkrankung gesehen. Das primäre gastrointestinale follikuläre Lymphom macht ohnehin 1-3,6 % der gastrointestinalen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) aus (Hawkes *et al.*, 2012). Das Duodenum und Ileum sind öfter befallen (Yamamoto *et al.*, 2010). Das follikuläre Lymphom stammt entweder aus Zentrozyten oder aus Zentroblasten im Keimzentrum. Je größer der Anteil der Zentroblasten ist, desto höher wird das Risiko für die Entwicklung zum DLBCL. Das gastrointestinale follikuläre Lymphom weist charakteristische multiple kleine Polypen, sogenannte lymphomatöse Polyposis, auf (Moynihan *et al.*, 1996). Immunphänotypisch besitzen neoplastische Lymphozyten CD20⁺, CD10⁺ und bcl-2⁺ (Damaj *et al.*, 2003).

4.1.1.4. Mantelzell-Lymphom

Das primäre gastrointestinale Mantelzell-Lymphom kommt selten vor, 4-9 % unter primären gastrointestinalen B-Zell-Lymphomen (Hawkes *et al.*, 2012, Romaguera *et al.*, 2003). Dieser Subtyp zeigt eine der schlechtesten Prognosen unter den B-Zell-NHL mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 27 %. Morphologisch gibt es vier Varianten: kleinzellig, Marginalzone-ähnlich, blastoid und pleomorph (Oinonen *et al.*, 1998). Immunphänotypisch sind CD20⁺, CD5⁺ und eine Überexpressierung von Zyklin-D1 bekannt (Burke, 2011).

4.1.2. T-Zell-Lymphom

4.1.2.1. Enteroopathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom (EATL)

Das EATL macht 1 % aller NHL und 10-25 % der primären Lymphome im Dünndarm aus (Hawkes *et al.*, 2012). Das Jejunum und das Ileum sind die am meisten betroffenen Lokalisationen. Eine isolierte Läsion im Magen oder Dickdarm ist jedoch möglich (Arps und Smith, 2013, Delabie *et al.*, 2011). Typischerweise verbreiten sich Läsionen multifokal im Dünndarm, in seltenen Fällen kann auch eine Tumor-Masse vorkommen. Metastasenbildungen in mesenterialen Lymphknoten, Leber, Milz, Lunge und Haut sind nicht selten, eine Knochenmarksbeteiligung zum Zeitpunkt der Diagnose ist aber unüblich (Arps und Smith, 2013, Isaacson und Du, 2005).

Das EATL wird aufgrund der Ätiologie und der Immunphänotypen in Typ I und Typ II unterteilt. Während der Typ I die Mehrheit des EATL ausmacht und pathogenetisch mit refraktärer Zöliakie (refractory Celiac disease, RCD), der Gluten-sensitiven Enteropathie, stark assoziiert ist, kommt der Typ II sporadisch vor und dessen Ätiologie ist zurzeit nicht bekannt (Arps und Smith, 2013, Hawkes *et al.*, 2012). Klinisch manifestieren sich Bauchschmerzen, Durchfall und Gewichtsverlust. Außerdem werden Ulzeration, Obstruktion und Perforation des GIT nicht selten beobachtet (Arps und Smith, 2013). Unabhängig von den Typen ist die Prognose des EATL trotz Einsatz einer multimodalen Therapie sehr schlecht mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 8-20 % (Hawkes *et al.*, 2012).

Histopathologisch werden die beiden Typen durch intraepitheliale Lymphozytose, eine vermehrte Anzahl der Plasmazellen in der Lamina propria und die Zotten-Atrophie mit der Kryptenhyperplasie gekennzeichnet (Arps und Smith, 2013, Isaacson und Du, 2005). Das EATL stammt aus intraepithelialen neoplastischen Lymphozyten und zeigt damit einen ausgeprägten Epitheliotropismus (Arps und Smith, 2013, Hawkes *et al.*, 2012, Isaacson und Du, 2005). Morphologisch und immunphänotypisch unterscheiden sich die zwei Typen deutlich. Die neoplastischen Lymphozyten vom Typ I sind pleomorph von mittel-großen Zellen mit runden oder gewinkelten vesikulären Nuklei und prominenten Nukleoli. Das helle Zytoplasma ist mäßig bis reichlich. Mit den neoplastischen Zellen sind gemischte Entzündungszellen ausgeprägt vergesellschaftet (Arps und Smith, 2013). Hierzu wurde auch als Sonderform eine eosinophile Entzündung

beschrieben (Isaacson und Du, 2005). Immunphänotypisch sind $CD3^+$, $CD4^-$, $CD8^{+/-}$, $CD56^-$, $TCR\beta^{+/-}$ und zytotoxische Phänotypen wie Perforin und Granzym positiv. Interessanterweise wird die Expressierung von CD8 und TCR β tendenziell reduziert, wenn RCD zum EATL fortschreitet (Arps und Smith, 2013, Hawkes *et al.*, 2012).

Der Typ II weist eher monotone, kleine bis mittelgroße Zellen mit runden bis geringgradig unregelmäßigen Nuklei auf. Das helle Zytoplasma ist gering. Im Gegensatz zum Typ I sind beim Typ II inflammatorische Infiltrate nicht ausgeprägt. Die neoplastischen Lymphozyten besitzen $CD3^+$, $CD4^-$, $CD8^+$, $CD56^+$, $TCR\beta^+$ oder $TCR\gamma\delta^+$. Im Gegensatz zum Typ I bleibt beim Typ II die Expressierung von CD8 und TCR β erhalten (Hawkes *et al.*, 2012).

4.1.2.2. Extranodales Natürliche-Killer (NK)-Zell-/T-Zell-Lymphom (ENKTL)

Das ENKTL kann in einen nasalen und einen nicht-nasalen Typ unterteilt werden. Das nasale ENKTL macht die Mehrheit mit 80 % der Fälle aus. Befallen sind meist die Nasenhöhle und der Nasopharynx. Der GIT kann beim nicht-nasalen ENKTL betroffen sein. Die Organbeteiligung des nicht-nasalen ENKTL ist vielfältig und umfasst die Haut, Speicheldrüsen, Milz und Hoden. Ätiologisch wird eine Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV) vermutet. Obwohl meist NK-Zell-Lymphome vorkommen, können auch T-Zell-Lymphome des zytotoxischen Typs auftreten. Histopathologisch sind eine Nekrose und Ulzeration der Mukosa prominent. Die Tumorzellen sind mittelgroß oder eine Mischung aus kleinen und großen Zellen mit unregelmäßigen Nuklei. Typischerweise besitzen die neoplastischen Zellen $CD2^+$, $CD56^+$, oberflächliches $CD3^-$, jedoch zytoplasmatisches $CD3^+$. Die Prognose ist sehr schlecht mit einer medianen Überlebenszeit von zehn Monaten (Hawkes *et al.*, 2012).

III. PUBLIKATION

04-Apr-2015

Dear Mr. Ohmura,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs" 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

Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs

S. Ohmura¹, M. Leipzig², I. Schöpfer¹, F. Hergt¹, K. Weber¹, B. C. Rütgen³, H. Tsujimoto⁴, W. Hermanns² and J. Hirschberger¹

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

²Institute of Veterinary Pathology, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

³Department of Pathobiology, Clinical Pathology Platform, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

⁴Department of Veterinary, Internal Medicine, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Abstract

The diagnosis of canine intestinal lymphoma by morphological examination is challenging, especially when endoscopic tissue specimens are used. The utility of detection of antigen receptor gene rearrangement by polymerase chain reaction (PARR) in canine lymphoma has been well established, but its usefulness to distinguish enteritis and intestinal lymphoma remains unclear. In this retrospective study we assessed clonality of 29 primary canine intestinal lymphoma, 14 enteritis and 15 healthy control cases by PARR analysis, using formalin-fixed, paraffin-embedded full-thickness tissue specimens. We could detect monoclonal rearrangements in 22 of 29 canine intestinal lymphomas [76%; 95% confidence interval (CI) 56–90%] and polyclonal rearrangements in all of the enteritis and healthy control cases (100%; CI 88–100%). We revealed a predominance of T-cell phenotype compared to B-cell phenotype (85%; CI 65–96% and 15%; CI 4–35%, respectively). We showed that PARR analysis contributes to differentiation of canine intestinal lymphoma from enteritis and to phenotyping of lymphomas.

Keywords

alimentary lymphoma, clonality, dogs, enteropathy, FFPE tissue, immunophenotyping

Introduction

Canine intestinal lymphoma is the primary lymphoid neoplasia occurring in the intestinal tract: the small intestine and colon in descending order of frequency.^{1,2} After the multicentric form intestinal lymphoma is, together with gastric lymphoma, the second commonest. Canine gastrointestinal lymphoma has been reported to account for about 5–7% of all canine lymphoma cases.² In canine gastrointestinal lymphoma, male dogs seem to be predisposed and a wide range of ages is affected.^{1–5}

The prognosis of canine intestinal lymphoma is very poor compared to the multicentric form despite of treatment with multi-agent chemotherapy and/or surgery, with median survival times of 13–77 days.^{3,4} In human patients, among gastrointestinal lymphomas, gastric lymphoma is most commonly seen.⁶ Histopathologically diffuse large B-cell lymphoma and marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) account for almost all cases in primary gastric lymphoma.⁷ Pathogenetically the occurrence

Correspondence address:

S. Ohmura
Clinic of Small Animal
Medicine
Center for Clinical
Veterinary Medicine
Ludwig Maximilian
University
Veterinärstraße 13
80539 Munich
Germany
e-mail:
s.ohmura@medizinische-
kleintierklinik.de

of gastric MALT has a strong association with *Helicobacter pylori* infection.⁸ In this context, it has been assumed that canine gastrointestinal lymphoma might also be primarily of B-cell origin, recent reports yet imply mostly T-cell origin, although there exist only few reports that characterize canine gastrointestinal lymphoma with a relatively high number of cases.^{1,3,4} Primary intestinal T-cell lymphoma in human patients is very rare,⁹ mostly known as enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL), of which occurrence can be attributed to refractory celiac disease (RCD).^{10,11} In canine intestinal lymphoma such etiological factors have not been identified at present. Its association with inflammatory bowel disease (IBD) is only speculative.²

The diagnosis of canine intestinal lymphoma is currently performed by cytological or histopathological examination and may be hampered mainly because of concomitant inflammatory conditions, especially lymphoplasmacellular enteritis, which is often seen in nearby lymphomatous lesions.² For the definitive diagnosis it is necessary to take full-thickness biopsies in order to histopathologically assess detailed cell morphology and invasiveness of lymphoma cells into the deeper layers. For its practical use and lower invasiveness of the procedure, however, tissue samples are often taken endoscopically, which may mislead histopathological interpretation, because the samples are very small, limited to the mucosal layer and often not completely preserved in tissue structure, all of which may lead to an inconclusive diagnosis.^{12,13}

Although PARR analysis has been often used in studies of canine lymphoma and lymphocytic leukaemia as a diagnostic tool,^{14–16} for staging and prognostic information,^{17,18} to detect minimal residual disease^{19–22} and also to assess early stages of cutaneous T-cell lymphoma,^{23,24} there only sparsely exist studies focusing on canine intestinal lymphoma. In one study 12 cases with alimentary lymphoma were analyzed by PARR using endoscopically obtained tissue samples and the authors reported a sensitivity of 66.7%,²⁵ which was much lower than previously reported.¹⁴ There may be some intrinsic difficulties to assess the utility of PARR analysis in canine intestinal lymphoma with

endoscopic tissue specimens. The portion of tissue samples used in histopathology may be different from that in PARR analysis, because endoscopic tissue samples are often not sufficient to examine the same portion for the both. Furthermore, reactive lymphocytes concomitantly seen with neoplastic lymphocytes make histopathological interpretation with endoscopic tissue specimens difficult. The concomitant existence of a reactive lymphocyte population that is inevitably included in tissue samples obtained by endoscopy may also be one of the major reasons for the lower sensitivity of PARR analysis in canine intestinal lymphoma.

Therefore we hypothesized that the usage of full-thickness tissue samples may enable more exact assessment of the usefulness of PARR analysis in canine intestinal lymphoma, because tissue samples with histopathological definitive diagnoses can be used. In addition, for PARR the same portion of tissue samples as that examined by histopathology can be analyzed. Furthermore, for PARR analysis representative DNA samples can be obtained, extracting DNA from lymphoma cell-rich fields on tissue specimens.

Our objectives of this study were to assess whether PARR analysis can differentiate canine intestinal lymphoma and enteritis, using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) full-thickness tissue specimens and to characterize phenotypes of canine intestinal lymphoma by means of immunohistochemistry (IHC) and PARR analysis.

Materials and methods

Sample collection

From the electronic database of the Institute of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Munich, of the years 1995 to 2013, primary intestinal lymphoma cases were searched by using key words 'intestinal lymphoma' and 'dog' to gather 32 cases. Three cases were later excluded, because of advanced DNA degradation (see also below). Diagnosis had been performed by histopathological examination, which was reevaluated and confirmed before PARR analysis. Any cases that were considered as intestinal involvement accompanied by multicentric lymphoma

were excluded. Enteritis cases were searched using 'enteritis' and 'dog' as keywords and 15 cases were included. For healthy control cases, 15 cases registered as 'no abnormalities in the intestine' were included. Using full-thickness tissue specimens from the small intestine, 15 cases diagnosed with enteritis and 15 cases without any histopathological abnormalities in intestinal tract were reevaluated and confirmed that no equivocal cases were included. These cases served as enteritis group and healthy control group, respectively. In the initial DNA integrity analysis however we could detect no polymerase chain reaction (PCR) products in three lymphoma cases and one enteritis case. Therefore 29 intestinal lymphoma, 14 enteritis and 15 healthy control cases were further analyzed using PARR.

Histopathology

Tissue specimens had been routinely fixed in 10% neutral buffered formaldehyde at room temperature for 24–48 h and embedded in paraffin. Tissue sections were cut (4 µm) and stained with haematoxylin-eosin (HE) and Giemsa. Histopathological examination included evaluation of tissue architecture, cellular morphology, nuclear size, mitotic rate and the presence of other cell populations. According to previous reports,²⁶ lymphomas were graded depending on the number of mitoses (low grade: 0–5 mitoses/high power field; medium grade: 6–10 mitoses/high power field; and high grade: more than 10 mitoses/high power field). The size of nuclei was classified as small, moderate and large proportional to the size of erythrocytes as described previously.²⁶ After immunophenotyping, lymphomas (including the cases with suspected T- and B-cell type) were classified according to the World Health Organization (WHO) classification.²⁷

Immunohistochemistry (IHC)

Immunophenotyping was performed according to routine avidin-biotin-peroxidase procedure using CD3 for T-cell phenotype and CD20 and CD79a for B-cell phenotype. After deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidase

activity was quenched using 0.3% hydrogen peroxide for 10 min. Antigen retrieval was achieved by microwave heating (700 W, in Tris/EDTA pH 9.0, twice for 10 min each) for CD79a and CD3. Nonspecific immunoglobulin binding was blocked with normal goat serum for 30 min. Sections were incubated with primary antibodies (Table 1) for 60 min at room temperature. After washing in Tris-buffered saline (TBS), a biotinylated secondary antibody (Table 1) was applied for 60 min at room temperature. After an additional washing step in TBS, avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain[®] ABC Kit; Vector Laboratories) was used for detection. Subsequently, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) served as chromogen, H₂O₂ as substrate and Mayer's haematoxylin as counter staining. Positive controls were canine lymph node tissue.

DNA extraction from FFPE tissue samples

In order to increase genomic DNA yield of lymphoma cells, tissue specimens stained with Giemsa were microscopically examined to determine one field that showed a higher number of lymphoma cells. The corresponding part of the field on the formalin-fixed tissue blocks was carefully excised with 4 mm punch-biopsy and collected into a 1.5 µL-Eppendorf tube. To avoid any contamination of samples, the biopsy punch was vigorously cleaned with 70% ethanol after each sample. Fixed tissue specimens were cut into small pieces and digested with 40 µL of proteinase K at 56 °C overnight. DNA extraction was performed using the QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommendation. After extraction, DNA samples were stored at –20 °C until use.

