

Kutane miRNA-Expression bei Labrador und Golden Retrievern  
mit atopischer Dermatitis

von Marie Isabel Morlang

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

Kutane miRNA-Expression bei Labrador und Golden Retrievern  
mit atopischer Dermatitis

von Marie Isabel Morlang  
aus Hofheim am Taunus

München 2019



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

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Mueller

Mitbetreuung durch:

Priv.-Doz. Dr. Karin Weber



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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Mueller

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Susanne Lauer

Tag der Promotion: 27. Juli 2019



*Meinen Eltern und Großeltern*





**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>5</b>
<b>1.</b>	<b>MicroRNAs .....</b>	<b>5</b>
1.1.	Biogenese .....	6
1.1.1.	Transkription .....	6
1.1.2.	Weiterverarbeitung durch Drosha und Dicer .....	6
1.1.3.	Zusammenbau des RNA-induced silencing complexes (RISC) .....	8
1.2.	Wirkmechanismus .....	11
1.2.1.	Erkennung der Zielstruktur .....	12
1.2.2.	Post-transkriptionelles Gen-Silencing .....	14
1.2.2.1.	Mechanismen des mRNA-Abbaus .....	15
1.2.2.2.	Translationale Repression .....	17
1.3.	Nachweis .....	19
1.4.	Rolle in der Medizin .....	20
1.4.1.	Humane miRNAs .....	21
1.4.2.	Canine miRNAs .....	24
1.4.3.	MicroRNAs in allergischer Dermatitis .....	26
1.4.4.	Therapeutisches Potential .....	33
<b>2.</b>	<b>Atopische Dermatitis .....</b>	<b>36</b>
2.1.	Canine atopische Dermatitis .....	36
2.1.1.	Inzidenz und Prävalenz .....	36
2.1.2.	Pathogenese .....	37
2.1.2.1.	Genetische Faktoren und Umweltfaktoren .....	38
2.1.2.2.	Rolle des Immunsystems .....	45
2.1.2.2.1.	Antikörper .....	45
2.1.2.2.2.	Angeborenes Immunsystem und Keratinozyten .....	47
2.1.2.2.3.	Adaptives Immunsystem .....	52
2.1.2.3.	Hautbarriere .....	56
2.1.2.4.	Zusätzliche Faktoren .....	60
2.1.2.4.1.	Futterantigene .....	60
2.1.2.4.2.	Lipide und Lipid-Metabolismus .....	62
2.1.2.4.3.	Sekundärinfektionen .....	64

---

2.1.3.	Klinisches Bild .....	66
2.1.4.	Diagnosestellung .....	69
2.1.5.	Therapie.....	74
2.1.5.1.	Vermeidung von auslösenden und verschlimmernden Faktoren .....	75
2.1.5.2.	Optimierung von Haut- und Fellpflege .....	76
2.1.5.3.	Pharmakotherapie zur Entzündungshemmung und Juckreizlinderung .....	78
2.1.5.4.	Biologika zur Entzündungshemmung und Juckreizlinderung .....	83
2.1.5.5.	Allergen (-spezifische) Immuntherapie.....	84
2.2.	Humane atopische Dermatitis im Vergleich .....	87
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>95</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungsobjekte und Gewebeproben .....</b>	<b>95</b>
<b>2.</b>	<b>Auswahl der miRNAs.....</b>	<b>96</b>
<b>3.</b>	<b>RNA-Extraktion .....</b>	<b>97</b>
<b>4.</b>	<b>Reverse Transkription .....</b>	<b>98</b>
<b>5.</b>	<b>Quantitative Real-Time PCR .....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>101</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>103</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungsobjekte .....</b>	<b>103</b>
<b>2.</b>	<b>qRT-PCR.....</b>	<b>105</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>111</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>119</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>121</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>193</b>
<b>1.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>193</b>
<b>2.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>193</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>195</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
µm	Mikroliter
3'-UTR	3'-untranslatierte Region
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
A	Adenin
AD	Atopische Dermatitis
AFR	Adverse food reaction = Futtermittelunverträglichkeit
Ago	Argonaute
AIT	Allergen (-spezifische) Immuntherapie
ATP	Adenosintriphosphat
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cAD	canine Atopische Dermatitis
CADESI	Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index
CADLI	Canine Atopic Dermatitis Lesion Index
CARD10	Caspase recruitment domain-containing protein 10
CCL	C-C-Chemokin-Ligand
CCR4-NOT	Carbon catabolite repressor 4-negative on TATA-less
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CER[EOP]	Ceramid 9
CER[EOS]	Ceramid 1
CER[NP]	Ceramid 3
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DC	Dendritische Zelle
DDX6	DEAD-box helicase 6
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
eIF4A	eukaryotischer Initiationsfaktor 4
et al.	et alii
FC	Fold Change
FcεRI	hochaffiner Immunglobulin E-Rezeptor
FFPE	Formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3

---

G	Guanin
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Hsc70	Heat shock cognate protein
Hsp	Heat shock protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKT	Intrakutantest
IL	Interleukin
IL12RB2	Interleukin-12-Rezeptor $\beta$ 2
ILIT	intralymphatische Immuntherapie
IRAK1	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
kg	Kilogramm
LC	Langerhans-Zelle
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LNA	Locked Nucleic Acid
LPS	Lipopolysaccharide
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
miR-	Bezeichnung einer MicroRNA
miRLC	MicroRNA loading complex
miRNA	MicroRNA
miRNome	miRNA-Genom
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
ng	Nanogramm
nt	Nukleotide
PABPC	zytoplasmatisches Poly(A)-bindendes Protein
PAN	Poly(A)-Nuklease
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKP2	Plakophilin-2-Gen
pri-miRNA	primary miRNA
qPCR	quantitative Real-Time PCR

---

RISC	RNA-induced silencing complex
RIT	Rush-Immuntherapie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-qPCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SAT	Serum-Allergietest
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung
siRNA	small interfering RNA
SLIT	sublinguale Immuntherapie
SOCS1	Suppressor of Cytokine Signaling 1
STAT4	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TARC	Thymus and activation regulated chemokine
TEWL	transepithelialer Wasserverlust
Th	T-Helfer
Th1	T-Helfer-1
Th2	T-Helfer-2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRBP	Transactivating response RNA-binding protein
Treg	regulatorische T-Zelle
TSLP	Thymic stromal lymphopietin
U	Uracil
vs.	versus
WHWT	West Highland White Terrier



## I. EINLEITUNG

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine häufig auftretende Hauterkrankung bei Hunden (HILLIER und GRIFFIN, 2001a; BIZIKOVA et al., 2015a). Sie wurde definiert als entzündliche und juckende allergische Hauterkrankung mit genetischer Prädisposition. Die charakteristischen klinischen Anzeichen stehen im Zusammenhang mit Immunglobulin E (IgE)-Antikörpern, die in den meisten Fällen gegen Umweltallergene gerichtet sind (HALLIWELL, 2006). Klinische Symptome treten typischerweise früh im Leben betroffener Hunde auf und präsentieren sich initial als Juckreiz und Erythem. In weiter fortgeschrittenen Stadien entwickeln sich zudem Alopezie, Exkorationen oder andere sekundäre Hautläsionen, die durch Selbsttraumatisierung und Infektionen hervorgerufen werden (GRIFFIN und DEBOER, 2001; ZUR et al., 2002b; BIZIKOVA et al., 2015b). Die zugrunde liegende Pathogenese stellt ein komplexes Zusammenspiel von Umweltfaktoren, Störungen des angeborenen und erworbenen Immunsystems und einer beeinträchtigten Hautbarriere dar (MARSELLA et al., 2012; PUCHEU-HASTON et al., 2015a; SANTORO et al., 2015). Obwohl das Verständnis der Pathogenese stetig wächst, ist sie bislang nicht vollständig geklärt (MARSELLA et al., 2012). In den meisten Fällen ist die Allergie IgE-bedingt und richtet sich gegen Umwelt- und/oder Futtermittelantigene (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). Im Verlauf der Erkrankung treten unterschiedliche T-Zell-Phänotypen und Zytokin-Expressionsprofile auf, wobei in der frühen Phase der Entzündung ein T-Helfer-2 (Th2)-Phänotyp dominiert, während eine gemischte T-Helfer-1 (Th1)/Th2-Antwort in chronischen Läsionen vorherrscht (NUTTALL et al., 2002; MARSELLA et al., 2012; PUCHEU-HASTON et al., 2015b). Da keiner der kommerziell verfügbaren Tests zwischen einer caninen atopischen Dermatitis (cAD) und anderen Hauterkrankungen differenzieren kann und sie sich somit nicht als Screening-Tests eignen, wird die Diagnose anhand einer Kombination aus Vorbericht, klinischen Anzeichen und dem Ausschluss anderer Hauterkrankungen gestellt (HENSEL et al., 2015). Labrador und Golden Retriever gehören, neben einigen anderen, zu den Rassen, welche eine genetische Prädisposition aufweisen, an atopischer Dermatitis zu erkranken (JAEGER et al., 2010).

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer ungefähren Länge von 22 Nukleotiden (nt), die eine Rolle in der post-



transkriptionellen Regulation der Genexpression spielen (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993). Integriert in RNA-induzierte Silencing-Komplexe (RISCs), dienen miRNAs als Führungsstrukturen, um „messenger RNAs“ (mRNAs) als Zielstruktur zu erkennen (HAMMOND et al., 2000). Durch Bindung der miRNA mit der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA, wird eine Regulation der Genexpression erzielt, entweder auf dem Wege des mRNA-Abbaus oder durch translationale Suppression (HUNTZINGER und IZAURRALDE, 2011). MicroRNAs sind zwischen Wirbeltieren konserviert, und spielen eine Rolle in vielen wichtigen biologischen Prozessen (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; LEWIS et al., 2003). Da eine einzige miRNA auf mehrere Gene abzielen kann, bilden sie in ihrer Gesamtheit ein komplexes Netzwerk, von dem angenommen wird, dass es etwa ein Drittel aller Gene des Genoms regulieren kann (LEWIS et al., 2003; HAMMOND, 2015). Es wird vermutet, dass die Expression von miRNAs gewebsspezifisch ist (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; BARTEL, 2004), und eine veränderte Regulation der Expression konnte in verschiedenen Erkrankungen, wie beispielsweise Tumoren (MCMANUS, 2003; LU et al., 2005; MAKUNIN et al., 2007), kardiovaskulären Erkrankungen (WANG et al., 2009) und Entwicklungsstörungen (KLOOSTERMAN et al., 2007) nachgewiesen werden. In einer allergischen Entzündung können miRNAs sowohl Einfluss auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems als auch auf Keratinozyten ausüben und dadurch den Verlauf der Erkrankung maßgeblich mitbestimmen (REBANE und AKDIS, 2014). Obwohl das Wissen über die Rolle von miRNAs in der Pathogenese der atopischen Dermatitis noch begrenzt ist, gibt es einige Studien, die verschiedene Mechanismen aufzeigen, durch die miRNAs in die Entstehung der Erkrankung involviert sein können. MiR-155 beispielsweise, wird in atopischer Haut nachweislich überexprimiert und trägt zu einer chronischen Entzündung bei, indem sie die T-Helfer-Zell-Aktivierung fördert (SONKOLY et al., 2010; MA et al., 2015). Im Gegensatz dazu verfügt miR-146, welche in allergischer Dermatitis ebenfalls überexprimiert wird, über entzündungshemmende Eigenschaften (TAGANOV et al., 2006; MEISGEN et al., 2014; REBANE et al., 2014). Durch Hemmung aktivierender Elemente des „Nuclear factor  $\kappa$ B“ (NF- $\kappa$ B)-Signalwegs, entsteht ein negativer Rückkoppelungsmechanismus als Versuch des Körpers, die überschießende Entzündung zu kontrollieren (TAGANOV et al., 2006; MEISGEN et al., 2014; REBANE et al., 2014). Eine verminderte Expression von miR-143 wurde in humanen Keratinozyten unter Einfluss von Interleukin-13 (IL-13), einem

Th-2-Zytokin, nachgewiesen (ZENG et al., 2016). Unter forcierter Expression von miR-143 wiederum, konnte ein Anstieg in der Expression von Proteinen der Hautbarriere beobachtet werden. Diese Erkenntnisse lassen annehmen, dass miR-143 als potentielle therapeutische Angriffsstelle für die Prävention und Therapie der atopischen Dermatitis dienen kann (ZENG et al., 2016).

Nach bestem Wissen der Autorin liegen bis zu diesem Zeitpunkt keine veröffentlichten Studien über die miRNA-Expression der Haut von Hunden mit atopischer Dermatitis vor. Eine krankheitsspezifische miRNA-Expression kann für die Diagnosestellung und Therapie der caninen atopischen Dermatitis von großem Interesse sein.

Das Ziel dieser Studie ist es, die miRNA-Expression von 18 miRNAs aus der Haut von Labrador und Golden Retrievern zu untersuchen, und diese mit den Ergebnissen von gesunder Haut zu vergleichen. Es soll die Frage beantwortet werden, ob ein AD-spezifisches Expressionsmuster existiert. Um zudem unspezifisch entzündungsbedingte Abweichungen der Expression abgrenzen zu können, wurde eine weitere Kontrollgruppe mit nicht-allergischen Hauterkrankungen untersucht.



## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze einsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von ~22 Nukleotiden (nt). Sie kodieren nicht für Proteine, sondern regulieren die Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993). Die Entdeckung der ersten miRNA 1993 fand im Rahmen der Forschung zur Entwicklungsregulation des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) statt. Das für die Larvenentwicklung wichtige Gen *lin-4*, kodierte nicht wie erwartet für ein Protein, sondern für eine kurze RNA (LEE et al., 1993). Durch komplementäre Bindung dieser RNA an die „messenger RNA“ (mRNA) des Gens *lin-14* wurde dessen Expression post-transkriptionell herunter reguliert (WIGHTMAN et al., 1993). Etwa sieben Jahre später wurde eine weitere kurze regulatorische RNA, *let-7*, in *C. elegans* entdeckt, die nicht nur Produkte von *lin-14*, sondern auch mRNAs anderer Gene komplementär binden und somit direkt regulieren konnte (REINHART et al., 2000). Weiterhin stellte sich heraus, dass *let-7* außer bei *C. elegans* auch bei einer großen Anzahl an weiteren Spezies, unter anderem dem Menschen, nachgewiesen werden konnte (PASQUINELLI et al., 2000). Dies und die Entdeckung der RNA-Interferenz, einem weiteren Regulationsmechanismus der Genexpression durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle, weckte großes Interesse an den neuen miRNAs (FIRE et al., 1998). Eine Genregulation durch RNAs schien eine große, weitreichende Rolle in der Natur zu spielen. Nach und nach wurden immer mehr Erkenntnisse zu Biogenese und Wirkungsweise der miRNAs gewonnen, und es zeigte sich, dass die zugrundeliegenden Mechanismen von miRNAs und doppelsträngigen „small interfering RNAs“ (siRNAs) einander ähnlich, stellenweise sogar identisch sind und sie zwischen Fliege und Säugetier konserviert sind (HUTVAGNER et al., 2001; SCHWARZ et al., 2002). In beiden Fällen geschieht die post-transkriptionelle Genregulation durch einen sequenzspezifischen Nuklease-Komplex, den „RNA-induced silencing complex“ (RISC), in den die kurze RNA inkorporiert wird und, aufgrund ihrer Sequenz, als Leitstruktur zur Erkennung der Ziel-mRNA dient (HAMMOND et al., 2000). In Abhängigkeit vom Grad der Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA, erfolgt anschließend eine

Degradation der mRNA oder lediglich die Hemmung derer Translation (HUTVAGNER und ZAMORE, 2002).

Folgend wird ein Überblick über die Biogenese mit Schwerpunkt auf die in Säugetieren involvierten Enzyme gegeben.

## **1.1. Biogenese**

### **1.1.1. Transkription**

MicroRNA-kodierende Gene sind im gesamten Genom verteilt. Etwa 60 % aller miRNA-Gene von Wirbeltieren sind innerhalb von Protein-kodierenden Genen oder nicht-Protein-kodierenden Transkriptionseinheiten lokalisiert. Von diesen intragenischen miRNAs befinden sich 50 % in den Introns und etwa 10 % in den Exons der „Wirtsgene“. Die restlichen miRNAs sind intergenisch kodiert, die Information liegt also in einem zwischen zwei Genen gelegenen Abschnitt (RODRIGUEZ et al., 2004). Die Struktur der miRNA-Gene ist vergleichbar mit der aller Protein-kodierender Gene. Die Transkription geschieht somit durch das Enzym RNA-Polymerase-II (LEE et al., 2004). Das Transkript weist die für die miRNA-Biogenese charakteristische Haarnadelstruktur auf und wird als „pri-miRNA“ (primary microRNA) bezeichnet (PASQUINELLI et al., 2000; LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; LEE und AMBROS, 2001; LEE et al., 2002). In gleicher Weise wie bei proteinkodierenden mRNAs finden post-transkriptionelle Modifikationen statt. Das 3'-Ende wird polyadenyliert, und das 5'-Ende mit einer Cap-Struktur versehen. Außerdem kann Splicing, im Falle von *C.elegans* in Form von Trans-Splicing, stattfinden (BRACHT et al., 2004; CAI et al., 2004).

### **1.1.2. Weiterverarbeitung durch Drosha und Dicer**

Auf dem Weg bis zur funktionsfähigen miRNA durchläuft das Transkript zwei wesentliche Schritte. Zuerst erfolgt die Verarbeitung der pri-miRNA zu dem ~70 nt langen Vorläufer, der als „pre-miRNA“ bezeichnet wird. Im zweiten Schritt wird die pre-miRNA in die funktionsfähige ~22 nt lange miRNA gespalten (LEE et al., 2002). Die Spaltung der pri-miRNA findet im Zellkern statt und wird durch eine RNase III namens „Drosha“ durchgeführt (LEE et al., 2003). Drosha agiert zusammen mit dem Protein DGCR8 in einem Komplex der den Namen „Mikroprozessor“ trägt. In diesem Mikroprozessor schneidet Drosha mit seinen

zwei Domänen beide Stränge des pri-miRNA-Stammes und DGCR8 sorgt mit seiner RNA-bindenden Fähigkeit für eine gezielte, spezifische Schnittführung (DENLI et al., 2004; GREGORY et al., 2004; HAN et al., 2004). Übrig bleibt der doppelsträngige, haarnadelförmige Stamm des Transkripts, die pre-miRNA. Sie muss für ihre weitere Verarbeitung aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden. Dies geschieht durch das Transportprotein Exportin-5. Exportin-5 bindet die doppelsträngige RNA (dsRNA) direkt und spezifisch in einer Ran-Guanosintriphosphat-abhängigen Weise (YI et al., 2003; BOHNSACK et al., 2004; LUND et al., 2004).

Angekommen im Zytoplasma wird die pre-miRNA von der RNase III Dicer gebunden, welche dann die schleifenförmige Region der Haarnadelstruktur abspaltet (BERNSTEIN et al., 2001; GRISHOK et al., 2001; HUTVAGNER et al., 2001; KETTING et al., 2001; KNIGHT und BASS, 2001). Dicer arbeitet ebenfalls in einem Komplex, dem sogenannten „microRNA loading complex“ (miRLC), zusammen mit dem RNA-bindenden Protein TRBP (Transactivating response RNA-binding protein) und dem Enzym Argonaute-2 (Ago2), einem Vertreter der Argonauten-Familie (CHENDRIMADA et al., 2005; GREGORY et al., 2005; HAASE et al., 2005; MANIATAKI & MOURELATOS, 2005). TRBP sorgt für die Rekrutierung von Ago2 und die Stabilität des Komplexes und trägt so dazu bei, eine Plattform für den nächsten Schritt, den Zusammenbau des RISCs, zu bilden. In Vertebraten und Drosophila finden sich dem humanen TRBP stark homologe Proteine (CHENDRIMADA et al., 2005). Ago2 wird in diesem Schritt der pre-miRNA-Prozessierung selbst nicht enzymatisch aktiv, es spielt aber aufgrund seiner Beteiligung bei der Selektion des funktionalen Strangs der dsRNA und dessen RISC-Beladung eine wesentliche Rolle (MANIATAKI und MOURELATOS, 2005). Von der entstandenen dsRNA wird in der Regel nur einer der beiden Stränge eine funktionale, mature miRNA (GRISHOK et al., 2001; SCHWARZ et al., 2002). Dieser Strang wird als Führungsstrang (guide strand) bezeichnet, während sein komplementärer Strang den Namen „passenger strand“ oder „star strand“ trägt. Die miRNA des komplementären Strangs wird mit einem Stern hinter dem Namen gekennzeichnet (LAU et al., 2001; LIM et al., 2003; SCHWARZ et al., 2003; SONTHEIMER, 2005).

### 1.1.3. Zusammenbau des RNA-induced silencing complexes (RISC)

Bei RISC handelt es sich um einen Ribonukleoprotein-Komplex, bestehend aus einer Ribonukleinsäure, der reifen miRNA, und Proteinen der Argonauten-Familie (MARTINEZ et al., 2002). Sein Zusammenbau ist ein komplexer Vorgang, dessen Ablauf bis heute nicht bis ins Detail geklärt ist. Eine gute Übersicht gibt der Artikel von Kobayashi und Tomari (KOBAYASHI und TOMARI, 2016). Demnach kann der Vorgang in zwei Hauptschritte unterteilt werden: Zunächst das Beladen des Ago-Moleküls mit der doppelsträngigen miRNA und anschließend die Ausreifung des Komplexes.

Zu Beginn wird, zum besseren Verständnis, näher auf die Eigenschaften der Ago-Proteine eingegangen.

Allgemein bestehen Ago-Proteine aus 4 Domänen, die „N“, „PAZ“, „MID“ und „PIWI“ genannt werden. Jede Domäne trägt mit ihrer spezifischen Funktion zur RISC-Bildung bei (PETERS und MEISTER, 2007; HUTVAGNER und SIMARD, 2008; MEISTER, 2013). Die MID- und PIWI-Domänen, beispielsweise, bilden zusammen eine basische 5'-Nukleotid-bindende Tasche, in die das 5'-Ende des Führungsstranges der miRNA, charakteristisch bestehend aus einer Phosphatgruppe, verankert werden kann. Das 3'-Ende mit seinem 2-Nukleotid-Überhang hingegen passt in ein Bindungsmodul der PAZ-Domäne, ebenfalls ähnlich einer Tasche, und kann hier fixiert werden. Es liegt außerdem ein Nukleinsäurebindender Kanal vor, der die „Seed-Sequenz“ (die Basen an Position 2-8 des Führungsstranges) anhand ihrer 2'-Hydroxylgruppen und des Phosphat-Rückgrats erkennt (MA et al., 2005; PARKER et al., 2005; YUAN et al., 2005; ELKAYAM et al., 2012; NAKANISHI et al., 2012; SCHIRLE und MACRAE, 2012). Die N-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Auftrennung der doppelsträngigen miRNA (miRNA/miRNA\*) zur einzelsträngigen reifen miRNA (KWAK und TOMARI, 2012). Bei Ago2-Molekülen weist die PIWI-Domäne eine Faltung auf, die der Struktur einer Endoribonuklease gleicht. Die Endoribonuklease-Aktivität wird „Slicer“ genannt und dient dem Abbau der Ziel-mRNA durch RISC (LIU et al., 2004; MEISTER et al., 2004).

Zu Beginn des Zusammenbaus von RISC wird das Ago-Molekül mit einem doppelsträngigen miRNA/miRNA\*-Komplex beladen (MATRANGA et al., 2005; RAND et al., 2005). Die Beladung ist ein dynamischer Prozess und benötigt die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Chaperonenfunktion von Hsc70 (Heat

shock cognate protein 70), Hsp90 (Heat shock protein 90) und deren Co-Chaperonen (IWASAKI et al., 2010; MIYOSHI et al., 2010). Es wird vermutet, dass die Proteine die Konformation des Ago-Moleküls verändern und somit der sperrigen doppelsträngigen miRNA Zugang zu dem Nukleinsäure-bindenden Kanal ermöglichen. Der genaue Ablauf ist bislang aber nicht geklärt (NAKANISHI, 2016). Bekannt ist jedoch, dass lediglich der Schritt der miRNA-Beladung und kein weiterer Schritt der Reifung von RISC energieabhängig ist und somit ATP benötigt (KAWAMATA et al., 2009; YODA et al., 2010). Den mit der doppelsträngigen miRNA beladenen Komplex nennt man „Pre-RISC“ (KOBAYASHI und TOMARI, 2016). Wie bereits erwähnt, bindet das 5'-Ende des Führungsstrangs in die von MID- und PIWI-Domäne gebildete Tasche, während das 3'-Ende mit der PAZ-Domäne interagiert. Welcher Strang der miRNA-Duplex der Führungsstrang und welcher der Passagierstrang wird, entscheidet sich nicht per Zufall. Einen entscheidenden Faktor bei der Strangselektion stellt die relative thermodynamische Stabilität der Duplex-Enden dar. In den meisten Fällen wird der Strang mit der geringeren thermodynamischen Stabilität der Basenpaarung am 5'-Ende in RISC inkorporiert und somit zum Führungsstrang (KHVOROVA et al., 2003; SCHWARZ et al., 2003). Im Gegensatz zu der Strangselektion bei Fliegen, ist bei Säugetieren das Molekül Dicer nicht notwendig. Die Erkennung des thermodynamisch instabileren Stranges geschieht durch das Ago-Molekül selbst (SUZUKI et al., 2015). Die geringere thermodynamische Stabilität vereinfacht den nächsten Schritt der Reifung des RISC-Komplexes, das „Wedging“. Hierbei bricht die N-Domäne einige Basenpaarungen am 3'-Ende des Führungsstranges auf, wobei die doppelsträngige miRNA wie durch einen Keil aufgespalten wird (KWAK und TOMARI, 2012). Hierdurch wird der letzte Schritt der RISC-Maturation, der Auswurf des Passagierstranges, auch „passenger ejection“ genannt, vorbereitet.

Es gibt zwei verschiedene Arten, auf die der Doppelstrang der miRNA aufgetrennt und der Passagierstrang ausgeworfen werden kann. Die erste Methode bedient sich der enzymatischen Aktivität der Endonuklease Slicer, wohingegen die alternative Methode Slicer-unabhängig abläuft. Für die Slicer-abhängige Variante müssen zwei wichtige Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen muss das Ago-Molekül über die Slicer-Funktion verfügen, zum anderen muss das zu spaltende Substrat, also die doppelsträngige miRNA, eine perfekte Komplementarität aufweisen (MATRANGA et al., 2005; MIYOSHI et al., 2005; RAND et al., 2005;



LEUSCHNER et al., 2006; SHIN, 2008). Nach dem Wedging wird das Zentrum des Passagierstranges durch Ago enzymatisch gespalten. Durch diese entstandene mittige Einkerbung verliert die miRNA-Duplex stark an Stabilität, kann der herrschenden Spannung nicht mehr standhalten und der nicht fixierte Passagierstrang wird ausgeschieden. Von den vier Ago-Molekülen bei Säugetieren besitzt nur Ago2 die enzymatische RNase-Funktion (LIU et al., 2004; HAUPTMANN et al., 2013). Da viele miRNAs typischerweise zentrale Basen-Fehlpaarungen aufweisen, wodurch die Slicer-abhängige Spaltung nicht möglich ist, wird in vielen Fällen auf die langsamere alternative Methode zurückgegriffen. Insbesondere Fehlpaarungen im Bereich der Seed-Sequenz und im Bereich der Basen an Position 12-16, aber auch das Vorliegen von vielen thermodynamisch schwachen Watson-Crick-Basenpaarungen begünstigen den Ablauf der Slicer-unabhängigen RISC-Ausreifung (KAWAMATA et al., 2009; YODA et al., 2010; GU et al., 2011). Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass allgemein gesagt, jeder Faktor, der zu einer Schwächung der Stabilität der miRNA-Duplex beiträgt, den Auswurf des Passagierstrangs vereinfacht (NAKANISHI, 2016). Für den Slicer-unabhängigen Bypass-Mechanismus wird die PAZ-Domäne des Ago-Moleküls benötigt. Ohne sie kann Ago zwar mit der doppelsträngigen miRNA beladen werden, ein Auftrennen der Stränge und der folgende Auswurf des Passagierstranges bleibt jedoch aus (GU et al., 2012). Die PAZ-Domäne verankert das 3'-Ende des Führungsstranges und dient somit als eine Art Haltegriff um den miR\*-Strang abzulösen (KOBAYASHI und TOMARI, 2016). Der weitere Verlauf gleicht demjenigen der Slicer-abhängigen Variante. Die miRNA-Duplex wird an den Stellen der Fehlpaarungen aufgebrochen und verliert an Stabilität. Aufgrund der im Komplex herrschenden Spannungen verbleibt nur der fest verankerte miRNA-Strang im RISC-Komplex, der lose Passagierstrang wird ausgeworfen (NAKANISHI, 2016).

Der entstandene Komplex aus Ago-Molekül und einzelsträngiger miRNA stellt den reifen RISC-Komplex dar (MARTINEZ et al., 2002).

Für viele miRNAs können beide Stränge einer miRNA im Gewebe nachgewiesen werden. Daher ist eine pauschale Einteilung in Führungsstrang und „nutzlosen“ Passagierstrang nicht möglich. Expressionsprofile haben gezeigt, dass in manchen Geweben beide Stränge gleichzeitig nachgewiesen werden konnten, während in anderen Geweben nur der eine oder der andere Strang gefunden wurde. Es ist

ebenfalls wahrscheinlich, dass die Strang-Selektion nicht nur gewebsspezifisch ist, sondern auch einer zellspezifischen und konditionsspezifischen Modulation unterliegt (RO et al., 2007; BIASIOLO et al., 2011; ZHOU et al., 2012). Aktuell ist noch wenig darüber bekannt, wie die Regel der niedrigeren thermodynamischen Stabilität unter bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise Krankheit oder unterschiedlichen Entwicklungsstadien, umgangen werden kann. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass solche Mechanismen existieren (MEIJER et al., 2014).

Die Erkenntnis, dass nur das Beladen von Ago mit der doppelsträngigen miRNA, nicht aber das Wedging oder der Auswurf des Passagierstrangs ATP benötigt, wirft die Frage auf, woher die Energie für diese Prozesse kommt (YODA et al., 2010; KWAK und TOMARI, 2012; SUZUKI et al., 2015). Kobayashi und Tomari stellen die Theorie eines zugrunde liegenden Energie-Gefälles auf, und nennen ihr Modell das „energy slope“-Modell (KOBAYASHI und TOMARI, 2016). Ago-Moleküle sind in ihrer RNA-freien Form sehr flexibel (ELKAYAM et al., 2012). Um mit einer miRNA-Duplex beladen zu werden, muss Ago eine energetisch ungünstigere Konformation einnehmen. Für diese Konformationsänderung ist die Chaperonen-Maschinerie notwendig. Sie bringt Ago in die aktive, beladungsfähige Form und verhindert, dass das Molekül wieder in die flexible, inaktive Form zurückfällt. Dieser Prozess benötigt die Hydrolyse von ATP. Während des Beladungsprozesses ändert Ago erneut seine Konformation. Die Domänen winden sich um die miRNA und interagieren so miteinander, dass sich die vorher offene Konformation in eine geschlossene Konformation wandelt. Die geschlossene Konformation ist stabiler und energetisch vorteilhaft, außerdem wird aufgrund des geringen Platzes im Molekül der Auswurf des losen Passagierstrangs unterstützt. Der entstandene reife RISC-Komplex stellt den energetisch vorteilhaftesten und stabilsten Zustand dar. Das „energy slope“-Modell vergleicht den Vorgang also mit dem Herabrollen eines Energiegefälles. Das Ago-Molekül bewegt sich von dem instabilen, energetisch ungünstigen, aktiven Zustand, über den stabileren pre-RISC Zustand hin zu dem bevorzugten, stabilen reifen RISC-Komplex (KOBAYASHI und TOMARI, 2016).

