

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf S. Müller

Genexpressionsanalysen und bioinformatische Analyse wurden am Laboratorium  
für funktionelle Genomanalyse (LAFUGA) der LMU München durchgeführt

## **Genexpression in der Haut atopischer Hunde**

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

von Paz Chantal Schamber  
aus Regensburg

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Müller

Korreferenten:  
Univ-Prof. Dr. Wolf  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Förster  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Erhard  
Univ.Prof. Dr. Kienzle

Tag der Promotion: 21.07.2012

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG .....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT .....	3
2.1.	Aufbau und Funktion der Haut.....	3
2.1.1.	Epidermis .....	3
2.1.1.1.	Stratum basale .....	4
2.1.1.2.	Stratum spinosum.....	5
2.1.1.3.	Stratum granulosum .....	5
2.1.1.4.	Stratum corneum .....	5
2.1.2.	Dermis .....	6
2.1.2.1.	Stratum papillare .....	6
2.1.2.2.	Stratum reticulare .....	7
2.1.3.	Subcutis .....	7
2.2.	Atopische Dermatitis.....	7
2.2.1.	Humane atopische Dermatitis .....	8
2.2.1.1.	Epidemiologie .....	8
2.2.1.2.	Klinik.....	9
2.2.1.3.	Prognose .....	10
2.2.2.	Canine atopische Dermatitis.....	11
2.2.2.1.	Epidemiologie .....	11
2.2.2.2.	Klinik.....	12
2.2.2.3.	Diagnose.....	12
2.2.2.4.	Therapie der cAD .....	13
2.2.2.4.1.	Allergenvermeidung.....	13
2.2.2.4.2.	Essentielle Fettsäuren.....	13
2.2.2.4.3.	Antihistaminika .....	14
2.2.2.4.4.	Glukokortikoide .....	14
2.2.2.4.5.	Cyclosporin .....	15
2.2.2.4.6.	Allergenspezifische Immuntherapie.....	15
2.2.3.	Pathogenese der atopischen Dermatitis.....	16
2.2.3.1.	Keratinozyten und Hautbarriere .....	17
2.2.3.2.	Veränderte Immunantwort bei AD.....	21
2.2.3.2.1.	Zytokinprofil .....	22
2.2.3.2.2.	Dendritische Zellen .....	23

---

2.2.3.2.3. Antigenpräsentation .....	25
2.2.3.2.4. T-Zell-homing .....	26
2.2.3.2.5. Regulatorische T-Zellen (T <sub>Reg</sub> ) .....	26
2.2.3.2.6. Eosinophile Granulozyten .....	27
2.2.3.3. Genetische Komponente .....	27
2.2.3.3.1. Kopplungsanalysen .....	29
2.2.3.3.2. Kandidatengenanalysen .....	33
2.2.3.4. Umwelteinflüsse und Provokationsfaktoren .....	37
2.2.3.4.2. Nahrungsmittel .....	39
2.2.3.4.3. Aeroallergene .....	40
2.2.3.4.4. Mikrobielle Besiedlung der Haut .....	40
2.2.3.4.5. Neuroimmunologische und psychische Faktoren .....	43
2.3. Histopathologie der atopischen Dermatitis .....	44
2.3.1. Histopathologie der humanen atopischen Dermatitis .....	44
2.3.2. Histopathologie der caninen atopischen Dermatitis .....	44
2.4. Microarray .....	47
2.5. Ziel der Arbeit .....	48
<b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>50</b>
3.1. Material .....	50
3.1.1. Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medikamente in alphabetischer Reihenfolge .....	50
3.1.2. Lösungen .....	51
3.1.3. Geräte in alphabetischer Reihenfolge .....	53
3.1.4. Verbrauchsmaterial und sonstiges Material in alphabetischer Reihenfolge .....	54
3.1.5. Antikörper für die Immunhistochemie .....	55
3.1.6. verwendete Fertig-Kits .....	55
3.1.7. Verwendete Software und Datenbanken .....	56
3.1.8. Hunde .....	57
3.2. Methoden .....	57
3.2.1. Einschlusskriterien .....	57
3.2.2. Behandlungsgruppen .....	58
3.2.3. Studienprotokoll .....	58
3.2.4. Gewinnung der Hautbiopsien .....	60

---

3.2.5.	RNA-Isolierung.....	61
3.2.5.1.	Vorsichtsmaßnahmen .....	62
3.2.5.2.	Trizol-Methode.....	62
3.2.5.3.	Natriumacetatfällung.....	64
3.2.6.	RNA-Konzentrationsbestimmung mittels spektralphotometrischer Untersuchung .....	65
3.2.7.	Beurteilung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer.....	66
3.2.8.	Genexpressionsanalysen mittels Agilent-Microarray-Technologie .....	67
3.2.8.1.	Design eines Agilent Custom-Arrays.....	69
3.2.8.2.	Annotationsliste.....	69
3.2.8.3.	Synthese der Fluoreszenz-markierten cRNA .....	70
3.2.8.4.	Aufreinigung der amplifizierten cRNA.....	74
3.2.8.5.	cRNA Konzentrationsbestimmung .....	75
3.2.8.6.	cRNA-Fragmentierung.....	76
3.2.8.7.	Hybridisierung.....	77
3.2.8.8.	Waschen der Microarrays.....	79
3.2.8.9.	Scannen der Microarrays und Auswertung der Scan-Files mittels Feature Extraction Software 10.7.3.1.....	79
3.2.9.	Datenfilterung.....	80
3.2.10.	Inter-Array Normalisierung und Datenvisualisierung in „R“ .....	81
3.2.11.	Statistische Auswertung mit Limma: Linear Models for Microarray Data .....	83
3.2.12.	Bioinformatische Auswertung und Daten-Visualisierung .....	86
3.2.12.1.	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery V.6.7 (DAVID)-Analyse .....	86
3.2.12.2.	KEGG-Pathway-Analyse .....	87
3.2.12.3.	Multi Experiment Viewer V.4.7.1 (MEV) .....	87
3.2.12.3.1.	Hierarchische Cluster-Analyse.....	88
3.2.12.3.2.	Self-Organizing Tree Algorithm (SOTA)-Analyse.....	89
3.2.12.4.	CoPub.....	90
3.2.13.	Verifizierung der Microarray-Ergebnisse mit quantitativer Real-time Reverse Transcription Polymerase Kettenreaktion .....	90
3.2.13.1.	cDNA-Synthese für die qPCR.....	90
3.2.13.2.	Erstellen von Primern für die qPCR.....	91
3.2.13.3.	qPCR .....	92

---

3.2.13.4. Auswertung .....	95
3.2.13.5. Bestätigung der Primer-Spezifität .....	97
3.2.14. Histologie .....	97
3.2.14.1. Fixation.....	98
3.2.14.2. Paraffineinbettung und Schnittherstellung.....	98
3.2.14.3. Färbung der Paraffinschnitte .....	99
3.2.14.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)–Färbung.....	99
3.2.14.3.2. Giemsa-Färbung .....	100
3.2.14.4. Immunhistochemie .....	100
3.2.15. Auswertung .....	102
<b>IV. ERGEBNISSE .....</b>	<b>104</b>
4.1. Hunde .....	104
4.1.1. Altersverteilung.....	104
4.1.2. Geschlechtsverteilung .....	104
4.1.3. Auswertung der klinischen Befunde .....	104
4.2. Hautbiopsien.....	105
4.2.1. Isolierung und Analyse von RNA aus den Hautbiopsien.....	105
4.2.2. Genexpressionsanalysen mittels Agilent-Microarray-Technologie .....	105
4.2.2.1. Scannen der Microarrays und Auswertung mittels Feature Extraction Software .....	105
4.2.2.2. Daten-Visualisierung.....	107
4.2.2.3. Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....	110
4.2.3. Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung.....	113
4.2.3.1. Zuordnung differentiell exprimierter Gene der Multifactorial unpaired-Analyse mittels DAVID-Analyse .....	113
4.2.3.2. Ergebnisse der KEGG MAPPER Pathway-Analyse.....	114
4.2.3.3. Ergebnisse der MEV-Analysen .....	117
4.2.3.3.1. Hierarchische Cluster (HCL)-Analyse .....	117
4.2.3.3.2. Ergebnisse der DAVID-Analyse für die hierarchische Cluster-Analyse (HCL) .....	119
4.2.3.3.3. Self-Organizing Tree Algorithm (SOTA)-Analyse.....	121
4.2.3.3.4. Ergebnisse der DAVID-Analyse für die SOTA-Cluster .....	123
4.2.3.4. CoPub .....	123
4.2.4. Verifizierung der Microarray-Ergebnisse mit Hilfe der qPCR .....	126

---

4.2.4.1.	Analyse der C <sub>T</sub> -Werte .....	126
4.2.4.2.	Bestätigung des Expressionsniveaus .....	127
4.2.5.	Histologische Auswertung .....	130
4.2.5.1.	HE-Färbung .....	131
4.2.5.2.	Giemsa-Färbung .....	132
4.2.5.3.	Immunhistochemische Färbung .....	133
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>134</b>
5.1.	Diskussion der Methodik .....	135
5.1.1.	Tiermodell und Proben-Zeitpunkte .....	135
5.1.2.	Probenbearbeitung .....	138
5.1.2.1.	RNA-Extraktion .....	138
5.1.2.2.	Microarray-Technologie und Validierung durch qPCR .....	139
5.2.	Diskussion der Ergebnisse der Microarray-Auswertung .....	140
5.2.1.	Statistische Analyse .....	140
5.2.2.	Bioinformatische Auswertung .....	143
5.3.	Identifizierung von Kandidatengenen .....	145
5.3.1.	Gene mit erhöhter Expression in der Haut atopischer Hunde bzw. mit verminderter Expression in der Haut gesunder Hunde .....	145
5.3.1.1.	Zytokine und Rezeptoren .....	145
5.3.1.1.1.	Chemokine .....	146
5.3.1.1.2.	Interleukine .....	149
5.3.1.1.3.	Tumor Nekrose Faktor/Rezeptor-Superfamilie .....	151
5.3.1.2.	Chitin und seine Rolle bei allergischen Entzündungen .....	155
5.3.1.3.	Weitere Gene mit erhöhter Expression in der Haut atopischer bzw. mit herabgesetzter Expression in der Haut gesunder Hunde .....	156
5.3.2.	Gene mit verminderter Expression in der Haut atopischer bzw. mit erhöhter Expression in der Haut gesunder Hunde .....	162
5.3.2.1.	Hautbarriere .....	162
5.3.2.1.1.	Strukturproteine und Zell-zu-Zellverbindungen .....	162
5.3.2.1.2.	Enzyme der Ceramidsynthese .....	170
5.3.2.2.	Weitere Gene mit verminderter Expression in der Haut atopischer bzw. mit erhöhter Expression in der Haut gesunder Hunde .....	171
5.3.3.	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse .....	175
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>178</b>

---

<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>181</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>183</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>2344</b>
9.1.	Abbildungsverzeichnis .....	2344
9.2.	Tabellenverzeichnis.....	2355
9.3.	R-Skript .....	2366
9.4.	Photometrische und mikroelektrophoretische Ergebnisse für die isolierte mRNA .....	2388
9.5.	cRNA-Ausbeute für die Hybridisierung .....	23939
9.6.	VSN-Durchschnittswerte und $\Delta$ VSN-Werte der diskutierten Gene der Gruppen der Multifactorial unpaired-Analyse nach 24 Stunden .....	2411
<b>X.</b>	<b>LEBENSLAUF .....</b>	<b>2433</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>244</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen für Gene und Proteine richten sich nach der offiziellen Nomenklatur des HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>). Kursiv geschriebene Abkürzungen stehen für Gene oder mRNA, nicht kursiv geschriebene für Proteine.

Abb.	Abbildung
AD	atopische Dermatitis
ADORA2B	engl.: Adenosine a2b receptor
Ag	Antigen
AJ	engl.: Adherens Junctions
Ak	Antikörper
APC	antigen-präsentierende Zelle
Aqua dest.	Aqua destillata
ASIT	allergen-spezifischen-Immuntherapie
ASPRV1	engl.: Aspartic peptidase, retroviral-like 1
BAFF	engl.: B cell activating factor oft the TNF family
BCL-3	engl.: B-cell CLL/lymphoma 3
BDGF	engl.: brain-derived growth factor
BLT1	Leukotrien B4 Rezeptor
cAD	canine atopische Dermatitis
CADESI	engl.: Clinical severity score
CALML5	engl.: Calmodulin-like 5
CARD 15	engl.: Caspase recruitment domain containing protein15
cDNA	engl.: copy DNA
CE	engl.: cornified cell envelope
CGRP	engl.: Calcitonin gene related petide
CHI3L1	engl.: Chitinase3-like1
CLA	engl.: Cutaneous lymphocyte Antigen
CLEC7A	C engl.: -type lectin receptor Dectin 1
CNG	Cingulin
CTL	zytotoxische-T-Lymphozyten
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand

---

CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
Cy3	Cyanin 3
D.farinae	Dermatophagoides farinae
DAVID	engl.: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DC	Dendritische Zellen
DMK	Dermokin
DNA	engl.: desocyribonucleinacid (Desoxyribunukleinsäure)
DSG1	Desmoglein 1
DSP	Desmoplakin
ECP	eosinophilic Cationic Protein
EDC	Epidermaler Differenzierungs-Komplex
EVPL	Envoplakin
Fab	engl.: frangment antigen binding
FasL	Fas-Ligand
Fc $\epsilon$ RI	Fc-epsilon-Rezeptor I
FLG	Filaggrin
FLG2	Filaggrin 2
GM-CSF	engl.: Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Faktor
hAD	humane atopische Dermatitis
HDM-Paste	Hausstaubmilben (engl.: house dust mites)-Paste
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HKG	engl.: house keeping genes
IDEC	engl.: inflammatory epidermal DC
IDT	Intradermal Test
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-18BP	engl.: Interleukin 18 binding protein
IL-R	Interleukin Rezeptor
IVL	Involucrin
KPRP	engl.: keratinocyte proline-rich protein
LA	Lokalanästhesie
LAFUGA	Laboratorium für funktionelle Genomanalysen

---

LEPs	engl.: late envelope proteins
LHC	Langerhans-Zellen
LLS	engl.: Local-Lesion-Score
LOR	Loricrin
<i>M. pachydermatis</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
MCGs	engl.: membrane coated granules
mDC	myeloide dendritische Zelle
MEV	engl.: Multi Experiemt Viewer
MPS	mononukleäres Phagozytose-System
MRC1	Makrophagen Mannose Rezeptor
NGF	engl.: nerve growth factor
NK	natürliche Killerzellen
OCLN	Occludin
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M Rezeptor
<i>P. ovale</i>	<i>Pityrosporum ovale</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PPARA	engl.: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPL	Periplakin
PT	Patch-Test
qPCR	quantitative Real-time Reverse Transkriptase PCR
RANTES	engl.: regulated on acitvation, normal T cell expressed and secreted
RG	Reaktionsgefäß
RIN	engl.: RNA integrity number
RNA	engl: ribonucleinacid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
SNP	engl.: single nucleotide polymorphism
SOCS3	engl.: suppressor of cytokine signaling 3
sog.	sogenannte
SPINK5	engl.: serine peptidase inhibitor, Kazal type 5
SPRPs	engl.: small proline-rich proteins
Tab.	Tabelle

TCR	T-Zell-Rezeptor
TD	engl.: thymusdependent
TE	Triz-EDTA-Pufferlösung
TEWL	engl.: transepidermal water loss
TGF	engl.: transforming growth factor
TGF-β	engl.: transforming growth factor-β
TGM1	Transglutaminase 1
TH	T-Helperzellen
TI	engl.: thymusindependent
TJ	engl.: Tight junction
TLR	engl.: toll like receptor
TLR-2	engl.: toll like receptor 2
TM	Schmelztemperatur
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFAIP6	engl.: tumor necrosis factor, alpha induced protein 6
TNFR	engl.: Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TNFSF13B	engl.: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
TNFSF9	engl.: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
TR1	Typ1-regulatorische-T-Zellen
TReg	regulatorische T-Zellen
TSLP	engl.: thymic stromal lymphopoietin
VIP	engl.: vasoactive intestinale polypeptide

## I. EINLEITUNG

Die atopische Dermatitis oder Umweltallergie stellt bei Mensch und Hund eine rezidivierende und chronisch-allergische Hautkrankheit dar (MARSELLA & GIROLOMONI, 2009), bei der eine Hypersensibilität gegen bestimmte Umwelt-Antigene vorliegt und zu den klassischen Symptomen führt. Die Atopie des Menschen und des Hundes ähneln sich in klinischer, histologischer sowie immunologischer Hinsicht, weshalb die canine atopische Dermatitis als Tiermodell für die humane Form der Krankheit dienen kann (NUTTALL et al., 2002; PUCHEU-HASTON et al., 2008; MARSELLA & GIROLOMONI, 2009). Beim Hund herrschen Juckreiz und Dermatitis vor (SCOTT, 1981; GRIFFIN & DEBOER, 2001), wohingegen beim Menschen die Symptome häufig aus der klassischen Triade von Asthma, allergischer Rhinitis und atopischer Dermatitis bestehen (WILLIAMS, 2000; SPERGEL & PALLER, 2003; BOGUNIEWICZ et al., 2006).

Die Pathophysiologie der atopischen Dermatitis ist vielfältig und bis heute nicht eindeutig geklärt. Unter anderem spielen immunologische Hyperreaktivität, eine defekte Hautbarriere, genetische Prädisposition sowie verschiedene Umweltfaktoren eine wichtige Rolle (LEUNG et al., 2004). Die Diagnose basiert auf einer Kombination aus passender Anamnese und vorliegenden klinischen Symptomen sowie dem Ausschluss von Differentialdiagnosen (DEBOER & HILLIER, 2001). Eine spontane Remission der Atopie des Hundes ist selten (MARSELLA & GIROLOMONI, 2009). Die Desensibilisierung stellt die einzige Therapieform dar, die eine Heilung ermöglicht, ist allerdings langwierig und führt häufig nur zur Besserung anstatt zur vollständigen Heilung (GRIFFIN & HILLIER, 2001). Daher ist für das Management der Symptome meist eine auf den jeweiligen Patienten individuell angepasste und in der Regel dauerhafte Kombinationstherapie notwendig, die nicht selten zu Nebenwirkungen führt (OLIVRY & SOUSA, 2001b; OLIVRY et al., 2010a).

Durch Verfügbarkeit des Hundegenoms (LINDBLAD-TOH et al., 2005) haben sich neue Möglichkeiten zur Analyse von Prozessen auf molekularer Ebene ergeben. Insbesondere die Untersuchung von Genexpressionsveränderungen mit Hilfe von Microarrays erlaubt den gleichzeitigen Vergleich von Expressionsmustern tausender Gene bei einem relativ überschaubaren

Arbeitsaufwand (SCHENA et al., 1995; FREEMAN et al., 2000; SCHULZE & DOWNWARD, 2001). Diese Technologie kann Aufschluss über differentiell exprimierte Gene in einem Gewebe zwischen Fall- und Kontrollgruppe geben, von denen angenommen wird, dass sie im Krankheitsgeschehen eine Rolle spielen. So können Gene identifiziert werden, die an der Pathophysiologie beteiligt sind und mögliche Ziele für neue Therapieformen darstellen könnten. Die individuelle Genexpression wird von vielen Faktoren (inneren und äußerem) beeinflusst. Um gut interpretierbare Daten zu erhalten, ist die Verwendung eines möglichst homogenen biologischen Modells wichtig.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Microarray-Technologie die Genexpression in der Haut atopischer Hunde unter standardisierten Bedingungen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zu untersuchen und neue Kandidatengene zu finden, die an der Pathophysiologie der Atopie beteiligt sein könnten, sowie potentielle Zielgene für neue Therapiemöglichkeiten beim Hund zu identifizieren. Weiterhin sollten bisherige Ergebnisse von Expressionsstudien bei atopischen Menschen und Hunden bestätigt und erweitert werden und mögliche Unterschiede zwischen im Laboratorium sensibilisierten und natürlich erkrankten Hunden aufgezeigt werden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Säugetieres und bildet als allgemeine Körperdecke sowohl eine schützende Grenzschicht als auch eine breite Kommunikationsfläche zur Umwelt. Sie erfüllt eine Vielzahl von Funktionen. Zum einen dient sie als Sinnesorgan und registriert Druck, Schmerz, Hitze und Kälte. Zum anderen bietet sie als erste Barriere Schutz vor mechanischen, physikalischen und chemischen Einflüssen und verhindert das Eindringen von Krankheitserregern. Weiterhin regelt sie den Wärmehaushalt des Körpers und spielt eine wichtige Rolle bei Stoffwechselvorgängen. Bei Energietüberschuss werden Fette in die Unterhaut eingelagert die bei Futtermangel wieder abgebaut werden können. Dadurch wirkt sie als Energiespeicher. Zusätzlich enthält die Haut eine Vielzahl an Immunzellen und spezifischen (wie z.B. Immunglobuline) sowie unspezifische Abwehrfaktoren (wie z.B. Lysozym) und stellt somit ein wichtiges immunologisches Organ dar. Die äußere Haut wird in drei Abschnitte, die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut) eingeteilt (LIEBICH et al., 2004).

#### 2.1.1. Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorndes Plattenepithel und bildet die äußerste Grenzschicht und damit die Barriere zur Außenwelt. Sie besteht überwiegend aus Keratinozyten (c.a. 85%). Daneben gibt es jedoch ebenfalls Melanozyten, Langerhans-Zellen (LHC), Lymphozyten, und Merkelzellen (HEES & SINOWATZ, 2000). Die Keratinozyten werden von den Basalzellen, welche auf der Basalmembran verankert sind, durch mitotische Teilung gebildet und schieben sich langsam in Richtung Oberfläche. Auf diesem Weg durchlaufen die Zellen mehrstufige Differenzierungsprozesse der Verhornung, bei der sie ihren Zellkern verlieren und sich allmählich in Hornschuppen (Korneozyten) umwandeln (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Durch die unterschiedlichen Reifungsstadien bei der Migration an die Hautoberfläche lässt sich die Epidermis

in fünf verschiedene Schichten unterteilen, die die Funktion der ständigen Neubildung, Keratinisierung, Verhornung und schließlich Desquamation übernehmen (LIEBICH et al., 2004). Ausgangspunkt dieser Differenzierung ist das Stratum basale, die unterste Schicht der Epidermis. Ihr schließt sich das Stratum spinosum an. Beide Schichten bilden zusammen das Stratum germinativum, an welche sich das Stratum granulosum und als äußerste Schicht das Stratum corneum angliedern. Ferner befindet sich in Zonen stark beanspruchter Haut (Ballen) zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum das Stratum lucidum.

### 2.1.1.1. Stratum basale

Das Stratum basale (die Basalschicht) ist die unterste Schicht der Epidermis und besteht aus einer Schicht prismatischer Zellen, die über Hemidesmosomen mit der darunterliegenden Basalmembran eng verbunden und damit auch mit dem Papillarkörper der Dermis gut verankert sind. Hier erfolgt die Neubildung der Keratinozyten durch mitotische Teilung der Basalzellen. Die Teilungsrate wird durch Feedback-Mechanismen entsprechend der Abschilferungsrate und der mechanischen Abnutzung der Korneozyten sowie der Epidermisoberfläche gesteuert. In der Regel dauert ein vollständiger Generationswechsel der Epidermiszellen je nach Tierart 20-30 Tage (LIEBICH et al., 2004). Durch die enge Verbindung mit der durchbluteten Dermis wird das Stratum basale gut mit Nährstoffen versorgt, welche durch Diffusion auch in die weiter oben gelegenen Schichten gelangen.

Weitere Zellen, die in der basalen Schicht zu finden sind, sind Melanozyten, Merkel-Zellen und LHC. Melanozyten stammen aus der Neuralleiste (HEES & SINOWATZ, 2000) und sind für die Pigmentierung der Haut verantwortlich (KÖNIG & LIEBICH, 2002). Sie schieben sich mit langen Ausläufern zwischen die Keratinozyten des Stratum spinosum und geben das in Pigmentkörnchen (Melanosomen) gespeicherte Melanin an diese ab (HEES & SINOWATZ, 2000). Intrazellulär bilden Melanosomen eine „Kappe“ über die Keratinozytenkerne und schützen sie so vor mutagener UV-Strahlung. Merkel-Zellen sind epitheliale neuroendokrine Zellen und haben die Funktion von Berührungsrezeptoren. Die LHC stehen im Dienste der zellvermittelten Immunantwort in der Epidermis. Sie werden zum mononukleären Phagozytose-System (MPS) gerechnet und spielen

eine wichtige Rolle bei Infektionen, Hauttumoren und Allergien (KÖNIG & LIEBICH, 2002).

### **2.1.1.2. Stratum spinosum**

Das Stratum spinosum (die Stachelzellschicht) wird von einer relativ breiten Schicht unregelmäßig polygonaler Zellen gebildet, die sich mit zunehmender Verlagerung nach oben parallel zur Epidermisoberfläche abflachen. Die Keratinozyten zeigen stachelförmige Zellfortsätze und stehen über gut ausgebildete Desmosomen miteinander in Verbindung (HEES & SINOWATZ, 2000). Intrazellulär verlaufen Bündel von Intermediärfilamenten, die in die Zellfortsätze ziehen und in den Desmosomen inserieren. Somit setzt sich dieses Filamentgerüst funktionell auf die Nachbarzellen fort, ohne jedoch in diese überzutreten. Im Stratum spinosum erfolgt die Keratinisierung der Epithelzellen, die mit der Bildung von Zytokeratinen, Keratinfilament-assoziierten Proteinen (Filaggrinen) und „membrane coated granules“ (MCGs) verbunden ist. Zytokeratine bilden das Zytoskelett von Epithelzellen. Filaggrine sind histidinreiche Proteine, die die Keratinfilamente zu einem Filament-Matrix-Komplex „verbacken“ und MCGs bestehen aus dem „membrane coating material“ (Interzellularkitt), der Phospholipide (Ceramide) und Enzyme enthält. Die MCGs geben ihren Inhalt durch Exozytose in den Interzellulärspalt ab. Der Interzellularkitt verbindet die Korneozyten, verhindert den Wasserverlust über die Haut und dient als Barriere gegen das Eindringen von Keimen und wasserlöslichen Chemikalien (LIEBICH et al., 2004).

### **2.1.1.3. Stratum granulosum**

Das Stratum granulosum (die Körnerzellschicht) ist eine dünne Lage aus zwei bis drei Zellschichten abgeflachter Keratinozyten, die in ihrem Zytoplasma basophile Keratohyalingranula aufweisen. In der Körnerzellschicht findet die Umwandlung der kernhaltige Keratinozyten in kernlose Korneozyten durch Apoptose statt (WOLFF & H., 2003). Die Zellorganellen degenerieren und der Zellkern zerfällt in Fragmente (LIEBICH et al., 2004).

### **2.1.1.4. Stratum corneum**

Das Stratum corneum (die Hornschicht) besteht aus mehreren Lagen flacher,

verhornter Zellen, die miteinander „verbacken“ sind. Sie enthalten Keratin, das durch die Verdichtung der aus den basalen Schichten mitgebrachten Tonofilamenten entsteht (HEES & SINOWATZ, 2000). An der Oberfläche der Hornschicht führt eine enzymatisch induzierte Lockerung des Interzellularkitts und ein schleichender Funktionsverlust der Desmosomen zum Abschilfeln der Hornzellen (LIEBICH et al., 2004). Diese Schicht wird als *Stratum disjunctum* bezeichnet. Das *Stratum lucidum* ist ein Lichtbrechungsartefakt junger Hornzellen. Bei den Haussäugetieren tritt dieses Phänomen regelmäßig im Ballen und am Nasenspielgel von Hund und Katze auf (KÖNIG & LIEBICH, 2002).

### **2.1.2. Dermis**

Die Dermis (Lederhaut) ist die bindegewebige Grundlage der Haut. Sie macht den Hauptanteil der Stärke der Haut aus und ihre Dicke differiert in den verschiedenen Körperregionen (KÖNIG & LIEBICH, 2002). Die Dermis besteht überwiegend aus kollagenen und elastischen Fasern und weist einen hohen Gehalt an Glykosaminoglykanen auf. Diese sind für die Wasserbindungsähigkeit der Haut verantwortlich. Weiterhin enthält die Dermis ein Geflecht von Kapillaren, Lymphgefäßen, Nervenfasern und die Hautanhangsgebilde. Histologisch lässt sich die Dermis beim Menschen in zwei Schichten, das *Stratum papillare* und das darunter gelegene und mächtigere *Stratum reticulare* unterscheiden (HEES & SINOWATZ, 2000). Beim Hund existieren diese zwei Schichten nur in den nicht-behaarten Arealen von Nasenspiegel und Fußballen.

#### **2.1.2.1. Stratum papillare**

Das *Stratum papillare* (die Papillarschicht) grenzt unmittelbar an die Epidermis und ist mit ihr durch papillenartige Ausstülpungen verzahnt. Dies ist nicht nur für den mechanischen Zusammenhalt von Bedeutung, sondern erhöht durch Vergrößerung der Oberfläche den Stoffaustausch (HEES & SINOWATZ, 2000). Diese Schicht erfüllt mechanische, nutritive, immunologische, kreislaufregulatorische und sensorisch-sensible Aufgaben. Entsprechend ausgeprägt sind Mikrovaskularisation und vegetative Innervation. Hier befindet sich der größte Anteil an Haaren, Talg- und Schweißdrüsen. Das *Stratum papillare* setzt sich aus lockerem Bindegewebe zusammen, das vornehmlich mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mastzellen durchsetzt ist

(LIEBICH et al., 2004). Das gehäufte Auftreten dieser Zellen verdeutlicht die Funktion der Haut als immunologische Barriere.

### **2.1.2.2. Stratum reticulare**

Das Stratum reticulare (die Geflechtschicht) ist eine faserreiche, straffe und zellarme Bindegewebsschicht. Die Kollagenfasern verlaufen, begleitet von elastischen Bündeln, vorzugsweise oberflächenparallel und sind scherengitterartig angeordnet. Die Plastizität und Verformbarkeit der Haut ist insbesondere auf die zahlreichen elastischen Fasern zurückzuführen, die nach Dehnung die ursprüngliche Anordnung der Kollagenlamellen wiederherstellen (LIEBICH et al., 2004).

### **2.1.3. Subcutis**

Die Subcutis (Unterhaut) besteht aus lockerem Bindegewebe mit mehr oder weniger reichlich eingelagertem Fettgewebe. Sie ermöglicht die Verschiebbarkeit der Haut und verbindet sie mit der oberflächlichen Körperfazie oder der Muskulatur (HEES & SINOWATZ, 2000; LIEBICH et al., 2004). Die Funktion der Unterhaut liegt in der Speicherung von Wasser und Energie (Fettdepot), in dem Kälteschutz und in dem Schutz vor mechanischen Einwirkungen (LIEBICH et al., 2004).

## **2.2. Atopische Dermatitis**

Die atopische Dermatitis (AD), auch Umweltallergie genannt, ist eine häufig vorkommende allergische und chronisch-entzündliche Hautkrankheit, die meist mit Juckreiz einhergeht und durch rezidivierende bakterielle Sekundärinfektionen verkompliziert wird. Charakteristisch für diese Krankheit sind ekzematöse Läsionen, trockene Haut und Juckreiz (LEUNG et al., 2004; WÜTHRICH B. et al., 2005; BOGUNIEWICZ & LEUNG, 2006; BOGUNIEWICZ et al., 2006). Beim Menschen ist sie eine der häufigsten Ursachen für Berufsunfähigkeit (WILLIAMS, 2000). Die AD wird ebenfalls häufig bei Haustieren, insbesondere beim Hund beobachtet (HILLIER & GRIFFIN, 2001a). Die meisten Patienten mit AD zeigen eine hohe Konzentration an Gesamt- und allergen-spezifischem Immunglobulin (Ig) E in Blut und Haut (WÜTHRICH, 1978; LIAN & HALLIWELL, 1998). Diese Form wird „allergische“ oder „extrinsische“ Form

der AD genannt (WUTHRICH, 1978; BOS et al., 1998). Bei Menschen mit extrinsischer AD (IgE assoziierte Subgruppe) ist die AD häufig nur der Beginn des sogenannten (sog.) „Atopic March“, bei dem sich im weiteren Verlauf häufig Asthma und allergische Rhinitis anschließen. Bei der sog. „nichtallergischen“ oder „intrinsischen“ Form weisen Patienten normale Gesamt-IgE-Spiegel auf und es können keine allergen-spezifischen IgE-Antikörper (Ak) nachgewiesen werden, obwohl die Patienten dieselben klinischen Symptome zeigen (WUTHRICH, 1978; NOVAK & BIEBER, 2003).

Sowohl beim Menschen als auch beim Hund ist der individuelle Verlauf der AD schwer zu prognostizieren. Jedoch leidet die Lebensqualität von schwer betroffenen Patienten und deren Familien erheblich (SPERGEL & PALLER, 2003; LINEK & FAVROT, 2010).

## **2.2.1. Humane atopische Dermatitis**

### **2.2.1.1. Epidemiologie**

Die Prävalenz atopischer Krankheiten, wie allergische Rhinitis, Asthma und AD ist in den letzten Jahrzehnten angestiegen. Momentan sind schätzungsweise mehr als 30 % der Bevölkerung in den Industrieländern betroffen (OKUDAIRA, 1998). Eine Erklärungsmöglichkeit für das vermehrte Auftreten der AD, insbesondere in weiter entwickelten Ländern mit hohen Hygienemaßstäben, ist die sog. „Hygiene-Hypothese“ (STRACHAN, 1989; YAZDANBAKHS et al., 2002). Sie besagt, dass ein verringelter Infektionsdruck während der Kindheit das Risiko des Auftretens allergischer Krankheiten erhöht.

Die AD ist eine der häufigsten Hautkrankheiten bei Säuglingen und Kindern (WILLIAMS, 1992; KAY et al., 1994) mit einer Prävalenz zwischen 10-20 % (LEUNG et al., 2004). Bei Erwachsenen liegt die Prävalenz bei etwa 1-3 % (LEUNG et al., 2004). Die ersten Symptome zeigen sich bei 85 % der Kinder zwischen dem sechsten Lebensmonat und dem fünften Lebensjahr (KAY et al., 1994). Berichte über AD bei Erwachsenen beziehen sich fast ausschließlich auf AD, die sich im Kindesalter entwickelt hat und bis ins Erwachsenenalter fortbesteht. Die AD kann jedoch in jedem Alter beginnen. Die Angaben über den Anteil der sog. adult-onset-AD liegen je nach Studie zwischen 13-47 %. Davon entwickeln 73 % der Patienten im Alter zwischen 18 und 29 Jahren die typischen

Symptome (OZKAYA, 2005).

### 2.2.1.2. Klinik

Die AD wird abhängig vom Alter des Patienten und der Verteilung der Läsionen in drei Phasen eingeteilt (Säuglings-, die Kindheits- und adulte Phase) (SPERGEL & PALLER, 2003):

Die Säuglingsphase reflektiert die Manifestation der AD von der Geburt bis zu einem Alter von zwei Jahren. Erythematöse Papeln und Bläschen treten typischerweise an den Wangen, der Stirn oder der Kopfhaut auf und jucken stark. Die Läsionen können auf das Gesicht beschränkt bleiben oder sich auf den Stamm oder besonders auf die Extremitäten als diffuse, oftmals symmetrische Flecken ausbreiten. Charakteristisch für die Hautläsionen bei Säuglingen ist die Tendenz, ein ausgeprägtes Ödem zu entwickeln, welches unabhängig von Sekundärinfektionen nässt und zu Krustenbildung führt. Generalisierte Xerodermie (trockene Haut) ist häufig. Im Alter von acht bis zehn Monaten sind Extensorflächen der Arme und Beine von der Dermatitis häufig betroffen. Dies hängt möglicherweise mit der Reibung beim Krabbeln zusammen, was dazu führt, dass diese Körperareale vermehrt irritierenden und allergenen Triggerstoffen wie beispielsweise Teppichen ausgesetzt sind. Typischerweise bleibt die Windelregion der Haut von den Läsionen verschont, was bei der Diagnose der AD hilfreich ist. Wahrscheinlich hängt dies damit zusammen, dass diese Region eine höhere Feuchtigkeit aufweist und die Windel vor der Exposition gegenüber Triggersubstanzen und vor Reibung und Selbstverletzung durch Kratzen schützt (SPERGEL & PALLER, 2003).

Meist schließt sich der Säuglingsphase die Kindheitsphase der AD nahtlos an. Sie zeigt sich meist im Alter von zwei Jahren bis zum Eintritt in die Pubertät. Die Läsionen in dieser Phase sind in der Regel weniger exsudativ. Stattdessen entwickeln sie eher lichenifizierte Papeln und Plaques, was die Chronizität der Läsionen wiederspiegelt. Klassischerweise sind bei den Patienten Hände, Füße, Handgelenke, Knöchel, Ellbogenbeuge und Kniekehle, also besonders die Flexorbereiche betroffen. Einige Kinder zeigen jedoch ein sogenanntes inverses Verteilungsmuster, das überwiegend die Extensorbereiche betrifft. Im Gesicht begrenzen sich die Läsionen im Gegensatz zu Säuglingen meist auf periorbitale und periorale Hautbezirke. Häufig besteht starker Juckreiz, der zu Schlafstörungen

führt. Lymphadenopathie kann beobachtet werden (SPERGEL & PALLER, 2003).

Die adulte Phase beginnt während der Pubertät und setzt sich häufig in das Erwachsenenalter fort. Typischerweise sind die Beugefalten, Gesicht und Nacken, Oberarme und Rücken und der dorsale Bereich von Händen, Füßen, Fingern und Zehen betroffen. Der Ausschlag ist charakterisiert durch trockene Schuppen, erythematöse Papeln und Plaques. Große lichenifizierte Plaques sind typisch für chronische Läsionen. Nässende, krustige und exsudative Läsionen können vorkommen, sind jedoch meist das Ergebnis einer Sekundärinfektion mit Staphylokokken (SPERGEL & PALLER, 2003). Unabhängig von der Phase der AD, kann postinflammatorische Hypo- oder Hyperpigmentation beobachtet werden (SPERGEL & PALLER, 2003).

Menschen mit AD haben ein erhöhtes Risiko, an Hautinfektionen mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), oder an disseminierten Formen von viralen Infektionen wie *Herpes simplex* oder *Molluscum contagiosum* zu erkranken. Die hohe Infektionsrate mit *S. aureus* bei Menschen mit AD lässt sich durch die bessere Adhärenz von *S. aureus* an der Epidermis bei Individuen mit AD (COLE & SILVERBERG, 1986) und durch die Unfähigkeit der entzündeten Haut von Atopikern, endogene antimikrobielle Peptide zu bilden (ONG et al., 2002a), erklären. Die Pyodermie äußert sich durch Erytheme und nässende sowie krustige Läsionen. Teilweise sind auch kleine Pusteln zu sehen. *S. aureus* verschlimmert die AD, da das Bakterium selbst als Trigger für die AD fungieren. Es werden erhöhte IgE-Spiegel und eine T-Zell-Antwort auf Staphylokokken Antigene (Ag) und Superantigene gebildet (LEUNG, 2001). Das höhere Risiko einer kutanen Ausbreitung von viralen Infektionen wie *Molluscum contagiosum* oder an einer Infektion mit *Herpes simplex* zu erkranken wird einem Defekt in der Produktion von T-Helfer 1-Zell ( $T_{H1}$ ) -Zytokinen beziehungsweise (bzw.) einer starken Verschiebung in Richtung T-Helfer 2-Zell ( $T_{H2}$ )-Antwort und einem Defekt der zytotoxischen T-Zell-Funktion zugeschrieben (BECK et al., 2009).

### **2.2.1.3. Prognose**

Die Prognose für ein Kind mit AD ist kaum vorherzusagen. Studien zeigten bei 40-60 % der Patienten ein komplettes Verschwinden der Hautsymptome während oder nach der Pubertät. Bei einigen kehrten sie jedoch im späteren

Erwachsenenalter zurück. Patienten, bei denen die Symptome nicht verschwanden, zeigten eine Verbesserung der Hautsymptomatik mit steigendem Alter. Allerdings haben Kinder mit AD ein hohes Risiko, später an anderen allergischen Krankheiten wie allergischer Rhinitis und Asthma zu erkranken (SCHÄFER et al., 1999; WUTHRICH, 1999; GUSTAFSSON et al., 2000; OETTGEN & GEHA, 2001; RHODES et al., 2001; RHODES et al., 2002). Alle drei als Atopien bezeichneten Erkrankungen werden zu den erblichen Dispositionskrankheiten gezählt. Somit sind sie nicht nur klinisch und allergologisch, sondern auch genetisch eng miteinander korreliert (COOKSON et al., 2001; COOKSON, 2002).

Faktoren, die am häufigsten bei persistierender AD übereinstimmten und somit die Vorhersage für eine Persistenz der Hautsymptomatik am sichersten zulassen, sind frühes Auftreten der Erkrankung, eine schwere Ausprägung mit ausgedehnten Läsionen in jungen Jahren, Asthma oder allergische Rhinitis als Begleiterscheinung und eine familiäre Vorbelastung mit AD (WILLIAMS, 2000).

## 2.2.2. Canine atopische Dermatitis

### 2.2.2.1. Epidemiologie

Angaben über die Prävalenz der atopischen Dermatitis beim Hund schwanken in der Literatur zwischen drei und 15 % (CHAMBERLAIN, 1974; REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). Die meisten Faktoren, die das Auftreten der humanen AD (hAD) fördern, besonders die veränderten Umweltbedingungen, lassen sich auf den Hund als Begleittier des Menschen übertragen. Dies würde auch eine Erhöhung der Inzidenz der caninen AD (cAD) vermuten lassen (HILLIER & GRIFFIN, 2001b; OLIVRY & HILL, 2001b; MARSELLA et al., 2006a). Die atopische Dermatitis ist die zweithäufigste Allergie nach der Flohspeichelallergie (VOLLSET, 1985) und ist klinisch von der Futtermittelunverträglichkeit nicht zu unterscheiden (VROOM, 1995; FAVROT et al., 2010). Bestimmte Rassen, wie Golden Retriever, Labrador Retriever und West Highland White Terrier sind bei der atopischen Dermatitis besonders häufig vertreten (SCOTT & PARADIS, 1990; PICCO et al., 2008). Allerdings können diese Rasseprädispositionen lokal stark variieren (JAEGER et al., 2010).

### **2.2.2.2. Klinik**

Die Klinik der atopischen Dermatitis bei Hunden ist vielfältig. Die meisten betroffenen Hunde zeigen im Alter von ein bis drei Jahren zum ersten Mal klinische Symptome. Typisch für atopische Hunde ist wie auch beim Menschen der Juckreiz. Er besteht vorwiegend im Gesicht, an den Pfoten, im inguinal-, perianal- und Ohrenbereich. Dabei kann jede Körperregion einzeln oder können Kombinationen verschiedener Regionen betroffen sein. Viele Tiere zeigen generalisierten Juckreiz (SCOTT, 1981; GRIFFIN & DEBOER, 2001). Zu den Sekundärläsionen, die sich aufgrund des Juckreizes und der chronischen Entzündung entwickeln, gehören selbstinduzierte Alopezie, Hyperpigmentation, Exkorationen und Lichenifikation (SCOTT, 1981). Häufig leiden atopische Hunde zusätzlich an bakteriellen Sekundärinfektionen der Haut und oftmals an Malassezien-Otitiden. Seltener besteht Konjunktivitis (SCOTT, 1981; ZUR et al., 2002). Die Symptome können je nach beteiligten Allergenen ganzjährig oder saisonal auftreten (GRIFFIN & DEBOER, 2001). Nicht selten leiden Atopiker zusätzlich an einer Flohspeichelallergie oder einer Futtermittelunverträglichkeit (ZUR et al., 2002).

### **2.2.2.3. Diagnose**

Die Diagnose Umweltallergie wird bei Hunden durch Anamnese, vorhandene klinische Symptome und durch Ausschließen von relevanten Differentialdiagnosen wie Sarkoptesräude, Flohspeichelallergie, Futtermittelunverträglichkeit, bakterielle Follikulitis und Malasseziendermatitis gestellt. Zusätzliche Untersuchungen wie Intrakutantest, Serumallergietest und Histopathologie von Hautproben können die Diagnose bekräftigen (DEBOER & HILLIER, 2001). Serumallergietests oder Intrakutantests sind als Screeningtest für Allergien bei Tieren mit Juckreiz ungeeignet, denn es können sowohl Atopiker negative, als auch nicht allergische Tiere positive Testergebnisse zeigen (CODNER & LESSARD, 1993; MUELLER et al., 2005). Beide Tests dienen dazu, bei schon diagnostizierten Atopikern Allergene zu identifizieren, welche für die spezifische Immuntherapie in die Desensibilisierungslösung mit aufgenommen werden können (DEBOER & HILLIER, 2001).

#### **2.2.2.4. Therapie der cAD**

Die Umweltallergie lässt sich sowohl ursächlich als auch symptomatisch behandeln. Meist wird eine Kombination aus antiinflammatorischer, antiinfektiver und allergenspezifischer Immuntherapie durchgeführt. Wie bei der Futtermittelallergie spielt die Allergenvermeidung oder zumindest eine verminderte Exposition eine große Rolle, auch wenn sich dies bei der Umweltallergie wesentlich schwieriger gestaltet (OLIVRY & SOUSA, 2001b). Als entzündungshemmende Medikamente können Glukokortikoide, Cyclosporin, Antihistaminika und essentielle Fettsäuren verwendet werden. Auch hier kann eine Kombination sinnvoll sein (OLIVRY & SOUSA, 2001b; OLIVRY et al., 2010a; BÄUMER et al., 2011). Die Behandlung der cAD sollte auf jeden Patienten individuell angepasst werden, da nicht alle Behandlungen für jeden Hund gleichermaßen geeignet sind (OLIVRY et al., 2010a).

##### **2.2.2.4.1. Allergenvermeidung**

Die Allergenvermeidung stellt sich bei Umweltallergien schwieriger dar als beispielsweise bei Futtermittelunverträglichkeiten. Hilfreich kann häufiges Baden sein, vor allem nach Spaziergängen (OLIVRY & SOUSA, 2001b; OLIVRY et al., 2010b). Dabei werden an Fell und Haut anhaftende Allergene abgewaschen und die meist trockene Haut von Allergikern mit Feuchtigkeit versorgt. Zusätzlich wird Hautinfektionen vorgebeugt und bestehende Infektionen werden durch Entfernen der Keime gemildert. Wichtig ist, dass die Einwirkzeit der Shampoos für eine optimale Wirkung beachtet wird. Doch meist reicht eine Shampoo-Therapie als alleinige Behandlung nicht aus.

##### **2.2.2.4.2. Essentielle Fettsäuren**

Bei Atopikern ist vermutlich eine Störung der epidermalen Barriere für eine erhöhte Penetration der Allergene in die Haut verantwortlich (siehe auch Punkt 2.2.3.1.). Durch Supplementation von essentiellen Fettsäuren, die in die Haut eingebaut werden, kann diese Barriere verbessert werden. Zusätzlich lagern sich Fettsäuren in Zellmembranen ein und können die Produktion von proinflammatorischen zugunsten der antiinflammatorischen Eikosanoide verschieben. Dadurch wird einer Entzündungsreaktion entgegengewirkt. Und schließlich wurde gezeigt, dass Fettsäuren T-Zell-Proliferation und Exprimierung

von Zytokinen und Rezeptoren hemmen können (STEHLE et al., 2010). Eine langfristige Anwendung kann atopischen Tieren Linderung verschaffen (GLOS et al., 2008). Weiterhin scheinen essentielle Fettsäuren einen Glukokortikoid sparenden Effekt zu haben, da bei Tieren mit Glukokortikoid-Dauertherapie und gleichzeitiger Gabe von essentiellen Fettsäuren die benötigte Dosis zur Kontrolle des Juckreizes verringert werden konnte (SÆVIK et al., 2004).

#### **2.2.2.4.3. Antihistaminika**

Derzeit existiert kein Hinweis darauf, dass Antihistaminika zur alleinigen Therapie bei atopischer Dermatitis geeignet wären. Nur wenige Wirkstoffe, die bei der caninen atopischen Dermatitis angewendet werden, wurden eingehend auf ihre Wirksamkeit untersucht (DEBOER & GRIFFIN, 2001). Die Wirksamkeit variiert von Tier zu Tier und von Wirkstoff zu Wirkstoff. Daher ist es oftmals notwendig, verschiedene Präparate für einen Patienten auszutesten. Es kann bis zu 14 Tage dauern, bis ein Effekt eintritt (SCOTT & JR, 1999; DEBOER & GRIFFIN, 2001). In Studien konnte bei Hunden eine Reduktion des Juckreizes durch Hydroxyzin, Chlorpheniramin, Diphenhydramin sowie Ceterizin nachgewiesen werden (DE VOS et al., 1987; PATERSON, 1994; BIZIKOVA et al., 2008). Durch die Kombination mit essentiellen Fettsäuren kann die klinische Wirksamkeit von Antihistaminika verbessert werden (PATERSON, 1995).

#### **2.2.2.4.4. Glukokortikoide**

Glukokortikoide sind die am häufigsten angewendeten entzündungshemmenden Medikamente in der Praxis (OLIVRY & SOUSA, 2001a). Allerdings sollte aufgrund ihrer zahlreichen und nicht ungefährlichen Nebenwirkungen sparsam mit ihnen umgegangen werden. Die orale Gabe ermöglicht nach Besserung der Juckreiszsymptomatik ein Reduzieren bis zu derjenigen Dosis, bei der nur noch leichte Beschwerden vorhanden sind. Oftmals ist eine Gabe jeden zweiten Tag in einer sehr niedrigen Dosis ausreichend. Eine gleichzeitige Anwendung von Antihistaminika und essentiellen Fettsäuren hat einen Kortison sparenden Effekt, so dass die minimal wirksame Dosis der Glukokortikoide weiter reduziert werden kann und damit auch das Risiko von Nebenwirkungen weiter sinkt. Tiere, die dauerhaft mit Glukokortikoiden therapiert werden, sollten regelmäßig auf bakterielle Harnwegsinfektionen hin untersucht werden.

Patienten, die unter Langzeit-Glukokortikoidgaben wieder ein schlechtes Hautbild entwickeln, sollten unbedingt auf Sekundärinfektionen und Demodikose untersucht werden (FAVROT et al., 2010). Topisch angewendete Glukokortikoide werden über die Haut in den Organismus aufgenommen und entfalten bei längerer Anwendung ebenfalls lokale und systemische Nebenwirkungen. Seit kurzem ist ein Hydrocortisonaceponat-haltiges Spray (Cortavance®, Virbac) auf dem Markt. Dieser Wirkstoff wird in der Epidermis metabolisiert und soll deshalb weniger systemische Nebenwirkungen haben. In einer Studie wurde gezeigt, dass sich, nach anfänglich einmal täglicher Anwendung und anschließender Reduzierung der Anwendungshäufigkeit an den betroffenen Körperregionen die klinischen Symptome besserten (NUTTALL et al., 2009). Mit diesem Präparat können also Nebenwirkungen vermieden und der Juckreiz an den entsprechenden Stellen dennoch gemildert werden.

#### **2.2.2.4.5. Cyclosporin**

Cyclosporin, ein Calcineurin-Inhibitor, ist hinsichtlich der Therapieerfolge bei der atopischen Dermatitis von Hunden ein mit Glukokortikoiden vergleichbares Medikament (MARSELLA & OLIVRY, 2001), die Wirkung tritt jedoch verzögert ein (4-6 Wochen nach Therapiebeginn), was die Anwendung auf eine Langzeittherapie beschränkt (OLIVRY et al., 2010a). Die häufigsten Nebenwirkungen hierbei sind Erbrechen und Durchfall, die jedoch oft auch transient verlaufen. Ein Nachteil ist der hohe finanzielle Aufwand für den Besitzer. Es besteht alternativ die Möglichkeit den Calcineurinhemmer Tacrolimus in 0,1%iger Salbenform zweimal täglich anzuwenden. Durch die langsam eintretende Wirkung und die mit der Applikation einhergehende anfängliche Irritation ist diese Therapieform jedoch für akute Läsionen nicht geeignet (OLIVRY et al., 2010a).

#### **2.2.2.4.6. Allergenspezifische Immuntherapie**

Bei der allergenspezifischen Immuntherapie (Hypo- oder Desensibilisierung) wird eine Desensibilisierungslösung, die beteiligte Allergene enthält, in gleichmäßigen Abständen unter die Haut gespritzt. Das Ziel dieser Methode ist eine „Gewöhnung“ des Immunsystems an die enthaltenen Allergene und eine weniger starke Reaktion bei Kontakt.

Die spezifische Immuntherapie wird für Hunde und Katzen mit atopischer Dermatitis empfohlen, bei denen die relevanten Allergene mittels Intrakutantest oder Serumallergietest identifiziert wurden und der Allergenkontakt unvermeidlich ist. Weitere Indikationen sind eine erfolglose symptomatische Therapie und/oder deren untragbare Nebenwirkungen (OLIVRY & SOUSA, 2001b). Der exakte Wirkmechanismus der allergenspezifischen Immuntherapie ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Bei einem Großteil der Hunde, bei denen diese Therapie durchgeführt wird, zeigt sich innerhalb von vier Monaten eine mindestens 50%ige Besserung der Symptome. Selten treten Nebenwirkungen auf, zu den häufigsten zählt jedoch ein erhöhter Juckreiz nach der Injektion (GRIFFIN & HILLIER, 2001). Optimale Frequenz, Dosis und Dauer der allergenspezifischen Immuntherapie sind bei Tieren nicht bekannt. Jedoch sollte die Dosis und die Frequenz der Injektionen je nach Reaktion des Patienten individuell auf diesen angepasst werden (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Die Allergene, welche in die Desensibilisierungslösung inkludiert werden, sollten aufgrund des Vorberichts, der positiven Ergebnisse von Serum- und/oder Intrakutantest sowie aufgrund der Umweltbedingungen des Tieres ausgewählt werden. Es ist nicht sinnvoll, positiv getestete Allergene in die Lösung einzubeziehen, zu denen das Tier keinen Kontakt hat (LIAN & HALLIWELL, 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass Schimmelpilz-Ag enzymatische Eigenschaften besitzen, die die Pollen-Ag der Lösung schädigen und somit die Wirkung der Therapie mindern können (MUELLER & BETTENAY, 1996; SCHNABL et al., 2006). Daher ist es ratsam, Pollen- und/oder Hausstaubmilben-Ag-Lösung und Schimmelpilz-Ag-Lösung als getrennte Lösungen anfertigen zu lassen, um bessere Ergebnisse bei der Hyposensibilisierung zu erzielen.

Zusammenfassend ist die allergenspezifische Immuntherapie die einzige Therapieform, die in der Lage ist, die Symptome der cAD in partielle oder totale Remission zu bringen, ohne dass weiterhin entzündungshemmende Medikamente gegeben werden müssten (GRIFFIN & HILLIER, 2001).

### **2.2.3. Pathogenese der atopischen Dermatitis**

Die Erforschung der Pathophysiologie der Atopie stellt die Wissenschaft vor immer neue Herausforderungen, da sie äußerst komplex ist und sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse eine Rolle spielen. Diese beiden Faktoren

beeinflussen Funktionen der Hautbarriere und die Immunantwort von Patienten, die für die Ausbildung der AD prädisponiert sind. Verschiedenste Allergene und Triggerfaktoren sollen ebenfalls zur Manifestation der AD beitragen (LEUNG et al., 2004).

### **2.2.3.1. Keratinozyten und Hautbarriere**

Es gibt immer mehr Anhaltspunkte dafür, dass Defekte der Hautbarriere eine große Rolle bei der AD von Mensch und Hund spielen, obwohl noch nicht ganz klar ist, ob die epidermalen Abweichungen primär oder sekundär bedingt sind.

Es wird angenommen, dass genetisch bedingte Mutationen die Barrierefunktionen der Haut beeinträchtigen und gemeinsam mit entsprechenden umweltbedingten Stressoren zu einer erhöhten Allergenpenetration und Ausbildung einer Allergie führen. Dies wiederum soll die Entwicklung einer  $T_{H2}$ -dominierten Immunantwort begünstigen und die Hautbarriere zusätzlich schädigen (ELIAS & SCHMUTH, 2009).

Die strapazierfähige äußere Schicht der Epidermis, das Stratum corneum, ist eine dünne Schicht vollständig differenzierter kernloser Korneozyten, die in einer lipidreichen Matrix aus Sphingosinen und Ceramiden eingebettet sind (ELIAS, 2005). Vereinfacht kann man sich das Stratum corneum als eine Mauer vorstellen, bei der das verhornte Epithel die Ziegelsteine und die lipidreiche Matrix den Mörtel darstellen. Es wurde nachgewiesen, dass Keratinozyten immunologisch aktive Zellen sind. Durch traumatische Zerstörung der Hautbarriere und ohne zusätzliche Signale von Immunzellen wird die Keratinozytenproliferation stimuliert und die Keratinozyten beginnen mit der Produktion von Zytokinen, welche den Wundheilungsprozess in Gang setzen und auch Teil der Entzündungsreaktion der Haut bei AD und Psoriasis sind (DJALILIAN et al., 2006).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Hautbarrierestörungen bei hAD direkt mit der Schwere der klinischen Symptome und der Wahrscheinlichkeit, im späteren Verlauf des sog. „Atopic march“ Asthma zu entwickeln, in Zusammenhang stehen (SPERGEL & PALLER, 2003). Die Haut von Patienten, die an hAD leiden, präsentiert sich häufig rau und trocken. Dies betrifft nicht nur die läsionalen, sondern auch die nicht-läsionalen Hautareale (SPERGEL & PALLER, 2003).

Da die Haut bei AD relativ arm an Ceramiden ist, was auf den höheren pH in der Epidermis von Patienten mit AD zurückgeführt wird, wird vermutlich die

Aktivität von Enzymen in der Lipid-Matrix, die an der Ceramid-Synthese und der epidermalen Differenzierung beteiligt sind, beeinflusst (JENSEN et al., 2004). Hierdurch entsteht ein Mangel an hydrophobem „Mörtel“, welcher für den vermehrten transepidermalen Wasserverlust sowohl in läsionaler als auch in nicht-läsionaler Haut mitverantwortlich ist (LEUNG et al., 2004).

Es wurde ebenfalls berichtet, dass Proteine die wichtig für die Differenzierung und Verhornung der Epidermis sind, bei Patienten mit AD vermindert sind. Das Protein, dem momentan die meiste Beachtung und Bedeutung in der Wissenschaft zuteil wird, ist das Filaggrin (FLG).

Filaggrin (filament-aggregating protein) spielt eine Schlüsselrolle für die Barrierefunktion der Epidermis. Das *FLG*-Gen befindet sich innerhalb des epidermalen Differenzierungskomplexes auf Chromosom 1q21 (MISCHKE et al., 1996). In der Haut wird *FLG* im Stratum granulosum während der terminalen epidermalen Differenzierung exprimiert (PRESLAND & DALE, 2000; CANDI et al., 2005). *FLG* kodiert für ein großes unlösliches Vorläuferprotein namens Profilaggrin, welches eines der Hauptbestandteile der keratohyalinen Granula ist (MANABE et al., 1991). Aus Profilaggrin entstehen nach proteolytischer Spaltung bis zu zwölf Filaggrin-Peptide. Filaggrine sind essentielle Komponenten der Epidermis. Sie führen zur Aggregation von Keratin und anderen Intermediärfilamenten mit dem Zytoskelett der Keratinozyten, in dem sie die Ausbildung von Disulfid-Brückenbindungen begünstigen. Dies hilft dabei, diese während des Verhorningsprozesses in ihre kompakte Schuppenform zu bringen (CANDI et al., 2005). Die so entstandene „Keratindecke“ dient als wichtige Permeabilitätsbarriere für Wasser, Mikroorganismen und Allergene. Nach der Abflachung der Keratinozyten zerfallen die Filaggrin-Proteine und entlassen dabei hygroskopisch wirksame Aminosäuren, die Wasser in der Zelle binden. Dies dient der Aufrechterhaltung der epidermalen Hydratation und Geschmeidigkeit (JARZAB et al., 2009) und somit ebenfalls der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion. Durch neueste Erkenntnisse lässt sich eine Verbindung zwischen der Genetik und der veränderten Hautbarriere herstellen. Zwei „loss-of-function-Mutationen“ im *FLG* scheinen Risikofaktoren für eine sehr frühe, schwere und lange fortbestehende Form der hAD und die Entstehung von AD in Kombination mit Asthma zu sein (HUDSON, 2006; WEIDINGER et al., 2006; WEIDINGER et al., 2007; MCGRATH & UITTO, 2008; RODRIGUEZ et al., 2009). Eine veränderte Keratinaggregation aufgrund des fehlenden *FLG*

könnte die Hautbarriere empfindlich schwächen und es Allergenen, selbst Aeroallergenen, ermöglichen, in die Haut einzudringen und zu Entzündungen und Sensibilisierungen zu führen, die später eine AD und im Anschluss daran sogar Asthma hervorrufen könnten. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass viele Patienten mit AD keine der *FLG*-Mutationen aufweisen und umgekehrt etwa 40 % der Menschen mit *FLG*-Mutation nicht an hAD leiden (O'REGAN et al., 2009). Weiterhin verliert sich im Laufe des Lebens die Krankheit auch bei Patienten mit diesen Mutationen, obwohl sie eher dazu tendieren, länger an dieser Krankheit zu leiden als Patienten ohne diese Genmutationen (HENDERSON et al., 2008).

Zusätzlich zu den Genmutationen, die Proteine der Hautbarriere betreffen, gibt es Hinweise dafür, dass Mutationen von Genen, die für Proteasen und Protease-Inhibitoren kodieren, für eine defekte Hautbarriere ebenfalls eine Rolle spielen. Die Abschilferung der obersten Hautschicht (Desquamation) wird durch Proteasen und Protease-Inhibitoren reguliert (CAUBET et al., 2004). Mutationen in diesen Genen könnten zu einer verstärkten Desquamation und zu einer Barriere-Störung führen. Ein gutes Beispiel hierfür stellt eine Loss-of-function-Mutation beim Nethertons Syndrom dar. Patienten mit dieser Krankheit leiden an starker AD und weisen hohe IgE-Ak Spiegel im Serum auf. Sie besitzen ein extrem dünnes Stratum corneum, was schwere Defekte der Hautbarriere zur Folge hat (WALLEY et al., 2001) (siehe Punkt 2.2.3.3.2. Abschnitt: hAD und Gemeinsamkeit mit der Netherton's-Krankheit ).

Keratinozyten in atopischer Haut zeichnen sich durch einen intrinsischen Defekt mit einem anormalen Chemokin-Zytokin-Produktionsmuster aus, welches zu einer Anlockung verschiedener Leukozyten und zur Aufrechterhaltung der Entzündung in der Haut führt (GIROLOMONI & PASTORE, 2001). Sie produzieren größere Mengen von IL1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, alles pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine (MASCIA et al., 2003). Außerdem stellen sie relevante Mengen an thymic stromal lymphopoitin (TSLP) her. TSLP regt dendritische Zellen an, die Entwicklung von naiven T-Zellen zu IL4 und IL13 produzierenden T<sub>H2</sub>-Zellen zu stimulieren (YOO et al., 2005; LIU et al., 2007).

Defekte der epidermalen Barriere werden bei Hunden mit AD ebenfalls vermutet. Hinweise für diese Tatsache gibt es aufgrund elektronenmikroskopischer Studien, in denen diskontinuierliche Lipidlamellen in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von atopischen Hunden im Vergleich zu gesunden Kontrollhunden nachgewiesen

wurden (INMAN et al., 2001). In der Tiermedizin wird spekuliert, dass ein primärer Defekt der Hautbarriere für das erhöhte Risiko einer Sensibilisierung gegenüber Umweltallergenen verantwortlich sein könnte. Dieser primäre Defekt würde durch die resultierende allergische Entzündung zu einer weiteren Zerstörung der Hautbarriere führen, was eine Sensibilisierung wiederum erleichtern und das häufige Wiederkehren der klinischen Symptome erklären würde. Diese Hypothese basiert auf der Verteilung der Läsionen, die besonders weniger behaarte Kontaktstellen der Haut betreffen, sowie auf mehreren Studien, die eine gestörte Hautbarrierefunktion vermuten lassen. Hightower et al. wiesen in einer Studie mit sensibilisierten Beagles einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust (transepidermal water loss = TEWL) an den Körperstellen nach, die bei cAD häufig betroffen sind. Diese Veränderungen waren bei Hunden unter zwei Jahren stärker als bei älteren Tieren (HIGHTOWER et al., 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es, als ob diese Barrieredysfunktion eine primäre Veränderung bei jungen und genetisch für AD prädisponierten Hunden ist, was eine vermehrte Penetration von Allergenen in die Haut erklären könnte. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie in der Humanmedizin, bei der eine signifikante Erhöhung des TEWL bei Kindern mit AD im ersten Lebensjahr im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe im selben Alter nachgewiesen wurde (BORALEVI et al., 2008). Defekte im Stratum corneum und den Verbindungen zum Stratum granulosum sind bei high-IgE Beagles (Beagles, die eine genetische Prädisposition dafür besitzen hohe Serum-Konzentrationen an allergen-spezifischem IgE zu entwickeln) ebenfalls mit dem Elektronenmikroskop nachgewiesen worden (MARSELLA et al., 2008; MARSELLA & GIROLOMONI, 2009). Ob diese Veränderung ähnlich wie beim Menschen an eine Lipidabnormalität geknüpft ist oder nicht, ist bisher noch nicht bekannt. Es konnte auch eine fehlerhafte Anordnung der Lipidlamellen in der atopischen Gruppe gesehen werden. In einer Studie wurden interzelluläre Lipide aus dem Stratum corneum des Inguinalbereichs von atopischen und gesunden Hunden quantifiziert (FARTASCH et al., 1992). Der Ceramidegehalt war in läsionaler und klinisch nicht betroffener Haut signifikant niedriger als in der gesunden Kontrollgruppe. Keine Unterschiede fand man im Gehalt von Cholesterol und freien Fettsäuren (FARTASCH et al., 1992).

Atopische Beagles wiesen in ihrer Haut bei immunhistochemischen Untersuchungen eine signifikant niedrigere Expression von FLG auf als die

normale Kontrollgruppe (MARSELLA et al., 2008; MARSELLA & GIROLOMONI, 2009). Morphologisch unterschied sich das FLG nach Färbung ebenfalls zwischen den untersuchten Gruppen. Die Proben der atopischen Hunde zeigten sehr feine Granula, wohingegen die Kontrollgruppe verschiedene gut angefärbte Granula aufwiesen (MARSELLA et al., 2008). Nachdem die Hunde Allergenen von Hausstaubmilben ausgesetzt wurden zeigten die atopischen Beagles eine signifikant geringere FLG-Expression. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung der Expression. Ob diese Hunde jedoch an einer Mutation im *FLG* leiden, ist nicht bekannt. Da die FLG-Expression durch Zytokine moduliert werden kann (HOWELL et al., 2007), ist es vorstellbar, dass auch ohne Genmutation allein die  $T_{H2}$ -polarisierte Immunantwort dieser Beaglekolonie für die verminderte Expression verantwortlich sein könnte. In einer anderen Studie wurde die FLG-Expression von Hunden mit natürlich auftretender cAD im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe untersucht. Dabei wurden in nicht-läsionaler Haut vier unterschiedliche Expressionsmuster mit Hilfe von Immunhistochemie nachgewiesen (CHERVET et al., 2010). Weiterhin wurden West Highland White Terrier auf mögliche *FLG*-Mutationen untersucht (BARROS ROQUE et al., 2009). Jedoch wurde eine Hauptrolle von *FLG*-Mutationen ortholog zur hAD für diese Rasse ausgeschlossen.

Kürzlich durchgeführte Studien geben Hinweise darauf, dass gewisse Allergene der Hausstaubmilbe die basalen Keratinozyten von Hunden derart stimulieren können, dass sie ohne weitere Stimuli verschiedenste Chemokine und Zytokine produzieren und somit die Entzündungsreaktion unabhängig von einer Typ I-Überempfindlichkeitsreaktion einleiten können (MAEDA et al., 2009).

### 2.2.3.2. Veränderte Immunantwort bei AD

Charakteristisch für die AD bei Mensch und Hund ist eine biphasische T-Zell-Antwort. Sowohl  $T_{H1}$ - als auch  $T_{H2}$ -Zellen sind in der Haut atopischer Individuen zu finden. Die  $T_{H2}$ -Immunantwort folgt einem Entzündungsweg, der in vermehrter IgE-Produktion durch B-Lymphozyten resultiert. Hohe IgE-Spiegel sind für die meisten Menschen mit AD charakteristisch, allerdings gibt es auch einige Patienten, die atopische Symptome zeigen, jedoch keinen erhöhten IgE-Serumspiegel aufweisen, was als intrinsische Form bezeichnet wird (LIAN & HALLIWELL, 1998; OLIVRY et al., 2001; AKDIS & AKDIS, 2003; NOVAK &

BIEBER, 2003). Die  $T_{H1}$ -Zell-Reaktion scheint bei chronischen Läsionen zu überwiegen (GREWE et al., 1998). Beide Arten der Immunreaktion werden vermutlich durch Umweltallergene ausgelöst. Die Frage, ob das Immunsystem auf normale Allergenkonzentrationen überreagiert oder ob es sich um eine normale Antwort auf vermehrte Allergene aufgrund einer Störung der Hautbarriere handelt, ist noch nicht geklärt (A. V. RAWLINGS & C. R. HARDING, 2004).

### 2.2.3.2.1. Zytokinprofil

Die Immunantwort bei Patienten mit hAD zeigt einen biphasischen Verlauf. Die Akutphase ist  $T_{H2}$  getragen und zeichnet sich u.a. durch erhöhte Interleukin-4 (IL4) und IL13-Spiegel in läsionaler und nicht-läsionaler Haut aus. Die chronische Phase scheint dagegen eher  $T_{H1}$  dominiert zu sein. Hier steigen die Spiegel von Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) und IL5, begleitet durch ein Infiltrat von Eosinophilen und Makrophagen (HAMID et al., 1994; HAMID et al., 1996). Weiterhin zeigten Studien eine vermehrte Expression von IL16 in akuten Läsionen und eine erhöhte IL12 und Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Faktor (GM-CSF) - Expression in chronischen Hautläsionen (BRATTON et al., 1995; HAMID et al., 1996; LABERGE et al., 1998). Dies ist von Interesse, da IL16 die Infiltration von CD4+ Zellen in akuten Läsionen fördern könnte und GM-CSF wahrscheinlich eine verlängerte Überlebenszeit von Eosinophilen und Makrophagen in chronischen Hautläsionen bewirkt. Die vermehrte Expression von IL12 in chronischen Läsionen ist wichtig, da dieses Zytokin eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von  $T_{H1}$ -Zellen spielt. Es wird vermutet, dass seine Expression durch Eosinophile und/oder Makrophagen den Übergang zu einer  $T_{H1}$  getragenen Immunantwort in chronischen Hautläsionen auslöst (GREWE et al., 1998). Es ist folglich nicht korrekt, die AD als eine klassisch  $T_{H2}$ -getragene Erkrankung zu bezeichnen, gilt dies doch nur für die erste, akute Phase. Dieses biphasische Expressionsmuster wurde ebenfalls in Studien nachgewiesen, in denen Hautbiopsien nach Patchtest-Reaktionen genommen wurden (GREWE et al., 1998). Während der frühen Entnahmepunkte der Hautbiopsien, beispielsweise 24 Stunden nach Allergenauftrag, wurde eine vermehrte Expression von IL4 nachgewiesen. Anschließend sanken die IL4 Werte wieder auf den Basiswert. Dagegen wurde nach 24 Stunden keine vermehrte Expression von IFN- $\gamma$  nachgewiesen. IFN- $\gamma$  wird jedoch verstärkt 48-72 Stunden nach Allergenauftrag exprimiert.