Polymerase chain reaction

The primer sets used in this study were previously reported by Chaubert *et al.* for T-lymphocytes primers detecting the complementarity determining region 3 (CDR3) of the T-cell receptor gamma gene (TCRG).²⁴ For B-lymphocytes, primers detecting the CDR3 of the immunoglobulin heavy chain gene (IGH) and the constant region of IGH

Table 1. Antibodies used for immunophenotyping of canine intestinal lymphomas (avidin-biotin complex method)

Phenotype	Primary antibody	Secondary antibody
T	CD3 (polyclonal rabbit anti-human CD3; Dako, Glostrup, Denmark), 1:100	Biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 1:200
B	CD79a (monoclonal mouse anti-human CD79a; Linaris, Dossenheim, Germany), 1:200	Biotinylated goat anti-mouse IgG (Dako), 1:100
	CD20 (polyclonal rabbit anti-human CD20; Thermo Scientific, Fremont, CA, USA), 1:400	Biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories), 1:200

(Cmu) were used.¹⁴ The primer sequences are summarized in Table 2. For assessment of TCRG clonality, PCR mixture containing 6 µL ultra pure water, 6 µL 5× Q-solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 0.5 µL of the forward and reverse primer at 25 pmol/µL, 15 µL HotStarTaq Master Mix (Qiagen GmbH) and 1 µL template DNA was subjected to initial hot start step at 95 °C for 5 min, 35 cycles of denaturing step at 94 °C for 30 s, annealing step at 55 °C for 45 s and synthesis step at 72 °C for 45 s and final elongation step at 72 °C for 5 min. The predicted size of PCR products ranges between 60 and 90 bp.²⁴ For detection of Cmu and IGH, PCR mixture containing 23 µL ultra pure water, 0.5 µL of the forward and reverse primer at 25 pmol/µL, 25 µL HotStarTaq Master Mix (Qiagen GmbH) and 0.8 µL template DNA was subjected to initial hot start step at 95 °C for 5 min, 30–35 cycles of denaturing step at 94 °C for 30 s, annealing step at 58 °C for 30 s (for Cmu primers), at 62 °C for 30 s (for IGH primers) and synthesis step at 72 °C for 60 s and final elongation step at 72 °C for 10 min. The predicted sizes of PCR products are 120 bp for IGH primers and 130 bp for Cmu primers.¹⁴ To find an adequate template DNA concentration, serial dilutions of DNA samples (undiluted, 1:10, 1:100) were made and amplified with Cmu primers. On the basis of sharpness of bands, adequate dilution levels were determined and applied to TCRG and IGH amplification. Amplification was performed using a Master Cycler egradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). As positive controls, DNA extracted from a T-cell line (CL-1)²⁸ and a B-cell line (CLBL-1),²⁹ and as a negative control, no template DNA were always included in this analysis.

PCR products were divided into two aliquots for heteroduplex analysis to exclude

the possibility of an unspecific monoclonal formation (pseudoclonality).³⁰ For this analysis, PCR products were denatured at 95 °C for 10 min and reannealed at 4 °C for 1 h.

Agarose gel electrophoresis

PCR products amplified with Cmu primers were initially analyzed on 2% agarose gels (TopVision Agarose, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) mixed with GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, CA, USA) in Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer to verify DNA integrity. Samples showing one clear band were included for further analyses. In this DNA integrity analysis there were three lymphoma cases and one enteritis case that showed no PCR products. PCR products yielded with IGH primers were also initially separated on 2% agarose gels. Samples that showed any band regardless of size were further analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

PCR products were mixed with loading dye (Novex® Hi-Density TBE Sample Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and vertically separated on 10% polyacrylamide gels (Invitrogen). The running time was set at 1 h at 200 V. The gels were then stained for 20 min with GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, CA, USA) and visualized with a UV illuminator (UniEquip GmbH, Planegg, Germany).

Interpretation of clonality

Interpretation of clonality was performed based on following definitions: monoclonal, one or

Table 2. Primers used to amplify rearranged T-cell receptor gamma (TCRG) and immunoglobulin heavy chain gene (IGH) and to verify DNA integrity for immunoglobulin heavy constant mu gene (Cmu)

Target gene	Primer names	Region	Primer sequence (5'–3')	References
TCRG	dTCR γ -Va	V	GGC GTG TAC TAC TGC GCT GCC	24
	dTCR γ -Jb	J	TGT GCC AGG ACC AAG CAC TTT	
IGH	CB1	V	CAG CCT GAG AGC CGA GGA CAC	14
	CB2	J	TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	
Cmu	Sigmf1	Cmu	TTC CCC CTC ATC ACC TGT GA	14
	Sr μ 3	Cmu	GGT TGT TGA TTG CAC TGA GG	

two discrete bands within the predicted base size; oligoclonal, more than two discrete bands; polyclonal, smear with or without minor bands; negative, no bands.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using a free software R (obtained from the R Project for Statistical Computing). Confidence intervals were calculated based on the binomial test. The Fisher's exact test was applied to analyze a difference between detection of monoclonality and lymphoma grades. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Patient characteristics and tumour localization

In the intestinal lymphoma group of 29 cases, there were 18 pure and 8 mixed breeds. The breeds seen more than one individual were Golden Retriever ($n=3$) and Bernese Mountain Dog ($n=2$), and other breeds were represented by one individual. In one case, the breed was unknown. Seventeen dogs were male (16 intact, 1 castrated), 11 dogs were female (nine intact, two spayed) and in one case no information about the sex was available. The mean age of 28 dogs was 8.1 years ($SD \pm 2.8$) and the median age was 8 years (range: 2–13 years). The age of one case was unknown.

The most commonly affected anatomical location was the small intestine (20/29), of which eight cases were from the jejunum and two cases were from the duodenum. In other 10 cases the more precise anatomical location than the small intestine was not available. Other affected anatomical

locations were the colon in two cases and the colon and rectum in one case. The anatomical sites of the remaining six cases were recorded as the intestine and further anatomical differentiation was not assessable.

Macroscopic evaluation was available in 28 cases. In these animals, the intestinal wall was diffuse to nodular thickened with variable narrowing of the intestinal lumen and mostly with ulceration of the mucosa. The cut surface was greasy or rubbery-like, homogenous and white to grey in colour.

The healthy control group included various breeds (German Shepherd, Golden Retriever, Miniature Poodle, Yorkshire Terrier, Berger Blanc Suisse, Entlebucher Mountain Dog, Cocker Spaniel, Norwich Terrier, Austrian Brandlbracke, Berger Picard, Pug Dog one each respectively; and two Dachshunds), one mixed breed dog and one dog of unknown breed. Five animals were male (all intact), 10 dogs were female (six intact, four spayed). The mean age of the 15 dogs was 5.5 years ($SD \pm 4.5$) and the median age was 6 years (range: 1.5 months–13 years). The enteritis group consisted of five mixed breed dogs, two Labrador Retrievers and breeds with one affected dog each included Shih Tzu, Weimaraner, Yorkshire Terrier, German Shepherd, Akita Inu, Norfolk Terrier and French bulldog. Nine animals were male (seven intact, two castrated), five dogs were female (two intact, three spayed). The mean age of this group was 2.9 years ($SD \pm 2.7$) and the median age was 2.5 years (range: 4 days–9.5 years). The following diagnoses were confirmed in the enteritis group: chronic predominant lymphoplasmacellular enteritis in five dogs, necrotizing enteritis in six dogs and eosinophilic, granulomatous and neutrophilic enteritis in one dog each.

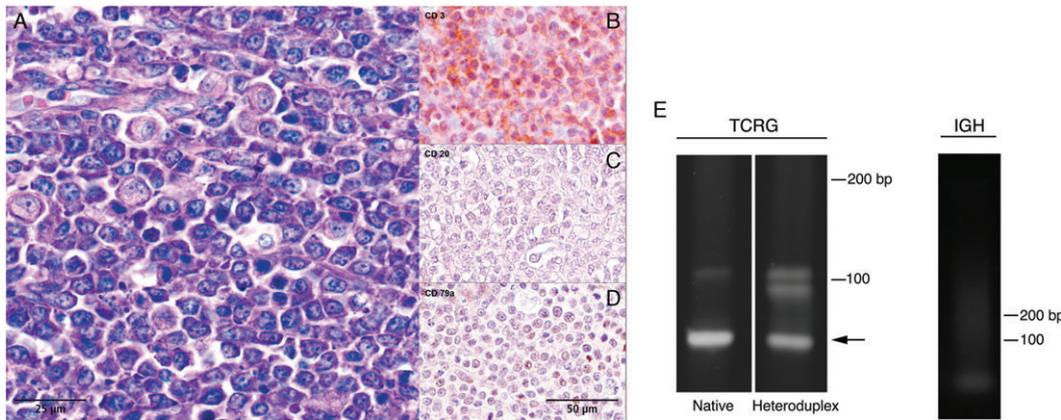


Figure 1. Histopathology, immunohistochemistry and detection of antigen receptor gene rearrangements. Jejunum, T-cell lymphoma. (A) Diffuse infiltration with neoplastic round cells, Giemsa staining, bar: 25 µm. Neoplastic cells were positive for CD3 (B), and negative for CD20 and CD79a (C and D, respectively), counterstained with haematoxylin, bar: 50 µm. (E) Detection of rearrangement for TCRG (left, PAGE) and IGH (right, agarose gel). PARR for TCRG shows monoclonality in both the native and heteroduplex samples (indicated by an arrow), whereas for IGH no band is visible. Molecular weight indicates 100 and 200 bp.

Histopathological findings and immunophenotyping by IHC

Lymphoma diagnosis was based on histopathological detection of a neoplastic lymphocytic infiltration. In 28 cases neoplastic infiltration was present in the lamina propria, the lamina submucosa and the muscularis mucosae. In one case deeper parts of the intestinal wall than the lamina propria were not present in the examined tissue sample for evaluation.

In 26 cases a diffuse and in 3 cases a nodular infiltration of the intestinal wall was present. In 13 cases a fibrous stroma of the tumour was obvious.

Morphologically, the tumour cells and their nuclei varied in size and shape from small, round and monomorphic to large and pleomorphic. Intestinal lymphomas were classified as small cell type in four, intermediate size cell type in nine and large cell type in 16 cases. Mitotic rate was low in 5, moderate in 8 and high in 16 tumours.

In seven cases the neoplastic infiltration presented an epitheliotropic behaviour. No evidence of epitheliotropism was found in 13 cases. In nine animals, all examined parts of the intestinal tract were completely replaced by neoplastic cells and/or deeply ulcerated. In these cases evaluation of the epithelium was not possible.

IHC was assumed to be positive when the predominant part of neoplastic round cells reacted

with anti-CD3 antibody for T-cell lymphoma and with anti-CD79a and/or anti-CD20 antibody for B-cell lymphoma (Fig. 1). Ambiguous or suspected results were the consequence of heterogeneous immunostaining. Immunophenotyping revealed clearly a T-cell origin in 16 cases and a B-cell origin in four cases. Caused by a patchy immunopositivity, a B-cell lymphoma was suspected in two cases and a T-cell lymphoma was suspected in six cases. In one case, the results of the immunohistochemical examination were ambiguous. All cases with epitheliotropism showed a T-cell phenotype or suspected T-cell phenotype.

Lymphoma classification

Out of the B-cell lymphomas, three were classified as diffuse large B-cell lymphoma (according to the Kiel classification two immunoblastic and one centroblastic), one as B-cell lymphoblastic lymphoma and one as B-cell lymphocytic lymphoma. Eighteen T-cell lymphomas were classified as peripheral T-cell lymphoma and six as T-cell lymphoblastic lymphoma.

PARR analysis

In the DNA integrity analysis there were three lymphoma cases and one enteritis case that showed no PCR products. The PCR products of the other

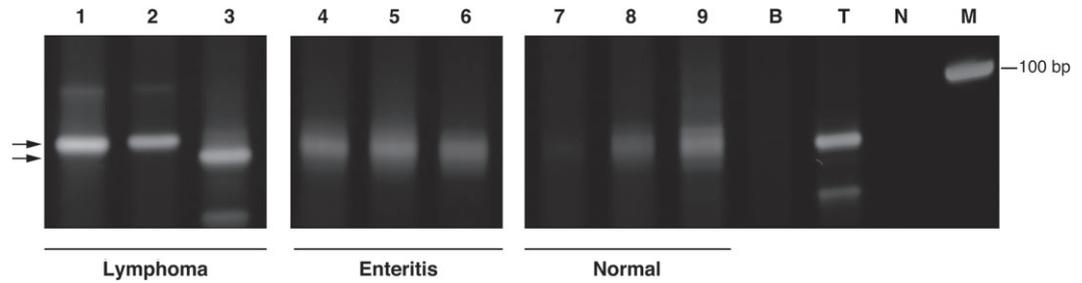


Figure 2. Detection of TCRG rearrangements on PAGE in lymphoma (lanes: 1–3), enteritis (lanes: 4–6) and normal cases (lanes: 7–9). Monoclonal bands are indicated by arrows in lymphoma cases. Lanes 1–3, monoclonal; lanes 4–9, polyclonal; lane B, B-cell line, negative; lane T, T-cell line, monoclonal; lane N, no template DNA; lane M, 100 bp ladder.

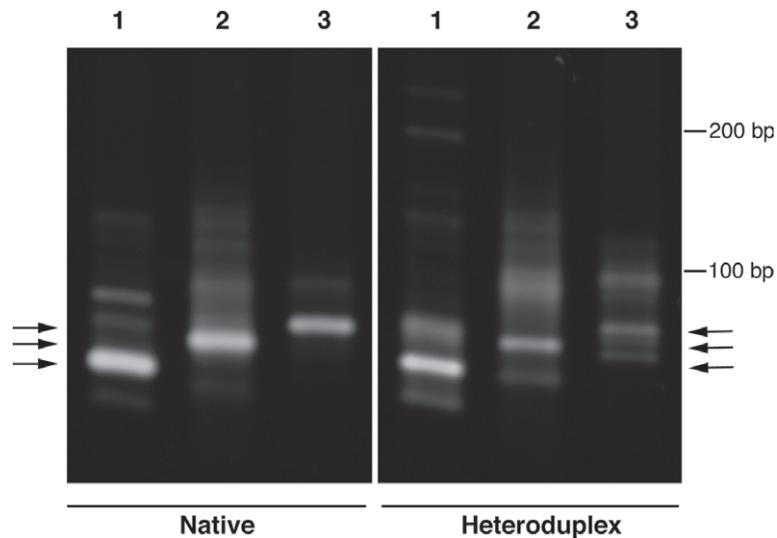


Figure 3. Heteroduplex analysis of TCRG PCR products on PAGE in three lymphoma cases. Three lanes on the left represent native PCR products and on the right denatured and reannealed PCR products (heteroduplex). Monoclonal bands are indicated by arrows. Note that after heteroduplex formation, monoclonal bands are still apparent. Molecular weight indicates 100 and 200 bp.