## **1.2. Wirkmechanismus**

MiRNAs bewirken ein post-transkriptionelles Gen-Silencing durch Unterdrückung der Translation und Beschleunigung des Abbaus der Ziel-mRNA (HUNTZINGER und IZAURRALDE, 2011). Die kurze RNA im RISC-Komplex dient als

Führungsstruktur, um die Ziel-mRNA zu erkennen (SCHWARZ et al., 2002). Durch Basenpaarung der miRNA mit partiell komplementären Regionen der 3'-UTR der mRNAs wird die Proteinsynthese post-transkriptionell reguliert (EULALIO et al., 2008; BARTEL, 2009; FABIAN et al., 2010).

Für die Wirkungsweise der miRNA-bedingten Genregulation ist entscheidend, dass die Führungs-miRNA die Ziel-mRNAs spezifisch bindet und dass der RISC-Komplex auf der Suche nach den passenden mRNAs schnell zwischen Zielstruktur und Nicht-Zielstruktur unterscheiden kann. Nur so ist eine schnelle Antwort auf wechselnde Umweltbedingungen möglich (KUNNE et al., 2014). Um diese Bedingungen zu erfüllen unterteilt das Ago-Molekül die Führungs-RNA in verschiedene funktionale Abschnitte (WEE et al., 2012; SALOMON et al., 2015). Die entscheidende Rolle bei der Zielerkennung spielt die sogenannte „Seed-Sequenz“ (LEWIS et al., 2003; BRENNECKE et al., 2005). Die Seed-Sequenz umfasst die Nukleotide an Position 2 - 7 oder 2 - 8, beginnend vom 5'-Ende der miRNA. Außerdem unterscheidet man einen Anker (nt 1), eine zentrale Region (nt 9 - 12), eine 3'-ergänzende Region (nt 13 - 17) und eine Schwanz-Region (nt 18 - 21) (WEE et al., 2012).

### **1.2.1. Erkennung der Zielstruktur**

Das 5'-Ende der Führungs-miRNA ist in der MID-Domäne verankert, die folgenden Nukleotide 2 - 7 sind in einer helikalen Anordnung so ausgebreitet, dass sie in Kontakt mit der Umgebung treten können. (ELKAYAM et al., 2012; NAKANISHI et al., 2012; SCHIRLE et al., 2014). Die folgenden Nukleotide reichen von der Mitte des Proteins bis zur 3'-bindenden Tasche in der PAZ-Domäne, wobei sich die Nukleotide 14 - 18 durch einen engen Kanal winden, der von der PAZ- und der N-Domäne gebildet wird (SCHIRLE et al., 2014). Durch diese Anordnung innerhalb des Ago-Moleküls wird verhindert, dass die 3'-Hälfte der Führungs-RNA Basenpaarungen mit komplementären Zielstrukturen eingehen kann. In Abwesenheit einer Ziel-mRNA fügt das Ago-Molekül einen Knick am Ende der Seed-Sequenz in die Führungs-RNA ein. Dieser Knick wird durch helix-7, einer  $\alpha$ -Helix des Ago-Moleküls, durch Einfügen eines hydrophoben Rests zwischen nt 6 und nt 7 hervorgerufen (SCHIRLE und MACRAE, 2012; FAEHNLE et al., 2013; NAKANISHI et al., 2013). Durch den eingefügten Knick liegen von der Seed-Sequenz nur noch die Nukleotide 2 - 5 in einer A-Form-Helix vor, einer Konformation, welche thermodynamisch günstig für die Basenpaarung zwischen

miRNA und Ziel-mRNA ist und somit die Interaktion beider RNAs fördert (BARTEL, 2004; ELKAYAM et al., 2012; NAKANISHI et al., 2012; SCHIRLE et al., 2014). Das bedeutet, dass innerhalb der Seed-Sequenz eine Unterteilung in zwei Untereinheiten stattfindet, von denen die Einheit nt 2 - 5 die initiale, eigentliche Erkennungssequenz darstellt (SCHIRLE et al., 2014; CHANDRADOSS et al., 2015; SALOMON et al., 2015). Die Paarung der Nukleotide 2 - 5 der Seed-Sequenz mit der Ziel-mRNA erfolgt nach einem Alles-oder-Nichts-Prinzip, wonach es beim Auftreten von Fehlpaarungen zu keiner Bindung kommt (SALOMON et al., 2015). Ist die Basenpaarung jedoch korrekt, kommt es zu einer Konformationsänderung des Ago-Moleküls. Helix-7 ändert ihre Position, um nun mit der kleinen Furche der neu gebildeten Duplex-RNA, bestehend aus Führungs-miRNA und Ziel-mRNA, zu interagieren. Hierdurch löst sich der Knick innerhalb der Seed-Sequenz, die Nukleotide 6 - 8 nehmen ebenfalls eine helikale Anordnung an und sind dann für weitere Basenpaarungen verfügbar (SCHIRLE et al., 2014). Zusätzlich zur Überprüfung der Basenpaarung auf Komplementarität wird die neue doppelsträngige Helix auch anhand ihrer dreidimensionalen Struktur überprüft. Die Interaktion von helix-7 mit der kleinen Furche der Duplex-RNA ermöglicht es, eine verzerrte Konformation aufgrund von Fehlpaarungen zu identifizieren und bei Bedarf eine unpassende Ziel-mRNA auszuwerfen (SCHIRLE et al., 2014). Fehlpaarungen im Bereich der Nukleotide 6 - 8 der Führungs-miRNA fallen nicht so schwer ins Gewicht wie im Bereich der Nukleotide 2 - 5 und können durch extensive Komplementarität im Bereich der 3'-ergänzenden Region ausgeglichen werden (BRENNECKE et al., 2005; GRIMSON et al., 2007; BARTEL, 2009; WEE et al., 2012; SALOMON et al., 2015). Die Bewegung von helix-7 führt neben der Freigabe der restlichen Seed-Sequenz nämlich auch zu einer Erweiterung des Kanals zwischen der PAZ- und der N-Domäne. Die Erweiterung wird begleitet von einer Repositionierung der 3'-Hälfte der Führungs-miRNA, wobei die Nukleotide der 3'-ergänzenden Region die Konformation einer A-Form-Helix annehmen und nun für die ergänzende Basenpaarung zur Verfügung stehen (SCHIRLE et al., 2014). Komplementarität im Bereich der 3'-ergänzenden Region kann zum einen Fehlpaarungen oder wackelnde G:U Paarungen in der Seed-Sequenz ausgleichen, zum anderen, bei korrekter Basenpaarung der Seed-Sequenz mit der Ziel-mRNA, die translationale Repression verstärken (BRENNECKE et al., 2005; GRIMSON et al., 2007; BARTEL, 2009; WEE et al., 2012; SALOMON et al., 2015).

Doch wie kann der RISC-Komplex miRNA-Zielstrukturen in der enormen und dynamischen Anhäufung von RNA-Molekülen in einer Zelle effizient identifizieren? Die Erklärung liefert eine Studie von Chandradoss et al. Sie unterstützt ebenfalls das Modell der schrittweisen Zielerkennung. Das Ago-Molekül kann also Zielstrukturen nur anhand der 3 - 4 Nukleotide der Seed-Untereinheit effizient erkennen und bildet erst dann eine langlebige Interaktion mit der mRNA aus, wenn die Basenpaarung sich über die gesamte Länge der Seed-Sequenz erstreckt. Auf der Suche nach Bindungsstellen bindet der RISC-Komplex einsträngige RNA-Moleküle und diffundiert entlang des Moleküls, während die Seed-Sequenz die mRNA nach komplementären Sequenzen absucht (CHANDRADOSS et al., 2015). RISC-Komplexe weisen nämlich eine unspezifische Affinität zu einsträngigen RNA-Molekülen auf, die eine Bindung und somit den Suchprozess begünstigt (AMERES et al., 2007). Die Einschränkung der initialen Zielsuche auf nur wenige Nukleotide vermindert den benötigten Energieaufwand und vereinfacht die laterale Diffusion. Somit ist ein effizienter Ablese-Mechanismus gewährleistet (CHANDRADOSS et al., 2015). Die Länge der Seed-Sequenz stellt vermutlich den besten Kompromiss zwischen optimalen kinetischen Eigenschaften während des initialen Ablesens einer Ziel-mRNA und ausreichender Sequenzspezifität dar (KUNNE et al., 2014).

Die Studie von Chandradoss et al. zeigt außerdem, dass das Ago-Molekül häufig zwischen benachbarten Zielstrukturen hin und her pendelt. Dadurch erhöht sich die Verweilzeit des RISC-Komplexes an einer Ziel-mRNA mit multiplen Bindungssequenzen. Energetisch stellt die laterale Diffusion entlang des Moleküls zur Erfassung mehrerer Bindungssequenzen die günstigere Variante dar, im Vergleich zur Dissoziation des Komplexes vom Molekül und der erneuten Bindung an anderer Stelle (CHANDRADOSS et al., 2015). Die Fähigkeit des Ago-Moleküls zur lateralen Diffusion entlang der mRNA hilft auch bei der Erklärung, wie benachbarte miRNA-Bindungsstellen zu einer kooperativen Unterdrückung von Ziel-mRNAs führen können (GRIMSON et al., 2007; BRODERICK et al., 2011).

### **1.2.2. Post-transkriptionelles Gen-Silencing**

Hat ein miRISC-Komplex eine Zielstruktur erfolgreich erkannt, erfolgt im Anschluss das Silencing der mRNA. Liegt eine vollständige Komplementarität vor, kann die mRNA durch katalytisch aktive Ago-Moleküle gespalten werden (AMERES und ZAMORE, 2013; IPSARO und JOSHUA-TOR, 2015). Im

Tierreich und auch beim Menschen sind Zielstruktur und Führungs-miRNA jedoch nur teilweise komplementär, was eine Spaltung durch Ago unmöglich macht (IPSARO und JOSHUA-TOR, 2015). Für die Genregulation kommen alternative Methoden zum Einsatz. Durch Rekrutierung zusätzlicher Proteine findet das Silencing als Kombination von translationaler Repression, Deadenylierung, Abbau der 5'-Cap-Struktur, dem so genannten „Decapping“, und schließlich dem Abbau der mRNA vom 5'- zum 3'-Ende statt (HUNTZINGER und IZAURRALDE, 2011; FABIAN und SONENBERG, 2012). GW182-Proteine spielen eine wichtige Rolle in diesen Prozessen. Sie stellen eine Art flexibles Gerüst dar, welches als Plattform dient, um Interaktionen zwischen den Ago-Proteinen und folgenden Effektor-Komplexen, wie beispielsweise den zytoplasmatischen Deadenylase-Komplexen Poly(A)-Nuklease (PAN) 2-PAN3 und CCR4-NOT (Carbon catabolite repressor 4-negative on TATA-less), zu ermöglichen (HUNTZINGER und IZAURRALDE, 2011; FABIAN und SONENBERG, 2012).

#### **1.2.2.1. Mechanismen des mRNA-Abbaus**

Gesammelte wissenschaftliche Nachweise zeigen, dass der Abbau der miRNA-Zielstruktur durch Enzyme des zellulären 5'-zu-3'-mRNA-Zerfallsweges katalysiert wird (JONAS und IZAURRALDE, 2015). Bei diesem Prozess wird zunächst der Poly(A)-Schwanz der mRNA am 3'-Ende durch aufeinander folgende Aktivität der Deadenylase-Komplexe PAN2-PAN3 und CCR4-NOT gekürzt (WAHLE und WINKLER, 2013). Anschließend folgt die Hydrolyse der 3'-Cap-Struktur durch das Decapping-Protein 2 unter Mithilfe verschiedener weiterer Kofaktoren (JONAS und IZAURRALDE, 2013). Schließlich wird die restliche mRNA durch die zytoplasmatische Nuklease 5'-zu-3'-Exoribonuklease 1 abgebaut (GARNEAU et al., 2007). Die aufeinander folgenden Schritte sind durch ein Netzwerk von direkten Interaktionen zwischen den jeweiligen katalytischen Einheiten gekoppelt. Der miRISC-Komplex macht Gebrauch von diesem gut aufeinander abgestimmten System über Rekrutierung des Adapter-Proteins GW182 (JONAS und IZAURRALDE, 2015). GW182 interagiert mit PAN3, dem Verbindungsprotein des PAN2-PAN3-Deadenylasekomplexes, und rekrutiert somit die katalytische Untereinheit PAN2 (BRAUN et al., 2011; CHRISTIE et al., 2013). Der genaue Beitrag des PAN2-PAN3-Deadenylasekomplexes zum mRNA-Abbau ist nicht gänzlich geklärt. Es wird vermutet, dass der Komplex in der frühen Phase der Deadenylierung involviert ist, ohne einen vollständigen mRNA-Abbau zu

initiieren. Wenn der Poly(A)-Schwanz der mRNA um eine bestimmte Länge gekürzt ist, übernimmt der CCR4-NOT-Komplex, setzt die Deadenylierung fort und leitet folgend den kompletten Abbau der RNA ein. Ein Ausfall des PAN2-PAN3-Komplexes kann vermutlich durch den CCR4-NOT-Komplex kompensiert werden, der in der Lage ist, auch allein für den mRNA-Abbau zu sorgen (YAMASHITA et al., 2005; WAHLE und WINKLER, 2013). Der CCR4-NOT-Komplex koppelt nicht nur den Prozess der Deadenylierung mit dem des Decappings, sondern verfügt außerdem über die Fähigkeit unabhängig vom mRNA-Abbau die Translation zu unterdrücken (COOKE et al., 2010; CHEKULAEVA et al., 2011; BAWANKAR et al., 2013; HUNTZINGER et al., 2013; ZEKRI et al., 2013; MATHYS et al., 2014). Diese Eigenschaften resultieren daraus, dass eine Unterdomäne des CCR4-NOT-Komplexes als Bindungsplattform für DDX6 (DEAD-box helicase 6) dient, einem Enzym, das die Translation unterdrückt und zusätzlich mit Decapping-Faktoren interagiert (PRESNYAK und COLLER, 2013; CHEN et al., 2014; MATHYS et al., 2014). Diese Unterdomäne koordiniert also die Funktionen des Komplexes durch Interaktion mit denjenigen Enzymen, die Deadenylierung, translationale Repression und Decapping katalysieren (CHEN et al., 2014).

Außer mit Ago-Proteinen und den Deadenylase-Komplexen, geht GW182 auch eine Verbindung mit dem zytoplasmatischen Poly(A)-bindenden Protein (PABPC) ein (FABIAN et al., 2009; HUNTZINGER et al., 2010; JINEK et al., 2010; KOZLOV et al., 2010; HUNTZINGER et al., 2013; ZEKRI et al., 2013). PABPC interagiert mit verschiedenen Translationsfaktoren und funktioniert dadurch als stimulierende Komponente der Translation (DERRY et al., 2006). Über die Art und Weise wie die Interaktion zwischen GW182 und PABPC zum Gen-Silencing beiträgt existieren verschiedene Theorien. Eine Variante sieht PABPC als eine Art Anker, durch den sich der miRISC-Komplex an polyadenylierte mRNAs anhängen kann. Dadurch werden polyadenylierte mRNAs effizienter mit Ago-Proteinen in Verbindung gebracht und deren Expression somit effizienter unterdrückt (BEILHARZ et al., 2009; WALTERS et al., 2010; ZEKRI et al., 2013). Das alternative Modell erklärt den translationshemmenden Effekt durch die Bindung von PABPC an GW182, welche den normalerweise auftretenden stimulierenden Effekt abschwächt (WAKIYAMA et al., 2007; BEILHARZ et al., 2009; FABIAN et al., 2009; ZEKRI et al., 2009; HUNTZINGER et al., 2010).

### 1.2.2.2. Translationale Repression

Zusätzlich zur Beschleunigung des mRNA-Abbaus lösen miRNAs auch eine translationale Repression aus, um ein Gen-Silencing zu erzielen (HUNTZINGER und IZAURRALDE, 2011; FABIAN und SONENBERG, 2012). Die translationale Unterdrückung kann in der frühen Phase nach miRNA-Expression beobachtet werden, ihr Effekt ist generell aber als eher schwach anzusehen. Bis die volle Wirkung der translationalen Hemmung eintritt, stellt die mRNA-Destabilisierung und -Deadenylierung die dominantere Komponente des miRNA-medierten Silencings dar (EICHHORN et al., 2014). Nichtsdestotrotz hat eine umfassende Analyse der miRNA-Funktion ergeben, dass die „reine“ translationale Unterdrückung etwa 6 - 26 % der Repression für jede endogene Zielstruktur in Säugerzellen ausmacht (EICHHORN et al., 2014). Die miRISCs besitzen die Fähigkeit, die Translation unabhängig von den Prozessen des mRNA-Abbaus zu hemmen. Umgekehrt kann der Abbau einer mRNA unabhängig davon ablaufen, ob eine Translation stattfindet oder nicht (WU et al., 2006; EULALIO et al., 2007; FUKAYA und TOMARI, 2012; MISHIMA et al., 2012; RICCI et al., 2013a).

Die Frage wie miRNAs die Translation unterdrücken können wurde lange kontrovers diskutiert, bis sich dann jedoch der Konsens entwickelt hat, dass miRNAs die Cap-abhängige Translation zum Zeitpunkt der Initiation unterdrücken (HUMPHREYS et al., 2005; PILLAI et al., 2005; MATHONNET et al., 2007; WAKIYAMA et al., 2007; DING und GROSSHANS, 2009; IWASAKI et al., 2009; ZDANOWICZ et al., 2009; FUKAYA und TOMARI, 2012; RICCI et al., 2013a). Der genaue molekulare Mechanismus muss allerdings noch geklärt werden (JONAS und IZAURRALDE, 2015). Aktuelle Modelle vermuten ein Zusammenspiel mit RNA-Helikasen, wie beispielsweise den eukaryotischen Initiationsfaktoren 4 (eIF4) A1 und eIF4A2, oder dem translationalen Repressor und Decapping-Aktivator DDX6 (JONAS und IZAURRALDE, 2015).

Die eIF4A-RNA-Helikasen sind Initiationsfaktoren der Translation, die die Sekundärstruktur einer mRNA im Bereich der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) entwinden und somit ein Ablesen und Finden des Start-Codons durch den 43S-Prä-Initiationskomplex ermöglichen (JACKSON et al., 2010). Einige Studien weisen darauf hin, dass dieser Scanning-Prozess durch die Interaktion zwischen miRISC und eIF4A behindert wird (MEIJER et al., 2013; FUKAO et al., 2014; FUKAYA et al., 2014). Bezüglich der Frage, wie genau diese Hinderung stattfindet und wie



eIF4A zum Silencing-Prozess beiträgt, gehen die Meinungen der einzelnen Studien allerdings auseinander. Eine Studie zeigte, dass miRISCs eIF4A2 spezifisch durch Interaktionen mit dem CCR4-NOT-Komplex rekrutieren (MEIJER et al., 2013). Diese Interaktion ist womöglich in der Lage, eIF4A2 auf der mRNA-5'-UTR zu fixieren und dadurch eine Blockierung für den 43S-Komplex darzustellen. Resultierend wird der Scanning-Prozess verhindert, und somit die Initiation der Translation gehemmt (MEIJER et al., 2013). Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass miRNAs die Translation unterdrücken, indem eIF4A losgelöst anstatt rekrutiert wird (FUKAO et al., 2014; FUKAYA et al., 2014). Trotz einiger Unklarheiten manifestiert sich aus diesen und anderen Studien ein Modell, bei dem miRNAs durch Abzielen auf eIF4E, eIF4G oder eIF4A in den Zusammenbau und/oder die Funktion des eIF4F-Komplexes eingreifen (MATHONNET et al., 2007; ZDANOWICZ et al., 2009; MEIJER et al., 2013; RYU et al., 2013; FUKAO et al., 2014; FUKAYA et al., 2014).

Ein alternativer oder möglicherweise weiterer Mechanismus, mit dem miRISCs und der CCR4-NOT-Komplex die Translation hemmen können, betrifft das Enzym DDX6. DDX6 beinhaltet zwei verschiedene Funktionen in der post-transkriptionellen mRNA-Regulation. Es kann einerseits unabhängig vom mRNA-Abbau die Translation unterdrücken, andererseits das Decapping stimulieren und somit den kompletten Abbau einer mRNA einleiten (PRESNYAK und COLLER, 2013). Die Aktivierung des Decapping-Prozesses wird vermutlich durch die Rekrutierung verschiedener Decapping-Faktoren zur mRNA hervorgerufen, die sich im Prozess der Deadenylierung befindet (JONAS und IZAURRALDE, 2013; PRESNYAK und COLLER, 2013). Wie DDX6 die Translation unterdrückt, bleibt bislang eine offene Frage (JONAS und IZAURRALDE, 2015). DDX6 interagiert mit einem eIF4E-Transporter, einem eIF4E-bindenden Protein, das mit eIF4G um die Bindung mit eIF4E konkurriert und somit die Einleitung der Translation hemmt (ROLLAND et al., 2014). Eine Hemmung des Transporters hat jedoch nur einen leichten Effekt auf das Silencing, was die Vermutung nahelegt, dass DDX6 noch weitere, bisher unbekannte, Mechanismen benutzt (JONAS und IZAURRALDE, 2015). Eine interessante Erkenntnis diesbezüglich ist, dass die ATPase-Aktivität von DDX6, welche durch die Interaktion mit dem CCR4-NOT-Komplex stimuliert wird, für das miRNA-bedingte Gen-Silencing erforderlich ist (MATHYS et al., 2014).

Es bleibt eine Herausforderung, die genauen Mechanismen der translationalen Hemmung sowie die Interaktion zwischen translationaler Repression und mRNA-Abbau in Zukunft herauszufinden (JONAS und IZAURRALDE, 2015).

### 1.3. Nachweis

MicroRNAs konnten bereits in verschiedensten Geweben, Zellkulturen, Blut und anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin und Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden (KROH et al., 2010; LV et al., 2014; MOMEN-HERAVI et al., 2014; GAITERO et al., 2016; SALIMINEJAD et al., 2019). Zu den konventionellen Nachweismethoden gehören das Northern-Blotting, die In-situ Hybridisierung, die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR), der Mikroarray und das „Next-Generation Sequencing“ (DAVE et al., 2018). Die in dieser Studie verwendete Methode der RT-qPCR zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus und eignet sich gut für die Quantifizierung von miRNAs (DAVE et al., 2018). Da nur eine begrenzte Anzahl an miRNAs pro Tag mittels RT-qPCR analysiert werden können, eignet sich die Methode insbesondere für die Untersuchung einer kleineren Anzahl von zu detektierenden miRNAs (DAVE et al., 2018). Das Prinzip der RT-qPCR beruht auf der reversen Transkription (RT), der Herstellung von zur miRNA komplementären DNA (cDNA), die anschließend im Rahmen einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) vervielfältigt wird. Die Menge der vervielfältigten PCR-Produkte wird dann unter Verwendung eines DNA-interkalierenden Farbstoffes mittels Fluoreszenz-Messung bestimmt. Bei der reversen Transkription mit einem Universalprimer werden zunächst alle miRNAs durch das Enzym Poly(A)-Polymerase an ihrem 3'-Ende mit einem Poly(A)-Schwanz versehen. Als Universalprimer wird dann ein zum Poly(A)-Schwanz komplementäres Oligo-dT-Nukleotid verwendet, das an seinem 5'-Ende eine Bindungssequenz für den unspezifischen Rückwärtsprimer der qPCR enthält (DAVE et al., 2018; SALIMINEJAD et al., 2019). Wenn der RT-Primer an die polyadenylierte miRNA bindet, kann folgend die cDNA mittels reverser Transkription synthetisiert werden. Für die Amplifikation jeder einzelnen miRNA wird anschließend in der qPCR ein universaler Rückwärtsprimer und ein miRNA-spezifischer Vorwärtsprimer verwendet (SALIMINEJAD et al., 2019). Aufgrund dieser spezifischen Vorwärtsprimer werden nur die gesuchten miRNAs amplifiziert und detektiert.

Als Ausgangsmaterial für eine miRNA-Expressionsanalyse sind nicht nur frische oder tiefgefrorene, sondern auch Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Proben geeignet (SIEBOLTS et al., 2009). Solche archivierten Proben waren bisher für die Extraktion und Analyse größerer Nukleinsäuren ungeeignet, da aufgrund der Fixation in Formalin ein Abbau der Moleküle und eine chemische Modifikation stattfindet (SRINIVASAN et al., 2002). Die Qualität von miRNAs scheint im Vergleich zu der von RNA- oder DNA-Molekülen weniger unter dem Einfluss des Formaldehyds zu leiden, was vermutlich an ihrer geringen Größe liegt (LIU und XU, 2011). Einige Studien führten eine vergleichende miRNA-Expressionsanalyse aus gefrorenen Proben und FFPE-Proben durch und konnten eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse feststellen (LI et al., 2007; GLUD et al., 2009; LIU und XU, 2011). Da FFPE-Gewebeproben in großen Mengen zusammen mit Patientendaten, Krankengeschichte und medizinischer Aufarbeitung archiviert sind, stellt die retrospektive Durchführung von miRNA-Expressionsanalysen eine wertvolle Möglichkeit dar, den aktuellen Wissensstand zu erweitern (LIU und XU, 2011). Bei der Verwendung von FFPE-Proben muss bedacht werden, dass eine lange Lagerungszeit, vermutlich durch die Aussetzung an der Luft, die Verwendung von ungepuffertem Formalin und die Zugabe von Glutaraldehyd die Qualität von miRNAs beeinträchtigen können (SIEBOLTS et al., 2009; RENTOFT et al., 2011).

#### **1.4. Rolle in der Medizin**

Über 60 % der Protein-kodierenden Gene des Menschen weisen Bindungsstellen für miRNAs auf und es wird angenommen, dass die Mehrheit aller Protein-kodierenden Transkripte einer miRNA-medierten Regulation unterliegen (FRIEDMAN et al., 2009; HA und KIM, 2014). Dadurch sind miRNAs vermutlich in nahezu alle Entwicklungsprozesse und pathologische Vorgänge bei Säugetieren involviert (HA und KIM, 2014). Abweichende miRNA-Expressionsmuster konnten bei vielen Krankheiten und Entwicklungsstörungen gefunden werden, was miRNAs zu interessanten Untersuchungsobjekten medizinischer Forschung macht (SALIMINEJAD et al., 2019). Sie können nicht nur ein verbessertes Verständnis der Krankheitszustände und deren Pathogenese ermöglichen, sondern auch als diagnostische Marker oder Ansatzpunkte neuer therapeutischer Methoden dienen (SALIMINEJAD et al., 2019).

### 1.4.1. Humane miRNAs

In einer Studie wurde gezeigt, dass etwa 17 % der miRNAs und miRNA-Familien überwiegend von einem bestimmten Gewebetyp exprimiert wurden, was bedeutet, dass eine gewisse Gewebsspezifität vorliegt (LUDWIG et al., 2016). Beispielsweise wird miR-122 spezifisch in der Leber, miR-9 und miR-124 im Gehirn, miR-205-5p in der Haut und miR-192-5p im Colon exprimiert (LANDGRAF et al., 2007; LUDWIG et al., 2016). Da miRNAs, wie bereits erwähnt, nicht nur in verschiedensten Geweben, sondern auch stabil im Blut und anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin und Zerebrospinalflüssigkeit vorkommen, bringen sie viele Eigenschaften eines potentiellen Biomarkers zu diagnostischen oder prognostischen Zwecken mit (KROH et al., 2010; LV et al., 2014; MOMEN-HERAVI et al., 2014; GAITERO et al., 2016; DAVE et al., 2018; SALIMINEJAD et al., 2019).

Eine Dysregulation von miRNAs wurde in vielen Krankheiten nachgewiesen. Hierzu zählen unter anderem Autoimmunkrankheiten, viele verschiedene Krebserkrankungen, Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen und solche des Nervensystems (DI MARCO et al., 2018; ENRIGHT et al., 2018; WANG et al., 2018; GHASABI et al., 2019; SALIMINEJAD et al., 2019).

Verschiedene miRNAs, unter anderem miR-155 und miR-21, zeigten eine abnormale Expression in Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, autoimmunhämolytischer Anämie, Immunthrombozytopenie oder systemischem Lupus erythematoses (DI MARCO et al., 2018).

Eine Überschneidung der involvierten miRNAs wurde für maligne Bluterkrankungen, wie chronisch lymphatische Leukämie, akute myeloische Leukämie und Non-Hodgkin-Lymphome gefunden. Eine Assoziation von Über- oder Unterexpression verschiedener miRNAs und der Prognose oder der Entwicklung einer Arzneimittelresistenz konnte bei einigen Blutkrebserkrankungen nachgewiesen werden (DI MARCO et al., 2018). Eine Dysregulation der miRNA-Expression korreliert mit unterschiedlichen Tumorarten durch ihre Beteiligung in der Regulation der Expression von Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen (MISHRA et al., 2016). Durch eine erniedrigte Expression von bestimmten miRNAs kann es zu einer erhöhten Expression von Onkogenen kommen, genau wie eine gesteigerte Expression anderer miRNAs zu einer Unterdrückung von Tumorsuppressorgenen führen kann. Zu den miRNAs mit nachgewiesener

Funktion als Tumorsuppressor gehören miR-15, miR-16, die miR-34 Familie, miR-142, miR-206 und let-7, wohingegen der miR-17-92-Cluster, miR-21 und miR-155 zu den onkogenen miRNAs gehören (MISHRA et al., 2016). Eine abweichende miRNA-Expression ist unter anderem bei Prostatakrebs, Brustkrebs, Dick- und Enddarmkrebs sowie Lungenkrebs nachweisbar. Außerdem zeigten sich einige zirkulierende miRNAs in Körperflüssigkeiten als potentiell nützliche Biomarker für Tumorerkrankungen (KOSAKA et al., 2010; CHAKRABORTY und DAS, 2016; MISHRA et al., 2016).

In metabolischen Erkrankungen wie Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 sind miRNAs ebenfalls involviert (TIWARI et al., 2018). Durch ihren Einfluss auf Überleben, Differenzierung und Apoptose der pankreatischen  $\beta$ -Zellen sowie ihrer Rolle in der Insulinsynthese und -sekretion tragen miRNAs zur Pathogenese bei. Abweichungen der miRNA-Expression können möglicherweise frühe Marker für ein verändertes Gleichgewicht des Glukosemetabolismus darstellen (TIWARI et al., 2018).