CC Chemokine, RANTES, monocyte chemotactic protein-3 und Eotaxin wurden ebenfalls in vermehrtem Maß in Hautläsionen bei hAD gefunden und sind vermutlich mitverantwortlich für die Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten in die Haut (KABURAGI et al., 2001).

Über Zytokine und Chemokine, die eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Erkrankung spielen, sind in der jüngsten Zeit viele neue Erkenntnisse über ihre Expression und Zusammensetzung gewonnen worden. So scheint das Zytokin IL31, das von  $T_{H2}$ -Zellen exprimiert wird, an der Pathogenese des Juckreizes beteiligt zu sein (CHEUNG et al., 2010). IL17 und IL11 sind am sog. „tissue remodelling“ beteiligt, wobei man Ersteres in akuten und Letzteres in chronischen Läsionen nachweisen konnte (BIEBER et al., 2006).

Die Zytokinproduktion von Hunden mit AD wies in Studien bei einem Großteil der Tiere ein klares  $T_{H2}$ -Zytokinprofil auf (OLIVRY et al., 1999). IL4 (ein  $T_{H2}$ -Zytokin) ist in der Haut von Tieren mit cAD im Vergleich zu gesunden Hunden signifikant erhöht und transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) wird vermindert exprimiert (NUTTALL et al., 2002). TGF- $\beta$  soll eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von peripherer und mukosaler Toleranz gegenüber Umweltantigenen bei Mensch und Mausmodellen spielen (NUTTALL et al., 2002). Eine verminderte TGF- $\beta$ -Transkription könnte daher einen Einbruch der Toleranzentwicklung bedeuten. Beim Vergleich von läsionaler mit nicht-läsionaler Haut wurde in der läsionalen Haut mehr IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL2 ( $T_{H1}$ -Zytokine) nachgewiesen, was ähnlich wie beim Menschen durch Selbsttrauma und Sekundärinfektionen in der späten Phase der Immunantwort begründet sein könnte (NUTTALL et al., 2002).

Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass bei Hunden mit AD nur die typische initiale  $T_{H2}$ -Antwort nachgewiesen werden konnte und in chronischen Läsionen das exprimierte Zytokinprofil variabel sein kann (MARSELLA & GIROLOMONI, 2009).

### 2.2.3.2.2. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) stellen eine komplexe Familie von Zellen dar, die aus vielen Untergruppen unterschiedlichen Ursprungs mit unterschiedlicher anatomischer Lokalisation und Funktion bestehen (LIU, 2001). Neben ihrer besonderen Rolle, als Wachposten des Immunsystems zu agieren, in dem sie

eindringende Pathogene aufnehmen, sind sie besonders effektiv bei der Ag-Präsentation und sie sind in der Lage, naive T-Zellen sowohl zu primen (STEINMAN et al., 1999), als auch die Antwort der verschiedenen T-Zellen zu regulieren. Es wird angenommen, dass DC während der Pathogenese der AD nicht nur Allergene aufnehmen, sondern ebenfalls Schlüsselereignisse für die klinische Manifestation stimulieren (NOVAK & BIEBER, 2005).

In gesunder Haut existieren drei kutane DC-Populationen, die ein gemeinsames Netzwerk ausbilden. Zu ihnen gehören die epidermalen Langerhanszellen (LHC) mit ihren Birbeck-Granula und die dermalen DC, die beim Menschen aus drei Untergruppen mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren bestehen (NOVAK & BIEBER, 2005); zu diesen gehören auch die plasmazytoiden DC (pDC) (ZABA et al., 2008). Während einer Entzündung gibt es eine zusätzliche Untergruppe dermaler „Entzündungs“-DC in der Epidermis und in der Dermis. Sie werden IDEC (inflammatory epidermal DC) genannt (ZABA et al., 2008). Mausmodelle lassen vermuten, dass diese Zellen monozytären Ursprungs sind und möglicherweise Ag zu den abführenden Lymphknoten bringen (STEINMAN et al., 1999). Bei Menschen mit hAD kann eine signifikante Infiltration mit IDEC nachgewiesen werden (GUTTMAN-YASSKY et al., 2007). Alle epidermalen und dermalen DC-Populationen exprimieren den hochaffinen IGE-Rezeptor (Fc $\epsilon$ RI), der an der Entstehung von ekzematösen Hautläsionen beteiligt sein soll (LEUNG et al., 2004; WERFEL, 2009). Bindet IgE an den Fc $\epsilon$ RI produzieren LHC IL16 und IL13, was wiederum Monozyten, IDEC und CD4+-T-Zellen in die Haut lockt. Das wiederum führt zur Produktion von IgE (ELENTNER et al., 2009), was zur T<sub>H2</sub>-Antwort beisteuert. IDEC sollen auch für den Wechsel zur T<sub>H1</sub>-Antwort bei der chronischen hAD verantwortlich sein, indem sie IL12 und IL18 produzieren und proinflammatorische Zytokine freigeben (ALLAM & NOVAK, 2006; BIEBER, 2010). Die pDCs, die Typ-I-Interferone (IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ ) freisetzen, scheinen in AD-Läsionen unterrepräsentiert bzw. abwesend zu sein. Mutmaßlich ist hierfür die verringerte Expression von sog. „Skin-homing-Molekülen“, auf pDCs von AD-Patienten verantwortlich. Da pDCs durch die Produktion von Typ-I-Interferonen an der Abwehr von Virusinfektionen mitwirken, könnten ihre verminderte Anzahl und ihre gestörte Aktivität mitverantwortlich für die gesteigerte Infektanfälligkeit von Patienten mit AD gegenüber Virusinfektionen sein (NOVAK et al., 2004).

Wie auch beim Menschen konnten epidermale LHC beim Hund in größerer Anzahl in Hautbiopsien von läsionalen Bereichen gefunden werden (DAY et al., 1996; OLIVRY et al., 1997; DAY et al., 2008).

Ricklin et al. untersuchten in einer Studie die DC von Hunden mit cAD und verglichen sie mit denen von gesunden und Hunden mit nicht atopischer Entzündung der Haut (RICKLIN et al., 2010). Sie konnten ähnlich wie beim Menschen verschiedene Subtypen von DC finden. Canine LHC und dermale DC ähnelten den epidermalen LHC bzw. den dermalen DC des Menschen. Typisch für die cAD war die Anwesenheit von IgE+ LHC und eine größere Anzahl an IgE+ dermalen DC, ähnlich wie dies auch beim Menschen der Fall ist (WOLLENBERG et al., 1999; GUTTMAN-YASSKY et al., 2007). Dieses Merkmal könnte man durch eine starke IgE-abhängige Allergenaufnahme erklären, der anschließend eine T-Zell-Stimulation folgen würde. Es wurden ebenfalls epidermale und dermale CD14+ Zellen bei Hunden mit cAD gefunden, von denen angenommen wurde, sie entsprächen den IDEC des Menschen, die sich während einer Entzündung sowohl in der Epidermis, als auch in der Dermis „ansiedeln“ können (RICKLIN et al., 2010).

### 2.2.3.2.3. Antigenpräsentation

Die AD ist eine biphasische entzündliche Hauterkrankung, die durch eine initiale,  $T_{H2}$ -Zytokin geprägte Phase, welche anschließend in die zweite,  $T_{H1}$  dominierte chronische Phase übergeht, charakterisiert ist. Die zweite Phase unterliegt beim Hund stärkeren Variationen als beim Menschen. Aus pathophysiologischer Sicht wird vermutet, dass die Fc $\epsilon$ RI-exprimierenden LHCs in der Epidermis eine Schlüsselrolle in der initialen Phase der AD spielen, da sie das fehlende Bindeglied zwischen den die Epidermis durchdringenden Aeroallergenen und den Ag-spezifischen Zellen, die in die Haut einwandern sein könnten. Es wird angenommen, dass Allergene die Haut von Patienten mit AD aufgrund einer Hautbarrierestörung durchdringen und in die Epidermis gelangen können, wo sie von den Fc $\epsilon$ RI-gebundenen IgE-Molekülen der epidermalen LHCs aufgenommen werden. Der Kontakt der DCs mit Ag führt zu einer Reihe von Ereignissen, die die DC so verändern, dass sie zu den Lymphknoten abwandern und T-Zellen aktivieren können. Zusätzlich führt die Fc $\epsilon$ RI-Aktivierung von LHCs zur Ausschüttung von Chemokinen wie IL16, welche für die Anlockungen anderer proinflammatorischer Zellen in die Haut verantwortlich sind. Die Polarisation von

naiven T-Helfer-Zellen ( $T_{H0}$ ) kann nur durch bestimmte Eigenschaften von APC eingeleitet werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass LHC die durch den Fc $\epsilon$ RI aktiviert wurden,  $T_{H0}$ -Zellen dazu stimulieren, sich in IL4 produzierende  $T_{H2}$ -Zellen zu verwandeln. Eine neue Hypothese ist, dass IDECs den Wechsel von  $T_{H2}$  zu  $T_{H1}$ -Immunantwort einleiten sollen. Es wird vermutet, dass sie monozytären Ursprungs sind und während der akuten Phase der AD durch verschiedene Signale von Entzündungszellen wie beispielsweise LHCs in die Epidermis gelockt werden. Vermutlich sinkt deshalb die Anzahl der IDEC Vorläuferzellen im peripheren Blut bei Menschen mit Symptomatik ab und steigt nach Verbesserung der klinischen Symptomatik wieder an. Nach ihrer Abwanderung in die Haut sollen die IDECs Mediatoren synthetisieren und ausscheiden, die zu einer Steigerung der Ag-Präsentation führen könnten. Zusätzlich sollen Fc $\epsilon$ RI-aktivierte IDECs  $T_{H0}$ -Zellen zu IFN $\gamma$  produzierenden  $T_{H1}$ -Zellen umwandeln und IL12 und IL18 sezernieren, was zu einem Wechsel von  $T_{H2}$  zu  $T_{H1}$ -Immunantwort führt (NOVAK et al., 2003).

#### **2.2.3.2.4. T-Zell-homing**

Haut-selektives „homing“ von Gedächtnis und Effektor-T-Zellen stellt ein wichtiges immunologisches Ereignis in der Pathophysiologie der AD dar. Cutaneous lymphocyte Antigen (CLA) ist ein „skin homing“-Rezeptor, der eine Untergruppe zirkulierender T-Gedächtniszellen definiert. CLA interagiert mit dem Blutgefäßrezeptor E-Selectin an entzündeten dermalen postkapillären Venolen. Dies stellt die Basis für ein selektives und sofortiges Einwandern von CLA+-T-Zellen in die Haut nach Eindringen von fremden Antigenen und Allergenen dar (TRAUTMANN et al., 2001). Es wurde nachgewiesen, dass das Haut assoziierte Chemokin CCL27 und sein Rezeptor CCR10 die chemotaktische Anlockung von „skin homing“-T-Zellen in vitro und in vivo stimulieren (HOMEY et al., 2002). Weitere wichtige Kofaktoren für diesen „homing“-Prozess sind  $\alpha$ -6 Integrin, vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1 und IL-8, das im peripheren Blut von Patienten mit AD in höherer Konzentration nachgewiesen werden kann (HWANG, 2001).

#### **2.2.3.2.5. Regulatorische T-Zellen ( $T_{Reg}$ )**

Die Familie der regulatorischen T-Zellen ist sehr komplex geworden und beinhaltet eine Reihe von unterschiedlichen T-Zell-Typen, die alle die Fähigkeit

besitzen, die Proliferation anderer Lymphozyten zu unterdrücken. Sie können alle durch die Expression des nukleären Faktor Foxp3 charakterisiert werden. Regulatorische T-Zellen können sowohl  $T_{H1}$ - als auch  $T_{H2}$ -Zellen unterdrücken. Superantigene von *S. aureus* scheinen diese  $T_{Reg}$ -Zellen in ihrer Funktion zu behindern und könnten auf diese Art Entzündungsreaktionen der Haut begünstigen (BIEBER et al., 2006).

#### **2.2.3.2.6. Eosinophile Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AD. Charakteristisch sind hohe Zahlen dieser Zellen in läsionaler Haut und im peripheren Blut (SIMON et al., 2004). Ihre Anzahl korreliert mit der Aktivität der Krankheit und sinkt während der Therapie. Sie scheinen durch Zytokine wie IL-5 und IL-13 in die Gewebe gelockt und dort aktiviert zu werden. Es gibt weitere Hinweise dafür, dass Eosinophile auch für neuroimmunologische Interaktionen entscheidend sein könnten (RAAP et al., 2005).

#### **2.2.3.3. Genetische Komponente**

Für eine genetische Komponente der hAD spricht eine in den meisten Fällen positive Familienanamnese sowie die signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für Neugeborene, eine AD zu entwickeln, wenn beide Eltern von dieser Krankheit betroffen sind (LEUNG & BIEBER, 2003).

Die cAD weist anerkanntermaßen Rasseprädisposition auf, die einige Rassen stärker betrifft als andere. Besonders häufig erkranken West Highland White Terrier und Golden Retriever bzw. Labrador Retriever (SCOTT & PARADIS, 1990; PICCO et al., 2008). Windhunde dagegen sind selten betroffen, was eine genetische Komponente vermuten lässt (TARPATAKI et al., 2006). Eine britische Studie mit Begleithunden zeigte eine Heritabilität von 0,47, was diese Vermutung bestärkt (SHAW et al., 2004). Eindeutigere Hinweise für die Erblichkeit existiert bei der hAD, bei der die Heritabilität bei eineiigen Zwillingen bei 0,72-0,77 liegt (LARSEN et al., 1986; SCHULTZ LARSEN, 1993).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Krankheit bei Mensch und Hund wird bei beiden ein signifikanter genetischer Hintergrund vermutet.

Die Erforschung des genetischen Hintergrundes komplexer Krankheiten kann man aufgrund unterschiedlicher Ansätze und Methoden in zwei Kategorien einteilen –

Aufdeckung von möglichen Kandidatengenen und Erforschung der genetischen Veränderung der Kandidatengene bei der erkrankten Population. Zur Identifizierung und Untersuchung von Kandidatengenen wurden bisher Microarray- und qPCR- sowie Kopplungs- und Kandidatengen-Analysen durchgeführt.

Die Kopplungs- („Linkage“-) Analyse dient zum Aufdecken von chromosomalen Regionen, die mit einer genetisch komplexen Krankheit assoziiert sein könnten. Hierfür werden i.d.R. Familien mit mindestens zwei betroffenen Familienmitgliedern und deren Eltern rekrutiert (sog. „affected sib pairs“, ASP) klinisch phänotypisiert und ihre Desoxyribonukleinsäure (DNA) genomweit mit komplexen Verfahren untersucht (RISCH & MERIKANGAS, 1996). Bei diesem Ansatz, der der Methodik bei monogenen Erkrankungen ähnelt, benötigt man keine Vorkenntnisse über Pathophysiologie, jedoch eine genaue Definition der Krankheit. Eine weitere Möglichkeit Kandidatengene mittels holistischem Ansatz zu finden, sind Transkriptom-Analysen. Dabei wird die gesamte Ribonukleinsäure (RNA) von Gewebeproben erkrankter Individuen mit der von gesunden Individuen verglichen und Expressionsprofile für jede Gruppe erstellt. Gene, deren Expressionsmuster bei erkrankten von den gesunden Kontrollen abweicht (also vermehrt oder vermindert exprimiert), sind möglicherweise am Krankheitsgeschehen beteiligt und können in weiterführenden Studien genauer untersucht werden.

Studien, welche Veränderungen in Kandidatengenen untersuchen, setzen Kenntnisse über die Pathophysiologie der Krankheit voraus und ermitteln die Assoziation von Polymorphismen in bereits bekannten Kandidatengenregionen. Für die Untersuchungen werden keine verwandten Individuen benötigt, jedoch müssen potenzielle Gene erst einmal identifiziert werden. Die Auswahl der zu untersuchenden Kandidatengene basiert häufig auf Literaturrecherche und konzentriert sich in der Regel auf Gene, die besonders mit der Krankheit verbunden sind. Unter Polymorphismen oder Varianten („single nucleotide polymorphism“ oder SNP), versteht man Fehler in der Basensequenz durch Austausch von einzelnen Basenpaaren in relevanten Genregionen, die so zu funktionellen Konsequenzen für die Expression eines Genproduktes führen können. Die meisten SNPs im humanen Genom bleiben allerdings ohne bekannte Auswirkung und sind daher nur zum Teil von funktioneller Relevanz.

Durch beide Methoden werden krankheitsspezifische Allele der AD und andere

Gene, die mit klinischen Merkmalen assoziiert sind, untersucht (HOFFJAN & EPPLEN, 2005).

Merryman-Simpson et al. untersuchten 2007 die Genexpression in der Haut atopischer Hunde im Vergleich zu gesunder Haut. Dabei wurde die Expression in läsionaler Haut mit der von nicht-läsionaler Haut atopischer Hunde und der Haut gesunder Hunde verglichen. Für die Analysen wurde eine Microarrayanalyse verwendet, die den Vorteil hat, unvoreingenommen Gene zu untersuchen. Aufgrund der großen Bandbreite an Genen, die untersucht werden, können neue Kandidatengene identifiziert werden. Bei dieser Studie wurden 54 von 22.000 Genen identifiziert, deren Expression im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe verändert waren. Diese Gene sind wichtig für das Immunsystem, die Immunantwort, den Zellzyklus, Apoptose, Hautbarrierebildung und die transkriptionelle Regulation (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008).

### 2.2.3.3.1. Kopplungsanalysen

Bislang wurden drei genomweite Kopplungsanalysen für hAD publiziert. Zwei der genomweiten Kopplungsanalysen wurden an Kindern mit AD durchgeführt (LEE et al., 2000; COOKSON et al., 2001). Die erste Analyse, deren Patienten Kinder aus deutschen und skandinavischen Familien waren, fand eine Verbindung zu einer Region auf dem Chromosom 3q21 (LEE et al., 2000). Die zweite Analyse an Kindern britischer Familien fand drei Genregionen mit Verbindung zu AD oder zu einer Kombination von AD und Asthma auf den Chromosomen 1q21, 17q25 und 20p (COOKSON et al., 2001).

Die erste Studie fand zusätzlich eine Verbindung zwischen erhöhten Serum-IgE-Spiegeln und Chromosom 3q21 (LEE et al., 2000). Die zweite Studie fand für dieselbe Fragestellung eine Verknüpfung zu den Chromosomen 5q31 und 16qtel (COOKSON et al., 2001). Allerdings waren die Hinweise für die Verbindung zu einem erhöhten Serum-IgE-Spiegel stets schwächer als der Hinweis für eine Koppelung mit AD.

Eine dritte genomweite Kopplungsanalyse wurde an erwachsenen Schweden mit AD durchgeführt (BRADLEY et al., 2002). Mögliche Hinweise für eine Verbindung mit AD wurden bei den Chromosomenregionen 3p24-22 gefunden. AD gemeinsam mit einem erhöhten allergenspezifischen Serum-IgE-Spiegel zeigte eine mögliche Verbindung zu Chromosom 18q21. Die Autoren nahmen in

ihrer Studie auch einen „Severity score of atopic dermatitis“ zu Hilfe und fanden Hinweise auf Verknüpfungen zu den Chromosomen 3q14, 13q14, 15q14-15 und 17q21. Es wäre denkbar, dass der 3q14 und der 17q21 Lokus mit den Genloci, die bei der AD bei Kindern identifiziert wurden, übereinstimmen. Für das Chromosom 13q14 wurde in früheren Studien eine Verknüpfung zu Kindern mit AD (BEYER et al., 2000), Atopie und Asthma (ANDERSON et al., 2002) hergestellt. Die anderen Genloci scheinen neu zu sein.

Ein überraschendes Ergebnis dieser Studien war jedoch, dass diese Regionen nicht mit den für allergisches Asthma bekannten Genregionen übereinstimmten, was einen gemeinsamen genetischen Hintergrund der beiden Krankheiten vermissen lässt. Stattdessen haben weitere Untersuchungen gezeigt, dass sich die vier Genloci (1q21, 17q25, 20p und 3q21) für AD in der Nähe von Regionen befinden, die Gene enthalten, die mit der Prädisposition für Psoriasis assoziiert sind (BOWCOCK & COOKSON, 2004). Das überrascht, da beide Erkrankungen klinisch und von unserem jetzigen pathophysiologischen Verständnis her viele Unterschiede aufweisen. Einige gemeinsame Merkmale der beiden Krankheiten sind trockene, schuppige Haut und eine gestörte epidermale Differenzierung. Die Übereinstimmungsraten bei monozygoten und dizygoten Zwillingen mit Psoriasis ähneln denen bei Zwillingen mit AD (FARBER et al., 1974; BRANDRUP et al., 1978), was auf einen ähnlich starken genetischen Einfluss hinweist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die gemeinsamen Kopplungsregionen auf dem Genom zwischen AD und Psoriasis polymorphe Gene enthalten, die generelle Effekte auf Hautentzündung und – immunität besitzen. Zusätzlich zeigt einer der gemeinsamen Genloci (20p12) auf Chromosom 20p ebenfalls eine starke Kopplung zu Lepra-prädisponierten Familien, welche in einer für Lepra endemischen Region Süindiens lebten (TOSH et al., 2002). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass bestimmte Gene oder Gen-Familien einen generellen Effekt auf die Immunreaktionen der Haut haben und an der Kontrolle chronischer Entzündungen der Haut beteiligt sind. Die Genregionen 20p und 16q werden mit AD und Asthma sowie mit einem erhöhten Serum-IgE in Verbindung gebracht. Der 17q25-Genlocus zeigt ebenfalls eine Verbindung zu Krankheiten wie multiple Sklerose und rheumatoider Arthritis (BOWCOCK & COOKSON, 2004). Dies bestärkt die Vermutung, dass es eine Überschneidung zwischen den Genloci verschiedener entzündlicher Krankheiten gibt.

## Epidermaler Differenzierungs-Komplex (Chromosom 1q21)

Genetische Kopplungsanalysen haben gezeigt, dass die größte Übereinstimmung bei AD und Psoriasis auf dem Chromosom 1q21 in der Region des humanen epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC = epidermal differentiation complex) liegt (COOKSON et al., 2001). Der EDC ist ein Cluster von Genen und Genfamilien, die für Proteine kodieren, welche bei der endgültigen Differenzierung der Epidermis eine Rolle spielen (CANDI et al., 2005). Das verhornte Epithel ist einer der Schlüsselmechanismen der Entwicklung der Barriere. Störungen in der Differenzierung des verhornten Epithels spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Hautläsionen bei der AD (PRESLAND & DALE, 2000; ECKERT et al., 2005). Der EDC enthält Genregionen für Profilaggrin (*FLG*), Loricrin (*LOR*), Involucrin (*IVL*), S100A kalziumbindende Proteine (calcium-binding proteins) und kleine Prolin-reiche Proteine (SPRRs = small proline-rich proteins), die essentiell für die Differenzierung der Keratinozyten und für die epidermale Barriere sind (PRESLAND & DALE, 2000; S. BENOIT et al., 2006; GLASER et al., 2008; JARZAB et al., 2009). Bei vielen dieser Gene wurde in Genexpressionsstudien eine vermehrte Expression in der Haut von Patienten mit AD und Psoriasis nachgewiesen (NOMURA et al., 2003b). Obwohl noch keine Polymorphismen in bestimmten Genen des EDC mit einer bestimmtem Krankheit in Zusammenhang gebracht werden konnten, kristallisierte sich heraus, dass sich in diesem Cluster Allele für die Anfälligkeit gegenüber dieser Krankheiten befinden müssen (CAPON et al., 1999). Die Gene des EDC werden während der späten Reifung der epidermalen Zellen exprimiert (HARDAS et al., 1996). Viele Mitglieder der S100-Proteinfamilie werden bei Psoriasis übermäßig exprimiert, keines dieser Gene ist herunter reguliert (BOWCOCK et al., 2001). *S100A2*, *S200A7*, *S100A8* und *S100A9* zeigten eine starke und vor allen Dingen signifikante Hochregulation in läsionaler Haut von Patienten mit hAD (JARZAB et al., 2009). Merryman-Simpson et al. zeigten, dass *S100A8* bei der cAD das am stärksten exprimierte Gen ist. Allerdings trifft dies nur für die läsionalen Hautbezirke zu (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008). Wood et al. untersuchten die Korrelation von vermehrt exprimierten Genen in der Haut atopischer Hunde und ihre Korrelation zum Clinical Severity score (CADESI). Dabei korrelierte die Expression von *S100A8* sowohl mit dem CADESI als auch mit den Reaktionen im intradermalen Test (IDT) (WOOD et al.,

2009).

Die S100 calcium-binding proteins werden häufig sezerniert und sind an einer großen Bandbreite an immunologischen Aktionen beteiligt (DONATO, 2001). Sie sind eine Gruppe pro-inflammatorischer Moleküle, die durch Phagozyten während einer Entzündung freigesetzt werden (ROTH et al., 2003). Es wurde nachgewiesen, dass der Schweregrad der Entzündung von ihrem Spiegel abhängt (S. BENOIT et al., 2006). Die Ausschüttung dieser Entzündungsmoleküle wird durch TNF- $\alpha$ , ein Zytokin, dass sowohl bei der caninen also auch bei der humanen AD exprimiert wird, stimuliert. S100A2 wirkt chemotaktisch für eosinophile Granulozyten (KOMADA et al., 1996). S100A7 (Psoriasin) ist ein potentes und selektives chemotaktisches Entzündungsprotein für CD4+ T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten (JINQUAN et al., 1996). Weiterhin dient es als antimikrobielles Protein, das vor allem gegen *E.coli* wirkt. Es wird in AD vermehrt exprimiert und ist möglicherweise die Erklärung dafür, warum die Besiedlung mit diesem Keim nicht typisch für diese Krankheit ist (GLASER et al., 2005; GLASER et al., 2008). S100A8 und S100A9 bilden einen Komplex, der zytostatische (GHAVAMI et al., 2004) und antibakterielle Aktivität besitzt (STEINBAKK et al., 1990). Dieser Komplex hemmt auch die Aktivierung von Makrophagen (AGUIAR-PASSETI et al., 1997) und die Immunglobulinsynthese durch Lymphozyten (BRUN et al., 1994). Wenn S100A8 als Homodimer vorliegt, ist es ein starkes chemotaktisches Molekül für Leukozyten (CORNISH et al., 1996; PASSEY et al., 1999). S100A12 besitzt eine pro-inflammatorische Wirkung auf Endothel- und Entzündungszellen (HOFMANN et al., 1999). Zur SPRR-Familie gehörende Gene, die übermäßig exprimiert werden, sind *SPRR3*, *SPRRK*, *SPRR1B* und *SPRR2A*. Das Expressionsmuster spezieller Gene des EDC bei AD wurde bisher noch nicht detailliert beschrieben, es wurde jedoch beobachtet, dass *SPRR2C* zehnfach höher exprimiert wird als in Haut von Psoriasis-Patienten und die *S100A12*-Expression dreifach erhöht ist (NOMURA et al., 2003b).

Jarzab et al. 2009 wiesen eine signifikante Hochregierung der *IVL*-Expression in läisionalen Hautbezirken nach (JARZAB et al., 2009). *IVL* wird als humaner Keratinozyten-Differenzierungsmarker genutzt und seine vermehrte Expression ist in der frühen epidermalen Differenzierung normal. Aus dieser Tatsache kann geschlossen werden, dass dieser Schritt in der EDC Differenzierung bei der AD nicht gestört bzw. beeinträchtigt ist.

Die Funktion einiger EDC-Genprodukte weist darauf hin, dass die Haut nicht nur eine passive Barriere darstellt. Dementsprechend werden die S100A calcium-binding proteins häufig als Antwort auf eine Entzündung sezerniert und besitzen weitgreifende immunologische Fähigkeiten (DONATO, 2001). Angesichts dieser Tatsache ist die Haut als erste Grenzfläche zwischen Körper und Umwelt zu verstehen, die eine Bandbreite an Antwortmöglichkeiten auf eine Vielzahl von schädigenden äußeren Einflüssen initiieren kann.

### **Chromosom 3q21 und 17q25**

Eine Verbindung mit diesem Chromosom wurde bei Kopplungsanalysen für AD (BRADLEY et al., 2002), Psoriasis (ENLUND et al., 1999) und Asthma (HAAGERUP et al., 2002) nachgewiesen. Allerdings hat sich noch kein gemeinsames Kandidaten-Gen herauskristallisiert. Bei schwedischen Familien mit Psoriasis konnte eine veränderte Genexpression von *SLC12A8* (Solute carrier family 12, Member 8) einem Kalium/Chlorid-Transporter gezeigt werden. Ein weiterer solute carrier auf dem Chromosom 5q31 (*SLC22A4*), ein organischer Kationen-Transporter, ist mit rheumatoider Arthritis assoziiert (TOKUHIRO et al., 2003). *SLC22A4* ist für hämatologische und immunologische Gewebe spezifisch und wird durch pro-inflammatorische Stimuli induziert. Es wird angenommen, dass *SLC22A4* als Transporter in lymphatischen Organen oder entzündlichem Milieu arbeitet. Zusätzlich ist *SLC9A3R1* von Chromosom 17q25 mit Psoriasis (HELMS et al., 2003) vergesellschaftet und bindet den solute carrier *SLC9A3*, einen Natrium/Wasserstoff-Austauscher. Funktionelle Studien dieser Proteine könnten als Gemeinsamkeit von entzündlichen Krankheiten einen verstärkten Kationen-Transport ergeben.

#### **2.2.3.3.2. Kandidatengenanalysen**

In den letzten Jahren wurden bei Menschen und Hunden schon viele potenzielle Kandidatengene identifiziert, die in direkten Zusammenhang mit AD gebracht wurden.

Auf Chromosom 5q31-33 finden sich Gene für die Zytokine IL3, IL4, IL5, IL13 und GM-CSF, die alle an einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort beteiligt sind (LIU et al., 2003). Auch auf Varianten in der IL13 kodierenden Genregion ist hingewiesen worden (LIU et al., 2003; COOKSON, 2004). Bei einer Kopplungsanalyse wurde bei Japanern ein Zusammenhang zwischen AD und IL4 Genen hergestellt

(KAWASHIMA et al., 1998). Diese Gene kodieren für die alpha-Kette des IL4-Rezeptors (16p12–p11). Polymorphismen in diesem Bereich könnten die IL4-rezeptorbedingte Signaltransduktion und die IgE-Synthese empfindlich beeinflussen. IL4 und IL13 sind die einzigen Zytokine, welche durch Interaktion untereinander und mit ihren Rezeptoren eine IgE Synthese induzieren können (DE VRIES, 1998). Bei Patienten mit AD finden sich in der Region, die für die alpha-Kette des IL4-Rezeptors kodiert, im Vergleich zu Patienten mit Ekzem ohne Sensibilisierungen und ohne erhöhte IgE-Serumspiegel eine gesteigerte Frequenz von SNPs (OISO et al., 2000). Ähnliches beobachteten Liung et al. in einer Studie 2003 bei zwei Polymorphismen des IL13-Genes (C-1055T und Arg130Gln). Eine weitere Genregion, die sich die AD mit einer anderen chronisch-entzündlichen Erkrankung teilt, findet sich im Bereich des „Caspase recruitment domain containing protein15“ (CARD15). Spezielle genetische Eigenheiten dieser Region haben hAD Patienten mit Morbus Crohn Patienten gemeinsam.

### **Polymorphismus im IL18 Genlocus**

Seit langem wird die Ansicht vertreten, dass ein Ungleichgewicht von  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ - Immunantwort der AD zu Grunde liegt. Eine solche Dysbalance scheint sich bei Polymorphismen im IL18-Gen beim Menschen einzustellen. Periphere mononukleäre Zellen, die diesen Polymorphismus aufweisen, reagieren nach Stimulation mit Super-Ag, beispielsweise von *S. aureus* mit einer vermehrten Produktion von IL18, welches wiederum in einer Verminderung von IL12 und folglich in einer  $T_{H2}$  Immunantwort resultiert (NOVAK et al., 2005; TRZECIAK et al., 2010).

### **Toll-like-Rezeptor 2**

Eine besonders schwere Verlaufsform der hAD mit einer ausgeprägten Besiedelung der erkrankten Haut durch *S. aureus* findet man bei Patienten, die den SNP R753Q im Toll-like-Rezeptor-(TLR)2-Gen in erhöhter Frequenz aufweisen (OH et al., 2009). TLR2 ist ein Protein der TLR-Familie, die eine fundamentale Rolle in der Pathogenerkennung und in der Aktivierung des Immunsystems spielt. Nach der Ag-Erkennung wird die Produktion von Zytokinen, die für eine effektive Immunität unerlässlich sind, gefördert.

## RANTES

Andere Verbindungen sieht man zwischen AD und funktionellen Mutationen der Promotorregion von *RANTES* (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted). Charakteristisch für allergisch bedingte Entzündung und atopische Krankheiten ist eine Hochregulation der CC-Chemokin-Expression. Es wurde eine funktionelle Mutation im proximalen Promoter des *RANTES*-Gens (19q11) identifiziert, was in einer neuen „consensus binding site“ für die GATA Transkriptionsfaktorfamilie resultiert. Das mutierte Allel war in einer deutschen Multicenter-Allergiestudie mit AD bei Kindern assoziiert, jedoch nicht mit Asthma (NICKEL et al., 2000). Transfektionsexperimente ergaben, dass der mutierte Promoter das Expressionslevel von RANTES um den Faktor acht erhöhte (NICKEL et al., 2000). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass diese Mutation ebenfalls ihren Beitrag zur Entwicklung der AD leisten könnte.

## Filaggrin

PALMER et al. 2006 identifizierten zwei unabhängige „loss of function-Mutationen“ (R501X und 2282del4) im *FLG*-Gen. Diese Mutationen sollen für eine Prädisposition für AD in Kombination mit Asthma verantwortlich sein (PALMER et al., 2006). Seither wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die ebenfalls bestätigten, dass Veränderungen im *FLG* stark mit der Entwicklung von AD assoziiert sind. Diese Entdeckung kann als Durchbruch für das Verständnis eines wichtigen Teiles der genetischen Grundlage und Pathogenese dieser Krankheit gewertet werden.

Beim Hund konnten loss-of-function Mutationen im *FLG*-Gen bisher nicht nachgewiesen werden (BARROS ROQUE et al., 2009). Allerdings wurde in immunhistochemischen Untersuchungen von atopischen Hunden im Vergleich zu gesunden Hunden eine verminderte Expression beobachtet (MARSELLA et al., 2008; CHERVET et al., 2010).

## hAD und Gemeinsamkeit mit der Netherton-Krankheit

Die Netherton Krankheit ist eine seltene rezessive Erbkrankheit, für die generalisiert gerötete Haut, Symptome von atopischen Krankheiten (Heuschnupfen, Urtikaria, Asthma und Lebensmittelunverträglichkeitsreaktionen) und sehr hohe IgE-Spiegel charakteristisch sind (CHAVANAS et al., 2000). Das

Gen, welches für die Netherton-Krankheit identifiziert wurde, ist *SPINK5* und kodiert für einen Serinprotease-Inhibitor mit 15 Domänen namens LEKTI, welcher an epithelialen und mukosalen Oberflächen und im Thymus exprimiert wird. Mutationen in diesen Genen könnten zu einer verstärkten Desquamation und zu einer Barriere-Störung führen. Beim Netherton-Syndrom leiden die Patienten an einer Loss-of-function-Mutation in diesem Gen. Polymorphismen in diesem Gen sind mit AD, Asthma und erhöhtem Serum IgE-Spiegel vergesellschaftet (WALLEY et al., 2001; KATO et al., 2003). Jede der LEKTI/*SPINK5* Protease-Inhibitor-Domänen unterscheidet sich ein wenig von den anderen (MÄGERT et al., 2002), was möglicherweise auf eine polyvalente Interaktion mit verschiedenen Substraten hinweist. Das Protein wird in der äußeren Epidermis, den Talgdrüsen und um Haarschäfte exprimiert (KOMATSU et al., 2002), was vermuten lässt, dass seine Funktion sich eher gegen Proteasen richtet, die von der Umwelt kommen. Dies passt zu der Beobachtung, dass etwa ein Drittel der Patienten mit AD an schweren bakteriellen Hautinfektionen leidet und diese Läsionen zu 90 % mit *S. aureus* besiedelt sind (LEYDEN et al., 1974). Nahezu alle Stämme von *S. aureus*, die aus Läsionen von Patienten mit AD isoliert wurden, weisen einen hohen Grad an proteolytischer Aktivität auf, welcher bei verminderter Protease-Inhibitor-Aktivität nicht entgegengewirkt werden kann. Im Gegensatz dazu wurde bei den Kontrollstämmen, die von der Haut gesunder Menschen isoliert wurden, kaum proteolytische Aktivität nachgewiesen (MIEDZOBRODZKI et al., 2002). Diese Tatsache gibt weitere Hinweise darauf, dass *SPINK5* möglicherweise wichtig für die Unterdrückung dieser proteolytischen Aktivität ist.

Viele Kinder die an AD leiden, haben hohe Serum-IgE-Ak-Titer, die spezifisch für Ag der ubiquitär vorkommenden Hausstaubmilbe *D. pteronyssinus* ist. Die Hauptallergene dieser Hausstaubmilbe (*Der p I* und *Der p II*), die aus dem Kot der Milbe stammen, sind Proteasen, welche einen starken Effekt auf epitheliale Zellen haben. Dies schließt die Zerstörung von interzellulären Adhäsionen, erhöhter parazelluläre Permeabilität und Einleitung des Zelltodes mit ein (WINTON et al., 1998). Falls diese externen Protease-Quellen wichtig für die Pathogenese dieser Krankheit sind, wäre die Hemmung von Proteasen ein möglicher neuer therapeutischer Ansatz für die AD.

Wood et al. verglichen die Expression ausgewählter Gene zwischen allergischen und nichtallergischen Hunden mittels qPCR und identifizierten Korrelationen mit

CADESI und IDT. Bei den atopischen Hunden wurde *SPINK5* vermehrt exprimiert und korrelierte mit dem CADESI und der Reaktionsstärke im IDT (WOOD et al., 2009); diese Beobachtungen stimmen nicht mit denen bei der hAD überein.

### **CC-Chemokine, Nel-like-2-Protein, Tenascin C**

NOMURA et al. 2003 zeigten in einer Studie, bei der die Expression in der Haut von Patienten mit AD mit der von Psoriasis-Patienten verglichen wurde, dass der größte Unterschied in der Expression des Zytokinmusters der Hautläsionen lag. Dies ist nicht verwunderlich, da Psoriasis und AD unterschiedliche Pathophysiologien zugrunde liegen. Dementsprechend wurde bei Patienten mit AD eine erhöhte Expression derjenigen Gene gefunden, die für CC-Chemokine kodieren. Von ihnen ist bekannt, dass sie  $T_{H2}$ -Zellen und eosinophile Granulozyten anlocken. Im Gegensatz dazu wurden bei Psoriasis-Patienten vermehrt CXC-Chemokine exprimiert, die  $T_{H1}$ -Zellen und neutrophile Granulozyten rekrutieren.

Zusätzlich zur unterschiedlichen Expression der Entzündungs- und Chemokin-Gene zeigten zwei weitere Gene mit möglicher Relevanz für die Pathophysiologie der AD eine signifikant vermehrte Expression. Zum Einen wurde das Nel-like 2-Protein verstärkt exprimiert, welches vermutlich die Funktion eines Wachstumsfaktors für sensorische Nerven in der Haut besitzt. Dies könnte zu einer erhöhten Empfindlichkeit der atopischen Haut gegenüber Juckreiz führen. Zum anderen war die Expression des Gens für Tenascin C erhöht, ein Molekül der extrazellulären Matrix und ein Hemmer von Plasminogen-Aktivatoren. Dies könnte Heilungs- und Remodellierungsvorgänge als Antwort gegenüber der allergischen Entzündungsreaktion widerspiegeln (NOMURA et al., 2003b).

#### **2.2.3.4. Umwelteinflüsse und Provokationsfaktoren**

##### **2.2.3.4.1. Die Hygiene-Hypothese**

Es gilt als erwiesen, dass eine generelle Neigung zu AD genetisch festgelegt ist, jedoch reicht dieser genetische Hintergrund alleine nicht aus, um den schnellen Anstieg der atopischen Krankheiten heutzutage zu erklären. Daher wurden verschiedenste Hypothesen aufgestellt, um den Anstieg der Prävalenz dieser Krankheit zu erklären. Eine Hypothese ist, dass bei genetisch prädisponierten

Individuen der Einfluss der Umwelt schon im Mutterleib und in frühen Lebensjahren zu einer Manifestation der AD führen kann. Dabei wird angenommen, dass humane fetale Lymphozyten als Konsequenz eines intrauterinen „primings“ durch plazentale Zytokine und Hormone und möglicherweise durch eine transplazentale Allergenexposition zu einem  $T_{H2}$ -Profil hin verzerrt werden (BJORKSTEN, 2000; BEVER, 2002). Während der postnatalen Phase ändert sich bei gesunden Individuen die  $T_{H2}$  dominierte Immunantwort zu einem  $T_{H1}$  dominierten Reaktionsprofil. Dies geschieht sicherlich als Konsequenz der Stimulation des Immunsystems mit verschiedensten Komponenten von Infektionserregern einschließlich deren Endotoxine (BJORKSTEN, 2000; BEVER, 2002).

Infektionen lösen eine IFN $\gamma$ -dominierte  $T_{H1}$ -Immunantwort aus, was zu einer Unterdrückung der  $T_{H2}$ -Immunantwort führt. Die Beziehung zwischen Endotoxinexposition und Entwicklung der Erkrankung wird durch den Zeitpunkt der Endotoxinexposition, durch die Art, die Dosis und die Frequenz des Stimulus und durch die genetische Variation der individuellen Fähigkeit, auf Endotoxine zu reagieren, beeinflusst. Atopische Patienten mögen nur mangelhaft fähig sein, auf Endotoxine zu reagieren. Diesem Unvermögen könnten funktionelle Varianten der TLRs von Patienten mit hAD, welche wiederum das Ergebnis von SNPs in den entsprechenden Genregionen sein könnten, zugrunde liegen. Einflüsse der modernen Lebensweise, wie der Einsatz von Antibiotika, eine verminderte Familiengröße und die Verbesserung der hygienischen Standards führen zu einer verringerten Exposition gegenüber Bakterien, was wiederum die Entwicklung einer  $T_{H2}$  dominierten Immunantwort unterstützt (PRESCOTT et al., 1997; PRESCOTT et al., 1998; BEVER, 2002; FLOHR et al., 2005). Bei einer gestörten Hautbarriere soll der Kontakt zu Katzen die Entwicklung der AD fördern (FLOHR C. & L., 2011). Dagegen verringern die Exposition gegenüber bestimmten Endotoxinen, der frühe Besuch von Kinderkrippen und der Kontakt zu Hunden und Tieren vom Bauernhof die Wahrscheinlichkeit, an AD zu erkranken (FLOHR C. & L., 2011). Zusätzlich wurde eine veränderte mikrobielle Darmflora bei Kindern in der westlichen Gesellschaft nachgewiesen, der ein Mangel an spezifischen Bakterienstämmen zugrunde liegt. Diese Bakterienstämme können durch die Induktion von regulatorischen Zytokinen wie IL10 und TGF- $\beta$  protektive Eigenschaften auf die Entwicklung allergischer Krankheiten haben (KABURAGI et al., 2001). In diesem Sinne konnte eine

finnische Studie aufzeigen, dass die peri- und postnatale systemischen Gabe von probiotischem *Lactobacillus rhamnosus* das Risiko von Kindern, eine AD zu entwickeln, deutlich senken kann (KALLIOMÄKI et al., 2001).

#### **2.2.3.4.2. Nahrungsmittel**

Säuglinge und jüngere Kinder zeigen häufig eine Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene. Besonders hervorzuheben sind hierbei Erdnüsse, Ei, Milch, Soja, Weizen und bestimmte Fischsorten (z.B. Dorsch), gegen welche man bei den jungen Patienten spezifisches IgE gefunden hat. Nahrungsmittelallergien sollen in bis zu 40 % der Fälle von Exazerbationen bei milder bis schwerer AD als Ursache gelten. Spezifische T-Zell-Klone gegen diese Allergene konnten aus Läsionen bei AD-Patienten isoliert werden (BURKS, 2003). Bei den Allergenen sollte jedoch zwischen denjenigen unterschieden werden, welche Nahrungsmittelallergien verursachen, die im Erwachsenenalter verschwinden können (Ei, Milch, Weizen und Soja) und denjenigen, bei denen die Nahrungsmittelallergie in der Regel bestehen bleibt (Erdnuss und Fisch) (BURKS, 2003). Patienten, die schon im sehr frühen Kindesalter eine schwere Nahrungsmittelallergie ausbilden, scheinen ein erhöhtes Risiko zu besitzen, bei der AD einen chronisch-rezidivierenden Verlauf zu entwickeln. Es bleibt unklar, wie die orale Einnahme eines Nahrungsmittelallergens zu einer verstärkten Entzündungsreaktion der Haut führen kann.

Die Rolle, die Futtermittelunverträglichkeitsreaktionen beim Hund spielen und ihre Pathogenese sind bis heute nicht vollständig geklärt (HILLIER & GRIFFIN, 2001b). Im Gegensatz zur IgE vermittelten Nahrungsmittelallergie beim Menschen kann bei einem Großteil der Hunde, die mit Hautsymptomen auf Futterallergene reagieren, weder eine IgE vermittelte Hypersensitivität, noch ein anderer immunologischer Mechanismus gefunden werden, weshalb man beim Hund anstatt von Futtermittelallergie besser von „cutaneus adverse food reaction“ oder Futtermittelunverträglichkeit sprechen sollte (HILLIER & GRIFFIN, 2001b). Experimentelle Modelle mit induzierter Futtermittelunverträglichkeit und einige Berichte von spontaner IgE vermittelter Futtermittelunverträglichkeit lassen vermuten, dass zumindest einige Hunde mit Futtermittelunverträglichkeit an einer IgE vermittelten Krankheit leiden (VADEN et al., 2000; HILLIER & GRIFFIN, 2001b). Zusätzlich lassen sich bei Hunden mit

Futtermittelunverträglichkeit und solchen mit cAD viele anamnestische und klinische Gemeinsamkeiten feststellen (VROOM, 1995; FAVROT et al., 2010). Es wird vermutet, dass beide Krankheiten bei einigen Hunden gemeinsam auftreten.

#### **2.2.3.4.3. Aeroallergene**

Verschiedene Studien belegen, dass Aeroallergene wie beispielsweise Hausstaubmilben, Tierhaare und Schimmel nach Aufnahme über die Atemwege zu Juckreiz und ekzematösen Reaktionen der Haut bei Patienten mit hAD führen können. Bei einer Applikation dieser Allergene über den sog. Atopie-Patch-Test konnte auch auf vorher unversehrter Haut in 30-50 % der Fälle ein Ekzem hervorgerufen werden (DARSOW et al., 2004). T-Zellen, die selektiv u.a. auf Hausstaubmilben reagieren, konnten aus läsionaler Haut bei Patienten mit hAD isoliert werden. Bei Meidung dieser Allergene war eine signifikante Besserung der Symptome festzustellen (CUSTOVIC et al., 1998; NOVAK & BIEBER, 2003). Auch konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Grad der IgE-Sensibilisierung gegen die Allergene und dem Schweregrad des Ekzems nachgewiesen werden (TUPKER et al., 1996).

Auch an der cAD soll eine Vielzahl von Umweltallergenen beteiligt sein (MASUDA et al., 2000; MUELLER et al., 2000; HILL & DEBOER, 2001). Zu ihnen gehören Hausstaub- und Vorratsmilben-Ag, Pollen von Gräsern, Bäumen und Getreide, Schimmelpilzsporen und viele mehr. Die Annahme, dass diese Allergene durch Eindringen in die Epidermis klinische Symptome auslösen, wird aufgrund von klinischen und histologischen Beobachtungen bestärkt (OLIVRY et al., 1996; OLIVRY & HILL, 2001a; MARSELLA et al., 2006a). Die meisten Hunde, die an AD leiden, profitieren von häufigem Baden möglicherweise aufgrund der verminderten Exposition und Penetration von Allergenen, welche dabei von der Haut gewaschen werden.

#### **2.2.3.4.4. Mikrobielle Besiedlung der Haut**

Die AD wird oftmals durch rezidivierende Infektionen der Haut verkompliziert. Am häufigsten werden sie durch Bakterien, jedoch teilweise auch durch Hefen und beim Menschen zum Teil von Viren verursacht.

## Die Rolle von Staphylokokken

Die canine und humane AD zeigen viele Gemeinsamkeiten. Beide werden häufig durch Staphylokokken-Infektionen der Haut verkompliziert. *S. aureus* ist beim Menschen der häufigste Verursacher von bakteriellen Hautinfektionen (LEYDEN et al., 1974), wohingegen *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*; früher *S. intermedius* genannt) der häufigste pathogene Keim im Zusammenhang mit AD beim Hund ist (DEBOER & MARSELLA, 2001). *S. pseudintermedius* ist Teil der normalen Schleimhautflora des Hundes und wurde beim Hund am häufigsten aus den Nasenlöchern und dem Perineum isoliert. Er ist jedoch auch als opportunistisch pathogener Keim aufgrund seiner häufigen Beteiligung an Pyodermien und Otitiden bekannt. Fazakerley et al. zeigten in einer Studie, dass Hunde, die an AD leiden, signifikant häufiger Träger von *S. pseudintermedius* (nahezu 90%) sind als gesunde Hunden (ein Drittel der untersuchten Hunde wurde positiv getestet) (FAZAKERLEY et al., 2009). Diese Zahlen sind mit denen der *S. aureus*-Träger beim Menschen vergleichbar, wo bei mehr als 90 % der Patienten mit AD und nur bei einem Drittel der gesunden Menschen *S. aureus* nachgewiesen werden konnte (LEYDEN et al., 1974).

Das Kratzen ist ein wichtiger Faktor, der die Bindung der Bakterien durch die Zerstörung der Hautbarriere und die Exposition extrazellulärer Matrixmoleküle, die *S. aureus* als Adhäsionsmolekülen dienen, erleichtert (CHO et al., 2001). Zusätzlich scheinen sich die Bakterien leichter an Hautstellen zu binden, bei denen die Entzündung T<sub>H2</sub>-Zell-mediert ist. Dies scheint am Zytokinmilieu zu liegen, welches zu einer verstärkten Produktion der Adhäsionsmoleküle und zu einer verminderten Expression der antimikrobiellen Peptide führt, die benötigt werden, um die Vermehrung von *S. aureus* unter Kontrolle zu halten (ONG et al., 2002a).

Ein weiterer Faktor, der für die wichtige Rolle von *S. aureus* als Faktor der hAD spricht, ist seine Fähigkeit, Super-Ag in Form von Enterotoxinen zu produzieren. Bei Trägern der Bakterien findet einerseits eine Sensibilisierung mit IgE Produktion gegen diese Toxine statt (LEUNG et al., 1993). Zusätzlich wird über die Super-Ag eine Entzündungsreaktion drastisch verschlimmert (BUNIKOWSKI et al., 1999), da sie eine Aktivierung von T-Zellen ohne klonale Spezifität bewirken können. Aber auch die Bakterien und ihre Enterotoxine selbst scheinen bei Applikation auf die geschädigte Haut direkt eine Entzündungsreaktion

auszulösen (ZOLLNER et al., 2000). Darüber hinaus deutet vieles darauf hin, dass die *S. aureus*-Super-Ag die suppressive Wirkung sog. regulatorischer T-Zellen zerstören können. Auch bei caninen *S. pseudintermedius* Isolaten wurde die Produktion von Super-Ag nachgewiesen (HENDRICKS et al., 2002).

Es wurde gezeigt, dass eine herabgesetzte Defensinproduktion in der Haut von Patienten mit hAD zu deren Anfälligkeit gegenüber *S. aureus*-Besiedelungen und -Infektionen beiträgt (ONG et al., 2002a). Antimikrobielle Peptide wie z.B.  $\beta$ -Defensine und Cathelicidine tragen zur Abwehr mikrobieller Infektionen bei. Eine verminderte Produktion würde die Abwehr der Haut empfindlich schwächen und könnte zu erhöhten Besiedelungs- und Infektionsraten beitragen. Erste Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich hier nicht um einen intrinsischen Mangel der Keratinozyten handelt, sondern dass das entzündliche Mikromilieu der AD eine Steigerung der Defensinproduktion unterdrückt (NOMURA et al., 2003a). Dies würde auch das höhere Risiko insbesondere von AD-Patienten erklären, virale Infektionen zu entwickeln.

### Die Rolle lipophiler Hefen

Hautinfektionen mit lipophilen Hefen des Genus *Malassezia* sind ein weiteres gemeinsames klinisches Symptom bei Menschen und Hund mit AD.

*Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) ist eine Hefenart, die häufig auf der Haut von Patienten mit hAD gefunden werden kann und zwar besonders im Nacken- und Kopfbereich. Es wird vermutet, dass sie bei diesen Patienten allergische Reaktionen vom Sofort- und vom Spättyp hervorruft. Bei mehr als 60 % der Patienten mit hAD können spezifische IgE-Ak gegen *P. ovale* gefunden werden, was die Vermutung bestärkt, dass diese Hefenart eine Rolle als Allergen bei der hAD spielt (SCHEYNIUS et al., 2002).

*Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) ist ebenfalls eine lipophile Hefe und ein normaler Kommensale auf der Haut und im Gehörgang von gesunden Hunden (BAXTER, 1976; BOND et al., 1994; BOND et al., 1995; KENNIS et al., 1996), der opportunistische Hautinfektionen auslösen kann (MASON & EVANS, 1991). Faktoren, die vermutlich ein übermäßiges Wachstum dieser Organismen auslösen könnten, sind beispielsweise Störungen im Mikroklima der Haut und im Immunsystem. Diese Faktoren können durch eine Vielzahl an Krankheiten beeinflusst werden, einschließlich der allergischen Erkrankungen, bakteriellen Infektionen, Keratinisierungsstörungen und hormonelle Erkrankungen (SCOTT &

MILLER, 1990; MASON & EVANS, 1991; MORRIS, 1999). Allerdings wird die cAD am häufigsten im Zusammenhang mit einer übermäßigen Vermehrung von *Malassezia* gesehen. Bei einigen Hunden mit AD wurde nachgewiesen, dass sie eine große Anzahl dieser Hefen sowohl auf nicht-läsionalen als auch auf läsionalen Hautbereichen beherbergen (BOND et al., 1994; WHITE et al., 1998). Atopische Hunde mit *Malassezia* Überwucherung reagierten auf intradermale Injektionen von *M. pachydermatis*-Extrakten mit Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp (MORRIS et al., 1998), was darauf hinweist, dass Allergene dieser Keime an der Pathogenese der AD beteiligt sein könnten. Weiterhin wurde bereits in früheren Berichten gezeigt, dass atopische Hunde erhöhte Serumkonzentrationen an Malassezien-spezifischen IgG und IgE (NUTTALL & HALLIWELL, 2001) aufweisen.

#### **2.2.3.4.5. Neuroimmunologische und psychische Faktoren**

Wichtige Trigger für das Ausbrechen von Krankheitsschüben der AD sind psychische Faktoren, wie z.B. Stress (SCHMID-OTT et al., 2001). Es wird postuliert, dass Neuropeptide, die in enger Verbindung sowohl zu Nervenendigungen u.a. in der Epidermis als auch zu LHC in der Haut stehen, Immun- und Nervensystem vernetzen. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise das „calcitonin gene related peptide“ (CGRP) genannt. Weiterhin wurden im Blut von Patienten mit AD unter Stressbedingungen erhöhte Spiegel der Substanz P, des „nerve growth factor“ (NGF) und des vasoaktiven intestinalen Polypeptids (VIP) nachgewiesen (TOYODA et al., 2002).

Damit im gesunden Organismus überschießende Entzündungsreaktionen verhindert werden, gibt es spezielle Mechanismen zur Gegenregulation, so z.B. die Produktion von Neuropeptiden wie dem proopiomelanocortin-derived hormone (alpha-MSH) durch aktivierte Keratinozyten. Ein Ungleichgewicht unter den Neuropeptiden zwischen antientzündlichen Faktoren und proentzündlich allergischen Einflüssen zugunsten der Letzteren könnte schließlich die Entstehung einer AD begünstigen. Es gibt Hinweise dafür, dass der für AD-Patienten ebenso typische wie quälende Juckreiz zumindest teilweise auch neuroimmunologischer Genese sein könnte. So sollen bestimmte Substanzen hierbei einen wichtigen Stellenwert einnehmen, u.a. Neuropeptide, Zytokine und „eosinophil-derived proteins“ (SONKOLY et al., 2006; BUDDENKOTTE & STEINHOFF, 2010;

CHEUNG et al., 2010).

### **2.3. Histopathologie der atopischen Dermatitis**

#### **2.3.1. Histopathologie der humanen atopischen Dermatitis**

Das histologische Bild der AD hängt von Stadium, der Schwere und dem Alter der Hautläsionen ab (LEUNG, 1995). Klinisch unauffällige Haut von Patienten mit AD stellt sich histologisch anormal dar. Sie zeigt milde Hyperkeratose, epidermale Hyperplasie und ein geringgradiges Zellinfiltrat in der Dermis, welches überwiegend aus Lymphozyten besteht (LEUNG, 1995). Akute Läsionen sind charakterisiert durch eine deutliche Spongiose (interzelluläres Ödem) der Epidermis und durch ein intrazelluläres Ödem (aufgeblähtes Aussehen der Keratinozyten) (LEUNG, 1995). Häufig werden geringgradige epidermale Infiltrate von Lymphozyten, beobachtet. Die Dermis zeigt deutliche perivaskuläre Infiltrate mit Lymphozyten und vereinzelten Monozyten/Makrophagen (LEUNG, 1995). Weiterhin kommen Mastzellen in unterschiedlichen Stadien der Degranulation, jedoch in normaler Anzahl vor (LEUNG, 1995). Eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten sind eher selten in akuten Läsionen vorhanden (LEUNG, 1995). In chronischen lichenifizierten Läsionen ist die Epidermis hyperplastisch und zeigt eine auffällige Hyperkeratose, jedoch nur minimale Spongiose. Die Anzahl von LHC in der Epidermis ist erhöht und Makrophagen dominieren das mononukleäre Zellinfiltrat (LEUNG, 1995). Mastzellen kommen in höherer Anzahl vor, sind jedoch überwiegend nicht degranuliert. Die Endothelzellen des oberflächlichen Venenplexus und die tiefen Venulen sind hypertrophiert und weisen einen vergrößertem Kern und prominente Nukleoli auf. Ein weiteres auffälliges Merkmal von lichenifizierten Plaques ist eine Fibrose der oberflächlichen Dermis (LEUNG, 1995).

#### **2.3.2. Histopathologie der caninen atopischen Dermatitis**

Für das Entzündungsmuster der Hautläsionen bei cAD ist eine chronische, hyperplastische und spongiöse gemischte perivaskuläre Dermatitis charakteristisch (OLIVRY et al., 1997). Das entzündliche Infiltrat der Haut atopischer Hunde ähnelt dem der hAD (OLIVRY et al., 1996) und ist ebenfalls abhängig von Stadium, der Schwere und dem Alter der Läsionen. Der Nachteil bei der Untersuchung von natürlich entstandenen Läsionen von Hunden mit cAD ist,

dass es nicht ersichtlich ist, wie lange die jeweiligen Veränderungen schon bestehen. Daher wurden, um die chronologische Abfolge der Einwanderung von Entzündungszellen in die Haut besser untersuchen zu können, histopathologische Untersuchungen nach intradermaler Allergeninjektion bzw. Injektion von Anti-IgE-Ak und in neuerer Zeit nach auftragen von Patch-Tests (PT) mit relevanten Allergenen durchgeführt (BECKER et al., 1988; OLIVRY & HILL, 2001b; MARSELLA et al., 2006b; PUCHEU-HASTON et al., 2006).

OLIVRY et al. 1997 untersuchten histologische Präparate läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Hunden mit cAD und verglichen diese miteinander und mit Hautpräparaten von gesunden Kontrolltieren.

Dabei fiel auf, dass die Epidermis in der klinisch gesund erscheinenden Haut von atopischen Hunden geringgradig diffus hyperplastisch verändert war. Bei den wenigen Entzündungszellen, die in der Epidermis gesehen wurden, handelte es sich überwiegend um epitheliotrope T-Lymphozyten. In der Epidermis waren keine neutrophilen und eosinophilen Granulozyten oder Mastzellen zu finden. Epidermale LHC schienen im Vergleich zur Haut gesunder Hunde in erhöhter Anzahl vorzukommen. Mikroaggregate von LHC wurden allerdings nicht gefunden.

Im Gegensatz dazu wurde in der Epidermis von läsionalen Hautbereichen eine mäßige bis ausgeprägte Hyperplasie mit einem diffus irregulären Muster gesehen. Eine geringe bis mittlere Anzahl neutrophiler Granulozyten wurde bei 43 % der Schnitte festgestellt. Epitheliotrope mononukleäre Zellen wurden als T-Lymphozyten und LHC identifiziert. Intakte eosinophile Granulozyten, gelegentlich von freien eosinophilen Granula umgeben, waren in vier von 14 Schnitten zu sehen. In diesen Fällen formierten sich die eosinophilen Granulozyten zu fokalen subkornealen Mikroabszessen. LHC kamen vermehrt vor und bildeten häufig epidermale Aggregate von teilweise mehr als 25 Zellen. Einige T-Lymphozyten konnte man in allen Schnitten läsionaler Haut in der Epidermis sehen. Epidermale Mastzellen wurden nicht gefunden (OLIVRY et al., 1997).

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Dermis von Hunden mit AD befanden sich Leukozyten in klinisch unauffällig erscheinender Haut hauptsächlich perivaskulär lokalisiert. Mononukleäre Zellen der Dermis bestanden aus dendritischen Zellen und T-Lymphozyten (OLIVRY et al., 1997).

In läsionaler Haut atopischer Hunde waren die Leukozyten in der Dermis in einem oberflächlichen, perivaskulären bis diffusen Muster angeordnet. Die dermale Zellzahl war gegenüber der von gesunden Hunden und der in nicht-läsionaler Haut erhöht. Neutrophile Granulozyten fanden sich in läsionaler Haut immer, wenn auch in geringer Zahl. Eosinophile Granulzyten wurden ebenfalls immer, jedoch in variierender Zellzahl gefunden. Der prozentuale Anteil eosinophiler Granulozyten in der Dermis war signifikant höher als in nicht-läsionaler Haut, bzw. im Vergleich zur Haut nicht-atopischer Kontrollhunde (OLIVRY et al., 1997).

1996 untersuchten OLIVRY et al. Hautbiopsien von läsionalen und nicht-läsionalen Hautbereichen von atopischen Hunden auf die Anwesenheit von APC und LHC und verglichen diese miteinander und mit Hautpräparaten von gesunden Hunden (OLIVRY et al., 1996). Dabei stellten sie fest, dass ähnlich wie beim Menschen (LEUNG et al., 1987; BIEBER et al., 1988) der prozentuale Anteil an dermalen APC im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eindeutig erhöht war. Dies lässt vermuten, dass die APCs eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der cAD spielen. Obwohl auch alleinstehende APCs in der gesamten Dermis der histologischen Präparate gesehen wurden, tendierten die APCs in der oberflächlichen Dermis, dazu sich in Gruppen anzutragen. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei der hAD beobachtet (ZACHARY et al., 1985) und als vermehrtes lokales Auffangen von Ag und/oder vermehrte Präsentation für T-Lymphozyten interpretiert. Insgesamt wurden die meisten LHC in Epidermis und Dermis von läsionalen Hautbiopsien atopischer Hunde gefunden (OLIVRY et al., 1996). Häufig wurden große Gruppen von LHCs in der Epidermis der läsionalen Biopsien gesehen (OLIVRY et al., 1996), ähnlich den Befunden in humanen läsionalen Proben (BIEBER et al., 1988). In der Dermis der atopischen Hunde konnten zwei Subpopulationen an IgE<sup>+</sup> Zellen identifiziert werden. Bei einer Subpopulation handelte es sich um Mastzellen, welche überwiegend perivaskulär angeordnet waren. Die zweite Subpopulation wurde als IgE<sup>+</sup> LHCs identifiziert. Sie lagen entweder diffus oder in Clustern vor. Interessanterweise handelte es sich sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis bei den in Gruppen vorliegenden LHC meist um IgE<sup>+</sup> LHC (OLIVRY et al., 1996). Dies lässt vermuten, dass das zellgebundene IgE möglicherweise eine Rolle beim Auffangen kutaner Allergene und/ oder bei der Ag-Präsentation spielt (OLIVRY et al., 1996).

Zusammenfassend besteht das epidermale Infiltrat läsionaler Haut atopischer Hunde aus LHC, T-Lymphozyten, gelegentlich intakten und degranulierten eosinophilen Granulozyten und selten neutrophilen Granulozyten. In ähnlicher Weise besteht das zelluläre entzündliche Infiltrat in der Dermis läsionaler Haut aus Mastzellen, dendritischen Zellen, T-Zellen und einer geringen Anzahl neutrophiler und eosinphiler Granulozyten. Die Anwesenheit von eosinophilen Granulozyten in der Haut, wie sie in dieser Studie beobachtet wurde, könnte für die Pathogenese von Hautläsionen bei caniner atopischer Dermatitis wichtig sein (OLIVRY et al., 1997).

## 2.4. Microarray

Multifaktorielle Krankheiten mit komplexem genetischen Hintergrund und krankheitsbedingten Fehlregulationen auf Zellebene zu erforschen stellt die Wissenschaft noch heute vor eine große Herausforderung. Um den Zustand und die Funktion einer Zelle im Krankheitsfall, also ihren Phänotyp, zu bestimmen, müssten Menge, Verhältnis und Zustand aller darin enthaltenen Proteine gemessen und mit einer normalen Kontrolle verglichen werden. Doch trotz enormer Fortschritte im Bereich der Proteomics-Methode ist dies heutzutage noch nicht durchführbar. Die Aminosäuresequenz, der Aufbau eines Proteins, ist im entsprechenden Gen verankert und wird über die Zwischenstufe der mRNA synthetisiert. Somit wird in der Regel davon ausgegangen, dass die Zusammensetzung und Menge der Proteine in einer Zelle eng mit der Komposition ihrer mRNA zusammenhängt.

Seit der Entwicklung der Microarray-Technologie Anfang der neunziger Jahre ist es möglich, in einem einzigen Experiment die Transkriptionsrate aller bekannten mRNA-Spezies einer Zelle zu erfassen und somit genomweite Expressionsprofile zu erstellen (SCHENA et al., 1995; FREEMAN et al., 2000; SCHULZE & DOWNWARD, 2001). Die Verwendung von Microarrays stieg seither stetig an (ROGERS & CAMBROSIO, 2007). Der Vorteil der Microarray-Analyse ist, dass in Bezug auf die zu untersuchenden Gene keine Vorauswahl notwendig ist. Der Vergleich der Genexpression zwischen Fall- und Kontrollgruppe bedeutet, dass Transkripte, die bei erkrankten Patienten vermindert oder übermäßig exprimiert werden, als potentielle Kandidaten-Gene für die Pathogenese dieser Erkrankung in Frage kommen könnten.

Die Microarray-Technologie beruht im Prinzip auf der Umkehrung des klassischen Northernblots, der die Expression eines Gens in einer durch Gelelektrophorese aufgetrennten Probe, durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde nachweist. Bei Microarrays wird dagegen die komplette mRNA einer Probe in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben, markiert und gegen eine große Anzahl an definierten Gensonden auf dem Array hybridisiert. Die Menge an gebundener markierter cDNA entspricht dabei der Häufigkeit der zugehörigen mRNA im untersuchten Gewebe. Der Vorteil von Microarray-Analysen besteht darin, dass auf einer sehr kleinen Fläche eine große Anzahl an Sonden aufgebracht und die Expression all dieser Gene gleichzeitig in nur einem Experiment unter identischen Bedingungen untersucht werden kann. Es existieren verschiedene Microarray-Technologien, die sich je nach Fragestellung unterschiedlich gut eignen (AHMED, 2006; MANDRUZZATO, 2007).

In vorliegender Arbeit wurden Oligonukleotid-Arrays (kurze Sonden, 25-70 nt) benutzt. Sie quantifizieren eine große Zahl an mRNAs und haben gegenüber cDNA-Arrays (lange Sonden, mehrere Hundert nt) einige Vorteile in Bezug auf die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit (HUGHES et al., 2001). Innerhalb der Oligonukleotid-Arrays kann zwischen Arrays mit langen (50-70 nt) und kurzen Nukleotid-Sequenzen (25-30 nt) unterschieden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotid-Arrays mit 60 nt langen Sonden verwendet, was einem langen Oligonukleotid-Array entspricht. Längere Sequenzen führen zu einer intensiveren Signalstärke, wodurch sie spezifischer sind und oftmals einen größeren dynamischen Bereich des Hybridisierungssignals aufweisen (RELÓGIO et al., 2002; SHIPPY et al., 2004).

## 2.5. Ziel der Arbeit

Eine Studie, welche sich speziell mit der Analyse von Hautbiopsien bei umweltallergischen Hunden befasste, wurde bisher erstmalig im Jahr 2007 durchgeführt (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008). In dieser Studie an Hunden zahlreicher Rassen und unterschiedlichen Alters, die unter verschiedenen Haltungs- und Umweltbedingungen lebten und Läsionen verschiedener Stadien zeigten, konnten signifikante Unterschiede bezogen auf die Genexpression in atopischer Haut nachgewiesen werden. Diese Gene wurden mit angeborenen Immun- und Entzündungsreaktionen, Zellzyklus, Apoptose, Bildung der

Hautbarriere und transkriptionaler Regulierung in Zusammenhang gebracht. Es wurden sowohl läsionale als auch nicht-läsionale Hautproben von Allergikern, sowie gesunde Haut von Kontrolltieren analysiert. Die Ergebnisse der vorangegangenen Studien ermutigen die weitere Erforschung der Veränderungen auf der Ebene der Genexpression im Zuge dieser Erkrankung, um daraus in Zukunft Targets für verbesserte therapeutische Möglichkeiten zu entwickeln.

Eine wichtige Voraussetzung für eine sinnvolle Auswertung von Mikroarray-Daten ist eine möglichst hohe Standardisierung des biologischen Modells. Bei einer allergischen Erkrankung ist in der Regel zu erwarten, dass die Reaktionen der betroffenen Individuen zum Teil etwas unterschiedlich in Hinsicht auf die Reaktionszeit und die Ausprägung verlaufen. Dieser wichtige Punkt wurde in der oben genannten Studie am Hund nicht ausreichend berücksichtigt, weshalb die Ergebnisse möglicherweise nur bedingt interpretiert werden können. Deshalb wurde in unserer Studie versucht, ein biologisches Modell unter möglichst kontrollierten und identischen Bedingungen zu etablieren, um aussagekräftigere Daten unter Berücksichtigung entsprechender Kontrollen zu gewinnen. Es sollten speziell die frühen Expressionsveränderungen untersucht werden, da angenommen wurde, dass gerade diese für die spätere Ausprägung der Hautveränderung eine zentrale Rolle spielen. Gleichzeitige histologische Beurteilung der Proben sollte dabei die Interpretation der mittels Mikroarray-Analysen gewonnenen Daten unterstützen.

Das Ziel dieser Studie war es, die Genexpression atopischer Hunde unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen, bisherige Ergebnisse von Expressionsstudien beim Mensch und Hund zu bestätigen und zu erweitern, mögliche Unterschiede zwischen künstlich sensibilisierten und natürlich erkrankten Tieren aufzuzeigen und neue Kandidatengene für weiterführende Studien und neue Therapiemöglichkeiten zu finden.