58 cases amplified with Cmu primers showed one clear band and all the samples were further analyzed with TCRG and IGH primers. Figure 1 shows results of IHC and PARR analysis in a canine intestinal T-cell lymphoma. In this case, a monoclonal band was detected with TCRG primers for both the native and heteroduplex samples, whereas no discrete band was obvious with IGH primers. Together with the result of IHC, a T-cell lymphoma was confirmed. Figure 2 shows the representative results of clonality assessment of TCRG in canine intestinal lymphoma, enteritis and healthy control group. In three intestinal lymphoma cases (lanes: 1–3) one clearly discrete band could be detected, indicating a monoclonal rearrangement of TCRG. In the

enteritis and healthy control group, smear patterns were consistently visible, indicating existence of a polyclonal lymphocyte population. Of 29 cases with intestinal lymphoma, 22 cases showed monoclonal rearrangements (76%; 95% CI 56–90%), with 20 cases showing monoclonality of TCRG and 1 case of IGH. One case showed monoclonality in both TCRG and IGH. We confirmed that all the monoclonal bands remained apparent after heteroduplex analysis (Fig. 3). Seven intestinal lymphoma cases showed no monoclonal rearrangement even with both TCRG and IGH primers. In the enteritis and healthy control group (100%; 95% CI 88–100%) no monoclonal rearrangement was detectable with TCRG and IGH primers. In respect of a correlation

between clonality and lymphoma grading, monoclonality was detectable in 81% (13/16; 95% CI 54–96%) of high grade, 63% (5/8; 95% CI 24–91%) of medium grade and 80% (4/5; 95% CI 28–99%) of low grade lymphomas. There was no significant difference between high grade lymphomas and low-medium grade lymphomas in detecting monoclonality ($p = 0.67$).

Correlation of phenotypes between PARR analysis and IHC

Comparing the phenotypes demonstrated by PARR analysis and IHC, 19 canine intestinal lymphoma cases were phenotypically concordant, including 18 cases of T-cell and 1 case of B-cell phenotype. Four cases of immunohistochemically suspected T-cell phenotype were confirmed by PARR analysis to be clearly of T-cell origin. One case that was immunohistochemically B-cell phenotype showed both TCRG and IGH rearrangements. One suspected B-cell phenotype by IHC clearly showed monoclonality of TCRG and one immunohistochemically ambiguous case was also monoclonal in TCRG by PARR analysis. Combining the results of PARR analysis and IHC including only phenotypically conclusive cases, 85% (22/26; 95% CI 65–90%) were of T-cell phenotype and 15% (4/26; 95% CI 4–35%) of B-cell phenotype. Despite of the usage of both methods, the phenotypes of three cases could not be definitively determined. Regarding the relationship between anatomical sites and phenotypes, in cases affecting the small intestine, 89% (16/18; 95% CI 65–98%) were of T-cell and 11% (2/18; 95% CI 1–34%) were of B-cell origin. Two large intestine cases had B-cell and one case had T-cell phenotype. Other five cases affecting the intestine without specified localization were of T-cell origin.

Discussion

The diagnosis of canine intestinal lymphoma is often challenging based on morphological examination, especially when endoscopic tissue samples are used.^{12,13} In order to improve the diagnostic accuracy with endoscopic tissue samples of canine intestinal lymphoma, the utility of PARR analysis has been tested but only on small scales. Kaneko

et al. preliminarily indicated the utility of PARR analysis to support the diagnosis of 4 canine alimentary lymphoma and 69 enteritis cases.³¹ Fukushima *et al.* focused on PARR analysis for endoscopically obtained tissue samples in 12 canine alimentary lymphoma cases, showing a sensitivity of 66.7%.²⁵ In the initial study by Burnett *et al.*, they could detect a monoclonal, biclonal or oligoclonal pattern in 91% of lymphoid malignancies.¹⁴ They also reported that the detection level of a monoclonal rearrangement using gel electrophoresis depends on the existence of background cell population either of a non-lymphoid or lymphoid tissue included in the analysis. For example, the detection level of a malignant clone in a non-lymphoid tissue, assessed by diluting DNA from lymphoid malignancy into that extracted from the liver, was 0.1% of the total DNA amount. In lymphoid tissues i.e. the spleen and thymus, by contrast, the detection level was reduced to 1 and 10%, respectively.¹⁴ This detection limit of PARR analysis may have been associated with the lower sensitivity in canine alimentary lymphoma. Furthermore, considering the fact that the use of endoscopically obtained tissue specimens may intrinsically contain difficulties to assess the utility of PARR analysis, such as that the portion of tissue samples used in histopathology may be different from that in PARR, and particularly due to the concern about lack of definitive diagnosis, we used full-thickness tissue specimens of intestinal lymphoma with histopathological definitive diagnosis. Because for both histopathological examination and PARR analysis the same portion of tissue specimens could be assessed, we were able to more precisely interpret the results of PARR analysis. Thus in this study we demonstrated that PARR analysis is a useful tool to distinguish between intestinal lymphoma and enteritis in dogs. We could detect monoclonality in 22 of 29 lymphoma cases (76%; 95% CI 56–90%) and polyclonality in 29 of 29 (100%; 95% CI 88–100%) including enteritis and healthy control group. The detection of monoclonality seemed to be independent on the lymphoma grades. These percentages for the detection of monoclonality and polyclonality are comparable to other studies in canine lymphoma using FFPE tissue samples and similar primer settings to

our study.^{15,24,32} As we used full-thickness tissue specimens of canine intestinal lymphomas with definitive diagnosis for PARR analysis, however, these percentages may not reflect clinical settings. In clinical settings, where less invasive procedures like endoscopy are performed, tissue sampling is one of the major problems to distinguish intestinal lymphoma from enteritis. Because the range of tissue sampling by endoscopy is limited to the mucosal layer and the inflammatory cell population often resides concomitantly with neoplastic lymphocytes, endoscopic tissue samples may not be suitable even for PARR analysis. However, these limitations of endoscopic tissue sampling could be improved by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA), which enables tissue sampling of the deeper layers of intestines, in which superficial ulcerative lesions are sparse, and thus possibly more representative samples suitable for PARR analysis to distinguish intestinal lymphoma from enteritis could be gained.^{33,34}

In the initial DNA integrity analysis with Cmu primers, we could not detect any PCR products in three lymphoma cases and one enteritis case. These samples were originated from years of 1997, 2006, 2011 and 2012. It has been reported that not long-term paraffin-embedding but the formalin fixation time for more than 1 week can impede PCR.³⁵ Since the fixation time at our institute is limited to 24–48 hours, we attribute the negative results of PCR with Cmu primers to small tissue sample sizes, which may have increased formalin permeability into tissue samples and thus intensified negative effects by formalin fixation on PCR.³⁵

Seven of 29 intestinal lymphoma cases did not show any monoclonal rearrangements in PARR analysis (i.e. polyclonal or no bands). Because the phenotypes of four out of seven cases were clearly determinable by IHC, the negative results may be attributable to failure of monoclonality detection, and in part to the small number of primers used in this study. These primers are designed to anneal to the common framework in V gene and well-conserved region in J gene, in which there also exists sequence variability among individuals.³⁶ Because of failure for primers to anneal to the targeted region of genes from lymphoma cells but not from normal lymphoid cells,

instead of monoclonality, a polyclonal pattern was detected. The use of multiplex primers has been shown to increase the detection of monoclonal rearrangements and an improved sensitivity can be expected in future studies.³⁶ Another reason for the negative results of PARR could be due to chromosomal translocation, deletion or incomplete rearrangements involving TCRG or IGH.^{37–39}

In the remaining three PARR negative cases, immunophenotyping by IHC did not yield clear results because of heterogenous immunostaining. This could be explained by downregulation of phenotype markers on lymphoma cells. Utilizing flow cytometry, Gelain *et al.* revealed aberrant phenotypes and abnormal expression level of phenotype markers in canine lymphomas, in which B-cell lymphomas with diminished expression of CD79a were most frequently found and, similarly, T-cell lymphomas with diminished and negative expression of CD3 were observed.⁴⁰ It is therefore conceivable that lymphoma cells may have downregulated phenotype markers and thus immunophenotyping with antibodies used for IHC in this study was hampered. On the other hand, based on the negative results of PARR, it can also be ascribed to natural killer (NK)-cell lymphoma, in which no variable, diversity and joining gene (VDJ) recombination occurs, and thus rearranged TCRG was not detectable.³⁷ Canine NK-cell intestinal lymphoma has been proposed by one case report, based on findings of large granular lymphocytic morphology and lack of surface CD3 expression, but unfortunately TCR clonality was not assessed.⁴¹ Although in human medicine IHC with anti-CD56 antibody is very helpful to characterize NK-cell lymphoma,⁹ immunophenotyping of canine CD56 is not currently available because of the lack of specific reactivity of human anti-CD56 antibody to canine CD56.⁴²

In three cases, results of phenotyping by PARR analysis and IHC were discordant. One immunohistochemically B-cell phenotype showed monoclonal rearrangements in both TCRG and IGH. This phenomenon can be interpreted as a result of cross-lineage, in which B-cells also have rearranged TCRG in the early precursor stage or through extended V(D)J recombinase activity after malignant transformation, so that

they possess B-cell phenotype on the cell surface level but also monoclonally rearranged TCR and immunoglobulin gene.^{14,43} However, it can also be possible that a very limited T-cell lineage that reactively accumulated around B-cell lymphoma cells would be detected as monoclonal by PARR analysis.^{44,45} In order to exclude this possibility, PARR analysis of B-cell lymphoma cells captured with the aid of laser microdissection may be the only reasonable method, which we did not pursue in this study. Interestingly, one case with suspected B-cell phenotype and one with an ambiguous immunophenotype by IHC were revealed to clearly possess a monoclonal TCRG rearrangement and thus to be of T-cell origin. These findings support the utility of PARR analysis to determine phenotypes in cases where immunophenotyping by IHC is inconclusive.

In our study population, T-cell phenotype was more frequent than B-cell phenotype (85%; 95% CI 65–90% and 15%; 95% CI 4–35%, respectively). This percentage is similar to that of a previous study including 44 canine gastrointestinal lymphoma cases, where T-cell phenotype accounted for 75%, B-cell for 10% and undeterminable cases for 15% by IHC.¹ In another study of 30 gastrointestinal lymphoma cases, 19 cases could be immunophenotyped, showing 63% T-cell and 37% B-cell phenotype.⁴ Rassnick *et al.* also reported a similar prevalence of T-cell phenotype, although in this study gastrointestinal lymphoma cases with multicentric involvement were also recruited.³

Due to the small number of cases affecting the large intestine in this study, it was not obvious whether the anatomical sites and phenotypes were correlated with each other. In our study population, two of three cases affecting the large intestine were of B-cell origin. In previous studies characterizing canine intestinal lymphoma, there is only limited information available concerning the prevalence of phenotypes in different anatomical locations. One case with primary colonic lymphoma was reported to be of T-cell origin.⁴⁶ In another report on four canine epitheliotropic T-cell gastrointestinal lymphoma cases, the stomach and small intestine were affected without large intestinal involvement.⁴⁷ On the other hand, characteristic B-cell gastrointestinal lymphoma with Mott-cell differentiation

has been reported, with one case affecting the stomach,⁴⁸ three other cases originated from the small intestine.^{49,50} One recent study as part of ultrasonographic description in canine gastrointestinal lymphoma has reported one T-cell and two B-cell gastric lymphomas and one B-cell lymphoma in the large intestine.⁵ On the basis of information available, both T- and B-cell phenotype can be seen in colorectal cases, but further studies on a larger scale are needed to elucidate this issue.

Epitheliotropic nature of canine intestinal lymphoma seems to be a distinct histopathological feature of T-cell origin. Primary epitheliotropic T-cell intestinal lymphoma in dogs was initially reported in three Shar-Pei and one Boxer dog⁴⁷ and also in one Labrador Retriever.⁵¹ Because the initial histopathological description by Couto *et al.* reported a submucosal origin of neoplastic lymphocytes,² the epitheliotropic T-cell intestinal lymphoma has been considered as a distinct subgroup of canine intestinal lymphoma. One subsequent report indicated, however, that 75% of canine intestinal lymphoma cases showed marked epitheliotropism and all these cases were of T-cell origin.¹ Because in our study the mucosal layer was often massively replaced by neoplastic lymphocytes, which may imply an advanced disease, the evaluation of occurrence of epitheliotropism was limited to 20 cases, with seven cases having epitheliotropism and all of these cases were of T-cell origin. The distinction of epitheliotropic and non-epitheliotropic feature has been well recognized in canine cutaneous lymphoma and seems to be associated with distinct immunophenotypes.³² To investigate whether this is also the case for canine intestinal lymphoma, immunophenotyping with a broad panel of phenotype markers will be needed.

In opposite to dogs, primary intestinal lymphoma of T-cell origin is very rare in human.⁶ Human patients with RCD have increased numbers of intraepithelial CD8⁺T-cells and highly tend to develop T-cell intestinal lymphoma, well known as EATL.⁵² Its clonal development from the inflammatory condition has been revealed by clonality analysis.^{6,11,53,54} In this respect, wheat-sensitive enteropathy in Irish Setter may be the closest model for the celiac disease (CD) in human,⁵⁵ but no predisposition for development of intestinal

lymphoma in this breed has been reported. Pathogenetic, histopathological and immunophenotypic characterization of human EATL has recently been documented and is currently categorized into two distinct subtypes, type I (also referred as classic) and type II. Type I is strongly associated with RCD and represents the majority of EATL, whereas the relationship between type II and CD seems to be equivocal. EATL is recognized as a malignant proliferation of intraepithelial CD8⁺T-cells based on the characteristic epitheliotropism, but there seem to exist distinct immunophenotypic differences between type I and II. Type I is known to have CD3⁺, CD8^{+/-}, CD56⁻, TCR β ^{+/-} phenotype and malignant T-cells tend to downregulate phenotype markers, such as CD8 and TCR β , during disease progression from RCD. To the contrary, type II seems to mostly have CD3⁺, CD8⁺, CD56⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺ phenotype and retain CD8 expression.^{9,56–58} The clinical course of both types is, similar to canine intestinal lymphoma, very aggressive with a median survival time of 10 months.⁵⁶ In this respect, two studies have referred similarity of canine intestinal lymphoma to EATL. In one study that describes large granular lymphocyte lymphomas in five dogs, one of the five dogs showed a massive infiltration of neoplastic lymphocytes in all the intestinal layers with an ulcerative villi atrophy and chronic plasmocytic enteritis. Although the dog also showed a wide dissemination of neoplastic lymphocytes including the blood, bone marrow, abdominal lymph nodes, liver and spleen, the authors indicated a resemblance to EATL based on the predominance of neoplastic lymphocytes in the intestine. More intriguingly, IHC revealed that the neoplastic lymphocytes possessed the immunophenotype of CD3⁺, CD8⁺.⁴² Another recent study reported that six of eight canine small intestinal lymphomas could be classified as EATL type I.⁵⁹ Although canine intestinal T-cell lymphoma has some common features with human EATL such as the marked epitheliotropism and aggressive behaviour, it is mandatory to further characterize canine T-cell lymphoma in terms of immunophenotypes. It is very intriguing to investigate whether canine intestinal lymphoma can be caused by etiological factors similar to human EATL in future studies.

In conclusion, we demonstrated that PARR analysis enables differentiation between enteritis and intestinal lymphoma in dogs and can also contribute to phenotyping especially in ambiguous cases by IHC. For its clinical use as a diagnostic tool, enhanced methods of tissue sampling should be considered to ensure representative tissue specimens for PARR analysis.