Im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen wurden viele miRNAs identifiziert, die das Potential haben, als Biomarker für koronare Herzkrankheiten, Myokardinfarkt oder Herzversagen zu dienen (BRONZE-DA-ROCHA, 2014). Als Angriffspunkt der miRNAs dienen nicht nur Kardiomyozyten, sondern auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten, wodurch miRNAs eine Rolle in vielen pathologischen Vorgängen des Herzens, wie beispielsweise einer Hypertrophie, einer Fibrose und auch bei Arrhythmien zugeschrieben wird (WANG et al., 2016; WOJCIECHOWSKA et al., 2017). Bei Patienten mit Koronarherzerkrankungen gehört miR-122-5p zu den am häufigsten hochregulierten miRNAs, und es wurde ein Zusammenhang zwischen einer hohen Expression und dem Schweregrad der Erkrankung festgestellt (GAO et al., 2012; WANG et al., 2018). Bei miR-122-5p handelt es sich um eine miRNA, die eng mit dem Lipidstoffwechsel assoziiert und somit an der Pathophysiologie einer Atherosklerose beteiligt ist (WANG et al., 2018). MiR-122 gehört damit, neben einigen anderen miRNAs, auch zu potentiellen Biomarkern bei Patienten mit Schlaganfall (EYILETEN et al., 2018).

Neben dem Schlaganfall gehört auch die Alzheimer-Krankheit zu den neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen miRNAs eine Rolle spielen (MARTINEZ und PELOW, 2019). Anhand des Nachweises verschiedener

miRNA-Sets im Blut von Menschen konnte mit hoher Sensitivität und Spezifität zwischen Patienten mit Alzheimer-Krankheit und altersentsprechenden kognitiv gesunden Kontrollen differenziert werden (MARTINEZ und PELOW, 2019). Außerdem war eine Differenzierung zwischen Menschen mit einer leichten kognitiven Störung, einer möglichen Vorstufe der Alzheimer-Krankheit, und gesunden Kontrollpersonen anhand von miRNA-Sets möglich. Mithilfe von miR-411 als Biomarker konnte weiterhin gut zwischen einer leichten kognitiven Störung und verschiedenen Schweregraden der Alzheimer-Krankheit unterschieden werden. Da alle bisher verfügbaren Biomarker mit hohen Kosten einhergehen, invasiv und/oder schwierig in der Durchführung und Interpretation sind, stellen miRNAs eine attraktive Alternative dar (MARTINEZ und PELOW, 2019). Vorläufige Ergebnisse von Studien über miRNA-Expression im Blut bei Epilepsiepatienten sprechen auch bei dieser Erkrankung für ein mögliches Potential von miRNAs als Biomarker (ENRIGHT et al., 2018). Einige im Gehirn exprimierte miRNAs wurden auch im Blut nachgewiesen. Der Spiegel dieser miRNAs im Blut von Patienten mit Epilepsie war im Vergleich zu gesunden Kontrollen verändert. Nicht nur generalisierte, sondern auch fokale Krampfgeschehen waren mit einem veränderten miRNA-Profil verbunden, und es wurde eine Assoziation zwischen Veränderungen des miRNA-Profiles und dem Schweregrad eines Krampfgeschehens berichtet. Möglicherweise ist eine Differenzierung anhand des miRNA-Profiles zwischen Arzneimittel-responsiver und -resistenter Epilepsie möglich (ENRIGHT et al., 2018).

Es wird angenommen, dass miRNAs in viele Prozesse der Haut, wie Pigmentierungsstörungen, Hautalterung, Schädigung durch UV-Strahlung und Erkrankungen wie Akne, Psoriasis und atopische Dermatitis, involviert sind (LAWRENCE und CECCOLI, 2017). In Psoriasis konnte ein spezifisches miRNA-Expressionsprofil im Vergleich zu gesunder Haut sowie im Vergleich zu atopischer Dermatitis gefunden werden (SONKOLY et al., 2007). Des Weiteren wurden unterschiedliche Expressionsmuster zwischen Mycosis fungoides im Frühstadium und atopischer Dermatitis sowie zwischen Mycosis fungoides im Frühstadium und weiter fortgeschrittenem kutanem T-Zell-Lymphom nachgewiesen (RALFKIAER et al., 2014).

Die Liste der genannten Krankheiten und die mögliche Rolle von miRNAs in ihrer Pathogenese stellt lediglich eine exemplarische Übersicht dar. Es liegen viele

weitere Erkenntnisse zu diesem Thema vor, die aufgrund des großen Ausmaßes in dieser Arbeit keine Erwähnung finden.

#### **1.4.2. Canine miRNAs**

Ebenso wie beim Menschen, konnte auch bei Hunden in vielen Erkrankungen eine abweichende Expression von miRNAs festgestellt werden.

Viele Studien aus dem Bereich der Onkologie untersuchten miRNA-Expressionen in multiplen Tumorarten wie unter anderem dem Lymphom, dem Übergangszellkarzinom der Harnblase, dem Osteosarkom, dem Hämangiosarkom und Mammatumoren (SAHABI et al., 2018). In spontan aufgetretenen primären Osteosarkomen von Hunden wurde ein spezifisches miRNA-Profil gefunden, zu dem unter anderem eine gesteigerte Expression von miR-9 gehört (FENGER et al., 2016). Eine Überexpression von miR-9 scheint einen Einfluss auf Osteoblasten und Osteosarkom-Zelllinien zu haben, indem es einen metastatischen Phänotyp mit gesteigerter Fähigkeit zu Invasion und Migration der Zellen fördert (FENGER et al., 2016). Zirkulierende miR-126- und miR-214-Spiegel könnten beim Osteosarkom des Hundes als prognostische Indikatoren der Dauer des tumorfreien Überlebens, als auch des allgemeinen Überlebens nach Amputation und adjuvanter Chemotherapie geeignet sein (HEISHIMA et al., 2019). Bei einem Vergleich der miRNA-Expression in Milzen von Hunden mit Hämangiosarkom, nodulärer Hyperplasie und gesunden Hunden konnten 22 unterschiedlich exprimierte miRNAs gefunden werden (GRIMES et al., 2016). Vier davon wurden zwischen Hämangiosarkom und nodulärer Hyperplasie, die restlichen 18 zwischen Hämangiosarkom und normaler Milz festgestellt. Die dysregulierten miRNAs sind in Prozesse der Angiogenese, vaskuläre Erkrankungen und Tumorsignalwege involviert, was bedeutet, dass ihre Dysregulation eine Rolle in der Pathogenese des Hämangiosarkoms des Hundes spielen kann (GRIMES et al., 2016). Die erste Studie, die miRNAs aus dem Urin von Hunden untersuchte, stellte fest, dass die Expression von miR-16- und miR-103b im Urin möglicherweise als Biomarker zur Unterscheidung eines Übergangszellkarzinoms von einer anderen Erkrankung der unteren Harnwege dienen kann, wohingegen keine Unterscheidung anhand der untersuchten miRNAs im Blut zwischen den Gruppen möglich war (KENT et al., 2017). Bei caninen Mammatumoren wurde eine unterschiedliche miRNA-Expression in Abhängigkeit des Tumortyps, des Malignitätsgrades und der Metastasierung festgestellt, wobei der Unterschied der Expression zwischen nicht-

metastasierten und metastasierten Tumoren am größten war. MiRNAs scheinen also in der Regulation der Metastasierung dieser Tumoren involviert zu sein, und können folglich möglicherweise als molekulare Marker einer Tumorstreuung dienen (BULKOWSKA et al., 2017).

Im Hinblick auf kardiologische Erkrankungen des Hundes wurde insbesondere die miRNA-Expression bei Mitralklappenendokardiose untersucht (HULANICKA et al., 2014; LI et al., 2015; JUNG und BOHAN, 2018). Eine unterschiedliche Expression zirkulierender miRNAs im Blut wurde nicht nur zwischen Hunden im kongestiven Herzversagen und gesunden Hunden, sondern auch zwischen Hunden unterschiedlicher Stadien der Mitralklappenendokardiose festgestellt. Das Ausmaß des Expressionsunterschieds scheint mit dem Schweregrad der Erkrankung zuzunehmen (HULANICKA et al., 2014; LI et al., 2015; JUNG und BOHAN, 2018). Eine Studie untersuchte die zirkulierende miRNA-Expression im Blut von Dobermännern mit dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zu gesunden Hunden, allerdings konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (STEUDEMANN et al., 2013).

Ähnlich wie beim Menschen kann auch bei Hunden miR-122 als sensitiver und spezifischer Biomarker im Blut zur Detektion von Leberzellschädigung dienen (DIRKSEN et al., 2016b; EMAN et al., 2018; OOSTHUYZEN et al., 2018; SAKAI et al., 2019). In zwei Studien wurde eine Überlegenheit von miR-122 im Blut als Biomarker gegenüber der Messung von Aminotransferasen nachgewiesen (DIRKSEN et al., 2016b; EMAN et al., 2018). Somit stellt miR-122 auch einen vielversprechenden Biomarker für die frühe Detektion einer subklinischen Hepatitis bei Hunden dar (DIRKSEN et al., 2016b). Neben miR-122 sind auch weitere miRNAs bei der Untersuchung von Lebererkrankungen von Interesse. So konnte in einer Studie beispielsweise ein Set von fünf miRNAs (miR-21, -122, -126, -200c, -222) identifiziert werden, das eine Unterscheidung zwischen Erkrankungen des Leberparenchyms, des Gallensystems oder neoplastischen Lebererkrankungen ermöglicht (DIRKSEN et al., 2016a). Eine andere Studie zeigte, dass die Konzentration von zirkulierender miR-122 und miR-29a positiv mit dem Grad einer Hepatitis und dem Stadium der Fibrosierung korrelierten. Somit können die beiden miRNAs möglicherweise zur Therapieüberwachung oder Feststellung einer Progression bei Hunden mit chronischer Hepatitis dienen (SAKAI et al., 2019).



Bei Hunden mit Meningoenzephalomyelitis unbekannter Ursache konnten in der Zerebrospinalflüssigkeit erhöhte Expressionslevel von miR-21 und miR-181c im Vergleich zu Hunden mit nicht-entzündlicher neurologischer Erkrankung nachgewiesen werden. Außerdem korrelierte die Zellularität positiv mit der Expression von miRNAs, insbesondere miR-21 (GAITERO et al., 2016). Widersprüchliche Ergebnisse wurden in einer anderen Studie veröffentlicht, bei der weder eine Verbindung zwischen miRNA-Expression und Zellularität der Zerebrospinalflüssigkeit, noch mit deren Proteingehalt festgestellt wurde (MARIONI-HENRY et al., 2018). Ein weiteres Ergebnis der zuletzt genannten Studie war eine signifikant höhere Expression von miR-10b-5p bei neoplastischer Ursache der neurologischen Symptome, im Vergleich zu entzündlichen oder degenerativen Ursachen.

Nach bestem Wissen der Autorin existieren zurzeit keine veröffentlichten Studien über miRNA-Expressionen bei Hunden mit Dermatitis.

#### **1.4.3. MicroRNAs in allergischer Dermatitis**

Ein gesundes Immunsystem entdeckt und eliminiert Pathogene sehr effizient. Eine überschießende und unangemessene Reaktion auf Pathogene, Toxine, Allergene und andere irritierende Substanzen kann jedoch eine unverhältnismäßig starke Entzündung mit einhergehendem Gewebeschaden, Autoimmunität und allergischen Erkrankungen hervorrufen (MEDZHITOV, 2010; RENZ et al., 2011). Eine allergische Dermatitis zeichnet sich durch eine starke allergeninduzierte Immunantwort des Th2-Typs aus (VAN DER HEIJDEN et al., 1991). Diese wird weiterhin durch die Produktion von TSLP (Thymic stromal lymphopoietin), IL-33 und IL-25 durch die Keratinozyten verstärkt (LEUNG et al., 2004; SALIMI et al., 2013; JANG et al., 2017). Die chronische Phase der allergischen Entzündung wird von einer komplexen Mischung an Faktoren dominiert, die nicht nur Th2-typische Zytokine, sondern auch IFN- $\gamma$ , IL-17 und IL-22 beinhaltet (KLUNKER et al., 2003; EYERICH et al., 2009; AKDIS et al., 2012; REBANE et al., 2012). Zusätzlich zu Th2-, Th1- und Th22-Zellen tragen auch weitere Zelltypen zur allergischen Entzündung bei. Hierzu gehören die regulatorischen T-Zellen, CD (Cluster of differentiation) 8 positive T-Zellen und Immunzellen des angeborenen Immunsystems. Beispielhaft zu nennen sind die natürlichen Killerzellen, eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, neutrophilen und basophilen Granulozyten

sowie Makrophagen (DENIZ et al., 2013; LICONA-LIMON et al., 2013; NADIF et al., 2013; SALIMI et al., 2013).

Rebane und Akdis stellen die Hypothese auf, dass es drei Mechanismen gibt, durch die miRNAs Einfluss auf eine allergische Entzündung in Geweben nehmen können. Erstens können miRNAs die Polarisierung von Th2-Zellen beeinflussen. Zweitens spielen miRNAs eine Rolle bei der Entwicklung und den Funktionen von CD8+ T-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems, die sich im entzündeten Gewebe befinden oder dorthin rekrutiert wurden. Drittens haben miRNAs Einfluss auf eine chronische Entzündung durch ihre Wirkung in Epithelzellen (REBANE und AKDIS, 2014).

Viele Studien haben den Einfluss von miRNAs auf angeborene und erworbene Immunantworten gezeigt. Zu den meist studierten miRNAs in diesem Zusammenhang gehören miR-21, miR-146a und miR-155 (REBANE und AKDIS, 2014). Über den Einfluss von miRNAs, speziell bei allergischen Dermatitiden, ist das Wissen begrenzt (ROZALSKI et al., 2016).

In einer Studie von Sonkoly et al. wurde die miRNA-Expression aus läsionaler Haut von Patienten mit Psoriasis, atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollpersonen untersucht und verglichen. Das Expressionsprofil der atopischen Haut zeigte eine erhöhte Expression von let-7i, miR-24, miR-27a, miR-29a, miR-193a, miR-199a und miR-222. Sowohl bei Psoriasis als auch bei atopischer Dermatitis waren miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-106p und miR-146a überexprimiert. MiR-21 konnte in Keratinozyten und Immunzellen nachgewiesen werden, wohingegen miR-146a nur von Immunzellen, insbesondere CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen, dendritischen Zellen (DC) und Mastzellen exprimiert wurde (SONKOLY et al., 2007). Der Zusammenhang zwischen miR-146a und einer Immunantwort wurde bereits von Taganov et al. untersucht. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass miR-146a eine Rolle bei Toll-like-Rezeptor (TLR)- und Zytokin-Signalwegen spielt, indem durch die Suppression von IRAK1 (IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1) und TRAF6 (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6) ein negativer Rückkoppelungsmechanismus entsteht. MiR-146a stellt somit einen negativen Regulator dar, der bei der Feinabstimmung der Immunantwort helfen kann (TAGANOV et al., 2006). Später wurde die Rolle von miR-146a bei allergischer Dermatitis erneut untersucht und ihre essentielle regulatorische Funktion in der Haut demonstriert (REBANE et al., 2014). MiR-146a war in den Keratinozyten und der Haut von Menschen mit

atopischer Dermatitis hochreguliert und hatte einen hemmenden Effekt auf die Expression von entzündungsfördernden Faktoren, wie beispielsweise den durch IFN- $\gamma$ -induzierten Genen für C-C-Chemokin-Ligand (CCL) 5, CCL8 und Ubiquitin D. Die durch miR-146a vermittelte Regulation entsteht durch direkten Einfluss auf IRAK1, CARD10 (Caspase recruitment domain-containing protein 10) und CCL5 in Keratinozyten. Die gesteigerte Expression während einer Dermatitis hilft dabei, die chronisch entzündlichen Prozesse, die durch IFN- $\gamma$  und eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs ausgelöst werden, zu kontrollieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass miR-146a durch den Einfluss auf aktivierende Elemente des epidermalen NF- $\kappa$ B-Signalweges, wie CARD10 und IRAK1, eine entzündungshemmende Funktion in der Haut besitzt. Weiterhin werden die durch IFN- $\gamma$  induzierbaren, mit atopischer Dermatitis in Verbindung stehenden Gene für CCL5, CCL8 und UBD supprimiert (REBANE et al., 2014). Im selben Jahr beschrieben Meisgen et al. ebenfalls die Rolle von miR-146a in der Immunantwort von Keratinozyten. Auf eine Stimulation von Keratinozyten über den Toll-like-Rezeptor 2 folgt eine NF- $\kappa$ B-bedingte gesteigerte Expression von miR-146a. Diese wiederum führt durch Bindung von miR-146a an IRAK1 und TRAF6 zur Suppression von NF- $\kappa$ B und der damit einhergehenden Produktion von IL-8, CCL20 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  (MEISGEN et al., 2014). Die Ergebnisse bestätigen das Vorliegen einer negativen Rückkoppelung. Auch in nicht-stimulierten Keratinozyten, die sich in Homöostase befinden, spielt miR-146a eine wichtige Rolle. Wird der ohnehin niedrige endogene miR-146a-Spiegel in ruhenden Keratinozyten experimentell weiter erniedrigt, lässt sich ein Anstieg von Entzündungsmediatoren wie IL-8, CCL20 und TNF- $\alpha$  beobachten. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass miR-146a dazu beiträgt, eine unangebrachte Aktivierung von Keratinozyten zu verhindern (MEISGEN et al., 2014). Die Tatsache, dass trotz erhöhter Expression von miR-146a bei Krankheiten wie der atopischen Dermatitis oder Psoriasis eine chronische Entzündung vorliegt, spricht dafür, dass miR-146a alleine nicht ausreicht, um die Treiber der Entzündungsreaktion zu unterdrücken (SRIVASTAVA et al., 2017). Eine gesteigerte Expression von miR-146a in Keratinozyten reduziert zusätzlich die chemotaktische Anlockung von neutrophilen Granulozyten (MEISGEN et al., 2014; SRIVASTAVA et al., 2017).

In einer weiteren Studie zur Rolle von miRNAs in der Pathogenese der atopischen Dermatitis wurde die Expression in läsionaler und gesunder Haut verglichen. Eine erhöhte Expression in der entzündeten Haut wurde für miR-31, miR-135b, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-155, miR-187, miR-223, miR362, miR-487 und miR-501b nachgewiesen. MiR-155 wurde mit am höchsten überexprimiert, vorwiegend von infiltrierenden Immunzellen, insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Vermutlich spielt miR-155 eine Rolle in grundlegenden biologischen Prozessen von T-Helferzellen, da die Expression zum Zeitpunkt von T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung unter Th1- sowie unter Th2-dominierten Bedingungen am höchsten war. Als direkte Zielstruktur wurde CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung, identifiziert. Eine Überexpression von miR-155 und die damit einhergehende Suppression von CTLA-4 könnte durch die Proliferation von Th-Zellen zur chronischen Entzündung beitragen (SONKOLY et al., 2010).

Eine weitere Forschungsgruppe untersuchte den möglichen Einfluss von miR-155 auf die Pathogenese der atopischen Dermatitis. Neben der Expression von miR-155 in gesunder und atopischer Haut wurde ein besonderes Augenmerk auf ihre regulatorischen Fähigkeiten in Bezug auf die Differenzierung und Funktion von Th17-Zellen, und die Expression von SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling-1) gelegt (MA et al., 2015). Th17-Zellen sind IL-17-produzierende CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems spielen und in entzündliche Erkrankungen, wie beispielsweise die atopische Dermatitis, involviert sind. Das Interesse an der Wirkung von miR-155 auf die Expression von SOCS1 rührt daher, dass SOCS1 als direkte Zielstruktur für miR-155 identifiziert wurde, und es sich hierbei um einen negativen Regulator des Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT)-Signalwegs handelt. Durch diese Kaskade wird die Aktivierung, Entwicklung, und Differenzierung von T-Lymphozyten reguliert. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass miR-155 stark in der Haut und in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Atopikern exprimiert wurde. Es konnte eine moderate Korrelation zwischen der Höhe der miR-155-Expression und dem Schweregrad der Erkrankung nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression von miR-155 führte zu einem erhöhten prozentualen Anteil an Th17-Zellen und einer damit einhergehenden erhöhten Produktion von IL-17. Die Expression von SOCS1 war in Haut, Plasma und peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen der atopischen

Patienten erniedrigt, und es lag ein negativer Zusammenhang zwischen der Höhe der miR-155-Expression und der Höhe der SOCS1-Expression vor. Zusammenfassend schlussfolgern Ma et al., dass es sich bei miR-155 um eine regulatorische Micro-RNA handelt, die die Differenzierung und Funktion von Th17-Zellen durch die Inhibition von SOCS1 bei atopischer Dermatitis fördert. Sie benennen miR-155 als potentiellen therapeutischen Angriffspunkt für atopische Dermatitis (MA et al., 2015).

In 2012 wurde die miRNA-Expression in allergischer Kontaktdermatitis zwischen läsionaler und nicht-läsionaler Haut beim Menschen untersucht. Zudem wurden die Ergebnisse vom Menschen mit denen aus einem Mausmodell für allergische Kontaktdermatitis verglichen. Bei Menschen, die allergisch auf Diphenylcyclopropanone waren, wurde in der läsionalen Haut unter anderem eine starke Hochregulation von miR-21, miR-142-3p, miR-142-5p und miR-223 nachgewiesen. Von insgesamt elf exprimierten miRNAs wurden Orthologe in sensibilisierten Mäusen gefunden, von denen wiederum neun in gleicher Weise über- oder unterexprimiert wurden. Bei den oben genannten vier am höchsten überexprimierten miRNAs wurde ein Zusammenhang mit T-Zellen und T-Zellaktivierung nachgewiesen. Die Ergebnisse passen zu der Erkenntnis, dass es sich bei der allergischen Kontaktdermatitis um eine T-Zell-medierte Hauterkrankung handelt (WANG et al., 2000; VENNEGAARD et al., 2012).

Im Vergleich zu Vennegaard et al., die lediglich die Expression 48 Stunden nach Provokation mit Diphenylcyclopropanone untersucht haben, erfolgte bei Gulati et al. eine miRNA-Expressionsanalyse aus der Haut von sensibilisierten Menschen an Tag 3, Tag 14 und Tag 120 nach Provokation. Verglichen mit den Placebo-behandelten Hautproben ergaben sich 127 signifikant unterschiedlich regulierte miRNAs an Tag 3, 43 miRNAs an Tag 14 und sechs miRNAs an Tag 120. An Tag 3 gehörten miR-7-1, miR-7-2, miR-7-3, miR-21\*, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-150, miR-150\*, miR-223 und miR-503 zu den zehn am höchsten unterschiedlich exprimierten miRNAs. An Tag 14 zählten miR-21, miR-21\*, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146\*, miR-146b, miR-155, miR-223, miR-369 und miR-1185-1-3p zu den höchsten zehn Werten. Die an Tag 120 hoch regulierten miRNAs waren miR-17, miR-136-5p, miR-140-5p, miR-193a-3p, miR-376c und miR-377. Einige der Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse anderer Studien zur Beteiligung von miRNAs bei allergischen Hauterkrankungen, es bleiben jedoch auch einige

miRNAs, über die bisher keine Berichte im Zusammenhang mit der Hautbiologie und -immunologie vorliegen (GULATI et al., 2015).

In einer Studie von Zeng et al. wurde der Einfluss von miR-143 auf den durch IL-13 hervorgerufenen Effekt auf die epidermale Hautbarriere untersucht (ZENG et al., 2016). IL-13 ist in läsionaler atopischer Haut deutlich überexprimiert und sorgt für eine erniedrigte Expression von Proteinen der epidermalen Hautbarriere wie Filaggrin, Involucrin und Loricrin. Die Th2-Zell-dominierte Entzündung in Keratinozyten trägt somit zur Dysfunktion der Hautbarriere bei Patienten mit atopischer Dermatitis bei (HOWELL et al., 2007; KIM et al., 2008; PELLERIN et al., 2013). Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass mit IL-13 behandelte humane Keratinozyten eine erniedrigte miR-143-Expression aufweisen. Bei Transfektion der IL-13-stimulierten Keratinozyten mit synthetischem miR-143 wurde wiederum eine Suppression der Proteinexpression von IL-13-Rezeptor- $\alpha$ 1 beobachtet. Diese Suppression wird durch direktes Binden von miR-143 an IL-13-R $\alpha$ 1-mRNA bedingt. Als Effekt der forcierten Expression von miR-143 wurde eine verstärkte Synthese von Filaggrin, Involucrin und Loricrin nachgewiesen. Die Autoren vermuten, dass miR-143 in Zukunft als Angriffspunkt für Prävention und Therapie der atopischen Dermatitis dienen kann (ZENG et al., 2016).

Bei einem Vergleich der Expression von miR-124 zwischen läsionaler Haut mit atopischem Ekzem und normaler, nicht-läsionaler Haut beim Menschen, wiesen Yang et al. eine deutlich verminderte Expression von miR-124 in läsionaler Haut nach (YANG et al., 2017). Die mRNA von inflammatorischen Genen und Faktoren wie p65, IL-8, CCL5 und CCL8 hingegen, war in den chronisch entzündeten Hautproben überexprimiert. Es wurde eine inverse Korrelation zwischen miR-124-Expression und mRNA-Expression von p65, IL-8, CCL5 und CCL8 gezeigt. In IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -stimulierten Keratinozyten stiegen die Expressionslevel von IL-8, CCL5 und CCL8 an, was eine Herunterregulation von miR-124 zur Folge hatte. Eine Überexpression von miR-124 wiederum führte zu einer Unterdrückung der Expression von p65 und vielen damit einhergehenden proinflammatorischen Faktoren, wie beispielsweise IL-8, CCL5 und CCL8. Die Studie belegt, dass miR-124 Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-abhängigen Entzündungsreaktionen in Keratinozyten und chronisch entzündeter Haut bei atopischem Ekzem hat. Eine Aufrechterhaltung der miR-124-Expression kann zukünftig einen Baustein in der Therapie des atopischen Ekzems darstellen (YANG et al., 2017).

MicroRNAs können nicht nur aus Gewebeproben oder Zellkulturen gewonnen und untersucht werden, sondern auch aus Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma, Urin oder auch Tränenflüssigkeit. Aufgrund der geringen Invasivität der Probenentnahme können krankheitsspezifische Dysregulationen der miRNA-Expression in Körperflüssigkeiten attraktive Biomarker darstellen (CHEN et al., 2008).

Eine Studie verglich die miRNA-Expression in Serum und Urin von Kindern mit atopischer Dermatitis mit derjenigen von gesunden Kindern (LV et al., 2014). Die Ergebnisse zeigten eine statistisch signifikante Überexpression von miR-203 und miR-483-5p im Serum von atopischen Kindern. Die hohe Expression von miR-483-5p korrelierte mit dem Vorhandensein anderer atopischer Konditionen wie beispielsweise Rhinitis oder Asthma, und kann auf eine Multi-Organ-, beziehungsweise -Gewebebeteiligung der atopischen Entzündung hinweisen. MiR-203 wurde im Urin von Kindern mit atopischer Dermatitis deutlich niedriger exprimiert als in der Kontrollgruppe. Diese Unterexpression korrelierte negativ mit hohen IgE-Serumkonzentrationen und dem Schweregrad der Dermatitis, somit kann eine niedrige miR-203-Expression im Urin einen zusätzlichen Biomarker für das Ausmaß der Entzündung bei Kindern mit atopischer Dermatitis darstellen. Die miRNA-Profile aus Serum und Urin waren unterschiedlich zu denen aus läsionaler Haut (LV et al., 2014).

Chen et al. haben eine miRNA-Expressionsanalyse aus dem Plasma von Erwachsenen mit atopischer Dermatitis durchgeführt (CHEN et al., 2018). Die am höchsten überexprimierte miRNA bei atopischen Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe war miR-151a. Interleukin-12-Rezeptor  $\beta 2$  (IL12RB2) wurde als direktes Ziel für miR-151a errechnet. Als Untereinheit des IL-12-Rezeptors spielt IL12RB2 eine wichtige Rolle in der Entwicklung von T-Helferzellen zugunsten einer Th1-Differenzierung. Eine Überexpression von miR-151a in Jurkatzellen bedingte eine Unterdrückung der Expression von Th1-Zytokinen wie IL-2, IL-12 oder IFN- $\gamma$ . Eine solche Inhibition kann das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zytokinen in der Haut stören und somit möglicherweise zur Pathogenese der atopischen Dermatitis beitragen. Die Autoren vermuten, dass ein erhöhter Plasma-miR-151a-Spiegel als nicht-invasiver Biomarker für die Diagnose einer atopischen Dermatitis dienen kann (CHEN et al., 2018).

#### 1.4.4. Therapeutisches Potential

Die Erkenntnisse über die Rolle von miRNAs in der Pathogenese von Krankheiten hat diese zu attraktiven Werkzeugen und Zielstrukturen neuer Therapieansätze gemacht (RUPAIMOOLE und SLACK, 2017).

Prinzipiell sind zwei Angriffspunkte einer solchen Therapie denkbar: Einerseits die Inhibition einer miRNA, beispielsweise durch „AntimiRs“, synthetischen komplementären anti-miR-Sequenzen, die die miRNA binden, blockieren und so zu einer gesteigerten Expression der Zielproteine führen. Andererseits die Substitution einer miRNA in Form von „miRNA-Mimics“, synthetisch hergestellten doppelsträngigen RNA-Molekülen, die die Ziel-miRNA imitieren sollen, und somit eine verminderte Expressierung der Zielproteine erzielen (SCHMIDT, 2014; RUPAIMOOLE und SLACK, 2017).

Die Entwicklung solcher Medikamente auf der Grundlage von Gegenstrang-Molekülen bringt einige Schwierigkeiten mit sich. Krankheitsspezifische miRNAs, deren Biologie und deren Funktion in der Pathogenese einer Krankheit müssen bekannt sein, genau wie die Sequenz dieser Ziel-miRNA, um sie imitieren oder inhibieren zu können. Da einzel- und doppelsträngige Oligonukleotide nicht mittels Diffusion in eine Zelle eindringen können und sie zudem sehr anfällig für einen RNase-vermittelten Abbau sind, müssen sie chemisch modifiziert werden oder mithilfe eines Vehikels in die Zelle gelangen (SCHMIDT, 2014; RUPAIMOOLE und SLACK, 2017). Mögliche Modifikationen zur Verbesserung der Stabilität sind beispielsweise das Hinzufügen einer 2'-O-Methylgruppe oder die Verwendung eines Nukleotid-Derivats namens „Locked Nucleic Acid“ (LNA), bei dem die Ribosemoleküle in ihrer 3'-endo-Konformation fixiert werden und somit eine Basenstapelung und Präorganisation des Rückgrats verbessert wird (KOSHKIN et al., 1998; SCHMIDT, 2014; RUPAIMOOLE und SLACK, 2017). Zu den am meisten verwendeten Vehikel-Systemen gehören Liposomen, Dendrimer-Komplexe und Polymere wie Polyethylenimin. Zentrale Herausforderungen für den Einsatz solcher Vehikel-Systeme im klinischen Bereich sind immunstimulierende Effekte, eine mögliche Toxizität aufgrund von Ladung und der spezifische Transport in das erkrankte Gewebe (RUPAIMOOLE und SLACK, 2017). Bei fehlender Gewebsspezifität könnten die systemisch verabreichten miRNAs von anderen Geweben aufgenommen werden und zu unerwünschten Wirkungen führen (MISHRA et al., 2016).