## III. MATERIAL UND METHODEN

### 3.1. Material

Sofern im Folgenden nicht anders angegeben, stammen die Herstellerfirmen der Materialien aus Deutschland.

#### 3.1.1. Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medikamente in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
Avidin-Biotin-Komplex	Vectastain: PK-6100, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroform	Ridel-de Haen, Deisenhofen
DAB (Substrat Chromogenreaktion)	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Nr. 4170
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Nr. 1.019.60
Eisenchlorid	Merck, Darmstadt, Nr. 1.03943
Eisessig	Merck, Darmstadt, Nr. 1.00063.100
Ethanol 100 %	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 95% (Histologie)	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 96%	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Eukitt (Roti ® -Histokitt II, Einschlusmittel)	Carl Roth ® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Formalin 10%	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken

Giemsa-Stammlösung	Merck, Darmstadt, Nr. 1.0924.0500
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Nr. 1.04302.0100
Hausstaubmilben-Allergen: Powder of milled dust mite, 99% pure Dermatophagoides farinae	Greer Laboratories, North Carolina, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGAA, Darmstadt
Lidocain 2%, CHASSOT ; ad us. vet. (Lidocainhydorchlorid)	Vetoquinol AG, Ittingen, Schweiz
Lithiumkarbonat	Merck, Darmstadt, Nr. 1.04543
Mayers Hämalaun	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A0884
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN, Irvine, CA, USA
Paraffin	(SAV LP, Flintsbach am Inn)
RNAlater	Qiagen GmbH, Hilden
Salzsäure, konzentriert (37 %)	neoLab ® Labor Spezialprodukte, Heidelberg
Trizol Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany
Vetisept Spray (PVP-Jod)	Dr. E. Graeub AG, Bern, Schweiz
Wasser frei von DNase, RNase (AccuGene)	Carbrex Bio Science
Wasserstoffperoxid 30 % (Histologie)	neoLab ® Labor Spezialprodukte, Heidelberg
Xylol (Isomerengemisch)	SAV LP, Flintsbach am Inn

### 3.1.2. Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Biebrich-Scharlach-Lösung 1 %	0,2 g Biebrich-Scharlach 20 ml Aqua dest.

---

Eisenchlorid-Lösung 30 %	1,2 g Eisenchlorid 4 ml Aqua dest.
Eosin 1%	10 g Eosin gelblich (AppliChem A0822) 1000 ml Aqua dest. heiß lösen, anschließend abkühlen lassen 1,5 ml Eisessig (Merck-Nr. 1.00063.100) in der Flasche filtrieren
Essigsäure 0,5%	25ml Essigsäure (Merck-Nr. 1.00063.100) 4975 ml Aqua dest.
Ethanol 75%	750ml 100%iges Ethanol
Ethanollösung 1%ig, saure	2 ml konzentrierte Salzsäure (37%) 200 ml 70%iges Ethanol
Giemsa-Gebrauchslösung	97,5 ml Kaliumdihydrogenphosphat (13,61 g in 1 l Aqua dest.) 2,5 ml Dinatriumhydrogenphosphat (17,8 g in 1 l Aqua dest.) mischen und erwärmen 7 ml Giemsa-Stammlösung (Merck-Nr. 1.0924.0500) auf pH-Wert 5,0 einstellen
Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach- Gebrauchslösung	180 ml Weigerts-Eisen-Hämatoxylin- Gebrauchslösung 20 ml Biebrich-Scharlach-Lösung (1 %)
Lithiumkarbonat-Lösung 0,5 %	1 g Lithiumkarbonat 200 ml Aqua dest.
TBS Puffer (0,05 M, pH-Wert 7,6)	60,5 g TRIS in 700 ml Aqua dest. lösen mit 2 molarer Salzsäure auf pH 7,6 einstellen auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen pH-Wert prüfen 90 g NaCl darin lösen pH-Wert prüfen, auf pH 7,6 einstellen
Wasserstoffperoxid 1 %	6 ml Wasserstoffperoxid 30 % 194 ml Aqua dest.

Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Gebrauchslösung	1 g Hämatolylin 100 ml 95%iges Ethanol 4 ml 30%ige Eisenchlorid-Lösung 95 ml Aqua dest. 1 ml konzentrierte Salzsäure (37 %)
--	---

### 3.1.3. Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Ausgießstation	TBS 88 Embedding System	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Dispergierer	SilentCrusher M	Heidolph, Schwabach
Einbettungsautomat	Histomaster 2050/DI	Bavimed, Birkenau:
Hybridisierungskammer für Slide-Sandwich	Hybridization Chamber Kit - SureHyb enabled	Agilent Technologies, Waldbronn
Hybridisierungskammer für Slide-Sandwich	Hybridization Chamber Kit - SureHyb enabled	Agilent Technologies, Waldbronn
Hybridisierungsofen	Agilent Microarray Hybridization Oven	Agilent Technologies, Waldbronn
Hybridisierungsofen	Herahybrid 12	Kendro, Langenselbold
Kleintierschermaschine	Favorita II GT 104	Aesculap AG, Tuttlingen
Magnetrührer	IKA® RCT basic IKAMAG® safety control	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Microarray Scanner	Agilent DNA Microarray Scanner G2505C	Agilent Technologies, Waldbronn
Microarray Slide mit Dichtungsringen	Hybridization Gasket Slide Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
Mikrozentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe
Pipetten	Kolbenhubpipette 2/10/20/100/200/1000µl	Gilson, Bad Camberg
Pipettierroboter	MulitPROBE II	PerkinElmer Life and

		Analytical Sciences, Shelton, USA
qPCR Gerät	StepOne™ Real-Time PCR System	Applied Biosystem, Darmstadt
Rotationsmikrotom	HM 315	Microm, Walldorf
Spektro-Photometer	NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Vis Spektralphotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wärmeschrank	Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad	Wasserbad	Daglef Platz, Wankendorf
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Beckmann Coulter CS- 15R Centrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

### 3.1.4. Verbrauchsmaterial und sonstiges Material in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Biopsiestanze	Biopsy Punch 8 mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main
Einmalhandschuhe	Blue Comfort Nitril	AMPri GmbH, Stelle
Einmal-Skalpell, spitz	Surgical Disposable Scalpels	Aesculap AG, Tuttlingen
Elektrophorese-Chip	Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Eppendorfröhrchen 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Gentle SkinTM Latexhandschuhe		Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Hundebuddy	VetMedCare Dog&Cat-	VetMedCare, Dr. Norbert

Hundefutter	Body Biomill® Maintenance 630	Freitag, Höchst, Österreich Biomill SA , Granges- Marnand, Schweiz
Hypoallergenes Klebeband	Micropore™	3M Health Care, Neuss
Kanülen gelb	BD Microlance™3 20G	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Mikrodialysemembran		Milipore, Schwalbach
Mullkoppressen	YPSIPAD Mullkompressen 10 x 10 cm	Holthaus Medicam GmbH, Remscheid
Nahtmaterial	Ethicon* PDSII 4-0 V6 Z275	Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Nordersted
Nitrilhandschuhe		Kimberly-Clark, Roswell
Objektträger, entfettet (Histologie)	Objektträger, entfettet	VWR International, Darmstadt
Spritze 2ml	BD 2 Pc 2ml Discardit II™ Syringe	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien

### 3.1.5. Antikörper für die Immunhistochemie

Bezeichnung	Hersteller
Polyklonaler Kaninchen-anti-humane- CD3-ε-Ketten-Antikörper (Rb a CD3)	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Nr. A045201
Biotinylierte Ziege-anti-Kaninchen- IgG-Antikörper	VECTOR: BA-1000, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim

### 3.1.6. verwendete Fertig-Kits

Bezeichnung	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Agilent Cyanine Dye Pack	Agilent Technologies, Waldbronn
Agilent Gene Expression Hybridization Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
Agilent Low-Input- QuickAmp Labeling Kit	Agilent Technologies, Waldbronn

---

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
Canis familiaris Custom Gene Expression Microarray, 8x60K	Agilent Technologies, Waldbronn
Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR	Applied Biosystem, Damstadt
RNeasy® Mini Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden
Sprint RT Complete-Double PrePrimed 46-well strips	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

### 3.1.7. Verwendete Software und Datenbanken

Software	Hersteller/Bezugsquelle
anaylsis FIVE Software	Olympus Imaging Europa GmbH, Hamburg,
Nanodrop Software	Peqlab, Erlangen
Bioconductor	<a href="http://bioconductor.org/">http://bioconductor.org/</a>
Excel Software	Microsoft
Multi Experiment Viewer (MEV) Version 4.7.1	<a href="http://www.tm4.org/mev/">http://www.tm4.org/mev/</a>
Feature Extraction Software 10.7.3.1	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
qPCR StepOne Software V 2.2.2	Applied Biosystems
R Software V 2.12.2	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>
2100 Expert Software (B.02.08.SI648)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

#### Datenbanken:

---

CoPub	<a href="http://services.nbic.nl/copub5">http://services.nbic.nl/copub5</a>
DAVID Bioinformatic Resources 2011	<a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov/">http://david.abcc.ncifcrf.gov/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/">http://ncbi.nlm.nih.gov/</a>

### 3.1.8. Hunde

Insgesamt zwölf Hunde der Rasse Beagle im Alter zwischen zwei und drei Jahren wurden verwendet. Sie waren Eigentum des Novartis Centre de Recherche Sante Animale, Saint-Aubin FR, Schweiz. Sechs der Hunde waren gegen *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*) sensibilisiert, die anderen sechs waren nicht-sensibilisierte Tiere.

## 3.2. Methoden

Die gesamte Bearbeitung der Proben für die Genexpressionsanalysen und die Auswertung der Expressionsdaten wurden im Laboratorium für funktionelle Genomanalysen (LAFUGA) unter der Anleitung von Herrn Dr. Stefan Bauersachs und der Hilfe seiner technischen Assistentin Frau Karin Groß durchgeführt.

Die histologischen Schnitte wurden durch das Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

### 3.2.1. Einschlusskriterien

Für den Genexpressionsversuch wurden sechs nichtallergische und sechs gegen *D. farinae* sensibilisierte, jedoch ansonsten gesunde Hunde der Rasse Beagle des Novartis Centre de Recherche Sante Animale, Saint-Aubin FR, Schweiz verwendet. Die Diagnose der atopischen Dermatitis beruhte einerseits auf positiven Hautreaktionen nach epikutaner Exposition mit *D. farinae*-Allergenlösung (Powder of milled dust mite, 99 % pure *Dermatophagoides farinae*, Greer Laboratories) und andererseits auf der zusätzlichen Bestätigung der Sensibilisierung gegenüber Haustaubmilben-Ag durch positiven IgE-Serumallergietest und IDT (DEBOER & HILLIER, 2001). Eine Infestation mit Ektoparasiten wie beispielsweise Flöhen oder *Sarcoptes*-Milben wurde durch eine regelmäßige Ektoparasitenprophylaxe, andere systemische Erkrankungen mit Hilfe von regelmäßigen klinischen- und jährlichen Blutuntersuchungen ausgeschlossen (DEBOER & HILLIER, 2001). Die Kontrolltiere waren anamnestisch unauffällig, zeigten keine klinischen Symptome und keine positive Patch-Test Reaktion auf *D. farinae*-Ag. Alle Tiere wurden in Gruppen von jeweils zwei Hunden unter identischen Umweltbedingungen gehalten. Sie waren zu diesem Zeitpunkt regelmäßig geimpft und entwurmt. Weiterhin bekamen alle Tiere die selbe Futterration (Biomill® Maintenance 630, Biomill SA) 20g/kg KG

pro Tag. Wasser stand zur freien Verfügung. Bei allen Hunden wurde eine gute gesundheitliche Verfassung vor Studienbeginn mit Hilfe einer klinischen Untersuchung bestätigt.

### 3.2.2. Behandlungsgruppen

Auf die Haut des geschorenen linken lateralen Thorax wurde bei jedem Hund im cranialen Feld 75 mg Hausstaubmilben-Ag-Paste (HDM-Paste) und im caudalen Hautareal 50 µl physiologische Kochsalzlösung aufgetragen. Die HDM-Paste wurde aus 75 mg Pulver (Powder of milled dust mite, 99 % pure *Dermatophagoides farinae*, Greer Laboratories) und Kochsalzlösung bis zum Erreichen einer pastösen Konsistenz hergestellt.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den bioptierten Läsionen um gleichalte Hautveränderungen handelte, wurden die Proben bei allen Hunden im selben Zeitabstand nach Allergenauftrag genommen. Weiterhin wurde darauf geachtet, die Hunde immer in derselben Reihenfolge zu behandeln und zu biопtieren.

### 3.2.3. Studienprotokoll

**Tabelle 1: Protokoll zur Probenentnahme**

Tag	Vorgehen bei <u>allergischen Hunden</u>	Vorgehen bei <u>nicht-</u> <u>allergischen Hunden</u>	Allgemein- untersuchung	LLS
Tag -5	Scheren des linken lateralen Thorax	Scheren des linken lateralen Thorax	ja	ja
Tag -1 (0h)	Entnahme der Basisbiopsie	Entnahme der Basisbiopsie	-	ja
Tag 1	Auftragen der Allergen- /Kochsalzlösung	Auftragen der Allergen- /Kochsalzlösung	-	
+6 h	Entnahme von 2 Biopsien (Allergen- und Kochsalzbereich)	Entnahme von 2 Biopsien (Allergen- und Kochsalzbereich)	-	ja
Tag 1 (+24 h nach Auftragen von Allergen/Kochsalz)	Entnahme von 2 Biopsien (Allergen- und Kochsalzbereich)	Entnahme von 2 Biopsien (Allergen- und Kochsalzbereich)	-	ja

Der Zeitraum für die Probenentnahme inklusive Vorbereitung der Hunde betrug sieben Tage. Jedem der Hunde wurden insgesamt fünf Hautbiopsien mit einem Durchmesser von 8 mm unter Lokalanästhesie (LA) (siehe 3.2.4. Gewinnung der Hautbiopsien) am linken lateralen Thorax entnommen (siehe Tabelle 1). Um Verfälschungen der Genexpressionsanalyse durch eine mögliche Hautreaktion aufgrund der Rasur auszuschließen, wurden die Hautstellen bei jedem Hund vier Tage vor der ersten Biopsieentnahme ausgeschoren (Favorita II GT 104, Aesculap AG). Im Anschluss an die Schur und vor jeder Biopsieentnahme wurden die behandelten Hautareale mittels Local-Lesion-Score (LLS) beurteilt (siehe Tab. 2).

**Tabelle 2: Local-Lesion-Score**

Keine sichtbaren Hautveränderungen/-Reaktionen	Erythem und/oder Papeln (mild)	Erythem und/oder Papeln (moderat)	Erythem und/oder Papeln und/oder Ödem (schwer)
-	+	++	+++

Mit Hilfe des LLS wurde der Hautzustand in Hinsicht auf drei Läsonstypen (Erythem, Papeln und Ödem) von - (abwesend) bis +++ (hochgradig) evaluiert. Die erste Biopsie an Tag -1 diente als Basiswert für die Genexpression des jeweiligen Hundes. Sie wurde vor dem Auftragen von Allergen- (Powder of milled dust mite, 99 % pure *Dermatophagoides farinae*, Greer Laboratories) bzw. steriler Kochsalzlösung an unveränderter Haut entnommen. Sechs und 24 Stunden nach dem Auftragen der Allergenlösung wurde je eine Biopsie genommen. Diese diente dem Nachweis einer veränderten Genexpression nach Allergenkontakt in der Haut von allergischen Hunden im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Zusätzlich wurden bei jedem der zwölf Hunde nach sechs und 24 Stunden am mit Kochsalzlösung behandelten Hautareal Kontrollbiopsien entnommen. Diese Hautstanzen dienten als Negativkontrolle der Genexpression im Vergleich zur Allergen-behandelten Haut. Aus jeder Biopsie wurde ein schmales Stück herausgeschnitten und in Formalin fixiert. Durch das Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden daraus histologische Schnitte angefertigt (siehe 3.2.12. Histologie). Die übrigen Teile der Hautstanze wurden direkt in Eppendorf-Röhrchen mit RNAlater (Qiagen GmbH) verbracht,

---

für zehn Tage bei 4 °C gekühlt und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung im LAFUGA bei -20 °C im Labor der Medizinischen Kleintierklinik gelagert.

Um die Hunde daran zu hindern, sich an den behandelten Hautarealen zu kratzen oder zu belecken, wurde im Anschluss an das Auftragen der Lösungen auf jedes Hautfeld ein hypoallergener Patch aufgebracht (bestehend aus einem 10x10 cm großen Teil eines hypoallergenen Handschuhs, der mit Hilfe von hypoallergenen Klebestreifen (Micropore™, 3M Health Care) befestigt wurde). Zusätzlich wurden diese Stellen durch einen Hundebuddy (VetMedCare Dog&Cat-Body, VetMedCare) geschützt.

### **3.2.4. Gewinnung der Hautbiopsien**

Jedem Studienteilnehmer wurde eine Hautstanzbiopsie vor, und insgesamt vier Hautstanzen sechs und vierundzwanzig Stunden nach Auftragen von HDM-Paste bzw. Kochsalzlösung entnommen. Die Proben wurden bei allen Tieren im Bereich des linken lateralen Thorax genommen. Zu diesem Zweck wurden bei jedem Hund zwei hintereinander liegende, ca. 8 x 8cm große Hautflächen mit einer Kleintierschermaschine (Favorita II GT 104, Aesculap AG) vier Tage vor der ersten Probennahme ausrasiert. Die Basisbiopsie wurde bei jedem Hund an Tag -1 in der oberen linken Ecke des cranial liegenden, geschorenen Hautfeldes, an unveränderter Haut entnommen. Die Biopsien sechs und vierundzwanzig Stunden nach Auftragen von HDM-Paste wurden an sichtbar veränderten Stellen (wenn vorhanden) entnommen. Um eine Kontamination der Proben mit RNA eines anderen Hundes zu vermeiden und eine möglichst hohe Standardisierung zu gewährleisten, wurde jede Biopsie nach demselben Schema entnommen. Für jeden Hund verwendete der Probennehmer neue Handschuhe (Blue Comfort Nitril, AMPri GmbH). Vor der Entnahme wurden 0,5 ml eines 2%-igen Lokalanästhetikums (Lidocain 2%, CHASSOT, Vetoquinol AG) an einer mit einem wasserfesten Stift markierten Hautstelle subkutan appliziert. Nach ca. drei Minuten wurde mit Hilfe einer Biopsiestanze mit einem Durchmesser von acht Millimetern (Biopsy Punch 8 mm, Stiefel Laboratorium GmbH) und steriles chirurgischem Instrumentarium (Schere, Pinzette, Nadelhalter) ein Hautstück entnommen. Für jeden Hund wurden frische sterile Biopsiestanzen (Biopsy Punch 8 mm, Stiefel Laboratorium GmbH) verwendet und das sterile Besteck zwischen zwei Entnahmen für die Dauer der Biopsie-Vorbereitung und -Entnahme in

70%igem Alkohol desinfiziert. Die Haut der Hunde wurde durch U-Hefte mit steriles resorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon® PDSII 4-0/V6/Z275, Johnson und Johnson Company) verschlossen und anschließend zur Infektionsprophylaxe mit PVP-Jodspray (Vetisept Spray, Dr. E. Graeub AG) besprüht.

Um Blutreste zu entfernen, wurde jedes Bioptat direkt nach der Entnahme auf eine Mullkomresse (YPSIPAD 10, Holthaus Medicam GmbH) gelegt. Anschließend wurde ein ca. ein bis zwei Millimeter schmales Stück an der breitesten Stelle der Hautstanze mit einem spitzen Einmal-Skalpell (Surgical Disposable Scalpels, Aesculap AG) für die Histologie herausgeschnitten (siehe Abb.1), auf einen Teil eines Holzspatels gelegt und in 10%ige Formalin-Lösung verbracht. Das Institut für Tierpathologie der LMU München fertigte daraus histologische Schnitte an. Die übrigen Teilstücke der Hautstanze wurden für die Microarray-Analysen in RNAlater asserviert (siehe Punkt 3.2.3).

Ursprünglich war geplant, jeweils zwei Biopsien je Probenzeitpunkt und Behandlung zu entnehmen, um eine Hautstanze zur histologischen und eine für die Genexpressions-Analysen zu verwenden. Allerdings wurde dies von der Tierschutzkommision, der die Tiere unterlagen, abgelehnt. Somit mussten die Biopsien wie unten abgebildet geteilt werden um beide Analysen durchzuführen.

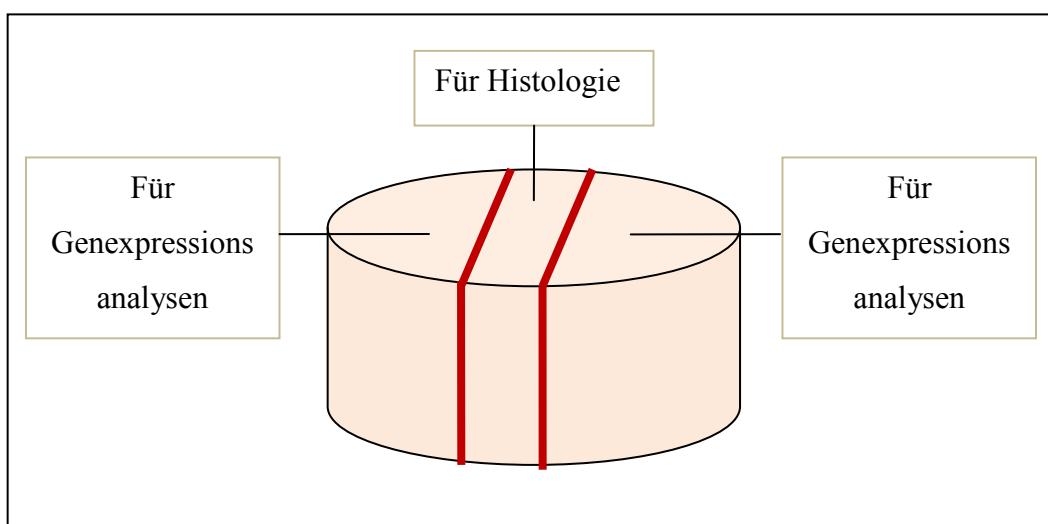


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aufteilung der Hautstanzen für histologische Untersuchung und Genexpressionsanalysen

### **3.2.5. RNA-Isolierung**

Die Isolierung und Analyse von RNA aus Zellen ermöglicht eine Analyse der Genexpression zu einem bestimmten Zeitpunkt. Es liegen bei der Isolierung nur Transkripte der Gene vor, die in einem bestimmten Zeitraum vor der Probennahme in der Zelle transkribiert wurden. Somit stellt die RNA-Isolierung eine wichtige Technik in der Molekularbiologie dar, und die isolierte RNA kann zur Analyse der Genexpression genutzt werden.

#### **3.2.5.1. Vorsichtsmaßnahmen**

Um die Degradierung der RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen zu vermeiden, wurde strengstens darauf geachtet, dass stets mit Handschuhen, RNase-freien Glas- und Plastikgeräten und RNase-freiem Einwegmaterial gearbeitet wurde. Zum Pipettieren wurden nur RNase-freie Spitzen mit Filter (aerosoldicht) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis, bzw. in auf 4° C gekühlten Zentrifugen durchgeführt. Ebenso wurden bei Arbeiten mit Trizol immer Handschuhe und ein Augenschutz getragen, der Kontakt mit der Haut und der Kleidung verhinderte und unter dem Abzug gearbeitet. Oberflächen, Arbeitsplätze und Geräte wurden nach Benutzung mit 1%iger SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat, ICN) gesäubert, um RNasen zu entfernen.

#### **3.2.5.2. Trizol-Methode**

Bei dieser Methode („One-step-RNA-Isolierung“) wird RNA aus Zellen oder Gewebeproben mit Hilfe von Trizol, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, isoliert.

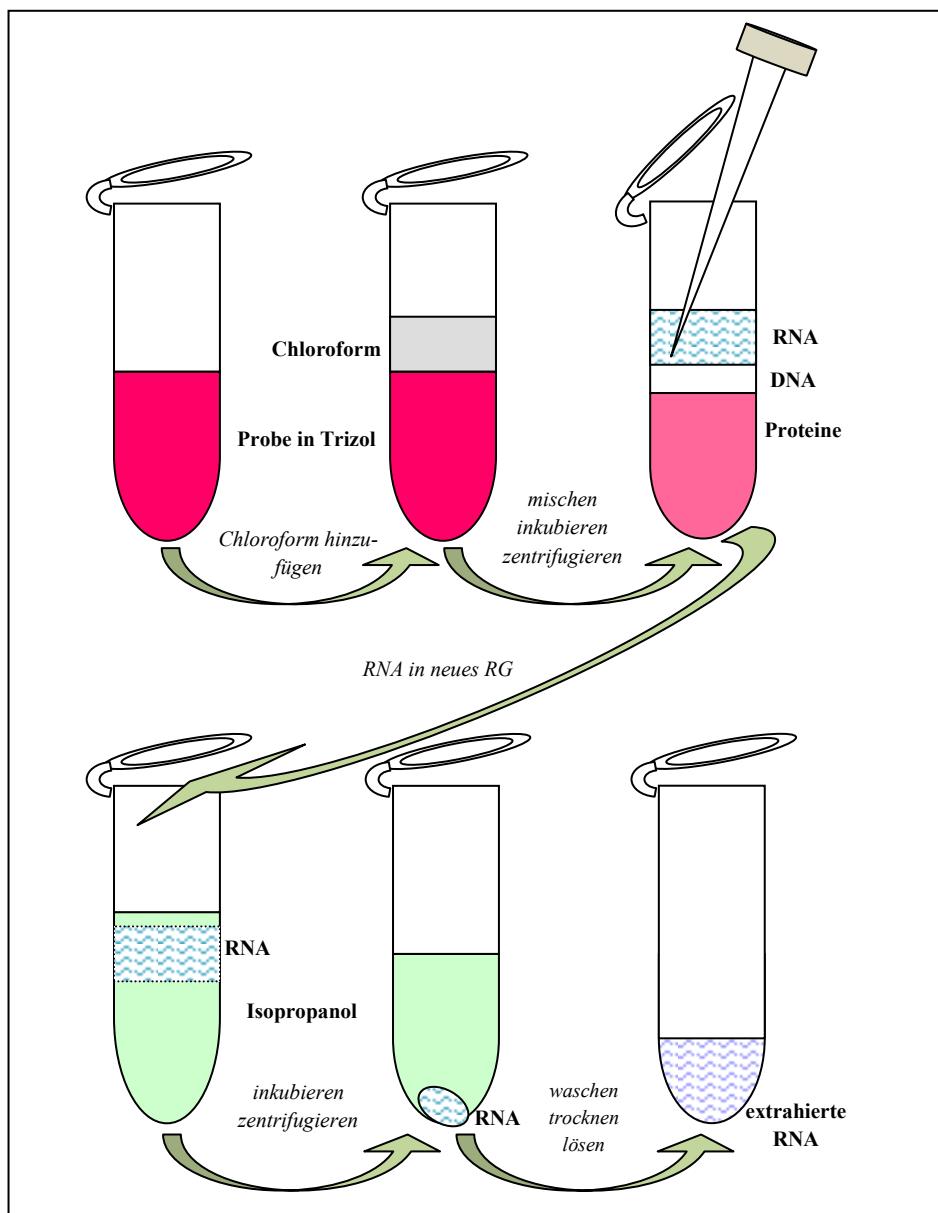


Abbildung 2: Schematische Darstellung der RNA-Isolierung mittels Trizol

Durchführung:

Homogenisierung

Jede der in RNAlater vorliegenden Hautproben wurde in 2 ml Trizol Reagent (Invitrogen GmbH) überführt und unmittelbar im Dispergierer (Heidolph) homogenisiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml der homogenisierten Probe entnommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (RG) (Eppendorf AG) überführt und mit dieser Probenmenge weiter gearbeitet. Das restliche Homogenisat wurde bei -80 °C gelagert. Die homogenisierten Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um das vollständige Auflösen der Nukleoproteinkomplexe zu sichern und im Anschluss zur Entfernung von

Geweberesten und Haaren zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in ein neues 1,5 ml RG (Eppendorf AG) pipettiert.

#### Phasentrennung

Nach Zugabe von je 0,2 ml Chloroform (Ridel-de Haen) wurden die RG gut verschlossen, 15 s lang gemischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) und ca. 3 min bei RT inkubiert. Um die Suspension in drei Phasen zu trennen, wurde sie bei 12.000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG). Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues RG überführt.

#### RNA-Präzipitation

Für die Fällung der RNA wurden 0,5 ml Isopropanol in jedes Probenröhrchen gegeben und vermischt. Die Proben wurden für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 12.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren war das RNA-Sediment als gelartiger Fleck am Boden des RG zu sehen.

#### RNA-Reinigung

Der gesamte flüssige Überstand wurde abgekippt. Daraufhin wurde das RNA-Sediment mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Dazu wurden die Proben gemischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) und anschließend bei 7.500 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Ethanol wurde abgegossen und nach erneutem kurzen Zentrifugieren (7.500 x g und 4°C für 1 min) vollständig entfernt.

### **3.2.5.3. Natriumacetatfällung**

Um mögliche Verunreinigungen mit Guanidiniumisothiocyanat, Phenol oder Proteinen zu entfernen, wurde die RNA noch einmal mithilfe von Natriumacetat und Isopropanol gefällt.

Durchführung:

Nach der Trocknung wurde das RNA-Sediment in 500 µl Wasser gelöst. Dann wurde 1 Volumenanteil Isopropanol (500 µl) und 0,1 Volumenanteile 3 M Natriumacetat (NaOAc) hinzugefügt und gemischt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert und 10 min bei 12.000 x g und 6 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Dem Sediment wurden 500 µl 75%iger Ethanol zugegeben und das Gemisch 5 min bei 6 °C und 7.500 x g zentrifugiert. Das

Ethanol wurde ebenfalls abgegossen, die Probe nochmals kurz abzentrifugiert und der restliche Überstand mit der Pipette abgenommen.

#### Lösen der RNA

Das RNA-Sediment wurde 5 min neben der offenen Flamme getrocknet und anschließend in RNase-freiem Wasser für mindestens 10 min auf Eis gelöst.

#### **3.2.6. RNA-Konzentrationsbestimmung mittels spektralphotometrischer Untersuchung**

Als Voraussetzung für die weitere Verwendung der RNA ist eine hohe Reinheit der Probe essentiell. Durch Kontaminationen mit Phenol oder chaotropen Salzen (im Trizol Reagenz enthalten) können Enzyme inhibiert werden, die bei der cDNA-Synthese oder dem Fluoreszenzlabeling verwendet werden. Um die Reinheit der RNA zu überprüfen wurde ihre Absorption bei 230-280 nm bestimmt. Weiterhin wurde ihre Konzentration bestimmt, um diese für die folgenden Analysen entsprechend einzustellen.

##### Durchführung:

Die Absorptionsmessungen wurden an einem UV-Vis Spektralphotometer NanoDrop 1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH) durchgeführt. Das Gerät arbeitet in einem Wellenlängenbereich zwischen 220 und 750 nm. Zur Untersuchung der Proben wurden jeweils 1,5 µl Probenvolumen direkt auf die Messoberfläche pipettiert und der Schwingarm des Gerätes darauf heruntergelassen. Als Leerwert wurde Nuklease-freies Wasser verwendet. Durch die Oberflächenspannung der Probe wurde eine Flüssigkeitssäule zwischen den Enden der optischen Fasern der Messoberfläche und des Schwingarms aufgebaut, und so der Leerraum zwischen den Enden der optischen Fasern durch die Probenflüssigkeit überbrückt. Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und Konzentrationen wurden anschließend auf einem Computerbildschirm dargestellt. Zwischen jedem Probenauftrag wurde die Messoberfläche gereinigt.

Ob eine Probe mit genetischer DNA oder Proteinen verunreinigt war, konnte durch den Quotienten aus 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Bei reiner RNA sollte das Verhältnis ungefähr bei 2,0 liegen (Messung bei pH 7-8). Ob sich noch Guanidiniumisothiocyanat-Reste aus der Trizol-Extraktion in der Probe befanden, konnte durch den Quotienten aus 260 nm und 230 nm ermittelt werden. Dieser Wert sollte über 2,14 liegen. Lagen die Werte unterhalb der angegebenen

Grenzen, wurde die entsprechende Probe durch erneute RNA-Fällung und Spülung gereinigt und ihre Konzentration und Reinheits-Prüfung mit den NanoDrop 1000 wiederholt.

### **3.2.7. Beurteilung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer**

Die Integrität bzw. Intaktheit der Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) und dem Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) anhand der sogenannten RNA-Integritätsnummer (RIN) bestimmt. Dies ist ein wichtiger Schritt in der Probenbearbeitung, da ein korrekter quantitativer mRNA Nachweis in der RT-qPCR oder in Micorarray-Experimenten nur mit intakter RNA möglich ist. Nukleasen, Hitze oder Scherkräfte können RNA-Moleküle abbauen oder Strangbrüche hervorrufen, wodurch Expressionsergebnisse verfälscht werden.

Durchführung:

Vor der Durchführung wurden alle Reagenzien für 30 min bei RT inkubiert. Das RNA 6000 Nano dye Konzentrat wurde während dieser Zeit vor Licht geschützt.

#### Vorbereiten der Gelmatrix:

550 µl der Agilent RNA 6000 Nano Gelmatrix wurden in den Aufsatz des Spin-Filters pipettiert. Anschließend wurde der Spin-Filter in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG) für 10 min bei 1.500 x g zentrifugiert. Jeweils 65 µl der Gelmatrix wurden in 0,5 ml RNase-freie Röhrchen pipettiert und bei 4 °C aufbewahrt.

#### Vorbereiten des Gel-dye-Mix:

Das RNA 6000 Nano dye Konzentrat wurde im Eppendorfröhrchen für 10 s kurz abzentrifugiert. 1 µl des RNA 6000 Nano dye Konzentrates wurde in ein Röhrchen mit 65 µl Gel pipettiert. Das Gemisch wurde anschließend vermengt (Vortex-Genie 2) und bei RT und 13.000 x g für 10 min zentrifugiert.

#### Beladen des Chips:

Der RNA Nano Chip wurde in die Chip-Priming-Station gelegt und 9 µl des Gel-dye-Mixes in die entsprechend markierte Vertiefung pipettiert. Nach 30 s wurde die Chip-Priming-Station geschlossen. Der auf der 1 ml-Markierung stehende Druckstempel der Spritze wurde bis zum Einrasten des Halteclips herunter gedrückt. Nach einer Wartezeit von 30 s wurde der Druckstempel wieder gelöst. Nach 5 s wurde der Druckstempel auf die 1 ml-Position zurückgestellt, die

Füllstation geöffnet und wieder 9 µl des Gel-dye Mixes in die entsprechend markierten Wells gefüllt. Als nächstes wurden 5 µl des RNA 6000 Nano Markers (Pico-Green) in die mit dem Leiter-Symbol gekennzeichnete Vertiefung und in die zwölf Proben-Vertiefungen pipettiert. Um das Auftreten von Sekundärstrukturen zu minimieren, wurden die Proben für 2 min bei 70 °C denaturiert. Je 1 µl des Molekulargewichtsstandards („Ladder“) wurden in die mit der Leiter gekennzeichneten Vertiefungen pipettiert. Von jeder Probe wurde 1 µl in eine der zwölf Proben-Vertiefungen pipettiert. Anschließend wurde der Chip für 1 min bei 2.400 rpm geschüttelt. Danach wurde der Chip in den Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) eingelegt, die Elektrophorese mit dem Assay Eukaryote Total RNA Nano Series II Version 2.5 gestartet und nach erfolgtem Lauf mit Hilfe der 2100 Expert Software (B.02.08.SI648) (Agilent Technologies) ausgewertet.

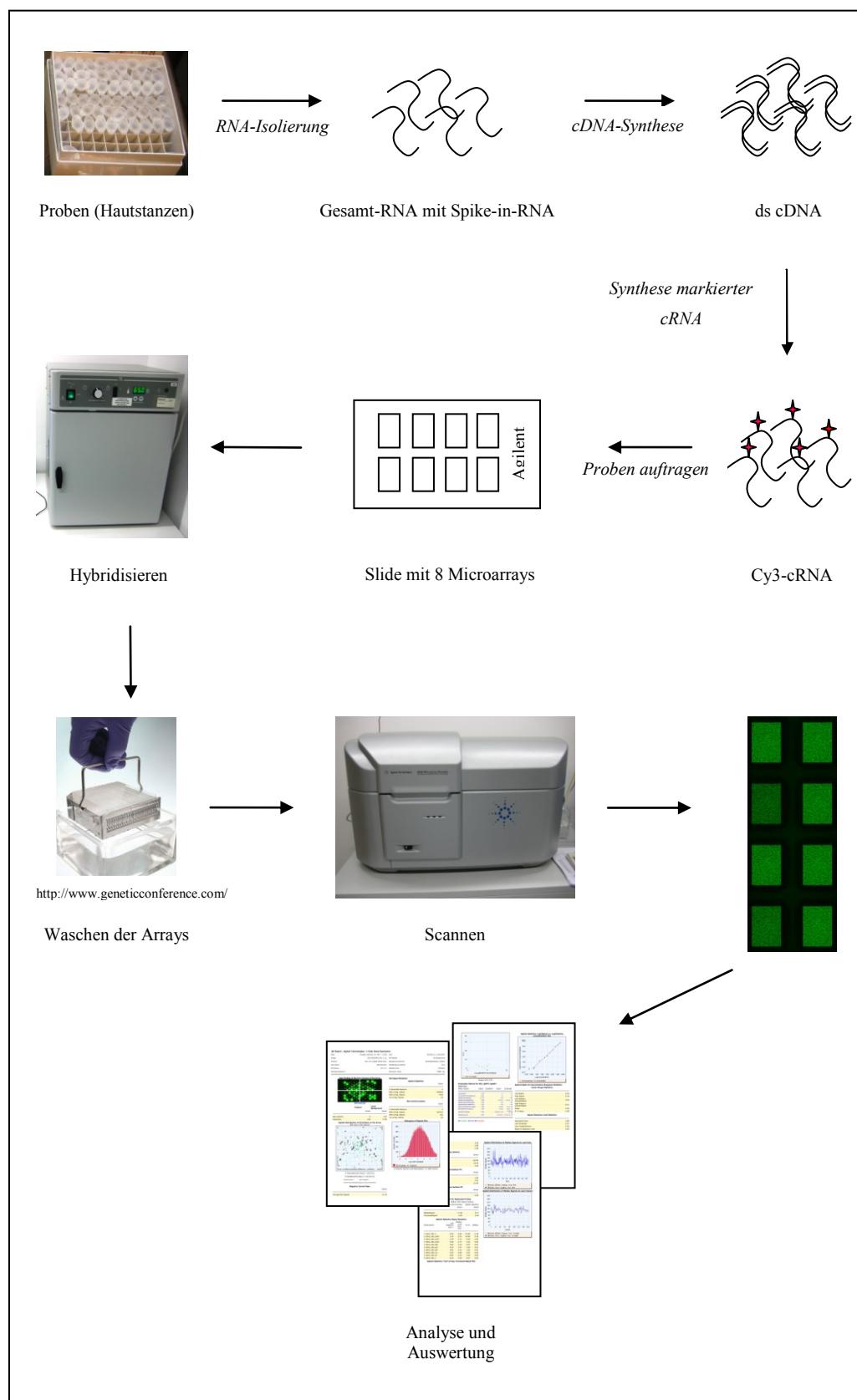
### **3.2.8. Genexpressionsanalysen mittels Agilent-Microarray-Technologie**

Um die Genexpression innerhalb der allergischen Gruppe vor und 6 h bzw. 24 h nach Allergenexposition zu untersuchen und mit dem Genexpressionsverhalten der gesunden Kontrollgruppe zu vergleichen, wurden die Hautproben in einem mehrstufigen Prozess bearbeitet (siehe Abb. 3). Zunächst wurde die Gesamt-RNA der Proben in doppelsträngige cDNA (ds cDNA) revers transkribiert. Ausgehend von der ds cDNA wurde anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierte cRNA synthetisiert. Dabei erfolgte eine lineare Amplifizierung. Die so markierten Hybridisierungsproben wurden auf die Microarrays aufgetragen.

Der Agilent Microarray 8x60K besteht aus einem speziellen Objektträger, auf dem acht identische Bereiche mit jeweils mehr als 60.000 genspezifischen Oligonukleotiden (60-mer) aufgebracht sind. Für die Herstellung der Microarrays werden die Oligonukleotide via Inkjet Print-Verfahren - Nukleotid für Nukleotid - bis zu einer Kettenlänge von 60 Nukleotiden auf die Oberfläche eines aktivierten Objektträgers aufgebracht. Die entsprechenden komplementären fluoreszenzmarkierten cRNA-Moleküle binden (hybridisieren) an die Oligonukleotide. Jedes Gen/Transkript wird auf dem Microarray durch ein oder mehrere Oligonukleotide repräsentiert.

Mit einem Agilent Microarray-Scanner wurden die Fluoreszenzintensitäten gemessen. Diese sind proportional zur Menge der gebundenen Probe und somit ein Maß für die Genexpressionsstärke. Nach Analyse und Auswertung wurden die

Daten der einzelnen Proben miteinander verglichen.



**Abbildung 3: Schema der Durchführung von Genexpressionsanalysen**

### 3.2.8.1. Design eines Agilent Custom-Arrays

Agilent produziert seine Arrays in unterschiedlichen Formaten. Für die vorliegende Transkriptom-Untersuchung wurde ein „Agilent 8x60 K Canis familiaris custom array“ verwendet. Die Customarrays von Agilent bieten die Möglichkeit, den Inhalt, also die durch die Oligonukleotide repräsentierten Gene und Transkripte, selbst zu bestimmen. Für das Design des Custom-Microarrays wurde der Inhalt des Agilent Katalog-Arrays für den Hund (Design-ID 021193, 4 x 44K-Format mit 43.803 caninen Probes für Target-Transkripte aus RefSeq (Release 31) Sept 2008, UniGene (Build 23) Feb 2008, TIGR Gene Indices (Release 7) Juni 2006, Genomassembly canFam2:Cf2 Mai 2005) als Grundlage verwendet. Auf der Grundlage der Annotation des Katalog-Arrays wurden aus Entrez Gene, Ensembl (beide Stand Ende 2010) und vom Affymetrix Canine Genome Array Transkripte ausgewählt, die wahrscheinlich auf dem Katalog-Array noch nicht vorhanden waren. Weiterhin wurde für Gene aus Literaturrecherchen, die an der atopischen Dermatitis bei Mensch und/oder Hund beteiligt sein sollen, sichergestellt, dass sie auf dem Array repräsentiert sind. Einzelne beim Hund noch nicht annotierte humane Kandidatengene wurden mittels Sequenzvergleich mit der caninen Genom-Sequenz abgeglichen. Es wurden diejenigen Sequenzen des Hundegenoms als Grundlage für die Ableitung von Probes verwendet, die den Nukleotidsequenzen des Menschen am ähnlichsten waren.

Das Design des Agilent Custom-Arrays wurde mithilfe des Agilent Webtools „eArray“ erstellt. Mithilfe von speziellen Algorithmen berechnet das Programm anhand von geladenen Nukleotidsequenz-Accession-Numbers bzw. der zugehörigen Nukleotidsequenzen die für das Gen spezifischen Oligonukleotide. Das Custom-Array bestand aus 43602 Agilent-Probes und zusätzlich 16466 Custom-Probes. Durchgeführt wurde das Design des Custom-Arrays von Dr. Bauersachs aus dem LAFUGA.

### 3.2.8.2. Annotationsliste

Jeder Probe wurde von der Firma Agilent eine Identifikationsnummer (ProbeID) zugewiesen, mit deren Hilfe die entsprechende Oligonukleotidsequenz zugeordnet werden kann. Doch nur ca. 36.000 der 60.000 Sequenzen waren einer Gen-ID aus Entrez Gene bzw. Ensembl zugeordnet. Allerdings ist eine funktionelle Aussage über ein hoch- oder herunterreguliertes Transkript ohne Zuordnung zu einem Gen

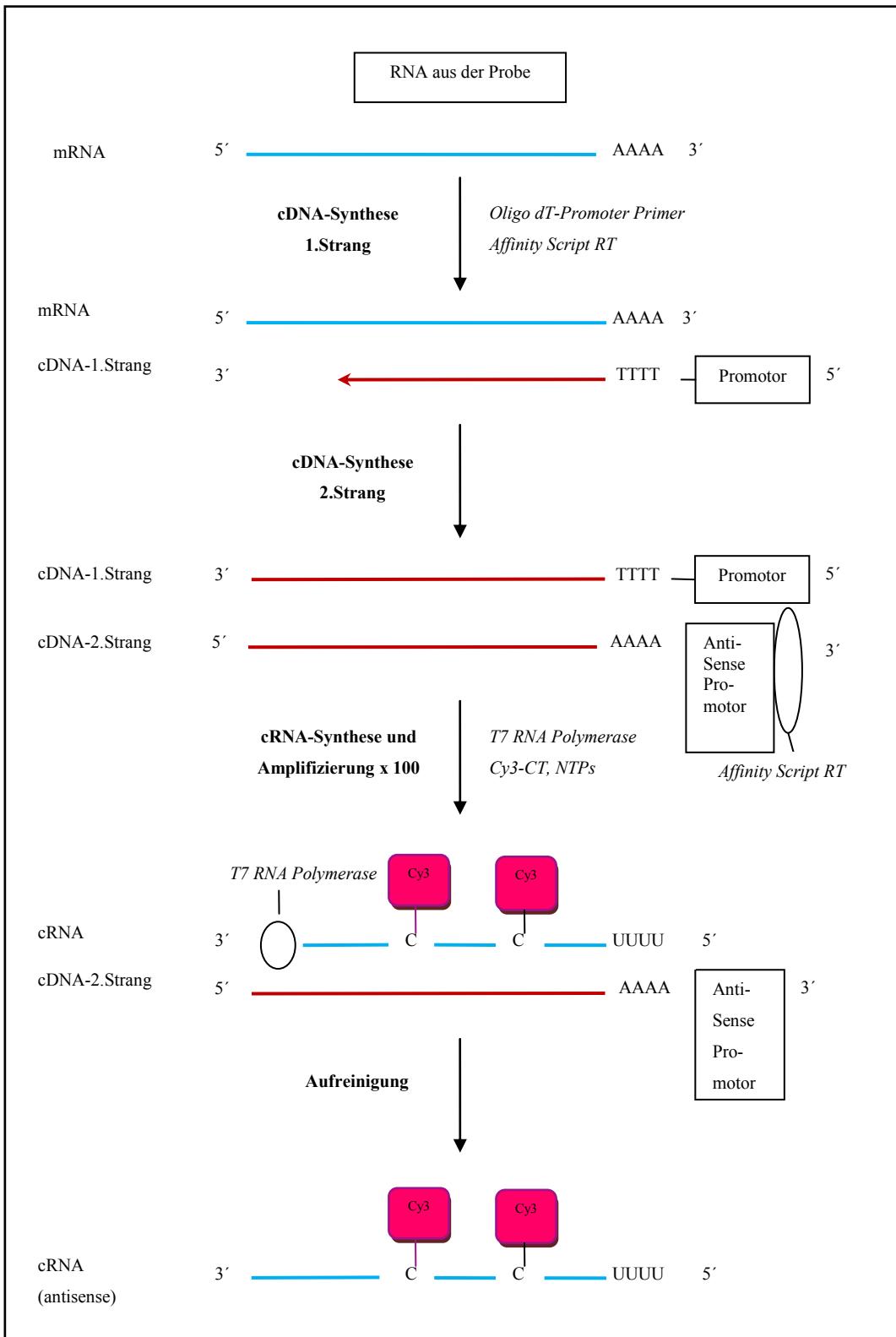
nicht möglich. Daher wurde die Liste der in den Vergleichen differentiell exprimierten Probes so weit wie möglich annotiert, d.h. canine und auch putative humane orthologe Gen-IDs zugeordnet.

Zunächst wurde die redundante Liste der differentiell exprimierten Transkripte (viele Transkripte sind mehrfach durch verschiedene Probes repräsentiert) zusammengefasst.

Für die Annotation der Arrays wurden Informationen verschiedene Datenbanken, wie NCBI und Ensembl herangezogen. In Excel-Tabellen wurden die Probes mit zugeordneten Gen-Identifikationsnummern und Gen-Namen von Ensembl und NCBI aufgelistet. Genom-, Protein-IDs und Transkript IDs wurden über online ID Converter in offizielle Gensymbole umgewandelt und orthologen humanen GeneIDs zugeordnet (Ensembl Biomart <http://www.ensembl.org/biomart/martview/64ddc9f92c6a37f15d94f62851ab1838>, DAVID <http://david.abcc.ncifcrf.gov/conversion.jsp>). Die Target-Transkript-Sequenzen von Probes, die nicht zugeordnet werden konnten, wurden gegen das canine bzw. humane Genom geblastet. Dadurch wurde die Annotationsliste von Agilent erweitert und so weit wie möglich vervollständigt mit dem Ziel, so viele orthologe humane GeneIDs wie möglich für weitere funktionelle Klassifizierungen zuzuordnen.

### 3.2.8.3. Synthese der Fluoreszenz-markierten cRNA

Für die Herstellung von Cyanin3 (Cy3)-CTP markierter cRNA aus der Gesamt- RNA der Proben wurden das Agilent Agilent Low-Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies Deutschland GmbH) und das Agilent Cyanine DyePack (Agilent Technologies Deutschland GmbH) verwendet. Das Verfahren läuft wie in Abb. 4 gezeigt ab.



**Abbildung 4: cRNA-Synthese durch *in vitro* Transkription**

Bei der cRNA-Synthese wird im ersten Schritt Poly(A)+-RNA der Probe mit Hilfe eines oligo(dT)-Primers, der im 5'-Bereich die Sequenz des T7-Promotors enthält, und der reversen Transkriptase in einen cDNA-Doppelstrang (ds-cDNA) umgeschrieben. Der Zweitstrang der ds-cDNA dient bei der cRNA-Synthese als Matrize für die RNA-Polymerase. Diese schreibt die cDNA in cRNA um und markiert sie im selben Schritt durch den Einbau von Cy3-CTP. Gleichzeitig findet eine lineare Amplifizierung statt. Dabei liegt die cRNA am Ende dieses Schrittes in 1000-facher Menge vor.

Durchführung:

cDNA-Synthese:

Für die cDNA-Synthese wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit drei verschiedenen Verdünnungsstufen (Spike-Mix I bis Spike-Mix III) aus der One-Color Spike Mix Stammlösung nach Herstellerprotokoll angefertigt. Die Spike-in-Gemische enthalten definierte Poly(A)<sup>+</sup>-RNAs als Positivkontrollen für die Expressionsanalysen.

**Tabelle 3: Herstellung der ersten (1:20), zweiten (1:25) und dritten Verdünnung (1:20)**

<b>Spike Mix I</b>	<b>µl</b>	<b>Spike Mix II</b>	<b>µl</b>	<b>Spike Mix III</b>	<b>µl</b>
Spike-Mix Stock	2	Spike-Mix I	2	Spike-Mix II	2
Dilution Buffer	38	Dilution Buffer	48	Dilution Buffer	38
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>40</b>		<b>50</b>		<b>40</b>

Die One-Color Spike Mix Lösungen (I-III) wurden nach Herstellung (siehe Tabelle 3) gründlich gemischt (Vortex-Genie 2), kurz abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R) und auf Eis gestellt. Die bei -20 °C tiefgefrorene RNA wurde 10 min bei RT aufgetaut, gevortext, kurz abzentrifugiert und ebenfalls auf Eis gestellt.

Für die weitere Verarbeitung der RNA wurde eine Menge von 2,5 µl mit einem RNA-Gehalt von 100 ng (entspricht 40 ng/µl) benötigt. Jede der Proben wurde durch Zugabe von RNase-freiem Wasser (im Kit enthalten) bis zum Erreichen dieser Konzentration verdünnt.

Im Anschluss daran wurde aus dem Spike Mix III und dem T7 Promotor-Primer ein weiterer Mix wie in Tab. 4 beschrieben hergestellt, zu den Proben gegeben und der Ansatz anschließend gemischt und kurz abzentrifugiert.

**Tabelle 4: Template und T7 Promoter Primer Mix**

<b>Komponenten</b>	<b>µl</b>
Spike-Mix III	2
T7 Promoter Primer	0,8
<b>Volumen</b>	<b>2,8</b>
Probe RNA (100 ng)	2,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>5,3</b>

Um die RNA-Struktur zu denaturieren (glätten), wurden alle Proben bei 65 °C 10 min in einem Hybridisierungsofen (Herahybrid 12, Kendro) inkubiert. Um diese Reaktion zu beenden, wurden die Proben für 5 min auf Eis gestellt.

Anschließend wurde der cDNA Master Mix für die cDNA-Synthese nach Anleitung des Herstellers angesetzt (siehe Tab. 5).

**Tabelle 5: Herstellung des cDNA Master Mix**

<b>Komponenten</b>	<b>µl</b>
5x First Strand Buffer	2
0,1 M DTT	1
10 mM dNTP Mix	0,5
AffinityScript RNase Block Mix	1,2
<b>Gesamtvolumen pro Probe</b>	<b>4,7</b>

Für die cDNA-Synthese wurden je 4,7 µl vom cDNA Master Mix zu jeder Probe gegeben und durch Auf- und Abpipettieren (Kolbenhubpipette, Gilson) miteinander vermischt. Die cDNA-Erst- und -Zweitstrangsynthese erfolgt bei diesem System in einem Schritt. Die Proben wurden für 2 h bei 40°C in einem Hybridisierungsofen (Herahybrid 12) inkubiert und die Reaktion nachfolgend

durch Inaktivierung der Enzyme in einem zweiten Hybridisierungsofen bei 70 °C für 15 min gestoppt. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt und dann kurz abzentrifugiert.

Synthese der Fluoreszenz-markierten cRNA:

Für die cRNA-Synthese wurde zunächst der Transcription Master Mix nach Herstellerprotokoll angesetzt (siehe Tab. 6).

*Tabelle 6: Herstellung des Transcription Master Mix*

Komponenten	µl
Nuclease-free water	0,75
5x Transcription Buffer	3,20
0,1 M DTT	0,60
NTP Mix	1,00
T7 RNA Polymerase Blend	0,21
Cyanine 3-CTP	0,24
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>6,00</b>

6 µl des Transcription Master Mix wurden jeder Probe zugegeben und mittels Pipette (Gilson) miteinander vermischt. Da Cyanin-Farbstoffe lichtempfindlich sind, wurden die Proben bei 40°C für 2 h in einem lichtgeschütztem Behältnis im Hybridisierungsofen (Herahybrid 12) inkubiert. Bei diesem Schritt wird vom 3'-Ende bezogen auf die ursprüngliche mRNA in 5'-Richtung mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase der zur mRNA komplementäre cRNA-Strang synthetisiert. Dabei wird das mit dem Cy3-Fluoreszenzfarbstoff (pink) markierte CTP (Cytosin-Triphosphat) eingebaut. Die Effizienz des Cy3-Einbaus und die Ausbeute an Cy3-cRNA kann später im Photometer gemessen werden, um die entsprechende Menge bei der Hybridisierung einzusetzen.

### 3.2.8.4. Aufreinigung der amplifizierten cRNA

Für die Aufreinigung der cRNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH)

verwendet.

#### Durchführung:

Im ersten Schritt wurde jede Probe mit 84  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l aufgefüllt. Im zweiten Schritt wurden je 350  $\mu$ l Buffer RLT dazu gegeben und gut mit der Probe vermischt. Anschließend wurden 250  $\mu$ l Ethanol (100%) zu jeder Probe hinzugefügt und vorsichtig mit Hilfe einer Pipette (Gilson) mit der Probe gemischt. Danach wurde jede Probe (700  $\mu$ l) in eine RNeasy mini Säule (RNA-adsorbierende Filtervorrichtung), die sich in einem 2 ml RG (Safe-Lock, Eppendorf AG) befand, überführt und für 30 s bei 4°C und 8.000 x g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Die so entfernte Flüssigkeit wurde mit dem RG verworfen und die RNeasy mini Säule, in der sich die cRNA nun befand, in ein neues RG gegeben. Die cRNA wurde mit 500  $\mu$ l Buffer RPE (ethanolhaltig) gewaschen und die Säulchen wurden für 60 s bei 4 °C und 8.000 x g zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde wieder mit dem Gefäß verworfen. Das Filterrörchen mit der gebundenen cRNA wurde in ein 1,5 ml RG (Safe-Lock; Eppendorf AG) eingehängt und die cRNA mit Hilfe von 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser für 60 s aus der Filtermembran gelöst. Nachfolgend wurde die Flüssigkeit mit der darin enthaltenen cRNA bei 4 °C für 30 s und 8.000 x g abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Die Proben wurden auf Eis gestellt und die RNeasy mini columns verworfen.

#### 3.2.8.5. cRNA Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der cRNA-Konzentration und der Einbaurate des Cy3-dCTP wurde das UV-Vis Spectrophotometer NanoDrop 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH) verwendet.

Zur Untersuchung der Proben wurde jeweils 1,5  $\mu$ l Probenvolumen direkt auf die Messoberfläche pipettiert und der Schwingarm des Gerätes darauf heruntergelassen. Als Leerwert wurde Nuklease-freies Wasser verwendet. Zwischen jeder Messung wurde die Messoberfläche gereinigt.

Zunächst wurde die Absorption bei  $\lambda= 260$  und  $\lambda=280$  nm gemessen und der Quotient bestimmt. Liegt der Quotient aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> bei ca. 2,0, ist eine gut aufgereinigte cRNA gewährleistet.

Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und cRNA-Konzentration (ng/ $\mu$ l) und Cy3-Konzentrationen (pmol/ $\mu$ l) wurden anschließend auf einem

Computerbildschirm dargestellt.

Die cRNA-Ausbeute ( $\mu\text{g}$ ) in 30  $\mu\text{l}$  Probenlösung wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{cRNA-Konzentration ng}/\mu\text{l} \times 30 \mu\text{l}}{1000} = \mu\text{g an cRNA}$$

Die Einbaurate von Cy3 markierten Nukleotiden in die cRNA wurde über die spezifische Aktivität bestimmt. Dazu wurde die Absorption von Cy3 bei 550 nm (Absorptionsmaximum) gemessen.

Die spezifische Aktivität der Proben berechnete sich wie folgt:

$$\frac{\text{Cy3-Konzentration pmol}/\mu\text{l} \times 1000}{\text{cRNA-Konzentration } \mu\text{g}/\mu\text{l}} = \text{pmol Cy3}/\mu\text{g cRNA}$$

Die cRNA-Ausbeute in 30  $\mu\text{l}$  sollte für die Hybridisierung bei mindestens 1,65  $\mu\text{g}$  liegen, die spezifische Aktivität bei mindestens 6,0 pmol Cy3/ $\mu\text{g}$  cRNA.

Die cRNA-Konzentration jeder Probe wurde für die Microarray-Analyse auf 600 ng in 19  $\mu\text{l}$  eingestellt.

### 3.2.8.6. cRNA-Fragmentierung

Um eine optimale Hybridisierung der Cy3-markierten cRNA mit den komplementären Oligonukleotidsequenzen zu gewährleisten, musste sie vorher fragmentiert werden.

Das 10X Blocking Agent wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll (Tab. 7) angefertigt.

**Tabelle 7: Fragmentierungsmix für 8x60K Microarray**

<b>Komponenten</b>	<b>µl</b>
Cyanine 3-labeled, linearly amplified cRNA in Nuclease-free water (600 ng/19 µl)	19
10x Blocking Agent	5
25x Fragmentation Buffer	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>

Anschließend wurden jeder Probe 5 µl 10x Blocking Agent und 30 s später 1 µl 15x Fragmentation Buffer hinzugefügt. Die Proben wurden gemischt (VortexGenie2) und abzentrifugiert und dann abgedunkelt für 30 min bei 60 °C im Hybridisierungsofen (Herahybrid 12, Kendro, Langenselbold) inkubiert. Um die Fragmentierung der cRNA zu beenden, wurden die Proben anschließend für 1 min auf Eis gestellt und vorsichtig mit 25 µl 2x GEx Hybridisation Buffer HI-RPM mit einer Pipette vermischt. Die Proben wurden für 1 min bei RT in der Mikrozentrifuge (Rotilabo®-Mini-Zentrifuge; Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe) kurz abzentrifugiert und wieder auf Eis gestellt.

### 3.2.8.7. Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden das Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) verwendet. Bei der Hybridisierung kann eine Cy3-cRNA an das komplementäre, auf der Objektträgeroberfläche fixierte Oligonukleotid des Mikroarrays binden.

Durchführung:

Ein Slide mit Dichtungsringen (Hybridization Gasket Slide Kit; Agilent Technologies) wurde mit der Beschriftung nach oben in die vorgesehene Halterung (Agilent SureHyb Chamber Base) gelegt. 40 µl Hybridisierungsprobe wurden vorsichtig mit schräg gehaltener Pipette in die Fläche von je einem Dichtungsring pipettiert, ohne diesen dabei zu berühren. Dadurch sollte das Auslaufen der Probenflüssigkeit verhindert werden. Das Microarray-Slide mit den Oligonukleotiden auf der Oberfläche wurde mit der aktiven Seite nach unten auf

das Gasket Slide gelegt, das Gegenstück der Haltevorrichtung auf das Slide-Sandwich gelegt und die Haltevorrichtung mit einer Klammer verschlossen. Anschließend wurde das Slide-Sandwich langsam gedreht und damit die Beweglichkeit der Luftblasen in der Microarray-Kammer überprüft, um ein Benetzen der gesamten Arrayfläche mit der Probenflüssigkeit zu gewährleisten (siehe Abb. 5).

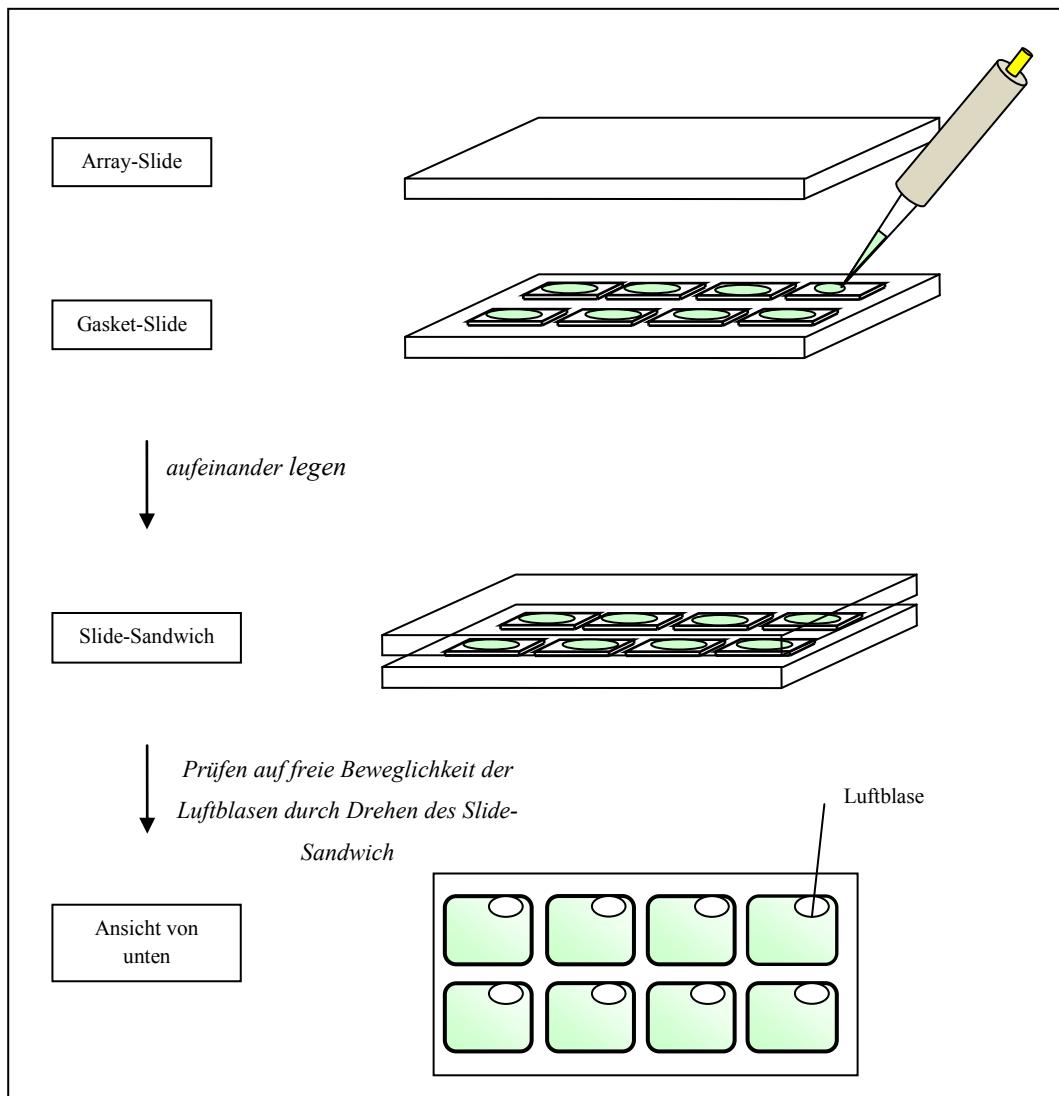


Abbildung 5: Slide-Sandwich

Nachfolgend wurden die Microarrays in den Hybridisierungs-Ofen (Agilent Microarray Hybridization Oven) eingelegt und für 17 Stunden bei 65 °C und 10 Umdrehungen pro Minute (rpm) hybridisiert.

### 3.2.8.8. Waschen der Microarrays

Nach dem Hybridisieren werden die nicht bzw. unspezifisch gebundenen cRNA-Moleküle abgewaschen, so dass nur die auf dem Microarray hybridisierte Cy3-cRNA gemessen werden kann. Für das Waschen der Microarrays wurde das Agilent Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies) verwendet.

Durchführung:

Zu Gene Expression Wash Buffer 1 und - 2 wurden 2 ml 10% Triton X-102 gegeben. Dies reduziert die Möglichkeit von Wasch-Artefakten auf dem Microarray. Gene Expression Wash Buffer 2 wurde vor der Anwendung in einem Hybridisierungsschrank (Herahybrid 12; Kendro) auf 37 °C aufgewärmt. Zwei Gefäße (Gefäß 1.1 und 1.2) wurden mit je 0,5 l raumtemperiertem Gene Expression Wash Buffer 1 gefüllt. In das Gefäß 1.2 wurde ein Magnetrührstein gegeben und das Gefäß auf einen Magnetrührer (IKA® RCT basic IKAMAG® safety control; IKA®-Werke GmbH & CO. KG) gestellt. Das dritte Gefäß wurde mit 0,5 l Gene Expression Wash Buffer 2 gefüllt. In das dritte Gefäß wurde ebenfalls ein Magnetrührstein gelegt. Anschließend wurde das Gefäß mit Wash Buffer 2 auf einen beheizbaren Magnetrührer (IKA® RCT basic IKAMAG® safety control; IKA®-Werke GmbH & CO. KG) gestellt und über die Temperaturkontrolle eine Temperatur von 32 °C eingestellt. Die Microarrays wurden aus dem Hybridisierungsofen entnommen und auf Luftblasenbildung und auf freie Beweglichkeit der Luftblasen kontrolliert. Das Slide-Sandwich wurde aus der Hybridisierungskammer entnommen und im Gefäß 1-1 im Waschpuffer 1 geöffnet. Die Microarray-Slides wurden zügig in ein Slide-Rack überführt, das sich im Gefäß 1.2 mit Waschpuffer 1 befand. Dort wurden die Slides für mindestens 1 min belassen. Anschließend wurden sie mit dem Slide-Rack direkt in den Gene Expression Wash Buffer 2 gestellt und für 1 min inkubiert. Aus diesem Gefäß wurde das Slide-Rack langsam und gleichmäßig herausgehoben, damit der Gene Expression Wash Buffer 2 gleichmäßig ablaufen konnte, um möglichst keine Tropfen auf den Microarray-Slides zu hinterlassen. Während des Waschvorgangs wurden Puffer 1 und Puffer 2 bei 200 rpm gemischt.

### 3.2.8.9. Scannen der Microarrays und Auswertung der Scan-Files mittels Feature Extraction Software 10.7.3.1

Nach Anregung der Moleküle bei 532 nm mittels integriertem SHG-YAG Laser

---

misst der Microarray Scanner die Fluoreszenzintensität der Cy3-markierten-cRNA-Hybide und speichert sie als Bilddatei (20bit tif-Datei).

Durchführung:

Die Microarrays wurden den Angaben des Herstellers entsprechend in eine Slide-Halterung gespannt, in den Agilent DNA Microarray Scanner G2505C (Agilent Technologies) eingelegt und der Scancvorgang gestartet. Die Microarrays wurden mit einer Auflösung von  $2 \mu\text{m}$  gescannt. Die Bilddatenverarbeitung wurde mit der Feature Extraction Software 10.7.3.1 (Agilent Technologies) durchgeführt.

Die Abbildungen der Fluoreszenzintensität der Microarrays wurden zunächst auf grobe und anschließend auf feinere Artefakte (wie Flecken von Tropfen oder Staubteilchen) untersucht. Diejenigen Microarrays, welche größere Defekte/Artefakte aufwiesen, wurden wiederholt.

Weiterhin wurden die statistischen Reports der Arrays miteinander verglichen, um starke Abweichungen in Signalstärke und -verteilung zu identifizieren.

Die Feature-Extraction Software ordnet mit Hilfe eines Gitternetz-Rasters, das automatisch über die Bilddatei gelegt wird, jedem Spot eine Feature Number und eine ProbeID zu. Sie führt automatisch eine Intra-Array-Normalisierung (siehe auch Punkt 3.2.10) durch, indem innerhalb eines Arrays eine Hintergrundkorrektur und ein Multiplicative Detrending vorgenommen wird. Dadurch werden Fehlerquellen innerhalb eines Microarray-Experiments minimiert. Durch die Hintergrundkorrektur wird sichergestellt, dass ein Array für alle Messwerte dasselbe Grundniveau besitzt. Beim Multiplicative Detrending werden durch das Programm unterschiedliche Signalintensitäten innerhalb des Arrays durch Vergleich von auf dem Array verteilten Kontroll-Probe-Sets ausgeglichen.

Zum Schluss wird für jedes Array-Experiment eine Text-Datei generiert, die Informationen über Intensitäten, Mittelwerte, Hintergrundkorrektur etc. für jede Probe auf dem Array enthält.

### **3.2.9. Datenfilterung**

Die von der Agilent Feature-Extraction Software generierten Text-Dateien für jeden Array wurden zunächst in ein Excel-Format umgewandelt und daraus die für die statistische Analyse unnötigen Spalten gelöscht. Danach wurden für jeden Probenentnahmepunkt die Daten der zugehörigen Proben in einer Excel

Tabelle zusammengefasst. Diese enthielt nur noch „Feature number“, „Probe name“, „Systematic name“ und die ihnen zugewiesenen gProcessed Signals und den WABG (Well above background). Für jeden Vergleich wurde eine Excel Datei mit diesen Daten der Vergleichsgruppen erstellt. Dann wurden die Daten nach WABG gefiltert. WABG gibt an, ob bei einer Feature number/probe ein signifikantes Signal nach Abziehen des Hintergrundrauschens vorhanden war oder nicht. Die Zahl 1 stand dabei für ein signifikantes Signal, die 0 für kein oder ein nicht-signifikantes Signal. Wenn bei mindestens einer der Gruppen aus dem Vergleich eine Feature number/probe bei mindestens 5 Hunden signifikant war (also WABG mindestens 5x Zahl 1 war), so wurde sie in der Liste belassen. War dies nicht der Fall, so wurde sie als „falsch“ angegeben und gelöscht. Ziel war es, die Redundanz der zu untersuchenden Feature numbers/probes pro Vergleich zu reduzieren und somit überflüssige Daten zu entfernen.