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

References

1. Coyle KA and Steinberg H. Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Veterinary Pathology* 2004; **41**: 141–146.
2. Couto CG, Rutgers HC, Sherding RG and Rojko J. Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1989; **3**: 73–78.
3. Rassnick KM, Moore AS, Collister KE, Northrup NC, Kristal O, Chretien JD, *et al.* Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009; **23**: 317–322.
4. Frank JD, Reimer SB, Kass PH and Kiupel M. Clinical outcomes of 30 cases (1997–2004) of canine gastrointestinal lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2007; **43**: 313–321.
5. Frances M, Lane AE and Lenard ZM. Sonographic features of gastrointestinal lymphoma in 15 dogs. *The Journal of Small Animal Practice* 2013; **54**: 468–474.
6. Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers B, Hiddemann W, *et al.* Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: I. Anatomic and histologic distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German Multicenter Study GIT NHL 01/92. *Journal of Clinical Oncology* 2001; **19**: 3861–3873.
7. Koch P, Probst A, Berdel WE, Willich NA, Reinartz G, Brockmann J, *et al.* Treatment results in localized primary gastric lymphoma: data of patients registered within the German multicenter study (GIT NHL 02/96). *Journal of Clinical Oncology* 2005; **23**: 7050–7059.
8. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, *et al.* Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after

- eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993; **342**: 575–577.
9. Hawkes EA, Wotherspoon A and Cunningham D. Diagnosis and management of rare gastrointestinal lymphomas. *Leukemia & Lymphoma* 2012; **53**: 2341–2350.
 10. Isaacson PG, O'Connor NT, Spencer J, Bevan DH, Connolly CE, Kirkham N, *et al.* Malignant histiocytosis of the intestine: a T-cell lymphoma. *Lancet* 1985; **2**: 688–691.
 11. Ashton-Key M, Diss TC, Pan L, Du MQ and Isaacson PG. Molecular analysis of T-cell clonality in ulcerative jejunitis and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *The American Journal of Pathology* 1997; **151**: 493–498.
 12. Evans SE, Bonczynski JJ, Broussard JD, Han E and Baer KE. Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2006; **229**: 1447–1450.
 13. Washabau RJ, Day MJ, Willard MD, Hall EJ, Jergens AE, Mansell J, *et al.* Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010; **24**: 10–26.
 14. 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.
 15. Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS and Moore PF. Canine indolent nodular lymphoma. *Veterinary Pathology* 2006; **43**: 241–256.
 16. Yagihara H, Uematsu Y, Koike A, Tamura K, Isotani M, Yamaguchi T, *et al.* Immunophenotyping and gene rearrangement analysis in dogs with lymphoproliferative disorders characterized by small-cell lymphocytosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2009; **21**: 197–202.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, *et al.* Increase in minimal residual disease in peripheral blood before clinical relapse in dogs with lymphoma that achieved complete remission after chemotherapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; **25**: 292–296.
 20. Sato M, Yamazaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, *et al.* The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Veterinary Journal* 2013; **195**: 319–324.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Affolter VK, Gross TL and Moore PF. Indolent cutaneous T-cell lymphoma presenting as cutaneous lymphocytosis in dogs. *Veterinary Dermatology* 2009; **20**: 577–585.
 24. 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.
 25. Fukushima K, Ohno K, Koshino-Goto Y, Uchida K, Nomura K, Takahashi M, *et al.* Sensitivity for the detection of a clonally rearranged antigen receptor gene in endoscopically obtained biopsy specimens from canine alimentary lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2009; **71**: 1673–1676.
 26. Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, *et al.* Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology* 2011; **48**: 198–211.
 27. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W and Moore PF. Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. In: *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*. 2nd edn., FY Schulman Ed., Washington,

- DC, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 2002.
28. 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.
 29. Rutgen BC, Hammer SE, Gerner W, Christian M, de Arespachochaga 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.
 30. Takanosu M, Tadika T and Kobayashi T. Heteroduplex polymerase chain reaction is essential for canine receptor rearrangement analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2010; **22**: 760–763.
 31. 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.
 32. Moore PF, Affolter VK, Graham PS and Hirt B. Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: an investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality. *Veterinary Dermatology* 2009; **20**: 569–576.
 33. Wiersema MJ, Vilmann P, Giovannini M, Chang KJ and Wiersema LM. Endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy: diagnostic accuracy and complication assessment. *Gastroenterology* 1997; **112**: 1087–1095.
 34. Stacchini A, Carucci P, Pacchioni D, Accinelli G, Demurtas A, Aliberti S, *et al.* Diagnosis of deep-seated lymphomas by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration combined with flow cytometry. *Cytopathology* 2012; **23**: 50–56.
 35. 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.
 36. Keller SM and Moore PF. A novel clonality assay for the assessment of canine T cell proliferations. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012; **145**: 410–419.
 37. Avery A. Molecular diagnostics of hematologic malignancies. *Topics in Companion Animal Medicine* 2009; **24**: 144–150.
 38. Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, *et al.* Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; **21**: 222–229.
 39. Rezuke WN, Abernathy EC and Tsongalis GJ. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clinical Chemistry* 1997; **43**: 1814–1823.
 40. Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, Marconato L and Comazzi S. Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008; **121**: 179–188.
 41. Snead EC. Large granular intestinal lymphosarcoma and leukemia in a dog. *The Canadian Veterinary Journal* 2007; **48**: 848–851.
 42. Turinelli V, Marchal T, Ponce F, Bonnefont-Rebeix C and Fournel-Fleury C. Aggressive large granular lymphocytes lymphomas in five dogs: a clinical cytohistological and immunological study. *Comparative Clinical Pathology* 2005; **13**: 109–118.
 43. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems MJ, Hahlen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, *et al.* Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; **13**: 196–205.
 44. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; **17**: 2257–2317.
 45. Ling FC, Clarke CE and Lillicrap D. Positive immunoglobulin gene rearrangement study by the polymerase chain reaction in a colonic adenocarcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* 1992; **98**: 116–119.
 46. Miura T, Maruyama H, Sakai M, Takahashi T, Koie H, Yamaya Y, *et al.* Endoscopic findings on alimentary lymphoma in 7 dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2004; **66**: 577–580.
 47. Steinberg H, Dubielzig RR, Thomson J and Dzata G. Primary gastrointestinal lymphosarcoma with

- epitheliotropism in three Shar-pei and one boxer dog. *Veterinary Pathology* 1995; **32**: 423–426.
48. De Zan G, Zappulli V, Cavicchioli L, Di Martino L, Ros E, Conforto G, *et al.* Gastric B-cell lymphoma with Mott cell differentiation in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2009; **21**: 715–719.
49. Kodama A, Sakai H, Kobayashi K, Mori T, Maruo K, Kudo T, *et al.* B-cell intestinal lymphoma with Mott cell differentiation in a 1-year-old miniature Dachshund. *Veterinary Clinical Pathology* 2008; **37**: 409–415.
50. Stacy NI, Nabity MB, Hackendahl N, Buote M, Ward J, Ginn PE, *et al.* B-cell lymphoma with Mott cell differentiation in two young adult dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 2009; **38**: 113–120.
51. French RA, Seitz SE and Valli VE. Primary epitheliotropic alimentary T-cell lymphoma with hepatic involvement in a dog. *Veterinary Pathology* 1996; **33**: 349–352.
52. de Mascarel A, Belleannee G, Stanislas S, Merlio C, Parrens M, Laharie D, *et al.* Mucosal intraepithelial T-lymphocytes in refractory celiac disease: a neoplastic population with a variable CD8 phenotype. *The American Journal of Surgical Pathology* 2008; **32**: 744–751.
53. Carbonnel F, Grollet-Bioul L, Brouet JC, Teilhac MF, Cosnes J, Angonin R, *et al.* Are complicated forms of celiac disease cryptic T-cell lymphomas? *Blood* 1998; **92**: 3879–3886.
54. Daum S, Weiss D, Hummel M, Ullrich R, Heise W, Stein H, *et al.* Frequency of clonal intraepithelial T lymphocyte proliferations in enteropathy-type intestinal T cell lymphoma, coeliac disease, and refractory sprue. *Gut* 2001; **49**: 804–812.
55. Batt RM, McLean L and Carter MW. Sequential morphologic and biochemical studies of naturally occurring wheat-sensitive enteropathy in Irish setter dogs. *Digestive Diseases and Sciences* 1987; **32**: 184–194.
56. Arps DP and Smith LB. Classic versus type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: diagnostic considerations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2013; **137**: 1227–1231.
57. Delabie J, Holte H, Vose JM, Ullrich F, Jaffe ES, Savage KJ, *et al.* Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project. *Blood* 2011; **118**: 148–155.
58. Isaacson PG and Du MQ. Gastrointestinal lymphoma: where morphology meets molecular biology. *The Journal of Pathology* 2005; **205**: 255–274.
59. Carrasco V, Rodriguez-Bertos A, Rodriguez-Franco F, Wise AG, Maes R, Mullaney T, *et al.* Distinguishing intestinal lymphoma from inflammatory bowel disease in canine duodenal endoscopic biopsy samples. *Veterinary Pathology* 2014. doi:10.1177/0300985814559398.

Appendix. Canine intestinal lymphomas: summary of patient characteristics, anatomical location, molecular clonality, phenotyping on PARR and IHC, and conclusive phenotype, if applicable.

Case No.	Age (year)	Sex	Canine Breed	Site Affected	TCRG Clonality	IGH Clonality	Immunophenotype PARR	Immunophenotype IHC	Immunophenotype PARR+IHC
1	5	Male	Belgian Shepherd	Duodenum	M	N	T	ambiguous	T
2	10	Female	Appenzeller Mountain Dog	Intestine	P	P	n.d.	T (suspected)	T (suspected)
3	7	Male	Mixed	Jejunum	M	N	T	T	T
4	8	Male	Bernese Mountain Dog	Colon	M	N	T	B (suspected)	T
5	11	Female	Mixed	Intestine	M	N	T	T	T
6	5	FS	Rottweiler	Intestine	M	N	T	T	T
7	6	Male	Bernese Mountain Dog	Jejunum	M	N	T	T (suspected)	T

8	n.a.	Male	Mixed	SI	M	N	T	T (suspected)	T
9	6	Male	Maltese	Intestine	M	N	T	T (suspected)	T
10	7	Female	Cocker Spaniel	Jejunum	M	N	T	T (suspected)	T
11	10	MC	Mixed	Colon	P	N	n.d.	B	B
12	13	Female	Presa Canario	Jejunum	P	P	n.d.	T (suspected)	T (suspected)
13	12	Male	Dachshund	SI	M	N	T	T	T
14	8	Female	Poodle	Intestine	M	N	T	T	T
15	10	Male	Golden Retriever	Intestine	M	N	T	T	T
16	9	FS	Mixed	Jejunum	M	N	T	T	T
17	2	Male	German Shepherd	SI	P	N	n.d.	B	B
18	5	Male	Mixed	SI	M	N	T	T	T
19	8	Male	Hanover Hound	SI	P	P	n.d.	T	T

20	9.5	Male	Pug	SI	M	N	T	T	T
21	10	Male	Mixed	SI	P	P	n.d.	T	T
22	7.5	Male	Golden Retriever	SI	P	P	n.d.	B (suspected)	B (suspected)
23	11	Female	Golden Retriever	SI	M	N	T	T	T
24	3	Male	Chihuahua	Jejunum	M	M	Dual B/T	B	B
25	4	Female	Great Dane	Jejunum	M	N	T	T	T
26	11	Female	Yorkshire Terrier	Jejunum	M	N	T	T	T
27	8	n.a.	Beagle	Duodenum	M	N	T	T	T
28	8	Male	n.a.	SI	M	N	T	T	T
29	13	Female	Mixed	Rectum/Colon	P	M	B	B	B

PARR, PCR for antigen receptor gene rearrangement; IHC, immunohistochemistry; MC, male castrated; FS, female spayed; SI, small intestine; TCRG, T-cell receptor gamma; IGH, immunoglobulin heavy chain; M, monoclonal; O, oligoclonal; P, polyclonal; N, negative; T, T-cell phenotype; B, B-cell phenotype; n.a., not available; n.d., not determinable.

IV. DISKUSSION

1. Charakteristika der Hunde mit intestinalem Lymphom

In dieser Studienpopulation von 29 intestinalen Lymphom-Fällen wurden 18 Rassehunde und acht Mischlings-Hunde einbezogen. Die Rassen, die mit mehr als einem Individuum auftraten, umfassen Golden Retriever (n = 3) und Berner Sennenhund (n = 2). Diese Rassenprävalenz bei kaninen intestinalen Lymphomen vor allem bei Berner Sennenhund könnte eher dem geographischen Unterschied zugeschrieben werden als einer echten Prädisposition für das intestinale Lymphom, obwohl für Golden Retriever ein erhöhtes Lymphom-Risiko beschrieben wurde (Modiano *et al.*, 2005, Pastor *et al.*, 2009). Dass in der vorliegenden Studie Rüden die Mehrheit der Fälle ausmachten, stimmt mit anderen Publikationen überein (Couto *et al.*, 1989, Frances *et al.*, 2013, Frank *et al.*, 2007, Rassnick *et al.*, 2009). Eine Studie berichtet jedoch eine gleichwertige Prävalenz der Geschlechter (Coyle und Steinberg, 2004). Das Mittel- und Medianalter der Hunde dieser Studie zeigt auch wie in der Literatur beschrieben, dass intestinale Lymphome zumeist bei Hunden im mittleren Alter und bei alten Hunden vorkommen, obwohl auch jüngere Hunde betroffen sein können (Couto *et al.*, 1989, Coyle und Steinberg, 2004, Frances *et al.*, 2013, Frank *et al.*, 2007, Rassnick *et al.*, 2009).

2. Anatomische Lokalisation

Die am häufigsten betroffene Lokalisation der kaninen intestinalen Lymphome war der Dünndarm, gefolgt vom Dickdarm. In der Literatur wurde der Dünndarm als die am meisten befallene Lokalisation übereinstimmend beschrieben (Couto *et al.*, 1989, Coyle und Steinberg, 2004, Frank *et al.*, 2007, Rassnick *et al.*, 2009).

3. PARR

3.1. Einflüsse der DNA-Extraktion von FFPE-Geweben auf die PCR

Wegen des retrospektiven Charakters wurden in der vorliegenden Studie nur FFPE-Darmgewebe eingeschlossen. Wenn DNA von FFPE-Geweben extrahiert wird, kann PCR durch inhibitorische Komponenten von FFPE behindert werden. Die PCR wird auch durch die Fixierungseffekte des Formalins (Verbindung der

DNA mit Proteinen, Fragmentierung der DNA) beeinflusst (Groenen *et al.*, 2008, Kaneko *et al.*, 2009a). Aufgrund dessen wird die amplifizierbare Basenlänge bei DNA von FFPE-Geweben meist bis zu ca. 300 Basenpaaren (Bp) eingeschränkt (Groenen *et al.*, 2008, Weirich *et al.*, 1995). In der vorliegenden Studie wurde die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA mithilfe der PCR mit Cmu-Primern festgestellt, deren PCR-Produkte 180 Bp betragen. Bei der initialen Prüfung der DNA-Integrität, wo insgesamt 62 Proben (32 Lymphome, 15 Enteritiden und 15 gesunde Kontrollen) getestet wurden, zeigten sieben Proben negative Ergebnisse mit Cmu-Primern. Dies scheint nicht mit der Dauer der Gewebeaufbewahrung assoziiert zu sein, weil eine aus dem Jahr 2012 stammende Probe ebenfalls nicht amplifizierbar war. Unter Berücksichtigung der inhibitorischen Effekte von FFPE auf die PCR wurde ein Verdünnungstest (1:10 und 1:100) durchgeführt. Infolgedessen konnten drei von sieben negativen Proben mit Cmu-Primern erfolgreich amplifiziert werden. Das Verdünnungsverhältnis von 1:10 schien in den meisten Fällen eine optimale Bedingung zu sein. Für die PCR mit FFPE-Proben sollte daher ein Verfahren für eine Optimierung der DNA-Konzentration angestrebt werden. Die restlichen vier Proben, die sich trotz des Verdünnungsverfahrens nicht amplifizieren ließen, wurden ausgelassen und durch vier andere Proben ersetzt, deren DNA-Integrität mit den Cmu-Primern erfolgreich festgestellt wurde.

3.2. B-Zell-Primer

In der vorliegenden Studie wurden die PCR-Produkte mit B-Zell-Primern zunächst auf dem Agarose-Gel analysiert, um das Vorhandensein der PCR-Produkte festzustellen. Dabei zeigten die meisten Lymphom-Proben negative Ergebnisse. Aufgrund der niedrigen Auftrennungsfähigkeit und der schlechten Visualität des Agarose-Gels wurden die positiven Proben weiter mit der PAGE analysiert, damit deutlich gezeigt werden konnte, dass ein Band, das auf dem Agarose-Gel wie ein monoklonales Muster erschien, tatsächlich ein polyklonales Muster aufwies. Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit des Einsatzes der PAGE bei B-Zell-Primern (Gonzalez *et al.*, 1999). Ferner wurden auch einige negative Proben mit dem Agarose-Gel weiter mit PAGE analysiert, damit die Möglichkeit ausgeschlossen werden konnte, dass ein potentiell positives Ergebnis wegen der schlechten Visualität des Agarose-Gels übersehen wurde. Hierzu konnte bestätigt werden, dass alle negativen Ergebnisse auf dem Agarose-Gel

auch bei PAGE negative Ergebnisse zeigten.