Um die therapeutischen Möglichkeiten, die toxischen Effekte sowie die Effektivität des Transports und der Wirkung auf die Zielproteine zu evaluieren, müssen neue Therapieansätze gründlich in vorklinischen Studien getestet werden, bevor sie für klinische Studien zugelassen werden (RUPAIMOOLE und SLACK, 2017). Viele neue Therapeutika mit unterschiedlichsten Ziel-miRNAs, insbesondere zur Therapie von Tumoren, aber auch zur Behandlung von Herzerkrankungen, Diabetes oder Atherosklerose, befinden sich im Stadium der vorklinischen Testphase. In das Stadium der klinischen Testverfahren haben es bisher einige Wirkstoffe geschafft. Hierzu gehören AntimiR-122 zur Behandlung von Hepatitis C, AntimiR-103/107 zum Einsatz bei Patienten mit Typ-2-Diabetes und nichtalkoholischer Fettlebererkrankung, AntimiR-155 zur Therapie von kutanem T-Zell-Lymphom und Mycosis fungoides, miR-29-Mimic bei Sklerodermie, miR-16-Mimic bei Mesotheliomen und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen sowie miR-34-Mimic zur Therapie von multiplen soliden Tumoren (RUPAIMOOLE und SLACK, 2017).

In verschiedenen vorklinischen Studien zeigten miR-34-Mimics die Fähigkeit, eine Hemmung des Tumorwachstums und eine Verlängerung der Überlebenszeit durch Eindämmung der metastatischen Ausbreitung in Mausmodellen zu erzielen (WIGGINS et al., 2010; LIU et al., 2011; TRANG et al., 2011). MRX34 (Mirna Therapeutics), ein in Liposomen verkapseltes miR-34-Mimic, wurde in einer multizentrischen Phase-I-Studie bei Menschen mit Tumoren eingesetzt (BEG et al., 2017). Die Therapie mit MRX34 zeigte bei einzelnen Patienten ein partielles Tumoransprechen und bei wenigen Patienten eine stabile Erkrankung (BEG et al., 2015; RUPAIMOOLE und SLACK, 2017). Aufgrund von Immunsystem-assoziierten Nebenwirkungen mit einhergehenden Todesfällen wurde die Studie beendet und weitere vorklinische Studien mit dem Augenmerk auf immunmedierte Toxizität sind notwendig (RUPAIMOOLE und SLACK, 2017).

Die weitest fortgeschrittenen klinischen Studien liegen für AntimiR-122 zur Therapie des Hepatitis-C-Virus vor. Bei den getesteten Produkten handelt sich zum einen um einen LNA-modifizierten Gegenstrang-Inhibitor unter dem Namen Mirvirasen (Santaris Pharma/Hoffmann-La Roche) und zum anderen um eine N-Acetyl-D-Galaktosamin-konjugierte AntimiR unter dem Namen RG-101 (Regulus Therapeutics) (RUPAIMOOLE und SLACK, 2017). Bei diesen Therapeutika wird die natürliche Anreicherung der miRNAs in der Leber als spezifisches Zielorgan ausgenutzt. Sowohl in vorklinischen Studien, als auch in klinischen Studien konnte

eine signifikante Reduktion der Viruslast bei behandelten Patienten nachgewiesen werden (ELMEN et al., 2008b; ELMEN et al., 2008a; JANSSEN et al., 2013). Nebenwirkungen, wie beispielsweise Kopfschmerzen, waren meist mild und behandelbar, daher wird eine sichere Anwendbarkeit angenommen (JANSSEN et al., 2013). Der erfolgreiche Einsatz in Phase-I- und Phase-II-Studien führte zu weiteren Phase-II-Studien, die mehr Patienten beinhalten, die Langzeitwirkung und -verträglichkeit untersuchen und Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Medikamenten testen sollen (RUPAIMOOLE und SLACK, 2017).

Zur Therapie von Hauterkrankungen ist eine lokale Anwendung miRNA-basierter Therapeutika vorstellbar, da der Wirkstoff direkt auf das Zielorgan aufgebracht werden kann und somit ein Verdünnungseffekt oder unerwünschte Wirkungen in anderen Geweben, wie sie bei systemischer Verabreichung auftreten können, vermieden werden (LAWRENCE und CECCOLI, 2017). Doch eine lokale Anwendung bringt die Schwierigkeit mit sich, dass die Wirkstoffe in der Lage sein müssen das Stratum corneum zu penetrieren. Die Herstellung von ultra-deformierbaren Liposomen, die Verwendung von Zell-penetrierenden Peptiden, oder chemische Modifikationen der miRNAs an sich könnten eine bessere Hautpenetration ermöglichen und dieses Problem beheben (LAWRENCE und CECCOLI, 2017). Es kommen theoretisch viele miRNAs als potentielle Zielstrukturen für eine Therapie von Hautkrankheiten wie Psoriasis, atopischer Dermatitis oder Pigmentierungsstörungen in Frage (LAWRENCE und CECCOLI, 2017). Ein wirksamer Einsatz von intradermal oder subkutan injizierten miR-146a-Mimics konnte beispielsweise in Mausmodellen nachgewiesen werden (URGARD et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2017). So konnten die miR-146a-Mimics in einem Mausmodell der Psoriasis zu einer Abschwächung der psoriasiformen Entzündung, einer verminderten epidermalen Proliferation und reduzierter Infiltration von neutrophilen Granulozyten führen (SRIVASTAVA et al., 2017). Des Weiteren wurde bei Mäusen eines Modells für reizende Kontaktdermatitis eine Verbesserung der Ohrschwellung und eine reduzierte Produktion entzündungsfördernder Zytokine und Chemokine unter Einfluss von miR-146a-Mimics nachgewiesen (URGARD et al., 2016). In Zellkultur wurde unter Einsatz von miR-181b-Mimics eine negative Regulation der Proliferation von humanen epithelialen Keratinozyten gezeigt, was miR-181b auch zu einer möglichen Zielstruktur in der Therapie der Psoriasis macht (FENG et al., 2017).

Die vielversprechenden Ergebnisse vorklinischer Studien in Kombination mit dem stetig wachsenden Wissensstand über Biologie und Funktion von miRNAs sowie der Entwicklung neuer Verabreichungssysteme, macht einen klinischen Einsatz miRNA-basierter Therapeutika in Zukunft wahrscheinlich (RUPAIMOOLE und SLACK, 2017).

## **2. Atopische Dermatitis**

### **2.1. Canine atopische Dermatitis**

Bei der caninen atopischen Dermatitis handelt es sich um eine allergische Hautentzündung, die mit Juckreiz einher geht und in der Regel durch die Produktion von IgE-Antikörpern gegen Umweltantigene vermittelt wird. Es besteht eine genetische Prädisposition und betroffene Hunde zeigen für die Krankheit charakteristische klinische Anzeichen (HALLIWELL, 2006). Folgend wird ein Überblick über Inzidenz und Prävalenz, Pathogenese, klinische Anzeichen, Diagnosestellung und Therapie der cAD gegeben.

#### **2.1.1. Inzidenz und Prävalenz**

Die wahre Inzidenz und Prävalenz von AD in der gesamten Hundepopulation ist unbekannt. Die Prävalenz wurde auf bis zu 15 % geschätzt, jedoch bergen epidemiologische Studien zur Feststellung der Häufigkeit einer Krankheit einige Schwierigkeiten (HILLIER und GRIFFIN, 2001a). In der Regel ist eine Erfassung der gesamten Population, die an atopischer Dermatitis erkranken könnte nicht möglich, daher orientieren sich die meisten Studien an Patientendaten von Tierkliniken oder Überweisungscentren (NODTVEDT et al., 2006a). Die dadurch gewonnenen Daten sind mit großer Wahrscheinlichkeit geprägt von der geografischen Lokalisation, der Art der tierärztlichen Einrichtung, der Wahl der Studienpopulation und den Kriterien, die für die Diagnosestellung einer AD angewendet wurden (HILLIER und GRIFFIN, 2001a). Die Patientenpopulation einer Kleintierpraxis in ländlicher Gegend beispielsweise, unterscheidet sich von der einer Kleintierklinik in der Stadt oder gar der Patientenpopulation eines dermatologischen Spezialisten (HILLIER und GRIFFIN, 2001a). Zudem sind je nach Land oder Kontinent unterschiedliche Rassen stärker vertreten als andere (NODTVEDT et al., 2006a). Einige Einblicke konnten bei der Untersuchung der Prävalenz von atopischen Hunden im Vergleich zu allen anderen gestellten Diagnosen, allen anderen Hauterkrankungen oder allen anderen mit Juckreiz

einhergehenden Hautproblemen erlangt werden, jedoch sind die Ergebnisse dieser Studien sehr variabel (HILLIER und GRIFFIN, 2001a). Eine schwedische Studie untersuchte die Inzidenz der cAD in Schweden und bediente sich der Daten einer Tierkrankenversicherung (NODTVEDT et al., 2006a). Da in Schweden, im Vergleich zu vielen anderen Ländern, ein Großteil der Hundepopulation krankenversichert ist, repräsentieren die gewonnenen Daten die tatsächliche Hundepopulation in Schweden besser als Patientendaten einer tierärztlichen Einrichtung. Es wurden nicht nur kranke Hunde, sondern auch gesunde Hunde erfasst und die Population verteilt sich über das gesamte Land. Doch auch hier ergeben sich Limitationen. Da es keinen kommerziellen diagnostischen Test für die cAD gibt, muss der untersuchende Tierarzt zunächst überhaupt die Diagnose cAD gestellt, und der Tierbesitzer den Fall unter dieser Bezeichnung bei der Versicherung eingereicht haben. Milde Fälle, die allein mit symptomatischer Therapie zu kontrollieren sind, werden weniger wahrscheinlich aufwändig aufgearbeitet und allgemeinere Diagnosen, wie beispielsweise „allergische Hauterkrankung“, wurden nicht berücksichtigt. Die geschätzte Inzidenz dieser Studie von 1,7 Fällen je 1000 Patientenjahren liegt also vermutlich unter dem wahren Wert (NODTVEDT et al., 2006a). In der Humanmedizin wird ein Anstieg der Prävalenz der AD beobachtet (ASHER et al., 2006), welcher sehr wahrscheinlich auf sich wandelnde Umweltfaktoren zurückzuführen ist (VON MUTIUS, 2000). Auch in der Hundepopulation wird ein Anstieg der Häufigkeit der atopischen Dermatitis vermutet, allerdings liegen zurzeit ungenügende Daten vor, um die wahre Inzidenz oder Prävalenz der AD in der gesamten Hundepopulation zu bestimmen. Es werden Querschnittsstudien benötigt, um die Prävalenz der cAD herauszufinden und den vermuteten Anstieg der Inzidenz zu überwachen (HILLIER und GRIFFIN, 2001a).

### **2.1.2. Pathogenese**

Die Pathogenese der cAD ist ein, bislang nicht vollständig bekanntes, komplexes Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren, welche wiederum Einfluss auf die Immunantwort und die Funktion der Hautbarriere ausüben (MARSELLA et al., 2012; BIZIKOVA et al., 2015a; PUCHEU-HASTON et al., 2015a; SANTORO et al., 2015).

### 2.1.2.1. Genetische Faktoren und Umweltfaktoren

Der Pathogenese der cAD liegt ein komplexes genetisches Gerüst zugrunde, welches zusammen mit Umweltfaktoren einzelne Individuen dazu prädisponiert, klinische Anzeichen der Erkrankung zu entwickeln (BIZIKOVA et al., 2015a). Mehrere Studien aus verschiedenen Ländern konnten starke Rasseprädispositionen für die Entwicklung von cAD nachweisen, was für eine genetische Grundlage der Krankheitsentstehung spricht (ZUR et al., 2002b; TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008; JAEGER et al., 2010). Zu den am häufigsten genannten Rassen gehören Golden Retriever, Labrador Retriever, West Highland White Terrier (WHWT), Deutsche Schäferhunde, Cocker Spaniel, Boxer, Französische Bulldoggen und Bullterrier. Zu beachten ist, dass die Rasseprädispositionen sowohl zeitlichen als auch geografischen Variationen unterliegen, sodass sich Unterschiede zwischen Kontinenten, Ländern und sogar Regionen innerhalb eines Landes ergeben können (JAEGER et al., 2010). Als Grund hierfür sind rasseinterne genetische Variationen zwischen unterschiedlichen geografischen Regionen denkbar (BIZIKOVA et al., 2015a). Eine Geschlechtsprädisposition für die Erkrankung an cAD scheint nicht vorzuliegen (ZUR et al., 2002b; SHAW et al., 2004; TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008). Eine britische Studie untersuchte in einer Population von Blindenführhunden, die hauptsächlich aus Labrador und Golden Retrievern bestand, die Heritabilität von cAD (SHAW et al., 2004). Die Heritabilität lag bei einem Wert von 0,47, was bedeutet, dass etwa 50 % des Risikos an AD zu erkranken durch genetische Faktoren bestimmt wird, wohingegen die restlichen Anteile durch Umweltfaktoren bedingt werden. Das Risiko eine AD zu entwickeln war stark davon abhängig, ob kein Elternteil, ein Elternteil oder beide Elterntiere von cAD betroffen waren, weshalb die Autoren dieser Studie davon abraten, betroffene Tiere in der Zucht einzusetzen (SHAW et al., 2004).

Um Gene zu identifizieren, die mit der Pathogenese der cAD in Verbindung stehen, wurden einige genomweite Zusammenhangs- oder Assoziationsstudien durchgeführt. Wood et al. untersuchten in einer genomweiten Assoziationsstudie mit cAD assoziierte Einzelnukleotid-Polymorphismen in Golden Retrievern (WOOD et al., 2009a). Zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen waren bei dieser Rasse signifikant mit AD assoziiert, nämlich PROM1 und RAB3C. Letzterer könnte für die Pathogenese der cAD relevant sein, da das Gen für ein

Transportprotein codiert, das bei Lipidankern gefunden werden kann und möglicherweise für die Funktion der Hautbarriere wichtig ist. In einer Studie aus den USA, die eine Genotypisierung und Zusammenhangsanalyse von 108 WHWT aus drei Familien durchgeführt hat, konnten keine chromosomalen Regionen festgestellt werden, die signifikant mit cAD in Verbindung stehen (SALZMANN et al., 2011). Ein Jahr später wurde eine genomweite Assoziationsstudie über WHWT aus Australien publiziert (ROQUE et al., 2012). Von den 60 untersuchten Tieren waren 35 Hunde an cAD erkrankt, die restlichen 25 Hunde waren gesund. Die Studie identifizierte eine Region auf Chromosom 17, die in dieser Population mit cAD assoziiert sein könnte. Zwei Gene, die aufgrund ihrer biologischen Funktion plausibel mit cAD verbunden sein könnten, wurden in großer Nähe zu der Region auf Chromosom 17 gefunden. Bei dem ersten Gen handelt es sich um PTPN22, welches eine lymphoide Tyrosin-Phosphatase codiert, die wiederum einen Signalmediator darstellt, der eine spontane Aktivierung von T- und B-Zellen verhindern soll. Bei dem zweiten Gen handelt es sich um das canine Ortholog des humanen Gens für Cytochrom P450 26B1, das in die Adipogenese und den Retinsäure-Stoffwechsel involviert ist. Eine Mutation in diesem Gen kann möglicherweise den normalen Fettstoffwechsel der Haut beeinträchtigen und somit zu einer abnormen Funktion der Hautbarriere führen (ROQUE et al., 2012). In einer schwedischen Population von Deutschen Schäferhunden konnte in einer genomweiten Studie eine signifikante Assoziation zwischen cAD und einer Region auf Chromosom 27 festgestellt werden (TENGVALL et al., 2013). Die assoziierte Region enthält acht Gene, von denen wiederum elf kleinere Haplotyp-Blöcke identifiziert werden konnten. Die zwei Haplotyp-Blöcke mit der stärksten Assoziation zu cAD sind beide im Bereich des Plakophilin-2-Gens (PKP2) lokalisiert. Plakophilin-2 ist ein Strukturprotein, welches eine wichtige Rolle bei der Bildung von Desmosomen und Corneodesmosomen spielt und somit Einfluss auf die Integrität der Hautbarriere hat. PKP2 stellt also ein relevantes Gen dar, das mit der Pathogenese der cAD in Verbindung gebracht werden kann (TENGVALL et al., 2013). Eine statistisch signifikante Dysregulation der Genexpression von PKP2 bei atopischen Hunden im Vergleich zu gesunden Hunden wurde bereits in einer früheren Studie nachgewiesen (WOOD et al., 2009b). Die Expression von PKP2 korrelierte mit dem Ausmaß und dem Schweregrad der atopischen Dermatitis. Weitere zehn Gene, die in der Formation der Hautbarriere und der Funktion des Immunsystems involviert sind, zeigten eine unterschiedliche

Expression zwischen cAD und gesunder Haut (WOOD et al., 2009b). Eine andere Studie über die unterschiedliche Genexpression zwischen läsionaler atopischer, nicht-läsionaler atopischer und gesunder Haut, ergab eine signifikant verschiedene Expression von 54 Genen (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008). Während die Dysregulationen, die lediglich in läsionaler atopischer Haut gefunden wurden, den entzündlichen Veränderungen der Haut geschuldet sein können, lassen gemeinschaftliche oder ausschließlich in nicht-läsionaler atopischer Haut nachgewiesene Regulationsunterschiede möglicherweise auf einen atopischen Phänotyp schließen. Sechzehn Gene waren gemeinschaftlich in atopischer Haut dysreguliert, 26 Gene ausschließlich in nicht-läsionaler atopischer Haut und zwölf Gene nur in läsionaler atopischer Haut. Die Gene zeigten ebenfalls eine Involvierung in der Funktion der Hautbarriere und immunologischen Vorgängen (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008). In einem Hundemodell der atopischen Dermatitis wurde die kutane Genexpression vor und nach Allergen-Konfrontation bei auf Hausstaubmilben sensibilisierten Beagles untersucht und mit der von nicht sensibilisierten Hunden verglichen (SCHAMBER et al., 2014). 24 Stunden nach dem Allergenkontakt waren 361 Gene in der Haut der sensibilisierten Hunde überexprimiert und 226 Gene unterexprimiert. Die Gene mit einer gesteigerten Expression konnten Entzündungsprozessen, der Wundheilung und der Immunantwort zugeordnet werden, wohingegen die niedrig exprimierten Gene in die Differenzierung und Barrierefunktion der Haut involviert sind (SCHAMBER et al., 2014).

Zusammengefasst handelt es sich bei der caninen atopischen Dermatitis um eine erbliche Erkrankung, bei der das Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen das Risiko und den Phänotyp der Erkrankung beeinflussen (BIZIKOVA et al., 2015a).

Zur Atopie beim Menschen gibt es zahlreiche Studien, die den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Krankheitsentwicklung untersucht haben. 1989 wurde eine epidemiologische Studie veröffentlicht, die ergab, dass es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an Kindern im Haushalt und der Häufigkeit des Auftretens von allergischer Rhinitis oder atopischem Ekzem gibt (STRACHAN, 1989). Mit steigender Anzahl an Geschwisterkindern sank das Risiko an AD zu erkranken. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass der frühe Kontakt zu Erregern von häufig auftretenden Kindheitsinfektionen einen protektiven Effekt auf die Entwicklung

allergischer Erkrankungen im späteren Leben haben könnte (STRACHAN, 1989). Diese Annahme wurde nachfolgend als „Hygiene-Hypothese“ bekannt. Weitere Studien unterstützten die Hypothese, dass eine Keimexposition in jungem Alter, beziehungsweise das Aufwachsen in einer „schmutzigeren“ Umgebung ein niedrigeres Risiko für die Entwicklung von atopischer Dermatitis und Asthma beinhaltet. So zeigten beispielsweise zwei weitere Studien ein reduziertes Risiko für eine allergische Erkrankung, wenn im ersten Lebensjahr ein erhöhter Kontakt zu anderen Kindern, zum Beispiel im Rahmen eines Kinderbetreuungsprogramms, vorlag (CELEDON et al., 2003; ROTHERS et al., 2007). Des Weiteren war die Häufigkeit von allergischen Krankheiten bei Kindern aus ländlichen Gegenden, die auf einer Farm aufgewachsen sind oder Kontakt zu Vieh hatten, niedriger als bei Kindern aus einem städtischen Umfeld (GEHRING et al., 2001; KILPELAINEN et al., 2002; DIMICH-WARD et al., 2006; VON MUTIUS und VERCELLI, 2010). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen liefert die Studie von Eisenbarth et al., die herausfand, dass bei einer Exposition die Menge an Lipopolysacchariden (LPS) oder anderen mikrobiellen Produkten den folgenden Entzündungsprozess maßgeblich beeinflusst (EISENBARTH et al., 2002). In einem Mausmodell für allergische Sensibilisierung führte eine Inhalation von Antigen in Kombination mit geringen Mengen an LPS zu einer Th2-Immunantwort, wie sie typischerweise in der Induktionsphase der atopischen Dermatitis zu sehen ist. Eine Inhalation von hohen Dosen von LPS zusammen mit Antigen hingegen führte zu einer Th1-Antwort. Es wurde somit gezeigt, dass das Ausmaß der Exposition gegenüber mikrobiellen Komponenten, wie LPS, den Typ der hervorgerufenen Entzündung bestimmen kann (EISENBARTH et al., 2002). Zusammen betrachtet lassen diese Erkenntnisse die Annahme zu, dass eine Exposition im frühen Leben gegenüber mikrobiellen Produkten oder anderen unspezifischen Immunstimulatoren das Risiko eine Allergie zu entwickeln invers beeinflusst (TSE und HORNER, 2008). Studien über den Zusammenhang von einem Zusammenleben mit Haustieren im frühen Kindesalter und der Entwicklung von allergischem Asthma oder allergischer Dermatitis ergaben widersprüchliche Ergebnisse (OWNBY et al., 2002; TAKKOUCHE et al., 2008; ALMQVIST et al., 2010; EPSTEIN et al., 2011; PELUCCHI et al., 2013).

Obwohl die Anzahl an tiermedizinischen Studien zur Rolle von Umweltfaktoren und Risikofaktoren in der Entwicklung der cAD begrenzt sind, gibt es einige



Parallelen zu den Erkenntnissen der humanen AD. Eine Studie untersuchte Unterschiede in dem Gehalt an Hausstaubmilbenantigenen, Endotoxinen und Zellwandbestandteilen von Pilzen ( $\beta$ -Glucanen) in Wohnraum, Schlafplatz und Fell von Labrador Retrievern mit und ohne cAD (LOORINGH VAN BEECK et al., 2011). Es konnte ein signifikanter inverser Zusammenhang zwischen niedrigem Endotoxingehalt im Fell des Tieres und dem Bestehen einer cAD gefunden werden. Im Hinblick auf den Gehalt von Hausstaubmilbenallergenen und Pilz-Glucanen wurde kein Unterschied festgestellt. Eine hohe Exposition gegenüber Endotoxinen im Fell eines Hundes kann möglicherweise einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer cAD ausüben (LOORINGH VAN BEECK et al., 2011).

Andere Studien untersuchten die Rolle geografischer und umweltbedingter Risikofaktoren für cAD bei Hunden aus der Schweiz, Deutschland, Schweden und Finnland.

Eine Unterbringung in einem Schuppen im Welpenalter, eine Adoption im Zeitraum der 8. - 12. Lebenswoche und regelmäßiges Waschen ergab bei Labrador und Golden Retrievern aus der Schweiz und Deutschland ein erhöhtes Risiko eine cAD zu entwickeln (MEURY et al., 2011). Leben in einer ländlichen Gegend, ein Haushalt mit weiteren Tieren und Spaziergänge durch den Wald hingegen, waren mit einem niedrigeren Risiko verbunden.

In einer Population von über 200.000 versicherten Hunden aus Schweden wurde ein städtischer Lebensraum und ein Geburtsdatum im Herbst als Risikofaktoren für eine cAD identifiziert (NODTVEDT et al., 2006a). Dieselbe Forschungsgruppe untersuchte ebenfalls umweltbedingte und ernährungsassoziierte Risikofaktoren in den prädisponierten Rassen WHWT, Boxer und Bullterrier in Schweden (NODTVEDT et al., 2007). Die Haupteckdaten der Studie lautet, dass die Fütterung einer nicht-kommerziellen Diät an laktierende Hündinnen einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von cAD bei den Welpen hat. Zwischen der Jahreszeit der Geburt, beziehungsweise dem Leben in der Stadt und dem Auftreten einer cAD konnte in dieser Studie kein Zusammenhang festgestellt werden (NODTVEDT et al., 2007).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie untersuchte Zusammenhänge zwischen Umweltfaktoren und von den Besitzern beobachteten, für eine AD typischen, Hautsymptomen bei Hunden in Finnland (ANTURANIEMI et al., 2017). Ein niedrigeres Risiko für das Auftreten von Hautsymptomen ergab sich für Hunde, die

in einem freistehenden Haus lebten, wenn weitere Hunde im Haushalt waren und wenn der Hund in dem aktuellen Haushalt geboren wurde. Diese Zusammenhänge wurden anschließend bei einem kleineren Teil der Population, nämlich Hunden mit einer tierärztlich diagnostizierten cAD, untersucht, wobei sich nur noch die beiden letzteren Faktoren als signifikant herausstellten (ANTURANIEMI et al., 2017).

Alle genannten Studien haben Zusammenhänge aufgewiesen, deren Kausalität nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann. Einige Faktoren können tatsächlich mit einem erhöhten oder erniedrigten Risiko einer cAD verbunden sein, wohingegen andere Faktoren möglicherweise lediglich Artefakte darstellen (BIZIKOVA et al., 2015a).

Mögliche Erklärungen für ein geringeres Risiko für cAD auf dem Land im Vergleich zur Stadt sind eine geringere Exposition gegenüber Abgasen, eine bessere Luftqualität, auch in geschlossenen Räumen, und mehr Kontakt zu Endotoxinen und anderen mikrobiellen Strukturen (MEURY et al., 2011; ANTURANIEMI et al., 2017). Andererseits kann dieses Ergebnis auch dadurch beeinflusst sein, dass Tierbesitzer in der Stadt möglicherweise häufiger einen Tierarzt aufsuchen oder dass es in Städten mehr Tierarztpraxen gibt und insbesondere spezialisierte Tierärzte einfacher zu finden sind (NODTVEDT et al., 2006a; MEURY et al., 2011; ANTURANIEMI et al., 2017). Dadurch kann es zu einer häufigeren Diagnosestellung von cAD in städtischen Regionen kommen.

Die Jahreszeit, in welcher ein Welpen geboren wird, könnte das Risiko einer cAD wie folgt beeinflussen: In genetisch prädisponierten Hunden konnte nachgewiesen werden, dass eine frühe Exposition gegenüber einem Allergen in einer stärkeren Immunantwort (im Sinne einer IgE Produktion) im späteren Leben, auch gegenüber anderen Allergenen, führt (SCHIESSL et al., 2003). Eine Vermeidung von Allergenkontakt im frühen Leben eines Hundes könnte somit einen präventiven Effekt auf IgE-mediierte Allergien haben. Welpen, die im Herbst geboren wurden, verbringen in ihren ersten sechs Monaten vermutlich mehr Zeit in Innenräumen und haben folglich mehr Kontakt zu Hausstaub oder Hausstaubmilben als Welpen, die im Frühjahr oder Sommer geboren werden (NODTVEDT et al., 2006a). Viele Komponenten von Hausstaubmilben können Entzündungsreaktionen in Zellen und Geweben auslösen, selbst wenn bisher keine Sensibilisierung stattgefunden hat (MACHADO et al., 1996; PUCHEU-HASTON et al., 2008). Das daraus resultierende entzündliche Milieu kann dazu beitragen in prädisponierten Hunden

eine Sensibilisierung hervorzurufen. Die Hauptallergene von Hausstaubmilben sind Proteasen, welche die epitheliale Permeabilität erhöhen können, beispielsweise durch Spaltung von interzellulären Verbindungsproteinen, der sogenannten „Tight Junctions“ (WAN et al., 1999). Durch die erhöhte Permeabilität wird die transepitheliale Passage von Hausstaubmilben- und vermutlich auch anderen Allergenen erleichtert, was zu einer Sensibilisierung und Verschlimmerung der Entzündungsprozesse führen kann (PUCHEU-HASTON et al., 2008). Außer ihrem Einfluss auf die epidermale Hautbarriere, können Hausstaubmilbenallergene ebenfalls eine Entzündungsreaktion durch IgE-unabhängige Aktivierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten, und damit einhergehender Produktion von IL-4, hervorrufen (MACHADO et al., 1996). Die entzündlichen Eigenschaften der Allergene von Hausstaubmilben können nicht nur die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung gegen sich selbst, sondern auch gegen zeitgleich vorhandene andere Allergene fördern (GOUGH et al., 2001). Somit kann eine gesteigerte Exposition gegenüber Hausstaubmilbenallergenen im frühen Alter von Welpen eine Sensibilisierung gegen multiple Allergene fördern und damit die Entwicklung einer cAD beeinflussen (BIZIKOVA et al., 2015a).

Regelmäßiges Waschen kann zum einen die Keimlast eines Tieres senken, es kann zum anderen aber auch die epidermale Lipidschicht beschädigen und dadurch zu einer verringerten Funktion der Hautbarriere führen (MEURY et al., 2011). Der Zusammenhang zwischen häufigem Baden und cAD kann allerdings auch darauf zurückzuführen sein, dass Bäder zu einem wichtigen Bestandteil der Therapie von allergischen Hunden gehören (MEURY et al., 2011).

Bezüglich der hausgemachten Diät von laktierenden Hündinnen im Zusammenhang mit der Entwicklung von cAD bei den Welpen äußern die Autoren die Theorie, dass eine selbstgemachte Fütterung einen höheren Gehalt an Mikroorganismen enthält als vergleichsweise sterile kommerzielle Futtermittel (NODTVEDT et al., 2007). Diese Assoziation würde, ebenso wie das Vorhandensein weiterer Hunde im Haushalt, durch eine erhöhte Exposition gegenüber Mikroorganismen und anderen Immunstimulatoren die Aussage der Hygiene-Hypothese befürworten (NODTVEDT et al., 2007; MEURY et al., 2011; ANTURANIEMI et al., 2017).

Interaktionen zwischen dem Immunsystem und Umweltfaktoren haben das Potential den zukünftigen Verlauf von Immunantworten auf verschiedenste Agenzien zu bestimmen (BIZIKOVA et al., 2015a). Das angeborene Immunsystem

und die Epidermis scheinen somit eine wichtige Rolle, sowohl während der Effektor-Phase der allergischen Entzündung, als auch während der Induktion und Sensibilisierung zu spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in genetisch prädisponierten Hunden der Kontakt zu bestimmten Umweltfaktoren die Entwicklung von aktuellen und zukünftigen Hypersensibilitäten beeinflussen kann. Die komplexe Interaktion zwischen Individuum und Umwelt ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig, was ein umfassendes Verständnis und mögliche Vorhersagen schwierig gestaltet (BIZIKOVA et al., 2015a).

#### **2.1.2.2. Rolle des Immunsystems**

Die Pathogenese der cAD beinhaltet eine Fehlfunktion des adaptiven Immunsystems, es spielen aber auch Zellen der angeborenen Immunabwehr, nichtzelluläre Komponenten und Keratinozyten eine wichtige Rolle in der Krankheitsentwicklung (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

##### **2.1.2.2.1. Antikörper**

Laut Nomenklatur handelt es sich bei der cAD um eine IgE-medierte Hautentzündung, wobei sich die Antikörperproduktion überwiegend gegen Umweltallergene richtet (HALLIWELL, 2006). Obwohl IgE in den meisten Fällen von cAD eine Rolle in der Pathogenese spielt, hat sich mit fortlaufender Forschung die Erkenntnis eingestellt, dass IgE-Antikörper nur einen einzelnen Baustein in der komplexen Krankheitsentstehung darstellen (MARSELLA et al., 2012).