Für das Aussortieren wurde die ODER-Excel-Funktion verwendet:

Beispiel: ein Vergleich von 2 Gruppen mit je 6 Hunden

```
=ODER(SUMME(WABG-Wert von Hund 1-6 von Gruppe1)>4; SUMME(WABG-Wert von Hund 1-6 von Gruppe2)>4)
```

Eine ODER-Funktion gibt WAHR zurück, wenn ein Argument wahr ist. Sie gibt FALSCH zurück, wenn alle Argumente falsch sind.

Anschließend wurden die Kontroll-probes aus dem Array ebenfalls aussortiert, so dass nur noch die „echten“ probes mit signifikanten gProcessedSignals übrig blieben.

Die daraus hervorgehende gekürzte Excel-Datei wurde als Text-Datei gespeichert und für die Normalisierung und statistische Auswertung in „R“ hochgeladen.

### **3.2.10. Inter-Array Normalisierung und Datenvisualisierung in „R“**

Um Ergebnisse zwischen verschiedenen Arrays direkt miteinander zu vergleichen, müssen Normalisierungsmethoden angewendet werden. Sie dienen der Datenbereinigung und der Reduktion der technischen Varianz, verursacht durch Unterschiede in der Probenaufarbeitung, dem Labeling, der Fluoreszenzintensität und der –auswertung, wobei die biologische Varianz (tatsächliche Genexpressionsunterschiede, die durch die unterschiedliche Behandlung der

---

verschiedenen Gruppen und Entnahmzeitpunkte entstehen) erhalten bleiben sollen.

Die Normalisierung besteht grundsätzlich aus zwei Schritten, der Intra-Array-Normalisierung (Normalisierung innerhalb eines Arrays, siehe auch Punkt 3.2.8.9) und der Inter-Array/“between-Array“-Normalisierung (Normalisierung zwischen verschiedenen Arrays).

Die „between array normalization“ der Rohdaten wurde im „R“-Programm durchgeführt.

Das „R“-Programm ist eine online frei verfügbare Programmiersprache zur statistischen und graphischen/visuellen Auswertung von Daten. Sie ist unter <http://www.r-project.org/> erhältlich. Durch eine Vielzahl von zusätzlichen Software-Paketen kann der Funktionsumfang von „R“ erweitert und somit für spezielle statistische Fragestellungen angepasst werden. Die Bioconductor-Software baut auf „R“ auf, bietet verschiedene Pakete zur Erweiterung aus dem Bereich der Bioinformatik und ist besonders für die Analyse von Genexpressionsdaten geeignet. Die Software-Pakete sind unter <http://bioconductor.org/> frei erhältlich und können nach Bedarf geladen werden.

Die Microarray-Daten wurden zunächst einer Normalisierung mit VSN (Variance Stabilization and Normalization) unterzogen. Dadurch sollten technisch bedingte Variationen zwischen den Arrays minimiert werden (Inter-Array-Normalisierung). Je nach durchgeföhrtem Vergleich wurden die gProcessedSignal-Werte als Tabulator-getrennte Textdatei eingespeist (bei der Multifactorial-Analyse die aller Arrays, bei einzelnen Vergleichen die der entsprechenden Vergleichsgruppen). Bei der VSN wird angenommen, dass die Microarraydaten in ihren Signalintensitäten variieren und eine Transformation gefunden werden kann, nach der die Varianz der Intensitäten annähernd konstant ist. Durch die VSN werden die Daten logarithmiert (Logarithmus zur Basis 2). Das bietet eine Basis für statistische Auswertung von Microarray-Daten und liefert eine vernünftige Daten Prä-Prozessierungsstrategie für Multivariaten-Analysen (HUBER et al., 2002).

Im direkten Anschluss an die VSN-Normalisierung erfolgte eine graphische Darstellung der Array-Daten in „R“. Bei den Einzelvergleichen als SD-Plot (SD=standard deviation), Box-plot (Rohdaten und nach Normalisierung), Distance-plot und Heatmap.

Diese Datenvisualisierung ermöglicht eine erste Abschätzung der Homologie

---

innerhalb eines Datensets. Weiterhin können Differenzen zwischen verschiedenen Gruppen dargestellt werden.

Das eingesetzte Script mit den Befehlen für „R“ für die Normalisierung und anschließende statistische Auswertung der Experimente ist im Anhang (9.3.) aufgeführt.

### **3.2.11. Statistische Auswertung mit Limma: Linear Models for Microarray Data**

Im Anschluss an die VSN-Normalisierung wurde die statistische Auswertung der Array-Daten mit Limma (LInear Models for MicroArray data) Version 3.6.9 durchgeführt. Die Limma-Analyse basiert auf einer Implementierung des Empirischen-Bayes-Ansatzes von Gordon Smyth (SMYTH, 2004; SMYTH, 2005) und ermöglicht das Verwenden von linearen Modellen für die Analyse von Microarray-Experimenten, sowie die Suche nach differentiell exprimierten Genen. Mit Hilfe von Limma können Vergleiche zwischen einer großen Anzahl von Ziel-RNAs gleichzeitig durchgeführt werden. Das verwendete R-Script ist im Anhang (siehe Anhang 9.3.) aufgeführt.

Durch Regressionsanalysen der Daten wurde bestimmt, ob die Expression eines Gens gegenüber einer Kontrolle oder einem anderen Biopsiezeitpunkt signifikant verändert ist. Die Signifikanz-Schwelle wurde auf 5 % (0,05) festgelegt (Korrektur auf multiple Tests mit der Funktion „False Discovery Rate“, FDR). Anhand der „Response variable“ wurden die Arrays entsprechend dem experimentellen Ansatz in Gruppen eingeteilt.

Mittels der „Two class, unpaired“ Auswertung konnten zwei Gruppen mit unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden, zum Beispiel ein Allergenentnahmzeitpunkt mit einem anderen (two classes), wobei jeder dieser Zeitpunkte mehrere biologische Replikate umfasste (unpaired). Eine „Two class, unpaired“ Auswertung wurde für den Vergleich der Basisbiopsien (0h-Biopsie) von allergischen (A) gegen nichtallergische Hunde (N), für die Vergleiche allergische gegen nicht allergische Hunde sechs- (6h) und 24 Stunden (24h) nach Allergenauftrag (A), bzw sechs und 24 Stunden nach Kochsalzlösung (S) (A0h-N0h, A\_6hA\_vsN\_6hA, A\_24hAvsN\_24hA, A\_6hSvsN\_6hS, A\_24hSvsN\_24hS) durchgeführt (siehe Tab. 8).

**Tabelle 8: Übersicht über Two class unpaired-Analysen**

<b>Basisbiopsie</b>	<b>Kochsalz</b>	<b>Allergen</b>
<b>A_0hvsN_0h</b>	<b>A_6h_SvsN_6h_S</b>	<b>A_6h_AvsN_6h_A</b>
	<b>A_24h_SvsN_24h_S</b>	<b>A_24h_AvsN_24h_A</b>

Mittels der „Two class, paired“-Auswertung konnten zwei verschiedene Behandlungsgruppen (two classes) aus derselben Tiergruppe zum selben Zeitpunkt (paired) untersucht werden. Eine gepaarte Stichprobenanalyse wurde für die Vergleiche zu den Biopsieentnahme-Zeitpunkten sechs- (6h) und 24 Stunden (24h) von allergischen Tieren (A) mit Allergen (A) im Vergleich zu Kochsalz (S) und ebenso für die nichtallergischen Hunde (N) durchgeführt (A\_6hAvsA\_6hS, A24hAvsA24hS, N\_6hAvsN\_6hS, N24hAvsN24hS) (siehe Tab. 9).

**Tabelle 9: Übersicht über Two class paired-Analysen**

<b>Allergisch</b>	<b>Nichtallergisch</b>
<b>A_6h_AvsA_6h_S</b>	<b>N_6h_AvsN_6h_S</b>
<b>A_24h_AvsA_24_hS</b>	<b>N_24h_AvsN_24h_S</b>

Eine „Multifactorial“-Analyse bietet die Möglichkeit, signifikante Probes in mehreren Gruppen zu finden, wobei auch hier ungepaarte und gepaarte Proben eingesetzt wurden. Für unsere Experimente wurde eine „Multifactorial“-Analyse über alle drei Biopsieentnahme-Zeitpunkte durchgeführt. Bei der Multifactorial unpaired-Analyse wurde der Unterschied der Genexpressionsänderung zwischen Allergischen und Nichtallergischen im Vergleich von Allergen zur Kochsalzlösung zu einem bestimmten Biopsienentnahme-Zeitpunkt (6h und 24h) durchgeführt. Dabei sollten diejenigen Effekte, die aufgrund der Biopsieentnahme und der möglichen systemischen Reaktion zu erwarten waren, ausgeblendet und diejenigen Effekte herausgefiltert werden, welche aufgrund der Allergeneinwirkung auftraten. Um dies zu erreichen, wurde die Expression

regulierter Gene der kochsalzbehandelten Haut von der mit Allergen behandelter Haut der jeweiligen Gruppen abgezogen.

Bei der Multifactorial paired-Analyse wurde der Unterschied in der Genexpressionsänderung zwischen der Basisbiopsie und dem sechs- bzw. 24-Stundenwert zwischen allergischen im Vergleich zu nichtallergischen Hunden mit Allergen bzw. Kochsalz durchgeführt.

**Tabelle 10: Übersicht über die Multifactorial-Analysen**

unpaired	paired	
	Allergen	Kochsalz
DiffAvsN_6h=	DiffAvsN_6hA_0h=	DiffAvsN_6h_S_0h=
(A_6h_A-A_6h_S)-	(A_6h_A-A_0h)-	(A_6h_S-A_0h)-
(N_6h_A-N_6h_S)	(N_6h_A-N_0h)	(N_6h_S-N_0h)
DiffAvsN_24h=	DiffAvsN_24A_0h=	DiffAvsN_24S_0h=
(A_24h_A-A_24h_S)-	(A_24h_A-A_0h)-	(A_24h_S-A_0h)-
(N_24h_A-N_24h_S)	(N_24h_A-N_0h)	(N_24h_S-N_0h)

Als Eingabedatei diente die entsprechende mit Tabulator getrennte Textdatei aus der VSN-Normalsierung mit Feature Numbers und den VSN-normalisierten Daten.

Gene mit einem fold change (FC) von 1,5 bzw. mehr wurden als signifikant reguliert angesehen. Der FC gibt die Höhe der Expressionsänderung eines Gens im Vergleich zwischen zwei Zeitpunkten oder Vergleichsgruppen an und stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Anzahl der differentiell regulierten Probes auf diejenigen einzuschränken, welche ein Minimum an Regulation aufweisen. Nur die differentiell exprimierten Gene wurden in ein neues Excel-Tabellenblatt eingefügt.

Nach der statistischen Auswertung und der Erweiterung der Annotationen wurden die noch immer redundanten Gene, die von mehreren Probes auf dem Array repräsentiert wurden, mit Hilfe von Galaxy zu einer Zeile zusammengefasst. Galaxy ist ein online frei verfügbares Tool zur biomedizinischen Datenanalyse

(<http://galaxy.psu.edu/>). Die Daten wurden in Form von mit Tabulator getrennten Text-Dateien hochgeladen und nach Systematic name und anschließend nach GeneID und GeneSymbol gekürzt. Dabei wurden die Probes, die einem Gen angehörten, in eine Zeile geschrieben und Feature Number und andere nicht-identische Angaben durch Kommata getrennt.

### **3.2.12. Bioinformatische Auswertung und Daten-Visualisierung**

#### **3.2.12.1. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery**

##### **V.6.7 (DAVID)-Analyse**

Die funktionelle Klassifizierung der in der Multifactorial unpaired-Analyse (DiffAvsN\_24h) differentiell regulierten Gene wurde mit dem „Functional annotation clustering“-Tool und dem „Functional annotation chart“-Tool der open-source Datenbank DAVID (Database for Annotation V. 6.7, Visualization and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) des National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) mit den standard Einstellungen (HUANG et al., 2008) durchgeführt. Die vier Cluster aus der SOTA-Analyse (siehe 3.2.10.3.2) wurden ebenfalls mit DAVID in funktionelle Gruppen eingeteilt. Differentiell exprimierte Gene einer Gen-Liste allein aufgrund der Gen-Bezeichnung in funktionelle Gruppen einzuordnen ist nicht möglich, da aufgrund des Gen-Namens häufig nur eine Funktion ersichtlich ist (meist die, bei der es als erstes „entdeckt“ wurde), ein Gen jedoch häufig in vielen Pathways eine Rolle spielt. Mit Hilfe von DAVID können langen Genlisten (wie nach Microarray-Analysen), in denen Gene bestimmter Gruppen besonders häufig vorkommen, entsprechende biologische Funktionen/Bedeutungen zugeordnet werden. Bei diesen Enrichment-Analysen werden alle Gene der Gen-Liste ihrer biologischen Funktion nach statistisch ausgewertet und in überrepräsentierten funktionellen Gruppen zusammengefasst. Beim „Functional annotation chart“ werden die am stärksten angereicherten „terms“ einschließlich ihrer Enrichment p-values und weiterer Angaben wie Anzahl der Gene in dieser Gruppe u.v.m. in einer Liste angegeben. Dabei sind die „terms“ ihrem p-value entsprechend aufsteigend angeordnet. Beim „Functional annotation clustering“ werden ähnliche „annotation terms“ (mit einer bestimmten Übereinstimmung der zugeordneten Gene) noch einmal in ein eigenes Cluster gruppiert. Für jedes Cluster wird ein Enrichment Score angegeben. Die Cluster sind ebenfalls entsprechend ihres

Enrichment Scores aufsteigend angeordnet. Für jeden Term innerhalb eines Clusters ist wieder sein Enrichment p-value angegeben.

Da mit humanen GenIDs mehr Gene zugeordnet werden konnten als mit den caninen, wurden die putativen orthologen humanen GenIDs für die DAVID-Analyse verwendet. Für die weniger stark differentiell exprimierten (down-regulated) Gene und die vermehrt differentiell exprimierten Gene (up-regulated) wurden eigene DAVID-Analysen durchgeführt.

Die Analysen lieferten damit einen Einblick, an welchen Prozessen die untersuchten differentiell exprimierten Gene beteiligt sind und erleichterten das Erkennen von Mustern in dem Datensatz.

### **3.2.12.2. KEGG-Pathway-Analyse**

Die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Datenbank (KANEHISA et al., 2006) dient dem Verständnis der höheren Funktionen von biologischen Systemen. Die aufgrund der Multifactorial unpaired-Analyse des Vergleiches DiffAvsN\_24h generierte Liste von Genen wurde mit Hilfe des frei verfügbaren online-Tools KEGG MAPPER einer Pathway-Analyse ([http://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway1.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html)) unterzogen. Die KEGG Pathway Datenbank beschreibt molekulare Interaktionsnetzwerke in der Zelle und spezifische Varianten dieser Netzwerke für bestimmte Organismen. Sie besteht aus einer Sammlung manuell gezeichneter Karten aus den Bereichen Metabolismus, genetische Informationsverarbeitung, Signalweiterleitung und verschiedenen zellulären Prozessen und Krankheiten und erlaubt Aussagen darüber, ob in Gen-Listen überproportional häufig Gene enthalten sind, die einem KEGG Pathway zugeordnet werden können. Die Pathways sind in der KEGG Pathway Datenbank enthalten, die von den Bioinformatikzentren der Kyoto Universität und dem Human Genome Center der Universität Tokyo zusammengestellt und im Internet der Öffentlichkeit verfügbar gemacht wurden (KANEHISA et al., 2006; KANEHISA et al., 2008).

### **3.2.12.3. Multi Experiment Viewer V.4.7.1 (MEV)**

Der Multi Experiment Viewer (MEV) Version 4.7.1 ist eine open-source Software (<http://www.tm4.org>) die von TIGR (The Institute of Genome Research) entwickelt wurde und bietet die Möglichkeit, mehrere in einem Experiment

erstellte Gruppen gemeinsam auszuwerten und zu visualisieren (SAEED et al., 2003).

### 3.2.12.3.1. Hierarchische Cluster-Analyse

Zunächst wurde eine hierarchische Cluster-Analyse (Hierarchical Clustering HLC, sample tree) der Arrays über alle vier Gruppen (**A\_24h\_A**; **A\_24h\_S**; **N\_24h\_A**; **N\_24h\_S**) aus der Multiclass unpaired-Analyse (DiffAvsN24h) durchgeführt (Metrik: Euklidische Distanz).

In die Analyse wurden die in der Limma-Analyse signifikanten und mit Galaxy in eine nicht redundante Liste umgewandelten, differentiell regulierten Gene eingesetzt.

Um eine korrekte Darstellung zu erreichen, wurden die VSN normalisierten und logarithmierten ProcessedSignals über alle Gruppen gemittelt (Gesamt-Mittelwert). Weiterhin wurden die Expressionswerte für ein Gen über jede Gruppe gemittelt. Anschließend wurde der Gesamt-Mittelwert für ein Gen vom Mittelwert der jeweiligen Gruppe subtrahiert und man erhielt den  $\Delta$ VSN-Wert.

$$\Delta VSN \text{ (Gen X)} = \\ VSN \text{ Mittelwert einer Gruppe (Gen X)} - VSN \text{ Gesamt-Mittelwert (Gen X)}$$

Mit Hilfe des  $\Delta$ VSN-Wertes wurde erkennbar, ob das ProcessedSignal einer Gruppe über oder unter dem Gesamt-Mittelwert aller Gruppen lag. Ein negativer Wert bedeutete also, dass die Signalintensität der Gruppe unter dem Durchschnitt aller Signalintensitäten lag, und ein positiver Wert, dass die Signalintensität für das Gen über dem Durchschnitt lag.

Als Eingabedatei wurde eine mit Tabulator getrennte Textdatei verwendet, welche unter anderem die Gene ID (human und canin) mit Gensymbolen (human und canin) und die gemittelten normalisierten und logarithmierten ProcessedSignals ( $\Delta$ VSN) enthielt.

Gene mit ähnlicher Expression wurden dabei geclustert und untereinander angeordnet. Die einzelnen Gruppen wiederum wurden nach der Ähnlichkeit ihres Expressionsprofils sortiert. Anhand der resultierenden Grafik (Heatmap) ließ sich abschätzen, wie sich die Gen-Expressionmuster der vier Arrays (**A\_24h\_A**;

**A\_24h\_S; N\_24h\_A; N\_24h\_S**) zueinander verhielten. Die baumartige Darstellung (Sample Tree) zeigte nach Entfernung der Knotenpunkte zueinander an, wie eng die Verwandtschaft zwischen den verglichenen Gruppen bzw. zwischen den Genen ist.

### 3.2.12.3.2. Self-Organizing Tree Algorithm (SOTA)-Analyse

Um Gene mit einem ähnlichen zeitlichen Expressionsverlauf zu identifizieren, wurde eine Self-Organising Tree Algorithm (SOTA)-Analyse mit den differentiell exprimierten Genen aus der Multiclass unpaired-Analyse (DiffAvsN24h) über alle Gruppen (Metrik: Pearson correlation; max. Cycles 3) durchgeführt.

Für diese Analyse wurden, wie für die hierarchische Clusteranalyse, die  $\Delta VSN$ -Werte mit entsprechender Zuordnung der caninen, sowie der putativen orthologen humanen Gene als mit Tabulator getrennte Textdatei in MEV hochgeladen. Die Liste beinhaltete jedoch die Werte für alle zehn Gruppen (Basisbiopsie allergischer und nichtallergischer Hunde=A/N\_0h, Biopsie sechs Stunden nach Allergen/Kochsalz von allergischen und nichtallergischen Hunden=A/N\_6h\_A und A/N\_6h\_S, Biopsie 24 Stunden nach Allergen/Kochsalz von allergischen und nichtallergischen Hunden=A/N\_24h\_A und A/N\_24h\_S).

SOTA erstellt ein Dendrogramm (einen binären Baum), in welchem jeder Endpunkt ein Cluster darstellt. Die Einstellungen des Programms müssen dabei abhängig von Anzahl der Gene und deren Diversität angepasst werden. Die Option „max. Cycles“ repräsentiert die maximale Anzahl an Iterationen, die erlaubt sind, die Anzahl der erhaltenen Cluster entspricht der „max. Cycle“ +1.

Der Verlauf der einzelnen Cluster wird in Form eines Verlaufsdiagrammes dargestellt.

Die sinnvollste Cluster-Verteilung ergab sich bei einer Anzahl von 4 Clustern. Daher wurde „max. Cycle: 3“ gewählt. Ein negativer Wert bedeutete auch hier, dass die Signalintensität der Gruppe unter dem Durchschnitt aller Signalintensitäten lag, und ein positiver Wert, dass die Signalintensität für das Gen über dem Durchschnitt lag.

Die Gene, die den einzelnen Clustern zugeteilt waren, wurden anschließend über DAVID wie in Punkt 3.2.10.1 beschrieben, funktionellen Gruppen zugeordnet.

### 3.2.12.4. CoPub

Copub (<http://services.nbic.nl/copub5>) dient einer Co-Zitations-Analyse und ist ein frei erhältliches, Literatur-basiertes „keyword enrichment tool“. In der Medline-Literatur-Datenbank wird eine Verbindung zwischen Genen und „Keywords“ hergestellt, die biologische Prozesse, Pathways, Medikamente, Pathologie und Krankheiten beschreiben. Mit Hilfe von Copub können langen Genlisten wiederum Keyword-Listen zugeordnet werden, deren Inhalt signifikant mit den eingespeisten Genen zusammenhängt (FRIJTERS et al., 2008).

In Copub wurden die putativ orthologen humanen Entrez-Gene IDs der differentiell regulierten Gene geladen. Ebenfalls wurden die Cluster aus der MEV-Analyse in Copub funktionellen biologischen und medizinischen Prozessen zugeordnet.

### 3.2.13. Verifizierung der Microarray-Ergebnisse mit quantitativer Real-time Reverse Transcription Polymerase Kettenreaktion

Mittels quantitativer Real-time Reverse Transcription Polymerase Kettenreaktion (qPCR) wurde die Genexpression ausgewählter Gene verifiziert, die sich im Array in ihrer Expression unterschieden. Für die qPCR wurden dieselben Ausgangsproben wie für das Microarray-Experiment verwendet.

#### 3.2.13.1. cDNA-Synthese für die qPCR

Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit Hilfe des Sprint RT Complete-Double PrePrimed 48-well strips Kit (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) durchgeführt. In diesem Kit sind alle notwendigen Komponenten, wie beispielsweise Reverse Transkriptase (RT), Random hexamer- und oligo(dT)18-Primer, Nukleinsäuren und Reaktionspuffer in Form von Lyophilisaten in jeder der 48 Vertiefungen (Wells) enthalten. Mit Hilfe der RT wurde die in der Probe enthaltene Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben, welche als Matrize bei der qPCR eingesetzt wurde.

Der Oligo(dT)18-Primer besteht aus 18 Desoxythymidin-Nukleotiden und hybridisiert beim Annealing-Schritt bevorzugt an den Poly-A Schwanz der mRNAs. Dagegen sind Random Hexamer Primer eine Mischung aus einzelsträngigen Desoxynukleotidhexameren, die aus unterschiedlichen Kombinationen von Desoxyadenosin, Desoxythymidin, Desoxyguanosin und

Desoxycytidin bestehen. Sie schreiben sowohl mRNA also auch rRNA in cDNA um.

Die cDNA-Synthese wurde für jede der 60 Proben ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 20 µl RNase-freiem Wasser gestartet und nach Angabe des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

Je 20 µl einer Probe wurden in eine Vertiefung gegeben und mit den darin enthaltenen Komponenten gemischt (Vortex-Genie 2). Anschließend wurden die Proben bei 42°C für 60 min im Hybridisierungsofen (Herahybrid 12) inkubiert. Die cDNA-Synthese wurde beendet, indem die Proben für 10 min auf 70°C zur Inkaktivierung der RT erhitzt wurden. Anschließend wurde die cDNA durch Zugabe von 180µl RNase-freiem Wasser für die weitere Verwendung verdünnt und zur besseren Handhabung in ein neues RG überführt.

### 3.2.13.2. Erstellen von Primern für die qPCR

Die Gen-spezifischen Primer wurden mit Hilfe des Primer-BLAST-Tools von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) generiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer eine Schmelztemperatur („Primer melting temperature“=T<sub>m</sub>) zwischen 59°C und 61°C besaßen (das Primer-Paar jedoch einen T<sub>m</sub>-Unterschied von 1°C nicht übersteigt) und eine vorraussichtliche PCR-Produktgröße von 80 bis 200 Basenpaaren ergaben. Weiterhin sollten die Primer möglichst in zwei verschiedenen Exons liegen und bekannte Splicing-Varianten der entsprechenden mRNA amplifizieren können. Die Primerlänge sollte zwischen 18 und 27 Nukleotiden liegen. Weiterhin sollten sie keine Sekundärstrukturen, Selbst- oder Kreuz-Dimere bilden.

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Thermo Fisher Scientific GmbH ([www.thermoscientific.com/biopolymers](http://www.thermoscientific.com/biopolymers)).

**Tabelle 11: Liste der verwendeten qPCR-Primer**

GenID	Accession Number	Forward Primer	Reverse Primer
<b>*RPL13A</b>	XM_533620	CTGCCCCACAAGACCAAG	GGGATCCCATCAAACACCT
<b>*LOC479750</b>	XM_536878	GCAGGAAGGGATTCTCCAG	GGTCCAGTAAGAAATCTCCATAA
<b>*UBB</b>	XM_858590	CGCGGCTGGCATTGTTAGCTG	GCATACCACCCCCTCAGGCAC
<b>ALOXE3</b>	XM_546605	GCACCTGTGGCCAGAGCCCTA	CAGCTCCGTGGAGCAGCACAC

<b><i>CCL8</i></b>	NM_001005255	TGCCAGCTTCAGCACCTTGTCC	TGGGGTCAGCACAGATCTCCCTG
<b><i>CLEC7A</i></b>	XM_849050	TCAAGGCATCACTGGCGACCT	TCACAGCAATGGGACGCCAACG
<b><i>DMKN</i></b>	XM_533694	CTGGGGTCAGGGCTTCGGA	TCCTCCACTGGACCCGTGCC
<b><i>DSG1</i></b>	NM_001002939	CCCAGCAGCGATGAAGTGGCA	TCACGACAGGCTGCAGCGAA
<b><i>DSP</i></b>	XM_545329	TTCTGCAGGAGGAGGGCACCC	GTGGCCTTCAGGCAGTGAGC
<b><i>FCGR3A</i></b>	XM_536141	TGGCTGCACAATGGGAGACCCAT	GAGGGACCTGGAGCAAGAGCCA
<b><i>FLG2</i></b>	XM_540329	TGGCACACTGAGCAAGGATGAGC	GCTGAGAACCTTGTGAGGCCA
<b><i>IL13RA2</i></b>	NM_001003075	TGGAAACCTGGCATGGGTGTCC	TCTGCTGAATGGTCCAAGCCCTCA
<b><i>IL18BP</i></b>	NM_001048018	GCCTCTCCTGGCTCCGGACAA	CCGACCTGGGAGGTGCTCGA
<b><i>IL33</i></b>	NM_001003180	TTTGCTGCATGCCAACACGAGG	AGGAAGAAGGCCTGGCTGGCAA
<b><i>KPRP</i></b>	ENSCAFT000000 20644	AAGTCCCTGTCCACGTCTGCT	CGTGGCTGGAAATTACGCT
<b><i>LOC476953</i></b>	XM_534152	CAGCACCAGCATCCCAGCTCC	CCCGTGTGGATGGCACT
<b><i>OCLN</i></b>	NM_001003195	GCTCTGGGATCCTGCTCGCT	CGTGCATGTCCCCACCGTACAC
<b><i>PPARA</i></b>	NM_001003093	AAAGCCGGGTCATCCTCGC	GCGCACCTCTGCCCTTGT
<b><i>SOCs3</i></b>	NM_001031631	TGAACGCAGTGTGCAAGTC	AGCGTGAAGAAGTGGCGCTGG
<b><i>SPINK5</i></b>	NM_001025397	GCGTGGCCCAGATGGCAAGA	GCCACCACCGTGGAACTGT
<b><i>TGMI</i></b>	NM_001003079	CGGGTGGCAAGTGGTAGACGC	TGGATTCCACAGAGCAGGGGCC

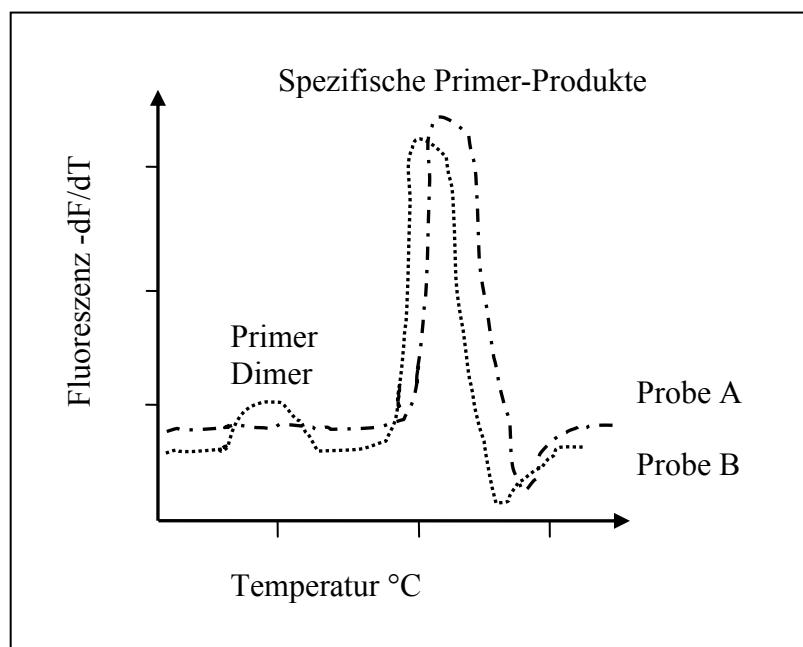
\*Referenz Gen

Die Konzentration jeder Primer-Lösung wurde mit Hilfe eines Spektro-Photometers (Nanodrop 1000, Peqlab Biotechnologie GmbH) gemessen und mit Tris-EDTA-Puffer-Lösung (TE) auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Die Primer-Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 10 pmol/µl wurden durch Verdünnung von 10 µl der Stocklösung (100 pmol/µl) mit 90 µl TE hergestellt.

Zur Kontrolle der Spezifität der Primer wurden die Primer-Produkte sequenziert und gegen die Datenbank von NCBI geblastet.

### 3.2.13.3. qPCR

Zwar beruht die qPCR auf den Prinzipien der PCR, jedoch erlaubt sie es zusätzlich, die entstandene DNA zu quantifizieren. Zum Nachweis der doppelsträngigen DNA wurde SYBR Green, ein sich in die DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, verwendet. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem PCR-Zyklus ermittelt und nimmt proportional zur Menge an PCR-Produkt zu. Um unspezifische Signale auszuschließen (Primerdimere oder unspezifische PCR-Produkte), wurde eine Schmelzkurvenanalyse der Produkte durchgeführt (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse**

Unspezifische Produkte (hier nicht dargestellt) unterscheiden sich wie die Primer-Dimere in der Schmelztemperatur vom eigentlichen Amplikon

Für die Durchführung wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR (Applied Biosystem) verwendet. Das Ansetzen der Reaktionsgemische wurde mit einem Pipettierroboter durchgeführt (MultiPROBE II, PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

Durchführung:

Zunächst wurde aus verschiedenen Reagenzien ein Reaktions-Mix für jedes Primer-Paar hergestellt und anschließend mit dem cDNA-Template vermischt (siehe Tabelle: 12).

**Tabelle 12: Pipettierschema eines einzelnen Ansatzes der qPCR**

<b>Komponenten Reaktions-Mix</b>	<b>µl</b>
2x Power SYBR Green PCR Master Mix1	10
Sample (cDNA)	1
<b>Volumen 1</b>	<b>11</b>
Forward Primer (4 pmol)	0,4
Reverse Primer (4 pmol)	0,4
Nuclease free water	8,2
<b>Volumen 2</b>	<b>9</b>
<b>Gesamtvolumen (1+2)</b>	<b>20</b>

Jeweils 11 µl des Reaktions-Mix mit cDNA wurden in eine 48-Loch qPCR-Platte pipettiert. Anschließend wurde 9 µl Primerpaar-Wasser-Gemisch hinzugegeben und die beiden Komponenten vorsichtig vermischt. Abschließend wurde die Platte mit einer durchsichtigen selbsthaftenden Folie luftdicht verschlossen, gemischt (Vortex-Genie 2) und bei 3000 x g für 10 s abzentrifugiert (CS-15R Centrifuge, Beckmann Coulter GmbH).

Da es sich bei der verwendeten Polymerase um eine HotStart-Polymerase handelte, welche durch einen Erhitzungsschritt aktiviert werden muss, wurde der Lauf mit der dazu gehörigen Software (qPCR StepOne Software V 2.2.2.) und dem folgenden Protokoll im qPCR-Gerät (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystem) gestartet.

**Tabelle 13: Reaktionsbedingungen der qPCR**

Phase	Temp.	Zeit	Wdh der Phasen	Funktion
Phase 1	90°C	10 min	1 x	Initiale Aktivierung der Polymerase
	90 °C	15 s		Denaturierung
Phase 2	60 °C	1 min	40 x	Annealing und Elongation
	95 °C	15 s		
Phase 3	60 °C	1 min	1 x	Schmelzkurve
	95 °C	15 s		

### 3.2.13.4. Auswertung

Die Auswertung der qPCR-Läufe erfolgte durch Schmelzkurven-Analyse und einer relativen Quantifizierung des Amplikons mittels  $\Delta C_T$ -Methode. Zur einheitlichen und vergleichbaren Erhebung von Expressionsdaten wurde der  $C_T$ -Wert („cycle threshold“) in der exponentiellen Phase ermittelt. Der  $C_T$ -Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenz über das Grundrauschen (Threshold) ermittelt wird (siehe Abb. 7). Geringe Ausgangsmengen an Template führen zu einem späteren Erreichen der exponentiellen Phase, zum späteren Übersteigen des Hintergrundrauschens und somit auch zu höheren  $C_T$ -Werten. Es besteht also ein umgekehrtes Verhältnis zwischen mRNA Menge in der Probe und ihrem  $C_T$ -Wert.

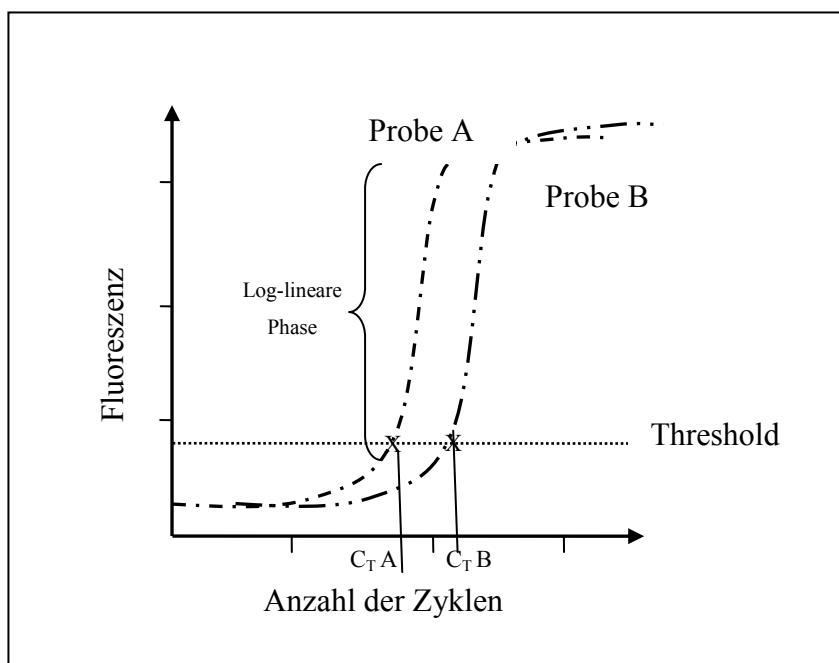


Abbildung 7: Schematische Darstellung von qPCR Reaktionskurven

Dargestellt sind qRT-PCR-Kurven von zwei unterschiedlichen Proben. Probe A enthält ursprünglich mehr cDNA, so dass pro Zyklus mehr Amplikons entstehen und der Threshold (Fluoreszenznachweisgrenze) nach weniger Zyklen erreicht wird als der von Probe B. Daher ist der C<sub>T</sub>-Wert von Probe A auch kleiner als der von Probe B.

Die Normalisierung der C<sub>T</sub>-Werte erfolgte auf das geometrische Mittel C<sub>T</sub>-Werte der drei Referenz-Gene *RPL13A*, *LOC479750* und *UBB* in der jeweiligen Probe. Als Referenzgene eignen sich solche Gene, deren Expression sich zu keinem Zeitpunkt signifikant ändert und die somit als Basisexpressionswerte angenommen werden. Für die Normalisierung wurde das geometrische Mittel der C<sub>T</sub>-Werte der Referenzgene vom C<sub>T</sub>-Wert der Probe subtrahiert.

$$\Delta C_T = \text{Proben-}C_T - \text{geometrisches Mittel (RPL13A-, LOC479750-, UBB-}C_T)$$

Anschließend wurden die  $\Delta C_T$ -Werte entsprechend den Array-Expressionsdaten einer statistischen multifaktoriellen Analyse mittels Limma in R unterzogen und die Expressionsänderungen mit den Array-Ergebnissen verglichen. In R wurden dieselben Befehle verwendet wie für die Analyse der Array-Daten (Siehe CD mit R-Script multifaktoriell Array, multifaktoriell qPCR).

Zum Erhalt direkt proportionaler positiver Werte zur Darstellung der  $\Delta C_T$ -Werte im Vergleich mit den Array-Expressionswerten wurden diese von der Zahl 20

subtrahiert,  $20 - \Delta C_T$ .

### 3.2.13.5. Bestätigung der Primer-Spezifität

Nach der qPCR muss sichergestellt werden, dass es sich bei dem Amplifikat tatsächlich um das gewünschte Produkt handelt. Um die Primer zu überprüfen, wurde ein Testlauf mit einer gepoolten Probe (aus 2  $\mu$ l jeder Probe) durchgeführt. Die Mikrodialyse der Primer-Produkte (DNA) wurde in Petrischalen mit einer Mikrodialysemembran von Millipore durchgeführt. Hierfür wurde die Membran auf das in der Petrischale befindliche 0,25x TE-Puffer (10 $\mu$ l TE und 30  $\mu$ l Wasser) gelegt, die Probe vorsichtig auf die Membran pipettiert und zur Aufreinigung für 30 min in einer Petrischale dialysiert. Die qPCR-Produkte wurden elektrophoretisch mittels Bioanalyzer aufgetrennt. Dabei liefen ein „lower“-Marker (15bB) und ein „higher“-Marker (1500 bp) mit dem Primer-Produkt mit. Die Negativkontrolle wurde mit Wasser durchgeführt. Die im Elektropherogramm ermittelte Größe des PCR-Produkts wurde mit der vom NCBI Primer-BLAST-Tool errechneten verglichen. Weiterhin konnte im Elektropherogramm ermittelt werden, ob nur ein spezifisches oder zusätzlich weitere unspezifische Amplikons enthalten waren.

Zur eindeutigen Bestätigung der Spezifität der Primerpaare wurde das entsprechende Amplikon sequenziert. Hierfür wurde das aufgereinigte PCR-Produkt auf etwa 10ng/5 $\mu$ l eingestellt (mit TE) und 6 $\mu$ l dieser Lösung in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Als Sequenzier-Primer wurden von dem in der PCR eingesetzten Primerpaar die Forward-Primer in einer Konzentration von 3,5 pmol/ $\mu$ l verwendet. Die Sequenzierung über das Kettenabbruchverfahren (Sanger-Methode) wurden anschließend von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Helmut Blum (LAFUGA) durchgeführt.

### 3.2.14. Histologie

Um festzustellen, ob und wie sich die Zellpopulation in der Haut der sensibilisierten Hunden während der Einwirkzeit der Allergenlösung im Vergleich zur Kochsalzlösung bzw. zur unbehandelten Haut verändert, wurden von den Biopsien bei Studienbeginn (Basisbiopsien von unveränderter Haut) und von den Biopsien, die sechs und 24 h nach Auftragen von Allergenpaste bzw. Kochsalzlösung entnommen wurden, jeweils ein Teilstück zur Herstellung histologischer Präparate verwendet. Die Fixation der Schnitte erfolgte im Novartis

Centre de Recherche Sante Animale, Saint-Aubin FR, in der Schweiz. Die weitere Verarbeitung zur Herstellung der gefärbten Präparate wurde durch das Institut für Tierpathologie der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt. Die Schnitte wurden Hematoxylin-Eosin (HE) und Giemsa gefärbt. In der HE-Färbung wurden die Rundzellen ausgezählt und evaluiert, ob sich die Zellzahl je nach Tiergruppe, Behandlung und Biopsiezeitpunkt ändert. In der Giemsa-Färbung sollten die Mastzellen ausgezählt werden. Für die Lymphozyten wurde außerdem eine immunhistochemische Färbung mit Hilfe eines polyklonalen CD3-Ak angefertigt.

### **3.2.14.1. Fixation**

Die Hautbiopsien wurden sofort nach der Entnahme und dem Herausschneiden eines etwa zwei Millimeter breiten Streifens, welches auf einem Stück Holz gelegt wurde, in 10%iges Formalin (Otto Fischar GmbH & Co. KG) verbracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **3.2.14.2. Paraffineinbettung und Schnittherstellung**

Die Entwässerung und Einbettung in Paraffin (SAV LP) erfolgte maschinell nach folgendem Schema in einem Einbettungsautomaten (Histomaster 2050/DI, Bavimed):

#### **Dehydrierung:**

Spülen mit Aqua dest.:	30 min
Ethanol 70%:	2 x 1,5 h
Ethanol 96%:	2 x 1,5 h
Ethanol 100%:	2 x 1,5 h
Xylol (intermedium):	2 x 30 min
Xylol:	1,5 h

#### **Einbettung:**

Paraffin bei 60 °C:	2 h
Paraffin bei 60 °C:	3 h

Danach wurden die Gewebeproben zur Herstellung von Paraffinblöcken an einer

Station (TBS 88 Paraffin Embedding System, Medite Medizintechnik) ausgegossen. Von den Blöcken wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM 315 Microm) 4–6 µm dicke Schnitte hergestellt. Nach dem Strecken der Schnitte im 40 °C warmen Wasserbad (Daglef Platz) wurden diese auf entfettete Objektträger (VWR International) aufgezogen. Im Anschluss trockneten die Schnitte für mindestens 24 h bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG).

### **3.2.14.3. Färbung der Paraffinschnitte**

Vor dem Färben wurde das Paraffin mittels Xylol (Isomenrengemisch, SAV LP) aus den Schnitten entfernt. Dazu wurden die Schnitte für 20 min in Xylol gestellt. Anschließend folgte die Rehydrierung der Schnitte durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in einer absteigenden Ethanolreihe: 2x 100%, 2x 96%, 1x 70%, Aqua dest.

#### **3.2.14.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)–Färbung**

In dieser Routinefärbung wurden die Schnitte auf allgemeine pathomorphologische Merkmale hin ausgewertet. Die Färbung wurde für jedes Präparat wie folgt durchgeführt:

#### **Färbung:**

Mayers Hämalaun:	4 min
Wässern unter fließendem	5 min
Leitungswasser:	
Eosin 1%:	ca. 2 s
Aqua dest. Spülung:	3 s

#### **Dehydrierung:**

Aqua dest.:	1 s
Ethanol 70 %:	1 s
Ethanol 96 %:	2 x 1 s
Ethanol 100 %:	2 x 1 s
Xylol in mehreren Portionen	insgesamt 1 min
(Isomerengemisch):	

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Eukitt (Roti®-Histokitt II, Carl Roth® GmbH & Co. KG) eingedeckt.

### **3.2.14.3.2. Giemsa-Färbung**

In der Färbung nach Giemsa stellen sich Zellkerne unterschiedlich blau, eosinophile Granula (z.B. eosinophilen Granulozyten) rot und Mastzellgranula rotviolett dar.

Die Färbung der Präparate erfolgte nach diesem Schema:

#### **Färbung:**

Giemsa-Gebrauchslösung bei 65 °C: 1 h

Aqua dest. Spülung: 3 s

Differenzierung in Essigsäure 0,5 % 1 s

bis zum Farbumschlag von Blau nach

Rot:

Ethanol 96 %: 2 s

2 x Ethanol 100 %: je 2 s

#### **Dehydrierung:**

Aqua dest.: 1 s

Ethanol 70 %: 1 s

Ethanol 96 %: 2 x 1 s

Ethanol 100 %: 2 x 1 s

Xylol in mehreren Portionen insgesamt 1 min

(Isomerengemisch):

Zuletzt wurden die Schnitte mit Eukitt (Roti®-Histokitt II, Carl Roth® GmbH & Co. KG) eingedeckt.

### **3.2.14.4. Immunhistochemie**

Nach Einbettung in Paraffin und Herstellung der Schnitte (s. 3.2.12.2. Paraffineinbettung und Schnittherstellung), wobei die Schnitte für die Immunhistochemie auf silanisierte Objektträger (StarFrost, VWR International) aufgezogen wurden, musste das Paraffin aus den Schnitten entfernt werden.

Hierfür wurden die Schnitte 20 min in Xylol gestellt. Im Anschluss folgte die Rehydrierung durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 70 %, Aqua dest.) und das Demaskieren der Schnitte (Mikrowelle: 10 mM Citratpuffer pH 6,0 bei 700 Watt für 2 x 10 Minuten). Alternativ zur Behandlung mit der Mikrowelle wurden die Schnitte zunächst in einer Target-Retrieval-Lösung (pH 9,9, DAKO Diagnostika GmbH) im vorgewärmten Wasserbad 20 min bei 95 – 98 °C behandelt. Anschließend kühlten die Schnitte 20 min bei Raumtemperatur ab und wurden vor der weiteren Bearbeitung kurz in Aqua dest. gespült.

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe des polyklonalen CD3-Ak A045201 (DAKO Diagnostika GmbH) aus dem Kaninchen dienten dem Nachweis spezifischer Ag von T-Zellen in der Haut von Hunden mit atopischer Dermatitis. Zur Sichtbarmachung der Ak-Bindung wurde der Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain: PK-6100, Linaris Biologische Produkte GmbH) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für die immunhistochemische Färbung wurde dann weiter wie folgt verfahren:

Blockierung der endogenen Peroxidase durch 1%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	15 min
Spülen in TBS (0,05 M, pH 7,6):	10 min
Blockierung der unspezifischen Bindungsstelle im Gewebe mit Ziegennormalserum, 1:10 verdünnt mit TBS:	30 min
Inkubation (Raumtemperatur) mit dem Primär-Ak 1:100 verdünnt mit TBS:	1 h
Spülen in TBS:	10 min
Inkubation (Raumtemperatur) mit dem Sekundär-Ak, 1:200 verdünnt mit TBS:	1 h
Spülen in TBS:	10 min
Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex, 1:100 verdünnt mit TBS:	30 min
Spülen in TBS:	10 min
Chromogenreaktion mit Substrat DAB-Lösung:	5 min
Spülen in fließendem Leitungswasser:	5 min
Gegenfärben mit Mayers Hämalaun:	1 min

Spülen in fließendem Leitungswasser: 5 min

**Dehydrierung:**

Aqua dest.:	1 s
Ethanol 70 %:	1 s
Ethanol 96 %:	2 x 1 s
Ethanol 100 %:	2 x 1 s
Xylol in mehreren Portionen (Isomerengemisch):	insgesamt 1 min

**3.2.15. Auswertung**

Alle Schnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Wenn sich auf einem Objektträger mehrere histologische Schnitte der Hautbiopsie befanden, wurde ein repräsentativer Schnitt ausgewählt. Mit der an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (ColorView III, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) wurden die entsprechenden Bereiche fotografiert und im analySIS Programm dokumentiert. Anschließend wurde die Fläche von Dermis und Epidermis des Schnittes mittels analySIS Five in der Einheit  $\mu\text{m}^2$  bestimmt und in der HE-Färbung Rundzellen ausgezählt. Um zu verhindern, dass einzelne Zellen mehrfach gezählt werden, wurden bereits erfasste Zellen markiert. Am Ende der Auszählung wurde mit Hilfe des Programms analySIS FIVE Software (Olympus Imaging Europa GmbH) die Summe der markierten Zellen ermittelt. Die Fläche des Schnittes und die bestimmte Zahl an Zellen wurde in eine Microsoft Excel Tabelle übertragen und die Zellzahl pro Fläche ( $\text{mm}^2$ ) ermittelt. In der Giemsa-Färbung sollten Eosinophile und Mastzellen analog zu den Rundzellen in der HE-Färbung ausgewertet werden. Allerdings unterlag die Intensität der Färbung zwischen den Präparaten großen Schwankungen, wodurch viele Präparate nicht ausgewertet werden konnten, da sie nicht mit den Anderen vergleichbar waren. Die histologischen Schnitte wurden abgedeckelt und erneut angefärbt, was die Qualität der Färbung und damit die Auswertbarkeit jedoch nicht verbesserte. Zusätzlich wurde ein immunhistochemischer Nachweis von T-Lymphozyten in den Präparaten versucht, wofür sich die Präparate allerdings als nicht geeignet erwiesen. Aufgrund der kleinen Gewebemenge pro Biopsie, die für die histologische Untersuchung zur Verfügung stand, konnten keine weitere Schnitte

und Färbungen angefertigt werden.

Die in der HE-Färbung ausgezählte Zellzahl pro Fläche ( $\text{mm}^2$ ) wurde statistisch mit Hilfe eines Kruskal Wallis-Tests über alle Gruppen ausgewertet, um zu sehen, ob sich signifikante Unterschiede in der Zellzahl pro Fläche in Abhängigkeit von der Behandlung einer Tiergruppen (allergisch/nicht-allergisch) ergeben. Es handelt sich um eine nicht-parametrische Varianzanalyse.

## IV. ERGEBNISSE

### 4.1. Hunde

Es nahmen insgesamt zwölf Hunde der Rasse Beagle an der Studie teil. Sie waren Eigentum des Novartis Centre de Recherche Sante Animale, Saint-Aubin FR, Schweiz. Sechs dieser Hund wurden mittels Hausstaubmilbenallergen (*D. farinae*) sensibilisiert. Die gesunde Kontrollgruppe setzte sich aus sechs nicht-sensibilisierten Tieren zusammen.

#### 4.1.1. Altersverteilung

Von den sechs Hunden der Kontrollgruppe waren zwei Hunde zum Zeitpunkt der Probennahme drei Jahre und vier der Hunde zwei Jahre alt. Das Durchschnittsalter lag bei 2,3 Jahren. Das Alter aller allergischen Hunde lag bei zwei Jahren.

#### 4.1.2. Geschlechtsverteilung

Von den sensibilisierten Hunden waren vier Hunde männlich und zwei weiblich. Unter den nicht-sensibilisierten waren vier Hündinnen und zwei Rüden.

#### 4.1.3. Auswertung der klinischen Befunde

Zu Beginn der Studie wurde bei allen Hunden eine Allgemeinuntersuchung durchgeführt. Diese war bei allen zwölf Hunden unauffällig. Weiterhin wurde im Rahmen der Studie nach dem Scheren der Haut und vor jeder Biopsie-Entnahme die Haut der Hunde bezüglich makroskopischer Veränderungen mit Hilfe eines Local-Lesion-Scores beurteilt (LSS) (siehe auch Tab. 2).

Die Haut aller Hunde wurde nach dem Scheren, vor der Basisbiopsie- und vor der sechs Stunden Biopsie-Entnahme bei allen Tieren als unauffällig (LSS: -) beurteilt. Die Haut der nichtallergischen Hunde zum Probenzeitpunkt 24 h nach Auftragen der Lösungen war ebenfalls unauffällig (LSS: -). In der Gruppe der allergischen Tiere wiesen drei der sechs Tiere geringgradige makroskopische Veränderungen (LSS: +), an der Stelle an der das Allergen aufgetragen worden war auf. Die Hautbereiche mit der Kochsalzlösung waren ebenfalls alle unauffällig (LSS: -).

## 4.2. Hautbiopsien

### 4.2.1. Isolierung und Analyse von RNA aus den Hautbiopsien

Die isolierte RNA (siehe 3.2.5) wurde spektralphotometrisch im NanoDrop 1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH) (siehe 3.2.6.) und mikroelektrophoretisch im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) (siehe 3.2.7.) analysiert.

Es konnte ausreichend Gesamt-RNA aus allen Proben gewonnen werden. Bei der photometrischen Analyse der RNA konnten sowohl der 260/280 Quotient ( $\geq 1,7$ ) als auch der 260/230 Quotient ( $\geq 2,0$ ) und somit die Reinheit der RNA als gut beurteilt werden.

Die RIN lag zwischen 3,3 und 8,6. Der Median lag bei 7,8. Einzig die RIN von Probe 14 lag bei 3,3, alle anderen Proben hatten eine RIN von 7,0-8,6. Somit konnte die RNA-Qualität aller Proben außer der von Probe 14 ebenfalls als gut bewertet werden.

Die Tabelle mit den photometrischen und mikroelektrophoretischen Ergebnissen der isolierten mRNA sind im Anhang 9.4. aufgelistet.

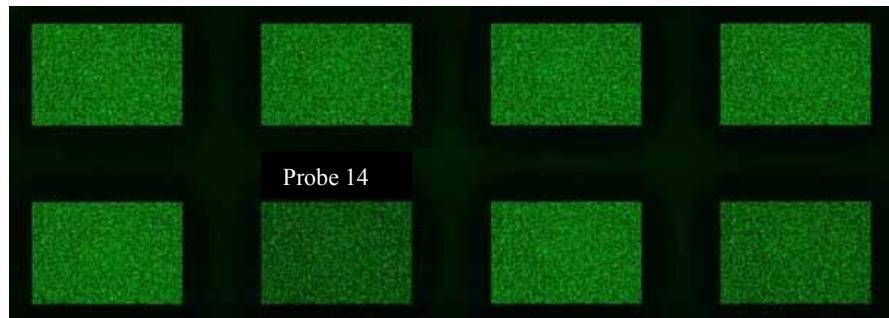
### 4.2.2. Genexpressionsanalysen mittels Agilent-Microarray-Technologie

Die Konzentration der Cy3-markierten cRNA und die Einbaurate des Cy3-dCTP wurden mit dem NanoDrop 1000 gemessen und für die Hybridisierung auf 600 ng/19  $\mu$ l eingestellt (siehe 3.2.8.5). Die cRNA-Ausbeute lag bei allen Proben über 1,65  $\mu$ g und die spezifische Aktivität über 6,0 pmol Cy3/ $\mu$ g cRNA (Anhang 9.5). Die cRNA Ausbeute von Probe 14 lag mit 1,75  $\mu$ g nur knapp über dem angegebenen Grenzwert von 1,65  $\mu$ g.

#### 4.2.2.1. Scannen der Microarrays und Auswertung mittels Feature Extraction Software

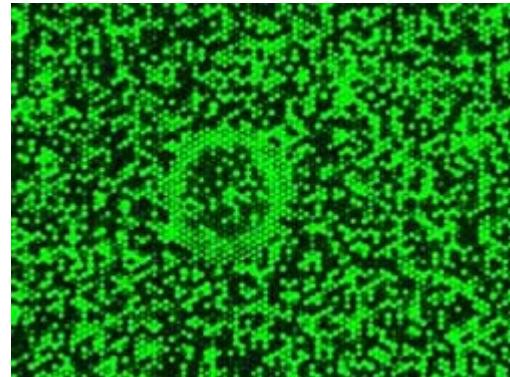
Nach dem Waschen wurden alle Microarrays erfolgreich gescannt (siehe Punkt 2.10.9). Im Anschluss daran wurden die Abbildungen der Fluoreszenzintensität der Microarrays auf grobe und anschließend auf feinere Artefakte (wie Flecken von Tropfen oder Staubteilchen) (siehe Abb. 9) sowie auf Abweichungen in der Fluoreszenzintensität untersucht (siehe Abb. 8).

Die Microarrays von Proben, welche größere Defekte/Artefakte aufwiesen, wurden wiederholt.



*Abbildung 8: Microarray-Scan-Bild*

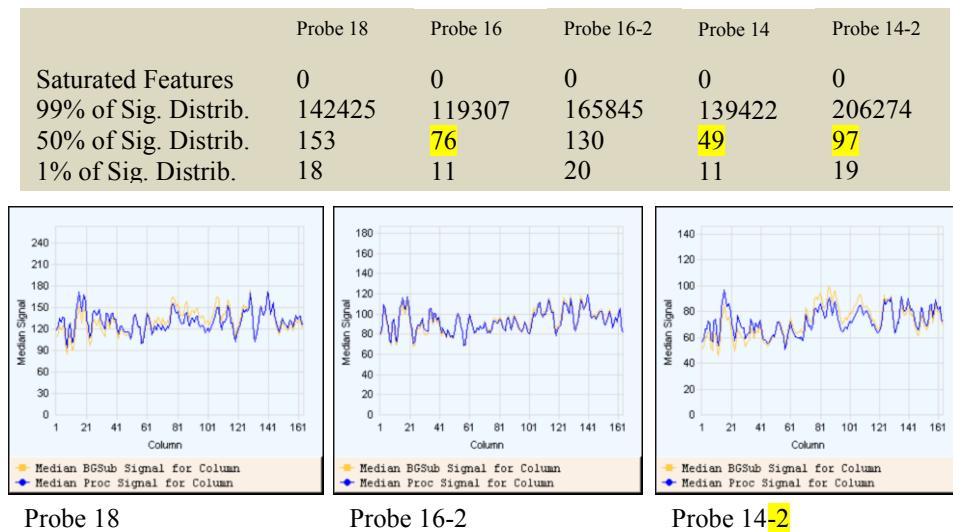
In diesem Scan Bild ist zu sehen, dass der zweite Array (Probe 14) von links in der unteren Reihe ein schwächeres Fluoreszenzsignal hat als die übrigen Arrays



*Abbildung 9: Eines der acht Array-Scan-Bilder vergrößert*

In dieser Abbildung ist ein Artefakt zu sehen, möglicherweise von einem Tropfen. Die Ergebnisse könnten dadurch verfälscht werden. Aus diesem Grund wurde das Experiment wiederholt.

Zeitgleich mit dem Scannen wurde von der Feature Extraction Software 10.7.3.1 mit Hilfe von internen Kontroll-Probes die Reproduzierbarkeit geprüft und technische Mängel aufgezeigt. Dabei zeigte Probe 14 bei der Signalstärke ebenfalls Defizite (Abb. 10).



**Abbildung 10: Verteilung der Signalstärke über den Array-Querschnitt**

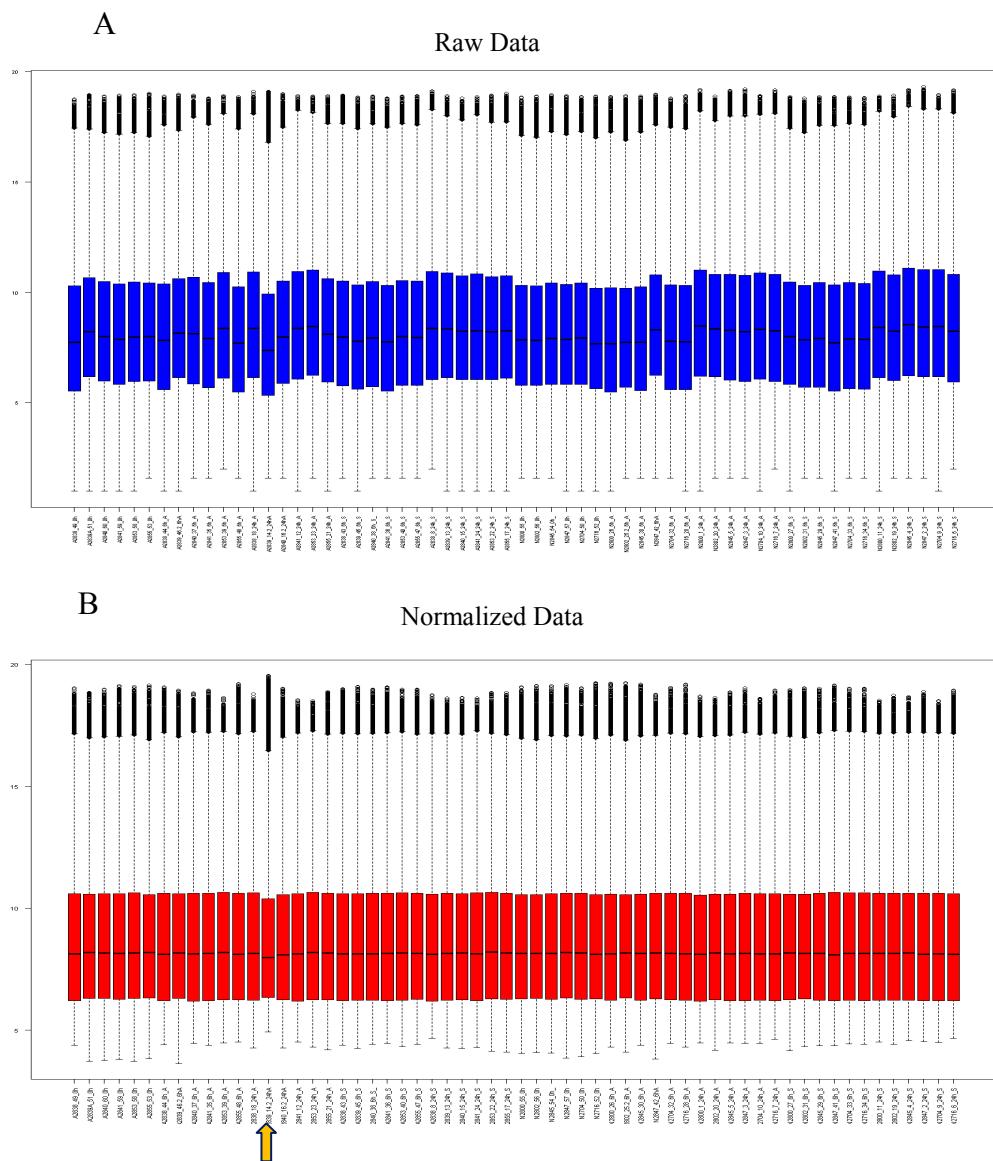
Dargestellt sind die Signalstärke in einer normalen hybridisierten Probe (Probe 18) sowie eine Probe (Probe 16) mit verminderter Signalstärke, die jedoch bei der Wiederholung in einem anderen Array normale Signalstärke zeigt. Weiterhin ist eine Probe (Probe 14) mit niedriger Signalstärke dargestellt, deren Signalstärke auch beim zweiten Durchgang keine normale Signalstärke zeigt. Die auffälligsten Werte sind gelb unterlegt.

#### 4.2.2.2. Daten-Visualisierung

Die Datenvisualisierung ermöglicht eine erste optische Abschätzung der Homologie innerhalb eines Datensets. Weiterhin können Unterschiede zwischen verschiedenen Proben und Probengruppen dargestellt werden.

Vor und im Anschluss an die VSN-Normalisierung erfolgte eine graphische Darstellung der Array-Daten in „R“. Bei den Einzelvergleichen wurden SD-Plot (SD=standard deviation), Box-plot (Rohdaten und nach Normalisierung), Distance-plot und Heatmap zur Visualisierung herangezogen. Die Daten der Multifaktoriellen Analyse wurden nach der statistischen Analyse als Heatdiagramm dargestellt.

Vor und nach der Normalisierung wurde die Verteilung der Expressionswerte mit einem Boxplot dargestellt (Abb. 11). Die Lage der blau eingefärbten „Box“ zeigt, dass sich die Häufigkeitsverteilung der Expressionswerte in allen Proben unterscheidet. Nach der Normalisierung ist die rote Box annähernd bei allen gleich groß und umfasst weitgehend denselben Expressionsbereich. Dies zeigt, dass mittels VSN-Normalsierung die globalen Signalintensitäten in den Expressionsprofilen angeglichen werden konnten. Innerhalb der normalisierten Daten zeigt sich jedoch eine Box, die von den anderen etwas abweicht (Probe 14).



*Abbildung 11: Boxplots der log2- transformierten ProcessedSignals (A) und der VSN-normalisierten Werte (B) der 60 Proben im Vergleich*

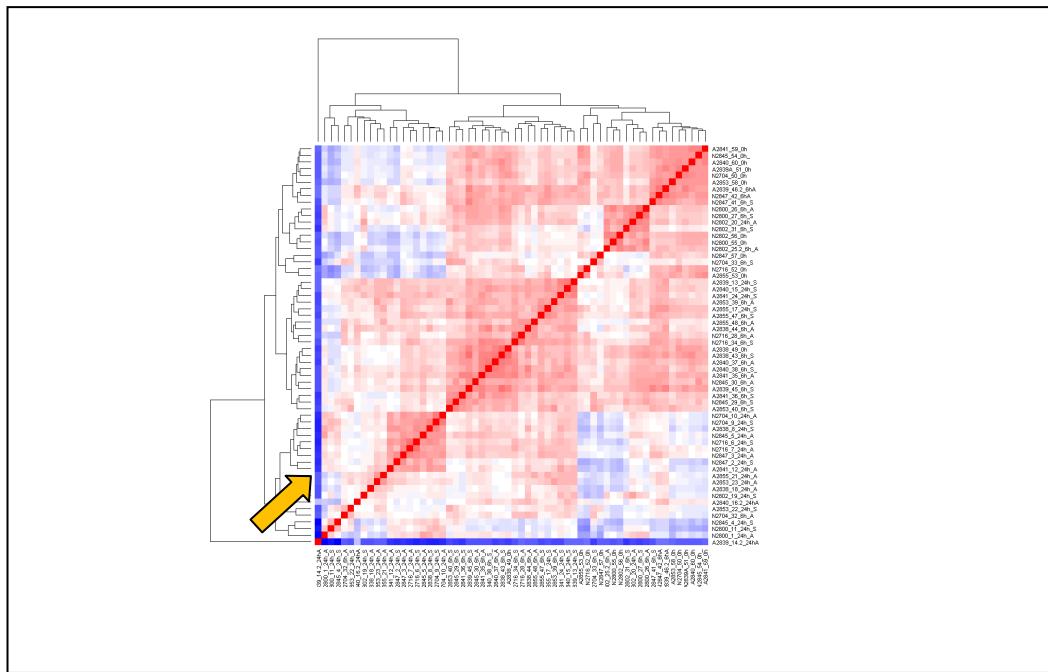
A: Proben vor der Normalisierung

B: Proben nach VSN-Normalisierung

Die vertikale schwarze Linie zwischen den „Whiskers“ gibt den Umfang der gemessenen Signalintensitäten wieder, Ausreißer werden durch die schwarzen Kringel dargestellt. Die Box umfasst 50 % der Daten, die sich im mittleren Signalintensitätsbereich befinden. Die Box beginnt am unteren Quartil, d.h. die kleinsten 25% der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Kennwert. Das Ende der Box markiert das obere Quartil; 75% der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert. Der vertikale Strich innerhalb der Box ist der Median.

In der Heatmap (Abb. 12) sind die Proben in einem Koordinatensystem aufgetragen, es stehen sich also immer zwei Proben gegenüber. Anhand einer Farbkodierung wird die Korrelation des Expressionsmusters dargestellt. Ein Quadrat steht also für die Ähnlichkeit im Expressionsmuster zweier Arrays. Identische Proben werden in roter Farbe dargestellt. Je weniger ähnlich sich die verglichenen Arrays sind, desto schwächer wird das Rot, bis es schließlich ins Blau umschlägt. Somit bedeutet eine blaue Darstellung, dass die jeweiligen Proben ein stark unterschiedliches Expressionsprofil zeigen. Die Daten werden von dem Programm automatisch entsprechend der Ähnlichkeit ihres Expressionsmusters geclustert (gruppiert), da sie ohne festgelegte Gruppierung eingespeist werden. Zusätzlich wird am Rand der Heatmap ein Dendrogramm abgebildet, das die verwandtschaftliche Beziehung der Proben zueinander darstellt. Je näher die Knotenpunkte zueinander liegen, desto ähnlicher sind sich die Proben.

Auch hier unterscheidet sich der Array von Probe 14, dargestellt durch die blaue Farbe (Pfeil in Abb. 12), von allen anderen Arrays. Im Dendrogramm wird ebenfalls deutlich, dass diese Probe keine verwandtschaftliche Beziehung zu den anderen Proben besitzt. Die Knotenpunkte liegen weit auseinander. Solche Arrayproben können die Expressionsdaten schon bei der Normalisierung und anschließend auch bei der statistischen Analyse empfindlich beeinflussen, weshalb diese Probe von der Datenauswertung ausgeschlossen wurde. Alle weiteren Analysen wurden ohne die Daten von Probe 14 durchgeführt. Die VSN-Normalisierung aller Daten untereinander wurde ebenfalls ohne diese Probe wiederholt.



**Abbildung 12: Heatmap aller Proben nach VSN-Normalisierung**

Pfeil: Probe 14

#### 4.2.2.3. Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Um Gene mit signifikanten Expressionsunterschieden identifizieren zu können, wurde mit Hilfe von Limma (linear models for microarray data, siehe 3.2.11) eine statistische Analyse durchgeführt. Das Limit für Signifikanz wurde auf Basis der „False Discovery Rate“ (FDR) von 5 % (0,05) festgelegt. Ein „Fold Change“ (FC) der Expressionsänderung von mindestens 1,5 wurde als Schwellenwert verwendet.

Mit diesen Kriterien und durch anschließendes Zusammenfassen der mehrfach vorkommenden Gene mit Hilfe von Galaxy (siehe 3.2.11.) ergaben sich in den durchgeföhrten Experimenten folgende Anzahlen an differenziell exprimierten Genen:

**Tabelle 14: Übersicht über die Two class unpaired-Analysen**

Basisbiopsie	up	down	Kochsalz	up	down	Allergen	up	down
<b>A0h_vs_N0h</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A_6hSvsN_6hS</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A_6hA_vsN_6hA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
			<b>A_24hSvsN_24hS</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>A_24hAvsN_24hA</b>	<b>709</b>	<b>1239</b>

In der Two class unpaired-Analyse (siehe Tab. 14) wurden die zwei verschiedenen Tiergruppen (Allergisch und Nichtallergisch) mit derselben Behandlungslösung (Kochsalz oder Allergen) zum selben Zeitpunkt (Basisbiopsie, sechs und 24 h nach dem Auftragen) verglichen. Dabei zeigten sich erst 24 h nach Allergeneinwirkung signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen allergischen- und nichtallergischen Tieren. Weder in der Basisbiopsie noch sechs Stunden nach Auftragen von Kochsalzlösung, noch sechs Stunden nach Auftragen von Allergen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Gruppen. 24 Stunden nach Einwirken der Kochsalzlösung wies lediglich ein Gen eine verminderte Expression zwischen den beiden Gruppen auf.

**Tabelle 15: Übersicht über die Two class paired-Analysen**

Allergisch	up	down	Nichtallergisch	up	down
A_6hAvsA_6hS	<b>289</b>	<b>22</b>	N_6hAvsN_6hS	<b>3</b>	<b>0</b>
A24hAvsA24hS	<b>12</b>	<b>1</b>	N24hAvsN24hS	<b>203</b>	<b>516</b>

Beim Vergleich derselben Tiere zum selben Zeitpunkt mit unterschiedlichen Lösungen auf der Haut mittels gepaarter Stichprobenanalyse (siehe Tab. 15) waren bei den allergischen Tieren nach sechs Stunden insgesamt 311 Gene differentiell exprimiert, nach 24 h insgesamt 13. Bei den nichtallergischen Tieren war eine differentielle Genexpression in der Haut erst nach 24 h zu finden (insgesamt 718 Gene). Nach sechs Stunden waren nur drei Gene signifikant unterschiedlich exprimiert.