3.3. T-Zell-Primer

Die PCR-Produkte mit T-Zell-Primern wurden nur mit PAGE analysiert, weil sie eine relativ kurze Basenlänge (ca. 80 Bp) aufweisen und zur Detektion dieser PCR-Produkte eine hohe Auftrennungsfähigkeit notwendig ist. In der vorliegenden Studie wurden die Kriterien für Monoklonalität streng gesetzt, nicht nur auf dem Vorhandensein eines klaren Einzelbandes oder von zwei gut erkennbaren miteinander aufgetrennten Bändern wurde geachtet, sondern auch darauf, dass die Bänder auch nach der Heteroduplex-Analyse deutlich erkennbar sein müssen. Das Vorhandensein von mehr als drei Bändern wird als oligoklonal bezeichnet und hier nicht als monoklonal eingeordnet. In der Literatur wurde darauf hingewiesen, dass ein Doppelseinsatz der PCR notwendig sei, um ein unspezifisches Band zu erkennen, das durch eine zufällige Amplifikation hergestellt wird, und um somit ein falsch-positives Ergebnis (Pseudoklonalität) auszuschließen (Elenitoba-Johnson *et al.*, 2000, Langerak *et al.*, 2012). Durch eine unspezifische Amplifikation werden unreproduzierbare Bänder hergestellt, sodass das Vergleichen der gepaarten PCR-Produkte, die durch zwei unabhängige Amplifikationen gewonnen werden, unspezifische Bänder erkennbar macht. Mit der Heteroduplex-Analyse kann dies jedoch ebenfalls durch das Verschwinden der unspezifischen Bänder festgestellt werden und in der vorliegenden Studie wurde diese Analyse eingesetzt (Takanosu *et al.*, 2010).

3.4. Heteroduplex-Analyse

Wie oben beschrieben, wurde diese Analyse durchgeführt, um die Möglichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses (Pseudoklonalität) auszuschließen. In der vorliegenden Studie kam jedoch keine Pseudoklonalität vor, denn alle monoklonalen Bänder konnten auch nach der Heteroduplex-Analyse in dem gleichen Bereich der Basenlänge erkannt werden. Dieses Ergebnis, dass keine Pseudoklonalität beobachtet wurde, kann als sicher angenommen werden, weil sich ein unspezifisches Band bildet, wenn das zur PARR eingesetzte DNA-Quantum so gering ist, dass nur ein begrenztes DNA-Template zufälligerweise amplifiziert wird (Elenitoba-Johnson *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie war jedoch das DNA-Template genügend vorhanden, da die DNA-Materialien nicht aus dünnen FFPE-Gewebe-Schnitten, sondern aus FFPE-Blöcken extrahiert

wurden. Bei den polyklonalen Ergebnissen war es ohne Heteroduplex-Analyse unproblematisch, dies von einem monoklonalen Band zu unterscheiden. Die Heteroduplex-Analyse machte jedoch durch ein senkrecht weiter verbreitetes Abstrich-Muster das Polyklonal-Muster erkennbarer.

3.5. Sensitivität und Spezifität

Bei der Sensitivität der PARR-Analyse handelt es sich um die Fähigkeit, beim Vorhandensein neoplastischer Lymphozyten eine Monoklonalität identifizieren zu können, während es bei der Spezifität um die Fähigkeit geht, bei nicht-neoplastischen Fällen (Entzündung, physiologischem Zustand) ein polyklonales Muster detektieren zu können. Ein falsch-positives Ergebnis kann vorkommen, wenn sich Lymphozyten unter einer chronischen Entzündung hochgradig vermehren und ein sehr begrenztes Lineage-Repertoire aufweisen (Burnett *et al.*, 2003, Vernau und Moore, 1999). Hierzu konnte beispielweise mit der PARR-Analyse eine Monoklonalität detektiert werden, wenn DNA-Proben aus reaktiven Lymphozyten im Keimzentrum eingesetzt wurden (Iijima *et al.*, 2000). Ein weiterer Fall des falsch-positiven Ergebnisses ist das oben genannte unspezifische Band, das durch eine unspezifische Amplifikation hergestellt wird (Elenitoba-Johnson *et al.*, 2000). Bei einem falsch-negativen Ergebnis handelt es sich um den Misserfolg, eine mögliche Monoklonalität nicht identifizieren zu können. Die Gründe dafür sind vielfältig. Erstens kann dies einem Fehlschlag der PCR bei der Analyse mit FFPE-Proben zugeschrieben werden, die PCR-inhibitorische Stoffe enthalten können (Kaneko *et al.*, 2009a, Weirich *et al.*, 1995). Dieser Fall kann jedoch durch Überprüfung der DNA-Integrität (z.B. mit Cmu-Primern in der vorliegenden Studie) ausgeschlossen werden. Ein zweiter Grund ist die Primer-Konstruktion. Die für die PARR-Analyse verwendeten Primer werden so konstruiert, dass sie an die sequenziell konservierte Region des V-Gens (Framework-Region) und des J-Gens anlagern können (Keller und Moore, 2012, Tamura *et al.*, 2006, Yagihara *et al.*, 2007). Basensequenzen dieser Region sind jedoch unter Individuen variabel, sodass es vorkommen kann, dass die verwendeten Primer an der Ziel-Region nicht anlagern und somit keine PCR-Produkte hergestellt werden (Avery, 2009, Keller und Moore, 2012). Drittens handelt es sich um genetische Veränderungen, die die Antigen-Rezeptor-Gene, wie eine chromosomale Translokation, eine partielle Rekombination der Antigen-Rezeptor-Gene und somatische Hypermutationen, die bei Post-Keimzentrum-B-

Zellen stattfinden, einschließen (Langerak *et al.*, 2007, Rezuke *et al.*, 1997). Schließlich können NK-Zell-Lymphome auftreten, bei denen keine Gen-Rekombination stattfindet (Keimbahn-Konfiguration) und mit der PARR-Analyse keine PCR-Produkte detektiert werden können (Avery und Avery, 2004, Burnett *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Studie betrug die Sensitivität 76 % und die Spezifität 100 %, die mit Werten in anderen Publikationen gut vergleichbar sind (Avery und Avery, 2004, Chaubert *et al.*, 2010). Im Vergleich zu einer Studie, in der die PARR-Analyse mit endoskopisch entnommenen Proben von 12 Fällen der kaninen GI-Lymphome eingesetzt und eine Sensitivität von 67,7 % berichtet wurde, ist die Sensitivität in der vorliegenden Studie höher (Fukushima *et al.*, 2009). Die Sensitivität der PARR-Analyse ist abhängig von der Primer-Einstellung (Homoplex oder Multiplex), dem Zustand der verwendeten Gewebe-Materialien (frisch oder Formalin-fixiert) und den analytischen Methoden (konventionelle Gel-Elektrophorese oder Gene-Scanning). In der Regel ist die Sensitivität unter Benutzung von Multiplex-Primer und Gene-Scanning höher (van Dongen *et al.*, 2003). In der vorliegenden Studie konnte dennoch gezeigt werden, dass der Einsatz der minimalen Primer-Einstellung und der konventionellen Gel-Elektrophorese eine relativ hohe Sensitivität ermöglicht. Dies unterstreicht die Bedeutung der zellulären Komposition, die zur PARR-Analyse eingesetzt wird, weil in der vorliegenden Studie unter dem Mikroskop bestätigte lymphomatöse Zell-Komponenten aus Paraffin-Blöcken gezielt herausgeschnitten und analysiert wurden, was einen Einschluss der reaktiven und nicht-neoplastischen Lymphozyten minimierte.

Aus praktischen Gründen wird eine endoskopische Probengewinnung aus dem GIT bevorzugt. Mit der Endoskopie können jedoch meist nur Proben aus oberflächlichen mukosalen Läsionen gewonnen werden, in denen auch inflammatorische Komponenten reichlich vorhanden sein können (Couto *et al.*, 1989). Wie Fukushima und Kollegen ausführten, dürften endoskopische Proben für die PARR-Analyse nicht geeignet sein. In der Praxis sollte daher angestrebt werden, repräsentative multiple Läsionen zu entnehmen. Dabei kann ein Einsatz der endoskopischen Ultraschall-gestützten Feinnadelaspiration (endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration, EUS-FNA) hilfreich sein, um in der Tiefe liegende Tumor-Läsionen beproben und diese zur PARR-Analyse einsetzen

zu können (Stacchini *et al.*, 2012, Wiersema *et al.*, 1997).

4. Korrelation der Phänotypen zwischen PARR und IHC

19 Fälle waren phänotypisch übereinstimmend und zehn Fälle nicht. Sieben Fälle der Nicht-Übereinstimmung resultierten aus den negativen Ergebnissen der PARR-Analyse. Weil vier Fälle von diesen sieben Fällen mit IHC eindeutig immunphänotypisiert werden konnten, könnte diese immunphänotypische Nicht-Übereinstimmung dem Fehlen der Detektion einer Monoklonalität mit der PARR-Analyse zugeschrieben werden. Die anderen drei Fälle mit PARR-negativen Ergebnissen ließen sich auch mit IHC nicht eindeutig einteilen und dafür können zwei Gründe vermutet werden: Erstens geht es um eine Herabregulation der Immunphänotyp-Marker von Lymphomzellen. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass bei kaninen B-Zell-Lymphomen der Immunphänotyp-Marker für B-Zellen, CD79a, aberrant unterexprimiert werden kann. Ebenfalls kann bei kaninen T-Zell-Lymphomen eine Unterexprimierung oder komplette Einstellung von CD3 auftreten (Gelain *et al.*, 2008, Wilkerson *et al.*, 2005). Eine aberrant herabregulierte Expressierung der Immunphänotyp-Marker hätte in der uneindeutigen Phänotypisierung mit der IHC resultieren können. Zweitens handelt es sich um die Möglichkeit eines NK-Zell-Lymphoms (Avery und Avery, 2004, Burnett *et al.*, 2003). In der Humanmedizin kommt zur Identifizierung der NK-Zell-Lymphome eine Immunphänotypisierung mit Anti-CD56-Antikörper zum Einsatz. Weil eine spezifische Reaktion dieses Antikörpers auf kanines CD56 jedoch nicht bestätigt wurde, konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden, ob es sich bei diesen immunhistochemisch uneindeutigen Fällen tatsächlich um NK-Zell-Lymphome handelt (Turnelli *et al.*, 2005).

Die letzten drei Fälle, deren Phänotypen zwischen PARR-Analyse und IHC nicht übereinstimmend waren, ließen sich mit der PARR-Analyse phänotypisieren, aber die Phänotypen stimmten mit der IHC nicht überein. Ein immunhistochemischer B-Zell-Phänotyp zeigte eine Doppel-Monoklonalität, die als Phänomen von Cross-Lineage bekannt ist. Das Phänomen beruht darauf, dass entweder durch die Rekombinase-Aktivität im Frühstadium der Zell-Reifung oder durch deren anhaltende Aktivität nach der malignen Transformation nicht nur Immunglobulin-Gene, sondern auch TCR-Gene rekombiniert werden, sodass die Zellen auf der Zell-Oberfläche einen B-Zell-Phänotyp aufweisen, während sie genetisch

rekombinierte Immunglobulin- und TCR-Gene besitzen und somit mit der PARR-Analyse eine Doppel-Monoklonalität identifiziert werden kann (Burnett *et al.*, 2003, Szczepanski *et al.*, 1999). Es wäre auch möglich, dass eine sehr limitierte T-Zelllinie, die sich reaktiv um neoplastische B-Zellen herum sammelt, bei der PARR-Analyse als monoklonal dargestellt werden kann (Ling *et al.*, 1992, van Dongen *et al.*, 2003). Um diese Möglichkeit auszuschließen, könnte das DNA-Material aus mit der Laser-Mikrodissektion ausgeschnittenen neoplastischen B-Zellen mit PARR analysiert werden, was aber in der vorliegenden Studie nicht angestrebt wurde. Ein Fall, der sich immunhistochemisch nur fraglich in B-Zell-Phänotyp einteilen ließ, konnte mit der PARR-Analyse eindeutig als T-zellig identifiziert werden. Der letzte Fall, dessen Immunphänotyp mit IHC nicht bestimmt werden konnte, zeigte bei der PARR-Analyse eindeutig eine TCR-Monoklonalität. Ferner muss erwähnt werden, dass die Immunphänotypen der vier Fälle, die mit IHC nur fraglich in T-Zell-Phänotyp eingeteilt werden konnten, mit der PARR-Analyse eindeutig als T-zellig bestätigt wurden. Dies zusammen betont die Wertigkeit der PARR-Analyse zur Phänotypisierung, vor allem, wenn sich Immunphänotypen mit IHC nicht eindeutig bestimmen lassen.

5. Zusammenhang zwischen anatomischen Lokalisationen und Phänotypen

Wegen der Seltenheit der Dickdarm-Lymphome bei kaninen intestinalen Lymphomen ist es unklar, ob ein bestimmter Immunphänotyp mit einer bestimmten anatomischen Lokalisation assoziiert ist. Diesbezüglich stehen in der Literatur nur wenige Auskünfte zur Verfügung. In der vorliegenden Studie wiesen zwei von drei Fällen mit einem Dickdarm-Lymphom einen B-Zell-Phänotyp auf. Miura und Kollegen berichteten von einem kolorektalen T-Zell-Lymphom (Miura *et al.*, 2004). Steinberg und Kollegen ermittelten, dass vier T-Zell-Lymphom-Fälle, die einen ausgeprägten Epitheliotropismus aufwiesen, Magen und Dünndarm, aber nicht Dickdarm betrafen (Steinberg *et al.*, 1995). Eine Sonderform eines B-Zell-Lymphoms mit Mott-Zell-Differenzierung stammte vom Magen (De Zan *et al.*, 2009) und drei ähnliche Fälle mit einer Mott-Zell-Morphologie waren im Dünndarm angesiedelt (Kodama *et al.*, 2008, Stacy *et al.*, 2009). Eine neueste Studie im Rahmen einer sonographischen Darstellung der kaninen gastrointestinalen Lymphomen berichtete über ein T-Zell- und zwei B-

Zell-Lymphome im Magen sowie ein B-Zell-Lymphom im Dickdarm (Frances *et al.*, 2013). Soweit beurteilbar scheinen die Immunphänotypen bei kaninen Lymphomen im Magen und Dickdarm heterogener zu sein, anders als beim Menschen, bei dem in gastrischen Fällen überwiegend B-Zell-Lymphome vorkommen (Koch *et al.*, 2005).

6. Phänotypen und Betrachtung zur Prognose

In dieser Studienpopulation kam mehrheitlich der T-Zell-Phänotyp (85 %) gegenüber dem B-Zell-Phänotyp (15 %) vor. Diese höhere Prävalenz des T-Zell-Phänotyps bei kaninen intestinalen Lymphomen stimmt mit anderen Studien überein. Einer Studie mit der größten Studienpopulation von 44 Fällen zufolge betrug der T-Zell-Phänotyp 75 % und der B-Zell-Phänotyp 10 %. Die restlichen Fälle dieser Studie (15 %) ließen sich immunphänotypisch nicht zuordnen (Coyle und Steinberg, 2004). Zwei andere klinische Studien mit jeweils 30 und 18 Fällen berichteten 63 % vom T-Zell-Phänotyp und 37 % vom B-Zell-Phänotyp. Bei der ersteren waren jedoch die immunphänotypisierten Fälle auf 19 Fälle begrenzt (Frank *et al.*, 2007) und bei der letzteren wurden auch fünf Fälle eingeschlossen, die sich als Beteiligung der multizentrischen Lymphome manifestierten (Rassnick *et al.*, 2009). Weil kanine T-Zell-Lymphome eine schlechtere Prognose als B-Zell-Lymphome aufweisen, kann die bekanntlich schlechte Prognose bei kaninen intestinalen Lymphomen der Prädominanz des T-Zell-Phänotyps zugeschrieben werden (Ponce *et al.*, 2004). Obwohl es statistisch nicht signifikant war ($p=0.06$), wurde hierzu auf eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose für gastrointestinale T-Zell-Lymphome (mediane Überlebenszeit von drei Wochen) als für gastrointestinale B-Zell-Lymphome (mediane Überlebenszeit von drei Monaten) hingewiesen (Rassnick *et al.*, 2009).