Die Annahme, dass es sich bei der cAD um eine IgE-medierte Hypersensibilität handelt, entstand aufgrund von Beobachtungen die zeigten, dass eine spontane oder auch experimentelle Sensibilisierung mit einem Anstieg an antigenspezifischen IgE-Spiegeln einherging (SCHWARTZMAN et al., 1971; LIAN und HALLIWELL, 1998). Nach intradermaler Applikation des Antigens konnte eine typische Hautreaktion beobachtet werden. Obwohl eine Rolle für IgE in der Pathogenese von cAD wahrscheinlich war, blieb dennoch eine gewisse Unsicherheit darüber, ob das Vorhandensein von IgE eine Notwendigkeit in der Entwicklung der klinischen Krankheit darstellte (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). Zum einen konnte in selteneren Fällen bei Hunden mit dem klassischen Bild einer AD keine sichtbare Reaktivität auf Antigen in Haut oder Serum dargestellt werden, zum anderen zeigten auch augenscheinlich gesunde Hunde

allergenspezifische IgE-Spiegel und positive intradermale Hauttests nach Antigen-Applikation (LIAN und HALLIWELL, 1998; HALLIWELL und DEBOER, 2001). Außerdem war eine allergenspezifische IgE-Produktion bei Hunden induzierbar, ohne eine erkennbare Erkrankung zu verursachen (JACKSON et al., 1996). Bis jetzt bleibt die Rolle von IgE in der Pathogenese der cAD unklar (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). Bei atopischen Hunden konnte im Gegensatz zu gesunden Hunden eine IgE-Expression auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen (LC) der Epidermis nachgewiesen werden (OLIVRY et al., 1996). IgE kann somit eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Verarbeitung von Allergenen spielen. Des Weiteren wird IgE auf der Oberfläche von Mastzellen exprimiert, sodass durch Allergenkontakt eine Degranulation mit anschließender Entzündung hervorgerufen werden kann (HALLIWELL, 1973; BRAZIS et al., 1998). Im Gegensatz zum Menschen, sind hohe Serum-IgE-Spiegel wenig hinweisend auf den atopischen Status eines Hundes (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). Eine Korrelation zwischen Gesamt-IgE-Werten und dem Bestehen einer AD konnte in mehreren Studien nicht nachgewiesen werden (JACKSON et al., 2002; FRASER et al., 2003; LAUBER et al., 2012). Da allergenspezifisches IgE nur einen Teil der gesamten IgE-Konzentration ausmacht, liegt die Vermutung nahe, dass Serumspiegel von allergenspezifischem IgE stärker mit dem Auftreten von klinischen Anzeichen allergischer Dermatitis korrelieren als die gesamte IgE-Konzentration (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). Doch auch die allergenspezifischen IgE-Spiegel sind nicht immer mit einer klinischen Erkrankung vereinbar. So konnten einige Studien einen Zusammenhang von steigenden Werten nach Allergenkontakt und der Entwicklung klinischer Symptome darstellen (PUCHEU-HASTON et al., 2008; OLIVRY et al., 2011), wohingegen andere Studien fehlende Serum-IgE-Level trotz klinischer Symptomatik und umgekehrt auch fehlende klinische Anzeichen trotz erhöhter allergenspezifischer Serumwerte festgestellt haben (EGLI et al., 2002; ZEMANN et al., 2002). Das Verständnis der Beziehung zwischen IgE und klinischer cAD wird weiter verkompliziert durch widersprüchliche Ergebnisse von Studien, die die Antikörperlevel im Verlauf einer Allergen (-spezifischen) Immuntherapie (AIT) untersucht haben. Eine Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen erfolgreicher Immuntherapie und einem Abfall von Serum-IgE-Werten (KEPPEL et al., 2008b). Eine andere Studie zeigte einen Anstieg von Serum-IgE im Verlauf der Therapie und ein Absinken der Spiegel nach

Beendigung, wobei Tiere mit einem starken Anstieg von IgE ein schlechteres Ansprechen zeigten (FOSTER et al., 2002).

Die Hunde, die alle klinischen Kriterien einer cAD erfüllen aber keine allergenspezifische Hautreaktion oder erhöhte IgE-Spiegel (sowohl Gesamt-IgE, als auch allergenspezifisches IgE) aufweisen, werden der Gruppe der „Atopie-ähnlichen Dermatitis“ zugeordnet (HALLIWELL, 2006). Es ist unbekannt, ob es sich tatsächlich um eine IgE-unabhängige Variante der cAD handelt oder das passende Antigen lediglich nicht mitgetestet wurde (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). Eine weitere Limitation ist eine fehlende Standardisierung, sowohl im Hinblick auf angewendete Allergenlösungen, als auch bei den Messmethoden kommerzieller Labore (PUCHEU-HASTON et al., 2015c).

Die Rolle von IgG-Antikörpern in der Pathogenese der cAD ist bislang nicht geklärt, doch obwohl IgG als pathogener Faktor nicht sicher ausgeschlossen werden kann, bleibt IgE der bestimmende Antikörper-Isotyp in Verbindung mit AD beim Hund (PUCHEU-HASTON et al., 2015c).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle von IgE in der Pathogenese der cAD bislang nicht endgültig geklärt ist (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). In den meisten Fällen der klinischen cAD scheint IgE in die Krankheitsentstehung involviert zu sein, jedoch lassen sich nicht alle Aspekte der komplexen Erkrankung durch IgE-Einfluss erklären. Somit stellt IgE nur ein Puzzlestück unter vielen Faktoren dar, die die Entwicklung der cAD bestimmen (MARSELLA et al., 2012).

#### **2.1.2.2. Angeborenes Immunsystem und Keratinozyten**

Auch Antigen-unspezifische Entzündungszellen des angeborenen Immunsystems, Keratinozyten und damit verbundene nichtzelluläre Faktoren spielen eine Rolle in der Pathogenese der cAD. Durch Kommunikation und Interaktion dieser Zellen untereinander und mit Umweltantigenen während der Induktions- und Entzündungsphase wird der zukünftige Verlauf der Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen bestimmt (DE BENEDETTO et al., 2009; PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Hypersensibilität beim Menschen (BIEBER et al., 2011) und auch bei atopischen Hunden konnte eine erhöhte Anzahl sowohl an epidermalen, als auch an dermalen dendritischen Zellen im Vergleich zu gesunder Haut festgestellt werden (DAY,

1996; OLIVRY et al., 1996; OLIVRY et al., 1997). Epidermale Langerhans Zellen und auch dermale dendritische Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II), der die in der Zelle verarbeiteten Antigene den T-Lymphozyten präsentiert (DAY, 1996). Das Milieu, in welchem die dendritischen Zellen auf ein Antigen treffen, beeinflusst maßgeblich die zukünftige Immunantwort auf dieses Antigen (LLOYD et al., 2007; NOVAK et al., 2010). Begegnen sich Antigen und dendritische Zelle in einer minimal entzündlichen oder nicht entzündlichen Umgebung, so ist der alleinige Kontakt nicht ausreichend, um eine Aktivierung und Migration der DC auszulösen. Findet der Kontakt jedoch in Begleitung bestimmter mikrobieller Faktoren, wie beispielsweise Proteasen oder pathogenassoziiertes molekulare Muster, statt, folgt eine starke Aktivierung mit anschließender Migration in lymphatisches Gewebe, um dort das verarbeitete Antigen naiven T-Zellen zu präsentieren (LLOYD et al., 2007; NOVAK et al., 2010). Unterschiedliche mikrobielle Faktoren beeinflussen DCs auf unterschiedliche Weise. So führen Proteasen von Schimmelpilzen oder Hausstaubmilben zu einer Produktion von Zytokinen zugunsten einer Th2-Polarisierung oder einer Hemmung der Th1-Polarisierung, während DCs unter Einfluss mikrobieller Lipopolysaccharide die Entwicklung eines Th1-Phänotyps fördern (GHAEMMAGHAMI et al., 2002; WANG et al., 2007; LAMHAMEDICHERRADI et al., 2008). Auch die Exposition gegenüber lokalen Entzündungsmediatoren beeinflusst die Aktivierung der DCs und ihren Einfluss auf die Polarisation der Lymphozyten. Beim Menschen führt der Einfluss von TSLP (Thymic stromal lymphopoietin), das von Keratinozyten unter Einfluss mikrobieller Antigene und anderer entzündlicher Stimuli produziert wird, zu einer potenten Aktivierung von DCs und einer nachfolgenden gesteigerten Th2-Polarisierung (SOUMELIS et al., 2002; VU et al., 2010; ITO et al., 2012). Somit können DCs eine wichtige Verbindung zwischen einer defekten Hautbarriere und der Aktivierung des Immunsystems darstellen (DE BENEDETTO et al., 2012). Auch bei caninen Keratinozyten wurde eine Produktion von TSLP nach Stimulation durch Liganden für Toll-like-Rezeptor 3 und 4 nachgewiesen (KLUKOWSKA-ROTZLER et al., 2013). In einem Milieu, das durch TNF- $\alpha$  geprägt ist, exprimieren DCs IL-2, IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und CCL8, was ebenfalls zur Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen führt (WANG et al., 2007).

Dendritische Zellen beeinflussen den Verlauf einer allergischen Entzündung nicht nur durch Förderung einer bestimmten T-Zell-Polarisierung in der Induktionsphase, sondern können auch eine Rolle in der antigenspezifischen Effektorphase der AD spielen (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Dendritische Zellen und Langerhans Zellen exprimieren IgE auf ihrer Oberfläche in läsionaler und nicht-läsionaler Haut, beziehungsweise nur in läsionaler Haut (OLIVRY et al., 1996; RICKLIN et al., 2010). Außerdem wurde eine Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεRI auf der Oberfläche von Langerhans-Zellen in Hunden nachgewiesen, welcher eine effektivere Verdauung und Präsentation von Antigen ermöglicht (BONKOBARA et al., 2005). Somit können DCs und LCs eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem darstellen, obwohl es bisher keine Studien gibt, die zeigen, dass eine Vernetzung mit IgE eine Aktivierung der Zellen hervorruft (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Gemäß ihrer Funktion als Wächterzellen der Haut konnte eine Infiltration von DCs und LCs nach Allergenexposition von experimentell sensibilisierten Hunden nachgewiesen werden (MARSELLA et al., 2006c; MARSELLA et al., 2006a; OLIVRY et al., 2006; PUCHEU-HASTON et al., 2008).

Zusammenfassend wird die Reaktion caniner DCs auf Antigenkontakt während der Phase der Sensibilisierung maßgeblich durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise mikrobielle Faktoren oder von Keratinozyten oder anderen Immunzellen produzierten entzündlichen Zytokinen beeinflusst. Dieser Einfluss spiegelt sich folgend auch in der Reaktion der Lymphozyten während der allergenspezifischen Effektorphase wider. Epidermale sowie dermale dendritische Zellen werden in allergenexponierte Hautstellen rekrutiert (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Mastzellen von Hunden exprimieren ebenfalls den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI, auch in gesunden Tieren (HAMMERBERG et al., 2001; BRAZIS et al., 2002). Eine Vernetzung des Rezeptors führt zu einer Ausschüttung verschiedener vorhandener oder neu synthetisierter Mediatoren, wie beispielsweise Histamin, TNF-α, Prostaglandinen, Leukotrienen, Proteasen, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13 oder Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) (HAMMERBERG et al., 2001; BRAZIS et al., 2002; LIN und LONDON, 2006, 2010). Außerdem exprimieren dermale Mastzellen auch IgE auf ihrer Oberfläche, und eine Kreuzvernetzung zweier IgE-Antikörper führt zu einer Degranulation und



daraus folgend einer lokalen Typ-I-Hypersensibilität (HALLIWELL, 1973). Eine intradermale Injektion von Anti-IgE-Antikörpern induziert eine Degranulation von Mastzellen und führt zu einer direkten und verzögerten Reaktion der Haut, die makroskopisch und histologisch der Reaktion bei einer spontan auftretenden atopischen Dermatitis gleicht (OLIVRY et al., 1997; PUCHEU-HASTON et al., 2006). Mastzellen können auch auf einem IgE-unabhängigen Weg zu einer Degranulation stimuliert werden, wie beispielsweise ex vivo unter dem Einfluss von Stammzellularfaktor, der in der Haut atopischer Hunde vermehrt exprimiert wird, nachgewiesen wurde (HAMMERBERG et al., 2001). Auch Proteasen führen zu einer IgE-unabhängigen Freisetzung der Mastzellgranula. So führte die epidermale Applikation eines Milbenextrakts mit proteolytischen Eigenschaften selbst bei Allergen-naiven Hunden zu einer Mastzelldegranulation (PUCHEU-HASTON et al., 2008). Es ist bekannt, dass eine Degranulation von Mastzellen bei bestehender allergischer Dermatitis zu einer Aufrechterhaltung, beziehungsweise Verschlimmerung der Entzündungsvorgänge führen kann, jedoch ist bislang nicht geklärt, welche Rolle Mastzellen in der Entstehung der cAD spielen (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Eine Theorie besagt, dass Mastzellen von atopischen Patienten möglicherweise über die Eigenschaft einer überschießenden Freisetzung der Mediatoren verfügen (DEMORA et al., 1996; HAMMERBERG et al., 2001). Jedoch konnte diese Hypothese von anderen Studien nicht unterstützt werden (BRAZIS et al., 1998; MARSELLA und NICKLIN, 2001b; LIN und LONDON, 2010). Ein weiteres Thema mit widersprüchlichen Ergebnissen ist die relative Anzahl an Mastzellen in der Haut von Hunden. Einige Studien haben keinen Unterschied in der Menge von Mastzellen zwischen atopischer Haut und gesunder Haut festgestellt, während andere Studien entweder ein erhöhtes oder aber auch ein erniedrigtes Vorkommen bei atopischen Hunden berichten (WELLE et al., 1999; HAMMERBERG et al., 2001; ABRAMO et al., 2014). Generell ist die Anzahl an Mastzellen in normaler Haut sehr variabel, abhängig von der Lokalisation (AUXILIA und HILL, 2000; KURTDEDE et al., 2005). Die bei cAD häufig betroffenen Lokalisationen Ohren/Ohrmuschel und ventrale Zwischenzehenhaut hatten das höchste Vorkommen von Mastzellen. Andere Regionen mit relativ hoher Anzahl waren Perineum, Genitalien, Gesicht und Kopf (AUXILIA und HILL, 2000).

Studien über die Anzahl von Granulozyten, insbesondere neutrophiler und eosinophiler Granulozyten, ergaben sehr variable Ergebnisse (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Eine Allergen- oder Anti-IgE-Exposition, insbesondere nach Sensibilisierung, war mit einer rapiden Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Haut begleitet (OLIVRY et al., 1997; MARSELLA et al., 2006a; PUCHEU-HASTON et al., 2006; PUCHEU-HASTON et al., 2008). Außerdem zeigten atopische Hunde eine erhöhte Anzahl zirkulierender Eosinophiler im Blut, obwohl meist keine wahre Eosinophilie vorlag (HAYASHIYA et al., 2002).

Keratinozyten stellen nicht nur Bausteine der Epidermis dar und sind damit wichtig für die Hautbarriere, sie spielen außerdem eine essentielle Rolle in der Regulation des Immunsystems der Haut und allergischen Reaktionen (GRONE, 2002; NISHIFUJI und YOON, 2013). Bei der Maus und beim Menschen wurde nachgewiesen, dass Keratinozyten multiple Zytokine produzieren und außerdem verschiedene Zytokin-Rezeptoren exprimieren (GRONE, 2002). Über die Keratinozyten des Hundes und ihre Rolle in der Entwicklung einer allergischen Entzündung ist weniger bekannt, es konnte allerdings auch eine Produktion von Mediatoren, wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , TSLP und TARC (Thymus and activation regulated chemokine) nachgewiesen werden (MAEDA et al., 2002; OLIVRY et al., 2003; KLUKOWSKA-ROTZLER et al., 2013). TARC sorgt für eine Rekrutierung von T-Zellen, die einen C-C-Chemokinrezeptor Typ 4 tragen und wird in der Haut nach Allergenkontakt oder Injektion von Anti-IgE überexprimiert (MAEDA et al., 2002; MAEDA et al., 2005; MARSELLA et al., 2006a; PUCHEU-HASTON et al., 2006). Von TSLP wird angenommen, dass es einen Th2-fördernden Phänotyp kutaner dendritischer Zellen induziert (KLUKOWSKA-ROTZLER et al., 2013). Eine gesteigerte Expression wurde während einer Exposition gegenüber Milbenallergenen oder Liganden für TLR3 und TLR4 beobachtet (KLUKOWSKA-ROTZLER et al., 2013). Diese Beobachtung stellt eine mögliche Erklärung dafür dar, wie eine mikrobielle Sekundärinfektion eine allergische Entzündung verschlimmern kann (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). In der Zellkultur von caninen Keratinozyten konnte außerdem eine Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-12p35, IL-18, GM-CSF, IL-8, TARC, CCL27 und CCL28, welches in die Rekrutierung von Th2-Zellen involviert ist, nachgewiesen werden (MAEDA et al., 2009; SHIBATA et al., 2010; MAEDA et

al., 2013). Eine Kultivierung zusammen mit proteolytischem Milbenallergen „Der f 1“ führte zu einer gesteigerten Expression von GM-CSF, IL-8 und TNF- $\alpha$  (MAEDA et al., 2009).

Somit können Keratinozyten durch die Produktion von Entzündungsmediatoren einen Einfluss auf die Phase der Sensibilisierung haben und zusätzlich eine Verschlimmerung der laufenden allergischen Entzündung hervorrufen. Durch ihren Einfluss auf andere Immunzellen stellen Keratinozyten mögliche Regulatoren der Immunantwort der Haut auf Umweltallergene dar (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Abschließend lässt sich sagen, dass Zellen und nichtzelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems gemeinsam mit der Epidermis eine wichtige Rolle in der Entstehung einer allergischen Sensibilisierung spielen. Durch ihre Interaktion mit Umweltallergenen und folgender Produktion von Entzündungsmediatoren können insbesondere Mastzellen und Keratinozyten den Weg für die Entstehung einer cAD bereiten (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

#### **2.1.2.2.3. Adaptives Immunsystem**

Die Entwicklung einer cAD im Sinne einer kutanen Hypersensibilität involviert die Aktivierung und Differenzierung von allergenspezifischen Lymphozyten (PUCHEU-HASTON et al., 2015b). Bestimmte Zytokine fördern die Entwicklung einer Th2-dominierten Immunantwort, welche die Produktion von IgE-Antikörpern stimuliert und weitere Entzündungszellen rekrutiert. Die Immunantwort scheint vor allem Th2-polarisiert zu sein aber jüngere Studien zeigen, dass während des Krankheitsverlaufs unterschiedliche Lymphozyten-Phänotypen dominierend auftreten (PUCHEU-HASTON et al., 2015b).

Lymphozyten können in geringen Mengen auch in gesunder Haut gefunden werden, ihre Anzahl ist in läsionaler und nicht-läsionaler atopischer Epidermis und läsionaler Dermis jedoch erhöht (SINKE et al., 1997). Typischerweise treten CD8+ Lymphozyten vermehrt in der Epidermis auf, während CD4+ Lymphozyten in der Dermis dominieren (SINKE et al., 1997).

Genau wie andere Entzündungszellen auch, werden Lymphozyten im Falle einer Entzündung in die betroffene Region rekrutiert. Eine epikutane Exposition gegenüber Allergen in sensibilisierten Hunden geht mit einem Einstrom von Lymphozyten in das Entzündungsgebiet einher (MARSELLA et al., 2006c;

MARSELLA et al., 2006a; OLIVRY et al., 2006; PUCHEU-HASTON et al., 2008). Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass es sich bei Lymphozyten um aktive Spieler in der Entwicklung einer allergischen Immunreaktion handelt (PUCHEU-HASTON et al., 2008). Eine antigenunabhängige Degranulation von Mastzellen wurde ebenfalls als stimulierender Faktor für eine T-Zell-Rekrutierung nachgewiesen (OLIVRY et al., 1997). Die Rekrutierung von T-Lymphozyten ist möglicherweise durch den von ihnen exprimierten Chemokin-Rezeptor CCR4 vermittelt (MAEDA et al., 2005). CCR4 ist der Rezeptor für TARC, welches von Keratinozyten in läsionaler atopischer Haut überexprimiert wird (MAEDA et al., 2005). Die Anzahl an zirkulierenden T-Lymphozyten, die CCR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, war bei einem Vergleich zwischen allergischen Hunden und gesunden Hunden in ersterer Gruppe deutlich höher (MAEDA et al., 2004).

Während einer allergischen Dermatitis werden sowohl CD4+ als auch CD8+ Lymphozyten rekrutiert, obwohl die dermalen CD4+ T-Lymphozyten überwiegen (OLIVRY et al., 1997; SINKE et al., 1997). Die Entzündungsreaktion weist eine biphasische Polarisierung von CD4+ T-Zellen auf (NUTTALL et al., 2002; MARSELLA et al., 2012). In der akuten Phase der Entzündung liegt typischerweise eine Th2-dominierte Immunantwort vor, welche durch eine Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 durch die Lymphozyten geprägt ist (OLIVRY et al., 1999; MARSELLA et al., 2006c). Diese Mediatoren rekrutieren weitere Entzündungszellen an den Ort des Geschehens und sorgen außerdem für eine Aktivierung von B-Lymphozyten, die dazu angeregt werden IgE zu produzieren (MAJEWSKA et al., 2016). In läsionaler atopischer Haut, und somit in einer chronischen allergischen Entzündung, liegt eine gemischte Th1- und Th2-Antwort vor, bei der sowohl Th1-Zytokine wie IL-2, IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als auch Th2-Zytokine wie IL-4 exprimiert werden (NUTTALL et al., 2002; SCHLOTTER et al., 2011).

Ein weiteres Zytokin, welches eine Rolle in der Pathogenese der cAD, insbesondere im Hinblick auf den damit einhergehenden Juckreiz zu spielen scheint, ist IL-31. Eine Verabreichung von IL-31 an Hunde führte innerhalb einer kurzen Zeit zu Juckreiz und in der Mehrheit der Studienpopulation mit cAD konnte IL-31, im Gegensatz zu den gesunden Kontrolltieren, im Serum nachgewiesen werden (GONZALES et al., 2013). Eine weitere Studie zeigte, dass Th2-polarisierte T-Zellen unter dem Einfluss von Allergenen und bakteriellen Endotoxinen, wie sie

beispielsweise im Rahmen einer häufig vorkommenden bakteriellen Sekundärinfektion auftreten können, IL-31 produzieren (MCCANDLESS et al., 2014). IL-31-Rezeptoren konnten nicht nur bei Monozyten und Keratinozyten, sondern auch in neuronalen Zellen der Spinalganglien nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass IL-31 einen direkten Effekt auf diese Zellen und damit auf die Reizleitung eines Juckreiz-Signals zum Rückenmark ausüben kann (MCCANDLESS et al., 2014). Eine aktuelle Studie untersuchte IL-31-Serumspiegel bei experimentell sensibilisierten Hunden (MARSELLA et al., 2018). Nach Allergenkontakt und der damit einhergehenden aufflammenden Entzündung konnte an Tag 28 eine signifikante positive Korrelation zwischen Serum-IL-31 und dem Schweregrad der Dermatitis beobachtet werden (MARSELLA et al., 2018). Für eine weitere Abklärung des Einflusses von IL-31 auf allergische Dermatitis und Juckreiz werden weitere Untersuchungen benötigt (MARSELLA et al., 2018).

Die Rolle von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten in der Pathogenese der cAD ist bis jetzt noch nicht geklärt, es wurden jedoch erhöhte Zahlen im Blut und in der Haut atopischer Hunde nachgewiesen (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014; MAJEWSKA et al., 2016). Außerdem waren CD8<sup>+</sup> Lymphozyten, genau wie CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in der Lage Zytokine wie IL-13, IL-22 und IFN $\gamma$  zu produzieren (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014).

Eine weitere Untergruppe der T-Zellen mit einer vermuteten, aber bisher ungeklärten Rolle in der Entwicklung einer cAD stellen die regulatorischen T-Zellen (Tregs) dar (PUCHEU-HASTON et al., 2015b; HAUCK et al., 2016). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Homöostase des Immunsystems, da sie durch ihre regulatorischen Fähigkeiten überschießende Immunantworten verhindern können (SAKAGUCHI et al., 2009; WING und SAKAGUCHI, 2010). Abweichungen im Vorkommen oder der Funktion dieser regulatorischen Zellen in der Pathogenese von allergischen Erkrankungen sind somit denkbar (HAUCK et al., 2016). Eine Klärung des Beitrags von Tregs in allergischen Erkrankungen wird dadurch erschwert, dass für sie kein allgemeingültiger Phänotyp definiert ist (PUCHEU-HASTON et al., 2015b). So wurden bereits unterschiedliche Kombinationen der Expression von CD4, CD25 und Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3) (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>) zur Charakterisierung von Tregs herangezogen (HAUCK et al., 2016). Eine Studie

zeigte, dass bei atopischen Hunden unter Allergen (-spezifischer) Immuntherapie der prozentuale Anteil an CD4+ FOXP3+ T-Zellen im peripheren Blut im Verlauf einer erfolgreichen Therapie angestiegen ist (KEPPEL et al., 2008a). In vitro wurde nachgewiesen, dass CD4+ CD25+ FOXP3+ Zellen aus dem peripheren Blut von Hunden in der Lage waren, die Proliferation von CD4+ T-Zellen zu unterdrücken (PINHEIRO et al., 2011). Während eine Studie bei dem Vergleich von gesunden und chronisch atopischen Hunden keinen Unterschied in der Verteilung von CD4+ CD25+ FOXP3+ T-Zellen zwischen läsionaler atopischer, nicht-läsionaler atopischer und gesunder Haut feststellen konnte (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014), haben andere Studien einen erhöhten prozentualen Anteil solcher Tregs im Blut atopischer Hunde festgestellt (BECCATI et al., 2016; HAUCK et al., 2016; MAJEWSKA et al., 2016). Die Menge regulatorischer T-Zellen korrelierte bei einer Untersuchung moderat, aber statistisch signifikant mit dem Schweregrad der Entzündung (HAUCK et al., 2016). Trotz der erhöhten Anzahl regulatorischer T-Zellen konnte in zwei der drei Studien kein protektiver Effekt nachgewiesen werden, was die Frage aufwirft, ob die regulatorische Funktion der Zellen bei Patienten mit cAD möglicherweise beeinträchtigt ist (HAUCK et al., 2016; MAJEWSKA et al., 2016).

Abschließend kann die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese der cAD vereinfacht so dargestellt werden: In genetisch prädisponierten Hunden können Allergene die Epidermis durchdringen und treten in Kontakt mit dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen. Nach Prozessierung des Allergens wandern die Antigen-präsentierenden Zellen in regionale Lymphknoten und induzieren in naiven T-Lymphozyten eine Th2-Polarisierung. Die übermäßige Produktion von Th2-Zytokinen führt zu einer gesteigerten allergenspezifischen IgE-Produktion durch B-Lymphozyten und außerdem zur Rekrutierung von Entzündungszellen wie eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Bindet IgE nun an kutane Mastzellen, so degranulieren diese und geben Entzündungsmediatoren ins Gewebe ab. Zusammen mit den Zytokinen, die von in die Haut migrierenden Lymphozyten produziert werden, führen diese Mediatoren zu einer allergischen Dermatitis. Durch Juckreiz und Selbsttraumatisierung kommt es häufig zu Sekundärinfektionen, was in der chronischen Phase der Entzündung zu der Entwicklung einer gemischten Th1- und Th2-Immunantwort führt (MARSELLA et al., 2012).

### 2.1.2.3. Hautbarriere

Die historische Auffassung der Pathogenese der atopischen Dermatitis, auch als „Inside-Outside“ Theorie bezeichnet, beruht darauf, dass eine angeborene Abweichung des Immunsystems zu einer abnormalen Immunantwort auf normalerweise harmlose Antigene führt (WOLF und WOLF, 2012). Eine neuere Theorie, die „Outside-Inside“ Theorie, behandelt eine defekte Hautbarriere bei atopischen Patienten als Grundpfeiler der Krankheitsentstehung (ELIAS et al., 2008). Demnach führt eine beeinträchtigte Funktion der Hautbarriere zu einer erleichterten Penetration von Allergenen durch die Epidermis, wodurch es einen vermehrten Kontakt zwischen Allergenen und epidermalen Immunzellen gibt, der dann zu einer überschießenden Stimulation der lokalen Immunantwort führt. Dieser exzessive Reiz löst wiederum die Freisetzung multipler Entzündungsmediatoren aus, die letztlich zu einer weiteren Verschlechterung der Hautbarriere führen (ELIAS et al., 2008; WOLF und WOLF, 2012). Es entsteht also ein Circulus vitiosus. Ob die Krankheit mit einem Barrieredefekt oder einer Immunaberration beginnt, ist abhängig vom jeweiligen Patienten.