**Tabelle 16: Übersicht über die Multifactorial paired-Analysen**

Allergen	paired					
	up	down	Kochsalz		up	down
DiffAvsN6A_0h=	<b>0</b>	<b>7</b>	DiffAvsN6S_0h=	(A.S.6h-A.0h)-(N.S.6h- N.0h)	<b>1</b>	<b>10</b>
(A.A.6h-A.0h)- (N.A.6h-N.0h)	<b>557</b>	<b>901</b>				
DiffAvsN24A_0h=			DiffAvsN24S_0h=		<b>337</b>	<b>746</b>
(A.A.24h-A.0h)- (N.A.24h-N.0h)			(A.S.24h-A.0h)-(N.S.24h- N.0h)			

Bei der gepaarten multifaktoriellen-Analyse wurde der Unterschied in der Genexpressionsänderung zwischen Basisbiopsie und dem Sechs- bzw. 24 Stundenwert (also im Verlauf über die Zeit) im Vergleich von Allergikern zur Kontrollgruppe nach Allergenauftrag bzw. Kochsalz untersucht (siehe Tab. 16). Sowohl bei Kochsalz, als auch bei Allergenauftrag war der Unterschied der Genexpressionsänderung nach 24 h im Vergleich zu 0 h am höchsten. Zum Sechsstunden-Zeitpunkt hatte sich im Vergleich zur Basisbiopsie sowohl bei Allergikern als auch bei der Kontrollgruppe nicht viel geändert.

**Tabelle 17: Übersicht über die Multifactorial unpaired-Analysen**

	unpaired	up	down
DiffAvsN6=		<b>6</b>	<b>3</b>
(A.A.6h-A.S.6h)-(N.A.6h-N.S.6h)			
DiffAvsN24=		<b>361</b>	<b>226</b>
(A.A.24h-A.S.24h)-(N.A.24h-N.S.24h)			

Bei der Multifactorial unpaired-Analyse (siehe Tab. 17) wurden die Unterschiede der beiden Tiergruppen (allergisch, nichtallergisch) zu einem bestimmten Zeitpunkt zwischen Allergenauftrag und Kochsalz verglichen (siehe auch Punkt

2.11.3). Um dabei möglichst die Effekte der Allergeneinwirkung herauszufiltern, wurden die Expressionswerte bei Kochsalz-Behandlung zum selben Zeitpunkt von der jeweiligen Gruppe abgezogen. So sollten Genexpressionsänderungen aufgrund von Biopsieentnahme und mögliche Effekte aufgrund systemischer Reaktionen so weit wie möglich ausgeblendet werden. Auch bei dieser Auswertung zeigten sich die meisten Unterschiede 24 h nach Behandlung der Haut. Dabei zeigten insgesamt 587 Gene signifikante Unterschiede in der Genexpressionsänderung zwischen allergischen und nichtallergischen Hunden. Die Ergebnisse der statistischen Analysen zeigten, dass es Effekte über die Zeit sowohl bei allergischen-, als auch bei nichtallergischen Tieren gab.

Da zwischen den allergischen Hunden und den Kontrolltieren sowohl zum Zeitpunkt der Basisbiopsie als auch sechs Stunden nach Auftragen der Lösungen kaum signifikante Unterschiede in der Genexpression nachweisbar waren, konzentrierte sich die weitere Auswertung auf einen Vergleich zum Zeitpunkt 24 h für die bioinformatischen Analysen. Da das Ziel darin bestand, möglichst die Wirkung darzustellen, welche das Allergen bei den allergischen im Vergleich zu den nichtallergischen Tieren auslöst, wurde für die bioinformatischen Analysen der Vergleich  $\text{DiffAvsN24} = (\text{A\_24h\_A} - \text{A\_24hS}) - (\text{N\_24h\_A} - \text{N\_24h\_S})$  der Multifactorial unpaired-Analyse (siehe Tab. 17) herangezogen.

Eine komplette Auflistung aller differentiell exprimierten Gene mit zugehörigem FC ist der beiliegenden CD in Tabelle „signifikante Gene: Vergleiche“ beigefügt.

#### **4.2.3. Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung**

##### **4.2.3.1. Zuordnung differentiell exprimierter Gene der Multifactorial unpaired- Analyse mittels DAVID-Analyse**

Mit Hilfe des Webtools DAVID konnten die differentiell exprimierten Gene der Multifactorial unpaired-Analyse (Diff AvsN\_24h) funktionellen Klassen mit entsprechenden biologischen Funktionen zugeordnet werden.

In der folgenden Tabelle sind Beispiele besonders interessanter Gen-Cluster der differentiellen Gene mit verminderter Genexpressionsänderung bei den allergischen Hunden (Allergen vs. Kochsalz) aufgeführt. Sie clustern grob in Gruppen, die mit Hautbarriere (Keratinisierung, Zell-Differenzierung und Zell-zu-Zell-Verbindungen) assoziiert sind.

**Tabelle 18: Ausgewählte Ergebnisse der Gene mit verminderter Genexpressionsänderung aus der Multifactorial unpaired-Analyse (DiffAvsN\_24h) aus der Functional Annotation Cluster-Analyse mit DAVID**

Functional Annotation Cluster Description <sup>1</sup>	Enrichm. Score <sup>2</sup>	Genes <sup>3</sup>
Epidermis development (14, 10.2) same Genes as: ectoderm development (14, 9.52); epidermal cell differentiation (8; 15.03) same Genes as: epithelial cell differentiation (8; 7.90); keratinocyte differentiation (7, 14.35), epithelium development (9.36); cornified envelope (4; 24.72); keratinization (3; 9.81)	4.56	15
Cytoskeleton (25; 2.46)	3.22	33
Cell junction (14; 3.68); anchoring junction (8; 6.32), cell junction (11; 3.61), apical junction complex (6; 8.24)→ same Genes as: apicolateral plasma membrane (6;8.00); cell-cell junction (7;5.01); adherens junction (6; 5.26); desmosome (3; 20.40), tight junction (3;6.44)	2.22	14
Sphingolipid metabolism (3; 10.03)	1.13	3

<sup>1</sup> basiert auf den aussagekräftigsten „terms“

<sup>2</sup> geometrisches Mittel (in -log10) der P-Werte der Gruppen des entsprechenden „annotation Clusters“

<sup>3</sup> Gesamtanzahl der in einem Cluster enthaltenen Gene

in Klammern: Anzahl an Genen und der „fold enrichment of the functional term“

Bei den differentiellen Genen, welche bei den allergischen Hunden nach Allergenbehandlung im Vergleich zu Kochsalz einen höheren FC als die nicht allergischen Hunde hatten, kam es nahezu ausschließlich zu Clustern, welche mit Entzündung, Immunantwort, und Wundheilung in Verbindung gebracht werden können. Die ausführlichen Listen mit den Ergebnissen der DAVID-Analysen können der beigefügten CD entnommen werden (siehe Ordner DAVID differentiell reguliert up\_down).

#### 4.2.3.2. Ergebnisse der KEGG MAPPER Pathway-Analyse

Die humanen und die caninen Gene IDs, die bei den allergischen Hunden mit Allergen (DiffAvsN\_24h) einer vermehrten (up) bzw. einer verminderen (down) Genexpressionsänderung unterlagen, wurden getrennt in die KEGG MAPPER Pathway-Analyse eingegeben. Dadurch sollten Gene, denen nur die Gene ID einer

Spezies zugeordnet waren, ebenfalls in die Pathway-Analyse mit einbezogen werden. In folgender Tabelle sind für die Thematik dieser Arbeit zutreffende/interessante Pathways aufgeführt. Teilweise wurden nicht identische Pathways angegeben.

**Tabelle 19: Ausgewählte Pathways der KEGG MAPPER Pathway-Analyse mit caninen und humanen GeneID's**

up	Canis familiaris	Homo sapiens
	cfa04145 Phagosome - Canis familiaris (15)	hsa04145 Phagosome - Homo sapiens (15)
	cfa04060 Cytokine-cytokine receptor interaction - Canis familiaris (15)	hsa04060 Cytokine-cytokine receptor interaction - Homo sapiens (13)
	cfa04062 Chemokine signaling pathway - Canis familiaris (13)	hsa04062 Chemokine signaling pathway - Homo sapiens (9)
	cfa04514 Cell adhesion molecules (CAMs) - Canis familiaris (9)	hsa04514 Cell adhesion molecules (CAMs) - Homo sapiens (11)
	cfa04630 Jak-STAT signaling pathway - Canis familiaris (7)	hsa04630 Jak-STAT signaling pathway - Homo sapiens (7)
	cfa04612 Antigen processing and presentation - Canis familiaris (6)	hsa04612 Antigen processing and presentation - Homo sapiens (8)
	Fc epsilon RI signaling pathway - (4)	Fc epsilon RI signaling pathway - (3)
down	Canis familiaris	Homo sapiens
	cfa04514 Cell adhesion molecules (CAMs) - (3)	
	cfa00600 Sphingolipid metabolism - (2)	hsadd00600 Sphingolipid metabolism - (3)
	cfa04530 Tight junction - (2)	hsadd04530 Tight junction - (2)
		hsadd04060 Cytokine-cytokine receptor interaction - (2)

In Klammern: Anzahl der Gene aus der Liste, die im Pathway vorkommen

Besonders interessant erschien der Pathway „sphingolipid metabolism“, der bei der Analyse mit den humanen Gene IDs drei Gene enthielt. Dieser Pathway dient

der Ceramidsynthese, also der Herstellung von Fettsäuren, welche für die Barrierefunktion der Haut von wesentlicher Bedeutung sind. Die anderen interessanten Pathways fallen in die Kategorie der Immunantwort und Zell-zu-Zell-Verbindungen.

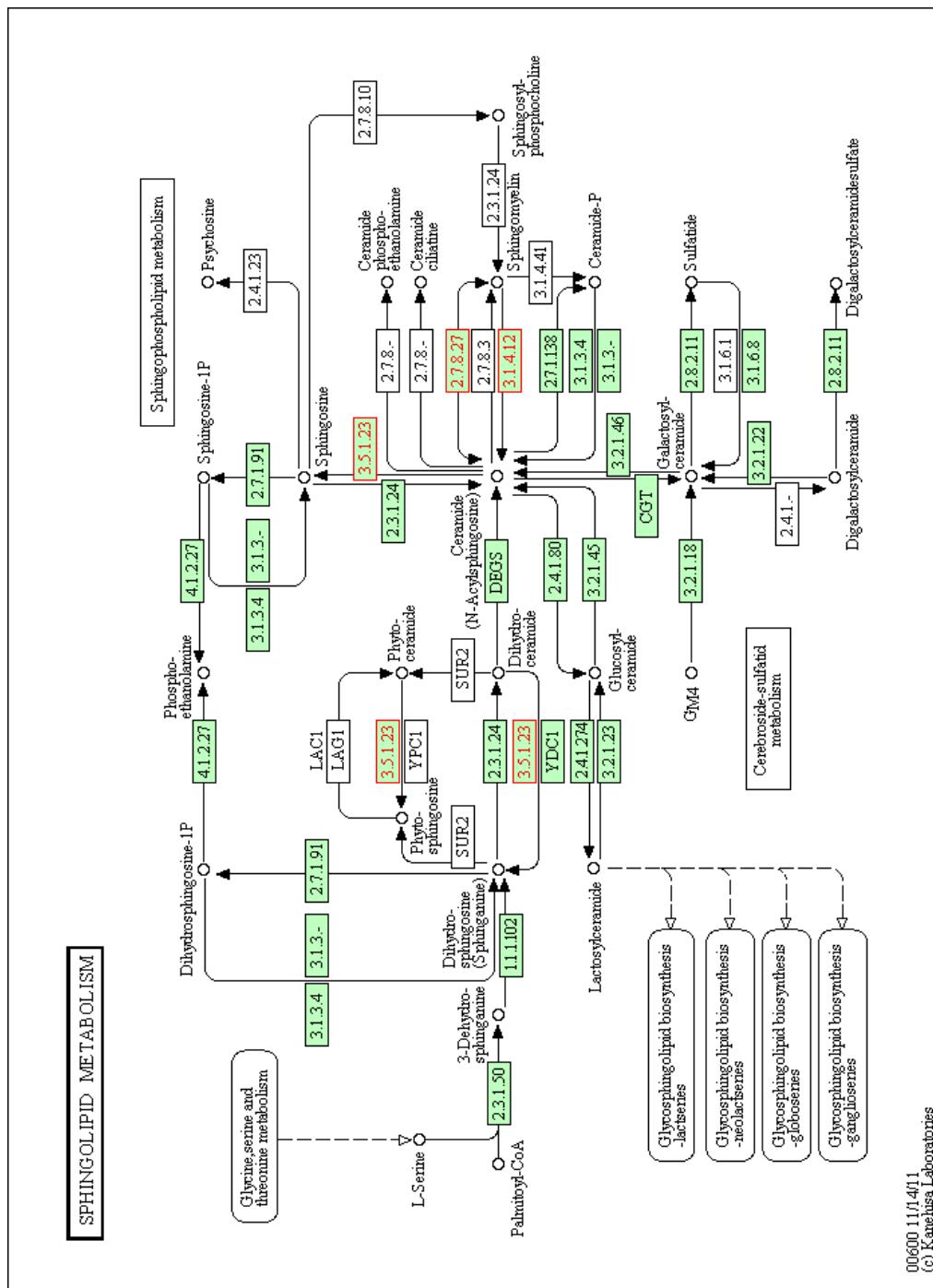


Abbildung 13: KEGG Pathway Sphingolipid-Metabolismus

Die rot dargestellten Kästchen stellen die Gene aus unserer Liste dar, die in diesem Pathway verändert reguliert sind (bei Allergischen mit Allergen vermindert exprimiert).

#### 4.2.3.3. Ergebnisse der MEV-Analysen

Mit Hilfe von MEV wurden Clusteranalysen durchgeführt.

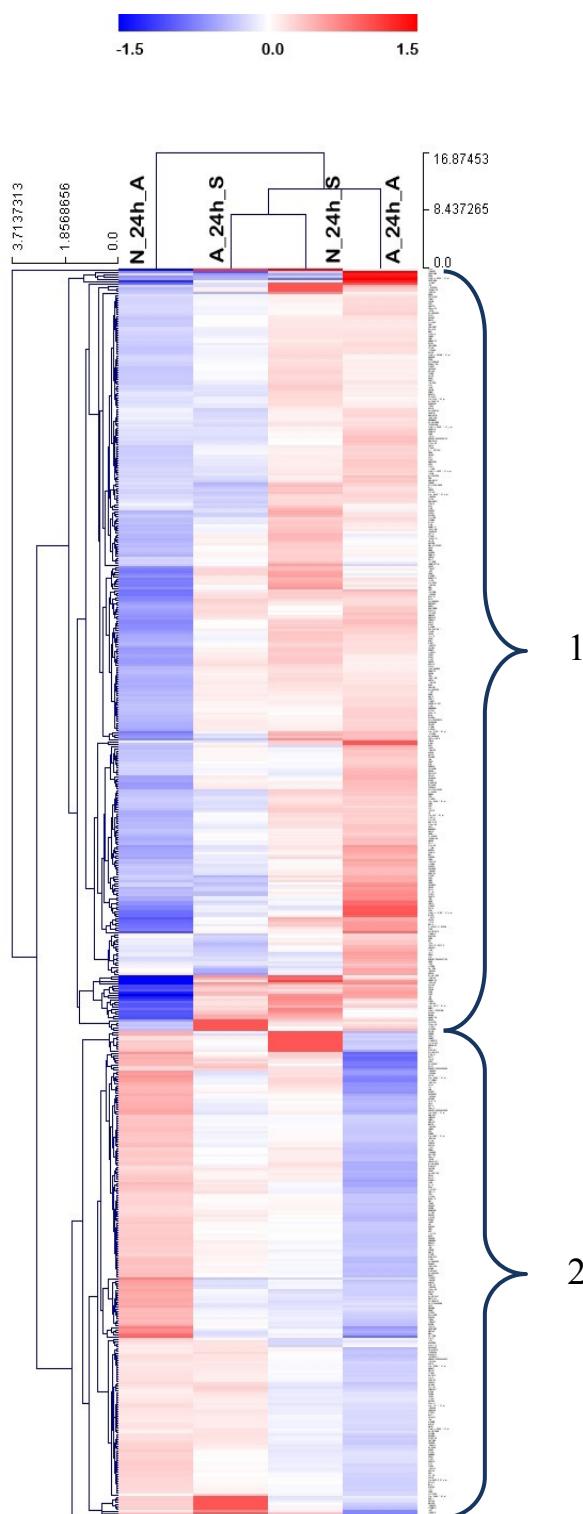
##### 4.2.3.3.1. Hierarchische Cluster (HCL)-Analyse

Um die Regulationsrichtung der differentiellen Gene der Multifactorial unpaired-Analyse (DiffAvsN\_24h) zwischen den Behandlungsgruppen nach 24 Stunden vergleichend darzustellen, wurden die  $\Delta$ VSN-Mittelwerte als mit Tabulator getrennte Textdatei in MEV eingespeist und als Heatmap dargestellt (siehe Punkt 3.2.9.6).

Dabei wurden die Gene, deren Expressionsprofil am ähnlichsten war, untereinander angeordnet. Auch die Gruppen wurden entsprechend ihrer Korrelation angezeigt.

In Abb. 18 ist zu sehen, dass sich die Expressionsprofile nach Allergenbehandlung zwischen allergischen (rechts außen) und nichtallergischen Hunden (links außen) am stärksten unterscheiden. Dabei unterscheidet sich die Kontrollgruppe nach Allergenexponierung am stärksten vom Rest.

Betrachtet man nur die allergischen Hunde und die Kontrollgruppe nach Allergenexponierung (A\_24h\_A, A\_24h\_A), fällt auf, dass der erste Teil der Gene (1), der sich bei den N\_24h\_A blau darstellt (vom Gesamt-Mittelwert nach unten abweichend) bei den A\_24h\_A rot dargestellt ist (vom Gesamt-Mittelwert nach oben abweichend) und der zweite Teil der Gene (2), der bei den N\_24\_A rot dargestellt ist, bei den A\_24h\_A blau gefärbt ist. Die Gene sind also zwischen den beiden Gruppen genau entgegengesetzt reguliert.



*Abbildung 14: Heatmap der hierarchischen Cluster-Analyse*

Die baumartige Darstellung (Sample Tree) gibt je nach Entfernung der Knotenpunkte zueinander an, wie eng die Verwandtschaft zwischen den verglichenen Gruppen bzw. zwischen den Genen ist. Eine Abweichung vom Mittelwert nach unten (verminderte Expression) ist in der Heatmap blau, eine Abweichung nach oben (vermehrte Expression) rot dargestellt. Je näher die Werte an den Gesamtmittelwert herankommen, desto blasser werden die Farbnuancen. Weiß bedeutet, dass die Farben dem Gesamtmittelwert entsprechen. Ein Gen wird durch einen Balken dargestellt.

1: Gene bei A\_24h\_A rot und bei N\_24h\_A blau dargestellt

2: Gene bei N\_24\_A rot und bei A\_24h\_A blau dargestellt

#### 4.2.3.3.2. Ergebnisse der DAVID-Analyse für die hierarchische Cluster-Analyse (HCL)

Die Gene, die in der Heatmap bei den allergischen Hunden nach Allergenbehandlung einer vermehrten Expression (rot) und bei den nichtallergischen Hunden gleichzeitig eine verminderte Expression zeigten (in Abb. 14 mit „1“ gekennzeichnet), und die Gene, die bei den allergischen Hunden nach Auftragen des Allergens eine verminderte, jedoch bei den nichtallergischen Hunden eine erhöhte Expression zeigten (in Abb. 14 mit „2“ gekennzeichnet), wurden als zwei getrennte Gen-Listen einer DAVID-Functional annotation cluster“-Analyse unterzogen. Dadurch sollten sie bestimmten funktionellen Klassen zugeordnet werden.

**Tabelle 20: Ergebnisse mit dem höchsten Enrichment Sore der DAVID-Analyse aus Genliste 1**

Functional Annotation Cluster Description <sup>1</sup>	Enrichm. Score <sup>2</sup>	Genes <sup>3</sup>
immune response (49;4.73); inflammatory response (31; 6-36); resoponse to wounding (37; 4.65); denfense response (39; 4.23)	15.29	67

<sup>1</sup> basiert auf den aussagekräftigsten “terms“

<sup>2</sup> geometrisches Mittel (in -log10) der P-Werte der Gruppen des entsprechenden „annotation Clusters“

<sup>3</sup> Gesamtanzahl der in einem Cluster enthaltenen Gene

in Klammern: Anzahl an Genen und der „fold enrichment of the functional term“

**Tabelle 21: Ergebnisse der DAVID-Analyse mit den höchsten Enrichment Scores aus Genliste 2**

Functional Annotation Cluster Description <sup>1</sup>	Enrichm. <sup>2</sup>	Genes <sup>3</sup>
epidermis development (13, 8.53) same Genes as: ectoderm development (13, 7.89); epidermal cell differentiation (7; 11.74); epithelial cell differentiation (8; 7.05); keratinocyte differentiation (6, 10.98), epithelium development (9; 4.79); cornified envelope (3; 16.60); keratinization (3; 8.43)	4.14	38
Cytoskeleton (27; 2.38)	3.23	36
cell junction (16; 3.76); anchoring junction (9; 6.37), cell-cell junction (9; 5.77), apical junction complex (6; 7.38)→ same Genes as: apicolateral plasma membrane (6; 7.16); adherens junction (7; 5.50); desmosome (3; 20.40), Tight junction (3; 6.44)	2.22	24

<sup>1</sup> basiert auf den aussagekräftigsten „terms“

<sup>2</sup> geometrisches Mittel (in -log10) der P-Werte der Gruppen des entsprechenden „annotation Clusters“

<sup>3</sup> Gesamtanzahl der in einem Cluster enthaltenen Gene

in Klammern: Anzahl an Genen und der „fold enrichment of the functional term“

Genliste 1 wurde funktionellen Gruppen zugeordnet, die mit Entzündungsreaktion und Wundheilung in Verbindung stehen (siehe Tab. 21). Damit reagieren die allergischen Hunde 24 Stunden nach Allergenexposition stärker mit einer Immunantwort als die gesunde Kontrollgruppe.

Die Gene in Genliste 2 wurden - grob zusammengefasst - funktionellen Klassen, die für die Differenzierung der Haut und Zell-zu-Zell-Verbindungen verantwortlich sind, zugeordnet (siehe Tab. 20). Man kann also sagen, dass die Expression von Genen, die diesen funktionellen Gruppen angehören, bei allergischen Hunden in allergenbehandelter Haut im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermindert ist.

Die ausführliche Liste dieser DAVID-Analyse und die Genlisten 1 und 2 aus der HCL-Analyse können der beiliegenden CD ennommen werden (Ordner DAVID Genliste 1, 2).

#### 4.2.3.3.3. Self-Organizing Tree Algorithm (SOTA)-Analyse

Um herauszufinden, ob es innerhalb der differentiellen Gene der Multifactorial nonpaired-Analyse (DiffAvsN24h) Gengruppen mit ähnlichem Expressionsverlauf über die Zeit gibt, wurde eine Self-Organizing Tree Algorithm (SOTA)-Analyse durchgeführt (Metrik: Pearson correlation; max. Cycles: 3) (siehe auch Punkt 3.2.10.3.2).

Die sinnvollste Cluster-Verteilung, d.h. Gruppierung in Gene mit ähnlichen Expressionsprofil, ergab sich bei einer Anzahl von vier Clustern (siehe Abb. 15).

Gene aus dem ersten Cluster werden bei allergischen und nichtallergischen Hunden sowohl bei mit Allergen- als auch bei mit Kochsalzlösung behandelter Haut im zeitlichen Verlauf im Vergleich zur Basisbiopsie verstärkt exprimiert. Allerdings fällt bei Betrachtung des Medians auf, dass die Expression dieser Gene am stärksten bei den allergischen Hunden in der mit Allergen behandelten Haut zunimmt, während bei den nichtallergischen Hunden in der mit Allergenlösung behandelten Haut zwischen den beiden Entnahmepunkten (sechs und 24 h) kein weiterer Expressionsanstieg stattfindet. Damit unterscheidet sich diese Behandlungsgruppe (N\_24h\_A) von den drei anderen, bei denen nach 24 h ein weiterer Anstieg der mRNA-Konzentration gemessen wurde (gut zu erkennen an dem hohen roten Peak in Cluster 1).

Die Gene aus dem zweiten Cluster werden genau entgegengesetzt zu denen aus dem ersten Cluster reguliert. Das bedeutet, ihre Expression nimmt über die Zeit bei allen Gruppen tendenziell ab. Allerdings zeigt der Median auch hier wieder, dass die Expressions-Minderung bei den allergischen Hunden nach Auftragen von Allergen am stärksten ist. Bei den nichtallergischen Hunden kommt es nach Auftragen des Allergens zwischen der Sechs- und 24-h-Biopsie zu keiner nennenswerten Senkung des Expressionsniveaus (im Gegensatz zu allen anderen Gruppen). Ganz im Gegenteil steigt die Expression von N\_6h\_A zu N\_24h\_A sogar etwas an.

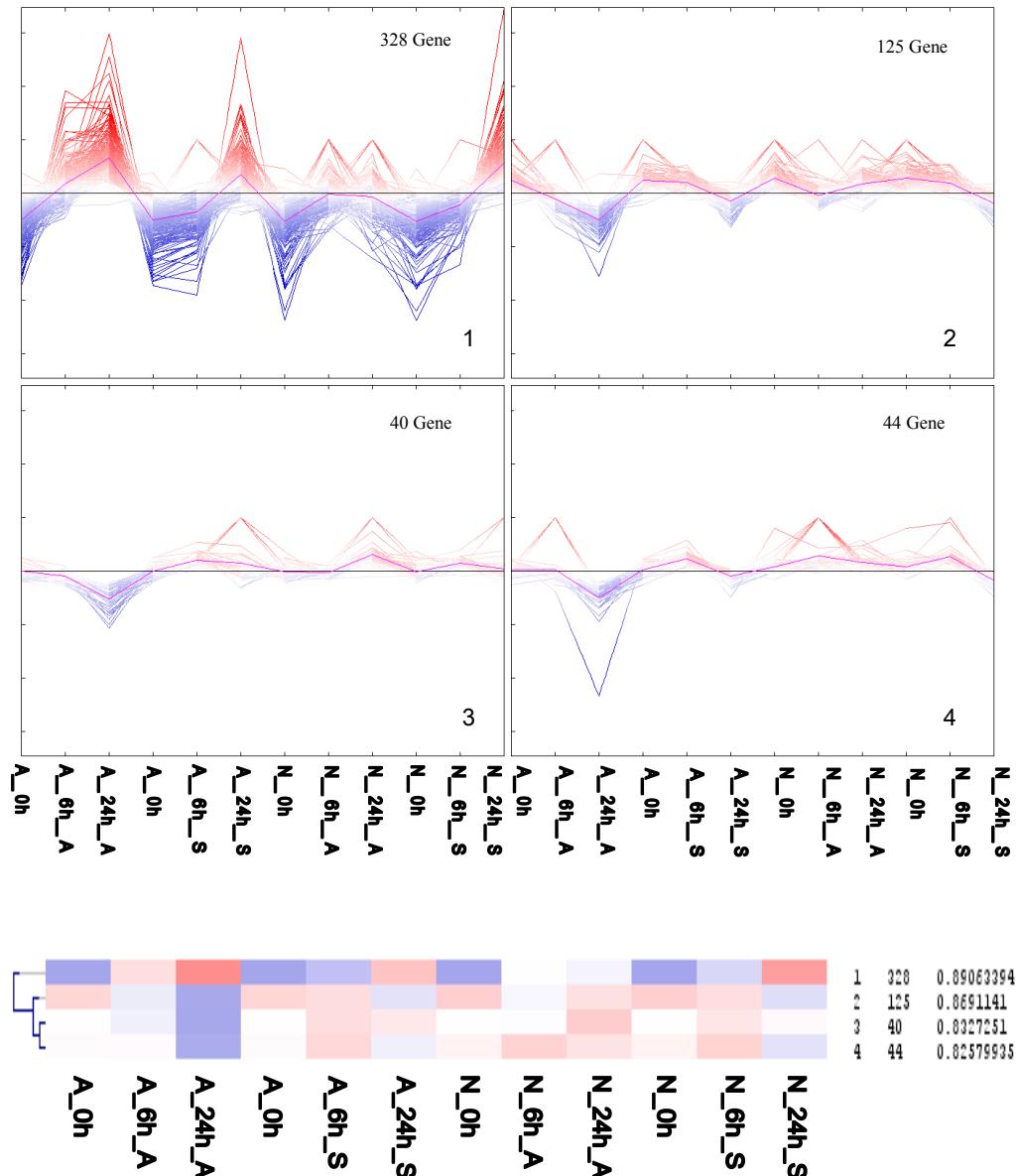


Abbildung 15: SOTA-Cluster-Analyse der Expressionsprofile über die Zeit

Die sinnvollste Cluster-Verteilung ergab sich bei einer Anzahl von 4 Clustern. Die rote Darstellung steht für eine Expression über dem Durchschnitt aller Gruppen, eine Blaue dagegen für eine Expression unterhalb des Durchschnitts. Unten ist zusätzlich das zugehörige SOTA-Dendrogramm abgebildet, welches die gemittelten Verläufe der Cluster und deren Korrelation zueinander darstellt. Funktionelle Zuordnung der Gene innerhalb der Cluster 1-4 siehe Punkt 4.2.3.3.4

Die Expressionsprofile der Gene aus Cluster 3 und 4 erscheinen auf den ersten Blick ähnlich. Bei beiden Clustern findet bei den allergischen Hunden ein starker Rückgang der Genexpression zwischen den Proben sechs und 24 h nach Behandlung mit Allergen statt. Das Expressionsniveau der Gene lag nach 24 h wesentlich unter dem Durchschnitt aller anderen Gruppen. Der Expressionsverlauf

der Gene der anderen Gruppen steigt in Cluster 3 und 4 zur sechs Stunden Biopsie hin an und fällt anschließend zur 24-h-Biopsie hin wieder ab. Eine Ausnahme ist die Gruppe der nichtallergischen Hunde in Cluster 3. Dort steigt die Expression zum 24 h Probenzeitpunkt nach Allergenbehandlung an.

Die Auflistung der Gene aus jedem Cluster sind auf der beiliegenden CD (MEV Tabelle) im Text-Format zu finden (siehe Ordner DAVID SOTA 1-4).

#### **4.2.3.3.4. Ergebnisse der DAVID-Analyse für die SOTA-Cluster**

Oftmals werden Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen gemeinsam reguliert und gehören zu funktionell ähnlichen Genklassen. Deshalb wurden die Gene der einzelnen Cluster anhand der humanen Gen IDs mit Hilfe des DAVID „functional annotation cluster“-Tools untersucht.

Die Gene aus dem ersten Cluster wurden vor allem den biologischen Prozessen Immunantwort, Entzündung und Wundheilung zugeordnet.

In Cluster 2 erreichten unter anderem funktionelle Klassen wie „epidermis development“, „epidermal cell differentiation“ und „keratinocyte differentiation“ die höchsten Enrichment Scores.

Cluster 3 und Cluster 4 Gene wurden besonders Klassen zugeordnet, die mit Zell zu Zell-Adhäsion in Zusammenhang gebracht werden.

Diese Analyse bestätigte die vorher erhaltenen Kategorien der DAVID-Analyse, welche herunter (FC niedriger bei A\_24h\_A vs. A\_24h\_S im Vergleich zu N\_24h\_A vs. N\_24h\_S) und hochregulierte (FC höher bei A\_24h\_A vs. A\_24h\_S im Vergleich zu N\_24h\_A vs. N\_24h\_S) Gene enthielt. Sie zeigt weiterhin auf, dass die Regulation der Expression der meisten Gene, welche in gemeinsamen funktionellen Gruppen enthalten sind, in der Regel in dieselbe Regulations-Richtung zielt.

Die Ergebnisse der DAVID-Analyse sind auf der beiliegenden CD im Ordner DAVID SOTA1-4 als Excel-Datei (DAVID Cluster 1 bis 4) zu finden.

#### **4.2.3.4. CoPub**

Mit Hilfe von CoPub wurden die differentiell exprimierten Gene weiter kategorisiert (Krankheiten, biologische Prozesse, Pathways, Medikamente etc.). Gene, welche für die Fragestellung dieser Arbeit besonders interessant und

relevant schienen, wurden anhand der von Copub vorgeschlagenen Literatur ausgewählt.

Zusätzlich wurde die Liste der differenitell exprimierten Gene aus der Multifactorial unpaired-Analyse manuell ausgewertet, um Gene, die mit Hilfe der bioinformatischen Programme nicht aufgefallen waren, aufzufinden. So konnten weitere Gene wie beispielsweise Filaggrin 2 (*FLG2*) zu den besonders interessanten Genen hinzugefügt werden.

Die folgende Liste enthält alle Gene, welche für besonders bemerkens- und erwähnenswert gehalten wurden:

**Tabelle 22: Differentiell exprimierte Gene aus der Multifactorial unpaired-Analyse (Diff AvsN\_24h), welche nach Literaturrecherche mit Copub und manueller Auswertung der Expressions-Daten interessant erschienen**

human Gene Symbol	human Entrez Gene ID	Cfa Gene Symbol	Cfa Entrez/Ensembl Gene ID	human Gene Description	Coef. Diff_A vsN_2 4h	FC	p.value	p.value adjust.
<i>CCL8</i>	6355	CCL8	448792	chemokine (C-C motif) ligand 8	2,07	4,2	0,0009	0,0483
<i>FCGR3A</i>	2214	FCGR3A	478984	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	0,96	1,9	0,0000	0,0116
<i>IL13RA2</i>	3598	IL13RA2	403622	interleukin 13 receptor, alpha 2	2,15	4,4	0,0000	0,0014
<i>IL18BP</i>	10068	IL18BP	476818	interleukin 18 binding protein	2,27	4,8	0,0001	0,0160
<i>IL33</i>	90865	IL33	403810	interleukin 33	1,73	3,3	0,0000	0,0143
<i>SOCS3</i>	9021	SOCS3	442949	suppressor of cytokine signalling 3	1,32	2,5	0,0008	0,0524
<i>CHI3L1</i>	1116	CHI3L1	490222	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	2,18	4,5	0,0009	0,0550
<i>CLEC7A</i>	64581	CLEC7A	611385	C-type lectin domain family 7, member A	0,64	1,6	0,0011	0,0591
<i>BCL3</i>	602			B-cell CLL/lymphoma 3	0,72	1,7	0,0010	0,0565
<i>CXCR6</i>	10663	CXCR6	608840	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	0,68	1,6	0,0003	0,0312
<i>ADORA2B</i>	136	ADORA2B	403410	adenosine A2b receptor	0,71	1,6	0,0017	0,0740
<i>FCGR2B</i>	2213			Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1,36	2,6	0,0005	0,0385
<i>MRC1</i>	4360	LOC487114	487114	mannose receptor, C type 1	1,60	3,0	1,0E-05	0,0072
<i>OSMR</i>	9180	OSMR	489223	oncostatin M receptor	1,03	2,0	0,0001	0,0160
<i>TNFAIP6</i>	7130	TNFAIP6	476147	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	2,61	6,1	0,0013	0,0649
<i>TNFSF9</i>	8744	TNFSF9	476729	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	1,32	2,5	0,0003	0,0320

human Gene Symbol	human Entrez Gene ID	Cfa Gene Symbol	Cfa Entrez/Ensembl Gene ID	human Gene Description	Coef. Diff_A vsN_2 4h	FC	p.value	p.value adjust.	
<b>TNFSF13B</b>	603969	TNFSF13B	485545	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	1,07	2,1	0,0005	0,0353	
<b>TGMI</b>	7051	TGM1	403630	transglutaminase 1 (K polypeptide epidermal type I, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	-0,60	-1,5	0,0002	0,0283	
<b>DSP</b>	1832	DSP	488207	desmoplakin	-0,63	-1,5	0,0004	0,0357	
<b>SPINK5</b>	11005	SPINK5	478055	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	-0,83	-1,8	0,0011	0,0601	
<b>FLG2</b>	388698			ENSC AFT0000020610	filaggrin family member 2	-1,88	-3,7	0,0000	0,0150
<b>CALML5</b>	51806	CALML5	487146	calmodulin-like 5	-0,73	-1,7	0,0019	0,0761	
<b>ASPRV1</b>	151516	ASPRV1	481416	aspartic peptidase, retroviral-like 1	-1,25	-2,4	0,0000	0,0114	
<b>OCLN</b>	4950	OCLN	403844	occludin	-0,66	-1,6	0,0001	0,0176	
<b>PPARA</b>	5465			peroxisome proliferator-activated receptor alpha	-0,84	-1,8	0,0005	0,0397	
<b>PPL</b>	5493	PPL	490021	periplakin	-0,64	-1,6	0,0003	0,0339	
<b>SCEL</b>	8796			scillillin	-1,18	-2,3	0,0001	0,0226	
<b>GATA3</b>	2625	GATA3	487134	GATA binding protein 3	-0,84	-1,8	0,0012	0,0620	
<b>LOR</b>	4014	LOR	609440	loricrin	-1,40	-2,6	0,0011	0,0591	
<b>DMKN</b>	93099	DMKN	476484	dermokin	-0,92	-1,9	0,0004	0,0359	
<b>KPRP</b>	448834	KPRP		ENSC AFG0000013003	keratinocyte proline-rich protein	-1,42	-2,7	0,0006	0,0443
<b>ALOXE3</b>	59344	ALOXE3	489487	arachidonate lipoxygenase 3	-0,64	-1,6	0,0015	0,0697	
<b>DSG1</b>	1828	DSG1	403401	desmoglein 1	-0,68	-1,6	0,0008	0,0519	
<b>ASAH2</b>	56624	ASAH2	486461	N-acylsphingosine amidohydrolase (non-lysosomal ceramidase) 2	-0,93	-1,9	0,0008	0,0506	
<b>CGN</b>	57530	CGN	483198	cingulin	-0,98	-2,0	0,0001	0,0158	

Es fällt auf, dass durch die limma-Analyse gute P-Werte der differentiell exprimierten Gene teilweise deutlich nach oben und zum Teil auch über das Signifikanzniveau von 0,05 korrigiert wurden (p value adjusted). Auf der beiliegenden CD sind die VSN-Werte jedes Hundes als logarithmierte Processed Signals für alle differentiell regulierten Gene, sowie die Durchschnitts-VSN-Werte für eine Gruppe und die  $\Delta$ VSN-Werte aufgelistet (delta VSN und VSN mit Durchschnittswerten).

Einige dieser Gene wurden für die qPCR zur Verifizierung der Array-Daten

verwendet.

#### 4.2.4. Verifizierung der Microarray-Ergebnisse mit Hilfe der qPCR

Die Expression folgender Gene wurde zur Verifizierung der Array-Ergebnisse mit Hilfe der qPCR gemessen: *CCL8*, *FCGR3A*, *IL13RA2*, *IL18BP*, *IL33*, *SOCS3*, *TGM1*, *DSP*, *ALOXE3*, *CLEC7A*, *DMKN*, *DSG1*, *FLG2*, *KPRP*, *LOC476953/SCEL*, *OCLN*, *PPARA*, *SPINK5*.

##### 4.2.4.1. Analyse der $C_T$ -Werte

Betrachtet man die  $C_T$ -Werte, so fällt auf, dass die von Probe 14 (A2839\_24h\_A) durchweg höher sind als die der anderen allergischen Tiere 24 h nach Auftragen von Allergen. Dies lag wahrscheinlich daran, dass die RNA-Qualität bei dieser Probe wesentlich schlechter war, als bei den anderen und stimmt mit den Ergebnissen der Microarray-Analyse überein (schlechtere Werte bei Cy3-cRNA-Ausbeute und niedrigere Einbaurate). In der folgenden Tabelle 23 ist dies anhand der  $C_T$ -Werte der Referenzgene und des geometrischen Mittels ihrer  $C_T$ -Werte gegen die die restlichen Gene normalisiert wurden, dargestellt.

**Tabelle 23:  $C_T$ -Werte und geometrisches Mittel der  $CT$ -Werte der Referenz-Gene der allergischen Tiere 24 h nach Hausstaubmilben-Allergen-Lösung.**

Die durchweg höheren  $C_T$ -Werte von Probe 14 sind gelb hinterlegt.

Referenzgen	Probe 18	Probe 14	Probe 16	Probe 12	Probe 23	Probe 21
<i>LOC479750</i>	26.9	30.7	27.9	26.8	26.9	26.7
<i>RPL13A</i>	20.4	21.9	21	21	21	20.8
<i>UBB</i>	22.1	27.4	24	23	22.9	22.9
GeoMittel	23.0	26.4	24.1	23.5	23.5	23.3

Dies stimmt ebenfalls mit den schwächeren Signalintensitäten in der Microarray-Analyse von Probe 14 überein, welche von den statistischen Analysen ausgeschlossen wurde, um Verfälschungen bei der Auswertung zu vermeiden.

#### 4.2.4.2. Bestätigung des Expressionsniveaus

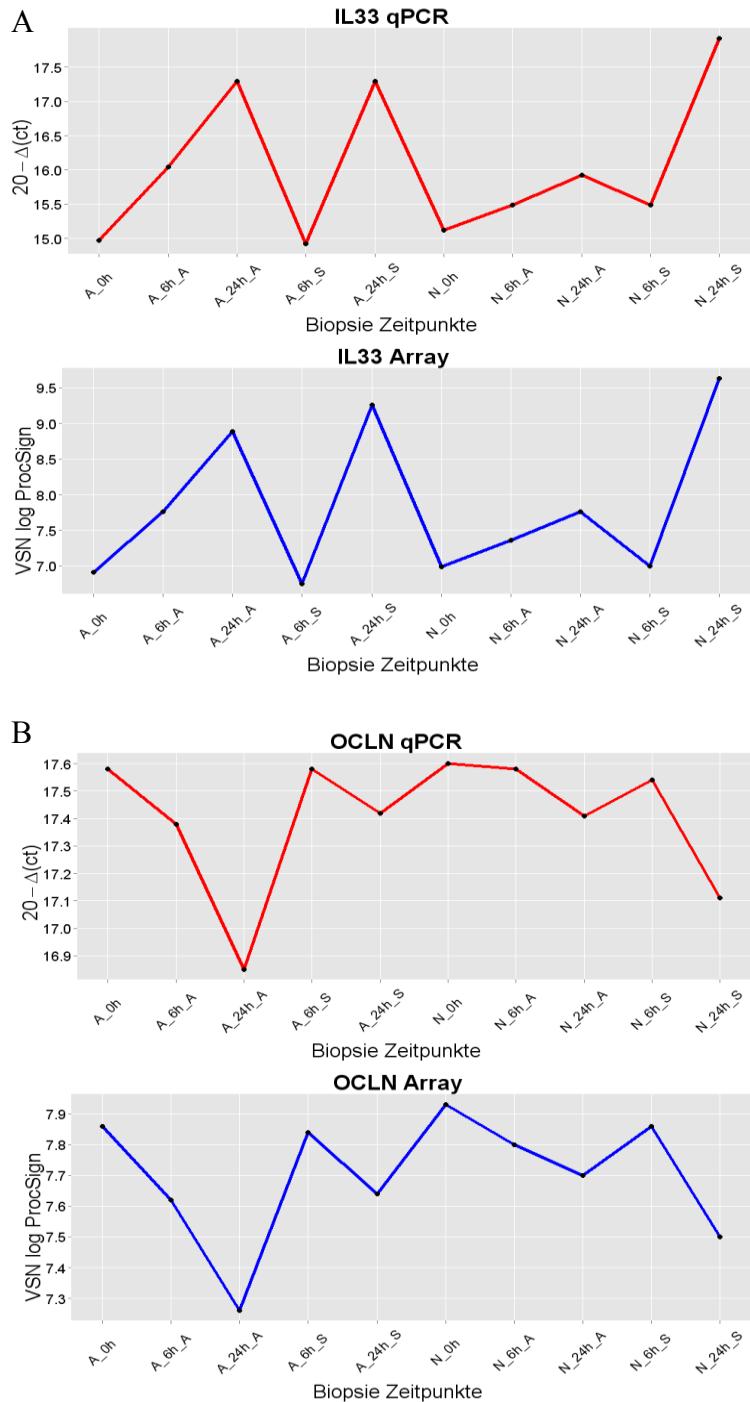
Für alle Gene, die in der qPCR verifiziert wurden, korrelierten die Expressionsverläufe zwischen Microarray und qPCR sehr gut miteinander (siehe Tab. 24 und Abb. 16). Somit wurde die Zuverlässigkeit der Array-Ergebnisse bestätigt. In Abb. 16 sind zwei Beispiele für die Übereinstimmung der Expressionsverläufe aus Tab. 24 von jeweils einem Gen dargestellt. Die Daten zeigen einen nahezu identischen Kurvenverlauf, womit die Zuverlässigkeit der Microarray-Daten bestätigt werden konnte.

**Tabelle 24: Expressionswerte der Proben nach Microarray-(normalisierte Processed Signals) und qPCR-Analyse (20- $\Delta C_T$ )**

MA=Microarray; PCR=qPCR

Gene Symbol	PCR /MA	Allergisch					Nichtallergisch				
		Allergen			Kochsalz		Allergen			Kochsalz	
		0 h	6 h	24 h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h	6 h	24 h
<i>CCL8</i>	PCR	11,73	14,62	15,14	12,12	14,40	11,40	13,26	11,60	13,33	14,62
<i>CCL8</i>	MA	6,60	7,65	7,75	6,31	7,60	6,37	6,92	5,84	6,69	7,49
<i>FCGR3A</i>	PCR	12,15	12,96	14,34	12,05	13,40	11,95	13,01	12,83	12,41	13,84
<i>FCGR3A</i>	MA	4,31	4,81	5,43	4,73	5,18	4,31	4,65	4,96	4,66	5,54
<i>IL13RA2</i>	PCR	12,85	13,21	15,64	12,79	14,58	12,47	13,03	13,81	12,89	15,10
<i>IL13RA2</i>	MA	5,93	6,24	8,20	5,86	7,60	5,79	5,97	7,14	5,95	8,30
<i>IL18BP</i>	PCR	10,58	11,89	13,69	10,37	11,65	10,08	11,46	11,03	11,23	12,19
<i>IL18BP</i>	MA	10,16	11,36	12,23	10,19	11,00	10,03	11,35	10,32	10,56	11,18
<i>IL33</i>	PCR	14,97	16,04	17,30	14,92	17,30	15,12	15,49	15,92	15,49	17,92
<i>IL33</i>	MA	6,91	7,76	8,89	6,75	9,26	6,99	7,36	7,76	7,00	9,63
<i>SOCS3</i>	PCR	13,75	15,47	15,69	13,14	15,62	13,72	13,81	14,38	13,89	15,92
<i>SOCS3</i>	MA	6,95	8,08	8,28	6,66	8,32	6,91	7,54	6,83	7,03	8,15
<i>TGMI</i>	PCR	16,33	16,86	15,80	16,97	16,38	16,46	16,81	16,53	16,79	16,22
<i>TGMI</i>	MA	11,42	11,53	11,09	11,77	11,33	11,46	11,56	11,37	11,76	11,10
<i>DSP</i>	PCR	20,32	19,79	18,80	19,99	19,60	20,20	20,03	20,06	20,09	19,72
<i>DSP</i>	MA	14,66	14,64	14,38	14,78	14,64	14,65	14,69	14,92	14,96	14,60
<i>ALOXE3</i>	PCR	15,68	15,92	15,28	16,15	15,73	15,86	15,83	15,74	16,11	15,64
<i>ALOXE3</i>	MA	8,27	8,26	7,76	8,49	8,18	8,41	8,24	8,56	8,42	8,34
<i>CLEC7A</i>	PCR	12,54	13,16	14,76	12,76	13,94	12,76	13,67	13,25	13,09	13,80
<i>CLEC7A</i>	MA	5,33	5,68	6,00	5,50	5,63	5,27	5,57	5,48	5,45	5,75
<i>DMKN</i>	PCR	21,68	21,22	20,52	21,39	21,43	21,79	21,37	21,26	21,44	21,11
<i>DMKN</i>	MA	13,89	13,80	12,95	14,11	13,64	13,90	13,90	13,73	14,08	13,50

Gene Symbol	PCR /MA	Allergisch					Nichtallergisch				
		Allergen			Kochsalz		Allergen			Kochsalz	
		0 h	6 h	24 h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h	6 h	24 h
<b><i>DSG1</i></b>	PCR	17,19	16,82	16,23	16,94	16,81	17,77	17,09	17,18	16,93	16,60
<b><i>DSG1</i></b>	MA	12,09	11,94	11,70	12,23	11,92	12,21	12,23	12,24	12,31	11,78
<b><i>FLG2</i></b>	PCR	23,45	22,97	21,70	23,24	22,98	24,22	23,20	22,80	23,29	22,45
<b><i>FLG2</i></b>	MA	13,03	12,91	11,67	13,18	13,02	13,08	13,06	13,19	13,18	12,89
<b><i>KPRP</i></b>	PCR	19,51	18,79	17,00	19,18	18,60	19,28	19,25	19,10	19,43	18,53
<b><i>KPRP</i></b>	MA	10,67	10,83	10,07	11,26	11,04	10,65	10,86	11,29	11,06	10,99
<b><i>LOC476953</i></b>	PCR	18,57	17,78	17,27	18,10	18,25	18,49	18,23	18,48	18,22	17,84
<b><i>SCEL</i></b>	MA	10,91	10,64	10,09	10,96	10,72	11,04	10,89	11,01	11,14	10,57
<b><i>OCLN</i></b>	PCR	17,58	17,38	16,85	17,58	17,42	17,60	17,58	17,41	17,54	17,11
<b><i>OCLN</i></b>	MA	7,86	7,62	7,26	7,84	7,64	7,93	7,80	7,70	7,86	7,50
<b><i>PPARA</i></b>	PCR	16,49	15,78	15,07	16,14	15,79	16,39	16,09	16,09	16,08	15,52
<b><i>PPARA</i></b>	MA	9,72	9,29	9,05	9,84	9,45	9,72	9,39	9,66	9,77	9,27
<b><i>SPINK5</i></b>	PCR	18,42	18,25	17,48	18,22	18,11	18,50	18,71	18,25	18,81	17,83
<b><i>SPINK5</i></b>	MA	14,56	14,53	14,10	14,65	14,53	14,74	14,65	14,55	14,69	14,24



**Abbildung 16: Vergleich der Microarray- und qPCR-Expressionswerte**

Microarray-Daten (blau) der auf dem Array vertretenen Probes als normalisierte, logarithmierte Mittelwerte für jede Gruppe, qRT-PCR-Daten (rot) als 20- $\Delta\Delta(\text{CT})$  Mittelwerte für jede Gruppe dargestellt.

A: Ein Beispiel für ein Gen, welches bei nichtallergischen Hunden 24 h nach Allergenexposition vermindert exprimiert wurde.

B: Ein Beispiel für ein Gen, dessen Expression bei allergischen Hunden 24 h nach Allergenexposition reduziert war.

Die qPCR-Ergebnisse wurden ebenfalls mit Limma in „R“ statistisch mit denselben Parametern wie die Microarray-Ergebnisse analysiert. Die statistischen Daten von Microarray und qPCR-Analyse können nicht direkt miteinander verglichen werden, da es sich um zwei Methoden mit unterschiedlicher Sensitivität handelt und die Expressionswerte bei beiden Methoden nicht absolut quantitativ sind. Es zeigt sich dennoch, dass die Tendenz der Ergebnisse von beiden Methoden sehr ähnlich ist (ist ein FC bei einer Methode hoch, trifft das für die andere ebenfalls zu, siehe Tab. 25).

**Tabelle 25: Vergleich der Ergebnisse der statistischen Analyse (Multifactorial unpaired DiffAvsN\_24h) von Microarray- und qPCR-Daten**

Microarray						qPCR				
up	Gene Symbol	Coeff	FC	p value	p value adjust.	Coeff	C <sub>T</sub> -Wert	FC	p.value	p value adj
	<b><i>CCL8</i></b>	2,07	4,2	0,0009	0,0483	-3,68	12,8	0,0002	0,0005	
	<b><i>FCGR3A</i></b>	0,96	1,9	0,0000	0,0116	-2,02	4,1	0,0130	0,0207	
	<b><i>IL13RA2</i></b>	2,15	4,4	0,0000	0,0014	-2,44	5,4	0,0000	0,0000	
	<b><i>IL18BP</i></b>	2,27	4,8	0,0001	0,0160	-3,24	9,4	0,0002	0,0004	
	<b><i>IL33</i></b>	1,73	3,3	0,0000	0,0143	-2,08	4,2	0,0001	0,0004	
	<b><i>SOCS3</i></b>	1,32	2,5	0,0008	0,0524	-1,80	3,5	0,0614	0,0701	
	<b><i>CLEC7A</i></b>	0,64	1,6	0,0011	0,0591	-1,17	2,2	0,0272	0,0680	
down										
	<b><i>TGMI</i></b>	-0,60	-1,5	0,0002	0,0283	0,50	-1,4	0,0481	0,0642	
	<b><i>DSP</i></b>	-0,63	-1,5	0,0004	0,0357	0,57	-1,5	0,1045	0,1045	
	<b><i>FLG2</i></b>	-1,41	-2,7	0,0001	0,0166	1,65	-3,1	0,0227	0,0680	
	<b><i>DMKN</i></b>	-0,92	-1,9	0,0004	0,0359	1,06	-2,1	0,0466	0,0777	
	<b><i>ALOXE3</i></b>	-0,64	-1,6	0,0015	0,0697	0,61	-1,5	0,1404	0,1404	
	<b><i>DSGI</i></b>	-0,68	-1,6	0,0008	0,0519	0,93	-1,9	0,0627	0,0783	
	<b><i>SPINK5</i></b>	0,83	-1,8	0,0011	0,0601	0,76	-1,7	0,0393	0,0514	
	<b><i>OCLN</i></b>	-0,66	-1,6	0,0001	0,0176	0,72	-1,6	0,0000	0,0002	
	<b><i>PPARA</i></b>	-0,84	-1,8	0,0005	0,0397	1,01	-2,0	0,0014	0,0023	
	<b><i>LOC476953/SCEL</i></b>	-1,78	-2,3	0,0001	0,0226	1,38	-2,6	0,0001	0,0002	
	<b><i>KPRP</i></b>	-1,42	-2,7	0,0006	0,0443	1,79	-3,5	0,0003	0,0008	

#### 4.2.5. Histologische Auswertung

Um festzustellen, ob und wie sich die Zellpopulation in der Haut der sensibilisierten Hunde während der Einwirkzeit der Allergenlösung im Vergleich zur Kochsalzlösung bzw. zur unbehandelten Haut und im Vergleich zur Kontrollgruppe unterscheidet, wurden von allen genommenen Biopsien Teilstücke zur histologische Präparation und anschließender lichtmikroskopischen Untersuchung genommen (siehe 3.2.14.).

#### 4.2.5.1. HE-Färbung

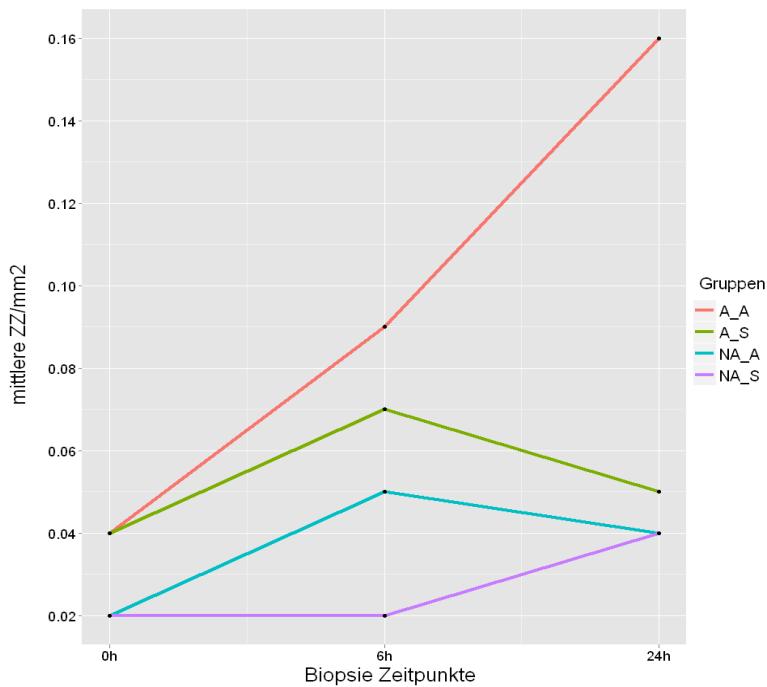
Die Auswertung der Rundzellen erfolgte in den HE gefärbten histologischen Schnitten. Es wurden Rundzellen pro mm<sup>2</sup> ausgezählt. Die Ergebnisse der Auszählung sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

**Tabelle 26: Auswertung der Rundzellen in histologischen Präparaten**

Rundz.=Rundzellen, HDM (house dust mite)=Allergen, PBS=Kochsalz, A=Allergische, NA=Nichtallergische Hunde

	Rundz.0h		Rundz.6h				Rundz.24h			
			HDM		PBS		HDM		PBS	
	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA
Anzahl der ausgewerteten Schnitte	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittlere Zellzahl pro mm <sup>2</sup>	0,04	0,02	0,09	0,05	0,07	0,02	0,16	0,04	0,05	0,04

Die Werte aus Tabelle 24 sind grafisch in Abb. 17 dargestellt. Dabei ist allein bei den allergischen Hunden, die mit Allergen behandelt wurden eine stetige Zunahme der mittleren Zellzahl/mm<sup>2</sup> in Abhängigkeit von der Einwirkzeit zu erkennen.



**Abbildung 17: Verlauf der Zellzahl pro Fläche von allergischen und nichtallergischen Hunden in Abhängigkeit von Behandlungslösung und Einwirkzeit**

A=allergische Hunde; NA=nichtallergische Hunde, HDM=Allergen ;PBS=Kochsalzlösung; 0h=Basisbiopsie ohne Behandlung

Die statistische Auswertung der Zellzahl/mm<sup>2</sup> in HE brachte beim Vergleich mittels Kruskal Wallis-Test in den Proben der nichtallergischen Hunde vor Behandlung und sechs sowie 24 Stunden nach Exposition mit Kochsalz bzw. Allergen (über alle 5 Gruppen (0 h, 6 h S, 6 h A, 24 h S, 24 h A) keinen signifikanten Unterschied im Zellinfiltrat ( $P=0.4953$ ). Beim selben Vergleich mit den Präparaten der allergischen Hunde lag der P-Wert deutlich niedriger ( $P=0.0841$ ). Er erreichte dennoch nicht das Signifikanz-Niveau von  $P=0,05$ .

Anschließend wurden die allergischen und die nichtallergischen Hunde vor Behandlung und nach sechs und 24 Stunden mit Kochsalz- und Allergenlösung mit demselben Test über alle 10 Gruppen verglichen. Auch hier wurde das Signifikanz-Niveau für die Zunahme mittleren Zellzahl/mm<sup>2</sup> der allergischen Hunde mit Allergen nach 24 h knapp verpasst ( $P=0.0607$ ).

#### 4.2.5.2. Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung der Hautproben wurde wie in Punkt 3.2.14.3.2. erläutert

durchgeführt. Die so gefärbten Präparate sollten analog zu den Rundzellen in der HE-Färbung ausgewertet werden. Jedoch unterlag die Intensität der Färbung zwischen den Präparaten großen Schwankungen. Teilweise waren die Eosinophilen nicht von den Neutrophilen zu unterscheiden, und auch die Mastzellen färbten sich in manchen Präparaten kaum an. Diese Problematik führte dazu, dass die Präparate untereinander nicht vergleichbar waren und dadurch eine statistische Auswertung nicht durchführbar war.

#### **4.2.5.3. Immunhistochemische Färbung**

Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem polyklonalen CD3-Ak durchgeführt (siehe auch Punkt 3.2.14.4.). Leider stellte sich heraus, dass die relativ kleinen Teilstücke aus den 8 mm Hautstanzen dafür nicht geeignet waren. Die Gewebestückchen waren zu klein und zerbrachen bei der Aufbereitung in kleine Einzelteile oder wiesen große Risse und Defekte auf. Somit war eine Vergleichbarkeit der Proben durch Ausmessen der Gewebefläche nicht mehr gegeben und eine Auswertung unmöglich. Weder die Behandlung in der Mikrowelle, noch die alternativ durchgeführte Behandlung im Wasserbad konnte dieses Problem beheben.

## V. DISKUSSION

Die AD, deren Hauptsymptom der Juckreiz ist, und welche mit zum Teil schweren ekzematösen Läsionen und trockener Haut einhergeht (LEUNG et al., 2004; WÜTHRICH B. et al., 2005; BOGUNIEWICZ & LEUNG, 2006; BOGUNIEWICZ et al., 2006), mindert die Lebensqualität von schwer betroffenen Patienten (Mensch und Hund) und die des familiären Umfeldes oft erheblich (SPERGEL & PALLER, 2003; LINEK & FAVROT, 2010). Ihre Bedeutung hat beim Menschen aufgrund der in den letzten Jahrzehnten stark angestiegenen Prävalenz, besonders in den industrialisierten Ländern, zugenommen (OKUDAIRA, 1998; LINEK & FAVROT, 2010). Selbiges wird beim Hund vermutet (HILLIER & GRIFFIN, 2001a; OLIVRY & SOUSA, 2001a; MARSELLA et al., 2006d), der in der westlichen Gesellschaft immer häufiger eine Stellung als nahezu gleichberechtigter Begleiter des Menschen einnimmt und somit auch denselben Umweltbedingungen ausgesetzt ist. Die Pathogenese dieser Krankheit konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden. Die Tatsache, dass es sich bei der AD um eine multifaktorielle Krankheit handelt, gestaltet eine eindeutige Zuordnung von möglichen Ursachen schwierig. Unter anderem sollen genetische Prädisposition, eine gestörte Hautbarriere und Hyperreakтивität bzw. Fehlregulation des Immunsystems eine wichtige Rolle spielen (LEUNG et al., 2003; NOVAK et al., 2003; RAIF S, 2003).

DNA-Microarrays ermöglichen eine unvoreingenommene Analyse von Regulationsmechanismen, die sich auf der Ebene der Genexpression widerspiegeln und Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Individuen aufweisen. Mit ihrer Hilfe können mRNA-Konzentrationen von tausenden von Genen gleichzeitig vergleichend gemessen und damit ein Überblick über viele gleichzeitig ablaufende Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene gewonnen werden. Die erstellten Expressionsprofile liefern aufgrund von Expressionsunterschieden zwischen Proben von erkrankten und gesunden Tieren Informationen darüber, welche Gene möglicherweise mit der Erkrankung assoziiert bzw. sogar an der Entstehung beteiligt sind. In einem geeigneten Modellsystem können in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren (Behandlung,

Einwirkzeit, Patientengruppe) anhand der entsprechenden Expressionsunterschiede und dem vorhandenen Wissen über die Funktionen der identifizierten Gene die mit der Erkrankung in Zusammenhang stehenden biologischen Prozesse beschrieben werden. Darauf basierend können neue biologische Hypothesen aufgestellt und mit früheren verglichen werden.

In einer kürzlich durchgeführten Studie wurden Expressionsprofile in der Haut atopischer Hunde einer Klinikpopulation untersucht (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008). Die Hunde, die in diese Studie eingeschlossen wurden, gehörten unterschiedlichen Rassen an, waren unterschiedlich alt und lebten unter verschiedenen Haltungs- und Umweltbedingungen. Weiterhin stammten die untersuchten Hautproben von Läsionen unterschiedlicher Stadien und unterschiedlichen Körperstellen. Trotzdem konnten dabei differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Jedoch müssen die Ergebnisse der Studie mit Vorsicht interpretiert werden, da es sich um ein sehr heterogenes biologisches Modell handelte und die Daten der Microarrayanalyse nicht durch weitere Methoden verifiziert wurden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Anlehnung an die Studie von Merryman-Simpson et al. von 2007 die Genexpression atopischer Hunde unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen, bisherige Ergebnisse von Expressionsstudien beim Mensch und Hund zu bestätigen und zu erweitern, mögliche Unterschiede zwischen künstlich sensibilisierten und natürlich erkrankten Tieren aufzuzeigen und neue Kandidatengene für weiterführende Studien und neue Therapiemöglichkeiten zu finden.

## **5.1. Diskussion der Methodik**

### **5.1.1. Tiermodell und Proben-Zeitpunkte**

Da es sich bei der AD um eine multifaktorielle Krankheit handelt, gestaltet es sich schwierig, bei Hunden mit natürlich auftretender AD im Vergleich zu gesunden Tieren, primäre Unterschiede, die durch die Krankheit selbst verursacht sind, von sekundären Unterschieden, die mit der anschließenden Entzündung einhergehen, zu unterscheiden (MARSELLA & GIROLOMONI, 2009). Eine große Herausforderung besteht sicherlich darin, bei Hunden aus dem Klinikpool verschiedene Faktoren wie beispielsweise die Umwelt, Rasse, (WOOD et al.,

2010), Ernährung, Alter des Tieres und der Läsionen, die bei dieser Krankheit eine Rolle spielen, zu kontrollieren. Damit wird ein Modell für die AD sehr interessant, bei welchem eben diese Faktoren kontrolliert und Läsionen induziert werden können. Hierbei können die primären Faktoren (die die Krankheit ausmachen oder bedingen) von den sekundären (die aufgrund der Krankheit und der mit ihr eingehenden Entzündung entstehen) getrennt werden. Künstlich sensibilisierte Hunde scheinen geeignet, um die Pathogenese der AD zu erforschen und neue Therapiemethoden zu entwickeln (MARSELLA & GIROLOMONI, 2009).

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit sechs sensibilisierte Hunde als Modell für die canine atopische Dermatitis verwendet. Da jedes Trauma der Haut die Expression in Richtung Entzündung und Wundheilung verändern kann, wurde die Haut zur Sicherheit vier Tage vor der ersten geplanten Biopsie vorsichtig geschoren und auf Läsionen und makroskopisch sichtbare Veränderungen geprüft. Dadurch sollten Genexpressionsänderungen aufgrund der Vorbereitung der Haut vermieden werden. Um mögliche rassebedingte Unterschiede der Genexpression in der Haut auszuschließen, wurden sowohl für die atopische als auch für die gesunde Kontrollgruppe Hunde der Rasse Beagle verwendet. Weiterhin wurde der Faktor Umwelt so weit wie möglich standardisiert, da die Tiere unter identischen Haltungs- und Fütterungsbedingungen gehalten wurden. Um sicherzustellen, dass es sich bei den bioptierten Hautbereichen um Läsionen gleichen Alters handelte, wurden die Proben bei allen Hunden im selben Zeitabstand nach der Behandlung mit Allergen/Kochsalzlösung genommen. Die Lösungen wurden bei allen Tieren auf zuvor unauffällige Haut des linken lateralen Thorax aufgetragen.

In dieser Arbeit sollten die frühen Expressionsveränderungen untersucht werden, da angenommen wird, dass gerade diese für die spätere Ausprägung der Hautveränderung eine zentrale Rolle spielen und bei allergischen Individuen die Weichen zur Entwicklung der klinischen Symptome stellen.

Bei keinem der Tiere wurden vor der Basisbiopsie, oder nach sechs Stunden makroskopische Läsionen auf der Haut beobachtet. Bei den Nichtallergischen Hunden wurden nach 24 h ebenfalls keine makroskopischen Veränderungen festgestellt. Sichtbare Hautläsionen konnten nur bei drei der sechs allergischen Hunde vor der 24 Stunden Biopsie an der allergenbehandelten Haut festgestellt

werden. Bei den Veränderungen handelte es sich um geringgradige erythematöse Läsionen. Ein möglicher Grund für die relativ geringfügige Ausprägung der Läsionen bei den allergischen Hunden, die auch nur bei der Hälfte der Tiere nach 24 Stunden festgestellt wurden, ist wahrscheinlich die individuell unterschiedlich schnell ablaufende Reaktion auf das Allergen. Auch in der Literatur weicht das Eintreten von Hautveränderungen nach Allergenexposition individuell von Hund zu Hund ab (MARSELLA et al., 2006b; MARSELLA et al., 2006c). Bei einer Studie von Marsella et al. aus dem Jahr 2006 reagierten nur zwei von sechs Hunden nach 24 Stunden mit geringgradigen Hautveränderungen, ähnlich zu den Tieren aus unserer Studie. Ein Großteil der Tiere wies erst 96 Stunden nach Allergen-Patch-Test sichtbare Läsionen auf. Der Grad der Ausprägung der makroskopischen Veränderungen korrelierte in dieser Studie jedoch nicht mit der untersuchten Zytokin-Expression (MARSELLA et al., 2006b).

Unerwarteter Weise fanden sich bei der statistischen Auswertung der Proben bei den Sechsstunden-Biopsien keine signifikanten unterschiedlich exprimierten Gene zwischen allergischen- und nichtallergischen Hunden nach Allergenexposition. Dies bedeutet nicht, dass keine Änderung in der Genexpression stattfand, sondern lediglich, dass sich die Expression zwischen den beiden verglichenen Gruppen zu diesem Zeitpunkt und innerhalb der von uns festgelegten Kriterien nicht unterscheidet. Möglicherweise liegt dieses Ergebnis an der Tatsache, dass eine differentielle Expression ab einem FC von 1,5 bei einer FDR von 5% als signifikant angenommen wurde. Die Festlegung dieser Parameter ist jedoch willkürlich. In vielen Studien werden Expressionsänderungen erst ab einem FC von 2,0 als signifikant angenommen. In diesen Studien würden also Gene mit einem FC zwischen 1,5 und 2,0 nicht als differentiell exprimiert detektiert werden. Weiterhin gibt es keine Aussagen darüber, ab welcher detektierbaren Änderung der Expression ein Gen eine biologische Relevanz aufweist; das kann für jedes Gen unterschiedlich sein. Es ist also denkbar, dass nach sechs Stunden bereits differentiell exprimierte Gene mit biologischer Relevanz existieren, diese jedoch aufgrund der festgelegten Kriterien nicht ermittelt werden konnten. Proben, die 24 h nach Behandlung genommen wurden, zeigten zwischen allergischen und nichtallergischen Tieren in den Expressionsanalysen deutlich differentiell exprimierte Gene.

Die histologische Auswertung erbrachte bei der Ermittlung der Zellzahl/mm<sup>2</sup> keine statistisch signifikanten Veränderungen. Zwar waren die histologischen

Veränderungen in der Zellpopulation der Rundzellen nach 24 Stunden bei den allergischen Hunden mit allergenbehandelter Haut ebenfalls nicht statistisch signifikant, jedoch war eine deutliche Tendenz in Richtung Zunahme der Zellzahl/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den anderen Gruppen zu erkennen (siehe Abb. 17). Dieses Ergebnis unterstützt die Expressionsergebnisse, die ebenfalls erst 24 Stunden nach Einwirken der Lösungen Unterschiede zwischen allergischen und gesunden Hunden erbrachten. Dass die histologischen Ergebnisse keine statistische Signifikanz aufwiesen, lässt sich durch die geringe Probenanzahl (n=6) pro Gruppe begründen.

### **5.1.2. Probenbearbeitung**

Die Gewebsasservierung erfolgte unmittelbar nach der Probengewinnung vor Ort unter standardisierten Bedingungen, jedoch lassen sich naturgemäß Probleme aufgrund geringer Ungenauigkeiten hinsichtlich der Entnahmelokalisation und Gewebezusammensetzung nicht ganz ausschließen. Für die Probengewinnung stellte die von uns gewählte Vorgehensweise eine praktikable Methode dar.