Außer dem Phänotyp könnte andererseits die anatomische Lokalisation in die Prognose einfließen. Hierzu wurden günstigere Prognosen bei kolorektalen Lymphomen ermittelt. Ein Hund mit einem kolorektalen Lymphom, der mit einem Kombinations-Chemotherapie-Protokoll behandelt wurde, zeigte beispielweise eine Überlebenszeit von mehr als 5 Jahren (Couto *et al.*, 1989). Ein anderer Hund mit einem Dickdarm-Lymphom, trotz des T-Zell-Phänotyps, blieb zum Zeitpunkt des letzten Follow-up über ein Jahr am Leben (Miura *et al.*, 2004). Frank und Kollegen fanden ebenfalls heraus, dass zwei von fünf Hunden mit

einem Dickdarm-Lymphom, die mit einer Chemotherapie mit oder ohne Chirurgie behandelt wurden, über ca. 2,5 und 6,9 Jahre überlebten. Die anderen drei Hunde zeigten jedoch mit ähnlichen Behandlungen deutlich kürzere Überlebenszeiten (Frank *et al.*, 2007). Weil das Verbreitungsmuster der Tumorerkrankung (diffus oder nodal) eine Entscheidung zu therapeutischen Optionen beeinflussen kann, dürfte sich ein prognostischer Unterschied der befallenen anatomischen Lokalisationen nur schwierig feststellen lassen.

7. Epitheliotropismus

Die epitheliotrope Eigenschaft scheint exklusiv für den T-Zell-Phänotyp charakteristisch zu sein. Das primäre epitheliotrope T-Zell-Lymphom wurde erstmals bei drei Shar-Pei und einem Boxer beschrieben (Steinberg *et al.*, 1995). Ein Fallbericht über ein primäres gastrointestinales Lymphom bei einem Labrador Retriever beschreibt auch einen Epitheliotropismus (French *et al.*, 1996). Diese Sonderform des Epitheliotropismus wurde initial als ein Subtyp der kaninen gastrointestinalen Lymphome betrachtet, weil sie sich von den histopathologischen Bildern in der ersten systematischen Studie streng unterschied, bei denen in allen Fällen ein submukosaler Ursprung der neoplastischen Lymphozyten beschrieben wurde (Couto *et al.*, 1989). Eine nachfolgende systematische Studie berichtete jedoch, dass sogar 75 % der Fälle einen ausgeprägten Epitheliotropismus aufwiesen und alle diese Fälle mit dem T-Zell-Phänotyp verbunden waren (Coyle und Steinberg, 2004). In der vorliegenden Studie konnte bei 20 Fällen auf einen Epitheliotropismus untersucht werden und 35 % dieser Fälle (7/20) zeigten einen Epitheliotropismus. Alle Fälle mit Epitheliotropismus waren ausschließlich T-zellig. Bei anderen zehn Fällen ließ sich das Vorhandensein eines Epitheliotropismus nicht beurteilen, weil die mukosale Schicht stark ulzeriert und durch neoplastische Lymphozyten massiv verdrängt war. Dies kann als eine fortgeschrittene Tumorerkrankung interpretiert werden.

Der charakteristische Immunphänotyp der epitheliotropen Form wurde bei kaninen kutanen Lymphomen detailliert untersucht. Die epitheliotrope Form scheint mit bestimmten Immunphänotypen verbunden zu sein, nämlich CD8⁺- oder CD4⁻CD8⁻-T-Zellen. Ferner wurde der TCRγδ-Phänotyp mehrheitlich gegenüber dem TCRαβ-Phänotyp beobachtet, was die physiologische Verteilung

der kutanen Lymphozyten widerspiegelt (Moore *et al.*, 2009).

Unter diesem Aspekt betrachtet, ist es von großem Interesse zukünftig zu untersuchen, ob auch die epitheliotrope Eigenschaft der kaninen intestinalen T-Zell-Lymphome mit einem bestimmten Immunphänotyp assoziiert ist. Die physiologische Verteilung der intestinalen Lymphozyten bei Hunden ist bereits bekannt. In der Literatur wird die Verteilung der Lymphozyten aufgrund der Histologie der Darmschichten, Epithel und Lamina propria, eingeteilt. Intraepitheliale Lymphozyten weisen ausschließlich T-Zell-Phänotyp und überwiegend $CD8^+ \alpha\beta^+$ auf (Elwood *et al.*, 1997, German *et al.*, 1999a, Luckschander *et al.*, 2009, Sonea *et al.*, 2000). Ein gewisser Anteil der $\gamma\delta^+$ -T-Zellen kann auch im Epithel gefunden werden und sie scheinen meist $CD4^- CD8^-$ zu besitzen (German *et al.*, 1999b, Luckschander *et al.*, 2009, Sonea *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu werden in der Lamina propria überwiegend mehr $CD4^+$ -T-Zellen als $CD8^+$ beobachtet (Elwood *et al.*, 1997, German *et al.*, 1999a, Sonea *et al.*, 2000). Obwohl $\alpha\beta^+$ -T-Zellen sowohl im Epithel als auch in der Lamina propria gefunden werden, befinden sich $\gamma\delta^+$ -T-Zellen meist im Epithel (German *et al.*, 1999b). Ob die epitheliotropen neoplastischen Lymphozyten mit einem bestimmten Immunphänotyp wie $CD8^+ \alpha\beta^+$, der physiologisch intraepithelial beobachtet wird, assoziiert sind, muss in zukünftigen Studien näher dargestellt werden.

8. Ätiologische Betrachtung

Es ist unklar, ob die Prädominanz des T-Zell-Phänotyps beim kaninen intestinalen Lymphom mit dessen Ätiologie verknüpft ist. In der Humanmedizin werden unter gastrointestinalen Lymphomen überwiegend gastrische Lymphome gesehen und fast alle Fälle gastrischer Lymphome sind vom B-Zell-Phänotyp (Koch *et al.*, 2001). Die Entwicklung der gastrischen MALT-Lymphome ist stark assoziiert mit einer Infektion von *Helicobacter pylori* (Wotherspoon *et al.*, 1993). Hierzu implizierte eine Studie bei Katzen einen Zusammenhang zwischen einer gastrischen Infektion von *Helicobacter* spp. und dem Vorhandensein gastrischer MALT-Lymphome. Bei Hunden ist derzeit noch nicht bewiesen, dass eine bakterielle Infektion zur Entwicklung eines Lymphoms führen kann (Bridgeford *et al.*, 2008). Im Kontext des Zusammenhangs zwischen Entzündungen und Entwicklungen eines gastrointestinalen Lymphoms wurde früher eine Rasse-

spezifische lymphoplasmazelluläre Enteropathie bei Basenji beschrieben, die durch eine signifikant erhöhte Anzahl der Immunglobulin-haltigen Zellen im GIT gekennzeichnet ist (MacLachlan *et al.*, 1988). Interessanterweise wurde über eine nachfolgende Entwicklung eines gastrointestinalen Lymphoms bei Basenji mit Enteropathie berichtet, obwohl in der Literatur weitere ähnliche Berichte sowie eine Prädisposition für gastrointestinale Lymphome bei dieser Rasse nicht gefunden werden können (Breitschwerdt *et al.*, 1982).

Humane primäre intestinale T-Zell-Lymphome zeigen interessanterweise ähnliche histopathologische Bilder und Prognosen wie bei Hunden auf. Die Ätiologie der humanen intestinalen T-Zell-Lymphome ist in letzter Zeit mehr und mehr ersichtlich geworden. Patienten mit RCD zeigen eine erhöhte Anzahl der intraepithelialen CD8⁺-T-Zellen und haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines intestinalen T-Zell-Lymphoms, gut bekannt als Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom (EATL) (de Mascarel *et al.*, 2008). Dieser enge Zusammenhang zwischen der inflammatorischen Bedingungen und EATL konnte mittels PARR-Analyse sowie Sequenzierung durch Identifizierung der klonalen Lymphozyten, die bei den Enteropathien und intestinalen Lymphomen konsistent beobachtet wurden, nachgewiesen werden (Ashton-Key *et al.*, 1997, Carbonnel *et al.*, 1998, Daum *et al.*, 2001). In dieser ätiologischen Betrachtung aus der Humanmedizin wäre die Weizen-sensitive Enteropathie beim Irish Setter am nächsten mit RCD bei Menschen vergleichbar, aber wiederum wird bei dieser Rasse keine Rasse-Prädisposition für intestinales Lymphom berichtet (Batt *et al.*, 1987).

Pathogenetische, histopathologische und immunphänotypische Eigenschaften von EATL, die auch zur Charakterisierung des kaninen intestinalen Lymphoms einen Hinweis geben könnten, werden in letzter Zeit näher dokumentiert. Derzeit wird EATL aufgrund der Pathogenese, der histopathologischen Bilder und Immunphänotypen in zwei Typen eingeteilt: Der Typ I ist ätiologisch mit RCD stark assoziiert und macht die Mehrheit der EATL aus. Der Typ II scheint dagegen mit RCD nicht verbunden zu sein und wird nur sporadisch beobachtet. Als gemeinsame histopathologische Eigenschaft der beiden Typen kann eine maligne Proliferation der intraepithelialen CD8⁺-T-Zellen und ein ausgeprägter Epitheliotropismus genannt werden. Es gibt jedoch bestimmte immunphänotypische und histopathologische Unterschiede, durch die die beiden

Typen unterschieden werden können. Die Immunphänotypen vom Typ I sind $CD3^+$, $CD8^{+/-}$, $CD56^-$, $TCR\beta^{+/-}$ und maligne Lymphozyten neigen zur Herabregulierung der Phänotyp-Marker, wie CD8 und TCR β , während der Progression von RCD. Im Gegensatz dazu besitzt der Typ II meistens $CD3^+$, $CD8^+$, $CD56^+$, $TCR\beta^+$ oder auch $\gamma\delta^+$, und CD8 wird konstant exprimiert. Der klinische Verlauf der beiden Typen, wie bei kaninem intestinalen Lymphom, ist sehr aggressiv mit einer medianen Überlebenszeit von zehn Monaten (Arps und Smith, 2013). Die ersten Autoren, die eine Ähnlichkeit zwischen EATL und einem kaninen intestinalen Lymphom feststellten, sind Turinelli und Kollegen. In ihrer Studie wurden fünf Fälle der kaninen Large-Granular-Lymphocyte-Lymphome histopathologisch sowie immunhistochemisch dargestellt. Ein Fall davon wies eine massive Infiltration neoplastischer Lymphozyten in alle Darmschichten mit einer ulzerativen Atrophie der Villi und chronischer plasmazellulärer Enteritis auf. Obwohl die neoplastischen Lymphozyten in Blut, Knochenmark, abdominalen Lymphknoten, Leber und Milz disseminiert waren, deuteten die Autoren aufgrund der Prädominanz der neoplastischen Lymphozyten im Darm auf eine Ähnlichkeit mit EATL hin. Von großem Wert dieser Studie ist, dass die Immunphänotypen der neoplastischen Lymphozyten ($CD3^+$, $CD8^+$) aufgezeigt werden konnten, die mit den Immunphänotypen der malignen Lymphozyten von EATL übereinstimmen (Turinelli *et al.*, 2005). Allerdings müssen Ähnlichkeiten sowie Unterschiede der Eigenschaften der Tumorerkrankungen zwischen Menschen und Kleintieren vorsichtig interpretiert werden. Bei felines gastrointestinalen Lymphomen wurde beispielweise eine ähnliche histopathologische Eigenschaft mit EATL wie Epitheliotropismus beschrieben. Aber die relativ günstigere Prognose der felines gastrointestinalen Lymphome stimmt mit den klinischen Bildern bei Menschen und Hunden nicht überein (Moore *et al.*, 2012). Ferner muss beachtet werden, dass Immunphänotypen der neoplastischen Zellen zwischen verschiedenen Spezies völlig unterschiedlich sein können, obwohl die histopathologischen Bilder ähnlich erscheinen. Bei humanen epitheliotropen kutanen T-Zell-Lymphomen weisen beispielweise neoplastische Lymphozyten meist $CD4^+$ und $\alpha\beta^+$ auf, während sie bei kaninen epitheliotropen kutanen T-Zell-Lymphomen $CD8^+$ und $\gamma\delta^+$ besitzen. Außerdem wurden bislang keine $CD4^+$ -T-Zell-Lymphome bei kaninen epitheliotropen kutanen Lymphomen beschrieben (Moore *et al.*, 2009).

Obwohl ein ätiologischer Zusammenhang zwischen Gastroenteritiden vor allem IBD und kaninen gastrointestinalen Lymphomen lang vermutet wurde, fehlen noch Studien, die dies letztlich bestätigen. In letzter Zeit wurden jedoch einige interessante Studien durchgeführt, die auf eine potentielle Beziehung zwischen Gastroenteritiden und einer Entwicklung der gastrointestinalen Lymphome hinweisen können. In einer Studie wurde mittels Gene-Scanning eine Klonalität bei 47 Hunden mit IBD analysiert, um eine Diversität der Lymphozyten zu ermitteln. 38 % der Fälle (18/47) wiesen eine Oligoklonalität entweder im Immunglobulin- oder TCR-Gen auf, was als reduzierte Diversität der Lymphozytenpopulation bei Hunden mit IBD interpretiert werden kann. Erstaunlicherweise zeigten ca. 15 % der Fälle (7/47) eine Monoklonalität im Immunglobulin-Gen und ein Fall wies eine TCR-Monoklonalität auf. Es ist bemerkenswert, dass 17 % der Fälle in Bezug auf IBD monoklonale Lymphozyten besaßen und die überwiegende Mehrheit der Monoklonalitätsfälle der B-Zell-Phänotyp war. Die Autoren der Studie berichteten außerdem, dass ein Fall mit IBD, der eine Immunglobulin-Monoklonalität gezeigt hatte, nachfolgend ein gastrointestinales Lymphom entwickelte, das post mortem bestätigt wurde (Olivero *et al.*, 2011). Wenn man berücksichtigt, dass bei kaninen gastrointestinalen Lymphomen mehrheitlich der T-Zell-Phänotyp vorkommt, lassen sich diese Ergebnisse unter Voraussetzung der linearen Entwicklung des Lymphoms von der Gastroenteritis dennoch schwer interpretieren. In Anbetracht dessen, dass ätiologische Faktoren für IBD noch unbekannt sind, kann vermutet werden, dass eine bestimmte inflammatorische Bedingung zu einer für T- oder B-Zellen begünstigten Proliferation und somit zu einer nachfolgenden malignen Transformation führt.