Das Stratum corneum (SC), die äußerste Schicht der Epidermis, stellt eine physikalische Barriere zum Schutz der Haut dar. Der Aufbau ähnelt der einer Mauer, die aus Steinen besteht, welche durch Mörtel zusammengehalten werden. Im SC stellen die Korneozyten die Bausteine dar, die in eine Matrix aus Lipiden, den Mörtel, eingebettet sind (NISHIFUJI und YOON, 2013). Ein unbeschädigtes SC, insbesondere die Lipidkomponente, ist wichtig für die Aufrechterhaltung einer funktionierenden Hautbarriere (DE JAGER et al., 2006). Die Lipidschichten bestehen überwiegend aus freien Fettsäuren, Cholesterol und Ceramiden, wobei Letztere im menschlichen SC prozentual dominieren und eine entscheidende Rolle in der Funktion der Hautbarriere spielen (CHOI und MAIBACH, 2005; MASUKAWA et al., 2009). Die sogenannten interzellulären Lipidlamellen stellen eine von den Lipidbestandteilen gebildete, umfassende, kontinuierliche und hoch organisierte mehrschichtige Struktur dar (KWOCHKA, 1993; WERTZ, 2000). Bei Menschen mit AD konnte eine beeinträchtigte Funktion der epidermalen Hautbarriere durch Messung eines erhöhten transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) nachgewiesen werden (LINDE, 1992). Die mangelhafte Funktion war mit Abweichungen im epidermalen Lipidstoffwechsel und der zu geringen Freisetzung der Lipide aus den Lamellenkörpern des Stratum granulosums assoziiert, was in

einer reduzierten Menge an Ceramiden sowohl in läsionaler als auch nicht-läsionaler Haut resultierte (HARA et al., 2000; VAN SMEDEN und BOUWSTRA, 2016). Außerdem wurde bei Patienten mit AD eine geringere Anzahl an Lipidlamellen, die weiterhin ein abweichendes Aussehen aufwiesen, im Vergleich mit gesunder Haut gefunden (VAN SMEDEN und BOUWSTRA, 2016).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Studien zum Einfluss einer defekten Hautbarriere beim Hund in der Pathogenese der cAD nachgewiesen (SANTORO et al., 2015). Eine entscheidende Bedeutung der Hautbarriere für die Entwicklung einer cAD wurde weiterhin durch die Erkenntnis demonstriert, dass von allen drei Arten der Allergenexposition (oral, inhalativ und perkutan) die perkutane Route die wichtigste Rolle zu spielen scheint (MARSELLA et al., 2006b). Eine defekte Hautbarriere kann somit zu einer erhöhten Durchlässigkeit für Antigene sorgen und damit zur allergischen Sensibilisierung beitragen (SANTORO et al., 2015). Eine der frühesten Studien, die strukturelle Unterschiede in der Epidermis von Hunden mit atopischer Dermatitis und von gesunden Hunden untersucht haben, stellte eine stark unregelmäßige Ablagerung der epidermalen Lipidlamellen bei atopischen Hunden fest (INMAN et al., 2001). Zusätzlich zu einer diskontinuierlichen Ablagerung zeigten die Lamellen in nicht-läsionaler atopischer Haut häufig eine abnormale Struktur, die sich insbesondere in einer reduzierten Dicke der interzellulären Lipidansammlungen manifestierte (INMAN et al., 2001). Diese Ergebnisse wurden später bestätigt und es wurde postuliert, dass die lokale Anwendung eines Hautlipidkomplexes zu einer Verbesserung der Hautbarriere führen kann (PIEKUTOWSKA et al., 2008). Eine folgende Studie untersuchte die Haut gesunder und atopischer Beagles vor und nach Allergenkonfrontation (MARSELLA et al., 2010). Während das Stratum corneum bei gesunden Hunden kompakte und gut organisierte Lipidlamellen aufwies, zeigten sich bei atopischen Hunden, auch schon vor Allergenkonfrontation, deutliche Unterschiede in der Organisation der Lamellen mit großen interzellulären Räumen, die mit abnormalem Lipidmaterial gefüllt waren. Die Struktur verschlechterte sich nach Konfrontation mit Hausstaubmilbenallergenen bei atopischen Hunden weiter, während keine deutliche Veränderung bei gesunden Hunden festgestellt werden konnte (MARSELLA et al., 2010). Genau wie beim Menschen wurde bei Hunden mit cAD ein erniedrigter Gehalt an Ceramiden im SC nachgewiesen (REITER et al., 2009; YOON et al., 2011; POPA et al., 2012; CHERMPRAPAI et al., 2018). Abgesehen



von einem niedrigeren Gesamtgehalt an Ceramiden wurden in zwei Studien drei Ceramid-Unterklassen in reduzierten Mengen in nicht-läsionaler und läsionaler atopischer Haut gefunden (REITER et al., 2009; YOON et al., 2011). Es handelt sich hierbei um Ceramid 1 (CER[EOS]), Ceramid 3 (CER[NP]) und Ceramid 9 (CER[EOP]). Des Weiteren war die Menge an Cholesterol und das Verhältnis von Cholesterol zu Ceramiden bei atopischen Hunden deutlich erhöht (REITER et al., 2009). Die erhöhte Cholesterol-Produktion kann als Versuch des Körpers, die Barrierefunktion wieder herzustellen, interpretiert werden, da eine gesteigerte Synthese als Reaktion auf einen erhöhten TEWL oder Störungen der Barrierefunktion nachgewiesen wurden (FEINGOLD et al., 1986). Eine aktuelle Studie, die die Lipidzusammensetzung und Lipidorganisation im SC von atopischen und gesunden Hunden untersuchte, stellte eine niedrigere Anzahl an freien Fettsäuren und ein reduziertes Verhältnis von C44- zu C34-Ceramiden in läsionaler Haut fest (CHERMPRAPAI et al., 2018). „C44“ und „C34“ beschreibt die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen des Sphingosin-Anteils und der nicht-hydroxylierten Acyl-Ketten der Ceramide. Unterschiede in der prozentualen Verteilung von Cholesterol und Ceramiden, auch im Hinblick auf Ceramid-Unterklassen, wurden nicht nachgewiesen. Die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung hatten Auswirkungen auf die strukturelle Organisation der Lipide. Im SC der atopischen Hunde wurde ein reduzierter Anteil an Lipiden, die eine orthorhombische Anordnung aufwiesen, festgestellt. Die orthorhombische Anordnung der Lipide in den Lamellen stellt eine sehr dichte Verpackung im Vergleich zu der weniger dichten hexagonalen Anordnung dar, die vermehrt in atopischer Haut gefunden wurde. Vermutlich begünstigen der reduzierte Anteil an freien Fettsäuren und die Reduktion der Kettenlänge der Ceramide eine hexagonale Anordnung der Lipide, die wiederum zu einer zerrütteten Konformation der Lamellen und einer verschlechterten Funktion der Hautbarriere führt. Außerdem konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass die Menge an C34-Ceramiden mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (CHERMPRAPAI et al., 2018).

Die beobachteten Veränderungen der Lipidkomponente können den erhöhten TEWL erklären, der bei atopischen Hunden festgestellt wurde und der proportional mit dem Schweregrad der Beschädigung des SC steigt (SHIMADA et al., 2008; SHIMADA et al., 2009; HIGHTOWER et al., 2010).

Neben den fettigen Anteilen des SC spielen auch Proteine eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Hautbarriere (MARSELLA et al., 2011; THYSSEN und KEZIC, 2014). Filaggrin und seine Metaboliten zählen zu den meist erforschten Proteinen, da sie essentiell für die Funktion der Hautbarriere, die Hydratation und die Homöostase des SC sind (MARSELLA et al., 2011; NISHIFUJI und YOON, 2013). Filaggrin entsteht aus der Spaltung des Vorläuferproteins Profilaggrin, und wird folgend durch proteolytische Spaltung in freie Aminosäuren und kleine Peptide, auch „Natural Moisturizing Factors“ genannt, metabolisiert (THYSSEN und KEZIC, 2014). Beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen des Filaggrin-Gens zu den wichtigsten Risikofaktoren für eine AD gehören (OSAWA et al., 2011). In einer Studie zu möglichen Mutationen des Filaggrin-Gens bei WHWT mit cAD konnte, im Gegensatz zum Menschen, keine erhebliche ursächliche Rolle festgestellt werden (BARROS ROQUE et al., 2009). Mutationen mit Funktionsverlust des Filaggrin-Gens spielen möglicherweise eine Rolle bei bestimmten Rassen bestimmter geografischen Lokalisationen, ein allgemeiner Einfluss ließ sich allerdings nicht bestätigen (CHERVET et al., 2010; WOOD et al., 2010). Abweichungen im Filaggrin-Metabolismus und der Filaggrin-Expression konnten allerdings bei Hunden mit cAD nachgewiesen werden, was dem Protein eine potentielle Rolle in der Pathogenese der cAD einräumt (CHERVET et al., 2010; SANTORO et al., 2013; MARSELLA et al., 2016; FANTON et al., 2017). Eine gesteigerte mRNA-Expression von Filaggrin bei atopischen Hunden wurde in zwei Studien gefunden, wobei in einer der Studien nach Allergenkonfrontation trotz signifikanten Anstiegs der mRNA-Expression kein äquivalenter Anstieg der Proteinexpression festgestellt werden konnte (THEERAWATANASIRIKUL et al., 2012; SANTORO et al., 2013). Das spricht möglicherweise für einen gesteigerten Abbau von Filaggrin, auf den die Haut mit einer gesteigerten mRNA-Expression reagiert. Eine erniedrigte Filaggrin-Expression konnte auch in einer anderen Untersuchung festgestellt werden (CHERVET et al., 2010). Im Vergleich zur gesunden Haut, wo eine homogene Verteilung von Filaggrin im Stratum granulosum und Stratum corneum vorlag, wurde anhand von Immunfluoreszenz bei atopischen Hunden eine fleckige Anordnung nachgewiesen (SANTORO et al., 2013). Die Expression von Calpain-1, Caspase-14 und Matriptase, drei Enzymen, die in den Filaggrin-Metabolismus involviert sind, war in einer Studie eines Hundemodells der AD in nicht-läsionaler atopischer Haut höher als bei gesunden Kontrolltieren (FANTON et al., 2017). Die

Resultate lassen auf einen abnormalen Filaggrin-Katabolismus schließen. In einer anderen Untersuchung wurden widersprüchliche Ergebnisse festgestellt, dort wurde eine reduzierte Expression von Caspase-14 nachgewiesen (MARSELLA et al., 2016). Abweichungen des Filaggrin-Stoffwechsels tragen somit möglicherweise zur Entwicklung einer defekten Hautbarriere bei atopischen Hunden bei, die dann wiederum durch verstärkte Allergenpenetration zu einer verstärkten Entzündung führt.

Es ist bisher unbekannt, ob die nachweisbaren Abweichungen der Hautbarriere in cAD primär oder sekundär als Folge der Entzündungsreaktionen auftreten (OLIVRY, 2011; STAHL et al., 2012; SANTORO et al., 2015). Die Erkenntnisse, dass eine veränderte Hautbarriere auch in nicht-läsionaler Haut nachgewiesen wurde, befürwortet einen der cAD zugrunde liegenden primären Defekt (REITER et al., 2009). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass in klinisch nicht-läsionaler Haut dennoch eine geringgradige Entzündung vorliegen kann (SANTORO et al., 2015).

#### **2.1.2.4. Zusätzliche Faktoren**

##### **2.1.2.4.1. Futterantigene**

Beim Menschen, insbesondere bei Kindern, ist eine atopische Dermatitis häufig mit einer Lebensmittelallergie assoziiert (HERATIZADEH et al., 2011). Auch bei Hunden besteht Grund zur Annahme, dass Patienten mit einer klassischen AD, hervorgerufen durch Umweltantigene, auch zu einer Dermatitis neigen, die durch Futtermittelantigene hervorgerufen wird (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). In einer Studie hatten 7 % der atopischen Hunde eine begleitende Futtermittel-unverträglichkeit („adverse food reaction“, AFR) (ZUR et al., 2002b), wohingegen andere Studien ergaben, dass von den untersuchten Hunden mit klinischen Anzeichen einer AD die Prävalenz von AFR zwischen 7,6 und 25 % lag (CHESNEY, 2002; PICCO et al., 2008; PROVERBIO et al., 2010). AFR können sich als atopische Dermatitis manifestieren, und Futterbestandteile können in sensibilisierten Hunden ein Aufflammen einer AD auslösen (OLIVRY et al., 2007). Der Zustand, wenn Futtermittelantigene eine klinische AD auslösen, wird Futtermittel-induzierte atopische Dermatitis, oder cAD sensu lato (im Gegensatz zur nicht-Futtermittel-responsiven cAD sensu stricto) genannt (PICCO et al., 2008). Die Exposition gegenüber eines Futtermittels auf das ein Hund sensibilisiert wurde, führt zu einem klinischen Syndrom, das sich nicht von der konventionellen cAD

unterscheiden lässt (HILLIER und GRIFFIN, 2001b; NODTVEDT et al., 2006b; OLIVRY et al., 2007; PICCO et al., 2008). Neben den klassischen Anzeichen einer cAD, wie beispielsweise Juckreiz, Erythem an distalen Gliedmaßen, Gesicht, Bauch und Pinnae, junges Alter bei Krankheitsbeginn und Sekundärläsionen durch Selbsttraumatisierung, können auch zusätzliche Symptome auftreten. Zu diesen zählen unter anderem ein schlechtes Ansprechen auf Glukokortikoide, perianaler Juckreiz, Seborrhoe oder chronische gastrointestinale Probleme (NODTVEDT et al., 2006b; VERLINDEN et al., 2006; PICCO et al., 2008). Bei der Futtermittel-induzierten AD sind zwei Altersverteilungen zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns überrepräsentiert: Sehr junge Hunde (unter einem Jahr) und mittelalte bis ältere Hunde (sechs Jahre und älter) (CHESNEY, 2002; PICCO et al., 2008; PROVERBIO et al., 2010). Zu den am häufigsten involvierten Futtermittel-antigenen zählen Rind, Milchprodukte, Huhn und Weizen (ROUDEBUSH, 2013). Futter-spezifische Serum-IgE-Antikörper wurden in vielen Studien nachgewiesen, eine verlässliche Korrelation zwischen Serum-IgE-Konzentrationen und einer klinischen Exposition gegenüber der Allergene scheint jedoch nicht vorzuliegen (MUELLER und OLIVRY, 2017; MUELLER und UNTERER, 2018). Im Hinblick auf Histologie und kutane Genexpression lassen sich viele Ähnlichkeiten zwischen AFR und cAD feststellen, jedoch gibt es auch einige Abweichungen (OLIVRY et al., 1997; NUTTALL et al., 2002; SCHLOTTER et al., 2011; VEENHOF et al., 2011; PUCHEU-HASTON et al., 2015c). Beispielsweise liegt im Falle einer AFR in der Haut eine Prädominanz von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten vor, die unter Eliminationsdiät nicht verschwindet, selbst wenn sich eine Verbesserung der kutanen Symptome einstellt (VEENHOF et al., 2011). Ebenso wurden Unterschiede in der Expression von STAT4 (Signal transducer and activator of transcription 4), IL-10, TNF- $\alpha$  und TARC festgestellt. Die Expression war in cAD erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen, wohingegen kein Unterschied zwischen gesunder und läsionaler Haut bei AFR vorlag (NUTTALL et al., 2002; SCHLOTTER et al., 2011; VEENHOF et al., 2011).

Die Erkenntnisse zeigen eine nahe Verwandtschaft zwischen der klassischen cAD und AFR beim Hund auf. Beide Syndrome können im selben Patienten auftreten, sie sind aber nicht dieselbe Entität und sollten daher differenziert werden (PUCHEU-HASTON et al., 2015c). Zur Abgrenzung einer Futtermittel-induzierten AD sollte bei Hunden mit klinischem Verdacht auf eine atopische Dermatitis eine

Eliminationsdiät mit anschließender Provokation durchgeführt werden (MUELLER und UNTERER, 2018).

Manche der klassischen Umweltantigene können nicht nur perkutan eine klinische AD hervorrufen, sondern auch dann, wenn sie peroral aufgenommen und verdaut werden. Man bezeichnet dies als orales Allergiesyndrom (MARSELLA et al., 2006b; MARSELLA und SARIDOMICHELAKIS, 2010; PUCHEU-HASTON et al., 2015c).

#### **2.1.2.4.2. Lipide und Lipid-Metabolismus**

Frühe Untersuchungen zu möglichen Unterschieden in Lipidkomposition und -metabolismus bei Hunden mit AD im Vergleich zu gesunden Hunden ergaben widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Plasmaspiegel an Linolsäure, Dihomogammalinolensäure und Arachidonsäure (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Die Interpretation der Ergebnisse ist schwierig, da Serum- und Hautfette maßgeblich durch die Aufnahme von Fettsäuren aus der Futterquelle beeinflusst werden (CAMPBELL und DORN, 1992). Eine Studie untersuchte die Serum-Fettsäurespiegel bei Hunden und fand heraus, dass der Gehalt an Linolsäure bei atopischen Tieren erniedrigt war (SAEVIK et al., 2002). Da die Hunde allerdings unterschiedliche Fütterung mit unterschiedlichem Gehalt an Fettsäuren erhielten, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Unterschiede von einer gestörten Absorption, einer geringeren Aufnahme oder einem veränderten Fettsäuremetabolismus herrühren. Während in der genannten Studie keine reduzierte Desaturase-Aktivität festgestellt wurde, fand eine andere Studie heraus, dass in läsionaler atopischer Haut im Vergleich zu nicht-läsionaler und gesunder Haut die Genexpression der Delta-5-Desaturase deutlich erniedrigt war (SCHLOTTER et al., 2009). Außerdem war die Expression der Delta-6-Desaturase in läsionaler Haut niedriger als in nicht-läsionaler Haut. Läsionale Haut wies zudem einen höheren Gehalt an Arachidonsäure, Dihomogammalinolensäure und Eicosapentaensäure auf (SCHLOTTER et al., 2009). Eine Untersuchung der Lipidzusammensetzung des subkutanen Fettes von Hunden mit und ohne Juckreiz ergab niedrigere Konzentrationen der langen, mehrfach ungesättigten Adrensäure bei Tieren mit Juckreiz als in gesunden Hunden (TAUGBOL et al., 1998). Die Analyse der Plasmafette zeigte ein häufigeres Vorkommen von Dihomogammalinolensäure im Blut von Hunden mit Juckreiz (TAUGBOL et al., 1998). Eine weitere Studie untersuchte den Gesamtfettgehalt von Hautbiopsien atopischer

und gesunder Hunden (ABRAMO et al., 2014). Der Gesamtlipidgehalt war in atopischer Haut signifikant erniedrigt, wohingegen mehrere Fettsäurederivate mit entzündungshemmenden Effekten, unter anderem Palmitoylethanolamid, vermehrt nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse veranlassten die Autoren zu der Vermutung, dass der erhöhte Gehalt der kutanen Fettsäuren eine Reaktion auf die Entzündung, beziehungsweise einen Versuch des Körpers darstellt, die Entzündung in der Haut zu lindern (ABRAMO et al., 2014). Die Hautproben der genannten Studie stammten von unterschiedlichen Regionen des Körpers, daher ist es möglich, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen auf den unterschiedlichen Lokalisationen anstatt auf dem Krankheitsstatus beruhen.

Eine verlässliche Aussage über die Rolle unterschiedlicher Lipidkonzentrationen oder -zusammensetzungen bei gesunden und atopischen Hunden ist bislang nicht möglich. Die fehlende Standardisierung der Futterquellen in vielen Studien erschwert die Interpretation der Ergebnisse (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Sphingosin-1-phosphat (S1P) spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase der Haut. Zum einen ist es in die Aufrechterhaltung der epidermalen Hautbarriere involviert (BOLLAG, 2003), zum anderen reguliert es den Ein- und Ausstrom von Entzündungszellen in verschiedenen Geweben (ROVIEZZO et al., 2011; HALOVA et al., 2012; RAHMAN et al., 2014). Bei Hunden mit atopischer Dermatitis konnten reduzierte Konzentrationen von S1P in läsionaler Haut und Serum gefunden werden (BAUMER et al., 2011). Es wird vermutet, dass S1P Entzündungszellen in der Haut zurückhalten kann (RIVERA et al., 2008; ZHI et al., 2011; MUDD et al., 2013). Das wäre insofern relevant, als dass eine erniedrigte Konzentration oder eine funktionale Schwäche von S1P zu einem erhöhten Transport von aktivierten, Antigen-beladenen dendritischen Zellen in die regionalen Lymphknoten führen kann. Damit wird die Entwicklung einer Sensibilisierung möglicherweise erleichtert (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Leukotriene können ebenfalls in der Pathogenese der cAD involviert sein. Im Vergleich zu gesunden Hunden wurde in der Haut von Atopikern eine signifikant höhere mRNA-Expression von 5-Lipoxygenase und 5-Lipoxygenase-aktivierendem Protein nachgewiesen. Das Enzym ist wichtig für die Synthese von Leukotrienen, die als Entzündungsmediatoren dienen (SCHLOTTER et al., 2010). Atopische Haut hatte außerdem ein höheres Vorkommen von Leukotrien-A4-Hydrolase, einem Enzym, das Leukotrien A4 in Leukotrien B4, einen

chemotaktischen Faktor für neutrophile und eosinophile Granulozyten, umwandelt (KIRSCH et al., 1988; MARSELLA, 2001; SCHLOTTER et al., 2010). Eine Studie, die die Konzentrationen von Sulfido-Leukotrienen in läsionaler, nicht-läsionaler und gesunder Haut von Hunden untersuchte, konnte keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen oder eine Korrelation mit klinischen Anzeichen feststellen (MARSELLA und NICKLIN, 2001a).

Zum aktuellen Zeitpunkt liegen zu wenige Erkenntnisse vor, um einen klaren Schluss über die Rolle der Leukotriene bei cAD zu ziehen (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

#### **2.1.2.4.3. Sekundärinfektionen**

Hunde mit atopischer Dermatitis leiden häufig an sekundären Hautinfektionen, insbesondere mit *Staphylococcus pseudintermedius* und *Malassezia pachydermatis* (SANTORO et al., 2015). Der Zusammenhang zwischen Hautinfektionen und einer Verschlechterung der klinischen Symptome einer cAD ist komplex und nicht vollständig bekannt. Es liegen jedoch einige Erkenntnisse vor, die einen Einfluss der Mikroorganismen auf das Trägertier und sein Immunsystem vermuten lassen. Bei allergischen Hunden wurde eine signifikant höhere Kolonisation der Haut mit Staphylokokken nachgewiesen (MASON und LLOYD, 1989). Möglicherweise besteht dabei ein Zusammenhang mit der deutlich höheren Anhaftung von *S. pseudintermedius* an Keratinozyten von atopischen im Vergleich zu gesunden Hunden, die in weiteren Studien festgestellt wurde (MCEWAN, 2000; SIMOU et al., 2005). Die Kolonisation von *S. pseudintermedius* bei atopischen Hunden in klinischer Remission unter Kortisontherapie unterschied sich in einer anderen Studie jedoch nicht von derjenigen gesunder Hunde (G. HARVEY und C. NOBLE, 2008). Eine vergleichende Untersuchung des Mikrobioms atopischer und gesunder Hunde ergab, trotz hoher individueller Unterschiede, dass atopische Haut eine niedrigere Speziesvielfalt als gesunde Haut aufwies, welche eine große Diversität mikrobieller Spezies zeigte (RODRIGUES HOFFMANN et al., 2014). Es wurde nachgewiesen, dass Staphylokokken-Proteine eine beeinträchtigte Hautbarriere durchdringen können und dann zu einer Aktivierung des Immunsystems führen (LLOYD et al., 2007). Die Degranulation von Mastzellen führt zu einer verstärkten perkutanen Absorption bakterieller Antigene, die dann wiederum eine Immunantwort auslösen. So kommt es zu einer Verschlimmerung des Zustandes (MASON und LLOYD, 1989). Bakterielle Bestandteile, die als Antigene fungieren

können, werden von Toll-like-Rezeptoren erkannt, was im Falle von caninen Keratinozyten zu einer gesteigerten Produktion von TSLP führt (KLUKOWSKA-ROTZLER et al., 2013). TSLP wiederum führt zu einer Aktivierung von DC und zu einer verstärkten Th2-Polarisierung. Eine humorale Immunantwort in Form einer IgE-Produktion bei Hunden mit Staphylokokken-Pyodermie konnte zwar nachgewiesen werden (MORALES et al., 1994), die Rolle der Antikörperbildung in der Pathogenese der cAD ist allerdings unklar (SANTORO et al., 2015). Ebenfalls ungeklärt ist die Rolle von Staphylokokken-Exotoxinen, die möglicherweise als Superantigene fungieren, und so zu einer unselektiven Aktivierung einer großen Anzahl an T-Lymphozyten führen können (SANTORO et al., 2015).

Eine Kolonisation der Haut atopischer Hunde mit *Malassezia pachydermatis* kann sehr häufig nachgewiesen werden, sie ist allerdings nicht zwingend mit klinischen Anzeichen assoziiert (NARDONI et al., 2007). Bei dem Vergleich der Häufigkeit des Vorkommens von *Malassezia spp.* bei gesunden und atopischen Hunden wurde festgestellt, dass die Hefepilze auf der Haut atopischer Hunde wesentlich häufiger zu finden waren als auf gesunder Haut (NARDONI et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie keinen Unterschied in der Häufigkeit der Kolonisation mit *M. pachydermatis* zwischen Ohren gesunder und allergischer Hunde (CAMPBELL et al., 2010). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht die Kolonisation an sich relevant ist, sondern andere Faktoren wie die Dichte der Kolonisation, die Heterogenität der Population oder die Häufigkeit von Infektionen eine Rolle spielen (SANTORO et al., 2015). Bei der Genotypisierung von *M. pachydermatis*-Isolaten gesunder und atopischer Haut wurden auf gesunder Haut sehr unterschiedliche Isotypen nachgewiesen, wohingegen auf der Haut atopischer Hunde eine fast monomorphe Population vorlag (KOBAYASHI et al., 2011). Der dominierende Isotyp 3D zeigte die höchste Produktion an Phospholipase A2, einem Enzym, das die epidermale Hautbarriere beeinträchtigen kann. Die Hypothese, Malassezien können durch die Produktion von Phospholipasen die Integrität der Hautbarriere beeinflussen und somit zur Pathogenese der cAD beitragen, wurde bereits von anderen Autoren geäußert (CAFARCHIA und OTRANTO, 2004; MACHADO et al., 2010). Die beiden Studien zeigten, dass die auf läsionaler atopischer Haut gefundenen Malassezien häufiger Phospholipasen produzierten als die Isolate von gesunder Haut. Neben der Produktion von Phospholipasen stimulierten



Malassezien in humanen Keratinozyten die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) und trugen dadurch möglicherweise zu einer Dermatitis bei (WATANABE et al., 2001). Einige Studien zeigten, dass *M. pachydermatis* auch als klassisches Allergen in der cAD dienen kann (BOND et al., 2002; CHEN et al., 2002; MORRIS et al., 2002). Es konnte sowohl eine Produktion von spezifischem Serum-IgE (CHEN et al., 2002) und eine positive intradermale Hautreaktion (BOND et al., 2002) als auch eine zell-medierte Immunantwort (MORRIS et al., 2002) auf Malassezien ausgelöst werden. Es scheint also, dass Malassezien auf direktem Weg, durch Produktion entzündungsfördernder Mediatoren und auf indirekte Weise, als konventionelles Allergen, zu einer cAD-assoziierten Entzündung beitragen können (SANTORO et al., 2015). Auch eine *Malassezia*-spezifische Immuntherapie wurde bei Hunden schon erfolgreich durchgeführt (ABERG et al., 2017).

### **2.1.3. Klinisches Bild**

Die ersten klinischen Anzeichen für eine AD beim Hund treten meist in jungen Lebensjahren zwischen sechs Monaten und drei Jahren auf (GRIFFIN und DEBOER, 2001). Das durchschnittliche Alter zu Krankheitsbeginn lag in multiplen Studien zwischen 1,7 und 2,7 Jahren (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010; JAEGER et al., 2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012). Französische Bulldoggen und Shar-Peis scheinen früher betroffen zu sein als andere Rassen (WILHEM et al., 2011). Eine Saisonalität der Symptome trat in älteren Studien bei 42 - 75 % der untersuchten Patienten auf, wobei das Auftreten der Symptome stark von den involvierten Allergenen abhängig ist (GRIFFIN und DEBOER, 2001). Neuere Studien berichten eine Saisonalität der Anzeichen bei 15 - 62 % der Hunde (ZUR et al., 2002b; TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012; BIZIKOVA et al., 2015b). Bei vorliegender Saisonalität war am häufigsten der Zeitraum von Frühling bis Herbst betroffen (ZUR et al., 2002b; PICCO et al., 2008; BRUET et al., 2012). Im Laufe der Erkrankung entwickelt die Mehrheit der Patienten mit initial saisonalen Symptomen auch nicht-saisonale klinische Anzeichen (GRIFFIN und DEBOER, 2001).

Eines der Hauptsymptome der cAD ist Juckreiz, der meist vor anderen klinischen Anzeichen auftritt und in der Regel Kortikosteroid-responsiv ist (FAVROT et al.,

2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012). Der Juckreiz tritt typischerweise in folgenden Körperregionen auf: Gesicht (27 - 57 %), Ohren (48 - 60 %), Pfoten/distale Extremitäten (62 - 81 %) und Bauch (39 - 66 %) (ZUR et al., 2002b; TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010; JAEGER et al., 2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012). Bei 38 % der Patienten sind die Beugeseiten der Extremitäten ebenfalls betroffen (FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011), der Juckreiz kann allerdings auch generalisiert auftreten (GRIFFIN und DEBOER, 2001). Einige Hunde zeigen initial neben Juckreiz keine sichtbaren klinischen Läsionen, weshalb dieser Juckreiz auch „Pruritus sine materia“ genannt wird (FAVROT et al., 2010). Die Primärläsion der cAD ist das Erythem (GRIFFIN und DEBOER, 2001; BIZIKOVA et al., 2015b).

Infolge des chronischen Juckreizes, der damit einhergehenden Selbsttraumatisierung, der chronischen Entzündung sowie auftretender Sekundärinfektionen weisen viele Patienten häufig Sekundärläsionen auf (GRIFFIN und DEBOER, 2001). Hierzu zählen Exkorationen, Alopezie, Hyperpigmentierung, rot-bräunliche Speichelverfärbungen des Fells sowie Lichenifikation. Betroffen sind überwiegend dieselben Stellen, die auch von Juckreiz betroffen sind (Gesicht, Schnauze, Ohren, Pfoten, Beugeseiten der Extremitäten, Achseln, Bauch, Oberschenkelinnenseiten, Inguinalregion) (GRIFFIN und DEBOER, 2001). Die prädisponierten Körperregionen können sich rassespezifisch unterscheiden (WILHEM et al., 2011). Etwa die Hälfte der Patienten leidet an einer Otitis externa (FAVROT et al., 2010). Außerdem können Bindehautentzündungen (TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011), Pododermatitiden und Seborrhoe auftreten (GRIFFIN und DEBOER, 2001; BIZIKOVA et al., 2015b). Viele Hunde mit cAD leiden unter Sekundärinfektionen, so konnten bei 28 - 33 % der untersuchten Patienten eine Infektion mit Hefepilzen und bei 55 - 66 % eine Infektion mit Bakterien nachgewiesen werden (TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011).

Im Jahr 2010 wurden zwei verschiedene Kombinationen diagnostischer Kriterien anhand von 1096 Patientendaten aus 15 Ländern weltweit erstellt, die bei der Diagnosestellung der cAD helfen sollen (FAVROT et al., 2010). Werden fünf der genannten Kriterien erfüllt, so liegt die Sensitivität für das Vorliegen einer AD bei 85 % und die Spezifität bei 79 %. Das erste Set beinhaltet die folgenden Kriterien:

Alter bei Krankheitsbeginn unter drei Jahren, Lebensraum hauptsächlich in geschlossenen Räumen, Kortikosteroid-responsiver Juckreiz, chronische oder wiederkehrende Hefepilzinfektionen, betroffene Vorderpfoten, betroffene Pinna, nicht betroffene Ohrränder sowie eine nicht betroffene dorso-lumbale Region. Das zweite Set setzt sich zusammen aus dem Alter bei Krankheitsbeginn unter drei Jahren, Lebensraum hauptsächlich in geschlossenen Räumen, Pruritus sine materia bei Krankheitsbeginn, betroffene Vorderpfoten, betroffene Pinna, nicht betroffene Ohrränder sowie eine nicht betroffene dorso-lumbale Region.

Zur Einteilung des Schweregrades und der Ausbreitung von Läsionen gibt es zwei aktuelle validierte Scoring-Systeme, die dabei helfen den aktuellen Zustand eines Patienten zu bewerten und den Krankheitsverlauf unter Therapie objektiv beurteilen zu können (PLANT et al., 2012; OLIVRY et al., 2014).

Das erste System ist der „Canine Atopic Dermatitis Lesion Index“, auch CADLI genannt (PLANT et al., 2012). Es bezieht sich auf die fünf am häufigsten betroffenen Regionen des Körpers, nämlich Kopf und Ohren, Vorderpfoten, Hinterpfoten, ventraler Brustkorb und Achseln sowie ventraler Bauch und Inguinalregion. Sechs Arten von Läsionen sind auf zwei Gruppen aufgeteilt, so gehören die akuten Veränderungen Erythem, Exkoration und Erosion zu einer Gruppe, wohingegen die chronischen Veränderungen Alopezie, Lichenifikation und Hyperpigmentierung die andere Gruppe darstellen. Je nach Schweregrad der Läsionen werden für jede Körperregion je Gruppe Punkte von 1 - 5 vergeben, wobei der Schweregrad mit steigender Punktzahl zunimmt. Die Punkte werden abschließend addiert und ergeben den CADLI des untersuchten Patienten (PLANT et al., 2012).