#### **5.1.2.1. RNA-Extraktion**

Die Präparation des Untersuchungsmaterials umfasste von der Gewebsentnahme über die RNA-Extraktion bis hin zur Hybridisierung mit Cy3-markierter cRNA mehrere kritische Teilschritte. Besonders wichtig ist anzumerken, dass es sich bei mRNA um einzelsträngige Ribonukleotidketten handelt, die sehr anfällig für Abbau durch ubiquitär vorhandene RNasen sind. Teilweise degradierte RNA kann bei der späteren Hybridisierung zu verfälschten Ergebnissen führen, weil die Verteilung der markierten cRNA-Fragmente über die mRNA von der cRNA aus intakter mRNA abweicht. Je nachdem wo die Oligonukleotid-Probe in der mRNA-Sequenz liegt, kann ein höheres oder niedrigeres Signal die Folge sein. Darum ist nur Zell- und Gewebsmaterial, welches unmittelbar nach der Entnahme aus dem Organismus konserviert wird (Konservierung mittels RNAlater oder Schockgefrieren) für eine valide Untersuchung verwendbar. Aus diesem Grund wurden die Hautproben unmittelbar nach der Gewinnung vor Ort in RNAlater gegeben. Zusätzlich wurden während der gesamten Probenbearbeitung wesentliche Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit der RNA berücksichtigt. So wurde das Arbeitsumfeld möglichst RNase-frei gehalten, die Arbeitsvorgänge so zügig wie möglich und die Reaktionsabläufe bei optimalen Rahmenbedingungen

durchgeführt. Trotz all dieser Vorkehrungen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sowohl zu falsch positiven als auch falsch negativen Ergebnissen bei der Array-Auswertung kommt.

Bei der Verwendung von Hautbiopsien für transkriptomische Untersuchungen ist es häufig ein Problem, RNA von ausreichender Qualität und in ausreichender Menge zu erhalten. Dies ist primär durch die Eigenschaften der Haut zu erklären. Zum einen lässt sich Haut im Gegensatz zu anderem Gewebe schlechter homogenisieren, zum anderen hat sie natürlicherweise einen relativ hohen Gehalt an RNAsen (OSKAR et al., 2011). Eine weitere Erklärung, weshalb die RIN (siehe auch Punkt 3.2.7.) von Haut in der Regel niedriger ausfällt als bei Gewebe aus anderen Organen, ist sicherlich, dass es sich bei der Haut um verhorndes und sich ständig erneuerndes Gewebe handelt. Hierbei kommt es im Zuge von Zelldifferenzierung, Apoptose und Regenerationsschritten immer wieder dazu, dass Zellen zugrunde gehen oder bereits abgestorben sind. Allein aus diesem Grund wird mit der Hautbiopsie automatisch bereits degradierte RNA isoliert, was die RIN von Anfang an niedriger ausfallen lässt.

Aus den vorher genannten Gründen sind bei aus Haut gewonnener mRNA RINs von 9-10 kaum zu erwarten. Werte von über 6,5 wurden in anderen Studien als ausreichend bewertet.

Die Qualität der mRNA wurde vor dem Labelling wie unter 3.2.6. und 3.2.7. beschrieben überprüft und bei allen mit einer Ausnahme als gut bewertet. Für die Auswertung der Array-Daten wurde Probe 14 ausgeschlossen. Bei ihr waren Mängel schon in der RNA-Menge- und -Qualität aufgefallen, welche sich in der Array-Auswertung dieser Probe bestätigten. Der Grund für die niedrigere RNA-Menge bzw. für die schlechtere RNA-Qualität dieser Probe konnte im Nachhinein nicht mehr eruiert werden.

### **5.1.2.2. Microarray-Technologie und Validierung durch qPCR**

Expressionsanalysen mit Hilfe von Microarrays erwiesen sich in vielen Bereichen der Human- und Tiermedizin als probates Mittel, um Veränderungen von Regulationsmechanismen im Zusammenhang mit Entstehung und Verlauf von Krankheiten auf Transkriptomebene zu untersuchen. Die Microarraytechnologie ist dabei gut geeignet, um mit kleinen Probengrößen das Expressionsmuster vieler Gene gleichzeitig zu untersuchen. Für die hier durchgeführten Analysen der Genexpression in der Haut atopischer Hunde wurde die Microarray-Technologie

der Firma Agilent gewählt. Sie ermöglicht die parallele Untersuchung von tausenden Transkripten bei einer hohen Flexibilität und Empfindlichkeit. Als Format wurde die 8x60K Variante gewählt, die die gleichzeitige Hybridisierung von 8 Arrays mit jeweils mehr als 60.000 Oligonukleotidsequenzen ermöglicht. Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität dieser 60mer-Oligonukleotid-Microarrays (RELÓGIO et al., 2002; SHIPPY et al., 2004) können aufgrund der durchgeführten statistischen Auswertung und der limitierten Anzahl an untersuchten biologischen Replikaten falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Um die Array-Ergebnisse anhand von ausgewählten Genen zu validieren, wurden die interessantesten Gene in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der qPCR-Methodik untersucht. Sie eignet sich gut zur direkten stichprobenartigen Überprüfung von Ergebnissen aus Microarrayuntersuchungen und wurde bereits in vielen Untersuchungen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden 18 differentielle Gene aus den Microarrayuntersuchungen mit Hilfe der qPCR überprüft. Die qPCR-Ergebnisse wurden in Bezug auf das geometrische Mittel von drei Referenz-Genen normalisiert ( $\Delta C_T$ -Werte) und ähnlich wie die Microarray-Daten mit Limma ausgewertet.

## 5.2. Diskussion der Ergebnisse der Microarray-Auswertung

### 5.2.1. Statistische Analyse

Nach Durchführung der statistischen Analysen (siehe Punkt 4.2.2.4.) fiel auf, dass es sowohl bei allergischen- als auch bei nichtallergischen Hunden über die Zeit Effekte im Sinne einer differentiellen Genexpression unabhängig von der aufgetragenen Lösung (Allergen/Kochsalz) gab (siehe Tab. 16 **Übersicht über die Multifactorial paired-Analysen**). Hierbei spielt sicherlich die Wundheilung, die aufgrund der Biopsieentnahme eingeleitet wird eine nicht unwesentliche Rolle.

Zusätzlich sind nicht nur lokale Effekte, sondern auch systemische Effekte (ALKIS, 2004) nach Auftragen des Allergens wahrscheinlich. Diese könnten die Genexpression auch an der mit Kochsalz-Kontrolle behandelten Haut beispielsweise durch Infiltration mit Leukozyten oder durch die Effekte von ausgeschütteten Zytokinen beeinflussen.

Der Vergleich der Basisbiopsien von allergischen und nichtallergischen Hunden

(siehe Tab.14) erbrachte keine differentiell exprimierten Gene. Dies mag auf den ersten Blick ungewöhnlich erscheinen, zumal in der Studie von Merryman-Simpson et al. aus dem Jahr 2007 insgesamt 26 differentiell exprimierte Gene beim Vergleich von makroskopisch unauffälliger Haut allergischer Hunde und der Haut von gesunden Kontrolltieren gefunden wurden (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008). Allerdings handelte es sich bei den Hunden der oben genannten Studie um Hunde mit natürlicher cAD. Bei diesen Hunden wurden zeitgleich Biopsien von Haut mit Läsionen und von normal erscheinender Haut genommen. Diese Tiere litten also zum Zeitpunkt der Entnahme der nicht-läsionaler Haut aufgrund ihrer Allergie bereits an klinischen Symptomen, was systemische Effekte zur Folge haben und damit die normal erscheinende Haut in ihrer Genexpression beeinflussen könnte. Weiterhin ist es denkbar, dass sich Hunde mit natürlich auftretender cAD in ihrer Genexpression grundsätzlich von gesunden Individuen unterscheiden. Und schliesslich könnte klinisch nicht entzündete Haut mikroskopisch schon pathologische Veränderungen zeigen. Wood et al. versuchten 2010 in einer Studie Gene, die mit der cAD assoziiert sein könnten, in Anlehnung an die beim Menschen gefundenen Kandidate-Gene zu identifizieren. Die Assoziation von Genen der an natürlicher cAD erkrankten Hunde gelang jedoch aufgrund der Rassenvielfalt und der unterschiedlichen Entnahmelokalisation der Hautbiopsien nicht (WOOD et al., 2010). Bei den Hunden der vorliegenden Studie handelt es sich um „künstlich“ sensibilisierte Tiere, bei denen gerade die „grundsätzlichen“ Expressionsunterschiede zur gesunden Kontrollgruppe, wie man sie bei den natürlich erkrankten Tieren vermuten kann, nicht erwartet werden können. Zusätzlich waren die Hunde in unserer Studie zum Zeitpunkt der Gewinnung der Basisbiopsie dem Allergen nicht ausgesetzt und zeigen möglicherweise aus diesem Grund keine systemischen Entzündungseffekte in der normalen Haut, wie man sie bei den Hunden aus der Studie von Merryman-Simpson et al. 2008 erwarten würde.

Betrachtete man nur die allergischen Tiere und verglich ihre Expression zwischen kochsalz- und allergenbehandelter Haut, waren sechs Stunden nach Allergenexposition über 300 Gene differentiell exprimiert. Davon war der Großteil im Vergleich zur Kochsalz-behandelten Haut verstärkt exprimiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Allergen-behandelte Haut anfangs stärker in Richtung Immunantwort reagiert. Beim Vergleich derselben Gruppen gab es nach

24 Stunden jedoch nur wenig differentiell regulierte Gene, möglicherweise hatte sich die Genexpression an der kochsalzbehandelten Haut aufgrund systemischer Effekte an die der allergenexponierten Haut angeglichen, wodurch kaum noch Unterschiede in der Genexpression zu finden waren.

Interessanterweise verhielt sich die Expression der Kontrolltiere beim Vergleich von kochsalz- und allergenbehandelte Haut genau umgekehrt zu der der allergischen Tiere (siehe Tab.15). Nach sechs Stunden waren lediglich 3 Gene differentiell exprimiert. Entweder hatte sich zu diesem Zeitpunkt - was die Expression angeht- tatsächlich noch nichts geändert, oder die Expression änderte sich an beiden Stellen (allergen und kochsalzbehandelte Haut) gleichermaßen, so dass keine Gene signifikant unterschiedlich exprimiert wurden. Nach 24 Stunden ergaben sich jedoch viele differentiell exprimierte Gene (über 700). Auffällig war dabei, dass bei einem Großteil dieser Gene (516) die Expression im Vergleich zur allergenexponierten Haut vermindert war. Möglicherweise wird hier der Entzündung entgegengewirkt.

Da zwischen den allergischen Hunden und den Kontrolltieren weder zum Zeitpunkt der Basisbiopsie noch sechs Stunden nach Auftragen der Lösungen (Allergen/Kochsalz) differentiell exprimierte Gene gefunden wurden, konzentrierte sich die weitere Auswertung auf den 24 h-Biopsiezeitpunkt. Die Multifactorial-Signifikanzanalyse hatte den Vorteil, dass mehr als zwei Faktoren gleichzeitig in die statistische Auswertung mit einbezogen werden konnten. Da das Ziel darin bestand, möglichst die Wirkung des Allergens bei allergischen Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe darzustellen, wurde für die bioinformatischen Analysen die diefferentiell exprimierten Gene aus dem Vergleich  $\text{DiffAvsN24} = (\text{A\_24h\_A} - \text{A\_24hS}) - (\text{N\_24h\_A} - \text{N\_24h\_S})$  der Multifactorial unpaired-Analyse herangezogen. Dieser Vergleich berücksichtigte gleichzeitig den Faktor „Behandlung“ und den Faktor „Tiergruppe“.

Die relativ hohen korrigierten P-Werte der statistischen Analyse, kommen sicherlich dadurch zustande, dass die Variation der Genexpressionswerte innerhalb der einzelnen Gruppen relativ hoch war. Dies kann durch die individuelle Reaktion der Hunde auf das Allergen erklärt werden. Möglicherweise spielen dabei Effekte der Probenentnahme eine weitere Rolle.

### 5.2.2. Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung der differentiell exprimierten Gene aus dem Vergleiches DiffAvsN24h der Multifactorial unpaired-Analyse ergab, dass diese vor allem den Gruppen Hautbarrieref bildung (Keratinisierung, Zell-zu-Zell-Verbindungen), Entzündung, Immunantwort und Wundheilung angehören.

Die HCL-Analyse zeigte grundsätzlich zwei entgegengesetzt regulierte Gencluster zwischen den allergischen- und den nichtallergischen Hunden in der mit Allergen behandelten Haut (siehe Abb. 14). Interessanterweise zeigte sich bei der DAVID-Analyse (Punkt 4.2.3.3.1), dass Gene aus Genliste 1 (in Abb. 14 mit 1 gekennzeichnet) zu den funktionellen Gruppen Entzündung, Immunantwort und Wundheilung gehörten und bei den nichtallergischen Hunden im Vergleich zu den allergischen herunterreguliert wurden. Die Gene aus Genliste 2 (in Abb. 14 mit 2 gekennzeichnet) dagegen können in die Gruppe der Hautbarrieref bildung zusammengefasst werden. Sie unterlagen bei den allergischen Hunden einer verminderten Expression.

In den weiteren Analysen ließen sich die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihrem zeitlichen Expressionsverlauf in 4 Gruppen (Cluster) einteilen (siehe 4.2.3.3.3 und 4.2.3.3.4). Cluster 1 enthielt die meisten Gene (insgesamt 328), von denen ein Großteil in der anschließenden DAVID-Analyse funktionellen Gruppen zugeordnet werden konnten, die im Zusammenhang mit Immunantwort, Entzündung und Wundheilung stehen. Es fiel auf, dass ihre Expression bei den allergischen Hunden sowohl bei Behandlung mit Allergen als auch bei Behandlung mit Kochsalzlösung im zeitlichen Verlauf zunahm. Die Zunahme war bei der Behandlung mit Allergen jedoch stärker ausgeprägt. Die Haut, die mit Kochsalzlösung behandelt wurde, zeigte nur einen geringgradigen Anstieg der Expression zwischen Basisbiopsie und der Hautprobe, die nach sechs Stunden genommen wurde. Dies könnte die Annahme bestätigen, dass sich nach 24 Stunden systemische Effekte in Bezug auf Entzündung und Immunsystem auf die Kontrollbiopsie mit Kochsalz auswirken könnten. Ein ähnlicher Verlauf konnte bei den gesunden Hunden und Kochsalz-Behandlung gesehen werden.

Erstaunlich war, dass nur in der Allergen-behandelten Haut der gesunden Hunde keine Expressionszunahme der „Entzündungs-Gene“ zwischen den Biopsien nach sechs und 24 Stunden gefunden werden konnte. Hier greifen möglicherweise Mechanismen, die einer überzogenen Immunantwort, wie sie für allergische

Patienten typisch ist, entgegen wirken.

Gene aus den Clustern 2-4 gehörten im Wesentlichen funktionellen Gruppen an, die mit der Bildung der Hautbarriere (Cluster 2: Epidermis-Differenzierung, Cluster 3+4: Zell-zu-Zell-Verbindungen) in Verbindung stehen.

Gene aus diesen Clustern werden größtenteils entgegengesetzt zu den Genen aus Cluster 1 reguliert. Das bedeutet, ihre Expression nahm über die Zeit bei nahezu allen Gruppen tendenziell ab. Es zeigte sich, dass der Rückgang der Expression wieder bei den allergischen Hunden 24 Stunden nach Auftragen von Allergen am stärksten war.

Im Jahr 2009 stellten Elias und Schmuth die neue “outside-inside-outside“ Hypothese in Bezug auf die Pathogenese der hAD vor (ELIAS & SCHMUTH, 2009). Dabei wird postuliert, dass ein genetischer Defekt der Hautbarriere die Entwicklung der atopischen Hautentzündung im Sinne einer  $T_{H2}$ -gewichteten Immunantwort fördert, was wiederum zu einer gestörten Differenzierung der Hautbarriere durch eine herabgesetzte Bildung von Proteinen des Stratum corneum führt. Diese Hypothese, die für die hAD aufgestellt wurde, stimmt mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen bei den Hunden sehr gut überein, da nach 24 Stunden bei den allergischen Hunden in der mit Allergen-behandelten Haut Gene mit Funktionen im Kontext von Entzündungsreaktionen im Vergleich zu den anderen Proben ansteigt und die Expression der „Hautbarriere-Gene“ gleichzeitig abnimmt. Diese Ergebnisse bestärken die Ähnlichkeit in der Pathogenese zwischen humaner und caniner AD. Sie klären jedoch nicht die Frage, ob es sich bei Hunden bei den in bisherigen Studien gefundenen Störungen der Hautbarriere um einen primären genetischen Defekt wie beim Menschen handelt oder allein um eine sekundäre Problematik aufgrund der Entzündungsreaktionen, die mit der AD einhergehen (THIERRY, 2011).

Bei den nichtallergischen Hunden kam es nach Auftragen des Allergens zwischen der sechs und 24 h Biopsie zu keiner nennenswerten Senkung des Expressionsniveaus der „Hautbarriere-Gene“ (im Gegensatz zu allen anderen Gruppen). Ganz im Gegenteil stieg die Expression vom sechs zum 24 h-Wert sogar etwas an. Möglicherweise existieren auch in diesem Fall Regulationsmechanismen bei gesunden Hunden, die versuchen, einer defekten Hautbarriere entgegenzuwirken. Denkbar wäre jedoch auch, dass lediglich die Herunterregulation der „Hautbarriere-Gene“ wegfällt, weil die

Entzündungsreaktion besser kontrolliert und die Bildung der Proteine für die Hautbarriere nicht weiter beeinflusst wird.

### **5.3. Identifizierung von Kandidatengenen**

Ziel dieser Arbeit war es, die Genexpressionsergebnisse von atopischen Hunden in schon veröffentlichten Studien beim Hund und Mensch zu bestätigen und zu erweitern, mögliche Unterschiede zwischen künstlich sensibilisierten und natürlich erkrankten Hunden aufzuzeigen und neue Kandidatengene für weiterführende Studien und neue Therapiemöglichkeiten zu identifizieren. Aus den Analysen mit DAVID, KEGG MAPPER-Pathway, Copub und den Expressionsverläufen wurden Gengruppen ausgewählt, die in Bezug auf differentielle Regulation während der Allergen- und Kochsalz-Exposition nach 24 Stunden auffällig erschienen. Gene, die bei den nichtallergischen Hunden im Vergleich zu den allergischen Hunden vermindert exprimiert wurden, sind für Entzündung, Immunantwort und Wundheilung relevant. Die vermindert exprimierten Gene der allergischen Hunde stehen im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Hautbarriere. Im Folgenden wird auf ausgewählte Gene detaillierter eingegangen. In Anhang 9.6 sind die diskutierten Gene für die Gruppen der Multifactorial unpaired-Analyse des 24 h Zeitpunktes mit ihren VSN-Durchschnittswerten und den  $\Delta$ -VSN-Werten aufgeführt.

#### **5.3.1. Gene mit erhöhter Expression in der Haut atopischer Hunde bzw. mit verminderter Expression in der Haut gesunder Hunde**

##### **5.3.1.1. Zytokine und Rezeptoren**

Die Klasse der Zytokine setzt sich aus einer sehr heterogenen Gruppe von Proteinen zusammen, die durch Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems gebildet werden. Sie wirken an den für sie spezifischen Zellrezeptoren. Zwischen ihnen und ihren Rezeptoren besteht eine sehr hohe Affinität, so dass eine geringe Menge an Zytokin ausreicht, um einen Effekt auszulösen. Die Expression dieser Rezeptoren wird durch äußere Einflüsse ebenso wie durch die Zytokine selbst gesteuert. Dadurch ändert sich die Ansprechbarkeit der Zellen auf ein bestimmtes Zytokin-Signal entsprechend. Meist werden Zytokine während der Antwort gegenüber Mikroorganismen oder anderen Ag gebildet, vermitteln bzw. regulieren die Immunität und Entzündungsreaktion

(ABBAS, 2000) und sind wichtig für die Gewebehomöostase (CHIZZOLINI et al., 2009; KOPF et al., 2010). Das Spektrum der Zytokine umfasst die Chemokine, die Interleukine, die Mitglieder der TNF-Superfamilie sowie verschiedene Wachstumsfaktoren.

Allergische Krankheiten beim Hund, besonders die cAD, zeigen viele Ähnlichkeiten zu denen des Menschen (REEDY et al., 1997). Hunde werden als Tiermodell für die Erforschung der hAD verwendet (MARSELLA & GIROLOMONI, 2009). Dennoch gibt es relativ wenige Informationen über die Schlüssel-Zytokine, die an der cAD beteiligt sind, über ihre Signalwege und ihre Funktion.

### 5.3.1.1.1. Chemokine

Chemokine haben im Immunsystem wichtige Funktionen bei der Regulation der Homöostase, bei dem Verlauf von Infektionen und Entzündung durch Steuerung der Leukozytenmigration (ABBAS, 2000). Zusätzlich sind sie in die Angiogenese (BELPERIO et al., 2000) und Tumorgenese (DHAWAN & RICHMOND, 2002; CHENG et al., 2011) involviert.

Abhängig von der Reihenfolge der Cysteine werden sie in zwei verschiedene Untergruppen eingeteilt. Folgen zwei Cysteine aufeinander, so handelt es sich um CC Chemokine, liegt eine andere Aminosäure dazwischen, werden sie CXC Chemokine genannt. Während einer Entzündung wirken die CXC Chemokine besonders auf Neutrophile und die CCs auf Monozyten, Lymphozyten und Eosinophile.

Alle der differentiell exprimierten Chemokin-Gene wiesen eine deutlich verminderte Expression in der Haut der nichtallergischen Hunde nach Allergen auf. Im Vergleich dazu zeigten diese Gene eine vermehrte Expression in der Haut der sensibilisierten Hunde. Differentiell exprimiert waren die Gene für CCL2, CCL3, CCL4, CCL8, CCL13, CCL19, CXCL1, CXCL6, CXCL16. Für das Chemokin-Rezeptor-Gen *CXCR6* konnte ebenfalls eine erhöhte Expression bei allergischen in der mit Allergen behandelten Haut und eine im Vergleich dazu stark herabgesetzte Expression in der Haut der nichtallergischen Hunden nachgewiesen werden. Für das *CCL2* wurde die höchste Expressionsänderung gefunden (FC=5).

Die Chemokine CCL2, CCL3, CCL4 und CCL13 wurden bei Patienten mit hAD

in erhöhten Konzentrationen in Haut und/oder Serum nachgewiesen (TAHA et al., 2000; GIUSTIZIERI et al., 2001; KABURAGI et al., 2001).

Damit sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine Ähnlichkeit zwischen hAD und cAD. Bei Hunden mit AD sind für die Entzündung der Haut  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen verantwortlich (SCHLOTTER et al., 2011). Dies könnte bei unseren Hunden im Zusammenhang mit der vermehrten *CCL2* Expression stehen, da *CCL2* beim Menschen bekannterweise zur Akkumulation von  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen sowie Monozyten und DC führt (GIUSTIZIERI et al., 2001; HOMEY et al., 2006; WITTMANN & WERFEL, 2006).

Die Funktion von *CCL19* ist noch nicht eindeutig geklärt, es scheint jedoch an der Lymphozyten-Rezirkulation und am Lymphozyten-Homing beteiligt zu sein (NANDAGOPAL et al., 2011). Möglicherweise könnte es auch bei der Rekrutierung der Leukozyten in die Haut von atopischen Hunden eine Rolle spielen.

*CCL8* spielt für die Chemotaxis von Monozyten, Lymphozyten und Eosinophilen hin zum Entzündungsherd eine wichtige Rolle. Es wurde erst kürzlich im Kontext der AD evaluiert. Islam et al. zeigten in einer Studie von 2011, dass kutanes *CCL8* zur Ansammlung von hoch differenzierten *CCR8*-exprimierende  $T_{H2}$ -Zellen in allergische Haut führt (ISLAM et al., 2011), was möglicherweise eine chronische Entzündung mit eosinophilen Granulozyten zur Folge hat (DEBES & DIEHL, 2011).

Es ist also denkbar, dass *CCL8*, dessen mRNA bei unseren atopischen Hunden nach 24 Stunden vermehrt exprimiert wurde, auch bei der cAD ein Kandidaten-Gen für die Pathophysiologie der Immunantwort bei der AD darstellt. Es ist möglicherweise auch beim Hund für die Rekrutierung von  $T_{H2}$ -Zellen in die läsionale Haut und die anschließende Entzündung mit Eosinophilen mitverantwortlich.

Die Rolle der identifizierten CXC-Chemokine ist bei der AD noch relativ unklar. CXCL1 wurde in der Haut von Patienten mit hAD und neutrophilem Zellinfiltrat zusammen mit CXCL5 und IL8 (CXCL8) nachgewiesen (KALISH & PHILLIPS, 2011). Neutrophile Granulozyten können im zellulären Infiltrat von läsionaler Haut bei Hunden mit AD nachgewiesen werden (OLIVRY et al., 1997). CXCL1 spielt also möglicherweise auch beim Hund eine Rolle für das Einwandern

neutrophiler Granulozyten. CXCL6 bewirkt die Anlockung von neutrophilen Granulozyten (PROOST et al., 1993) und Endothelzellen bei der Angiogenese (STRIETER et al., 1995), seine Beteiligung wurde bei verschiedenen immunologischen Prozessen nachgewiesen, jedoch bisher noch nicht im Zusammenhang mit der AD beschrieben. Erwähnenswert scheint, dass CXCL6 bei Patienten mit Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, in ulzerierten Abschnitten der Darmschleimhaut von Endothelzellen vermehrt exprimiert wird (GIJSBERS et al., 2004). Dieses Zytokin ist also möglicherweise gemeinsam mit anderen Faktoren bei der cAD an der neutrophilen Entzündung beteiligt.

CXCL16 ist ein Ligand für den CXCR6 Chemokin-Rezeptor. CXCL16 ist wie CXCL6 an der Entzündungsreaktion im Darm bei Patienten mit Morbus Crohn beteiligt (DIEGELMANN et al., 2010; UZA et al., 2011). Günther et al. zeigten in einer aktuellen Studie, dass CXCR6-CXCL16 Interaktionen bei Patienten mit Psoriasis am "skin-homing" von zytotoxischen CD8+-T-Zellen beteiligt sind. In immunhistochemischen Färbungen konnten sie nachweisen, dass CXCL16 von Monozyten, Keratinozyten und DC in der Haut von Patienten mit Psoriasis stärker exprimiert wurde, als in der von Patienten mit AD oder in der Haut der gesunden Kontrollgruppe (GÜNTHER et al., 2011). Andere Studien belegen, dass dieser Rezeptor nicht nur von CD8+-Zellen, sondern auch von  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$ -Zellen exprimiert wird (MORGAN et al., 2005; LATTA et al., 2007). Möglicherweise stellt CXCR6 einen wichtigen Entzündungsmediator in  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -vermittelten Entzündungen dar. Die chemotaktischen Eigenschaften von CXCL16 scheinen für  $T_{H2}$ -Zellen bei Asthmatikern in der Lunge gering zu sein (LATTA et al., 2007). Es wird jedoch vermutet, dass die Expression von CXCR6 und CXCL16 eine wichtige Rolle bei der Stimulation oder bei der Aufrechterhaltung von T-Zell-Aktivierung in der Lunge haben könnten. Latta et al. konnten zusätzlich einen entzündungshemmenden Effekt nach Blockade des CXCR6 nachweisen, sogar nachdem Lymphozyten bereits rekrutiert worden waren (LATTA et al., 2007). Im Zusammenhang mit der AD wurde diese Chemokin-Rezeptor Kombination noch nicht diskutiert. Sie scheint bei zahlreichen chronisch-entzündlichen Erkrankungen eine Rolle zu spielen und könnte auch an der Pathophysiologie der AD beteiligt sein. Es ist denkbar, dass eine Hemmung des CXCR6-Rezeptors, oder eine Unterdrückung der Produktion seines Liganden CXCL16 die Entzündungsreaktion in der Haut herabsetzen könnte.

Insgesamt fiel die herabgesetzte Expression der Chemokine bei nichtallergischen Hunden auf, welche Faktoren dazu führen konnte jedoch nicht geklärt werden.

### 5.3.1.1.2. Interleukine

Interleukine vermitteln die Kommunikation zwischen Leukozyten und anderen an der Immunreaktion beteiligten Zellen.

In der vorliegenden Arbeit sank die Expression von IL33 bei den nichtallergischen Hunden nach Behandlung mit dem Allergen stärker als bei den allergischen Hunden. Damit war das Expressionsniveau der Allergiker im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppen nach Allergenexposition höher. IL33 ist ein relativ neues Interleukin der IL1-Familie, das von zahlreichen Zellen und verschiedenen Geweben nach proinflammatorischer Stimulation und Zelllyse exprimiert wird (SCHMITZ et al., 2005; LIEW et al., 2010). Der IL33-Rezeptor ist ebenfalls weit verbreitet und wird auch von  $T_{H2}$ - und Mastzellen exprimiert (LIEW et al., 2010). Bei Patienten mit Anaphylaxie und in der Haut von Atopikern konnte nachgewiesen werden, dass IL33 zu einer durch  $T_{H2}$ -Zellen geprägten Immunantwort und zur Degranulation von IgE aktivierten Mastzellen führt (PRÉFONTAINE et al., 2009). Diese Erkenntnisse führen zu der Annahme, dass IL33 für die Pathophysiologie der AD eine wichtige Rolle spielt. Beim Hund mit AD wurde eine gestörte Expression dieses Interleukins bisher noch nicht identifiziert. Möglicherweise spielt es auch hier eine wichtige Rolle für die  $T_{H2}$ -Immunantwort und die Mastzellaktivierung und deren Degranulation für die Ausprägung der klinischen Symptome. Somit könnte IL33 einen neuen Anstanzpunkt für therapeutische Maßnahmen bei cAD darstellen.

Die Konzentration der mRNA für den Interleukinrezeptor IL13RA2 war bei den gesunden Hunden nach 24 Stunden erniedrigt. Zwischen allergischen und gesunden Hunden zeigte sich zwischen kochsalz- und allergenbehandelter Haut eine genau entgegengesetzte Expression.

IL13 ist ein Zytokin, das durch Bindung an einen Rezeptorkomplex aus IL13RA1 und IL4RA eine herausragende Rolle bei der Induktion und der Aufrechterhaltung der IgE-Produktion spielt und zu den Zytokinen der  $T_{H2}$  geprägten Immunantwort gezählt wird (LEUNG et al., 2004). Vorangegangene Studien unterstellen IL13 eine zentrale Rolle bei Asthma (GRÜNIG et al., 1998; WILLS-KARP et al., 1998) und atopischer Dermatitis. Es wurde gezeigt, dass IL13 verstärkt im Blut

(KATAGIRI et al., 1997) und in der Haut von Patienten mit hAD und besonders in akuten Läsionen exprimiert wird (HAMID et al., 1996).

Der IL13RA2 bindet IL13 mit hoher Affinität. IL13RA2 war im Serum von Patienten mit hAD nachweislich erhöht (HUSSEIN et al., 2011) und bei Mäusen wurde eine lösliche nicht zellgebundene Form des IL13RA2 nachgewiesen (sIL13RA2) (CHOMARAT & BANCHEREAU, 1998). Die canine Form dieses Rezeptors ähnelt der humanen Form (TANG, 2001). Der Rezeptor bindet IL13 mit hoher Affinität und es wird vermutet, dass er als IL13-Köder agiert indem er IL13 abfängt und somit seine Wirkungen hemmt (CHOMARAT & BANCHEREAU, 1998). Unsere Ergebnisse könnten ein Hinweis auf eine ähnliche Rolle dieses Rezeptors beim Hund sein. Nichtallergische Hunde wiesen eine verminderte Expression auf, möglicherweise weil sie, im Gegensatz zu den allergischen Hunden nach Auftragen von Allergen, weniger molekulare Entzündungssignale aufwiesen, die eine IL13RA2 Expression ankurbeln könnten. Weitere Studien in diese Richtung sind notwendig, um die Rolle von IL13RA2 als neues diagnostisches Mittel oder als neuen Therapieansatz durch Hemmung der Wirkung von IL13 bei der cAD zu klären.

Die mRNA von IL18BP (IL18 binding protein), einem Molekül, dem ebenfalls entzündungshemmende Eigenschaften durch Bindung von IL18 zugeschrieben werden (NOVICK et al., 1999), wies in der allergenbehandelten Haut der atopischen Hunde eine erhöhte Expression auf. Nichtallergische Hunden zeigten eine erniedrigte Expression dieses Gens. IL18BP bindet IL18 mit hoher Affinität und verhindert so die Bindung an seinen Rezeptor, was eine Hemmung der T-Zell-Immunantwort zur Folge hat. IL18 führt in Anwesenheit von IL12 zur Stimulation der  $T_{H1}$ -Immunantwort (OKAMURA et al., 1998), ohne IL12 jedoch zur Entwicklung von  $T_{H2}$ -Lymphozyten (YOSHIMOTO et al., 1999; YOSHIMOTO et al., 2000). Erhöhte IL18 Serumspiegel wurden bei Patienten mit hAD und im Mausmodell nachgewiesen (TANAKA et al., 2001). Auch in der Haut bei Patienten mit AD konnte IL18 in höheren Konzentrationen als bei gesunden Kontrollgruppen gemessen werden (WITTMANN et al., 2009). Weitere chronisch-entzündliche Krankheiten, bei denen IL18 eine wichtige Rolle spielt, sind Psoriasis (Schuppenflechte) (OHTA et al., 2001), rheumatoide Arthritis (GRACIE et al., 1999) und Morbus Crohn (PIZARRO et al., 1999). Keratinozyten sind in der Lage, IL18BP nach proinflammatorischen Stimuli freizusetzen und der

Entzündung dadurch entgegen zu wirken (PAULUKAT et al., 2001). Es wurde nachgewiesen, dass IL18BP vor der Entwicklung einer Kontakt-Dermatitis schützt (PLITZ et al., 2003). Rekombinantes humanes IL18BP wird momentan für die Therapie von Psoriasis und rheumatoider Arthritis erprobt (TAK et al., 2006). Die Rolle von IL18-BP bei AD wurde in der Literatur bisher noch nicht diskutiert. Durch seine entzündungshemmenden Eigenschaften könnte es sich um eine viel versprechende zusätzliche Therapie zur Linderung der Entzündung bei Hunden und Menschen mit AD handeln.

Möglicherweise handelt es sich bei IL18BP und IL13RA2 lediglich um Anzeichen für ein negatives Feedback der Entzündung.

### **5.3.1.1.3. Tumor Nekrose Faktor/Rezeptor-Superfamilie**

Die Tumor Nekrose Faktor/Rezeptor-Superfamilie (TNF/TNFR-Superfamilie) ist ein System von derzeit mehr als 40 identifizierten Ligand- und Rezeptor-Proteinen, die in der Regel von Zellen des Immunsystems gebildet werden und die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung sowie die Apoptose von Zellen beeinflussen. Zu diesem Zweck interagieren membrangebundene und/oder lösliche Liganden der TNF-Superfamilie mit einem oder mehreren spezifischen membrangebundenen und/oder löslichen Rezeptoren der korrespondierende TNF-Rezeptor-Superfamilie (HEHLGANS & PFEFFER, 2005).

Der TNF-Ligand TNFSF13B, oder auch “B cell activating factor of the TNF family” (BAFF) genannt, ist ein wichtiger Überlebensfaktor für periphere B-Lymphozyten (MACKAY & SCHNEIDER, 2009). Die Rolle der B-Lymphozyten in der Pathophysiologie von Allergien durch IgE Produktion ist unumstritten (NAGEL et al., 2009), obwohl die Faktoren, welche B-Zellen aktivieren und zur Entstehung von Allergien beitragen, noch nicht vollständig geklärt sind. BAFF wird sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form exprimiert (MACKAY & SCHNEIDER, 2009). Bei allergischen Krankheiten wurde von erhöhten Serum-BAFF-Werten bei Asthmatikern (KANG et al., 2006) und Kindern mit AD (JEE et al., 2010) berichtet. Bei Erwachsenen mit AD konnten jedoch keine erhöhten Serumwerte bestätigt werden (MATSUSHITA et al., 2008; CHEN et al., 2011). Dafür konnten Chen et al. in ihrer Studie erhöhte BAFF-Konzentrationen in Haut von Atopikern nach Patch Test nachweisen (CHEN et al., 2011). Dieselbe Studie zeigte, dass BAFF in atopischer Haut durch Keratinozyten, eingewanderte

T-Zellen und Makrophagen exprimiert wird (CHEN et al., 2011). Die Ergebnisse der Studien bei hAD lassen vermuten, dass BAFF bei der frühen Form der AD eine Rolle spielt, jedoch nicht mehr im Erwachsenenalter. Dies scheint sich auch in der lokalen Reaktion der Haut wider zu spiegeln, wo BAFF nur in akuten Läsionen nach Allergen Patch Test, jedoch nicht in natürlich entstandenen Läsionen nachgewiesen werden konnte (JOHANSSON et al., 2002). Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch bei Hunden mit AD homolog zum Menschen *BAFF* in akuten Läsionen nach Allergen Patch Test stärker exprimiert wird, als in der Haut die mit Kochsalz behandelt wurde. Bei nichtallergischen Hunden verhält sich die Expression genau entgegengesetzt. Dort ist die Expression von BAFF nach 24 Stunden in der kochsalzbehandelten Haut höher, als in der allergenbehandelten Haut. Interessant wäre es, in weiteren Studien zu untersuchen, ob sich BAFF bei Hunden mit cAD im Serum nachweisen lässt oder nur in der Anfangsphase der Erkrankung eine Rolle spielt. Möglicherweise könnte die Rolle von BAFF in der Pathophysiologie der hAD am Hundemodell geklärt werden, sofern die weiteren Ergebnisse mit denen beim Menschen übereinstimmen.

Die Expression von TNFAIP6 (tumor necrosis factor alpha induced protein 6) kann durch proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha und IL1 induziert werden (LEE et al., 1992). Erhöhte Spiegel wurden in Synovia von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis nachgewiesen (WISNIEWSKI & VILČEK, 1997). Es wird vermutet, dass TNFAIP6 einen entzündungshemmenden Effekt hat und Teil eines negativen Feedback-Mechanismus sein könnte (WISNIEWSKI & VILČEK, 1997; MILNER & DAY, 2003). Weiterhin aktiviert TNFAIP6 inter- $\alpha$ -Inhibitor, ein entzündungshemmendes Agens des im Zusammenhang mit Entzündungen stehenden Protease-Netzwerks (FRIES & KACZMARCZYK, 2003). In einer Studie von 2007 wurde in der Flüssigkeit der bronchioalveolären Lavage von Asthmatikern, nachdem sie Allergen ausgesetzt wurden, ebenso wie in den Atemwegen von Rauchern erhöhte Konzentrationen von TNFAIP6 gefunden (FORTEZA et al., 2007). Daraus wurde auf eine protektive Wirkung von TNFAIP6 geschlossen. Park et al. (2006) wiesen eine verminderte Expression dieses Gens in Fibroblasten nach, die aus Hautbiopsien von Menschen mit hAD gewonnen wurden und vermuteten, dass die Expressionshemmung mit dem Schweregrad der Entzündung assoziiert sein könnte (PARK et al., 2006). Allerdings ist nicht bekannt, ob dieses Gen in der

nicht betroffenen Haut ebenfalls eine verminderte Expression aufweist oder womöglich aufgrund einer Expression durch andere Zellen doch insgesamt verstärkt exprimiert vorliegt. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, die Ergebnisse unserer Studie mit denen von Park et al. zu vergleichen. Ob TNFAIP6 in der Haut von Menschen und Hunden mit natürlich vorkommender AD im Vergleich zu normaler Haut tatsächlich insgesamt in verminderter Konzentration vorliegt, wie Park et al. vermuten lassen (PARK et al., 2006), ist unklar. Durch die Expressionsanalysen konnten wir eine stark herabgesetzte Expression dieser mRNA in der Kontrollgruppe 24 Stunden nach Allergenexposition nachweisen. Das Expressionsniveau bei den allergischen Hunden nach Behandlung mit Allergen und Kochsalz und bei nichtallergischen Hunden nach Kochsalzbehandlung ähnelte sich und lag höher als das der Nichtallergischen nach Allergenexposition. Nachdem sich in einem Mausmodell herausstellte, dass TNFAIP6 entzündungshemmende Wirkung hat (WISNIEWSKI et al., 1996), wird dieses Molekül oftmals als Ansatzpunkt für neue Therapien von entzündlichen Krankheiten diskutiert. Unsere Ergebnisse und die Tatsache, dass TNFAIP6 bei entzündlichen Erkrankungen nahezu ausschließlich in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen wurde, aber Entzündungen dennoch vorlagen und den Patienten Beschwerden bereiteten, steht allerdings im Gegensatz zu dieser Hypothese. Diese Ungereimtheiten gilt es, in weiteren Studien zu untersuchen.

Wie in Punkt 2.2.3.2.2. beschrieben, spielen DC durch Präsentation von Ag und T-Zell-Stimulation eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AD. Die Stimulation der Immunantwort wird durch Co-Faktoren mit gesteuert. Nach Aktivierung der DC durch Ag (z.B. Allergen) kommt es während ihrer Reifung zu einer vermehrten Expression von stimulierenden Co-Faktoren wie beispielsweise TNFSF9. TNFSF9 ist ein membrangebundener Ligand der TNF-Familie, der hauptsächlich auf APC und besonders auf DC identifiziert wurde (CHOI et al., 2009) und an seinen Gegenpart, den Rezeptor TNFRSF9 bindet, der überwiegend von aktivierten T- und B-Lymphozyten sowie von Monozyten exprimiert wird (POLLOK et al., 1993; SCHWARZ et al., 1995; WU et al., 2011). Die Rolle von TNFSF9 und seinem Rezeptor ist bisher nicht eindeutig geklärt und scheint zum Teil widersprüchlich. In manchen Studien wird vermutet, dass TNFRSF9 einen Co-Rezeptor zur T-Zell-Proliferation darstellt (GOODWIN et al., 1993; SCHWARZ et al., 1996; WU et al., 2011), andere Studien dagegen haben

Hinweise dafür gefunden, dass die Aktivierung des Rezeptors zur Apoptose von T-Zellen führt (LANGSTEIN et al., 1998). In Tumorstudien wurde nachgewiesen, dass DC, die TNFSF9 stärker exprimierten, eine bessere Immunantwort und damit eine bessere Antitumor-Antwort erreichten (WU et al., 2011). Heinisch et al. 2011 wiesen in einer Studie eine erhöhte Expression von TNFRSF9 in eosinophilen Granulozyten von Menschen mit extrinsischer AD und Asthma mit erhöhtem IgE-Spiegel nach. Gesunde und Patienten, die an der intrinsischen Form der AD litten, wiesen keine vermehrte Expression dieses Rezeptors auf. Bei Eosinophilen wurde die Expression von TNFRSF9 durch einen löslichen T-Zell abhängigen Faktor induziert. Somit scheint seine Expression wie bei T-Zellen abhängig von der Aktivierung der Zelle zu sein. Heinisch et al. konnten zusätzlich zeigen, dass TNFRSF9 zur Blockade von apoptosehemmenden Mediatoren führte. Sie nahmen an, dass TNFRSF9 in Situationen, in denen eine hohe Konzentration an überlebensfördernden Faktoren für eosinophile Granulozyten vorliegt, einen limitierenden Faktor für die Akkumulation von Eosinophilen und somit eine Art Feedback Mechanismus darstellen könnte (HEINISCH et al., 2001). Gesunde Hunde zeigten 24 Stunden nach Allergenexposition eine verminderte und im Gegesatz dazu in der mit Kochsalzlösung behandelten Haut eine höhere Konzentration der Liganden TNFSF9-mRNA. Bei den atopischen Hunden verhielt es sich genau umgekehrt. Sollte TNFSF9 die Immunantwort fördernende Eigenschaften besitzen, wie es in den Tumorstudien vermutet wurde, könnte die verminderte Expression bei den nichtallergischen Hunden auf eine Hemmung der Immunantwort hinweisen (möglicherweise als Negatives Feedback) und ein Hinweis für die übersteigerte Immunantwort von allergischen Individuen sein. Ob TNFSF9 bei der Aktivierung und Proliferation von T- und B-Zellen eine Rolle spielt oder möglicherweise zur Verminderung der Zahl der eosinophilen Granulozyten beiträgt und somit entzündungshemmende Eigenschaften hat, ist weiterhin unklar. Möglicherweise verhält es sich ähnlich wie mit seinem Rezeptor und seine Funktion ist abhängig von der momentanen Situation. Es wäre denkbar, dass seine Konzentration während der Proliferation der T-Zellen ansteigt, zur Anlockung von Eosinophilen führt und ab einer gewissen Konzentration apoptosefördernd wirkt und dadurch regulatorische Funktionen in der Immunantwort übernimmt. Diese Hypothese würde die Ergebnisse der vorher erwähnten scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse von Toodwin et al., Schwarz et al., Wu et al. und Langstein et al. möglicherweise erklären. Die Rolle, die

TNFSF9 und seinem Rezeptor bei der AD tatsächlich zukommt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

### 5.3.1.2. Chitin und seine Rolle bei allergischen Entzündungen

Chitin ist ein Polysaccharid, das beim Säugetier nicht vorkommt und ist nach Cellulose das häufigste Polysaccharid in der Natur. Es stellt eine wichtige Komponente für Zellwände von Pilzen und das Exoskelett und den Verdauungstrakt von Insekten dar. Vor kurzem untersuchten mehrere Studien die Wirkung von Chitin auf das Immunsystem *in vivo* und *in vitro* und konnten neue Erkenntnisse bezüglich der Regulation von Chitin gegenüber der angeborenen und der erworbenen Immunantwort aufzeigen. Es konnte nachgewiesen werden, dass exogenes Chitin unter anderem Makrophagen aktivieren kann. Dies geschieht durch Interaktion mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren wie beispielsweise dem Makrophagen Mannose Rezeptor (MRC1), dem Toll-like Rezeptor2 (TLR2) (DA SILVA et al., 2008; SHIBATA et al., 2008), dem C-type lectin receptor Dectin 1 (CLEC7A) (LEE, 2009) und dem Leukotrien B4 Rezeptor (BLT1) (REESE et al., 2007). In der Haut der gesunden Beagles konnte im Unterschied zu den sensibilisierten eine verminderte Expression von MRC1, TLR2 und CLEC7A nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis auf die Aktivierung und eine höhere Anzahl von Makrophagen durch das Allergen der Hausstaubmilbe bei den allergischen Hunden sein und möglicherweise zur T<sub>H1</sub>-Aktivierung, die bei chronischer Dermatitis gesehenen wird, beitragen.

Bis vor kurzem wurde vermutet, dass den Säugetieren im Gegensatz zu Wirbellosen Tieren Chitininasen fehlen. Studien haben jedoch eine Familie von Chitininasen und Chitinase-ähnlichen Proteinen (CLP=chitinase like proteins) nachgewiesen, von denen ein Großteil ihre Enzymaktivität durch Mutationen verloren haben (BLEAU et al., 1999; CHANG et al., 2001). Neue Studien vermuten einen Zusammenhang zwischen CLPs und der Entwicklung und dem Fortschreiten von allergischen Entzündungen und Gewebeumbau. CHI3L1 (Chitinase3-like1) kodiert für ein Protein (YKL40), dem die Chitinase-Aktivität fehlt und das in der Vergangenheit mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht wurde, welche durch Entzündung und Gewebeumbau charakterisiert sind (JOHANSEN et al., 1996; KUCUR et al., 2007; LEE & ELIAS, 2010). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass CLPs Chitin-Partikel an ihrer inaktivierten

katalytischen Domäne binden können (RENKEMA et al., 1998). Die Expression von CHI3L1 wird durch IL13- und T<sub>H2</sub>-Immunantwort stimuliert. Mäuse, bei denen dieses Gen inaktiviert wurde, zeigten eine geringere IL13 und T<sub>H2</sub>-induzierte Entzündungsreaktion (LEE et al., 2009). Erhöhte Konzentrationen im Serum und in der Lunge von Astmatikern korrelierten mit dem Schweregrad der Erkrankung. Polymorphismen im *CHI3L1*-Gen korrelierten mit den YKL-40 Konzentrationen und Asthma (CHUPP et al., 2007; OBER et al., 2008; OBER & CHUPP, 2009). Eine weitere Promotor Variante von *CHI3L1* scheint mit Atopie bei Kindern assoziiert zu sein (SOHN et al., 2008). Um eine bessere Sensibilisierung mit Ovalbumin, einem Chitin-freien Allergen, zu erzielen, wird die Verwendung von YKL-40 empfohlen (LEE et al., 2009). Welche Rolle YKL-40 jedoch bei allergischen Reaktionen mit Chitin-haltigen Allergenen spielt, ist bisher nicht bekannt. Die Expressionsminderung von *CHI3L1* bei den Kontrollhunden und die entsprechend höhere Expression dieser mRNA bei den sensibilisierten Hunden spricht für eine ähnliche Rolle des Proteins beim Hund wie beim Menschen. Seine Funktion in der Pathophysiologie der AD sollte in weiteren Studien untersucht werden. Möglicherweise ist es an der Aufrechterhaltung der Immunantwort beteiligt, zumal nachgewiesen wurde, dass es die Apoptose von T-Zellen und Makrophagen durch Hemmung der Fas Expression verhindert (LEE et al., 2009). Die Zukunft wird zeigen, ob es sich um ein mögliches Ziel-Protein für neue Therapien bei AD von Mensch und Hund eignet.

### **5.3.1.3. Weitere Gene mit erhöhter Expression in der Haut atopischer bzw. mit herabgesetzter Expression in der Haut gesunder Hunde**

Die T<sub>H2</sub>-Immunantwort spielt im Entzündungsmuster bei hAD und cAD eine wichtige Rolle. Das suppressor of cytokine signaling 3 (*SOCS3*)-Gen kodiert für ein Mitglied der SOCS Familie, deren Expression durch Zytokine induziert wird und die eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren darstellt (ELLIOTT & JOHNSTON, 2004). SOCS Proteine sind an der Kontrolle des Gleichgewichts zwischen T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Immunantwort beteiligt (ARAKAWA et al., 2004), wobei *SOCS3* überwiegend von T<sub>H2</sub>-Zellen exprimiert wird. Seine Expression korreliert mit dem Schweregrad der klinischen Symptome bei Patienten mit hAD und fördert die T<sub>H2</sub>-Zell Differenzierung (SEKI et al., 2003; YOSHIMURA et al.,

2007). SCHLOTTER et al. 2011 untersuchten die Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in akuten und chronischen Läsionen und in nicht-läsionaler Haut von Hunden mit natürlich auftretender AD und verglichen sie mit der von gesunden Hunden. Sie fanden eine erhöhte *SOCS3*-Expression in nicht-läsionaler und läsionaler Haut im Vergleich zur Kontrollhaut (SCHLOTTER et al., 2011).

In der vorliegenden Studie konnte nach 24 h bei den sensibilisierten Hunden eine vermehrte Expression von *SOCS3* in mit Allergen und Kochsalz behandelter Haut nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die Kontrollgruppe eine stark verminderte Expression in der allergenbehandelten Haut. Bei sensibilisierten Hunden könnte *SOCS3* für die Aufrechterhaltung der Entzündung bei cAD mitverantwortlich sein. Weshalb *SOCS3* bei natürlich erkrankten Hunden in nicht-läsionaler Haut ebenfalls vermehrt exprimiert wird, ist unklar. Denkbar wäre, dass die chronische AD durch länger andauernde Konzentrationserhöhung von Zytokinen im Serum zu einer "Generalisierung" der Expressionsänderung führt. Eine Hemmung von *SOCS3* könnte für die Therapie der AD von Bedeutung sein und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die Haut besitzt eine Vielzahl an Abwehrmechanismen, um den Körper vor exogenen Faktoren und Infektionen zu schützen. Sie produziert unter anderem antimikrobielle Peptide (AMP) wie beispielsweise Cathelicidine und  $\beta$ -Defensine (reviewed von KOLLS et al., 2008), die einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems darstellen und eine effektive bakterizide Wirkung haben. In gesunder Haut ist die Konzentration an AMP relativ gering, steigt jedoch während Wundheilung, Infektionen und Entzündung der Haut zum Schutz vor pathogenen Keimen an (ONG et al., 2002b; SCHAUBER et al., 2007). Sowohl Menschen als auch Hunde mit AD neigen zu rezidivierenden Sekundärinfektionen der Haut (siehe auch Punkt 2.2.3.4.4.). Bei der hAD konnte eine niedrigere Konzentration an AMP nachgewiesen werden (ONG et al., 2002b). HOWELL et al. zeigten, dass  $T_{H2}$ -Zytokine wie IL4, IL10 und IL13 die Expression von AMP senken können und vermuteten, dass dieses Phänomen für die Infektionsneigung von atopischen Patienten mitverantwortlich sein könnte (HOWELL et al., 2005; HOWELL et al., 2006).

BCL-3 (B-cell CLL/lymphoma 3) wurde ursprünglich als Proto-Onkogen bei B-Zell-Leukämie identifiziert (MCKEITHAN et al., 1990). In späteren Studien

zeigte sich, dass BCL3 von verschiedenen Zellen wie zum Beispiel von Lymphozyten (BRASIER et al., 2001) und Keratinozyten (MASSOUMI et al., 2006) exprimiert wird und bei Keratinozyten als Transkriptionsfaktor mit modulierender Eigenschaften auf die Expression von Proteinen der angeborenen Immunantwort wirkt. Seine Expression wird durch T<sub>H</sub>2-Zytokine (IL4, IL13) stimuliert (BÜCHAU et al., 2009). In Keratinozyten senkt BCL3 die Expression von antimikrobiellen Peptiden (AMP) und erhöht die TNF- $\alpha$  abhängige Expression von IL8 und IL6. Weiterhin wies läsionale Haut von Menschen mit AD eine höhere Konzentration an BCL3 auf. Durch Gabe von Vitamin D3 konnte die Expression von BCL-3 bei atopischen Patienten gesenkt werden (BÜCHAU et al., 2009).

Unsere Ergebnisse in Bezug auf die BCL-3 Expression stimmen mit den Beobachtungen von Büchau et al. beim Menschen überein und könnten ein Hinweis für die Beteiligung von BCL3 an der Infektionsneigung von atopischen Hunden durch Senkung der Expression von AMP sein. Die Kontrollgruppe wies eine stark erniedrigte Expression von *BCL3* auf. Möglicherweise stellt Vitamin D3 auch für den Hund einen neuen therapeutischen Ansatz für die Therapie der AD dar.

Die Epidermis stellt eine sich regenerierende äußere Schicht der Haut dar und besteht aus mehreren Schichten von Keratinozyten (siehe auch Punkt 2.1.1.). Auf Stressoren (z.B Entzündung) oder Verletzungen reagieren Keratinozyten durch eine verstärkte Proliferation, was wichtig für die Wundheilung ist und durch vermehrte und beschleunigte Abschilferung der Haut zum Schutz vor Infektionen beiträgt. Obwohl der AD und Psoriasis unterschiedliche Pathophysiologien zugrunde liegen, sind beide Hautkrankheiten mit Keratinozyten-Hyperplasie, -Proliferation, einer veränderten Keratinozytendifferenzierung, Einwandern von T-Zellen und einem erhöhten Zytokin-Spiegel assoziiert. OSM (Oncostatin M) gehört zur IL6 Familie der Zytokine. Es wird überwiegend von aktivierten T-Zellen, Monozyten und DC abgegeben und führt zur Produktion von akute Phase-Proteinen in der Leber (RICHARDS et al., 1992). OSM wirkt über zwei unterschiedliche Rezeptoren, OSMR1 und OSMR2 (MOSLEY et al., 1996). BONIFACE et al. 2007 untersuchten die Expression von OSM und OSM-Rezeptoren bei Patienten mit Psoriasis und AD und ihren Effekt auf Keratinozyten. Sie zeigten, dass die Expression von OSM und OSMR2 bei beiden

Krankheiten erhöht ist und dass OSM-induzierte und STAT3-medierte Veränderungen der Keratinozyten mit Entzündungen der Haut assoziiert sind (BONIFACE et al., 2007). Zusätzlich isolierten sie T-Zellen aus der Haut und aus dem Blut der Patienten, die wesentlich mehr OSM produzierten als T-Zellen aus dem Blut der Vergleichsgruppe. Daraus schlossen sie, dass aktivierte T-Zellen, die in die Haut einwandern, eine wichtige OSM-Quelle sind und durch Aktivierung des OSMR der Keratinozyten zur Pathologie der Hautveränderungen beitragen können (BONIFACE et al., 2007).

Die allergenbehandelte Haut der Kontroll-Hunde wies im Vergleich zur kochsalzbehandelten Haut nach 24 h eine stark verminderte Expression von *OSMR* auf. Bei den sensibilisierten Hunden war die Konzentration von *OSMR* in der mit Allergen behandelten Haut im Vergleich zur mit Kochsalzbehandelten Haut höher. Eine erhöhte Konzentration von *OSM*-mRNA konnte nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise waren für einen statistisch signifikanten Unterschied die Läsionen zu akut und OSM von den einwandernden Zellen noch nicht messbar verstärkt exprimiert worden. Unsere Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass OSMR und OSM möglicherweise ebenfalls eine zentrale Rolle für die Aktivierung und Hyperproliferation von Keratinozyten spielen und die Expression des OSMR durch einwandernde OSM-produzierenden Zellen stimuliert werden könnte. Die histologische Auswertung (siehe Abb. 17) zeigte, dass nach 24 Stunden die Zellzahl pro Fläche in der mit Allergenbehandelten Haut bei sensibilisierten Hunde anstieg, was für das Einwandern von Entzündungszellen und ihre mögliche OSM-Produktion sprechen würde.

Um zu verifizieren, dass OSM und OSMR in der cAD wie beim Menschen eine zentrale Rolle spielt, sind weitere Studien in Anlehnung an die Studie von BONIFACE et al. 2007 notwendig.

Adenosin ist ein endogenes Purin-Molekül, das eine Vielzahl an physiologischen Funktionen durch Interaktion mit vier Rezeptoren mediert. Es spielt eine Rolle als intermediärer Mediator in vielen wichtigen biochemischen Prozessen (BERNE et al., 1983). Bei Patienten mit Asthma wurde ein erhöhter Adenosin-Spiegel in der bronchioalveolären Lavage-Flüssigkeit nachgewiesen (DRIVER et al., 1993). Je nach Rezeptor führt Adenosin zu pro- oder antiinflammatorischen Effekten (zusammengefasst von RORKE & HOLGATE, 2002). Mit zunehmendem Verständnis der Adenosin-Rezeptoren und der Entwicklung von verschiedenen

Agonisten und Antagonisten stellte sich heraus, dass Adenosin-Rezeptoren für neue Therapien bei verschiedenen Krankheiten geeignet sind. Adenosin in Form von Adenosin-Monophosphat (AMP) führt bei Menschen mit Asthma zu Bronchiokonstriktion, jedoch nicht bei gesunden. Dies geschieht durch Aktivierung von ADORA2B (adenosine a2b receptor) auf Mastzellen und ihre anschließende Degranulation (MARQUARDT & WALKER, 1990, 1994; MANJUNATH & SAKHARE, 2009). Ob ADORA2B einen pro- oder antiinflammatorischen Effekt hat, ist noch nicht eindeutig geklärt und möglicherweise von den jeweiligen Zielzellen abhängig. Dennoch wurden einige Antagonisten für diesen Rezeptor für neue Therapien entwickelt (FEOKTISTOV et al., 1998). CVT-6883, ein ADORA2B-Antagonist, wird beispielsweise bereits als Therapeutikum für Astmatiker getestet (HAM & REES, 2008).

Die Allergischen Hunde wiesen nach 24 Stunden eine erhöhte Expression von ADORA2B in allergenbehandelter Haut auf. Dagegen war die Expression in der Haut der Kontrollgruppe stark herabgesetzt. Die Rolle von Adenosin wurde bei atopischer Dermatitis bisher nicht untersucht. Es wäre jedoch denkbar, dass ADORA2B bei der Mastzell-Degranulation in der Haut ebenfalls eine Rolle spielt und Antagonisten, die für Astmatiker geeignet sind, auch zur Therapie der AD eingesetzt werden könnten. Weitere Studien in diese Richtung sind notwendig.

Bei Hunden gibt es Hinweise dafür, dass IgE eine Rolle bei der cAD spielt. Die Wechselwirkung zwischen allergenspezifischem IgE und relevanten Allergenen soll ausschlaggebend für die Pathogenese der cAD sein. Man geht davon aus, dass IgE die Fähigkeit besitzt, die Immunantwort durch Abfangen von epidermalem Ag und anschließender Bindung an LHC zu verstärken und an der Zelloberfläche von Mastzellen und Basophilen gebundenes IgE in der Lage ist, die Entzündung durch Wechselwirkung mit Allergen einzuleiten (HALLIWELL & DEBOER, 2001). Die Rolle von IgG an der Entstehung der AD beim Hund ist umstritten und Studienergebnisse widersprechen sich. Teilweise gibt es Hinweise für einen Zusammenhang mit der AD (WILLEMSE et al., 1985), teilweise geht man von einer protektiven Eigenschaft der IgG aus, da IgG-Serumspielgel bei gesunden Hunden höher waren als bei erkrankten Individuen (LIAN & HALLIWELL, 1998). Die meisten Patienten mit extrinsischer hAD zeigen erhöhte Serum-IgE-Spiegel mit spezifischen, gegen Umweltallergene gerichteten IgE, sowie allergenspezifische IgG (LARCHEÉ et al., 2006; SICHERER & LEUNG, 2006). Aufgrund

der dominanten Rolle von IgE in der atopischen Entzündung haben sich Untersuchungen an FC-Rezeptoren während allergischer Reaktionen in der Haut hauptsächlich auf Fcε-Rezeptoren konzentriert (KINET, 1999). Allerdings sind auch IgG-Spiegel bei Patienten mit AD erhöht (DE BOER, 1998). Die meisten Immunzellen, darunter DC, Makrophagen, Monozyten und Granulozyten exprimieren Rezeptoren, die das FC-Stück von IgG-AK binden, sogenannte FCγ-Rezeptoren (FcγR) (RAVETCH & KINET, 1991). Beim Menschen sind drei Klassen von FCγR bekannt, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16), jeder mit einer eigenen Funktion und einem eigenen Expressionsmuster (NIMMERJAHN & RAVETCH, 2008). FcγRI bindet monomere IgG mit hoher Affinität, wohingegen FcγRII und FcγRIII low affinity-Rezeptoren darstellen, die nur in der Lage sind, IgG enthaltende Immunkomplexe zu binden. Eine Aktivierung der FCγR fördert die Phagozytose, die Freigabe von Zytokinen und die Ag-Präsentation (NIMMERJAHN & RAVETCH, 2008). Beim Menschen konnte eine vermehrte Expression von CD64 und CD16 in akut und chronisch entzündeter Haut nachgewiesen werden (KIEKENS et al., 2000). Die Rolle von IgE und IgG in der Pathophysiologie der AD ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. ABOUND et al. 2009 untersuchten die Rolle von FCγRezeptor-assozierter FCεRI und von CD16 bei AD im Mausmodell, das viele Ähnlichkeiten zur hAD zeigt. Sie konnten unterschiedliche, aber zum Teil überlappende Rollen von FCεRI und CD16 im Mausmodell identifizieren (ABBOUD et al., 2009).

In unserer Studie wiesen die gesunden Hunde im Vergleich zu den sensibilisierten Hunden herabgesetzte CD32 und CD16 Expression auf. Bei den Allergischen Hunden lag eine vermehrte Expression in der allergenbehandelten vor. Diese Ergebnisse stimmen mit denen beim Menschen und bei der Maus überein und sprechen dafür, dass IgG Rezeptor-Effekte beim Hund eine Rolle bei der atopischen Reaktion der Haut spielen könnten. Es ist wahrscheinlich, dass die überlappenden Effekte von FCεRI und CD16, die bei der Maus gefunden wurden (ABBOUD et al., 2009), auch beim Hund eine Rolle spielen. Weitere Studien zum besseren Verständnis der Rolle von FC-Rezeptoren bei AD sind wichtig.

Weshalb nahezu alle bis hier diskutierten Gene bei den gesunden Hunden in der mit Allergen behandelten Haut eine stark herabgesetzte Expression aufwiesen ist unklar. Möglicherweise verfügen sie über einen Negativen Feedback-

Mechanismus, der einer übersteigerten Immunantwort entgegenwirken.

### **5.3.2. Gene mit verminderter Expression in der Haut atopischer bzw. mit erhöhter Expression in der Haut gesunder Hunde**

#### **5.3.2.1. Hautbarriere**

Verhornung ist der Prozess, bei dem die Keratinozyten vom Stadium der proliferativen Basalzellen zur verhornten Zelllage im Str. corneum, der äußersten Schicht der Epidermis, heranreifen. Diese Hautschicht ist analog zu einer Mauer aus flachen, kernlosen Keratinozyten (Korneozyten), die von einem Mörtel aus extrazellulären Lipiden und Resten von Desmosomen zusammengehalten werden. Gemeinsam bilden sie die lebenswichtige Barriere zur Außenwelt und schützen den Organismus vor Mikroorganismen, Strahlung und Verletzung sowie vor Flüssigkeitsverlust.

##### **5.3.2.1.1. Strukturproteine und Zell-zu-Zellverbindungen**

Für die physiologische Funktion des Str. corneum ist die korrekte Ausbildung des „cornified envelope“ (CE) unerlässlich. Die Verhornung findet zwischen der Basalzellschicht und dem Str. corneum statt, wo der CE gebildet wird. Auf molekularer Ebene entsteht der CE aus verschiedenen Vorläuferproteinen, die durch Transglutaminasen miteinander vernetzt und von speziellen Lipiden umgeben werden, welche die physikalischen Eigenschaften der Hautbarriere gewährleisten. Daraus resultiert eine ca. 15 nm dicke, wasserundurchlässige Schicht aus Proteinen und Lipiden, die sich an der inneren Plasmamembran der Keratinozyten ablagern. Der CE erfüllt zwei wichtige Funktionen. Zum Einen ist er die am wenigsten wasserlösliche Struktur im Str. corneum, zum Anderen stellt er den Ort dar, an dem sich interzelluläre Lipide und Keratinozyten zu einer funktionellen Einheit verbinden, was dem Str. corneum, gemeinsam mit den Korneodesmosomen, einen Großteil seiner mechanischen Stabilität und Undurchdringlichkeit verleiht (CREDILLE et al., 2009). Für eine physiologische Hautfunktion sind sowohl eine normale Bildung durch Zellproliferation und Differenzierungsprozesse sowie eine kontrollierte Desquamation (NILS, 1975; CHAPMAN & WALSH, 1990) durch Degradierung der Korneodesmosomen enorm wichtig (EGELRUD, 2000).

Ein Protein, das bezüglich der Hautbarrierefunktion und aufgrund einer Beteiligung an der AD große Aufmerksamkeit auf sich zieht, ist das Filaggrin (FLG). FLG führt zur Aggregation von Keratinfilamenten (Strukturproteine der Keratinozyten), was das „Kollabieren“ der Zelle einleitet und verantwortlich für die typische flache Form der Korneozyten im Str. croneum ist. Loss of function-Mutationen und Polymorphismen in diesem Gen konnten mit hAD assoziiert werden (BARKER et al., 2007; BAURECHT et al., 2007; NEMOTO-HASEBE et al., 2009). Es existieren keine eindeutigen Beweise dafür, dass die cAD mit einer defekten FLG-Expression assoziiert ist (CHERVET et al., 2010). Eine Linkage-Analyse bei West Highland White Terriern deutete auf das Fehlen solch einer Korrelation für diese Rasse hin (BARROS ROQUE et al., 2009). Marsella et al. konnten immunhistochemische Veränderungen von FLG bei cAD darstellen (MARSELLA et al., 2009).

Bei den atopischen Beagles unserer Studie konnten wir keine veränderte Expression von FLG nachweisen, jedoch zeigte FLG2 (Filaggrin 2) eine verminderte Expression. WU et al. 2009 identifizierten dieses FLG2-Protein, das dem FLG stark ähnelt. Es wird von den obersten Zellen des Str. granulosum gebildet und wie FLG nach Proteolyse im Str. granulosum und Str. corneum in normaler Epidermis angereichert. Wu et al. vermuten überschneidende und möglicherweise synergistische Funktionen zwischen den beiden FLG-Proteinen bei der Bildung der epidermalen Barriere und beim transepidermalen Wasserverlust. Eine verminderte Expression von FLG2 in der Haut von Patienten mit AD konnten sie jedoch nicht nachweisen (WU et al., 2009). Auch Loss of function-Mutation im *FLG2* konnten nicht mit AD in Verbindung gebracht werden (MARENHOLZ et al., 2011). Allerdings wies eine neue Studie in einer vergleichenden Proteom-Analyse eine verminderte Expression von FLG2, DSG1, Desmocollin und TGM3 bei Patienten mit AD nach (BROCCARDO et al., 2011). Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle von FLG2 bei der Ausprägung klinischer Symptome zu beleuchten. Unsere Ergebnisse weisen jedoch auf eine mögliche Beteiligung von FLG2 an der Pathogenese der cAD hin.

Die molekularen Mechanismen der Hydratation der Haut sind noch weitgehend ungeklärt. Bekannt ist, dass die FLG-Proteine nach der Abflachung der Keratinozyten zerfallen und dabei hygroskopisch wirksame Aminosäuren entlassen, die Wasser in die Zelle „ziehen“, was der Aufrechterhaltung der

epidermalen Hydratation und Geschmeidigkeit (JARZAB et al., 2009) dient. MATSUI et al. 2011 fanden heraus, dass die Prozessierung von Profilaggrin zu FLG von ASPRV1 (aspartic peptidase, retroviral-like 1) reguliert wird. Haarlose Mäuse mit einem Mangel an ASPRV1 zeigen trockene Haut mit einem verdickten und feuchtigkeitsärmeren Str. corneum, mit Ansammlung von fehlerhaft prozessiertem Profilaggrin und deutlicher Abnahme der FLG-Konzentration. Weiterhin konnten sie bei Patienten mit hAD Mutationen in diesem Gen nachweisen (MATSUI et al., 2011). HILDENBRAND et al. beobachteten eine gestörte Regeneration und Wundheilung der Haut bei Mäusen mit veränderter ASPRV1-Expression (HILDENBRAND et al., 2010).

Die Expression von ASPRV1 war bei den allergischen Hunden 24h nach Allergenexposition stark reduziert, die FLG Expression jedoch nicht. Die ASPRV1 Expression der Kontrollgruppe dagegen wie eine vermehrte Expression nach Allergenexposition auf. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Prozessierung von FLG beim Hund trotz normaler FLG Expression aufgrund des ASPRV1 Mangels gestört sein könnte. Dieser Mechanismus könnte auch die Ursache für die von Marsella et al. und Chervet et al. immunhistochemisch beobachteten Abweichungen des FLG bei atopischen Hunden sein. Eine fehlende Prozessierung könnte die scheinbar verminderte Expression von FLG in der Immunhistochemie eventuell vortäuschen, da diese in beiden nicht auf mRNA-Ebene mit Hilfe von qPCR gemessen wurde.