Andere Studien zur Immunzellpopulation und zur Charakterisierung der anti-apoptotischen Zellen bei Hunden mit IBD weisen der obigen Studie entgegen auf eine für T-Zell-Proliferation bevorzugte Bedingung hin. Wie schon beschrieben kommen physiologisch CD8⁺-T-Zellen überwiegend im Epithel und CD4⁺-T-Zellen in der Lamina propria vor. Bei Hunden mit IBD wurde im Vergleich zur gesunden Kontroll-Gruppe eine signifikant erhöhte Anzahl der CD4⁺-T-Zellen sowie IgG⁺-Plasmazellen in der Lamina propria im Dünndarm beobachtet, aber es wurde keine signifikant erhöhte Anzahl der CD8⁺-T-Zellen in der Lamina propria festgestellt. Dieses Vermehrungsmuster der Lymphozyten spiegelt die

physiologische Verteilung der Lymphozyten im GIT wider. Während im Epithel auch eine signifikant erhöhte Anzahl der intraepithelialen CD3⁺-Zellen identifiziert wurde, war der Anteil der Subtypen (CD4⁺, CD8⁺, $\alpha\beta$ ⁺, $\gamma\delta$ ⁺) paradoxerweise nicht vermehrt, was auf die Schwierigkeit bei der Auswertung der Zell-Zahl auf den Gefrierschnitten zurückzuführen sei (German *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, dass die Proliferation der Lymphozyten bei IBD nach der physiologischen Verteilung in Darmschichten erfolgt. Ferner wies eine Studie zufolge Lymphozyten unter den inflammatorischen Bedingungen von IBD eine Anti-Apoptose auf. Dies ist von besonderer Bedeutung, da nicht B-Zellen, sondern T-Zellen eine erhöhte Resistenz gegen Apoptose aufwiesen, was mittels IHC durch Detektion der Expressierung von Bcl-2 und Kaspase-3 ausgewertet wurde (Jergens *et al.*, 2014). Bei dieser Untersuchung wurde jedoch die Expressierung dieser Proteine anscheinend für Zellen in der Lamina propria analysiert. In zukünftigen Studien sollte abgeklärt werden, ob auch intraepitheliale T-Zellen eine anti-apoptotische Eigenschaft zeigen können.

9. Zukünftige Perspektiven

Wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, kann die PARR-Analyse nicht nur zur Diagnosestellung der kaninen intestinalen Lymphome, sondern auch zur Phänotypisierung beitragen. Obwohl es in der vorliegenden Studie nicht ausgenutzt wurde, hat die PARR-Analyse ein weiteres analytisches Potenzial inne: Die mit der Gel-Elektrophorese aufgetrennten Einzelbänder können weiter isoliert und sequenziert werden. Damit kann eine Kontinuität der klonalen Lymphozyten analysiert werden. Um einen Zusammenhang zwischen Gastroenteritiden und der Entwicklung der kaninen gastrointestinalen Lymphome feststellen zu können, sind chronologisch aufeinanderfolgende Analysen der Klonalität bei Hunden mit Gastroenteritiden unabdingbar. In zukünftigen Studien mittels PARR-Analyse könnte folgendes abgeklärt werden:

1. Hunde mit einer chronischen Gastroenteritis zeigen ein verringertes Repertoire der Lymphozyten im GIT, nämlich Oligoklonalität.
2. Wenn diese Hunde ein gastrointestinales Lymphom entwickeln sollten, stammen die monoklonalen neoplastischen Lymphozyten aus einer der oligoklonalen Lymphozytpopulationen, die schon bei der Gastroenteritis

vorhanden waren, nämlich der linearen Entwicklung der neoplastischen Zellen.

Um diese Hypothesen zu bestätigen, muss überprüft werden, wie es schon in den Studien zur chronologischen Klonalitätsanalyse bei RCD und EATL erfolgreich durchgeführt wurde, ob die Basensequenzen des monoklonalen Bandes eines Lymphoms mit denen der oligoklonalen Bänder einer Gastroenteritis komplett übereinstimmen (Ashton-Key *et al.*, 1997, Carbonnel *et al.*, 1998, Daum *et al.*, 2001).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Diagnose des kaninen intestinalen Lymphoms erfolgt mit der morphologischen Untersuchung wie Zytologie oder Histopathologie. Diese morphologische Untersuchung kann jedoch wegen der mit neoplastischen Lymphozyten oft vergesellschafteten lymphoplasmazellulären Enteritis (LPE) erschwert werden. Dies ist vor allem der Fall, wenn endoskopisch entnommene Gewebeprobe eingesetzt werden. Die Klonalitätsanalyse vom Antigen-Rezeptor-Gen-Rearrangement der Lymphozyten mittels Polymerasekettenreaktion (PARR) gilt als sehr nützlich bei lymphatischen Neoplasien, zur Diagnose, Bestimmung des Tumorstadiums, Auswertung der minimalen Resterkrankung und Entdeckung eines Lymphoms im Frühstadium. Einer vorläufigen Studie zufolge scheint jedoch die Wertigkeit der PARR-Analyse, Gastroenteritiden und kanine gastrointestinale Lymphome zu differenzieren, relativ limitiert zu sein. Die Gründe hierfür liegen im Vorhandensein der mit neoplastischen Lymphozyten vergesellschafteten LPE und an der Verwendung der endoskopisch entnommenen kleinen Gewebeprobe. Diese zwei Faktoren können die Detektion eines monoklonalen Bandes durch ein prominentes polyklonales Muster behindern. In der vorliegenden retrospektiven Studie wurden deshalb Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Volldarmgewebeprobe von 29 kaninen intestinalen Lymphomen mit histopathologischen definitiven Diagnosen eingeschlossen, um repräsentative DNA-Proben von den neoplastischen Lymphozyten analysieren zu können. Ferner wurden 14 Fälle mit Enteritiden und 15 gastrointestinal gesunde Kontroll-Fälle eingeschlossen. Damit konnten eine Sensitivität von 76 % und eine Spezifität von 100 % ermittelt werden. Im Vergleich zur primären Studie wurde trotz des minimalen Einsatzes der Primer in der vorliegenden Studie die Sensitivität verbessert. Dies unterstreicht die Wichtigkeit, zur PARR-Analyse für kanine intestinale Lymphome eine repräsentative Tumor-Probe aus Gewebeprobe einzuschließen. Außerdem konnte mit Hilfe der Immunhistochemie und der PARR-Analyse gezeigt werden, dass bei kaninen intestinalen Lymphomen eher der T-Zell-Phänotyp als der B-Zell-Phänotyp vorkommt (85 %; 95 %-Konfidenzintervall (KI) 65-96 % beziehungsweise 15 %; KI 4-35 %). Die histopathologischen und immunphänotypischen Eigenschaften des kaninen intestinalen T-Zell-Lymphoms scheinen denen des humanen intestinalen T-Zell-

Lymphoms ähnlich zu sein, vor allem dem Enteropathie-assoziierten T-Zell-Lymphom (EATL), das ätiologisch mit der Gluten-sensitiven Enteropathie, refraktärer Zöliakie (refractory Celiac disease, RCD) verbunden ist. Genauso wie die etablierte Beziehung zwischen RCD und EATL wurde in letzter Zeit auch ein potenzieller Zusammenhang zwischen chronischen Gastroenteritiden und der Entwicklung der kaninen gastrointestinalen Lymphome impliziert. In zukünftigen Studien könnte die PARR-Analyse zur Auswertung der Diversität der Lymphozyten bei Hunden mit chronischen Gastroenteritiden beitragen. Ferner könnte eine potenzielle lineare Entwicklung der kaninen gastrointestinalen Lymphome aus chronischen Gastroenteritiden durch Detektion eines gemeinsamen Zell-Klons abgeklärt werden.

VI. SUMMARY

The diagnosis of canine intestinal lymphoma by morphological examination is still challenging because lymphoplasmacellular enteritis (LPE) is concomitantly seen with neoplastic lymphocytes. This is the case especially when endoscopic tissue specimens are used. Clonality assessment of antigen receptor gene rearrangement by polymerase chain reaction (PARR) in canine lymphatic neoplasia has been shown to be very useful for the diagnosis of canine lymphoma, tumor stage assessment, evaluation of minimal residual disease and detection of early tumor stages. The utility of PARR analysis to distinguish gastroenteritis and gastrointestinal lymphoma in dogs has been, however, reported to be relatively limited. The reported limited utility of PARR analysis in canine gastrointestinal lymphoma can be due to the existence of concomitant LPE with neoplastic lymphocytes and to the use of endoscopic small samples, which may obscure the detection of a monoclonal band by polyclonal smear pattern on PARR analysis. In order to gain representative DNA samples from lymphoma cells, we therefore used formalin-fixed, paraffin-embedded full-thickness tissue specimens of 29 canine primary intestinal lymphoma cases with histopathological definitive diagnoses in this retrospective study. To assess the specificity of PARR analysis, 14 enteritis and 15 healthy control cases were involved. A sensitivity of 76% and a specificity of 100% was calculated. Compared to the initial report the sensitivity was improved despite the usage of a minimal primer setting in our study, which underlines the importance that representative DNA samples from lymphoma cells should be involved for PARR analysis. Furthermore, we revealed a predominance of T-cell phenotype compared to B-cell phenotype (85%; 95% confidence interval (CI) 65-96% and 15%; CI 4-35%, respectively), determined by immunohistochemistry and PARR analysis. The histopathological and immunophenotypic features of canine intestinal lymphoma seem similar to human intestinal T-cell lymphoma, especially enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL), which is etiologically associated with gluten-sensitive enteropathy, namely refractory Celiac disease (RCD). Like the relationship between RCD and EATL, a possible relation between chronic gastroenteritis and development of canine gastrointestinal lymphoma has recently been implicated. In future studies PARR analysis may enable an assessment of lymphocyte diversity in dogs with

chronic gastroenteritis and could also elucidate a possible linear development of gastrointestinal lymphoma from chronic gastroenteritis by detecting a common lymphocyte clone between them.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Affolter VK, Gross TL, Moore PF. Indolent cutaneous T-cell lymphoma presenting as cutaneous lymphocytosis in dogs. *Vet Dermatol.* 2009;20(5-6):577-85.
2. Arps DP, Smith LB. Classic versus type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: diagnostic considerations. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(9):1227-31.
3. Ashton-Key M, Diss TC, Pan L, Du MQ, Isaacson PG. Molecular analysis of T-cell clonality in ulcerative jejunitis and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 1997;151(2):493-8.
4. Askling J, Brandt L, Lapidus A, Karlen P, Bjorkholm M, Lofberg R, Ekblom A. Risk of haematopoietic cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2005;54(5):617-22.
5. Avery A. Molecular diagnostics of hematologic malignancies. *Top Companion Anim Med.* 2009;24(3):144-50.
6. 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(4):196-207.
7. Batt RM, McLean L, Carter MW. Sequential morphologic and biochemical studies of naturally occurring wheat-sensitive enteropathy in Irish setter dogs. *Dig Dis Sci.* 1987;32(2):184-94.
8. Bonfanti U, Bertazzolo W, Bottero E, De Lorenzi D, Marconato L, Masserdotti C, Zatelli A, Zini E. Diagnostic value of cytologic examination of gastrointestinal tract tumors in dogs and cats: 83 cases (2001-2004). *J Am Vet Med Assoc.* 2006;229(7):1130-3.
9. Breitschwerdt EB, Waltman C, Hagstad HV, Ochoa R, McClure J, Barta O. Clinical and epidemiologic characterization of a diarrheal syndrome in Basenji dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1982;180(8):914-20.
10. Bridgeford EC, Marini RP, Feng Y, Parry NM, Rickman B, Fox JG. Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable

hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;123(1-2):106-13.

11. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol.* 1993;121(5):1121-32.
12. Burnett RC, Blake MK, Thompson LJ, Avery PR, Avery AC. Evolution of a B-cell lymphoma to multiple myeloma after chemotherapy. *J Vet Intern Med.* 2004;18(5):768-71.
13. 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(1):32-41.
14. Carbonnel F, Grollet-Bioul L, Brouet JC, Teilhac MF, Cosnes J, Angonin R, Deschaseaux M, Chatelet FP, Gendre JP, Sigaux F. Are complicated forms of celiac disease cryptic T-cell lymphomas? *Blood.* 1998;92(10):3879-86.
15. 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(1):20-9.
16. Cook JE, Beverley PC. Analysis of lymphocyte diversity in the elderly: heteroduplex analysis and alternative techniques. *Exp Gerontol.* 2001;36(3):583-9.
17. Couto CG, Rutgers HC, Sherding RG, Rojko J. Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *J Vet Intern Med.* 1989;3(2):73-8.
18. Coyle KA, Steinberg H. Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol.* 2004;41(2):141-6.
19. Daum S, Weiss D, Hummel M, Ullrich R, Heise W, Stein H, Riecken EO, Foss HD. Frequency of clonal intraepithelial T lymphocyte proliferations in enteropathy-type intestinal T cell lymphoma, coeliac disease, and refractory sprue. *Gut.* 2001;49(6):804-12.
20. de Mascarel A, Belleannee G, Stanislas S, Merlio C, Parrens M, Laharie D, Dubus P, Merlio JP. Mucosal intraepithelial T-lymphocytes in refractory celiac disease: a neoplastic population with a variable CD8 phenotype. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(5):744-51.

21. De Zan G, Zappulli V, Cavicchioli L, Di Martino L, Ros E, Conforto G, Castagnaro M. Gastric B-cell lymphoma with Mott cell differentiation in a dog. *J Vet Diagn Invest.* 2009;21(5):715-9.
22. Dylke J, Lopes J, Dang-Lawson M, Machtaler S, Matsuuchi L. Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor (BCR). *Immunol Lett.* 2007;112(1):47-57.
23. Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Mitchell RS, Brown MS, Robetorye RS. PCR analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in polyclonal processes can yield pseudoclonal bands as an artifact of low B cell number. *J Mol Diagn.* 2000;2(2):92-6.
24. Elwood CM, Hamblin AS, Batt RM. Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC class II expression in the canine small intestine. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;58(3-4):195-207.
25. Evans SE, Bonczynski JJ, Broussard JD, Han E, Baer KE. Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2006;229(9):1447-50.
26. Ferrer L, Fondevila D, Rabanal R, Ramis A. Detection of T lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. *J Comp Pathol.* 1992;106(3):311-4.
27. Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P, Blavier A, Bonnefont C, Chabanne L, Marchal T, Cadore JL, Goy-Thollot I, Ledieu D, Ghernati I, Magnol JP. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol.* 2002;39(1):92-109.
28. Frances M, Lane AE, Lenard ZM. Sonographic features of gastrointestinal lymphoma in 15 dogs. *J Small Anim Pract.* 2013;54(9):468-74.
29. Frank JD, Reimer SB, Kass PH, Kiupel M. Clinical outcomes of 30 cases (1997-2004) of canine gastrointestinal lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2007;43(6):313-21.
30. Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer.* 1972;29(1):252-60.

31. French RA, Seitz SE, Valli VE. Primary epitheliotropic alimentary T-cell lymphoma with hepatic involvement in a dog. *Vet Pathol.* 1996;33(3):349-52.
32. 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(12):1673-6.
33. Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, Marconato L, Comazzi S. Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;121(3-4):179-88.
34. 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(1-2):47-56.
35. German AJ, Hall EJ, Day MJ. Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *J Comp Pathol.* 1999a;120(2):129-45.
36. German AJ, Hall EJ, Day MJ. Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *J Vet Intern Med.* 2001;15(1):14-25.
37. German AJ, Hall EJ, Moore PF, Ringler DJ, Newman W, Day MJ. The distribution of lymphocytes expressing alphabeta and gammadelta T-cell receptors, and the expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 in the canine intestine. *J Comp Pathol.* 1999b;121(3):249-63.
38. Gonzalez M, Gonzalez D, Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Chillon MC, Balanzategui A, Mateos MV, Alaejos I, Langerak AW, Orfao A, Van Dongen JJ, San Miguel JF. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica.* 1999;84(9):779-84.
39. Groenen PJ, Langerak AW, van Dongen JJ, van Krieken JH. Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematop.* 2008;1(2):97-109.
40. Hawkes EA, Wotherspoon A, Cunningham D. Diagnosis and management of rare gastrointestinal lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(12):2341-50.