Das zweite System ist die vierte Version des „Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Indexes“, auch als CADESI-4 bezeichnet (OLIVRY et al., 2014). Hier liegt der Schwerpunkt auf 20 typischerweise betroffenen Körperstellen, wobei bei symmetrischen Regionen, wie beispielsweise den Achseln, die rechte und die linke Achsel als eigenständige Region aufgelistet werden. Begutachtet werden die Lippen, Pinnae, Achseln, Vorderpfoten, Hinterpfoten, Ellbogen, karpale Beugeseiten, Flanken, der Inguinalbereich, der ventrale Bauch, die Genitalien sowie die ventrale Schwanzbasis. Es wurden drei Läsionen zur Beurteilung ausgewählt: das Erythem als Indikator einer akuten Entzündung, die Lichenifikation als Zeichen einer chronischen Entzündung sowie eine Kombination

aus Alopezie und Exkoration als Ausdruck des herrschenden Juckreizes. Für jede Region werden Werte von 0 (keine Läsionen) bis 3 (stark betroffen) vergeben und anschließend addiert. Ein Wert von  $< 10$  wird als normal oder als AD in Remission angesehen. Von einer milden AD ist die Rede bei Werten von 10 - 34, eine moderate AD liegt vor bei Werten von 35 – 59 und Werte von 60 oder mehr zählen zur Kategorie der schweren AD (OLIVRY et al., 2014).

Histopathologisch liegt in der Haut atopischer Hunde eine epidermale Hyperplasie mit orthokeratotischer und parakeratotischer Hyperkeratose, Hypergranulose, Spongiose und Melanose vor. Außerdem fanden sich eine erhöhte Anzahl von Mastzellen. Eosinophile Granulozyten wurden nur in etwa 15 % der Fälle gefunden (BIZIKOVA et al., 2015b). Das perivaskuläre entzündliche Infiltrat besteht aus T-Zellen, dendritischen Zellen, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen, wohingegen sich das epidermale entzündliche Infiltrat aus T-Zellen, Langerhans-Zellen sowie eosinophilen Granulozyten zusammensetzt (OLIVRY und HILL, 2001). Viele aktuellere Beschreibungen des histopathologischen Bildes beziehen sich auf experimentelle Modelle der cAD und nicht auf spontan aufgetretene AD, das mikroskopische Bild ist dem der spontanen AD aber sehr ähnlich (BIZIKOVA et al., 2015b). Die Hautreaktionen der späten Entzündungsphase zeigen ein Entzündungsmuster, bestehend aus oberflächlicher perivaskulärer sowie interstitieller mononuklearer Dermatitis mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Nach Allergenkontakt wird eine Degranulation von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten sichtbar (OLIVRY et al., 2001b; MARSELLA et al., 2006a; OLIVRY et al., 2006; PUCHEU-HASTON et al., 2006; PUCHEU-HASTON et al., 2008). Außerdem wurde eine unregelmäßige epidermale Hyperplasie mit lymphozytärer und eosinophiler Exozytose mit Bildung von eosinophilen Mikroabszessen sowie eine Infiltration der läsionalen Haut von epidermalen und dermalen dendritischen Zellen beschrieben (OLIVRY et al., 2001b; MARSELLA et al., 2006a; PUCHEU-HASTON et al., 2008).

#### **2.1.4. Diagnosestellung**

Die canine AD hat keine pathognomonischen klinischen oder vorberichtlichen Anzeichen, die eine sichere Diagnose nach einer klinischen Untersuchung und Anamneseerhebung zulassen (DEBOER und HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015). Das liegt unter anderem daran, dass das Erscheinungsbild je nach Ausmaß der Läsionen, dem Stadium der Erkrankung oder beispielsweise dem

Vorhandensein von sekundären Infektionen stark variieren kann (HENSEL et al., 2015). Außerdem können die Symptome denen anderer, nicht-allergischer Hauterkrankungen ähneln oder sich überschneiden, was eine klinische Diagnosestellung schwierig macht (DEBOER und HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015). Die Diagnosestellung beruht somit auf einer aufmerksamen Interpretation von Krankheitsgeschichte und klinischem Erscheinungsbild in Kombination mit einem systematischen Ausschluss relevanter Differentialdiagnosen (DEBOER und HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015). Die sogenannten „Allergietests“, dazu gehören der Serum-Allergietest (SAT) und der Intrakutantest (IKT), sind nicht als Screening-Tests zum Nachweis des Vorliegens einer AD geeignet. Sie sind erst nach gesicherter Diagnosestellung einer cAD sinnvoll, um zu vermeidende Allergene zu identifizieren oder um relevante Allergene auszuwählen, die bei einer Allergen(-spezifischen) Immuntherapie im Allergenextrakt verwendet werden sollen (DEBOER und HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015).

Initial ist das Hauptmerkmal einer cAD Juckreiz, der mit erythematösen Hautveränderungen oder im Laufe der Erkrankung auch mit sekundären Läsionen einhergehen kann (GRIFFIN und DEBOER, 2001; BIZIKOVA et al., 2015b). Das bedeutet, dass bei jedem Hund, der mit Juckreiz vorgestellt wird, eine ausführliche klinische Untersuchung und Anamneseerhebung durchgeführt werden sollte. Um herauszufinden, ob ein Patient möglicherweise cAD hat, können bei der Interpretation der Untersuchungsergebnisse die Kriterien von Favrot et al. als Hilfsmittel angewandt werden (FAVROT et al., 2010). Welches der beiden Kriterien-Sets Verwendung findet, ist dem jeweiligen Untersucher überlassen. Wenn einige Kombinationen klinischer Anzeichen vorliegen, die stark mit einer cAD assoziiert sind, gilt es anschließend andere Hauterkrankungen auszuschließen, welche mit ähnlichen klinischen Symptomen einhergehen (DEBOER und HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015).

Zu den relevanten Differentialdiagnosen zählen die Flohspeichelallergie, kutane Futtermittelunverträglichkeitsreaktionen (AFR), die Sarkoptesräude oder anderer Ektoparasitenbefall, eine bakterielle Pyodermie sowie eine Malassezien-Dermatitis (DEBOER und HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015).

Das Vorliegen eines Flohbefalls kann durch Kämmen des Fells mit einem Flohkamm untersucht werden. Zu beachten ist jedoch, dass bei Hunden mit

Flohspichelallergie nicht notwendigerweise Flöhe gefunden werden müssen. Wenn also keine Flöhe gefunden werden konnten, sollte, um eine bestehende Flohspichelallergie auszuschließen, eine effektive Flohtherapie durchgeführt werden. Hierfür empfehlen sich schnell wirksame systemische Adultizide wie beispielsweise Spinosad (DRYDEN et al., 2013). Eine kontinuierliche Prävention des Flohbefalls durch regelmäßige Anwendung von Antiparasitika ist empfehlenswert, insbesondere unter dem Aspekt, dass Hunde mit einer AD häufig gleichzeitig an einer Flohspichelallergie leiden (SOUSA und HALLIWELL, 2001).

Andere Ektoparasiten wie Sarkoptes-Milben, Demodex-Milben, Herbstgrasmilben oder Ohrmilben können mittels mikroskopischer Untersuchung von oberflächlichen oder tiefen Hautgeschabseln, Tesa-Präparaten, ausgezupften Haaren oder Tupferproben nachgewiesen werden. Da Sarkoptes-Milben sehr schwierig zu finden sind, ist in manchen Fällen eine antiparasitäre Versuchstherapie erforderlich, um einen Befall auszuschließen (HENSEL et al., 2015).

Um festzustellen ob eine Infektion mit Bakterien, meist *Staphylococcus pseudintermedius*, oder Hefepilzen, meist *Malassezia pachydermatis*, vorliegt, ist eine zytologische Untersuchung von Diff-Quik®-gefärbten Abklatsch- oder Tesa-Präparaten der läsionalen Haut sinnvoll (MENDELSON et al., 2006; HENSEL et al., 2015). Zu beachten ist, dass solche Pyodermien oft sekundär in Verbindung mit einer zugrunde liegenden Erkrankung wie einer cAD oder aber auch Endokrinopathien auftreten (DEBOER, 1990). Eine Behandlung der Pyodermie ist also essentiell um herauszufinden, ob die ursächliche Grunderkrankung ebenfalls mit Juckreiz einhergeht oder nicht (HENSEL et al., 2015).

Wie bereits beschrieben, lässt sich eine Futtermittelunverträglichkeitsreaktion klinisch nicht von einer AD unterscheiden (HILLIER und GRIFFIN, 2001b; NODTVEDT et al., 2006b; OLIVRY et al., 2007; PICCO et al., 2008). Der durch Futtermittel hervorgerufene Juckreiz kann entweder immun-mediert, im Sinne einer Futtermittelallergie, oder nicht immun-mediert als Futtermittelintoleranz auftreten (HILLIER und GRIFFIN, 2001b). Bei jedem AD-verdächtigen Patienten, bei dem die klinischen Symptome das ganze Jahr über vorherrschen, ist der Ausschluss einer kutanen AFR mittels Eliminationsdiät zur Differenzierung notwendig (HENSEL et al., 2015; MUELLER und OLIVRY, 2017). Idealerweise besteht eine solche Eliminationsdiät aus einer Protein- und einer

Kohlenhydratquelle, die der Hund vorher noch nie bekommen hat (KENNIS, 2006). Die Auswahl kann sich schwierig gestalten, da kommerzielle Futtermittel häufig eine Vielzahl an Inhaltsstoffen aufweisen (HENSEL et al., 2015). Eine ausführliche Futteranamnese ist für die Wahl der Diätkomponenten vonnöten. Einige Studien haben gezeigt, dass spezielle kommerzielle Futtermittel, die laut Etikett nur eine Proteinquelle enthalten durch andere Substanzen kontaminiert waren, was diese Futtermittel für eine Eliminationsdiät unbrauchbar macht (RADITIC et al., 2011; RICCI et al., 2013b; HORVATH-UNGERBOECK et al., 2017; OLIVRY und MUELLER, 2018). Alternativ können hydrolysierte Futtermittel zum Einsatz kommen. Vorsicht ist allerdings geboten, da Hunde, die allergisch auf häufige Inhaltsstoffe wie Huhn oder Soja reagieren, keine Besserung auf die hydrolysierte Diät zeigen können (OLIVRY und BIZIKOVA, 2010). Eine durch den Besitzer selbst gekochte Eliminationsdiät stellt somit, wenn korrekt durchgeführt, die sicherste Methode zur Diagnose einer AFR dar (KENNIS, 2006). Die Patienten müssen die Eliminationsdiät ausschließlich und streng für mindestens acht Wochen gefüttert bekommen, sodass in den meisten Fällen mit AFR eine Besserung festzustellen ist (OLIVRY et al., 2015a). Sollte sich eine Besserung einstellen, so sollte die Diät weiter fortgeführt werden, um herauszufinden ob die klinischen Symptome durch eine Diät komplett oder nur teilweise eingedämmt werden können (HENSEL et al., 2015). Eine Beteiligung von AFR am Krankheitsgeschehen gilt als bestätigt, wenn nach einer Besserung der klinischen Anzeichen unter Eliminationsdiät ein Wiederauftreten der Symptome nach Konfrontation mit dem ursprünglichen Futter eintritt und diese Symptome nach dem Füttern der Eliminationsdiät wieder verschwinden (KENNIS, 2006; HENSEL et al., 2015).

Bleibt der Juckreiz auch nach Ausschluss von Flöhen, Ektoparasiten, Pyodermie und AFR bei AD-verdächtigen Patienten bestehen, so lässt sich die klinische Diagnose der cAD stellen (HENSEL et al., 2015).

Ist die Diagnose cAD in einem Patienten gestellt, so können anschließend Allergietests Verwendung finden. Eine vorherige Anwendung zur Feststellung einer Allergie ist nicht möglich, da das Vorhandensein oder die Menge an allergenspezifischem IgE nicht zwingend eine Allergie diagnostiziert (DEBOER und HILLIER, 2001a). Auch Intrakutantests zeigen lediglich die Fähigkeit kutaner Mastzellen zur Degranulation nach Allergenexposition auf, was hinweisend auf eine Allergie sein kann, aber nicht diagnostisch ist (DEBOER und HILLIER,

2001a). Klinisch normale und gesunde Hunde können sowohl bei einem SAT, als auch bei einem IKT positive Testreaktionen zeigen (LIAN und HALLIWELL, 1998; MUELLER et al., 2005a). Bei bestehender Diagnose einer cAD und in Zusammenhang mit den klinischen und vorberichtlichen Informationen ist eine Durchführung von IKT oder SAT sinnvoll, um herauszufinden welche Allergene möglichst vermieden werden sollten oder welche Allergene für eine Allergen (-spezifische) Immuntherapie geeignet sind (DEBOER und HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015).

Bevor ein Allergentest durchgeführt wird sollte berücksichtigt werden, ob der Patient Medikamente verabreicht bekommen hat, die durch ihre entzündungshemmende Wirkung die Ergebnisse eines Tests beeinflussen können. Antihistaminika, Glukokortikoide, Bronchodilatoren, trizyklische Antidepressiva oder Beta-2-Sympathomimetika können Einfluss auf den Ausgang eines Intrakutantests haben (HILLIER und DEBOER, 2001). Je nach Wirkstoff sollte nach Absetzen des Medikaments eine ausreichend lange Wartezeit vor der Testdurchführung eingehalten werden (OLIVRY und SARIDOMICHELAKIS, 2013). Bei der Wahl der Sedativa für einen Intrakutantest sollte auf Wirkstoffe wie Ketamin, Diazepam, Acepromazin und Morphin verzichtet werden, da diese ebenfalls mit den Testergebnisse interferieren können (MARTIN und MARTIN, 2006).

Der Intrakutantest ist eine indirekte Messmethode der Reaktivität von kutanen Mastzellen, die auf dem Vorhandensein von IgE beruht (DEBOER und HILLIER, 2001a). Die Auswahl der Allergene im Test ist essentiell für ein verlässliches Ergebnis und sollte individuell auf den jeweiligen Patienten, dessen Umgebung sowie geographische Unterschiede angepasst werden (HENSEL et al., 2015). Die zu testenden Allergenlösungen werden intrakutan, meist am seitlichen Brustkorb nach vorheriger Schur der Region, appliziert. Die Hautreaktionen an jeder Injektionsstelle werden mit Positiv- und Negativkontrollen verglichen und dann subjektiv und/oder objektiv ausgewertet. Die subjektive Auswertung beurteilt Intensität, Größe und Form des Erythems sowie die Schwellung, beziehungsweise Quaddelbildung an der Injektionsstelle. Es werden Grade von 0 bis 4 vergeben, wobei die Negativkontrolle mit einer „0“ und die Positivkontrolle mit einer „4“ bewertet wird. Die Reaktion gilt als positiv, wenn ein Grad von 2 oder mehr vergeben wird (HILLIER und DEBOER, 2001). Bei der objektiven Auswertung



wird der mittlere Durchmesser des erythematösen Bereichs oder der Quaddel gemessen. Zwischen den beiden Auswertungsmethoden wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen (HUBBARD und WHITE, 2011). Bei Hunden mit saisonalen Krankheitssymptomen sollte ein IKT gegen Ende oder innerhalb von zwei Monaten nach Ende der Phase mit der stärksten Reaktion durchgeführt werden (HUBBARD und WHITE, 2011).

Bei den allergenspezifischen IgE-Serumtests werden, meist mit Hilfe von Festphasenimmunoassays, spezifische IgE-Antikörper gegen eine Reihe von Allergenen nachgewiesen. Häufig untersuchte Allergene sind Pollen, Schimmelpilze, Hausstaubmilben sowie epidermale Allergene in verschiedenen Kombinationen (DEBOER und HILLIER, 2001b). Kommerzielle SATs sind in der Regel keine quantitativen, sondern semi-quantitative Assays. Das bedeutet, dass das Endsignal in eine Punktzahl umgewandelt wird, die dann wiederum im Vergleich zu intra-Assay Standards oder den Ergebnissen von Referenzproben interpretiert wird (DEBOER und HILLIER, 2001b). Da in der Veterinärmedizin keine Labor-übergreifenden Standards existieren, sondern jedes Labor seine eigenen Methoden der Durchführung und Auswertung besitzt, ist ein aussagekräftiger Vergleich von Testergebnissen verschiedener Laboren so gut wie unmöglich (DEBOER und HILLIER, 2001b). Übereinstimmende Testergebnisse einer identischen Serumprobe bei unterschiedlichen Laboren sind nicht gewährleistet (PLANT et al., 2014).

Beide Testmethoden sind sehr unterschiedlich und nicht standardisiert, was dazu führt, dass die Korrelation zwischen IKT und SAT nur schwach ist (FOSTER et al., 2003). Nichtsdestotrotz ist die Erfolgsrate einer Allergen (-spezifischen) Immuntherapie auf Basis eines SATs im Vergleich zu einem IKT nicht signifikant unterschiedlich (PARK et al., 2000).

### **2.1.5. Therapie**

Aufgrund der komplexen Pathogenese der AD sowie des variablen Schweregrads und Krankheitsverlaufs eines jeden Patienten erfordert das Management dieser Erkrankung in der Regel eine Kombination verschiedener Therapieansätze (OLIVRY und SOUSA, 2001a). Neben der Vermeidung von Allergenkontakt und einer Allergen (-spezifischen) Immuntherapie, stehen beispielsweise verschiedene Medikamente zur Entzündungs- und Juckreizlinderung im Rahmen einer

symptomatischen Therapie zur Verfügung. Die Wahl der einzelnen Therapieelemente und deren Kombination muss unter anderem an den Zustand des Patienten, den Schweregrad der Läsionen und des Juckreizes, die beteiligten Allergene sowie ebenfalls die Möglichkeiten und Wünsche des Patientenbesitzers angepasst werden (OLIVRY et al., 2010a; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016).

#### **2.1.5.1. Vermeidung von auslösenden und verschlimmernden Faktoren**

Die Vermeidung von Allergenkontakt ist logischerweise ein wichtiger Bestandteil des Managements der AD, die Durchführung in der Praxis ist jedoch meist problematisch (OLIVRY und SOUSA, 2001a; OLIVRY et al., 2010a). Zunächst müssen die relevanten beteiligten Allergene identifiziert werden, was durch einen IKT oder SAT erfolgen kann (DEBOER und HILLIER, 2001b). Auch sollten mögliche begleitende Allergien wie Futtermittelallergien oder eine Flohspeichelallergie sowie mikrobielle Infektionen festgestellt werden, da diese zu den wichtigsten Faktoren gehören, die einen Schub, beziehungsweise eine Verschlimmerung der AD hervorrufen können (OLIVRY und SOUSA, 2001a; OLIVRY et al., 2010a). Bei Beteiligung einer Futtermittelunverträglichkeit sollten die relevanten Futtermittelkomponenten, gegen die der Patient sensibilisiert wurde, nicht mehr gefüttert werden (OLIVRY et al., 2010a). Da Hunde mit AD dazu neigen können eine Hypersensibilität gegenüber Flohspeichelallergenen zu entwickeln, sollte bei bereits bestehender Flohspeichelallergie oder in Regionen, in denen Flöhe endemisch vorkommen, eine effektive Flohkontrolle mit adultiziden Wirkstoffen über das gesamte Jahr erfolgen (OLIVRY und SOUSA, 2001a; OLIVRY et al., 2010a). Sollte durch zytologische Evaluierung der Läsionen eine Infektion mit Hefepilzen oder Bakterien festgestellt werden, so ist eine antimykotische, beziehungsweise antibakterielle Therapie angezeigt (OLIVRY und SOUSA, 2001a; OLIVRY et al., 2010a). Hierbei können Shampoos oder Lösungen mit antimikrobiellen Inhaltsstoffen zum Einsatz kommen, ebenso wie Cremes, Gels, Tücher oder Salben mit antiseptischen, antibiotischen oder antimykotischen Wirkstoffen bei lokalisierten Läsionen. Bei einer weit ausgebreiteten oder generalisierten Infektion kann eine systemische Antibiotika- oder Antimykotikagabe notwendig sein. Bei der Erstellung eines Therapieplans sollten immer die aktuellen Leitlinien oder Empfehlungen für antimikrobielle Therapien berücksichtigt werden (OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2015b). Außerdem

muss der Therapieverlauf und -erfolg zytologisch kontrolliert werden, damit gegebenenfalls notwendige Anpassungen erfolgen können oder, bei ausbleibendem Erfolg, eine bakteriologische, beziehungsweise mykologische Untersuchung mit Antibiogramm eingeleitet werden kann (OLIVRY et al., 2010a). Eine Vermeidung von Umweltallergenen ist meist schwierig zu erreichen, insbesondere im Falle von Aeroallergenen wie Pollen oder Schimmelpilzen (OLIVRY und SOUSA, 2001a). In Phasen in denen relevante Allergene bekannterweise in hohen Mengen in der Luft vorkommen, kann versucht werden, die Expositionszeiten des Patienten im Freien zu reduzieren (OLIVRY und SOUSA, 2001a; OLIVRY et al., 2010a). Hierbei wird der Allergenkontakt nicht vermieden, sondern lediglich reduziert. Sind nachgewiesenermaßen Hausstaubmilbenallergene am Krankheitsgeschehen beteiligt, so können spezielle Liegekissen oder Bezüge mit kleiner Porengröße Anwendung finden, die den Kontakt zu den Allergenen minimieren sollen (VAUGHAN et al., 1999). Regelmäßiges Waschen und Saugen von Liegeplätzen, Teppichen und der Umgebung des Patienten helfen außerdem, die Allergenlast zu senken (OLIVRY et al., 2010a). In einer Studie hat eine Umgebungsbehandlung mit akarizidem Benzylbenzoat-Spray zu einer Verbesserung der klinischen Symptome bei Hausstaubmilben-Allergikern geführt (SWINNEN und VROOM, 2004).

#### **2.1.5.2. Optimierung von Haut- und Fellpflege**

Es wird vermutet, dass ein wöchentliches Baden von atopischen Patienten mit einem nicht irritierenden Shampoo zu einer Verbesserung der Symptome führen kann. Die Besserung beruht möglicherweise auf der Entfernung von Allergenen und Mikroben aus dem Fell sowie von der Haut der Hunde, als auch auf dem feuchtigkeitsspendenden Effekt des Badens (OLIVRY et al., 2010a). Eine Therapie mit Shampoos, die den Juckreiz lindern sollen und die Lipide, komplexe Zuckermoleküle, Phytosphingosine und/oder Antiseptika enthalten, hatte nachweislich einen moderaten aber eher kurz anhaltenden Effekt auf Hautläsionen und Juckreiz bei Hunden (LOFLATH et al., 2007; BENSIGNOR et al., 2013). Das Ergebnis einer dieser Studien, dass Hunde der Kontrollgruppe, die lediglich eine Whirlpool-Therapie ohne Anwendung von Shampoo bekamen, ebenfalls eine Verbesserung der klinischen Symptome zeigten, lässt vermuten, dass der vorteilhafte Effekt einer Shampoo-Therapie möglicherweise zumindest teilweise auf der Durchführung des Waschens an sich beruht (LOFLATH et al., 2007;

OLIVRY et al., 2010a). Bei sehr fettiger und schuppender Haut wird die Anwendung eines antiseborrhoeischen Shampoos und bei vorliegender Infektion der Gebrauch eines antiseptischen Shampoos empfohlen, auch wenn die Intensität und Häufigkeit des Badens möglicherweise den wichtigsten Faktor bei der Juckreizlinderung darstellt (OLIVRY et al., 2015b).

Eine orale Supplementation von essentiellen Fettsäuren, entweder als Nahrungsergänzung oder in Form von kommerziell erhältlichen, fettsäurereichen Futtermitteln, stellt einen weiteren Ansatz dar, die Haut atopischer Patienten zu unterstützen (OLIVRY und SOUSA, 2001a; OLIVRY et al., 2010a; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016). Ziel ist es, die Produktion entzündungsfördernder Eicosanoide zu reduzieren, eine Aktivierung von Entzündungszellen und deren Sekretion von Zytokinen zu verhindern, Störungen des Lipidmetabolismus‘ zu beheben und letztlich zu einer Normalisierung des Stratum corneums zu führen (OLIVRY et al., 2001a; STEHLE et al., 2010; POPA et al., 2011; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016). Nach Supplementation verschiedener essentieller Fettsäuren konnte eine verbesserte Organisation der Lipidlamellen des SC in der Haut atopischer Hunde nachgewiesen werden (POPA et al., 2011). Eine weitere Studie zeigte, dass die orale Aufnahme essentieller Fettsäuren, insbesondere der Omega-6 Linolensäure in Kombination mit Zink, zu einem reduzierten TEWL und einer verbesserten Fellqualität führt (MARSH et al., 2008). Kommerzielle Futtermittel, die mit essentiellen Fettsäuren angereichert wurden, können bei Hunden mit AD zu einer Verbesserung von Juckreiz und Läsionen führen (GLOS et al., 2008). Dieser Effekt trat allerdings nicht bei allen getesteten Produkten auf (GLOS et al., 2008). Die ideale Fettsäure-Komposition, -Dosierung oder -Formulierung zur Reduzierung der atopischen Hautsymptomatik ist bislang unbekannt, ebenso wenig liegen Nachweise für die Überlegenheit bestimmter Fettsäure-Kombinationen oder -Dosierungen vor (OLIVRY et al., 2010a; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016). Da der Eintritt einer Verbesserung unter Supplementation von Fettsäuren bis zu zwei Monaten dauern kann, ist dieser Therapieansatz nicht zur Behandlung akuter Schübe, sondern eher für das Langzeitmanagement der Erkrankung geeignet (OLIVRY et al., 2001a; SAEVIK et al., 2004; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016). Aufgrund der begrenzten Wirkung wird eine Kombination mit anderen Therapiemodalitäten in den meisten Fällen erforderlich sein (OLIVRY et al., 2010a;

SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016). Neben der oralen Supplementation essentieller Fettsäuren existieren auch Produkte zur lokalen Anwendung von Lipiden, die dabei helfen können, vorhandene Defekte der Lipidbarriere des SC zu normalisieren (PIEKUTOWSKA et al., 2008; POPA et al., 2012). Solche Produkte enthalten beispielsweise Ceramide, Cholesterol und essentielle Fettsäuren. Eine moderate Verbesserung klinischer Anzeichen konnte nach lokaler Anwendung mehrfach ungesättigter Fettsäuren und essentieller Öle nachgewiesen werden (BLASKOVIC et al., 2014), andere Ergebnisse sind allerdings variabel und unbeständig (OLIVRY et al., 2015b; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016; HOBI et al., 2017; MARSELLA et al., 2017). Kosten und Vorteile einer lokalen Anwendung gegenüber der oralen Substitution müssen abgewogen werden, da der Vorteil einer topischen Applikation vermutlich minimal ist, wenn ein Hund bereits eine fettsäurereiche Diät erhält (PIEKUTOWSKA et al., 2008; POPA et al., 2011; POPA et al., 2012; OLIVRY et al., 2015b).

#### **2.1.5.3. Pharmakotherapie zur Entzündungshemmung und Juckreizlinderung**

Eine Vielzahl an Zelltypen wie Keratinozyten, epidermale Langerhans-Zellen, dermale dendritische Zellen, T-Lymphozyten sowie eosinophile Granulozyten sind an der Entzündungsreaktion der AD beteiligt und tragen nach Aktivierung durch die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Arachidonsäurederivaten zur Entzündung bei (OLIVRY et al., 1997; KLUKOWSKA-ROTZLER et al., 2013; JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014). Die Entzündungsvorgänge können effektiv durch den Einsatz von entzündungshemmenden und immunmodulatorischen Medikamenten wie Glukokortikoiden, Calcineurin-Inhibitoren oder Janus-Kinase-Inhibitoren kontrolliert werden (OLIVRY et al., 2015b; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016).

Beschränkt sich die Entzündung und der Juckreiz auf bestimmte Bereiche des Körpers, so kann statt einer oralen Verabreichung eine lokale Anwendung von Glukokortikoiden oder Tacrolimus, einem topischen Calcineurin-Inhibitor, durchgeführt werden (OLIVRY et al., 2010a; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016).

Glukokortikoide sind in der Lage die Genexpression zu regulieren und können so eine Aktivierung von Immunzellen wie beispielsweise von T-Lymphozyten,

eosinophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen verhindern. Sie unterdrücken die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen sowie Chemokinen und erzielen damit einen starken entzündungshemmenden Effekt (OLIVRY und SOUSA, 2001b). Die lokale Anwendung von Glukokortikoiden ist sehr effektiv in der Reduktion klinischer Anzeichen einer AD und eignet sich am besten für die kurzfristige Anwendung fokaler Läsionen (DEBOER et al., 2002; NUTTALL et al., 2009; OLIVRY et al., 2010a; NUTTALL et al., 2012; OLIVRY und BIZIKOVA, 2013). Bei längerer und kontinuierlicher Verwendung besteht das Risiko einer Hautatrophie, weshalb nach einer Induktionsphase mit täglicher Anwendung auf eine intermittierende Gabe gewechselt werden sollte (KIMURA und DOI, 1999; NUTTALL et al., 2009; BIZIKOVA et al., 2010; OLIVRY et al., 2015b). Mit Hydrokortisonaceponat, einem Glukokortikoid Diester, steht ein Wirkstoff zur Verfügung, der mit einer hohen Potenz, guten Hautpenetration, einer schnellen Metabolisierung in der Haut und somit minimalen systemischen Nebenwirkungen einhergeht (NUTTALL et al., 2009; BIZIKOVA et al., 2010). Nichtsdestotrotz muss auch bei diesem Wirkstoff die Entwicklung einer Hautatrophie überwacht werden (BIZIKOVA et al., 2010). In der Regel wird die Therapie so lange fortgeführt, bis eine komplette und stabile Remission eintritt, Dauer und Häufigkeit der Anwendung müssen jedoch individuell an jeden Patienten angepasst werden (NUTTALL et al., 2009; OLIVRY et al., 2015b). Im Langzeitmanagement der AD kann eine einmal tägliche Anwendung an zwei aufeinander folgenden Tagen einen Rückfall oder ein Wiederkehren von Symptomen hinauszögern (LOURENCO et al., 2016).

Calcineurin-Inhibitoren wie beispielsweise Tacrolimus oder Ciclosporin sind Immunmodulatoren, die die Aktivierung von T-Lymphozyten verhindern (BENSIGNOR und OLIVRY, 2005; KOBAYASHI et al., 2007; FORSYTHE und PATERSON, 2014). Sie hemmen Calcineurin, eine zytoplasmatische Phosphatase, wodurch eine Translokation des „Nuclear Factor of Activated T-cells“ in den Zellkern unterbleibt. Das hat eine verminderte Transkription, Translation und Sekretion von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen zur Folge (BENSIGNOR und OLIVRY, 2005; KOBAYASHI et al., 2007; FORSYTHE und PATERSON, 2014). Ebenso wie Glukokortikoide reduziert eine lokale Anwendung von Tacrolimus-Salbe sehr effektiv die klinische Symptomatik, insbesondere bei fokalen Läsionen (MARSELLA et al., 2004; BENSIGNOR und OLIVRY, 2005).