Für die Vernetzung der Vorläuferproteine (Involucrin, Loricrin, SPRPs, Envoplakin, Periplakin etc.) (HOHL, 1990; GREENBERG et al., 1991; STEINERT & MAREKOV, 1995) und der Lipide (MAREKOV & STEINERT, 1998) (NEMES et al., 1999) des CE ist die TGM1 (Transglutaminase 1) essentiell. Es wird vermutet, dass sie zunächst das im Zytoplasma enthaltene Involucrin (IVL) modifiziert und anschließend mit den Proteinen Envoplakin (ENVP) und Periplakin (PPL) vernetzt, welche sich an den Desmosomen in unmittelbarer Nähe von Desmoplakin (DSP) und der interdesmosomalen Plasmamembran befinden (RUHRBERG et al., 1996; RUHRBERG et al., 1997). Anschließend werden weitere Proteine wie SPRP, Loricrin (LOR) und Keratinfilamente mit eingebaut. Mäuse, bei denen das *TGM1*-Gen inaktiviert wurde, zeigten eine gestörte Reifung der Epidermis in der späten embryonalen Entwicklung, was in einem starken Anstieg des TEWL und Tod durch

Dehydrierung nur wenige Stunden nach der Geburt endete (MATSUKI et al., 1998; KURAMOTO et al., 2002). Hauttransplantate der TGM1-inaktivierten Mäusen auf gesunde Tiere führte zur Ausbildung ichthyoseähnlicher Läsionen mit starker Schuppenbildung (KURAMOTO et al., 2002). Mutationen dieses Gens wurden beim Menschen und beim Hund mit Ichthyose (CAO et al., 2009; CREDILLE et al., 2009; RODRÍGUEZ-PAZOS et al., 2009) und beim Menschen mit nichtbullöser angeborener ichthyosiformer Erythrodermie (AKIYAMA et al., 2001) beschrieben (AKIYAMA et al., 2001; CAO et al., 2009; CREDILLE et al., 2009; RODRÍGUEZ-PAZOS et al., 2009). In einer Studie, die die Genexpression in der Haut von atopischen Menschen untersuchte, wurde eine erhöhte Expression von TGM1 in atopischer Haut festgestellt (SÄÄF et al., 2008). Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, da die sensibilisierten Hunde eine verminderte Expression von TGM1 in der allergenbehandelten Haut, die Kontroll-Hunde jedoch eine erhöhte Expression aufwiesen. Logisch betrachtet, erscheinen unsere Ergebnisse plausibel, zumal für die AD eine gestörte Hautbarriere charakteristisch ist und das Fehlen von TGM1 nachweislich zu einer gestörten Hautbarriere führt. TGM1 ist somit möglicherweise an der Pathogenese der cAD beteiligt.

PPL, EVPL und IVL (Involucrin) bilden das Proteingerüst, über das die innere Plasmamembran der Korneozyten und die Desmosomen gespannt sind und an dem die Proteine und Lipide des CE ansetzen (RICE & GREEN, 1977; RUHRBERG et al., 1996; RUHRBERG et al., 1997; RUHRBERG & WATT, 1997). PPL und EVPL sind Teil des CE bei der terminalen Differenzierung von verhornten Epithelien. Vermutlich tragen sie zur mechanischen Stabilität des Str. corneum in der Epidermis bei (KARASHIMA & WATT, 2002; KAZEROUNIAN et al., 2002). Allerdings konnte eine gestörte Funktion der Hautbarriere durch verminderte Expression nur eines dieser Gene (PPL, EVPL, IVL) nicht nachgewiesen werden (DJIAN et al., 2000; MAATTA et al., 2001; AHO et al., 2004). Die sensibilisierten Hunde in der vorliegenden Studie wiesen eine herabgesetzte Expression, die gesunden Hunde dagegen eine erhöhte Expression von PPL 24 h nach Allergenexposition auf. PPL wird eine Schlüsselrolle bei der Bildung des Gerüstes für den CE zugeschrieben wird (DICOLANDREA et al., 2000). Weiterhin zeigten die Hunde in der Multifactorial unpaired-Analyse nach 24 Stunden eine stark verminderte Expression der mRNA von LOR (Loricrin). LOR ist ein wasserunlösliches Protein, das ca. 80% der

Gesamtmasse des CE ausmacht und vor seinem Einbau in den CE in LOR-Granula gespeichert wird (HOHL et al., 1991). LOR wird durch TGM mit sich selbst und vielen anderen CE-Proteinen vernetzt. Mäuse mit einem Defizit an Loricrin zeigten nur subtile Symptome wie vorübergehend gerötete Haut und eine erhöhte Fragilität des CE (KOCH et al., 2000). Diese und einige der oben genannten Studien sind ein Hinweis dafür, dass der CE zwar essentiell für die Hautfunktion ist, die genaue Zusammensetzung des CE jedoch dafür nicht ausschlaggebend zu sein scheint und die übrigen Proteine das Fehlen kompensieren können. Mäuse, die einen Mangel an drei CE Proteinen (PPL, EVPL und IVL) aufwiesen, zeigten hingegen eine gestörte Hautbarriere und zusätzlich eine veränderte T-Zell-Zusammensetzung der Haut (SEVILLA et al., 2007). KIM et al. 2008 konnten zeigen, dass  $T_{H2}$  Zytokine die Expression von LOR und IVL durch Induktion bestimmter Transkriptionsfaktoren hemmen können (KIM et al., 2008); in einer anderen Studien wurde eine verminderte Expression von LOR in der Haut von Patienten mit AD nachgewiesen (JARZAB et al., 2009), was mit den Ergebnissen unserer Studie übereinstimmt.

Sciillin (SCEL) ist ein weiteres Vorläuferprotein für den CE und wird während der terminalen Differenzierung der Epidermis exprimiert (CHAMPLIAUD et al., 2000). Auch die mRNA dieses CE-Proteins wurde bei den sensibilisierten im Vergleich zu den gesunden Hunden vermindert exprimiert. Es ist ebenfalls ein Substrat für TGM1 und wird vermutlich mit sich selbst und Keratin-Filamenten verknüpft (KVEDAR et al., 1992). Mäuse, bei denen das SCEL inaktiviert wurde, zeigten, ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen CE-Proteinen, weder strukturelle Abweichungen der Epidermis noch Hinweise für funktionelle Defekte in der Hautbarriere oder eine veränderte Expression anderer CE-Komponenten (BADEN et al., 2005).

Die verminderte Expression eines der beschriebenen Strukturproteine des CE scheint selten Auswirkungen auf die Integrität der Hautbarriere zu besitzen. Wenn allerdings mehrere dieser Proteine gemeinsam betroffen sind, scheint das Defizit zu groß, um von anderen Proteinen ausgeglichen werden zu können, und Barrieredefekte machen sich bemerkbar. Die Hunde in der vorliegenden Studie wiesen eine reduzierte Expression verschiedener Vorläufer-Struktur-Proteine des CE auf, was die Wahrscheinlichkeit einer gestörten Barriere erhöht.

Wichtig für die mechanische Stabilität eines Gewebes sind Haftverbindungen zwischen den Zellen, um Zerreißungen bei Scherkräften zu vermeiden. Die Basalzellen der Epidermis haften durch Hemidesmosomen an der Basalmembran, die aus extrazellulärer Matrix besteht (zusammengefasst von WATT, 2002) und verbinden sich so mit der Dermis. Innerhalb der Epidermis existieren zwei Arten von Verbindungen, die für den Zusammenhalt der Korneozyten verantwortlich sind, Desmosomen und Adherens Junctions (AJ), die das Aktin-Zytoskelett zwischen den Zellen verbinden. Erstere sind Strukturen in Zellmembranen, die enge scheibenförmige Verbindungen zwischen zwei Zellen herstellen und dadurch die zelleigenen Intermediärfilamente mit denen anderer Zellen verbinden. Sie bestehen aus verschiedenen intrazellulären und transmembranalen Komponenten (NILS, 1975; CHAPMAN & WALSH, 1990). Bei der Reifung der Keratinozyten zu kernlosen Korneozyten werden die Desmosomen zu Korneodesmosomen umgebaut und mit dem CE verbunden (ISHIDA-YAMAMOTO et al., 2011). Korneozyten haften also durch Korneodesmosomen, d.h. durch modifizierte desmosomale Strukturen, aneinander, die in der obersten Zellschicht proteolytisch degradiert werden und dadurch die natürliche Abschilferung der Zellen erlauben (SERRE et al., 1991).

DSP (Desmoplakin), PPL (Periplakin) und EVPL (Envoplakin) (s.o.) gehören der Plakin-Familie an, einer Familie von Verbindungsproteinen (cytolinker-/desmosomal linker-proteins) und binden Intermediärfilamente. Loricrin und Lipide des CE werden an DSP, EVPL und PPL angeheftet. Autoantikörper gegen die Plakin-Proteine sind bekanntermaßen an autoimmunbedingten Hautkrankheiten wie Pemphigus (MAO et al., 2008), Erythema multiforme (FOEDINGER et al., 1995), paraneoplastischem Pemphigus (KIYOKAWA et al., 1998) und Epidermolysis bullosa (JONKMAN et al., 2005) beteiligt. Gemeinsam mit DSG1 (Desmoglein1) und weiteren Proteinen sind sie an der Bildung der Zell-zu-Zell-Kontakte, den Desmosomen beteiligt.

DSP stellt den intrazellulären Hauptbestandteil der Desmosomen dar. Bei der späten Differenzierung wird DSP teilweise mit in den CE eingebaut (RUHRBERG & WATT, 1997). Seine Rolle bei AD wurde bisher nicht diskutiert. Jedoch könnte eine verminderte Expression, wie sie die sensibilisierten Hunde 24 Stunden nach Allergen-Exposition zeigten, zu einem geschwächten Zellverband und damit zu einer Verschlechterung der Barrierefunktion führen. Diese mögliche

Beteiligung am Barrieredefekt der AD muss in weiteren Studien untersucht werden.

Das DSG1 (desmoglein1) ist ein integrales Membranprotein und gehört zur Gruppe der kalziumbindenden Cadherine. Gemeinsam mit Desmocollin ragt es durch die Plasmamembran als fingerartige Struktur in den Interzellulärspalt und verbindet sich mit DSG1-Molekül der Nachbarzelle, wodurch eine interzelluläre Verbindung entsteht, die charakteristisch für Desmosomen (GREEN & SIMPSON, 2007; GARROD & CHIDGEY, 2008) und Korneodesmosomen (DESCARGUES et al., 2006; CAUBET et al., 2004) ist. Naoe et al. kamen zu dem Schluss, dass DSG1 als Barrierelement eine wichtige Rolle für die Funktion des Str. corneum spielt (NAOE et al., 2010).

Eine Beteiligung von DSG1 an der AD wurde bisher nur in einer Studie durch eine verminderte Expression auf Proteom-Ebene in der Haut atopischer Patienten beschrieben (BROCCARDO et al., 2011). Aufgrund seiner Beteiligung an der Bildung von Korneodesmosomen ist es bedeutend für die Aufrechterhaltung der Hautbarriere. Somit wäre eine Rolle bei der Pathophysiologie der cAD naheliegend, zumal die DSG1-mRNA in der Haut der sensibilisierten Hunde eine verminderte Expression aufwies. Bei den gesunden Hunden war die Expression von *DSG1* hingegen erhöht.

Tight Junctions (TJ) stellen interzelluläre Adhäsionsmoleküle dar, die sich apikal an der lateralen Zellwand befinden und die Zelle gürtelartig umgeben (FARQUHAR & PALADE, 1963). Im einschichtigen Epithel (z.B. Darm) unterstützen TJ die Barrierefunktion, da sie zu engem Zellkontakt führen und den Zellzwischenraum verschließen, wodurch eine parazelluläre Barriere entsteht. Im mehrschichtigen Epithel der Haut sind TJ nur schwach ausgebildet und befinden sich in den Maculae occludentes des Str. granulosum (SQUIER, 1973; ELIAS et al., 1977). Maculae occludentes werden als schwächer ausgeprägte TJ angesehen (MORITA et al., 1998). Die Beteiligung der Maculae occludentes an der Barrierefunktion der Epidermis ist nicht eindeutig geklärt und Studien kamen zu scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen (HASHIMOTO, 1971; ELIAS & FRIEND, 1975). Kürzlich durchgeführte Studien an Mäusen unterstützen die Vermutung, dass TJ an der epidermalen Barrierefunktion beteiligt sind (YAMAMOTO et al., 2008). OCLN (Occludin) ist ein Transmembranprotein und an der Bildung von TJ beteiligt (FURUSE et al., 1993; ANDO-AKATSUKA et

al., 1996). Die Expression von OCLN in den oberen Schichten der Epidermis deutet auf einen Einfluss auf die Differenzierung der Keratinozyten hin. In der Haut von Patienten mit Psoriasis wird OCLN stärker exprimiert als in gesunder Haut und ist vermutlich an der Pathogenese beteiligt (YOSHIDA et al., 2001). CNG (Cingulin) ist ebenfalls ein Protein der TJ und interagiert mit verschiedenen TJ-Proteinen sowie mit Actin (CORDENONSI et al., 1999; BAZZONI et al., 2000; D'ATRI & CITI, 2001). Es ist an der Regulation der Genexpression anderer Proteine und der Regulation der Zellproliferation beteiligt (AIJAZ et al., 2005; GUILLEMOT & CITI, 2006). Allerdings ist über seine Funktion insgesamt noch relativ wenig bekannt.

In der Haut der sensibilisierten Hunde zeigten die Gene für CNG und OCLN eine stark verminderte Expression, die möglicherweise eine Verlangsamen der Zellproliferation und eine gestörte Ausbildung der TJ bewirkt. Weitere Studien sollten hier Klarheit über die Beteiligung an der Pathophysiologie der cAD schaffen.

Wichtig für die Schutzfunktion der Haut ist, dass Zellerneuerung und -abschilferung im Gleichgewicht sind. Am Prozess der Desquamation sind von der Haut produzierte endogene Proteasen und von Mikroorganismen gebildete exogene Proteasen beteiligt, die Zell-zu-Zell-Verbindungen auflösen (HORIKOSHI et al., 1999). Proteasen sind ferner in der Lage, Abwehrmoleküle in der Haut zu aktivieren bzw. zu inaktivieren (RAO et al., 1997; YAMASAKI et al., 2006). Um einer übermäßigen Protease-Aktivität und damit einer unkontrollierten Abschilferung der Haut entgegenzuwirken, werden von der Haut Gegenspieler, die Protease-Inhibitoren, produziert. Zwischen ihnen und den Proteasen herrscht in gesunder Haut eine Balance. Störungen führen zu Hautkrankheiten mit Defekten der Barrierefunktion und zu Entzündung durch eine erhöhte proteolytische Aktivität (HANSSON et al., 2002; DENECKER et al., 2008). *SPINK5* (Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5) kodiert für einen wichtigen Protease-Inhibitor, und Polymorphismen im diesem Gen konnten mit hAD (WALLEY et al., 2001; KATO et al., 2003; NISHIO et al., 2003; WEIDINGER et al., 2008; WENZEL et al., 2008) assoziiert werden. Das jedoch eindrücklichste Beispiel für eine Krankheit im Zusammenhang mit *SPINK5* beim Menschen ist das Netherton-Syndrom, bei der eine loss of function-Mutation (CHAVANAS et al., 2000) dieses Gens vorliegt (Siehe auch Punkt 2.2.6.6.2.,

hAD und die Netherton-Krankheit).

Die Ergebnisse unserer Studie stimmen mit den Befunden beim Menschen überein. Allerdings stellten WOOD et al. 2009 bei Hunden mit cAD eine erhöhte Expression in atopischer Haut fest (WOOD et al., 2009). Für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten die verwendeten biologischen Modelle eine Rolle spielen. Wood et al. untersuchten Hautproben von Hunden sehr verschiedener Rassen, die sich auch im Alter stark unterschieden. Beteiligungen bestimmter Gene bei hAD sind zum Teil stark von Populationsgruppen der Menschen abhängig. Dieses Phänomen spielt sicherlich auch beim Hund eine Rolle und so könnten bei einer Rasse Gene involviert sein, die bei der anderen keine Rolle für die Ausprägung der cAD spielen. Es ist bekannt, dass die große Rassevielfalt beim Hund die Identifizierung von Genen, die mit AD assoziiert sind, schwierig gestaltet (WOOD et al., 2010). Aus diesem Grund haben wir bei der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung eines möglichst homologen biologischen Modells geachtet. Sollte sich die Beteiligung von SPINK5 bei der cAD in weiteren Studien für bestimmte Rassen bestätigen, könnte eine Therapie mit Protease-Inhibitoren (EGELRUD et al., 2005) ein Ansatz für die Entwicklung neuer Therapien sein.

### 5.3.2.1.2. Enzyme der Ceramidsynthese

Neben den CE-Proteinen werden verschiedene Lipide synthetisiert, von denen einige kovalent an die CE-Proteine gebunden werden. Ein Großteil wird nach ihrer Synthese in Granula, den sogenannten „lamellar granules“ oder „Odland bodies“ gelagert, die in den oberen Schichten des Str. granulosum während der Verhornung in den Interzellularraum abgegeben werden (BOUWSTRA et al., 2003; MADISON, 2003). Dort bilden sie Lipidlamellen, die die Barriere der Haut vervollständigen, indem sie den TEWL und das Eindringen wasserlöslicher Substanzen von außen verhindern. Der CE wird also zusätzlich von einer Lipidschicht umgeben. Die Lipidlamellen enthalten Ceramide, Phospholipide und Cholesterol als Vorläufer der interzellulären Lipide (FREINKEL & TRACZYK, 1985; LANDMANN, 1988). Die sensibilisierten Hunde wiesen 24 Stunden nach Auftragen der Lösungen in der mit Allergen behandelten Haut eine verminderte Expression von ASAHI2 (N-acylsphingosine amidohydrolase 2) und SMPD3 (sphingomyelin phosphodiesterase 3) auf, die beide am Sphingolipid-

Metabolismus (Siehe Abb. 13 im Ergebnisteil) beteiligt sind. Ein veränderter Lipid-Gehalt liegt im Str. corneum nicht-läsionaler Haut von Patienten mit AD vor, vermutlich ein weiterer prädisponierender Faktor der AD in der Humanmedizin (IMOKAWA et al., 1991; DI NARDO et al., 1998; MACHELEIDT et al., 2002). Abnormale Lipidlamellen konnten im Str. corneum auch beim Hund nachgewiesen werden. Sie waren in ihrer Kontinuität unterbrochen und dünner als bei gesunden Hunden (INMAN et al., 2001, (PIEKUTOWSKA et al., 2008). Diese morphologischen Befunde wurden durch biochemische Analysen unterstützt, die eine anormale Zusammensetzung der Lipide und besonders der Ceramide bei Hunden mit AD nachwiesen (REITER et al., 2009; SHIMADA et al., 2009; POPA et al., 2011). Verschiedene systemische und lokale Therapien mit Fettsäuren sind auf dem Markt, um die Funktion der Hautbarriere zu unterstützen, was in entsprechenden Studien zu einer Verbesserung der strukturellen und klinischen Veränderungen führte (PIEKUTOWSKA et al., 2008; POPA et al., 2011).

Die allergische Reaktion in der Haut der sensibilisierten Hunde scheint also die Differenzierung des Str. corneum in vielerlei Hinsicht zu stören. Wenn man davon ausgeht, dass bei den verwendeten sensibilisierten Hunden von Natur aus keine Lipid anomalien bestehen, sondern sich erst im Laufe des Entzündungsgeschehens entwickeln, kann man daraus schließen, dass auch atopische Individuen, die von Grund auf keine Störung im Lipidfilm der Haut besitzen, diese im Laufe der Zeit aufgrund der chronischen Entzündung entwickeln. Eine Therapie, welche die Normalisierung des Lipidgehaltes und der Lipidstruktur in der Haut unterstützt und damit das Eindringen von Substanzen wie beispielsweise Allergenen in tiefere Schichten der Epidermis verhindert, scheint also in jedem Fall sinnvoll.

### **5.3.2.2. Weitere Gene mit verminderter Expression in der Haut atopischer bzw. mit erhöhter Expression in der Haut gesunder Hunde**

Das *KPRP* (keratinocyte proline-rich protein) ist ein kürzlich identifiziertes Gen, zu dem noch nicht viel bekannt ist. *KPRP* stellt einen Marker der epidermalen Differenzierung dar und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Differenzierung von Keratinozyten (KONG et al., 2003; LEE et al., 2005). Es wird im Str. granulosum exprimiert und Lee et al. konnten eine vermehrte Expression in der Haut von Patienten mit Psoriasis nachweisen. In der Haut atopischer Patienten

war seine Expression jedoch kaum nachweisbar.

Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von Lee et al. überein und sind ein Hinweis dafür, dass KPRP auch bei der cAD eine Rolle spielen könnte. Weil nicht bekannt ist, ob KPRP ein Strukturprotein im CE oder ein Protein mit anderer Funktion darstellt, sind weiterführende Studien notwendig, um seine mit großer Wahrscheinlichkeit essentielle Rolle im molekularen Mechanismus für die Regulation der Homöostase der Haut zu beleuchten.

CALML5 (calmodulin-like 5) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, das in der Epidermis exprimiert wird und mit der Calmodulin-Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine verwandt ist. Funktionelle Studien zeigten, dass CALML5 nach der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  seine Konformation ändert und während der Keratinozytendifferenzierung stark exprimiert wird (MÉHUL et al., 2001). CALML5 kann an TGM3 binden, die ähnlich der TGM1 ein Schlüsselenzym der terminalen Differenzierung der Epidermis darstellt. In normaler Haut ist die Expression von CALML5 auf das Str. granosum und die unteren Schichten des Str. corneum beschränkt. In den oberen Zelllagen des Str. corneum wird es anschließend proteolytisch degradiert. Mehul et al. wiesen eine erhöhte Konzentration in Haut von Patienten mit Psoriasis nach, obwohl nicht eindeutig war, ob dies aufgrund einer verstärkten Expression oder aufgrund mangelnder proteolytischer Degradierung der Fall war (MÉHUL et al., 2001). Die verminderte Expression von CALML5 könnte ein weiterer Hinweis für eine verlangsamte oder gestörte Differenzierung der Epidermis bei den sensibilisierten Hunden 24 Stunden nach Einwirken des Allergens sein.

DMK (dermokine) ist ein Gen mit bisher relativ unbekannter Funktion, das im Zusammenhang mit Hautkrankheiten noch nicht beschrieben wurde. DMK wird bei Krankheiten, die mit Entzündung einhergehen, häufig verstärkt exprimiert und seine Expression wurde als erstes in den differenzierten Zelllagen der Haut gefunden (MATSUI et al., 2004; NASO et al., 2007). In der vorliegenden Studie war die Expression von DMK bei sensibilisierten Hunden 24 Stunden nach Allergen-Exposition herabgesetzt. DMKN könnte ein neues an der Pathophysiologie der AD beteiligtes Gen sein.

PPARA (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Fettsäuren aktiviert wird, die während des Entzündungsgeschehens produziert werden (MORAES et al., 2006) und zur

Familie der Kern-Hormon-Rezeptoren gehört. PPARA wird von verschiedenen Zellen exprimiert, in der Haut unter anderem von Keratinozyten (RIVIER et al., 1998; MICHALIK et al., 2001), LHC (DUBRAC et al., 2007), Makrophagen (BABAEV et al., 2007) und T-Zellen (CUNARD et al., 2002). PPARA reguliert die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten (KÖMÜVES et al., 2000), ist an der Wundheilung beteiligt (MICHALIK et al., 2001) und reguliert Entzündungen der Haut. In atopischer Haut wurde eine verminderte Expression von PPARA nachgewiesen (PLAGER et al., 2007; STAUMONT-SALLÉ et al., 2008). Die Aktivierung von PPARA durch topische Behandlung mit PPARA-Liganden hat entzündungshemmende Effekte bei verschiedenen Hautkrankheiten im Mausmodell und bei Menschen mit Kontaktallergie (SCHMID et al., 1996; SHEU et al., 2002), hAD (PICCARDI et al., 2001; EBERLEIN et al., 2008; STAUMONT-SALLÉ et al., 2008; EICHENFIELD et al., 2009; HATANO et al., 2010) und UV-induzierter Hautrötung (KIPPENBERGER et al., 2001). TÖRMÄ et al. 2009 zeigten, dass eine Abnahme der Expression von PPARA bereits früh im Entzündungsgeschehen nach Allergenexposition in der Haut stattfindet (TÖRMÄ & BERNE, 2009).

24 Stunden nach Auftragen der Allergenlösung zeigten die sensibilisierten Hunde in der Multifactorial unpaired-Analyse eine verminderte Expression von *PPARA* im Vergleich zu den nichtallergischen Hunden. Da PPARA nicht nur in die Differenzierung der Keratinozyten involviert ist, sondern auch regulierend in die Entzündung der Haut eingreift (zusammengefasst von DUBRAC & SCHMUTH, 2011), könnten PPARA-Liganden auch bei der Behandlung der cAD eine wirkungsvolle Therapieform darstellen. Möglicherweise ist die erhöhte Expression von *PPARA* bei der Kontrollgruppe in allergenbehandelter Haut für die Hemmung der Entzündung mitverantwortlich.

*ALOXE3* (Arachidonate lipoxygenase 3) kodiert für das LOX3-Protein, welches vornehmlich in der Epidermis exprimiert wird (KRIEG et al., 2002). Die LOX-Familie stellt eine Gruppe von weit verbreiteten Dioxygenasen dar, die Sauerstoffmoleküle an mehrfach ungesättigte Fettsäuren binden und hoch aktive Lipidmediatoren hervorbringen (BRASH, 1999). Die Produkte von *ALOXE3* und *ALOX12B* wandeln Arachidonsäure in Epoxyalkoholprodukte um. YU et al. 2007 konnten zeigen, dass diese Epoxyalkoholprodukte als endogene PPARA-Agonisten (s.o.) fungieren und somit eine Rolle bei der Differenzierung der

Epidermis spielen (YU et al., 2007). Zusätzlich verhält sich die Expression von *ALOXE3* ähnlich wie die von *PPARA* und sinkt bereits früh im Entzündungsgeschehen nach Einwirken von Allergen auf die Haut (TÖRMÄ & BERNE, 2009). Mutationen in *ALOXE3* und *-12B* wurden bei Patienten mit ichthyosiformen Hautkrankheiten nachgewiesen (JOBARD et al., 2002; ECKL et al., 2005), die ähnlich wie die AD unter anderem durch trockene, schuppige Haut und einen vermehrten TEWL charakterisiert sind (LAVRIJSEN et al., 1995). Es ist bekannt, dass Patienten mit hAD häufig ichthyosiforme Hautveränderungen zeigen und Patienten mit Ichthyosen (z.B. Netherton-Syndrom) häufig AD entwickeln. Mutationen im *FLG*- und *SPINK5*-Gen haben beide Krankheiten ebenfalls gemeinsam.

Unsere Ergebnisse stimmen in Bezug auf die Ähnlichkeit der Regulation von *PPARA* und *ALOXE3* mit früheren Studien überein. Bisher wurden über eine veränderte Expression dieser Gene bei der cAD nicht berichtet. Da sich die Klinik bei Hund und Mensch sehr ähnelt, ist es naheliegend, dass diese Gene in der Pathophysiologie der cAD eine wichtige Rolle spielen könnten. Weiterführende Studien sollten klären, ob diese Pathways auch bei Hunden mit natürlich auftretender AD involviert sind.

*GATA3* (GATA bindin protein 3) ist eine Transkriptionsfaktor und ein zentraler Modulator für die Regulation der Balance zwischen  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zell-Immunantwort (NAWIJN et al., 2001), indem es die  $T_{H1}$ -Immunantwort hemmt und stattdessen die Entwicklung von  $T_{H0}$ -Zellen zu  $T_{H2}$ -Zellen fördert und bei differenzierten  $T_{H2}$ -Zellen die Expression der Zytokine aufrecht erhält (ZHENG & FLAVELL, 1997). BAE et al. 2011 untersuchten seine Rolle bei allergischen Hautentzündungen mit Hilfe von transgenen Mäusen, die das humane *GATA3* überexprimierten, und konnten eine übermäßige  $T_{H2}$ -Immunantwort nachweisen (BAE et al., 2011). Nach Hemmung der *GATA3*-Expression ging diese wieder zurück. Mit AD assoziierte Polymorphismen im *GATA3*-Gen konnten für Patienten aus England nachgewiesen werden (ARSHAD et al., 2008). Bei einer Studie mit deutschen Kindern mit AD und Asthma konnte allerdings keine Verbindung mit *GATA3* gefunden werden (SUTTNER et al., 2009). Die sensibilisierten Hunde unserer Studie wiesen im Gegensatz zu den oben erwähnten Studien in der Multifactorial-Analyse nach 24 h eine verminderte Expression des *GATA3*-Gens auf. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein,

dass es sich bei den verwendeten Beagles nicht um natürliche Atopiker, sondern um ansonsten gesunde Hunde handelt. Sollten Polymorphismen im *GATA3*-Gen auch bei cAD mitbeteiligt sein, sollten diese bei den verwendeten Hunden nicht vorliegen, da sie keine Anlage zur natürlichen Ausprägung der AD besitzen. Möglicherweise ist die Senkung der Expression von *GATA3* eine Gegenreaktion, um der allergischen Entzündung entgegenzuwirken. Ob die *GATA3*-Expression bei der natürlich auftretenden Form der cAD eine Rolle spielt, sollte in weiteren Studien an natürlich erkrankten Tieren untersucht werden. Zwischen dem Ablauf der  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Immunantwort von Hund und Mensch mit AD gibt es allerdings Unterschiede. Möglicherweise ist *GATA3* an der cAD im Gegensatz zur hAD nicht oder nicht wesentlich beteiligt.

### 5.3.3. Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Die sensibilisierten Hunde wiesen in der vorliegenden Studie keine differentiell exprimierten Gene in normaler unbehandelter Haut im Vergleich zur nichtallergischen Kontrollgruppe auf. Erst im Laufe der Einwirkzeit und besonders 24 Stunden nach Allergenauftrag konnten Expressionsänderungen unter anderem in der Multifactorial unpaired-Analyse nachgewiesen werden, die sowohl die Expression allergenexponierter als auch kochsalzexponierter Haut im Vergleich von gesunden und atopischen Hunden berücksichtigte. Dieser Vergleich sollte mögliche systemische Effekte und Wundheilungseffekte, die man sowohl in der allergen- als auch in der kochsalzbehandelten Haut erwartete, subtrahieren und damit überwiegend die unterschiedliche Reaktion zwischen allergischen und nichtallergischen Tieren auf das Allergen aufzeigen. 24 Stunden nach Auftragen der Lösungen konnten wir eine herabgesetzte Expression bei nichtallergischen Hunden nach Allergenkontakt bzw. im Verhältnis dazu eine höhere Konzentration an mRNA derjenigen Gene bei den sensibilisierten Hunden nachweisen, welche im Zusammenhang mit Entzündung, Wundheilung und Immunantwort standen. Für die Ausbildung der Hautbarriere wichtige Gene waren im Gegenzug in der Haut der sensibilisierten Hunde vermindert exprimiert. Bei der Untersuchung von Patienten mit hAD und cAD, die natürlicherweise an dieser Krankheit leiden, lässt sich in der Regel nicht nachvollziehen, welche Effekte primärer Natur sind und welche sich aufgrund der allergischen Entzündung entwickeln. Die Reaktion der Hunde in unserer Studie weist darauf hin, dass die Entzündung nach

Allergenexposition bereits nach 24 Stunden auf molekularer Ebene zu einer gestörten Differenzierung der Keratinozyten, zu einer anormalen Entwicklung des CE und zu einer verminderten Expression der Enzyme für die Sphingolipid-Synthese in läsionaler Haut führt, selbst wenn vor der allergischen Entzündung keinerlei Unterschiede in der Expression von Genen zu gesunden Individuen bestehen. In chronischen Läsionen wird sich diese Problematik vermutlich noch stärker ausprägen. Diese Ergebnisse bestätigten die Outside-Inside-Outside-Hypothese auf molekularer Ebene, die besagt, dass bei natürlich erkrankten Patienten eine gestörte Hautbarriere das Eindringen von Allergen erleichtert, was zu einer Entzündung führt, die wiederum die Hautbarriere weiter schädigt. Wir konnten zeigen, dass die Hautbarriere nicht allein durch einwandernde Zellen und Trauma durch Kratzen betroffener Haut geschädigt wird, sondern noch unbekannte Faktoren auf molekularer Ebene zur Expressionsminderung von Genen führt, die für die Ausbildung der Barriere essentiell sind. Wichtig ist auch anzumerken, dass sicherlich erst die Summe der abweichend exprimierten Gene zu einer tatsächlichen, klinisch relevanten, gestörten Hautbarriere führt, da viele Studien mit knock-out Mäusen zeigten, dass ein Mangel an nur einem Protein meist nicht ausreicht. Die herabgesetzte Expression der Entzündungsgene 24 Stunden nach Allergenauftrag bei der gesunden Kontrollgruppe könnte ein Hinweis für einen Negativen Feedback-Mechanismus im Entzündungsgeschehen sein, der bei den sensibilisierten Tieren nicht zu funktionieren scheint, wodurch die allergische Entzündung nicht eingedämmt wird, zur chronischen Entzündung fortschreiten kann und eine Störung der Hautbarriere zur Folge hat.

Lange Zeit konzentrierte sich die Therapie bei AD hauptsächlich auf die T-Zell-medierte Entzündung und/oder die Reduktion des Juckreizes. Die meisten Medikamente, die hierfür zu Verfügung stehen, sind jedoch mit Kurzzeit- und auch potentiellen Langzeit-Nebenwirkungen behaftet. Im Gegensatz dazu bringen Therapien für die Verbesserung der Hautstruktur und -barriere seltener Nebenwirkungen mit sich. Unsere Studie ist ein Hinweis dafür, dass der unterstützende und auch prophylaktische Einsatz von systemischen und lokalen Medikamenten (im Moment in der Regel Fettsäuren und Ceramide) zur Stärkung der Hautbarriere zusätzlich zur entzündungshemmenden Therapie auch bei atopischen Individuen sinnvoll ist, die nicht an einer primären

Hautbarrierestörung leiden. Unsere Ergebnisse bestätigen weiterhin die Ähnlichkeit der Pathophysiologie der AD zwischen Mensch und Hund.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

### Genexpression in der Haut atopische Hunde

Atopische Dermatitis (AD) ist eine weltweit auftretende allergische multifaktorielle Hautkrankheit, deren Prävalenz in den letzten Jahrzehnten besonders in industrialisierten Ländern bei Mensch und Hund stetig angestiegen ist. Die Pathophysiologie ist bis heute nicht eindeutig geklärt, jedoch spielen unter anderem genetische Prädisposition, immunologische Hyperreakтивität, eine gestörte Hautbarriere sowie verschiedene Umweltfaktoren eine wichtige Rolle. Die Therapie der AD ist oftmals unbefriedigend.

Mit der Veröffentlichung des Hundegenoms im Jahr 2005 haben sich umfangreiche Möglichkeiten eröffnet, zu Mensch und Maus orthologe Gene für den Hund durch funktionelle Genomanalysen zu identifizieren. Diese genomischen Daten können mit Hilfe der Microarray-Technologie Erkenntnisse über Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen Fall- und Kontrollgruppen geben.

Ziel dieser Arbeit war es, die Genexpression in der Haut von gegen Hausstaubmilben-Allergen sensibilisierten Hunden durch Microarray-Analysen zu untersuchen. Dadurch sollten differentiell exprimierte Gene (DEG) erfasst und neue, an der Pathophysiologie beteiligte Kandidatengene und/oder Zielgene für neue Therapien der caninen AD identifiziert werden. Gleichzeitig sollten bisherige Ergebnisse von Expressionsstudien bei atopischen Menschen und Hunden bestätigt und erweitert werden.

Hautbiopsien wurden von sechs sensibilisierten und sechs nichtallergischen Beagles von normaler, unbehandelter Haut sowie sechs und 24 Stunden nach Einwirken von auf die Haut aufgetragener Allergen- und Kochsalzlösung (als Negativkontrolle) unter Lokalanästhesie entnommen. Um Schwankungen aufgrund der genetischen Variabilität zu verringern, wurden Hunde derselben Rasse verwendet. Die Transkriptomanalysen wurden mittels Agilent 8x60k Canine Custom Genexpression Array durchgeführt und die Expression ausgewählter Gene durch quantitative real-time RT-PCR validiert. Die Expressionswerte wurden sowohl innerhalb einer Gruppe zu unterschiedlichen Biopsiezeitpunkten und mit unterschiedlicher Behandlung (gepaartes Design) als auch zwischen den Gruppen (ungepaartes Design) verglichen. Um zu untersuchen,

ob und wie sich die Zellpopulation in der Haut in Abhängigkeit von der aufgetragenen Lösung und von ihrer Einwirkzeit verändert, wurden zusätzlich histologische Präparate angefertigt, darin enthaltene Rundzellen ausgezählt und die Zellzahl pro Fläche bestimmt.

Die Microarray-Analyse zeigte im ungepaarten Design keine signifikanten Änderungen der Genexpression in normaler unbehandelter Haut sowie sechs Stunden nach Auftragen der Lösungen. Nach 24 Stunden dagegen konnten 597 DEG identifiziert werden, 361 mit höheren und 226 mit niedrigeren mRNA-Konzentrationen in allergenbehandelter Haut der Allergiker verglichen mit der Negativkontrolle und mit der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung zeigten, dass nach 24 Stunden die Zellzahl pro Fläche in der Allergen-behandelten Haut der atopischen Hunde tendenziell angestiegen war, jedoch nicht in der kochsalzbehandelten Haut und in den nichtallergischen Hunden.

Functional Annotation Clustering, Pathway- und Co-Zitations-Analysen wurden durchgeführt, um die DEG der ungepaarten Multifactorial-Analyse zu charakterisieren. Ein Großteil der Gene mit herabgesetzter Expression in der Kontrollgruppe und im Verhältnis dazu höherer mRNA Konzentration in der Haut der allergischen Hunde, steht im Zusammenhang mit Entzündung, Wundheilung sowie der Immunantwort. Niedrigere mRNA-Konzentrationen in der allergenbehandelten Haut allergischer Tiere wurden dagegen für Gene erhalten, die wichtig für eine korrekte Differenzierung der Epidermis und die Funktion der Hautbarriere sind.

Einige dieser Gene wurden unseres Wissens vorher nicht im Zusammenhang mit der AD beschrieben und könnten in der Pathophysiologie eine wichtige Rolle spielen. Eine Reihe der von uns gefundenen Gene könnten Zielgene für neue Therapien der caninen AD und Kandidatengene für weiterführende Studien darstellen. Da die sensibilisierten Hunde in der unbehandelten Haut keine Expressionsunterschiede der Hautbarrieregene zur Kontrollgruppe zeigten, gehen wir davon aus, dass die allergische Entzündung bei den atopischen Beagles nach Allergen-Patch-Test aufgrund unbekannter Faktoren auf molekularer Ebene zur Expressionsminderung von Genen führt, welche für die Epidermis-Differenzierung und Barriere-Formation wichtig sind.

Unsere Ergebnisse bestätigen weiterhin die Ähnlichkeit der Pathophysiologie der

AD zwischen Mensch und Hund und bekräftigen, dass das atopische Hundemodell zur Erforschung sowohl der humanen als auch der caninen AD geeignet ist.

## VII. SUMMARY

### Geneexpression in the skin of atopic dogs

Atopic dermatitis (AD) is a multifactorial allergic skin disease occurring worldwide in humans and dogs, with rising prevalence especially in industrialized countries. So far pathophysiology is not fully elucidated. However, it is known that a genetic predisposition, an immunologic hyperreactivity, a defect skin barrier and different environmental factors play a pivotal role. Treatment of atopic dermatitis is often unsatisfactory.

The first release of the canine genome sequence in 2005 provided extensive possibilities to identify genes orthologous to humans and mice via functional genome analysis. These genome data can be used to obtain insight in differences in gene expression patterns between case- and control groups by the use of DNA-microarrays.

The aim of this study was to analyze gene expression in the skin of dogs sensitized against house dust mite antigen using this technology. The evaluation of differentially expressed genes (DEG) was helpful to identify new genes possibly involved in pathophysiology of AD and target-genes for new therapeutic interventions. In addition, the study confirmed and extended previous results of gene expression studies in atopic humans and dogs.

Skin biopsies were collected after local anesthesia from six sensitized and six non-allergic Beagle dogs from normal, non-treated skin before and after six and 24 hours after skin patch test with allergen or saline as a negative control. Dogs of the same breed were used as case and control group in order to reduce biological noise due to genetic variability. Transcriptome analysis was performed with an Agilent 8x60k canine custom gene expression array and expression of selected genes was validated by quantitative real-time RT-PCR. Expression data was compared within a group after different treatment of the skin and at different timepoints after treatment (paired design) and also between groups (unpaired design). Additionally, round cells were counted to evaluate if and how populations of inflammatory cells in the skin changed over time and after intervention.

Microarray analysis did not reveal significant changes in gene expression in the

unpaired analyses of normal, untreated skin and also six hours after treatment with allergen or saline. In contrast, after 24 hours 597 DEG were detected; 361 with higher and 226 with lower mRNA concentration in allergen-treated skin of sensitized dogs as compared to their saline-treated skin and to the skin specimens from the control group. Round cells did increase, but not significantly, in the allergen-treated skin of atopic dogs, no change was observed after saline treatment or in the skin of non-allergic dogs.

Functional annotation clustering, pathway and co-citation analysis were performed to characterize the DEG of the unpaired multifactorial analysis. For the most part, genes with decreased expression in the skin of non allergic dogs and compared to that higher mRNA concentration in allergen treated skin of sensitized dogs belonged to genes known to be involved in inflammation, wound healing and immune response. In contrast, down regulated genes in allergen treated skin of allergic dogs were associated with genes that are important for differentiation and barrier function of the skin. To the best of our knowledge, some of these genes were not detected in previous studies in the context of atopic dermatitis and may play an important role in its pathophysiology. A number of genes found in this study are potential target genes for new treatment in atopic dermatitis and further studies.

As the sensitized dogs did not show differences in the expression of genes important for skin barrier function in the normal, untreated skin as compared to the control group, we assume that allergic inflammation after allergen patch test lead to a decrease in the expression of genes important for epidermal differentiation and barrier formation through yet unknown factors and pathways. Our results further confirm the similar pathophysiology of human and canine atopic dermatitis and that the atopic dog model is suitable to investigate human and canine atopic dermatitis.

### VIII. LITERATURVERZEICHNIS

A. V. Rawlings, C. R. Harding. Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy* 2004; 17: 43-8.

Abbas AK (2000) *Cellular and Molecular Immunology*. Ed A.H. Lichtman JSP. W.B. Saunders Company

Abboud G, Staumont-Sallé D, Kanda A, Roumier T, Deruytter N, Lavogiez C, Fleury S, Rémy P, Papin J-P, Capron M, Dombrowicz D. Fc $\epsilon$ RI and Fc $\gamma$ RIII/CD16 Differentially Regulate Atopic Dermatitis in Mice. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 6517-26.

Aguiar-Passeti T, Postol E, Sorg C, Mariano M. Epithelioid cells from foreign-body granuloma selectively express the calcium-binding protein MRP-14, a novel down-regulatory molecule of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* 1997; 62: 852.

Ahmed FE. Microarray RNA transcriptional profiling: Part II. Analytical considerations and annotation. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2006; 6: 703-15.

Aho S, Li K, Ryoo Y, McGee C, Ishida-Yamamoto A, Uitto J, Klement JF. Periplakin gene targeting reveals a constituent of the cornified cell envelope dispensable for normal mouse development. *Molecular and cellular biology* 2004; 24: 6410.

Aijaz S, D'Atri F, Citi S, Balda MS, Matter K. Binding of GEF-H1 to the Tight Junction-Associated Adaptor Cingulin Results in Inhibition of Rho Signaling and G1/S Phase Transition. *Developmental Cell* 2005; 8: 777-86.

Akdis CA, Akdis M. Immunological differences between intrinsic and extrinsic types of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1618-21.

Akiyama M, Takizawa Y, Kokaji T, Shimizu H. Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma. *British Journal of Dermatology* 2001; 144: 401-7.

Alkis T. Systemic effects of local allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 113: S8-S14.

Allam J, Novak N. The pathophysiology of atopic eczema. Clinical and Experimental Dermatology 2006; 31: 89-93.

Anderson G, Leaves N, Bhattacharyya S, Zhang Y, Walshe V, Broxholme J, Abecasis G, Levy E, Zimmer M, Cox R. Positive association to IgE levels and a physical map of the 13q14 atopy locus. European Journal of Human Genetics 2002; 10: 266-70.

Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. The Journal of Cell Biology 1996; 133: 43.

Arakawa S, Hatano Y, Katagiri K. Differential expression of mRNA for Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors and suppressors of cytokine signalling in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. Clinical & Experimental Immunology 2004; 135: 505-10.

Arshad SH, Karmaus W, Kurukulaaratchy R, Sadeghnejad A, Huebner M, Ewart S. Polymorphisms in the interleukin 13 and GATA binding protein 3 genes and the development of eczema during childhood. Br J Dermatol 2008; 158: 1315-22.

Babaev VR, Ishiguro H, Ding L, Yancey PG, Dove DE, Kovacs WJ, Semenkovich CF, Fazio S, Linton MRF. Macrophage Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  Reduces Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. Circulation 2007; 116: 1404-12.

Baden HP, Champliaud MF, Sundberg JP, Viel A. Targeted deletion of the sciillin gene resulted in normal development and maturation. genesis 2005; 42: 219-28.

Bae CJ, Lee JW, Shim SB, Jee SW, Lee SH, Woo JM, Lee CK, Hwang DY. GATA binding protein 3 overexpression and suppression significantly contribute to the regulation of allergic skin inflammation. International journal of molecular medicine 2011;

Barker JN, Palmer CN, Zhao Y, Liao H, Hull PR, Lee SP, Allen MH, Meggitt SJ, Reynolds NJ, Trembath RC, McLean WH. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. J Invest Dermatol 2007; 127: 564-7.

Barros Roque J, O'Leary CA, Kyaw-Tanner M, Latter M, Mason K, Shipstone M, Vogelnest L, Duffy DL. Haplotype sharing excludes canine orthologous Filaggrin locus in atopy in West Highland White Terriers. *Animal Genetics* 2009; 40: 793-4.

Bäumer W, Stahl J, Sander K, Petersen LJ, Paps J, Stark H, Kietzmann M, Olivry T. Lack of preventing effect of systemically and topically administered histamine H1 or H4 receptor antagonists in a dog model of acute atopic dermatitis. *Experimental Dermatology* 2011; 20: 577-81.

Baurecht H, Irvine AD, Novak N, Illig T, Buhler B, Ring J, Wagenpfeil S, Weidinger S. Toward a major risk factor for atopic eczema: meta-analysis of filaggrin polymorphism data. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1406-12.

Baxter M. The association of *Pityrosporum pachydermatis* with the normal external ear canal of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 1976; 17: 231-4.

Bazzoni G, Martínez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 20520-6.

Beck LA, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin J, Gallo R, Paller AS, Lieff S, Reese J, Zaccaro D, Milgrom H, Barnes KC, Leung DYM. Phenotype of atopic dermatitis subjects with a history of eczema herpeticum. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 124: 260-9.e7.

Becker AB, Chung KF, McDonald DM, Frick OL, Gold WM. Cutaneous allergic response in atopic dogs: Relationship of cellular and histamine responses\* 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1988; 81: 441-8.

Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of leukocyte biology* 2000; 68: 1-8.

Berne R, Knabb R, Ely S, Rubio R (1983) Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. 3136

Bever H. Early events in atopy. *European Journal of Pediatrics* 2002; 161: 542-6.

Beyer K, Nickel R, Freidhoff L, Bjorksten B, Huang S-K, Barnes KC, MacDonald S, Forster J, Zepp F, Wahn V, Beaty TH, Marsh DG, Wahn U. Association and Linkage of Atopic Dermatitis with Chromosome 13q12-14 and 5q31-33 Markers. 2000; 115: 906-8.

Bieber T, Ring J, Braun-Falco O. Comparison of different methods for enumeration of Langerhans cells in vertical cryosections of human skin. British Journal of Dermatology 1988; 118: 385-92.

Bieber T, Hinz T, Staudacher A. Neues in der Pathophysiologie der atopischen Dermatitis  
Advances in the pathogenesis of atopic dermatitis. Der Hausarzt 2006; 57: 567-75.

Bieber T. Atopic Dermatitis. Ann Dermatol 2010; 22: 125-37.

Bizikova P, Papich MG, Olivry T. Hydroxyzine and cetirizine pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral and intravenous administration of hydroxyzine to healthy dogs. Veterinary Dermatology 2008; 19: 348-57.

Bjorkenstein B. Perinatal Events in Relation to Sensitization in the Human. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 162: S105-7.

Bleau G, Massicotte F, Merlen Y, Boisvert C. Mammalian chitinase-like proteins. Exs-Basel- 1999; 87: 211-22.

Boguniewicz M, Schmid-Grendelmeier P, Leung DY. Atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 2006; 118: 40-3.

Boguniewicz M, Leung DYM. 10. Atopic dermatitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006; 117: S475-S80.

Bond R, Collin NS, Lloyd DH. Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. Journal of Small Animal Practice 1994; 35: 68-72.

Bond R, Saijonmaa-Koulumies LEM, Lloyd DH. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. Journal of Small Animal Practice 1995; 36: 147-50.

Boniface K, Diveu C, Morel F, Pedretti N, Froger J, Ravon E, Garcia M,

Venereau E, Preisser L, Guignouard E, Guillet G, Daggregorio G, Pene J, Moles JP, Yssel H, Chevalier S, Bernard FX, Gascan H, Lecron JC. Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol* 2007; 178: 4615-22.

Boralevi F, Hubiche T, Léauté-Labrèze C, Saubusse E, Fayon M, Roul S, Maurice-Tison S, Taïeb A. Epicutaneous aeroallergen sensitization in atopic dermatitis infants – determining the role of epidermal barrier impairment. *Allergy* 2008; 63: 205-10.

Bos J, Van Leent E, Sillevis Smitt J. The millennium criteria for the diagnosis of atopic dermatitis. *Experimental Dermatology* 1998; 7: 132-8.

Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponec M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research* 2003; 42: 1-36.

Bowcock A, Shannon W, Du F, Duncan J, Cao K, Aftergut K, Catier J, Fernandez-Vina M, Menter A. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Human molecular genetics* 2001; 10: 1793.

Bowcock AM, Cookson WO. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 2004; 13 Spec No 1: R43-55.

Bradley M, Soderhall C, Luthman H, Wahlgren C, Kockum I, Nordenskjold M. Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosomes 3, 13, 15, 17 and 18 in a Swedish population. *Human molecular genetics* 2002; 11: 1539.

Brandrup F, Hauge M, Henningsen K, Eriksen B. Psoriasis in an Unselected Series of Twins. *Arch Dermatol* 1978; 114: 874-8.

Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 23679.

Brasier AR, Lu M, Hai T, Lu Y, Boldogh I. NF-κB-inducible BCL-3 Expression Is an Autoregulatory Loop Controlling Nuclear p50/NF-κB1 Residence. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 32080-93.

Bratton DL, Hamid Q, Boguniewicz M, Doherty DE, Kailey JM, Leung DY.

Granulocyte macrophage colony-stimulating factor contributes to enhanced monocyte survival in chronic atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation* 1995; 95: 211-8.

Broccardo CJ, Mahaffey S, Schwarz J, Wruck L, David G, Schlievert PM, Reisdorph NA, Leung DYM. Comparative proteomic profiling of patients with atopic dermatitis based on history of *eczema herpeticum* infection and *Staphylococcus aureus* colonization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011; 127: 186-93. e11.

Brun J, Ulvestad E, Fagerhol M, Jonsson R. Effects of human calprotectin (L1) on in vitro immunoglobulin synthesis. *Scandinavian journal of immunology* 1994; 40: 675-80.

Büchau AS, MacLeod DT, Morizane S, Kotol PF, Hata T, Gallo RL. Bcl-3 acts as an innate immune modulator by controlling antimicrobial responses in keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129: 2148-55.

Buddenkotte J, Steinhoff M. Pathophysiology and therapy of pruritus in allergic and atopic diseases. *Allergy* 2010; 65: 805-21.

Bunikowski R, Mielke M, Skarabis H, Herz U, Bergmann RL, Wahn U, Renz H. Prevalence and role of serum IgE antibodies to the *Staphylococcus aureus*-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 103: 119-24.

Burks W. Skin Manifestations of Food Allergy. *Pediatrics* 2003; 111: 1617-24.

Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 328-40.

Cao X, Lin Z, Yang H, Bu D, Tu P, Chen L, Wu H, Yang Y. New mutations in the transglutaminase 1 gene in three families with lamellar ichthyosis. *Clinical and Experimental Dermatology* 2009; 34: 904-9.

Capon F, Novelli G, Semprini S, Clementi M, Nudo M, Vultaggio P, Mazzanti C, Gobello T, Botta A, Fabrizi G. Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *Journal of Investigative Dermatology* 1999; 112: 32-5.

Cauba C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 122: 1235-44.

Chamberlain KW. Atopic (allergic) dermatitis. *Vet Clin North Am* 1974; 4: 29-39.

Champliaud MF, Baden HP, Koch M, Jin W, Burgeson RE, Viel A. Gene characterization of sciellin (SCEL) and protein localization in vertebrate epithelia displaying barrier properties. *Genomics* 2000; 70: 264-8.

Chang NCA, Hung SI, Hwa KY, Kato I, Chen JE, Liu CH, Chang AC. A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 17497.

Chapman S, Walsh A. Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Archives of dermatological research* 1990; 282: 304-10.

Chavanas S, Garner C, Bodemer C, Ali M, Teillac D, Wilkinson J, Bonafé J, Paradisi M, Kelsell D, Ansai S. Localization of the Netherton syndrome gene to chromosome 5q32, by linkage analysis and homozygosity mapping. *The American Journal of Human Genetics* 2000; 66: 914-21.

Chen Y, Enoksson SL, Johansson C, Karlsson MA, Lundeberg L, Nilsson G, Scheynius A, Karlsson MCI. The Expression of BAFF, APRIL and TWEAK Is Altered in Eczema Skin but Not in the Circulation of Atopic and Seborrheic Eczema Patients. *PLoS One* 2011; 6: e22202.

Cheng WL, Wang CS, Huang YH, Tsai MM, Liang Y, Lin KH. Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer. *Annals of Oncology* 2011; 22: 2267-76.

Chervet L, Galichet A, McLean W, Chen H, Suter MM, Roosje PJ, Müller EJ. Missing C-terminal filaggrin expression, NFκB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology* 2010; 19: e343-e6.

Cheung PF-Y, Wong C-K, Ho AW-Y, Hu S, Chen D-P, Lam CW-K. Activation of human eosinophils and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31:

implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Int. Immunol.* 2010; 22: 453-67.

Chizzolini C, Dayer JM, Miossec P. Cytokines in chronic rheumatic diseases: is everything lack of homeostatic balance? *Arthritis research & therapy* 2009; 11: 246.

Cho S-H, Strickland I, Boguniewicz M, Leung DYM. Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 108: 269-74.

Choi BK, Kim YH, Kwon PM, Lee SC, Kang SW, Kim MS, Lee MJ, Kwon BS. 4-1BB Functions As a Survival Factor in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 4107-15.

Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and Interleukin-13: Their Similarities and Discrepancies. *International reviews of immunology* 1998; 17: 1-52.

Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *New England Journal of Medicine* 2007; 357: 2016-27.

Codner E, Lessard P. Comparison of intradermal allergy test and enzyme-linked immunosorbent assay in dogs with allergic skin disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1993; 202: 739

Cole G, Silverberg N. The adherence of *Staphylococcus aureus* to human corneocytes. *Archives of dermatology* 1986; 122: 166.

Cookson WU, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, Cox H.E., Coleman R, Leaves NI, Trembath RC, Moffatt MF, Harper JI. Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nature Genetics* 2001; 27: 372-3.

Cookson W. Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunol Rev* 2002; 190: 195-206.

Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 978-88.

Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DAD, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *The Journal of Cell Biology* 1999; 147: 1569-82.

Cornish C, Devery J, Poronnik P, Lackmann M, Cook D, Geczy C. S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation. *Journal of cellular physiology* 1996; 166: 427-37.

Credille KM, Minor JS, Barnhart KF, Lee E, Cox ML, Tucker KA, Diegel KL, Venta PJ, Hohl D, Huber M, Dunstan RW. Transglutaminase 1-deficient recessive lamellar ichthyosis associated with a LINE-1 insertion in Jack Russell terrier dogs. *British Journal of Dermatology* 2009; 161: 265-72.

Cunard R, DiCampli D, Archer DC, Stevenson JL, Ricote M, Glass CK, Kelly CJ. WY14,643, a PPAR $\alpha$  Ligand, Has Profound Effects on Immune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology* 2002; 169: 6806-12.

Custovic A, Simpson A, Chapman M, Woodcock A. Allergen avoidance in the treatment of asthma and atopic disorders. *Thorax* 1998; 53: 63.

D'Atri F, Citi S. Cingulin interacts with F-actin in vitro. *FEBS letters* 2001; 507: 21-4.

Da Silva CA, Hartl D, Liu W, Lee CG, Elias JA. TLR-2 and IL-17A in Chitin-Induced Macrophage Activation and Acute Inflammation. *The Journal of Immunology* 2008; 181: 4279-86.

Darsow U, Laifaoui J, Kerschenlohr K, Wollenberg A, Przybilla B, Wüthrich B, Borelli S, Giusti F, Seidenari S, Drzimalla K, Simon D, Disch R, Devillers ACA, Oranje AP, De Raeve L, Hachem JP, Dangoisse C, Blondeel A, Song M, Breuer K, Wulf A, Werfel T, Roul S, Taieb A, Bolhaar S, Bruijnzeel-Koomen C, Brönnimann M, Braathen LR, Didierlaurent A, André C, Ring J. The prevalence of positive reactions in the atopy patch test with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema: a European multicenter study. *Allergy* 2004; 59: 1318-25.

Day MJ, Corato A, Shaw SE. Subclass profile of allergen-specific IgG antibodies in atopic dogs. *Res Vet Sci* 1996; 61: 136-42.

Day R, Beckett B, Donnai D, Fryer A, Heidenblad M, Howard P, Kerr B, Mansour S, Maye U, McKee S, Mohammed S, Sweeney E, Tassabehji M, de

Vries BB, Clayton-Smith J. A clinical and genetic study of the Say/Barber/Biesecker/Young-Simpson type of Ohdo syndrome. *Clin Genet* 2008; 74: 434-44.

De Boer. In vitro production of IgG4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC): the contribution of committed B cells. *Clinical & Experimental Immunology* 1998; 114: 252-7.

De Vos C, Maleux M, Baltes E, Gobert J. Inhibition of histamine and allergen skin wheal by cetirizine in four animal species. *Annals of allergy* 1987; 59: 278.

de Vries J. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998; 102: 165-9.

Debes GF, Diehl MC. CCL8 and skin T cells - an allergic attraction. *Nature Immunology* 2011; 12: 111.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 271-6.

DeBoer DJ, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 239-49.

DeBoer DJ, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXI): antihistamine pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 323-9.

Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of Cell Biology* 2008; 180: 451-8.

Dhawan P, Richmond A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *Journal of leukocyte biology* 2002; 72: 9-18.

Di Nardo A, Wertz P, Giannetti A, Seidenari S. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *ACTA Dermatovenerologica Stockholm* 1998; 78: 27-30.

DiColandrea T, Karashima T, Määttä A, Watt FM. Subcellular Distribution of Envoplakin and Periplakin. *The Journal of Cell Biology* 2000; 151: 573-86.

Diegelmann J, Seiderer J, Niess JH, Haller D, Göke B, Reinecker HC, Brand S. Expression and regulation of the chemokine CXCL16 in Crohn's disease and models of intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases* 2010; 16 (11):1871-81.

Djalilian A, McGaughey D, Patel S, Seo E, Yang C, Cheng J, Tomic M, Sinha S, Ishida-Yamamoto A, Segre J. Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. *Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1243-53.

Djian P, Easley K, Green H. Targeted ablation of the murine involucrin gene. *The Journal of Cell Biology* 2000; 151: 381-8.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2001; 33: 637-68.

Driver AG, Kukoly CA, Ali S, Mustafa SJ. Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1993; 148: 91.

Dubrac S, Stoitzner P, Pirkebner D, Elentner A, Schoonjans K, Auwerx J, Saeland S, Hengster P, Fritsch P, Romani N. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activation inhibits Langerhans cell function. *The Journal of Immunology* 2007; 178: 4362.

Dubrac S, Schmuth M. PPAR-alpha in cutaneous inflammation. *Dermato-endocrinology* 2011; 3: 23.

Eberlein B, Eicke C, Reinhardt H, Ring J. Adjuvant treatment of atopic eczema: assessment of an emollient containing N-palmitoylethanolamine (ATOPA study). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2008; 22: 73-82.

Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 481-92.

Eckl KM, Krieg P, Küster W, Traupe H, André F, Wittstruck N, Fürstenberger G, Hennies HC. Mutation spectrum and functional analysis of epidermis-type lipoxygenases in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Human mutation* 2005; 26: 351-61.

Egelrud T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Dermato Venereologica* Supplement 2000; 44-5.

Egelrud T, Brattsand M, Kreutzmann P, Walden M, Vitzithum K, Marx UC, Forssmann WG, Mägert HJ. hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *British Journal of Dermatology* 2005; 153: 1200-3.

Eichenfield LF, McCollum A, Msika P. The benefits of sunflower oleodistillate (SOD) in pediatric dermatology. *Pediatric dermatology* 2009; 26: 669-75.

Elentner A, Finke D, Schmuth M, Chappaz S, Ebner S, Malissen B, Kissenseppenig A, Romani N, Dubrac S. Langerhans cells are critical in the development of atopic dermatitis-like inflammation and symptoms in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; 13: 2658-72.

Elias P. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *Journal of Investigative Dermatology* 2005; 125: 183-200.

Elias PM, Friend DS. The permeability barrier in mammalian epidermis. *The Journal of Cell Biology* 1975; 65: 180.

Elias PM, Goerke J, Friend DS. Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J Invest Dermatol* 1977; 69: 535-46.

Elias PM, Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Current allergy and asthma reports* 2009; 9: 265-72.

Elliott J, Johnston JA. SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends in Immunology* 2004; 25: 434-40.

Enlund F, Samuelsson L, Enerbaeck C, Inerot A, Wahlstroem J, Yhr M, Torinsson A, Riley J, Swanbeck G, Martinsson T. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *European Journal of Human Genetics* 1999; 7: 783-90.

Farber EM, Nall ML, Watson W. Natural History of Psoriasis in 61 Twin Pairs. *Arch Dermatol* 1974; 109: 207-11.

Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal*

of Cell Biology 1963; 17: 375-412.

Fartasch M, Bassukas I, Diepgen T. Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. British Journal of Dermatology 1992; 127: 221-7.

Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. Veterinary Dermatology 2010; 21: 23-31.

Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan NA. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. Vet Dermatol 2009; 20: 179-84.

Feoktistov I, Biaggioni I, Polosa R, Holgate ST. Adenosine A2B receptors: a novel therapeutic target in asthma? Trends in Pharmacological Sciences 1998; 19: 148-53.

Flohr C, Pascoe D, Williams H. Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true? British Journal of Dermatology 2005; 152: 202-16.

Flohr C., L. Y. Atopic Dermatitis and the Hygiene Hypothesis Revisited. Pathogenesis and Management of Atopic Dermatitis 2011; 41: 1-34.

Feehling D, Anhalt GJ, Boeckeler B, Elbe A, Wolff K, Rappersberger K. Autoantibodies to desmoplakin I and II in patients with erythema multiforme. The Journal of Experimental Medicine 1995; 181: 169-79.

Forteza R, Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Fries E, Rugg MS, Milner CM, Day AJ. TSG-6 Potentiates the Antitissue Kallikrein Activity of Inter- $\alpha$ -inhibitor through Bikunin Release. American journal of respiratory cell and molecular biology 2007; 36: 20.

Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. BioTechniques 2000; 29: 1042-55.

Freinkel RK, Traczyn TN. Lipid Composition and Acid Hydrolase Content of Lamellar Granules of Fetal Rat Epidermis. J Investig Dermatol 1985; 85: 295-8.

Fries E, Kaczmarczyk A. Inter-alpha-inhibitor, hyaluronan and inflammation.

Acta biochimica Polonica 2003; 50: 735.

Frijters R, Heupers B, Van Beek P, Bouwhuis M, Van Schaik R, De Vlieg J, Polman J, Alkema W. CoPub: a literature-based keyword enrichment tool for microarray data analysis. Nucleic acids research 2008; 36: W406.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. The Journal of Cell Biology 1993; 123: 1777-88.

Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, Karami-Tehrani F. Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. Journal of leukocyte biology 2004; 76: 169.

Gijsbers K, Van Assche G, Joossens S, Struyf S, Proost P, Rutgeerts P, Geboes K, Van Damme J. CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue. European journal of immunology 2004; 34: 1992-2000.

Girolomoni G, Pastore S. The role of keratinocytes in the pathogenesis of atopic dermatitis. Journal of the American Academy of Dermatology 2001; 45: S25.

Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, De Pità O, Chinni LM, Giannetti A, Girolomoni G, Pastore S. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2001; 107: 871-7.

Glaser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schroder J-M. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. Nat Immunol 2005; 6: 57-64.

Glaser R, Meyer-Hoffert U, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Kobliakova J, Folster-Holst R, Proksch E, Schroder J-M, Schwarz T. The Antimicrobial Protein Psoriasin (S100A7) Is Upregulated in Atopic Dermatitis and after Experimental Skin Barrier Disruption. J Invest Dermatol 2008; 129: 641-9.

Glos K, Linek M, Loewenstein C, Mayer U, Mueller R, Spezialisten T, Hamburg G. The efficacy of commercially available veterinary diets recommended for dogs

with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2008; 19: 280-7.

Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *European journal of immunology* 1993; 23: 2631-41.

Gracie JA, Forsey RJ, Gilmour A, Leung B, Greer M, Kennedy K, Carter R, Wei X, Xu D. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 104: 1393-402.

Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *The FASEB journal* 1991; 5: 3071.

Grewé M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunology Today* 1998; 19: 359-61.

Griffin CE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 255-69.

Griffin CE, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 363-83.

Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998; 282: 2261.

Guillemot L, Citi S. Cingulin regulates claudin-2 expression and cell proliferation through the small GTPase RhoA. *Molecular biology of the cell* 2006; 17: 3569-77.

Günther C, Carballido-Perrig N, Kaesler S, Carballido JM, Biedermann T. CXCL16 and CXCR6 Are Upregulated in Psoriasis and Mediate Cutaneous Recruitment of Human CD8+ T Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 2011;

Gustafsson D, Sjöberg O, Foucard T. Development of allergies and asthma in

infants and young children with atopic dermatitis - a prospective follow -up to 7 years of age. *Allergy* 2000; 55: 240-5.

Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Whynot J, Novitskaya I, Cardinale I, Haider A, Khatcherian A, Carucci JA, Bergman R, Krueger JG. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 119: 1210-7.

Haagerup A, Bjerke T, Schiøtz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA. Asthma and atopy - a total genome scan for susceptibility genes. *Allergy* 2002; 57: 680-6.

Halliwell RE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 159-67.

Ham J, Rees D. The adenosine a2b receptor: its role in inflammation. *Endocrine, Metabolic Immune Disord Drug Targets* 2008; 8: 244-54.

Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1994; 94: 870-6.

Hamid Q, Naseer T, Minshall EM, Song YL, Boguniewicz M, Leung DYM. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1996; 98: 225-31.

Hansson L, Bäckman A, Ny A, Edlund M, Ekholm E, Hammarström BE, Törnell J, Wallbrandt P, Wennbo H, Egelrud T. Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 118: 444-9.

Hardas B, Zhao X, Zhang J, Longqing X, Stoll S, Elder J. Assignment of Psoriasin to Human Chromosomal Band 1q21: Coordinate Overexpression of Clustered Genes is Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 1996; 106: 753-8.

Hashimoto K. Intercellular spaces of the human epidermis as demonstrated with lanthanum. *Journal of Investigative Dermatology* 1971; 57: 17-31.

Hatano Y, Man MQ, Uchida Y, Crumrine D, Mauro TM, Feingold KR, Elias PM, Holleran WM. Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\beta/\delta$  (but not  $\gamma$ ) and liver X receptor activators. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125: 160-9. e5.

Hees H, Sinowatz F (2000) Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie, 3 edn. Deutscher Ärzte-Verlag. 455-69

Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115: 1-20.

Heinisch IVWM, Bizer C, Volgger W, Simon HU. Functional CD137 receptors are expressed by eosinophils from patients with IgE-mediated allergic responses but not by eosinophils from patients with non-IgE-mediated eosinophilic disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 108: 21-8.

Helms C, Cao L, Krueger J, Wijsman E, Chamian F, Gordon D, Heffernan M, Daw J, Robarge J, Ott J. A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nature Genetics* 2003; 35: 349-56.

Henderson J, Northstone K, Lee S, Liao H, Zhao Y, Pembrey M, Mukhopadhyay S, Smith G, Palmer C, McLean W. The burden of disease associated with filaggrin mutations: a population-based, longitudinal birth cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008; 121: 872-7.

Hendricks A, Schuberth H-J, Schueler K, Lloyd DH. Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus intermedius* isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. *Research in Veterinary Science* 2002; 73: 273-7.

Hightower K, Marsella R, Creary E, Dutcher P. Evaluation of transepidermal water loss in canine atopic dermatitis: a pilot study in Beagle dogs sensitized to house dust mites. *Veterinary Dermatology* 2008; 19: 108.

Hildenbrand M, Rhiemeier V, Hartenstein B, Lahrmann B, Grabe N, Angel P, Hess J. Impaired skin regeneration and remodeling after cutaneous injury and chemically induced hyperplasia in taps-transgenic mice. *Journal of Investigative Dermatology* 2010; 130: 1922-30.

Hill PB, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 169-86.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 147-51.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (X): is there a relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions? *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 227-31.

Hoffjan S, Epplen JT. The genetics of atopic dermatitis: recent findings and future options. *J Mol Med* 2005; 83: 682-92.

Hofmann M, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P. RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell* 1999; 97: 889-901.

Hohl D. Cornified Cell Envelope. *Dermatology* 1990; 180: 201-11.

Hohl D, Mehrel T, Lichti U, Turner M, Roop D, Steinert P. Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 6626.

Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bunemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 2002; 8: 157-65.

Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DYM. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 118: 178-89.

Horikoshi T, Igarashi S, Uchiwa H, Brysk H, Brysk M. Role of endogenous cathepsin D-like and chymotrypsin-like proteolysis in human epidermal desquamation. *British Journal of Dermatology* 1999; 141: 453-9.

Howell MD, Novak N, Bieber T, Pastore S, Girolomoni G, Boguniewicz M, Streib J, Wong C, Gallo RL, Leung DYM. Interleukin-10 downregulates anti-

microbial peptide expression in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 2005; 125: 738-45.

Howell MD, Boguniewicz M, Pastore S, Novak N, Bieber T, Girolomoni G, Leung DY. Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *Clin Immunol* 2006; 121: 332-8.

Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DYM. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007; 120: 150-5.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protocols* 2008; 4: 44-57.

Huber W, Von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 2002; 18: S96.

Hudson TJ. Skin barrier function and allergic risk. *Nat Genet* 2006; 38: 399-400.

Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature biotechnology* 2001; 19: 342-7.

Hussein Y, Ahmad A, Ibrahim M, Elsherbeny H, Shalaby S, El-Shal A, Sabbah N. Interleukin 13 receptors as biochemical markers in atopic patients. *Journal of investigational allergology & clinical immunology: official organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana de Alergia e Inmunología* 2011; 21: 101.

Hwang S. Mechanisms of T-cell homing to skin. *Advances in dermatology* 2001; 17: 211.

Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *Journal of Investigative Dermatology* 1991; 96: 523-6.

Inman AO, Olivry T, Dunston SM, Monteiro-Riviere NA, Gatto H. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Vet Pathol* 2001; 38: 720-3.

Ishida-Yamamoto A, Igawa S, Kishibe M. Order and disorder in corneocyte adhesion. *The Journal of Dermatology* 2011; 38: 645-54.