41. Heyderman E. Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J Clin Pathol.* 1979;32(10):971-8.
42. Iijima T, Inadome Y, Noguchi M. Clonal proliferation of B lymphocytes in the germinal centers of human reactive lymph nodes: possibility of overdiagnosis of B cell clonal proliferation. *Diagn Mol Pathol.* 2000;9(3):132-6.
43. Isaacson PG, Du MQ. Gastrointestinal lymphoma: where morphology meets molecular biology. *J Pathol.* 2005;205(2):255-74.
44. Isaacson PG, Spencer J. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Histopathology.* 1987;11(5):445-62.
45. Jergens A, Young J, Moore D, Wang C, Hostetter J, Augustine L, Allenspach K, Schmitz S, Mosher C. Bcl-2/Caspase 3 mucosal imbalance favors T cell resistance to apoptosis in dogs with inflammatory bowel disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;158(3-4):167-74.
46. Jones M, Cordell JL, Beyers AD, Tse AG, Mason DY. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J Immunol.* 1993;150(12):5429-35.
47. 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(4):468-76.
48. 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.* 2009a;71(4):535-8.
49. 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.* 2009b;71(5):555-9.
50. 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(3):145-9.

51. Keller SM, Moore PF. A novel clonality assay for the assessment of canine T cell proliferations. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;145(1-2):410-9.

52. Kinoshita K, Honjo T. Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(7):493-503.

53. Kleinschmidt S, Meneses F, Nolte I, Hewicker-Trautwein M. Retrospective study on the diagnostic value of full-thickness biopsies from the stomach and intestines of dogs with chronic gastrointestinal disease symptoms. *Vet Pathol.* 2006;43(6):1000-3.

54. Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers B, Hiddemann W, Grothaus-Pinke B, Reinartz G, Brockmann J, Temmesfeld A, Schmitz R, Rube C, Probst A, Jaenke G, Bodenstein H, Junker A, Pott C, Schultze J, Heinecke A, Parwaresch R, Tiemann M. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: I. Anatomic and histologic distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German Multicenter Study GIT NHL 01/92. *J Clin Oncol.* 2001;19(18):3861-73.

55. Koch P, Probst A, Berdel WE, Willich NA, Reinartz G, Brockmann J, Liersch R, del Valle F, Clasen H, Hirt C, Breitsprecher R, Schmits R, Freund M, Fietkau R, Ketterer P, Freitag EM, Hinkelbein M, Heinecke A, Parwaresch R, Tiemann M. Treatment results in localized primary gastric lymphoma: data of patients registered within the German multicenter study (GIT NHL 02/96). *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7050-9.

56. Kodama A, Sakai H, Kobayashi K, Mori T, Maruo K, Kudo T, Yanai T, Masegi T. B-cell intestinal lymphoma with Mott cell differentiation in a 1-year-old miniature Dachshund. *Vet Clin Pathol.* 2008;37(4):409-15.

57. Lana SE, Jackson TL, Burnett RC, Morley PS, Avery AC. 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(2):329-34.

58. Langerak AW, Groenen PJ, Bruggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, Boone E, Carter GI, Catherwood M, Davi F, Delfau-Larue MH, Diss T,

- Evans PA, Gameiro P, Garcia Sanz R, Gonzalez D, Grand D, Hakansson A, Hummel M, Liu H, Lombardia L, Macintyre EA, Milner BJ, Montes-Moreno S, Schuurig E, Spaargaren M, Hodges E, van Dongen JJ. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159-71.
59. Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, Schuurig E, Al Saati T, van Dongen JJ, van Krieken JH. Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2007;21(2):222-9.
60. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia*. 1997;11(12):2192-9.
61. Langner KF, Joetzke AE, Nerschbach V, Eberle N, Schuberth HJ, 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.
62. Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Ilar j*. 2005;46(3):269-79.
63. Ling FC, Clarke CE, Lillcrap D. Positive immunoglobulin gene rearrangement study by the polymerase chain reaction in a colonic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 1992;98(1):116-9.
64. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *Ilar j*. 2005;46(3):258-68.
65. Luckschander N, Pfammatter NS, Sidler D, Jakob S, Burgener IA, Moore PF, Zurbriggen A, Corazza N, Brunner T. Phenotyping, functional characterization, and developmental changes in canine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Vet Res*. 2009;40(6):58.
66. MacLachlan NJ, Breitschwerdt EB, Chambers JM, Argenzio RA, De

- Buyscher EV. Gastroenteritis of basenji dogs. *Vet Pathol.* 1988;25(1):36-41.
67. Marchetti V, Benetti C, Citi S, Taccini V. Paraneoplastic hypereosinophilia in a dog with intestinal T-cell lymphoma. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(3):259-63.
68. Mason DY, Gatter KC. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J Clin Pathol.* 1987;40(9):1042-54.
69. Miura T, Maruyama H, Sakai M, Takahashi T, Koie H, Yamaya Y, Shibuya H, Sato T, Watari T, Tokuriki M, Hasegawa A. Endoscopic findings on alimentary lymphoma in 7 dogs. *J Vet Med Sci.* 2004;66(5):577-80.
70. 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(13):5654-61.
71. Moore PF, Affolter VK, Graham PS, Hirt B. Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: an investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality. *Vet Dermatol.* 2009;20(5-6):569-76.
72. Moore PF, Rodriguez-Bertos A, Kass PH. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Vet Pathol.* 2012;49(4):658-68.
73. Moynihan MJ, Bast MA, Chan WC, Delabie J, Wickert RS, Wu G, Weisenburger DD. Lymphomatous polyposis. A neoplasm of either follicular mantle or germinal center cell origin. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(4):442-52.
74. Oinonen R, Franssila K, Teerenhovi L, Lappalainen K, Elonen E. Mantle cell lymphoma: clinical features, treatment and prognosis of 94 patients. *Eur J Cancer.* 1998;34(3):329-36.
75. Olivero D, Turba ME, Gentilini F. Reduced diversity of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in chronic inflammatory gastrointestinal diseases in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144(3-4):337-45.
76. Otter R, Bieger R, Kluin PM, Hermans J, Willemze R. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma in a population-based registry. *Br J Cancer.* 1989;60(5):745-50.

77. Ozaki K, Yamagami T, Nomura K, Narama I. T-cell lymphoma with eosinophilic infiltration involving the intestinal tract in 11 dogs. *Vet Pathol.* 2006;43(3):339-44.
78. 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(2):301-10.
79. Patnaik AK, Hurvitz AI, Johnson GF. Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet Pathol.* 1977;14(6):547-55.
80. 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(2):158-66.
81. Rassnick KM, Moore AS, Collister KE, Northrup NC, Kristal O, Chretien JD, Bailey DB. Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. *J Vet Intern Med.* 2009;23(2):317-22.
82. Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:175-207.
83. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:97-121.
84. Rezuke WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin Chem.* 1997;43(10):1814-23.
85. 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.* 2011a;25(2):285-91.
86. 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.* 2011b;25(2):292-6.

87. Sato M, Yamzaki J, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet J.* 2013;195(3):319-24.

88. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:359-83.

89. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591-619.

90. Snead EC. Large granular intestinal lymphosarcoma and leukemia in a dog. *Can Vet J.* 2007;48:848-851.

91. Sonea IM, Jergens AE, Sacco RE, Niyo Y, Merten E, Kauffman LK, Moore PF. Flow cytometric analysis of colonic and small intestinal mucosal lymphocytes obtained by endoscopic biopsy in the healthy dog. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000;77(1-2):103-19.

92. Stacchini A, Carucci P, Pacchioni D, Accinelli G, Demurtas A, Aliberti S, Bosco M, Bruno M, Balbo Mussetto A, Rizzetto M, Bussolati G, De Angelis C. Diagnosis of deep-seated lymphomas by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration combined with flow cytometry. *Cytopathology.* 2012;23(1):50-6.

93. Stacy NI, Nabity MB, Hackendahl N, Buote M, Ward J, Ginn PE, Vernau W, Clapp WL, Harvey JW. B-cell lymphoma with Mott cell differentiation in two young adult dogs. *Vet Clin Pathol.* 2009;38(1):113-20.

94. Steinberg H, Dubielzig RR, Thomson J, Dzata G. Primary gastrointestinal lymphosarcoma with epitheliotropism in three Shar-pei and one boxer dog. *Vet Pathol.* 1995;32(4):423-6.

95. Stokes C, Waly N. Mucosal defence along the gastrointestinal tract of cats and dogs. *Vet Res.* 2006;37(3):281-93.

96. Stonehewer J, Simpson JW, Else RW, Macintyre N. Evaluation of B and T lymphocytes and plasma cells in colonic mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease. *Res Vet Sci.* 1998;65(1):59-63.

97. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hahlen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, Tibbe GJ, De Bruijn MA, Van Dongen JJ. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999;13(2):196-205.
98. Takanosu M, Tadika T, Kobayashi T. Heteroduplex polymerase chain reaction is essential for canine receptor rearrangement analysis. *J Vet Diagn Invest*. 2010;22(5):760-3.
99. 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(1-2):163-7.
100. Thilakaratne DN, Mayer MN, MacDonald VS, Jackson ML, Trask BR, 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. *Can Vet J*. 2010;51(1):79-84.
101. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983;302(5909):575-81.
102. Turinelli V, Marchal T, Ponce F, Bonnefont-Rebeix C, Fournel-Fleury C. Aggressive large granular lymphocytes lymphomas in five dogs: a clinical cytohistological and immunological study. *Comp Clin Pathol*. 2005; 13:109–118.
103. Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS, Moore PF. Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol*. 2006;43(3):241-56.
104. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, 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(12):2257-317.
105. Vernau W, Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias

and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;69(2-4):145-64.

106. Washabau RJ, Day MJ, Willard MD, Hall EJ, Jergens AE, Mansell J, Minami T, Bilzer TW. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J Vet Intern Med.* 2010;24(1):10-26.

107. Weirich G, Funk A, Hoepner I, Heider U, Noll S, Putz B, Fellbaum C, Hofler H. PCR-based assays for the detection of monoclonality in non-Hodgkin's lymphoma: application to formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and decalcified bone marrow samples. *J Mol Med (Berl).* 1995;73(5):235-41.

108. Wiersema MJ, Vilmann P, Giovannini M, Chang KJ, Wiersema LM. Endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy: diagnostic accuracy and complication assessment. *Gastroenterology.* 1997;112(4):1087-95.

109. 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(3-4):179-96.

110. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1993;342(8871):575-7.

111. 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(3-4):375-82.

112. 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(2):197-202.

113. Yamamoto S, Nakase H, Yamashita K, Matsuura M, Takada M, Kawanami C, Chiba T. Gastrointestinal follicular lymphoma: review of the literature. *J Gastroenterol.* 2010;45(4):370-88.

-
114. 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(4):897-903.

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Immunglobulin-Struktur.

CDR: Komplementaritäts-determinierende Region, C_H: konstante Domäne der schweren Ketten, C_L: konstante Domäne der leichten Ketten, V_H: variable Domäne der schweren Ketten, V_L: variable Domäne der leichten Ketten

- Abbildung 2: Schematische Darstellung der V-D-J-Rekombination.

V-Gene: variable Gene, D-Gene: diversity-Gene, J-Gene: joining-Gene, C-Gene: constant-Gene. mRNA: messenger RNA (Ribonukleinsäure)

- Abbildung 3: Schematische Darstellung der PARR-Analyse.

Neoplastische monoklonale Lymphozyten werden auf der Gel-Elektrophorese als ein Band (oder zwei Bänder) dargestellt (Bahn links, Lym.). Reaktive polyklonale Lymphozyten weisen hingegen ein Abstrich-Muster (Smear) auf (Bahn rechts, Entz.).

- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Heteroduplex-Analyse nach Langerak *et al.*, 1997.

Vor der Denaturierung und Rehybridisierung der PCR-Produkte sind die Basensequenzen der junktionalen Region der PCR-Produkte komplementär zugeordnet (oben links). Durch die Denaturierung und Rehybridisierung wird eine Duplex-Formation induziert (unten links). Die junktionale Region von Homoduplexen ist komplementär richtig zugeordnet (monoklonale Zellen), während die von Heteroduplexen komplementär nicht richtig zugeordnet ist (monoklonale Zellen in polyklonalen Zellen sowie polyklonale Zellen). Bei Heteroduplexen entsteht eine Konformationsveränderung (Wölbung), durch die auf der Gel-Elektrophorese Heteroduplexe langsamer als Homoduplexe migrieren (rechts).

- Figure 1: Histopathology, immunohistochemistry and detection of antigen receptor gene rearrangements. Jejunum, T-cell lymphoma.

(A) Diffuse infiltration with neoplastic round cells, Giemsa staining, bar: 25 μm .

Neoplastic cells were positive for CD3 (B), and negative for CD20 and CD79a (C and D, respectively), counterstained with haematoxylin, bar: 50 μm . (E) Detection of rearrangement for TCRG (left, PAGE) and IGH (right, agarose gel). PARR for TCRG shows monoclonality in both the native and heteroduplex samples

(indicated by an arrow), whereas for IGH no band is visible. Molecular weight indicates 100 and 200 bp.

- Figure 2: Detection of TCRG rearrangements on PAGE in lymphoma (lanes: 1–3), enteritis (lanes: 4–6) and normal cases (lanes: 7–9).

Monoclonal bands are indicated by arrows in lymphoma cases. Lanes 1–3, monoclonal; lanes 4–9, polyclonal; lane B, B-cell line, negative; lane T, T-cell line, monoclonal; lane N, no template DNA; lane M, 100 bp ladder.

- Figure 3: Heteroduplex analysis of TCRG PCR products on PAGE in three lymphoma cases.

Three lanes on the left represent native PCR products and on the right denatured and reannealed PCR products (heteroduplex). Monoclonal bands are indicated by arrows. Note that after heteroduplex formation, monoclonal bands are still apparent. Molecular weight indicates 100 and 200 bp.

IX. TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 1: Histopathologische Charakteristika der kaninen gastrointestinalen Lymphome nach Coyle und Steinberg, 2004.
- Table 1: Antibodies used for immunophenotyping of canine intestinal lymphomas (avidin-biotin complex method).
- Table 2: Primers used to amplify rearranged T-cell receptor gamma (TCRG) and immunoglobulin heavy chain gene (IGH) and to verify DNA integrity for immunoglobulin heavy constant mu gene (Cmu).
- Appendix: Canine intestinal lymphomas: summary of patient characteristics, anatomical location, molecular clonality, phenotyping on PARR and IHC, and conclusive phenotype, if applicable.

X. DANKSAGUNG

Mein herzlicher großer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Johannes Hirschberger für seine väterliche Großherzigkeit, mit der mein Promotionsstudium bereitwillig genehmigt wurde, für die Überlassung des interessanten Promotionsprojektes und für seine ständige Hilfsbereitschaft, die meine weiteren beruflichen Pläne enorm unterstützte.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Katrin Hartmann für die Bereitstellung der klinischen und laboratorischen Einrichtungen.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Mitdotorandinnen Nadine Holtermann und Imke Schöpfer für ihre Freundschaft, ohne die mein Einleben und Einarbeiten in die Klinik wesentlich schwerer gewesen wären.

Für die geduldige Unterstützung bei der Laborarbeit sei Dr. Karin Weber herzlich gedankt.

Bei Dr. Miriam Leipzig und Prof. Dr. Walter Hermanns aus dem Institut für Tierpathologie möchte ich mich von Herzen für die Durchführung der histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen bedanken.

Mein besonderes Dankeschön geht an alle Oberärzte der Onkologie und Dr. Isabella Zenker, Dr. Tina Meichner, Dr. Silja Laberke, Dr. Franziska Hergt und Dr. Katja Zimmermann für die Unterstützung mit ihren umfassenden fachlichen Kenntnissen. Mir gelten sie alle als großes Vorbild der Onkologen.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Melanie Wergin für die tiefen radioonkologischen Kenntnisse.

Herzlich möchte ich meinen guten Freunden Nicole Zenker, Michael Kirstein und Gregor Hengst für die sprachliche Korrektur danken, ohne die mein Doktorvater aufgegeben hätte, dieses Manuskript fertig zu lesen.

Weiterhin möchte ich herzlich der Stadt München für ihre hervorragende Hospitalität inklusive Oktoberfest danken, die mir einen gemütlichen Aufenthalt während des Promotionsstudiums ermöglichte.

Vor allem möchte ich meiner Freundin Tae Yoshino für ihre emotionale Unterstützung von Herzen danken.