Islam SA, Chang DS, Colvin RA, Byrne MH, McCully ML, Moser B, Lira SA, Charo IF, Luster AD. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ TH2 cells. *Nature Immunology* 2011; 12: 167-77.

Jaeger K, Linek M, Power H, Bettenay S, Zabel S, Rosychuk R, Mueller R. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary Dermatology* 2010; 21: 118-22.

Jarzab J, Filipowska B, Zebracka J, Kowalska M, Bozek A, Rachowska R, Gubala E, Grzanka A, Hadas E, Jarzab B. Locus 1q21 Gene Expression Changes in Atopic Dermatitis Skin Lesions: Dereulation of Small Proline-Rich Region 1A. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 151: 28-37.

Jee H, Kim K, Hong J, Sohn M, Kim K. Increased serum B cell-activating factor level in children with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Dermatology* 2010; 35: 593-8.

Jensen J, Fölster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schütze S, Proksch E. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 122: 1423-31.

Jinquan T, Vorum H, Larsen C, Madsen P, Rasmussen H, Gesser B, Etzerodt M, Honore B, Celis J, Thestrup-Pedersen K. Psoriasin: a novel chemotactic protein. *Journal of Investigative Dermatology* 1996; 107: 5-10.

Jobard F, Lefèvre C, Karaduman A, Blanchet-Bardon C, Emre S, Weissenbach J, Özgür M, Lathrop M, Prud'homme JF, Fischer J. Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12 (R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13. 1. Human molecular genetics 2002; 11: 107.

Johansen J, Hvolris J, Hansen M, Backer V, Lorenzen I, Price P. Serum YKL-40 levels in healthy children and adults. Comparison with serum and synovial fluid

levels of YKL-40 in patients with osteoarthritis or trauma of the knee joint. *Rheumatology* 1996; 35: 553.

Johansson C, Eshaghi H, Linder MT, Jakobson E, Scheynius A. Positive atopy patch test reaction to *Malassezia furfur* in atopic dermatitis correlates with a T helper 2-like peripheral blood mononuclear cells response. *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 118: 1044-51.

Jonkman MF, Pasmanij AMG, Pasman SGMA, van den Berg MP, ter Horst HJ, Timmer A, Pas HH. Loss of desmoplakin tail causes lethal acantholytic epidermolysis bullosa. *The American Journal of Human Genetics* 2005; 77: 653-60.

Kaburagi Y, Shimada Y, Nagaoka T, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and eotaxin) in patients with atopic dermatitis. *Archives of dermatological research* 2001; 293: 350-5.

Kalish H, Phillips TM. Assessment of Chemokine Profiles in Human Skin Biopsies by an Immunoaffinity Capillary Electrophoresis Chip. *Methods* 2011;

Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 2001; 357: 1076-9.

Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic acids research* 2006; 34: D354-D7.

Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, Yamanishi Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research* 2008; 36: D480-D4.

Kang JS, Yoon YD, Ahn JH, Kim SC, Kim KH, Kim HM, Moon EY. B cell-activating factor is a novel diagnosis parameter for asthma. *International Archives of Allergy and Immunology* 2006; 141: 181-8.

Karashima T, Watt FM. Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments. *Journal of cell science* 2002; 115: 5027.

Katagiri K, Itami S, Hatano Y, Takayasu S. Increased levels of IL-13 mRNA, but not IL-4 mRNA, are found in vivo in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with atopic dermatitis (AD). *Clinical & Experimental Immunology* 1997; 108: 289-94.

Kato A, Fukai K, Oiso N, Hosomi N, Murakami T, Ishii M. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br J Dermatol* 2003; 148: 665-9.

Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Nakagawa H, Otsuka F, Hamaguchi H. Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 1998; 35: 502-4.

Kay J, Gawkrodger DJ, Mortimer MJ, Jaron AG. The prevalence of childhood atopic eczema in a general population. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1994; 30: 35-9.

Kazerounian S, Uitto J, Aho S. Unique role for the periplakin tail in intermediate filament association: specific binding to keratin 8 and vimentin. *Experimental Dermatology* 2002; 11: 428-38.

Kennis RA, Rosser EJ, Olivier NB, Walker RW. Quantity and distribution of Malassezia organisms on the skin of clinically normal dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1996; 208: 1048-&.

Kiekens R, Thepen T, Bihari I, Knol E, Van De Winkel J, Bruijnzeel-Koomen C. Expression of Fc receptors for IgG during acute and chronic cutaneous inflammation in atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 2000; 142: 1106-13.

Kim BE, Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clinical Immunology* 2008; 126: 332-7.

Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI): from physiology to pathology. *Annual review of immunology* 1999; 17: 931-72.

Kippenberger S, Loitsch SM, Grundmann-Kollmann M, Simon S, Dang TA, Hardt-Weinelt K, Kaufmann R, Bernd A. Activators of peroxisome proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced

inflammation. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1430-6.

Kiyokawa C, Ruhrberg C, Nie Z, Karashima T, Mori O, Nishikawa T, Green KJ, Anhalt GJ, DiColandrea T, Watt FM. Envoplakin and periplakin are components of the paraneoplastic pemphigus antigen complex. *The Journal of investigative dermatology* 1998; 111: 1236.

Koch PJ, De Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M. Lessons from Loricrin-Deficient Mice. *The Journal of Cell Biology* 2000; 151: 389-400.

Kolls JK, McCray PB, Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8: 829-35.

Komada T, Araki R, Nakatani K, Yada I, Naka M, Tanaka T. Novel specific chemotactic receptor for S100L protein on guinea pig eosinophils. *Biochemical and biophysical research communications* 1996; 220: 871-4.

Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Ohka R, Amano O, Takehara K, Saijoh K. Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 118: 436-43.

Kömüves LG, Hanley K, Lefebvre AM, Man MQ, Ng DC, Bikle DD, Williams ML, Elias PM, Auwerx J, Feingold KR. Stimulation of PPAR $\alpha$  promotes epidermal keratinocyte differentiation in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 2000; 115: 353-60.

Kong W, Longaker MT, Lorenz HP. Molecular cloning and expression of keratinocyte proline-rich protein, a novel squamous epithelial marker isolated during skin development. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 22781.

König HE, Liebich HG (2002) Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, 2 edn. Schattauer Verlag

Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010; 9: 703-18.

Krieg P, Heidt M, Siebert M, Kinzig A, Marks F, Furstenberger G. Epidermis-type lipoxygenases. *Advances in experimental medicine and biology* 2002; 507:

165-70.

Kucur M, Isman FK, Karadag B, Vural VA, Tavsanoglu S. Serum YKL-40 levels in patients with coronary artery disease. *Coronary artery disease* 2007; 18: 391.

Kuramoto N, Takizawa T, Matsuki M, Morioka H, Robinson JM, Yamanishi K. Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109: 243-50.

Kvedar JC, Manabe M, Phillips SB, Ross BS, Baden HP. Characterization of sciellin, a precursor to the cornified envelope of human keratinocytes. *Differentiation* 1992; 49: 195-204.

Laberge S, Ghaffar O, Boguniewicz M, Center DM, Leung DYM, Hamid Q. Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998; 102: 645-50.

Landmann L. The epidermal permeability barrier. *Anatomy and Embryology* 1988; 178: 1-13.

Langstein J, Michel J, Fritsche J, Kreutz M, Andreesen R, Schwarz H. CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *The Journal of Immunology* 1998; 160: 2488.

Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6: 761-71.

Larsen FS, Holm NV, Henningsen K. Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 487-94.

Latta M, Mohan K, Issekutz TB. CXCR6 is expressed on T cells in both T helper type 1 (Th1) inflammation and allergen-induced Th2 lung inflammation but is only a weak mediator of chemotaxis. *Immunology* 2007; 121: 555-64.

Lavrijsen APM, Bouwstra JA, Gooris GS, Weerheim A, Bodde HE, Ponec M. Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization in patients with lamellar ichthyosis. *Journal of Investigative Dermatology* 1995; 105: 619-24.

Lee CG. Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling. *Yonsei medical journal* 2009; 50: 22.

Lee CG, Hartl D, Lee GR, Koller B, Matsuura H, Da Silva CA, Sohn MH, Cohn L, Homer RJ, Kozhich AA. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* 2009; 206: 1149-66.

Lee CG, Elias JA. Role of breast regression protein-39/YKL-40 in asthma and allergic responses. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 2010; 2: 20.

Lee TH, Wisniewski HG, Vilcek J. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *The Journal of Cell Biology* 1992; 116: 545-57.

Lee WH, Jang S, Lee JS, Lee Y, Seo EY, You KH, Lee SC, Nam KI, Kim JM, Kee SH. Molecular cloning and expression of human keratinocyte proline-rich protein (hKPRP), an epidermal marker isolated from calcium-induced differentiating keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2005; 125: 995-1000.

Lee Y-A, Wahn U, Kehrt R, Tarani L, Businco L, Gustafsson D, Andersson F, Oranje AP, Wolkertstorfer A, Berg Av, Hoffmann U, Kuster W, Wienker T, Ruschendorf F, Reis A. A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nat Genet* 2000; 26: 470-3.

Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA, Hanifin JM, Sampson HA. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *The Journal of Clinical Investigation* 1993; 92: 1374-80.

Leung DY, Jain N, Leo HL. New concepts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 634-8.

Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003; 361: 151-60.

Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 651-7.

Leung DYM, Schneeberger EE, Siraganian RP, Geha RS, Bhan AK. The presence of IgE on macrophages and dendritic cells infiltrating into the skin lesion of atopic dermatitis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1987; 42: 328-37.

Leung DYM. Atopic dermatitis: The skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1995; 96: 302-19.

Leung DYM. Atopic dermatitis and the immune system: The role of superantigens and bacteria. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2001; 45: S13-S6.

Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 1974; 90: 525-.

Lian TM, Halliwell RE. Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66: 203-23.

Liebich HG, Böck P, Budras K-D, Maierl J, Reese S (2004) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für das Studium und Praxis., 4 edn. Schattauer Verlag

Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 103-10.

Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, Zody MC. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005; 438: 803-19.

Linek M, Favrot C. Impact of canine atopic dermatitis on the health related quality of life of affected dogs and quality of life of their owners. *Veterinary Dermatology* 2010; 21: 456-62.

Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang S-K, Lau S, Sommerfeld C, Fallin MD, Kao WHL, Wahn U, Nickel R. Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112: 382-8.

Liu Y-J. Dendritic Cell Subsets and Lineages, and Their Functions in Innate and

Adaptive Immunity. Cell 2001; 106: 259-62.

Liu Y, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang Y, de Waal Malefyt R, Omori M, Zhou B, Ziegler S. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. 2007;

Loewenstein C, Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. Veterinary Dermatology 2009; 20: 84-98.

Maatta A, DiColandrea T, Groot K, Watt FM. Gene targeting of envoplakin, a cytoskeletal linker protein and precursor of the epidermal cornified envelope. Molecular and cellular biology 2001; 21: 7047.

Macheleidt O, Kaiser HW, Sandhoff K. Deficiency of Epidermal Protein-Bound omega-Hydroxyceramides in Atopic Dermatitis. Journal of Investigative Dermatology 2002; 119: 166-73.

Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. Nature Reviews Immunology 2009; 9: 491-502.

Madison KC. Barrier Function of the Skin: "La Raison d'Etre" of the Epidermis. J Investig Dermatol 2003; 121: 231-41.

Maeda S, Maeda S, Shibata S, Chimura N, Fukata T. House dust mite major allergen Der f 1 enhances proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in a cell line of canine epidermal keratinocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology 2009; 131: 298-302.

Mägert H-J, Kreutzmann P, Ständker L, Walden M, Drögemüller K, Forssmann W-G. LEKTI: a multidomain serine proteinase inhibitor with pathophysiological relevance. The international journal of biochemistry & cell biology 2002; 34: 573-6.

Manabe M, Sanchez M, Sun T, Dale B. Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. Differentiation 1991; 48: 43-50.

Mandruzzato S. Technological platforms for microarray gene expression profiling. Microarray Technology and Cancer Gene Profiling 2007; 12-8.

Manjunath S, Sakhare PM. Adenosine and adenosine receptors: Newer therapeutic perspective. *Indian journal of pharmacology* 2009; 41: 97.

Mao X, Choi EJ, Payne AS. Disruption of desmosome assembly by monovalent human pemphigus vulgaris monoclonal antibodies. *Journal of Investigative Dermatology* 2008; 129: 908-18.

Marekov LN, Steinert PM. Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 1998; 273: 17763-70.

Marenholz I, Rivera VAG, Esparza-Gordillo J, Bauerfeind A, Lee-Kirsch M-A, Ciechanowicz A, Kurek M, Piskackova T, Macek M, Lee Y-A. Association Screening in the Epidermal Differentiation Complex (EDC) Identifies an SPRR3 Repeat Number Variant as a Risk Factor for Eczema. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 1644-9.

Marquardt DL, Walker LL. Modulation of mast cell responses to adenosine by agents that alter protein kinase C activity. *Biochemical Pharmacology* 1990; 39: 1929-34.

Marquardt DL, Walker LL. Inhibition of protein kinase A fails to alter mast cell adenosine responsiveness. *Inflammation Research* 1994; 43: 7-12.

Marsella R, Olivry T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXII): nonsteroidal anti-inflammatory pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 331-45.

Marsella R, Nicklin C, Lopez J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol* 2006a; 17: 306-12.

Marsella R, Olivry T, Maeda S. Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Vet Dermatol* 2006b; 17: 111-20.

Marsella R, Olivry T, Nicklin C, Lopez J. Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Veterinary Dermatology* 2006c; 17: 24-35.

Marsella R, Olivry T, Nicklin C, Lopez J. Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Vet Dermatol* 2006d; 17: 24-35.

Marsella R, Samuelson D, Doerr K, Hightower K, Harrington L (2008) Defective barrier function in an experimental model of atopic dermatitis in high IgE producing beagles. In the Proceedings of the 5th George Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis. Kyoto, Japan. 18

Marsella R, Samuelson D, Harrington L. Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Veterinary Dermatology* 2009; 20: 547-54.

Marsella R, Girolomoni G. Canine Models of Atopic Dermatitis: A Useful Tool with Untapped Potential. *J Invest Dermatol* 2009;

Mascia F, Mariani V, Girolomoni G, Pastore S. Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *American Journal of Pathology* 2003; 163: 303.

Mason KV, Evans AG. Dermatitis associated with Malassezia Pachydermatis in 11 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1991; 27: 13-20.

Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fässler R. Cyld Inhibits Tumor Cell Proliferation by Blocking Bcl-3-Dependent NF-κB Signaling. *Cell* 2006; 125: 665-77.

Masuda K, Sakaguchi M, Fujiwara S, Kurata K, Yamashita K, Odagiri T, Nakao Y, Matsuki N, Ono K, Watari T, Hasegawa A, Tsujimoto H. Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 73: 193-204.

Matsui T, Hayashi-Kisumi F, Kinoshita Y, Katahira S, Morita K, Miyachi Y, Ono Y, Imai T, Tanigawa Y, Komiya T. Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine- $\alpha$ - $\beta$  and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13. 1. *Genomics* 2004; 84: 384-97.

Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M. SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO*

Molecular Medicine 2011; 3: 320-33.

Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, Ueda E, Morishima Y, Tabata K, Yasuno H. Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95: 1044.

Matsushita T, Fujimoto M, Echigo T, Matsushita Y, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Elevated serum levels of APRIL, but not BAFF, in patients with atopic dermatitis. *Experimental Dermatology* 2008; 17: 197-202.

McGrath JA, Uitto J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends in molecular medicine* 2008; 14: 20-7.

McKeithan TW, Ohno H, Diaz MO. Identification of a transcriptional unit adjacent to the breakpoint in the 14; 19 translocation of chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1990; 1: 247-55.

Méhul B, Bernard D, Schmidt R. Calmodulin-like skin protein: a new marker of keratinocyte differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* 2001; 116: 905-9.

Merryman-Simpson AE, Wood SH, Fretwell N, Jones PG, McLaren WM, McEwan NA, Clements DN, Carter SD, Ollier WE, Nuttall T. Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Vet Dermatol* 2008; 19: 59-66.

Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J, Peters JM, Kaya G, Gonzalez FJ, Zakany J. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and PPAR $\beta$  mutant mice. *The Journal of Cell Biology* 2001; 154: 799-814.

Miedzobrodzki J, Kaszycki P, Bialecka A, Kasprowicz A. Proteolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the colonized skin of patients with acute-phase atopic dermatitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2002; 21: 269-76.

Milner CM, Day AJ. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *Journal of cell science* 2003; 116: 1863.

Mischke D, Korge B, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *Journal of Investigative Dermatology* 1996; 106: 989-92.

Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & therapeutics* 2006; 110: 371-85.

Morgan AJ, Guillen C, Symon FA, Huynh TT, Berry MA, Entwistle JJ, Briskin M, Pavord ID, Wardlaw AJ. Expression of CXCR6 and its ligand CXCL16 in the lung in health and disease. *Clinical & Experimental Allergy* 2005; 35: 1572-80.

Morita K, Itoh M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Furuse M, Yoneda K, Imamura S, Fujimoto K, Tsukita S. Subcellular distribution of tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin. *Journal of Investigative Dermatology* 1998; 110: 862-6.

Morris DO, Olivier NB, Rosser EJ. Type-1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. *Am J Vet Res* 1998; 59: 836-41.

Morris DO. *Malassezia* dermatitis and otitis. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 1999; 29: 1303-10.

Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, Cosman D. Dual oncostatin M (OSM) receptors. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 32635.

Mueller R, Bettenay S. Long-term immunotherapy of 146 dogs with atopic dermatitis - a retrospective study. *Australian Veterinary Practitioner* 1996; 26: 128-32.

Mueller RS, Bettenay SV, Tideman L. Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Aust Vet J* 2000; 78: 392-9.

Mueller RS, Fieseler KV, Rosychuk RA, Greenwalt T. Intradermal testing with the storage mite *Tyrophagus putrescentiae* in normal dogs and dogs with atopic dermatitis in Colorado. *Vet Dermatol* 2005; 16: 27-31.

Nagel A, Hertl M, Eming R. B-cell-directed therapy for inflammatory skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129: 289-301.

Nandagopal S, Wu D, Lin F. Combinatorial Guidance by CCR7 Ligands for T Lymphocytes Migration in Co-Existing Chemokine Fields. *PLoS One* 2011; 6: e18183.

Naso MF, Liang B, Huang CC, Song XY, Shahied-Arruda L, Belkowski SM, D'Andrea MR, Polkovitch DA, Lawrence DR, Griswold DE. Dermokine: An extensively differentially spliced gene expressed in epithelial cells. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127: 1622-31.

Nawijn MC, Dingjan GM, Ferreira R, Lambrecht BN, Karis A, Grosveld F, Savelkoul H, Hendriks RW. Enforced Expression of GATA-3 in Transgenic Mice Inhibits Th1 Differentiation and Induces the Formation of a T1/ST2-Expressing Th2-Committed T Cell Compartment In Vivo. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 724-32.

Nemes Z, Marekov LN, Fésüs L, Steinert PM. A novel function for transglutaminase 1: Attachment of long-chain  $\omega$ -hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96: 8402-7.

Nemoto-Hasebe I, Akiyama M, Nomura T, Sandilands A, McLean WHI, Shimizu H. *FLG* mutation p.Lys4021X in the C-terminal imperfect filaggrin repeat in Japanese patients with atopic eczema. *British Journal of Dermatology* 2009; 161: 1387-90.

Nickel R, Casolaro V, Wahn U, Beyer K, Barnes K, Plunkett B, Freidhoff L, Sengler C, Plitt J, Schleimer R. Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the CC chemokine RANTES. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 1612.

Nils R. The ultrastructure of the interfollicular epidermis of the hairless (hr/hr) mouse III. Desmosomal transformation during keratinization. *Journal of Ultrastructure Research* 1975; 52: 32-51.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc $\gamma$  receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8: 34-47.

Nishio Y, Noguchi E, Shibasaki M, Kamioka M, Ichikawa E, Ichikawa K,

Umebayashi Y, Otsuka F, Arinami T. Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. *Genes and immunity* 2003; 4: 515-7.

Noli C, Scarampella F (2005) Praktische Dermatologie bei Hund und Katze. Schlütersche Verlag

Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003a; 171: 3262-9.

Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst MA, Travers JB, Leung DY. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2003b; 112: 1195-202.

Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112: 252-62.

Novak N, Bieber T, Leung DYM. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112: S128-S39.

Novak N, Allam J-P, Hagemann T, Jenneck C, Laffer S, Valenta R, Kochan J, Bieber T. Characterization of Fc $\epsilon$ RI-bearing CD123 $^{+}$  blood dendritic cell antigen-2 $^{+}$  plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 114: 364-70.

Novak N, Bieber T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005; 53: S171-S6.

Novak N, Kruse S, Potreck J, Maintz L, Jenneck C, Weidinger S, Fimmers R, Bieber T. Single nucleotide polymorphisms of the IL18 gene are associated with atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 115: 828-33.

Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999; 10: 127-36.

Nuttall T, Mueller R, Bensignor E, Verde M, Noli C, Schmidt V, Reme C.

Efficacy of a 0.0584% hydrocortisone aceponate spray in the management of canine atopic dermatitis: a randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Vet Dermatol* 2009; 20: 191-8.

Nuttall TJ, Halliwell REW. Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2001; 12: 327-32.

Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 789-95.

O'Regan G, Sandilands A, McLean W, Irvine A. Filaggrin in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 124: R2-R6.

Ober C, Tan Z, Sun Y, Possick JD, Pan L, Nicolae R, Radford S, Parry RR, Heinzmann A, Deichmann KA. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *New England Journal of Medicine* 2008; 358: 1682-91.

Ober C, Chupp GL. The chitinase and chitinase-like proteins: a review of genetic and functional studies in asthma and immune-mediated diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2009; 9: 401.

Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 107: 429-40.

Oh DY, Schumann RR, Hamann L, Neumann K, Worm M, Heine G. Association of the toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis. *Allergy* 2009

Ohta Y, Hamada Y, Katsuoka K. Expression of IL-18 in psoriasis. *Archives of dermatological research* 2001; 293: 334-42.

Oiso N, Fukai K, Ishii M. Interleukin 4 receptor  $\alpha$  chain polymorphism Gln551Arg is associated with adult atopic dermatitis in Japan. *British Journal of Dermatology* 2000; 142: 1003-6.

Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon- $\gamma$  production by IL-12 and IL-18. *Current Opinion in Immunology* 1998; 10: 259-64.

Okudaira H. Why atopic diseases prevail in developed countries. *Allergy Clin. Immunol. Int.* 1998; 110-4.

Olivry T, Moore P, Affolter V, Naydan D. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Archives of dermatological research* 1996; 288: 579-85.

Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the Cutaneous Inflammatory Infiltrate in Canine Atopic Dermatitis. *The American Journal of Dermatopathology* 1997; 19: 477-86.

Olivry T, Dean GA, Tompkins MB, Dow JL, Moore PF. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Exp Dermatol* 1999; 8: 204-11.

Olivry T, DeBoer DJ, Griffin CE, Halliwell RE, Hill PB, Hillier A, Marsella R, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 143-6.

Olivry T, Hill PB. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 219-25.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 317-22.

Olivry T, Hill PB. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 305-9.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 311-6.

Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prélaud P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2010a; 21: 233-48.

Olivry T, Foster AP, Mueller RS, McEwan NA, Chesney C, Williams HC. Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Veterinary Dermatology* 2010b; 21: 4-22.

Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DYM. Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2002a; 347: 1151-60.

Ong PY, Hamid QA, Travers JB, Strickland I, Kerithy MA, Boguniewicz M, Leung DYM. Decreased IL-15 may contribute to elevated IgE and acute inflammation in atopic dermatitis. *The Journal of Immunology* 2002b; 168: 505.

Oskar B, Wendy R, Teodora R, Aeilko Z. RNA isolation for transcriptomics of human and mouse small skin biopsies. 2011;

Ozkaya E. Adult-onset atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 579-82.

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arsecularatne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38: 441-6.

Park YD, Lyou YJ, Lee KJ, Lee DY, Yang JM. Towards profiling the gene expression of fibroblasts from atopic dermatitis patients: human 8K complementary DNA microarray. *Clinical & Experimental Allergy* 2006; 36: 649-57.

Passey R, Xu K, Hume D, Geczy C. S100A8: emerging functions and regulation. *Journal of leukocyte biology* 1999; 66: 549.

Paterson S. Use of antihistamines to control pruritus in atopic dogs. *Journal of Small Animal Practice* 1994; 35: 415-9.

Paterson S. Additive benefits of EFAs in dogs with atopic dermatitis after partial response to antihistamine therapy. *J Small Anim Pract* 1995; 36: 389-94.

Paulukat J, Bosmann M, Nold M, Garkisch S, Kämpfer H, Frank S, Raedle J, Zeuzem S, Pfeilschifter J, Mühl H. Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN- $\gamma$ . *The Journal of Immunology* 2001; 167: 7038.

Piccardi N, Piccirilli A, Choulot J, Msika P. Sunflower oil oleodistillate for atopy

treatment: an in vitro and clinical evaluation. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 390-423.

Picco F, Zini E, Nett C, Naegeli C, Bigler B, Rufenacht S, Roosje P, Gutzwiller ME, Wilhelm S, Pfister J, Meng E, Favrot C. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Vet Dermatol* 2008; 19: 150-5.

Piekutowska A, Pin D, Reme CA, Gatto H, Haftek M. Effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the stratum corneum barrier of atopic dogs. *J Comp Pathol* 2008; 138: 197-203.

Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadham J, Smith MF, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *The Journal of Immunology* 1999; 162: 6829.

Plager DA, Leontovich AA, Henke SA, Davis MD, McEvoy MT, Sciallis GF, 2nd, Pittelkow MR. Early cutaneous gene transcription changes in adult atopic dermatitis and potential clinical implications. *Exp Dermatol* 2007; 16: 28-36.

Plitz T, Saint-Mézard P, Satho M, Herren S, Waltzinger C, de Carvalho Bittencourt M, Kosco-Vilbois MH, Chvatchko Y. IL-18 Binding Protein Protects Against Contact Hypersensitivity. *The Journal of Immunology* 2003; 171: 1164-71.

Pollok KE, Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J, Kim K, Pickard R, Kwon B. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *The Journal of Immunology* 1993; 150: 771.

Popa I, Pin D, Remoué N, Osta B, Callejon S, Videmont E, Gatto H, Portoukalian J, Haftek M. Analysis of epidermal lipids in normal and atopic dogs, before and after administration of an oral omega-6/omega-3 fatty acid feed supplement. A pilot study. *Veterinary Research Communications* 2011; 35: 501-9.

Préfontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ, Lemière C, Martin JG, Hamid Q. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *The Journal of Immunology* 2009; 183: 5094.

Prescott SL, Macaubas C, Yabuhara A, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Loh R,

Sly PD, Holt PG. Developing Patterns of T Cell Memory to Environmental Allergens in the First Two Years of Life. International Archives of Allergy and Immunology 1997; 113: 75-9.

Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG. Transplacental Priming of the Human Immune System to Environmental Allergens: Universal Skewing of Initial T Cell Responses Toward the Th2 Cytokine Profile. J Immunol 1998; 160: 4730-7.

Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. Crit Rev Oral Biol Med 2000; 11: 383-408.

Proost P, De Wolf-Peeters C, Conings R, Opdenakker G, Billiau A, Van Damme J. Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8. The Journal of Immunology 1993; 150: 1000.

Pucheu-Haston CM, Shuster D, Olivry T, Brianceau P, Lockwood P, McClanahan T, de Waal Malefyt R, Mattson JD, Hammerberg B. A canine model of cutaneous late-phase reactions: prednisolone inhibition of cellular and cytokine responses. Immunology 2006; 117: 177-87.

Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T, Dunston SM, Hammerberg B. Epicutaneous sensitization with Dermatophagoides farinae induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in a canine model of atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2008; 38: 667-79.

Raab U, Goltz C, Deneka N, Bruder M, Renz H, Kapp A, Wedi B. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2005; 115: 1268-75.

Raif S G. Allergy and hypersensitivity: Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity. Current Opinion in Immunology 2003; 15: 603-8.

Rao NV, Rao GV, Hoidal JR. Human dipeptidyl-peptidase I. Journal of Biological Chemistry 1997; 272: 10260-5.

Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. Annual review of immunology 1991; 9: 457-92.

Reedy LM, Miller WH, Willemse T (1997) Allergic Skin Diseases of the Dog and Cat, 2nd edn. W.B.Saunders, London, UK

Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, Locksley RM. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 2007; 447: 92-6.

Reiter LV, Torres SMF, Wertz PW. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Veterinary Dermatology* 2009; 20: 260-6.

Relógio A, Schwager C, Richter A, Ansorge W, Valcárcel J. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic acids research* 2002; 30: e51-e.

Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, Hrbicek M, Aerts JMFG. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *European Journal of Biochemistry* 1998; 251: 504-9.

Rhodes HL, Sporik R, Thomas P, Holgate ST, Cogswell JJ. Early life risk factors for adult asthma: A birth cohort study of subjects at risk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 108: 720-5.

Rhodes HL, Thomas P, Sporik R, Holgate ST, Cogswell JJ. A Birth Cohort Study of Subjects at Risk of Atopy. Twenty-two-year Follow-up of Wheeze and Atopic Status. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 165: 176-80.

Rice RH, Green H. The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell* 1977; 11: 417-22.

Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, Gauldie J. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *The Journal of Immunology* 1992; 148: 1731.

Ricklin M, Roosje P, Summerfield A. Characterization of Canine Dendritic Cells in Healthy, Atopic, and Non-allergic Inflamed Skin. *Journal of Clinical Immunology* 2010; 30: 845-54.

Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases.

Science 1996; 273: 1516-7.

Rivier M, Safonova I, Lebrun P, Griffiths CEM, Ailhaud G, Michel S. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 1998; 111: 1116-21.

Rodríguez-Pazos L, Ginarte M, Vega-Gliemmo A, Toribio J. Lamellar ichthyosis with a novel homozygous C-terminal mutation in the transglutaminase-1 gene. *International journal of dermatology* 2009; 48: 1195-7.

Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD, Weidinger S. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1361-70 e7.

Rogers S, Cambrosio A. Genomics and Proteomics Issue: Making a New Technology Work: The Standardization and Regulation of Microarrays. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 2007; 80: 165.

Rorke S, Holgate ST. Targeting adenosine receptors: novel therapeutic targets in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Medicine* 2002; 1: 99-105.

Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkötter C. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends in Immunology* 2003; 24: 155-8.

Ruhrberg C, Hajibagheri M, Simon M, Dooley TP, Watt FM. Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *The Journal of Cell Biology* 1996; 134: 715-29.

Ruhrberg C, Watt FM. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Current Opinion in Genetics & Development* 1997; 7: 392-7.

Ruhrberg C, Hajibagheri M, Parry DAD, Watt FM. Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. *The Journal of Cell Biology* 1997; 139: 1835.

S. Benoit, A. Toksoy, M. Ahlmann, M. Schmidt, C. Sunderkötter, D. Foell, M.

Pasparakis, J. Roth, M. Goebeler. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. *British Journal of Dermatology* 2006; 155: 62-6.

Säaf AM, Tengvall-Linder M, Chang HY, Adler AS, Wahlgren CF, Scheynius A, Nordenskjold M, Bradley M. Global expression profiling in atopic eczema reveals reciprocal expression of inflammatory and lipid genes. *PLoS One* 2008; 3: e4017.

Saeed A, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 2003; 34: 374.

Saevik BK, Bergvall K, Holm BR, Sajjonmaa-Koulumies LE, Hedhammar Å, Larsen S, Kristensen F. A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2004; 15: 137-45.

Schäfer T, Heinrich J, Wjst M, Adam H, Ring J, Wichmann H-E. Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 104: 1280-4.

Schauber J, Dorschner RA, Coda AB, Buchau A, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 803-11.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467.

Scheynius A, Johansson C, Buentke E, Zargari A, Tengvall Linder M. Atopic Eczema/Dermatitis Syndrome and *Malassezia*. *International Archives of Allergy and Immunology* 2002; 127: 161-9.

Schlotter YM, Rutten VPMG, Riemers FM, Knol EF, Willemse T. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011;

Schmid-Ott G, Jaeger B, Adamek C, Koch H, Lamprecht F, Kapp A, Werfel T. Levels of circulating CD8+ T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis. *Journal*

of Allergy and Clinical Immunology 2001; 107: 171-7.

Schmid HHO, Schmid PC, Natarajan V. The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signalling. Chemistry and physics of lipids 1996; 80: 133-42.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity 2005; 23: 479-90.

Schnabl B, Bettenay SV, Dow K, Mueller RS. Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. Vet Rec 2006; 158: 81-5.

Schultz Larsen F. Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. J Am Acad Dermatol 1993; 28: 719-23.

Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays—a technology review. Nature cell biology 2001; 3: E190-E195.

Schwarz H, Valbracht J, Tuckwell J, Von Kempis J, Lotz M. ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. Blood 1995; 85: 1043.

Schwarz H, Blanco F, Von Kempis J, Valbracht J, Lotz M. ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. Blood 1996; 87: 2839.

Scott D. Observations on canine atopy. The Journal of the American Animal Hospital Association (USA) 1981;

Scott DW, Miller WH. Epidermal Dysplasia And Malassezia pachydermatis Infection In West Highland White Terriers. Veterinary Dermatology 1990; 1: 25-36.

Scott DW, Paradis M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec (1987-1988). Can Vet J 1990; 31: 830-5.

Scott DW, Jr WHM. Antihistamines in the management of allergic pruritus in dogs and cats. Journal of Small Animal Practice 1999; 40: 359-64.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE (2001) Small Animal Dermatology, 6th edn. W.B.Saunders, Philadelphia

Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K. SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses. *Nature medicine* 2003; 9: 1047-54.

Serre G, Mils V, Haftek M, Vincent C, Croute F, Réano A, Ouhayoun JP, Bettinger S, Soleihavoup JP. Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *Journal of Investigative Dermatology* 1991; 97: 1061-72.

Sevilla LM, Nachat R, Groot KR, Klement JF, Uitto J, Djian P, Maatta A, Watt FM. Mice deficient in involucrin, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier. *J Cell Biol* 2007; 179: 1599-612.

Shaw SC, Wood JL, Freeman J, Littlewood JD, Hannant D. Estimation of heritability of atopic dermatitis in Labrador and Golden Retrievers. *Am J Vet Res* 2004; 65: 1014-20.

Sheu MY, Fowler AJ, Kao J, Schmuth M, Schoonjans K, Auwerx J, Fluhr JW, Man MQ, Elias PM, Feingold KR. Topical Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$ ; Activators Reduce Inflammation in Irritant and Allergic Contact Dermatitis Models1. *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 118: 94-101.

Shibata S, Maeda S, Tsuchida H, Fukata T. Phenotypic analysis for a cell line of canine epidermal keratinocytes. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 853-5.

Shimada K, Yoon JS, Yoshihara T, Iwasaki T, Nishifuji K. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2009; 20: 541-6.

Shippy R, Sendera T, Lockner R, Palaniappan C, Kaysser-Kranich T, Watts G, Alsobrook J. Performance evaluation of commercial short-oligonucleotide microarrays and the impact of noise in making cross-platform correlations. *BMC Genomics* 2004; 5: 61.

Sicherer SH, Leung DYM. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects. *Journal of Allergy and*

Clinical Immunology 2006; 118: 170-7.

Simon D, Braathen LR, Simon HU. Eosinophils and atopic dermatitis. Allergy 2004; 59: 561-70.

Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Statistical applications in genetics and molecular biology 2004; 3: 3.

Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. R. Gentleman VC, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber, ed. New York: Springer 2005: 397–420.

Sohn M, Lee J, Kim K, Kim S, Lee S, Kim K, Kim K, Lee C, Elias J, Lee M. Genetic Variation in the Promoter Region of Chitinase 3-Like 1 (CHI3L1) is Associated with Atopy. American journal of respiratory and critical care medicine 2008; 200809.

Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, Alenius H, Dieu-Nosjean M-C, Meller S, Rieker J, Steinhoff M, Hoffmann TK, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B. IL-31: A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006; 117: 411-7.

Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003; 112: S118-S27.

Squier C. The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to horseradish peroxidase. Journal of Ultrastructure Research 1973; 43: 160-77.

Staumont-Sallé D, Abboud G, Brénuchon C, Kanda A, Roumier T, Lavogiez C, Fleury S, Rémy P, Papin J-P, Bertrand-Michel J, Tercé F, Staels B, Delaporte E, Capron M, Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2008; 121: 962-8.e6.

Stehle M, Hanczaruk M, Schwarz S, Göbel T, Mueller R. Effects of polyunsaturated fatty acids on isolated canine peripheral blood mononuclear cells and cytokine expression (IL 4, IFN , TGF ) in healthy and atopic dogs. Veterinary Dermatology 2010; 21: 113-8.

Steinbakk M, Naess-Andresen C, Fagerhol M, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *The Lancet* 1990; 336: 763-5.

Steinert PM, Marekov LN. The Proteins Elafin, Filaggrin, Keratin Intermediate Filaments, Loricrin, and Small Proline-rich Proteins 1 and 2 Are Isodipeptide Cross-linked Components of the Human Epidermal Cornified Cell Envelope. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 17702-11.

Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Human Immunology* 1999; 60: 562-7.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ: British Medical Journal* 1989; 299: 1259.

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 27348.

Suttner K, Depner M, Klopp N, Illig T, Vogelberg C, Adamski J, von Mutius E, Kabesch M. Genetic variants in the GATA3 gene are not associated with asthma and atopic diseases in German children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 123: 1179-81.

Taha RA, Minshall EM, Leung DYM, Boguniewicz M, Luster A, Muro S, Toda M, Hamid QA. Evidence for increased expression of eotaxin and monocyte chemotactic protein-4 in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000; 105: 1002-7.

Tak P, Bacchi M, Bertolino M. Pharmacokinetics of IL-18 binding protein in healthy volunteers and subjects with rheumatoid arthritis or plaque psoriasis. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2006; 31: 109-16.

Tanaka T, Tsutsui H, Yoshimoto T, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Wang W, Higa S, Koshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18 is elevated in the sera from patients with atopic dermatitis and from atopic dermatitis model mice, NC/Nga. *International Archives of Allergy and Immunology* 2001; 125: 236-40.

Tang L. Molecular cloning of canine IL-13 receptor chain  $\alpha$  1 and  $\alpha$  2 cDNAs and

detection of corresponding mRNAs in canine tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 79: 181-95.

Tarpataki N, Papa K, Reiczigel J, Vajdovich P, Vorosi K. Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. *Acta Vet Hung* 2006; 54: 353-66.

Thierry O. Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011; 144: 11-6.

Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics* 2003; 35: 341-8.

Törmä H, Berne B. Sodium lauryl sulphate alters the mRNA expression of lipid-metabolizing enzymes and PPAR signalling in normal human skin in vivo. *Experimental Dermatology* 2009; 18: 1010-5.

Tosh K, Meisner S, Siddiqui MR, Balakrishnan K, Ghei S, Golding M, Sengupta U, Pitchappan Ramasamy M, Hill Adrian VS. A Region of Chromosome 20 Is Linked to Leprosy Susceptibility in a South Indian Population. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 186: 1190-3.

Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Hino T, Kagoura M, Morohashi M. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 2002; 147: 71-9.

Trautmann A, Akdis M, Bröcker E-B, Blaser K, Akdis CA. New insights into the role of T cells in atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Trends in Immunology* 2001; 22: 530-2.

Trzeciak M, Gleń J, Roszkiewicz J, Nedoszytko B. Association of single nucleotide polymorphism of interleukin-18 with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2010; 24: 78-9.

Tupker R, De Monchy J, Coenraads P, Homan A, van der Meer J. Induction of atopic dermatitis by inhalation of house dust mite. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1996; 97: 1064-70.

Uza N, Nakase H, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Ueno S, Inoue S, Mikami

S, Matsuura M, Shimaoka T. SR-PSOX/CXCL16 plays a critical role in the progression of colonic inflammation. *Gut* 2011; 60: 1494-505.

Vaden S, Hammerberg B, Davenport D, Orton S, Trogdon M, Melgarejo L, VanCamp S, Williams D. Food hypersensitivity reactions in soft coated wheaten terriers with protein-losing enteropathy or protein-losing nephropathy or both: gastroscopic food sensitivity testing, dietary provocation, and fecal immunoglobulin E. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2000; 14: 60-7.

Vollset I. Atopic dermatitis in Norwegian dogs. *Nord Vet Med* 1985; 37: 97-106.

Vroom MW. [A retrospective study in 45 West Highland White Terriers with skin problems]. *Tijdschr Diergeneesk* 1995; 120: 292-5.

Walley A, Chavanas S, Moffatt M, Esnouf R, Ubhi B, Lawrence R, Wong K, Abecasis G, Jones E, Harper J. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nature Genetics* 2001; 29: 175-8.

Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *The EMBO journal* 2002; 21: 3919-26.

Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CN, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WH, Novak N. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 214-9.

Weidinger S, Rodriguez E, Stahl C, Wagenpfeil S, Klopp N, Illig T, Novak N. Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 724-6.

Weidinger S, Baurecht H, Wagenpfeil S, Henderson J, Novak N, Sandilands A, Chen H, Rodriguez E, O'Regan GM, Watson R. Analysis of the individual and aggregate genetic contributions of previously identified serine peptidase inhibitor Kazal type 5(*SPINK5*), kallikrein-related peptidase 7(*KLK7*), and filaggrin (*FLG*) polymorphisms to eczema risk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008; 122: 560-8. e4.

Wenzel J, Peters B, Zahn S, Birth M, Hofmann K, Kusters D, Tomiuk S, Baron JM, Merk HF, Mauch C, Krieg T, Bieber T, Tuting T, Bosio A. Gene expression profiling of lichen planus reflects CXCL9+-mediated inflammation and

distinguishes this disease from atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 67-78.

Werfel T. The Role of Leukocytes, Keratinocytes, and Allergen-Specific IgE in the Development of Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1878-91.

White S, Bourdeau P, Blumstein P, Ibih C, Scott K, Salman M, Chapman P. Comparison via cytology and culture of carriage of *Malassezia pachydermatis* in atopic and healthy dogs. 1998;

Willemse A, Noordzij A, Van den Brom WE, Rutten VP. Allergen specific IgGd antibodies in dogs with atopic dermatitis as determined by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 359-63.

Williams HC. Is the prevalence of atopic dermatitis increasing? *Clinical & Experimental Dermatology* 1992; 17: 385-91.

Williams HC. Epidemiology of atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Dermatology* 2000; 25: 522-9.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282: 2258.

Winton H, Wan H, Cannell M, Thompson P, Garrod D, Stewart G, Robinson C. Class specific inhibition of house dust mite proteinases which cleave cell adhesion, induce cell death and which increase the permeability of lung epithelium. *British journal of pharmacology* 1998; 124: 1048-59.

Wisniewski H-G, Vilcek J. TSG-6: An IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1997; 8: 143-56.

Wisniewski HG, Hua J, Poppers DM, Naime D, Vilcek J, Cronstein BN. TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo. *The Journal of Immunology* 1996; 156: 1609.

Wittmann M, Werfel T. Interaction of keratinocytes with infiltrating lymphocytes in allergic eczematous skin diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2006; 6: 329.

Wittmann M, Macdonald A, Renne J. IL-18 and skin inflammation. Autoimmunity Reviews 2009; 9: 45-8.

Wolff HH, Kerl H. (2003) Histopathologie der Haut. Springer Verlag

Wollenberg A, Wen S, Bieber T. Phenotyping of epidermal dendritic cells: Clinical applications of a flow cytometric micromethod. Cytometry 1999; 37: 147-55.

Wood SH, Clements DN, Ollier WE, Nuttall T, McEwan NA, Carter SD. Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. J Dermatol Sci 2009; 55: 27-33.

Wood SH, Ollier WE, Nuttall T, McEwan NA, Carter SD. Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. Veterinary Immunology and Immunopathology 2010; 138: 193-7.

Wu C, Guo H, Wang Y, Gao Y, Zhu Z, Du Z. Extracellular domain of human 4-1BBL enhanced the function of cytotoxic T-lymphocyte induced by dendritic cell. Cellular Immunology 2011; 271: 118-23.

Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Glaser R, Schroder JM. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. PLoS One 2009; 4: e5227.

Wuthrich B. Serum IgE in atopic dermatitis: relationship to severity of cutaneous involvement and course of disease as well as coexistence of atopic respiratory diseases. Clin Allergy 1978; 8: 241-8.

Wuthrich B. Clinical aspects, epidemiology, and prognosis of atopic dermatitis. Ann Allergy Asthma Immunol 1999; 83: 464-70.

Wüthrich B, Roll A, Fischer B, Senti G. Aktuelles zur atopischen Dermatitis (Neurodermitis) = New insights to atopic dermatitis (atopic eczema). Allergologie ISSN 0344-5062 2005; 28: 92-104.

Yamamoto T, Kurasawa M, Hattori T, Maeda T, Nakano H, Sasaki H. Relationship between expression of tight junction-related molecules and perturbed

epidermal barrier function in UVB-irradiated hairless mice. Archives of dermatological research 2008; 300: 61-8.

Yamasaki K, Schauber J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. The FASEB journal 2006; 20: 2068.

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. Science 2002; 296: 490-4.

Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, Comeau MR, Campbell DJ, Ziegler SF. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. J Exp Med 2005; 202: 541-9.

Yoshida Y, Morita K, Mizoguchi A, Ide C, Miyachi Y. Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. Archives of dermatological research 2001; 293: 239-44.

Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE, Nakanishi K. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. Proceedings of the National Academy of Sciences 1999; 96: 13962.

Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, Izumi S, Okamura H, Paul WE, Nakanishi K. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. Nature Immunology 2000; 1: 132-7.

Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nature Reviews Immunology 2007; 7: 454-65.

Yu Z, Schneider C, Boeglin W, Brash A. Epidermal Lipoxygenase Products of the Hepoxilin Pathway Selectively Activate the Nuclear Receptor PPAR $\alpha$ . Lipids 2007; 42: 491-7.

Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and “Inflammatory” Dendritic Cells in Human Skin. J Invest Dermatol 2008; 129: 302-8.

Zachary CB, Poulter LW, MacDonald DM. Cell-mediated immune responses in

atopic dermatitis: the relevance of antigen-presenting cells. *British Journal of Dermatology* 1985; 113: 10-6.

Zheng W-p, Flavell RA. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* 1997; 89: 587-96.

Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, Von Mallinckrodt C, Wagner TO, Brade V, Kaufmann R. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy* 2000; 30: 994-1000.

Zur G, Ihrke PJ, White SD, Kass PH. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Vet Dermatol* 2002; 13: 89-102.

## IX. ANHANG

### 9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aufteilung der Hautstanzen für histologische Untersuchung und Genexpressionsanalysen .....	61
Abbildung 2: Schematische Darstellung der RNA-Isolierung mittels Trizo .....	63
Abbildung 3: Schema der Durchführung von Genexpressionsanalysen .....	68
Abbildung 4: cRNA-Synthese durch in vitro Transkription.....	71
Abbildung 5: Slide-Sandwich.....	78
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse.....	93
Abbildung 7: Schematische Darstellung von qPCR Reaktionskurven.....	96
Abbildung 8: Microarray-Scan-Bild.....	106
Abbildung 9: Eines der acht Array-Scan-Bilder vergrößert .....	106
Abbildung 10:Verteilung der Signalstärke über den Array-Querschnitt .....	107
Abbildung 11:Boxplots der log2-Expressionswerte der Rohdaten (A) und der VSN-normalisierten Daten (B) der 60 Proben im Vergleich .....	108
Abbildung 12:Heatmap aller Proben nach VSN-Normalisierung .....	110
Abbildung 13:KEGG Pathway Sphingolipid-Metabolismus.....	116
Abbildung 14:Heatmap der hierarchischen Cluster-Analyse .....	118
Abbildung 15:SOTA-Cluster-Analyse der Expressionsprofile über die Zeit .....	122
Abbildung 16:Vergleich der Microarray- und qPCR-Expressionswerte .....	129
Abbildung 17:Verlauf der Zellzahl pro Fläche von allergischen und nichtallergischen Hunden in Abhängigkeit von Behandlungslösung und Einwirkzeit.....	132

## 9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Protokoll zur Probenentnahme .....	58
Tabelle 2:	Local-Lesion-Score .....	59
Tabelle 3:	Herstellung der ersten (1:20), zweiten (1:25) und dritten Verdünnung (1:20) .....	76
Tabelle 4:	Template und T7 Promoter Primer Mix .....	73
Tabelle 5:	Herstellung des cDNA Master Mix .....	73
Tabelle 6:	Herstellung des Transcription Master Mix .....	74
Tabelle 7:	Fragmentierungsmix für 8x60K Microarray .....	77
Tabelle 8:	Übersicht über Two class unpaired-Analysen .....	84
Tabelle 9:	Übersicht über Two class paired-Analysen .....	84
Tabelle 10:	Übersicht über die Multifactorial-Analysen .....	85
Tabelle 11:	Liste der verwendeten qPCR-Primer .....	91
Tabelle 12:	Pipettierschema eines einzelnen Ansatzes der quantitativen PCR ..	94
Tabelle 13:	Reaktionsbedingungen der qPCR .....	95
Tabelle 14:	Übersicht über die Two class unpaired-Analysen .....	110
Tabelle 15:	Übersicht über die Two class paired-Analysen .....	111
Tabelle 16:	Übersicht über die Multifactorial paired-Analysen .....	112
Tabelle 17:	Übersicht über die Multifactorial unpaired-Analysen .....	112
Tabelle 18:	Ausgewählte Ergebnisse der Gene mit verminderter Genexpressionsänderung aus der Multifactorial unpaired-Analyse (DiffAvsN_24h) aus der Functional Annotation Cluster-Analyse mit DAVID .....	114
Tabelle 19:	Ausgewählte Pathways der KEGG MAPPER Pathway-Analyse mit caninen und humanen GeneIDs .....	115

Tabelle 20:	Ergebnisse mit dem höchsten Enrichment Score der DAVID-Analayse aus Genliste 1 .....	119
Tabelle 21:	Ergebnisse der DAVID-Analayse mit den höchsten Enrichment Scores aus Genliste 2.....	120
Tabelle 22:	Differentiell regulierte Gene aus der Multifactorial unpaired-Analyse (Diff AvsN_24h), welche nach Literaturrecherche mit Copub und manueller Auswertung der Expressions-Daten interessant erschienen .....	124
Tabelle 23:	$C_T$ -Werte und geometrisches Mittel der CT-Werte der House-keeping-Gene der allergischen Tiere 24 h nach Hausstaubmilben-Allergen-Lösung.....	126
Tabelle 24:	Expressionswerte der Proben nach Microarray-(normalisierte Processed Signals) und qPCR-Analyse (20- $\Delta CT$ ) .....	127
Tabelle 25:	Vergleich der Ergebnisse der statistischen Analyse (Multifactorial unpaired DiffAvsN_24h) von Microarray- und qPCR-Daten .....	130
Tabelle 26:	Auswertung der Rundzellen in histologischen Präparaten .....	131

### 9.3. R-Skript

```

data = read.table("all_samples_o_14.txt", sep="\t", header=T)

print(dim(data))

print(colnames(data))

data_matrix = as.matrix(data)
rownames = data_matrix[,1]
data_matrix = data_matrix[,-1]
colnames = colnames(data_matrix)
dims = dim(data_matrix)
data_matrix = as.numeric(data_matrix)
dim(data_matrix) = dims
colnames(data_matrix) = colnames
rownames(data_matrix) = rownames
library (vsn)
e2 <- vsn2(data_matrix)

Exprs <- exprs(e2)
write.table (Exprs, file="All samples o14_vsn.txt", sep="\t")

```

```
library(limma)
targets <- readTargets("TargetFile.txt")
ATT <- paste(targets$Animal, targets$Treatment, targets$Time, sep=".")
ATT
ATT <- factor(ATT,
levels=c("A.none.0h","A.A.6h","A.A.24h","A.S.6h","A.S.24h","N.none.0h","N.A.6h","N.A.24h",
"N.S.6h","N.S.24h"))

ATT

10 Levels: A.none.0h A.A.6h A.A.24h A.S.6h A.S.24h N.none.0h N.A.6h ... N.S.24h

design <- model.matrix(~0+ATT)
colnames(design) <- levels(ATT)
design
attr("assign")
[1] 1 1 1 1 1 1 1 1 1
attr("contrasts")
attr("contrasts")$ATT
[1] "contr.treatment"

fit <- lmFit(Exprs, design)

cont.matrix <- makeContrasts(A24h.AvsN=A.A.24h-N.A.24h, A6h.AvsN=A.A.6h-N.A.6h,
DiffAvsN24=(A.A.24h-A.S.24h)-(N.A.24h-N.S.24h),DiffAvsN6=(A.A.6h-A.S.6h)-(N.A.6h-
N.S.6h), levels=design)

fit2 <- contrasts.fit(fit, cont.matrix)

fit2 <- eBayes(fit2)

results <- decideTests(fit2, method="global",adjust.method="fdr",p.value=0.05, lfc=0.585)

summary(results)
#   A24h.AvsN A6h.AvsN DiffAvsN24 DiffAvsN6
-1    1382     21     267      3
0     44979    47450    46728    47501
1     1160      50     526     17

write.fit(fit2, results, file="1Limma_Multifactorial_FDR0.05_FC1.5.txt", digits=3, adjust="fdr",
sep="\t")

heatDiagram(results,fit2$coef,primary="DiffAvsN24", names="ID", limit=2,
orientation="portrait",low="blue",high="red", mar=rep(5,4), cex=1,ncolors=50)
```

#### 9.4. Photometrische und mikroelektrophoretische Ergebnisse für die isolierte mRNA

Probe	Bezeichnung	Konzentration ng/µl	Quotient 260/280	Quotient 260/230	RIN
01	N2800_1_24h_A	68	1,8	2,9	7,5
02	N2847_2_24h_S	167	1,8	2,3	8,1
03	N2847_3_24h_A	182	1,9	2,4	8,2
04	N2845_4_24h_S	133	1,8	2,5	7,8
05	N2845_5_24h_A	154	1,8	2,4	7,6
06	N2716_6_24h_S	193	1,8	2,4	8,4
07	N2716_7_24h_A	226	1,8	2,4	8,6
08	A2838_8_24h_S	76	1,8	2,6	8,2
09	N2704_9_24h_S	162	1,8	2,4	8,6
10	N2704_10_24h_A	161	1,8	2,3	8,2
11	N2800_11_24h_S	100	1,7	2,7	8,1
12	A2841_12_24h_A	152	1,8	2,5	8,3
13	A2839_13_24h_S	90	1,8	2,7	8,2
14	A2839_14_24h_A	44	1,9	2,4	3,3
15	A2840_15_24h_S	114	1,7	2,4	8,2
16	A2840_16_24h_A	73	1,8	2,6	7,2
17	A2855_17_24h_S	126	1,8	2,6	8,3
18	A2838_18_24h_A	231	1,8	2,4	7,9
19	N2802_19_24h_S	123	1,9	2,4	7,9
20	N2802_20_24h_A	83	1,8	2,5	8,4
21	A2855_21_24h_A	194	1,8	2,2	8,3
22	A2853_22_24h_S	200	1,8	2,5	8,0
23	A2853_23_24h_A	225	1,8	2,4	8,4
24	A2841_24_24h_S	108	1,8	2,6	8,4
25	N2802_25_6h_A	107	1,9	2,4	7,0
26	N2800_26_6h_A	83	1,8	2,3	7,4
27	N2800_27_6h_S	78	1,8	2,4	7,4
28	N2716_28_6h_A	182	1,9	2,3	8,0
29	N2845_29_6h_S	108	1,8	2,5	7,5
30	N2845_30_6h_A	88	1,8	2,5	7,7
31	N2802_31_6h_S	103	1,8	2,5	7,2
32	N2704_32_6h_A	142	1,8	2,3	7,6
33	N2704_33_6h_S	54	1,7	2,0	7,8
34	N2716_34_6h_S	247	1,7	2,1	7,3
35	A2841_35_6h_A	114	1,8	2,0	7,9

36	A2841_36_6h_S	154	1,8	2,0	7,5
37	A2840_37_6h_A	135	1,8	2,3	8,2
38	A2840_38_6h_S	61	1,7	2,3	8,1
39	A2853_39_6h_A	51	1,8	2,1	7,9
40	A2853_40_6h_S	150	1,8	2,0	7,5
41	N2847_41_6h_S	112	1,8	2,2	7,6
42	N2847_42_6hA	134	1,8	2,3	7,8
43	A2838_43_6h_S	97	1,8	2,1	7,6
44	A2838_44_6h_A	111	1,8	2,3	7,8
45	A2839_45_6h_S	127	1,8	2,2	7,6
46	A2839_46_6h_A	117	1,8	2,3	8,5
47	A2855_47_6h_S	172	1,8	2,3	8,1
48	A2855_48_6h_A	148	1,8	2,3	8,2
49	A2838_49_0h	73	1,7	2,5	7,9
50	N2704_50_0h	81	1,6	2,4	7,5
51	A2839_51_0h	124	1,8	2,2	7,5
52	N2716_52_0h	140	1,8	2,3	7,6
53	A2855_53_0h	117	1,9	2,2	7,1
54	N2845_54_0h	99	1,7	2,4	7,3
55	N2800_55_0h	53	1,7	2,1	8,1
56	N2802_56_0h	56	1,7	2,3	7,3
57	N2847_57_0h	153	1,8	2,3	7,5
58	A2853_58_0h	153	1,8	2,3	7,8
59	A2841_59_0h	132	1,8	2,3	7,3
60	A2840_60_0h	120	1,8	2,1	7,7

## 9.5. cRNA-Ausbeute für die Hybridisierung

Probe	Bezeichnung	Array	cRNA yield: µg per 30 µl (min. 1,65 µg)	Specific Activity: pmol Cy3/µg cRNA (mind. 6)
01	N2800_1_24h_A	1	3,02	18,07
02	N2847_2_24h_S	1	3,14	15,97
03	N2847_3_24h_A	1	2,68	16,89
04	N2845_4_24h_S	1	2,88	15,10
05	N2845_5_24h_A	1	2,63	15,86
06	N2716_6_24h_S	1	2,93	16,71
07	N2716_7_24h_A	1	3,55	13,36
08	A2838_8_24h_S	1	3,71	14,16

09	N2704_9_24h_S	2	4,39	13,79
10	N2704_10_24h_A	2	3,81	12,92
11	N2800_11_24h_S	2	3,68	12,80
12	A2841_12_24h_A	2	4,73	13,45
13	A2839_13_24h_S	2	3,57	15,54
14	A2839_14_24h_A	2	1,75	13,74
15	A2840_15_24h_S	2	3,71	19,01
16	A2840_16_24h_A	2	2,22	15,42
17	A2855_17_24h_S	3	3,56	15,86
18	A2838_18_24h_A	3	2,19	16,61
19	N2802_19_24h_S	3	2,63	17,00
20	N2802_20_24h_A	3	3,14	13,65
21	A2855_21_24h_A	3	2,75	13,95
22	A2853_22_24h_S	3	2,84	12,45
23	A2853_23_24h_A	3	3,16	12,82
24	A2841_24_24h_S	3	2,66	8,44
25	N2802_25_6h_A	4	2,48	13,79
26	N2800_26_6h_A	4	2,31	12,88
27	N2800_27_6h_S	4	2,70	13,24
28	N2716_28_6h_A	4	2,59	15,30
29	N2845_29_6h_S	4	2,80	14,66
30	N2845_30_6h_A	4	2,93	13,94
31	N2802_31_6h_S	4	2,89	16,94
32	N2704_32_6h_A	4	2,86	11,31
33	N2704_33_6h_S	5	2,92	13,45
34	N2716_34_6h_S	5	2,89	15,66
35	A2841_35_6h_A	5	2,41	13,32
36	A2841_36_6h_S	5	2,04	12,35
37	A2840_37_6h_A	5	2,12	13,98
38	A2840_38_6h_S	5	3,31	13,22
39	A2853_39_6h_A	5	2,96	11,35
40	A2853_40_6h_S	5	2,34	9,73
41	N2847_41_6h_S	6	2,03	9,02
42	N2847_42_6hA	6	3,01	10,46
43	A2838_43_6h_S	6	3,59	11,19
44	A2838_44_6h_A	6	2,07	9,59
45	A2839_45_6h_S	6	2,13	10,28
46	A2839_46_6h_A	6	3,02	10,24
47	A2855_47_6h_S	6	2,80	8,46
48	A2855_48_6h_A	6	2,75	9,05

49	A2838_49_0h	6	2,87	14,00
50	N2704_50_0h	7	2,31	13,60
51	A2839_51_0h	7	3,29	14,40
52	N2716_52_0h	7	2,15	10,61
53	A2855_53_0h	7	2,40	13,60
54	N2845_54_0h	7	2,31	12,72
55	N2800_55_0h	7	2,14	8,98
56	N2802_56_0h	7	1,81	10,09
57	N2847_57_0h	7	2,16	9,73
58	A2853_58_0h	8	2,84	10,05
59	A2841_59_0h	8	2,47	11,65
60	A2840_60_0h	8	2,58	14,06

## 9.6. VSN-Durchschnittswerte und $\Delta$ VSN-Werte der diskutierten Gene der Gruppen der Multifactorial unpaired-Analyse nach 24 Stunden

	Durchschnitts VSN				VSN-Mittel aller Gruppen	deltaVSN-Werte			
	A_24hA	A_24hS	N_24hA	N_24hS		A_24hA	A_24hS	N_24hA	N_24hS
IL13RA2	8,27	7,68	7,25	8,44	7,91	0,36	-0,23	-0,66	0,53
IL33	8,89	9,26	7,76	9,63	8,88	0,01	0,37	-1,12	0,74
CCL8	7,12	6,95	5,31	6,83	6,55	0,57	0,40	-1,24	0,28
FCGR3A	5,43	5,18	4,96	5,54	5,28	0,15	-0,10	-0,32	0,26
IL18BP	12,88	11,61	10,88	11,80	11,79	1,09	-0,19	-0,91	0,01
SOCS3	8,28	8,32	6,83	8,15	7,89	0,38	0,43	-1,07	0,25
CXCR6	7,56	7,32	7,10	7,44	7,36	0,20	-0,04	-0,25	0,08
ADORA2B	7,81	7,70	6,94	7,51	7,49	0,32	0,21	-0,55	0,02
FCGR2B	8,90	8,76	7,73	8,89	8,57	0,33	0,19	-0,84	0,32
BCL3	7,11	6,99	6,42	7,08	6,90	0,21	0,09	-0,48	0,18
OSMR	7,12	7,04	6,30	7,18	6,91	0,21	0,13	-0,61	0,27
TNFAIP6	11,02	10,94	8,39	10,92	10,32	0,70	0,62	-1,92	0,60
TNFSF9	7,58	7,12	6,81	7,58	7,27	0,31	-0,15	-0,46	0,31
TNFSF13B	5,57	5,40	5,11	5,83	5,48	0,09	-0,08	-0,37	0,35
TGM1	11,09	11,33	11,37	11,10	11,22	-0,13	0,11	0,15	-0,12
DSP	14,38	14,64	14,92	14,60	14,64	-0,26	0,01	0,28	-0,03
SPINK5	14,10	14,53	14,55	14,24	14,35	-0,26	0,18	0,19	-0,12
FLG2	10,15	11,41	11,78	11,36	11,18	-1,03	0,24	0,61	0,19
FLG2	13,61	14,63	14,60	14,42	14,31	-0,71	0,32	0,28	0,11
CALML5	13,66	14,06	14,05	13,79	13,89	-0,23	0,17	0,16	-0,10
ASPRV1	11,57	12,30	12,66	12,29	12,21	-0,64	0,10	0,45	0,09
OCLN	7,26	7,73	7,72	7,50	7,55	-0,29	0,17	0,17	-0,05
PPARA	9,05	9,45	9,66	9,27	9,36	-0,31	0,09	0,30	-0,09
PPL	14,96	15,19	15,64	15,31	15,28	-0,32	-0,09	0,37	0,04
PPL	14,86	15,11	15,56	15,23	15,19	-0,33	-0,08	0,37	0,04

	Durchschnitts VSN				VSN-Mittel aller Gruppen	deltaVSN-Werte			
	A_24hA	A_24hS	N_24hA	N_24hS		A_24hA	A_24hS	N_24hA	N_24hS
SCEL	10,09	10,72	11,01	10,57	10,60	-0,50	0,12	0,42	-0,03
GATA3	10,94	11,45	11,68	11,41	11,37	-0,43	0,08	0,31	0,04
LOR	7,87	9,04	8,94	8,86	8,68	-0,81	0,36	0,27	0,18
DMKN	13,45	14,01	14,11	13,86	13,85	-0,41	0,15	0,25	0,00
KPRP	10,07	11,04	11,29	10,99	10,85	-0,78	0,19	0,44	0,14
ALOXE3	7,85	8,18	8,56	8,34	8,23	-0,39	-0,05	0,33	0,11
DSG1	11,74	11,92	12,24	11,78	11,92	-0,18	0,00	0,32	-0,14
ASAII2	6,84	7,27	7,58	7,18	7,22	-0,38	0,05	0,36	-0,04
CGN	12,37	12,99	13,45	13,18	13,00	-0,63	-0,01	0,45	0,19
CCL2	14,11	13,95	12,02	14,22	13,58	0,53	0,38	-1,56	0,64
CCL3	5,63	5,07	4,86	5,20	5,19	0,44	-0,12	-0,33	0,01
CCL4	8,43	7,56	6,74	7,48	7,55	0,88	0,01	-0,81	-0,08
CCL8	10,77	10,52	8,31	10,50	10,02	0,75	0,49	-1,71	0,47
CCL13	7,80	7,47	6,69	7,65	7,40	0,40	0,07	-0,72	0,25
CCL19	11,61	11,41	10,01	11,45	11,12	0,49	0,29	-1,11	0,33
CXCR6	7,56	7,32	7,10	7,44	7,36	0,20	-0,04	-0,25	0,08
CXCL16	12,04	11,48	11,00	11,57	11,52	0,51	-0,04	-0,52	0,05
CXCL6	6,23	5,98	4,73	5,90	5,71	0,52	0,27	-0,98	0,19
CXCL1	9,05	8,75	8,33	9,17	8,82	0,22	-0,08	-0,49	0,34
IL33	8,89	9,26	7,76	9,63	8,88	0,01	0,37	-1,12	0,74
IL18BP	12,88	11,61	10,88	11,80	11,79	1,09	-0,19	-0,91	0,01
IL13RA2	8,34	7,76	7,25	8,43	7,95	0,39	-0,18	-0,70	0,48
TNFSF9	7,58	7,12	6,81	7,58	7,27	0,31	-0,15	-0,46	0,31
TNFAIP6	11,02	10,94	8,39	10,92	10,32	0,70	0,62	-1,92	0,60
TNFSF13B	5,57	5,40	5,11	5,83	5,48	0,09	-0,08	-0,37	0,35
TNFSF13B	7,61	7,36	6,99	7,80	7,44	0,17	-0,08	-0,45	0,36
TLR2	8,40	8,11	8,00	8,57	8,27	0,13	-0,16	-0,27	0,30
MRC1	10,73	10,38	9,71	10,68	10,37	0,35	0,01	-0,67	0,30
CLEC7A	5,95	5,63	5,48	5,75	5,70	0,24	-0,07	-0,22	0,05
CHI3L1	5,88	5,50	4,86	6,14	5,60	0,29	-0,09	-0,74	0,54
SMPD3	7,00	7,62	7,70	7,58	7,48	-0,48	0,15	0,22	0,11

## X. LEBENSLAUF

### Persönliche Angaben

Name: Paz Chantal Schamber, geborene Gülberg

Geboren: 16.12.1981 in Regensburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Eltern: Götz Udo Gülberg

Miriam Marta Herrera Estay

Geschwister: 2 (Bruder und Schwester)

### Ausbildung, Weiterbildung und berufliche Tätigkeit

seit Mai 2009 Doktorandin der Abteilung für Dermatologie in der Medizinischen Kleintierklinik München

seit Mai 2009 Assistenztierärztein in der Klinik für Kleintiere Dr. Lutz in Riem/München

2003-2009 Studium der Tiermedizin an der LMU München

2008-2009 Anstellung als studentische Hilfskraft in der Klinik für Kleintiere Dr. Lutz in Riem/München

2007-2008 Durchführung von Werbemaßnahmen

1993-2002 Pestalozzi-Gymnasium München

2001-2002 Anstellung als Krankenpflegehelferin

2000-2001 Anstellung im Verkauf

1998-1999 Anstellung im Verkauf

1997-1998 Anstellung in der Gastronomie

1988-1993 Grundschule/Volksschule Ebersberg

1987-1988 Grundschule München Fürstenried

## **XI. DANKSAGUNG**

Ich möchte mich sehr herzlich bei Professor Dr. Ralf Müller für die Bereitstellung dieses Themas, für die herausragende Betreuung und Unterstützung sowie für die jederzeit freundliche Zusammenarbeit in der Klinik bedanken.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Blum für die Hilfe bei der Planung der Studie danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Bauersachs für die jederzeit hilfsbereite, freundliche und geduldige Unterstützung bei der Auswertung der Genexpressionsanalysen und für das Erstellen der Custom-Arrays. Aus seiner Arbeitsgruppe möchte ich besonders Karin Groß herzlichst danken, die mit größter Sorgfalt und Geduld die Bearbeitung der schier unendlich vielen Proben durchgeführt hat. Weiterhin möchte ich Elmer für die Hilfe im Labor danken. Ich danke auch Alexander Graf für seine stets unkomplizierte Art mir bei bioinformatischen Fragen oder sonstigen Problemen und Computer-Angelegenheiten zur Seite zu stehen. Natürlich möchte ich mich beim gesamten Team aus der AG Blum und AG Bauersachs bedanken, das mich so herzlich aufgenommen hat und mit dem ich eine sehr schöne Zeit und viel Spaß hatte.

Liebes Derma-Team, bei euch möchte ich mich für die schöne Zeit und wunderbare Zusammenarbeit in der Klinik bedanken.

Frau Professor Dr. Katrin Hartmann danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München erstellen zu dürfen.

Ich danke der Gesellschaft zur Förderung kynologischer Forschung, ohne deren Finanzierung die Durchführung der Studie nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danke ich der Firma Novartis und den Mitarbeitern des Novartis Centre de Recherche Sante Animale in der Schweiz, ganz besonders Frau Rachel Schwab für die nette und hilfsbereite Unterstützung bei der Probengewinnung sowie den braven Hunden, welche das gesamte Prozedere so freundlich und unglaublich geduldig mitgemacht haben.

Für die Erstellung der histologischen Präparate möchte ich mich herzlichst bei Herrn Majzoub und seinem Team aus dem Institut für Tierpathologie bedanken.

Ich danke außerdem meinen Kollegen aus der Klinik für Kleintiere Dr. Lutz in

Riem für ihre Flexibilität und ihre Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit.

All meinen Freunden möchte ich fürs Mitfeiern und Anspornen während dieser nicht immer leichten Zeit danken. Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich meinem Vater, meinen Onkeln Niels und Veit Gülberg sowie meiner lieben Freundin Svenja Budach ganz herzlich danken. Außerdem danke ich meinem Onkel Falko Gülberg für seine Hilfe bei den finalen Layout-und Druck-Fragen.

Meinen Schwiegereltern Tatjana und Juri möchte ich dafür danken, dass Leo jederzeit bei ihnen Willkommen ist. Danke für euer Verständnis, für das leckere Essen und euren Rückhalt. Ein großer Dank geht an die Besten aller Eltern. Ich danke euch fürs Zuhören, Aufbauen, fürs immer an mich Glauben und eure liebevolle Unterstützung in allen Belangen und Phasen meines Lebens.

Von ganzem Herzen möchte ich dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinem Mann Maxim, für seine Unterstützung durch alle Krisen, für seine Geduld, sein Verständnis und seine Liebe danken.