Es wird eine zwei Mal tägliche Anwendung für eine Woche mit anschließender Reduktion der Frequenz empfohlen, bis die Dosis und Frequenz gefunden wird, die gerade ausreicht um klinische Anzeichen zu kontrollieren (OLIVRY et al., 2010a). An der Auftragsstelle können gegebenenfalls milde Irritationen auftreten (BENSIGNOR und OLIVRY, 2005). Im Vergleich zu Glukokortikoiden ist Tacrolimus aufgrund seines langsamen Wirkungseintritts nicht zur Behandlung akuter Schübe geeignet (OLIVRY et al., 2010a).

Bei schwer betroffenen Patienten und Patienten, bei denen sich die Läsionen nicht auf bestimmte Bereiche beschränken, kommen orale entzündungshemmende und juckreizlindernde Medikamente zum Einsatz. Hierzu zählen Glukokortikoide, Ciclosporin, Oclacitinib oder Lokivetmab (OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2015a; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016; GEDON und MUELLER, 2018).

Systemisch wirksame Glukokortikoide sind sehr effektiv in der Juckreizlinderung und Behandlung von akuten Schüben und chronischer AD (OLIVRY und MUELLER, 2003; OLIVRY et al., 2010b; TASZKUN, 2010; OLIVRY und BIZIKOVA, 2013; GADEYNE et al., 2014). Sie sind schnell wirksam und günstig im Preis, jedoch können in Abhängigkeit von Dosierung und Dauer der Anwendung Nebenwirkungen wie Polyurie, Polydipsie, Polyphagie, Muskelatrophie, Harnwegsinfektionen und Sekundärinfektionen der Haut, Calcinosis cutis sowie ein iatrogener Hyperadrenokortizismus auftreten (OLIVRY und MUELLER, 2003; OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2010b; OLIVRY und BIZIKOVA, 2013; GADEYNE et al., 2014). Da die unerwünschten Wirkungen häufiger bei höheren Dosierungen, täglicher Anwendung und langfristiger Gabe auftreten, eignen sich systemische Glukokortikoide besonders für die Therapie akuter Schübe oder episodischer Verschlechterungen der klinischen Anzeichen der AD. So können sie kurzfristig eingesetzt werden, um eine schnelle Linderung zu verschaffen, während andere Therapieoptionen mit geringeren Risiken für Nebenwirkungen zur langfristigen Kontrolle identifiziert werden (OLIVRY et al., 2010a; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016). Für die orale Therapie empfehlen sich kurz wirksame Glukokortikoide wie Prednisolon oder Methylprednisolon in einer initialen Dosierung von 0,5 mg/kg ein bis zweimal täglich, bis zum Eintreten einer klinischen Remission. Danach folgt eine kontinuierliche Reduktion, um das Risiko für Nebenwirkungen zu minimieren, bis zur niedrigsten Dosis und Frequenz,

die ausreicht um klinische Symptome zu kontrollieren (OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2010b). Sollten Patienten langfristig eine orale Glukokortikoid-Therapie erhalten, so wird eine jährliche klinische Untersuchung mit bakterieller Untersuchung des Urins angeraten, um das Auftreten von Nebenwirkungen zu überwachen und asymptomatische bakterielle Harnwegsinfektionen zu detektieren (TORRES et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016). Die gleichzeitige Administration anderer Medikamente oder Nahrungsergänzungsmittel wie beispielsweise von Antihistaminika oder essentiellen Fettsäuren, kann möglicherweise einen Steroid-sparenden Effekt ausüben und sollte daher bei längerfristiger Glukokortikoid-Gabe in Betracht gezogen werden (DEBOER und GRIFFIN, 2001; SAEVIK et al., 2004; OLIVRY et al., 2010a; DELL et al., 2012).

Im Vergleich zu Glukokortikoiden ist Ciclosporin, ein systemischer Calcineurin-Inhibitor, vergleichbar effektiv in der Linderung klinischer Symptome und zeigt seltener Nebenwirkungen, die zudem in der Regel weniger schwer sind (OLIVRY et al., 2002; OLIVRY und MUELLER, 2003; STEFFAN et al., 2005; OLIVRY et al., 2010b; OLIVRY und BIZIKOVA, 2013). Nachteilig sind der langsame Wirkungseintritt und die hohen Kosten des Medikaments. Die initiale orale Dosis beträgt 5 mg/kg einmal täglich. Nach vier bis sechs Wochen, wenn klinische Symptome kontrolliert sind, kann bei vielen Patienten die Dosis reduziert werden (STEFFAN et al., 2005; NUTTALL et al., 2014). Dies erfolgt entweder durch die Gabe derselben Dosis jeden zweiten Tag oder durch eine kontinuierliche Reduktion der täglichen Dosis um 25 % alle vier Wochen (STEFFAN et al., 2003; FORSYTHE und PATERSON, 2014). Ciclosporin wird in der Regel als sicher in der langfristigen Anwendung angesehen, milde Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall können dennoch, meist zu Beginn der Gabe, auftreten (MARSELLA und OLIVRY, 2001; STEFFAN et al., 2003; NUTTALL et al., 2014). Seltener mögliche Nebenwirkungen, welche dosisabhängig auftreten und somit in der Regel nach einer Dosisreduktion verschwinden, sind Anorexie, Hirsutismus, gingivale Hyperplasie und kutane Papillomatose (FORSYTHE und PATERSON, 2014; NUTTALL et al., 2014). Da eine zufriedenstellende Wirkung meist erst nach vier bis sechs Wochen eintritt, kann während der ersten zwei Wochen der Ciclosporin-Gabe eine gleichzeitige Verabreichung eines kurzwirksamen Glukokortikoids von Vorteil sein (DIP et al., 2013).



Oclacitinib ist ein selektiver Inhibitor der Janus-Kinase 1, einem Enzym, das eine zentrale Rolle in Zytokin-Signalwegen spielt, die in Entzündungsprozesse, Allergien und Juckreizentstehung involviert sind (GONZALES et al., 2014). Durch die Inhibition der Janus-Kinase wird die Signalübertragung der Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 und IL-31 am Rezeptor verhindert und somit überwiegend eine Hemmung der Th2-Immunantwort erreicht (GONZALES et al., 2014). Oclacitinib zeigt einen schnellen Wirkungseintritt, ist effektiv in der Juckreizlinderung sowie der Therapie klinischer Symptome der AD und zudem sicher in der Anwendung (COSGROVE et al., 2013; GADEYNE et al., 2014; COSGROVE et al., 2015; LITTLE et al., 2015). Es eignet sich somit nicht nur zur Behandlung akuter Schübe, sondern auch zur Langzeittherapie einer AD. Milde Nebenwirkungen, insbesondere bei langfristiger Gabe, können in Form von Harnwegsinfektionen, Erbrechen, Pyodermien, Otitiden und Durchfall auftreten (COSGROVE et al., 2013; COSGROVE et al., 2015; LITTLE et al., 2015). Die orale Dosis beträgt initial 0,4 - 0,6 mg/kg zweimal täglich und kann nach zwei Wochen auf eine einmal tägliche Gabe reduziert werden (COSGROVE et al., 2013; GADEYNE et al., 2014). Im Falle einer kompletten klinischen Remission kann eine weitere Dosisreduktion versucht werden, um die niedrigste Dosis zur Kontrolle der Krankheit zu identifizieren (OLIVRY et al., 2015b).

Eine längerfristige gleichzeitige Gabe von oralen Glukokortikoiden, Ciclosporin oder Oclacitinib in jeglicher Kombination ist aufgrund des höheren Risikos einer Immunsuppression mit dem einhergehenden Risiko opportunistischer Infektionen nicht empfehlenswert (OLIVRY et al., 2015b).

Antihistaminika stellen Antagonisten für spezielle Histamin-Rezeptoren dar, die bei Aktivierung durch Binden von Histamin zu einer Vasodilatation, Ödem- und Quaddel-Bildung in der Haut sowie Juckreiz führen können (DEBOER und GRIFFIN, 2001; BIZIKOVA et al., 2008). Für die Therapie einer allergischen Entzündung sind insbesondere Antihistaminika von Interesse, die auf den Histamin-Rezeptor H1 abzielen (DEBOER und GRIFFIN, 2001). Durch Inaktivierung der Rezeptoren wird der entzündungsfördernde und Juckreiz-hervorrufende Effekt des von aktivierten Mastzellen ausgeschütteten Histamins blockiert (DEBOER und GRIFFIN, 2001; BIZIKOVA et al., 2008). Die Effektivität von Antihistaminika zur Therapie der cAD ist begrenzt, was möglicherweise daran liegt, dass Histamin nicht zu den Hauptmediatoren der Entzündungsreaktion gehört

oder dass Antihistaminika nicht mehr wirken können, wenn Histamin bereits an die Rezeptoren gebunden hat (DEBOER und GRIFFIN, 2001; OLIVRY und MUELLER, 2003; OLIVRY et al., 2010b). Aus diesem Grund werden Antihistaminika nicht zur Behandlung einer akuten allergischen Entzündung eingesetzt, sondern eher in Kombination mit anderen Therapieoptionen zum Langzeitmanagement der AD, beispielsweise um die Dosierung anderer Medikamente zu reduzieren (DEBOER und GRIFFIN, 2001; DELL et al., 2012). Hierbei ist eine tägliche präventive Gabe empfehlenswert (OLIVRY et al., 2015b). Eine gewisse Wirksamkeit beim Hund wurde für Hydroxyzin und dessen aktiven Metaboliten Cetirizin nachgewiesen sowie für Dimetinden und eine Kombination aus Chlorpheniramin und Hydroxyzin (BIZIKOVA et al., 2008; EICHENSEER et al., 2013). Obwohl die Effektivität von Antihistaminika von Individuum zu Individuum sehr variabel ist, kann versuchsweise eine Therapie durchgeführt werden (DEBOER und GRIFFIN, 2001; OLIVRY et al., 2015b). In einer Studie bewerteten viele Tierbesitzer den Einsatz von Antihistaminika in der Therapie der AD ihres Tieres als vorteilhaft (DELL et al., 2012).

#### **2.1.5.4. Biologika zur Entzündungshemmung und Juckreizlinderung**

Der Einsatz von Biologika wie beispielsweise monoklonaler Antikörper gegen IL-31 stellt eine neuartige Therapieoption der AD dar. IL-31 wurde als bedeutendes Zytokin im Zusammenhang mit AD-assoziiertem Juckreiz bei Hunden identifiziert (GONZALES et al., 2013; ROSSBACH und BAUMER, 2014; GONZALES et al., 2016; MICHELS et al., 2016a). Lokivetmab, ein caniner monoklonaler Anti-IL-31-Antikörper, bindet spezifisch zirkulierendes IL-31 und verhindert so dessen Bindung an den Rezeptor (MICHELS et al., 2016a). Diese Neutralisierung von IL-31 führt zu einer effektiven Juckreizlinderung bei Patienten mit AD. Die subkutane Injektion von 2,0 mg/kg Lokivetmab bei Hunden mit AD führte zu einer raschen Juckreizlinderung innerhalb eines Tages und einer Verbesserung des CADESI-03-Wertes innerhalb von sieben Tagen (MICHELS et al., 2016a). Die Wirkung nach einmaliger Injektion hielt bei den meisten Tieren bis zu einem Monat an (MICHELS et al., 2016a). Die Verabreichung von Lokivetmab scheint sicher und ohne Nebenwirkungen zu sein (MICHELS et al., 2016b). Sehr wenige Tiere entwickeln Antikörper gegen Lokivetmab, deren Bedeutung bislang aber unbekannt ist (MICHELS et al., 2016b).

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen canines IL-31 stellt einen weiteren Therapieansatz der AD dar, der auf eine Neutralisierung von IL-31 abzielt. Durch die körpereigene Produktion von Anti-IL-31-Antikörpern soll damit der juckreizlindernde Effekt, wie bei Lokivetmab, erzielt werden (BACHMANN et al., 2018).

#### **2.1.5.5. Allergen (-spezifische) Immuntherapie**

Unter einer Allergen (-spezifischen) Immuntherapie (AIT) versteht man die Verabreichung einer graduell ansteigenden Menge eines Allergenextrakts an ein allergisches Individuum, um eine Verbesserung der Symptomatik, die mit einem Allergenkontakt einhergeht, zu erreichen (BOUSQUET et al., 1998). Eine AIT stellt neben der Vermeidung von Allergenkontakt die einzige ursächliche Therapieoption dar, die in den natürlichen Ablauf einer allergischen Reaktion eingreift und möglicherweise einige zugrundeliegende pathogene Mechanismen abzuschwächen oder umzukehren vermag (GRIFFIN und HILLIER, 2001; OLIVRY et al., 2010a; MUELLER et al., 2018). Es wird außerdem angenommen, dass dies die aktuell einzige Therapieform ist, die das Potential hat, ein Wiederauftreten einer Allergie zu verhindern oder zumindest in einer lang andauernden Remission zu resultieren (GRIFFIN und HILLIER, 2001; OLIVRY et al., 2010a; MUELLER et al., 2018). Der Wirkmechanismus einer AIT ist bislang nicht vollständig geklärt, die Vorgänge beim Hund scheinen jedoch denen des Menschen sehr ähnlich zu sein (MUELLER et al., 2018). Es findet neben einer reduzierten Aktivität von Effektorzellen ein Wandel der Immunreaktion von einer Th2- zu einer Th1-dominierten Immunantwort statt, woraus sich letztlich eine immunologische Toleranz entwickelt (AKDIS und AKDIS, 2015; LAWRENCE et al., 2016; MUELLER et al., 2018). Die Veränderungen zugunsten einer Th1-dominierten Immunantwort gehen bei erfolgreicher AIT mit einem Anstieg der regulatorischen T-Zellen und IL-10 einher (KEPPEL et al., 2008b). Außerdem konnte ein Anstieg von Gesamt-IgG und allergenspezifischem IgG sowie ein Abfall von allergenspezifischem IgE während der Immuntherapie festgestellt werden (KEPPEL et al., 2008b; DEBOER et al., 2016). Eine AIT ist sinnvoll bei Patienten mit einer gesicherten Diagnose der AD, bei denen durch IKT oder SAT Allergene identifiziert wurden, die am Krankheitsgeschehen beteiligt zu sein scheinen und deren Kontakt nicht vermieden werden kann (GRIFFIN und HILLIER, 2001). Besonders empfehlenswert ist die Therapie für Patienten, bei denen die Symptome

den Großteil des Jahres auftreten. Selbst bei nur kurz andauernden Krankheitsepisoden ist eine AIT ratsam bei Patienten mit sehr schwerem Krankheitsverlauf und unzufriedenstellendem Erfolg oder nicht tolerierbaren Nebenwirkungen einer symptomatischen Therapie (GRIFFIN und HILLIER, 2001). Ob zur Identifizierung relevanter Allergene ein IKT oder ein SAT herangezogen wird, scheint keinen Einfluss auf den Erfolg einer AIT zu haben, es ist jedoch sehr wichtig, dass die Testergebnisse stets in Bezug auf den individuellen Patienten, den Krankheitsverlauf und die geographischen Gegebenheiten interpretiert werden (GRIFFIN und HILLIER, 2001; ZUR et al., 2002a; SCHNABL et al., 2006). Es existieren keine standardisierten Empfehlungen über die Menge eines einzelnen Allergens oder die Anzahl an Allergenen die in den Extrakt für die Immuntherapie integriert werden sollten (GRIFFIN und HILLIER, 2001). Bei der klassischen Form der AIT wird eine Mischung von wässrigen oder alumpräzipitierten Allergenen subkutan injiziert (GRIFFIN und HILLIER, 2001). Während einer Induktionsphase von vier Wochen bis vier Monaten werden ansteigende Dosen des Allergenextrakts verabreicht, bis eine Erhaltungsdosis erreicht wird, die nachfolgend in regelmäßigen Abständen von etwa drei bis vier Wochen injiziert wird (GRIFFIN und HILLIER, 2001; SCHNABL et al., 2006). Dosis und Frequenz der Injektionen werden in Abhängigkeit des klinischen Ansprechens sowie des Auftretens unerwünschter Wirkungen, wie beispielsweise gesteigertem Juckreiz nach Injektion, an jeden Patienten individuell angepasst (OLIVRY et al., 2010a). Da es mehrere Monate dauern kann, bis ein positiver Effekt eintritt, sollte die Therapie mindestens 12 Monate durchgeführt werden, bis die Wirksamkeit bei einem Patienten beurteilt werden kann (GRIFFIN und HILLIER, 2001; OLIVRY et al., 2010a). Ist die Therapie effektiv, so wird sie meist lebenslang fortgeführt. Versuchsweise kann eine Reduktion der Injektionsfrequenz oder eine Beendigung der Therapie erfolgen, da einige Hunde auch nach Ende einer AIT langanhaltende Remissionen gezeigt haben (GRIFFIN und HILLIER, 2001; OLIVRY et al., 2015b). Die Effektivität einer AIT ist variabel, ein Ansprechen im Sinne einer Verbesserung klinischer Anzeichen oder Reduktion begleitender entzündungshemmender und juckreizlindernder Medikamente konnte in 50 - 80 % der Tiere beobachtet werden (GRIFFIN und HILLIER, 2001; SCHNABL et al., 2006; LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009; HOBI und MUELLER, 2014; FISCHER et al., 2016). Die AIT wird nicht nur als effektiv, sondern auch als sicher für die Behandlung atopischer Patienten angesehen (LOEWENSTEIN und

MUELLER, 2009; OLIVRY et al., 2010b). Die häufigste Nebenwirkung ist ein Anstieg des Juckreizes nach Injektion des Allergenextrakts (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009). Systemische Nebenwirkungen sind sehr selten. Etwa in 1 % der Patienten konnten Anzeichen wie Schwäche, Depression, Hecheln, Hyperaktivität, Durchfall, Erbrechen, Urtikaria, Kollaps oder Anaphylaxie beobachtet werden (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009).

Neben dem klassischen Behandlungsprotokoll existieren weitere Therapieformen, die entweder eine niedrigere Dosis, eine beschleunigte Induktionsphase oder eine abweichende Verabreichungsform beinhalten (MUELLER und BETTENAY, 2001; COLOMBO et al., 2005; HOBI und MUELLER, 2014; DEBOER et al., 2016; TIMM et al., 2018).

Bei der so genannten „Rush-Immuntherapie“ (RIT) wird die Induktionsphase stark verkürzt, indem durch Injektion steigender Allergendosen alle 30 bis 60 Minuten die Erhaltungsdosis bereits an einem Tag erreicht wird (MUELLER und BETTENAY, 2001; HOBI und MUELLER, 2014). Möglicherweise kann eine RIT die Dauer bis zum maximalen Wirkungseintritt verkürzen, es liegen jedoch bislang zu wenige Studien vor um diesen Sachverhalt zu prüfen (MUELLER et al., 2005b; HOBI und MUELLER, 2014; MUELLER et al., 2018). Da die RIT unter tierärztlicher Überwachung durchgeführt werden muss, können mögliche Nebenwirkungen, die meist während der Induktionsphase auftreten, gut gemanagt und Fehler im Protokoll bei Injektion durch den Patientenbesitzer vermieden werden (MUELLER und BETTENAY, 2001; HOBI und MUELLER, 2014). Die RIT scheint eine effektive und sichere Alternative zur konventionellen Immuntherapie zu sein, weitere Studien zur Bestätigung der vorläufigen Erkenntnisse sind jedoch notwendig (LOEWENSTEIN und MUELLER, 2009; MUELLER et al., 2018).

Neben der klassischen AIT mittels subkutaner Injektion existieren Protokolle, die eine sublinguale oder intralymphatische Verabreichungsform beinhalten. Für beide Varianten konnte eine Effektivität in der Reduktion von Juckreiz, Läsionen und begleitender Medikation nachgewiesen werden (DEBOER et al., 2016; TIMM et al., 2018). Bei der sublingualen Immuntherapie (SLIT) existieren Berichte über eine sechsmonatige Pilotstudie und eine bisher unveröffentlichte größere, unkontrollierte Studie bei Hunden mit nachgewiesener Allergie gegen Milben (DEBOER und MORRIS, 2012; DEBOER et al., 2016). Eine zweimal tägliche

sublinguale Verabreichung eines flüssigen Allergenextrakts führte zu einer Verbesserung in über 50 % der Patienten (DEBOER und MORRIS, 2012; DEBOER et al., 2016). Etwa die Hälfte der Hunde bei denen eine vorherige subkutane Immuntherapie erfolglos blieb, zeigten ein gutes Ansprechen (DEBOER und MORRIS, 2012). Somit scheint die SLIT eine sinnvolle Alternative zur konventionellen AIT darstellen. Bei der intralymphatischen Immuntherapie (ILIT) wird der Allergenextrakt in einen Lymphknoten injiziert. Es wurde vermutet, dass diese Verabreichungsform zu einer höheren Erfolgsquote und einem schnelleren Wirkungseintritt führen kann (TIMM et al., 2018). Zwei Studien konnten bislang eine Effektivität vergleichbar mit der der konventionellen AIT nachweisen (FISCHER et al., 2016; TIMM et al., 2018). Allerdings war bei nur wenigen Hunden der schnellere Wirkungseintritt sowie längerfristige Wirkungen nachzuweisen. Weitere Studien zur Beurteilung sind also notwendig (FISCHER et al., 2016; MUELLER et al., 2018; TIMM et al., 2018). Insbesondere über Langzeitauswirkungen einer intralymphatischen Immuntherapie kann bisher keine Aussage gemacht werden (MUELLER et al., 2018).

Es konnte bisher keine Überlegenheit einer bestimmten Therapieform über die anderen nachgewiesen werden (OLIVRY et al., 2010a; SARIDOMICHELAKIS und OLIVRY, 2016). Die meist fehlende Standardisierung von Therapieprotokollen und Allergenextrakten führt zu einer großen Variation, die einen Vergleich verschiedener Ansätze sehr schwierig macht. Eine Standardisierung der Allergen-Präparate für die Tiermedizin würde Studien zur Dosisoptimierung ermöglichen und einen Vergleich verschiedener Therapieprotokolle erleichtern. Zukünftige Studien sind somit notwendig um die bestmögliche Form der Immuntherapie zu identifizieren (MUELLER et al., 2018).

## **2.2. Humane atopische Dermatitis im Vergleich**

Die beim Hund häufig und spontan auftretende AD ähnelt klinisch und immunologisch stark der humanen AD (MARSELLA und GIROLOMONI, 2009). Es wird angenommen, dass es sich hierbei um „dieselbe Erkrankung“ in zwei unterschiedlichen Spezies handelt (MUELLER et al., 2018). Aus diesem Grund können validierte Hundemodelle der AD nicht nur zur Erforschung der Pathogenese der Erkrankung dienen, sondern auch Verwendung bei der Erprobung neuer therapeutischer Ansätze finden (MARSELLA und GIROLOMONI, 2009).

Auch beim Menschen handelt es sich um eine komplexe, chronische, entzündliche Hauterkrankung, die etwa 5 - 20 % der Kinder und 3 % der Erwachsenen betrifft (FENNESSY et al., 2000; SILVESTRE SALVADOR et al., 2017). Es bestehen Unterschiede in der Prävalenz im Hinblick auf geographische Lokalisation und ethnische Herkunft (HANIFIN und REED, 2007; BRUNNER und GUTTMAN-YASSKY, 2018). In etwa 60 – 80 % der Fälle tritt die Krankheit erstmals in den frühen Lebensjahren auf (PYUN, 2015). Während einige Patienten mit steigendem Alter aus der Krankheit „herauswachsen“, also eine komplette Remission erlangen und fortan symptomfrei bleiben, zeigen bis zu 40 % der Patienten eine persistierende, lebenslange Erkrankung (PYUN, 2015; KIM et al., 2016). Etwa 25 % der erwachsenen Patienten mit AD zeigen einen Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter (SILVERBERG, 2019).

Ebenso wie beim Hund stellen eine defekte Hautbarriere und eine abnormale Immunantwort auf Umweltallergene einen wichtigen Bestandteil des Krankheitsgeschehens dar (MARSELLA und DE BENEDETTO, 2017).

Die entzündete atopische Haut beinhaltet eine Vielzahl an Zellen, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Hierzu zählen Langerhans-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Fibroblasten sowie verschiedene Lymphozyten-Subtypen (PENG und NOVAK, 2015). Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Allergenerkennung und der Initiation einer Th2-dominierten Immunantwort, wie sie typischerweise bei Mensch und Hund in der frühen Phase der atopischen Dermatitis auftritt (PENG und NOVAK, 2015; OLIVRY et al., 2016; MARSELLA und DE BENEDETTO, 2017). Sie exprimieren den hochaffinen IgE-Rezeptor auf ihrer Oberfläche, der allergenspezifisches IgE bindet und damit Allergene detektieren kann. Nach Allergenerkennung sorgen dendritische Zellen für eine gesteigerte Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine und Chemokine, wodurch sie ein wichtiges verstärkendes Medium der allergischen Entzündung darstellen (NOVAK, 2012). Sogenannte „Innate lymphoid cells“ infiltrieren die atopische Haut und setzen Zytokine des Th2-Typs, wie beispielsweise IL-5, IL-9 und IL13 frei. Hierdurch wird nach einer Stimulation durch Allergene, durch TSLP oder IL-33 die lokale Entzündung verstärkt (SALIMI et al., 2013). Ebenso wie beim Hund gehören beim Menschen IL-4 und IL-13 zu den Hauptmediatoren der Th2-dominierten Immunantwort (WANG et al., 2007; PENG und NOVAK, 2015; OLIVRY et al.,

2016). Sie führt letztlich zu einer IgE-Produktion durch B-Lymphozyten, einer Differenzierung von dendritischen Zellen, einer Aktivierung von T-Lymphozyten sowie einer Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (PENG und NOVAK, 2015). Während bei Hunden mit AD widersprüchliche Ergebnisse zur Menge an Mastzellen in läsionaler Haut vorliegen (WELLE et al., 1999; HAMMERBERG et al., 2001; ABRAMO et al., 2014), findet sich bei Menschen mit AD eine erhöhte Anzahl an Mastzellen in läsionaler Haut, insbesondere von Mastzellen, die IL-31 sezernieren (OTSUKA und KABASHIMA, 2015). Dies bestätigt die Vermutung, dass Mastzellen zur atopischen Dermatitis beitragen (PENG und NOVAK, 2015). Bei Mensch und Hund wird eine Rolle von IL-31 bei der Entstehung von Juckreiz vermutet und es besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe an Serum-IL-31-Werten und dem Schweregrad der AD (RAAP et al., 2008; MARSELLA et al., 2018). Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen beiden Spezies ist, neben dem Th2/Th22-dominierten Phänotyp der Immunantwort in der frühen Phase der AD, eine gemischte Th1/Th2 Immunreaktion in der chronischen Phase der Erkrankung (NUTTALL et al., 2002; SCHLOTTER et al., 2011; GITTLER et al., 2012; OLIVRY et al., 2016).

Eine defekte Hautbarriere spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AD beim Menschen (PENG und NOVAK, 2015). Ebenso wie beim Hund sind nicht nur läsionale Bereiche der Haut betroffen, sondern auch augenscheinlich gesunde Hautpartien (SUAREZ-FARINAS et al., 2011). Ähnlich der cAD ist bei der humanen AD das Stratum corneum maßgeblich an der defekten Hautbarriere beteiligt (VAN SMEDEN und BOUWSTRA, 2016). Neben Veränderungen der Lipidkomposition, der Lipidorganisation und einer reduzierten Expression von strukturellen Proteinen wie Loricrin und Filaggrin, trägt auch die mechanische Belastung durch Juckreiz-induziertes Kratzen zur Beeinträchtigung der Hautbarriere bei (SUAREZ-FARINAS et al., 2011; VAN SMEDEN und BOUWSTRA, 2016). Auch die interzellulären Verbindungen, die „Tight junctions“, sind bei Atopikern beeinträchtigt (ZANIBONI et al., 2016). Eine wichtige Erkenntnis der Erforschung der defekten Hautbarriere bei atopischen Patienten stellt die Entdeckung verschiedener Mutationen des für Filaggrin codierenden Gens dar, die mit einem Funktionsverlust einhergehen (IRVINE et al., 2011). Träger einer Filaggrin-Mutation haben ein erhöhtes Risiko an atopischer



Dermatitis zu erkranken, wodurch eine solche Mutation als wichtiger Prädispositionsfaktor angesehen wird (WAN et al., 2017).

Auch beim Menschen besteht ein starker Zusammenhang zwischen einer defekten Hautbarriere und der überschießenden Immunantwort bei der Pathogenese der AD. Durch die defekte Hautbarriere wird die Penetration von Allergenen vereinfacht und es kommt schneller zu einem Kontakt zwischen Antigen und Antigen-präsentierenden Zellen. Letztere wiederum initiieren nach Allergenkontakt eine Entzündungsreaktion (MARSELLA und DE BENEDETTO, 2017). Die im Rahmen der Immunantwort produzierten und freigesetzten Zytokine sind in der Lage, die Hautbarriere weiter zu schädigen, beispielsweise durch eine reduzierte Expression von Schlüsselproteinen der epidermalen Hautbarriere (PENG und NOVAK, 2015). Hierdurch entsteht ein Teufelskreis, der vermutlich zur Chronizität der Erkrankung beiträgt (MARSELLA und DE BENEDETTO, 2017).

Ebenso wie bei Hunden mit AD kann bei atopischen Menschen ein erhöhtes Vorkommen von Staphylokokken, am häufigsten von *S. aureus*, auf der Haut nachgewiesen werden (KONG et al., 2012). Verglichen mit der Haut gesunder Menschen lag bei Atopikern eine geringere Diversität des Mikrobioms vor (KONG und SEGRE, 2017). Eine Infektion mit Mikroorganismen spielt ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der AD. Zum einen durch die Produktion bestimmter Toxine, die die Hautbarriere schädigen und den Zelltod von Keratinozyten hervorrufen können, zum anderen durch die Auslösung einer Th2-dominierten Entzündungsreaktion via TSLP-Freisetzung durch Keratinozyten (VU et al., 2010; BRAUWEILER et al., 2014).

Bei der Mehrheit der Menschen mit AD können hohe Serum-IgE-Werte gemessen und eine positive Reaktion in einem Hauttest, dem sogenannten „Prick-Test“, beobachtet werden (TOKURA, 2010). Diese Form der AD wird als extrinsische Form bezeichnet, im Gegensatz zur selteneren intrinsischen Form, die sich klinisch nicht von der extrinsischen Form unterscheiden lässt, jedoch durch einen negativen Prick-Test und normale Serum-IgE-Werte charakterisiert wird (TOKURA, 2010). Somit können keine Allergene als Auslöser der Erkrankung mittels Haut- oder Serumtest aufgefunden gemacht werden, vergleichbar mit dem Phänomen der „Atopie-ähnlichen Dermatitis“ des Hundes (HALLIWELL, 2006).

Hinsichtlich des klinischen Bildes der AD beim Menschen existieren ebenfalls einige Parallelen zur AD des Hundes. Im akuten Stadium treten starker Juckreiz und erythematöse Papeln oder Maculae auf (SILVERBERG, 2017). Typischerweise betroffene Körperregionen unterscheiden sich je nach Altersgruppe der Patienten. Bei kleinen Kindern sind Gesicht, Kopfhaut und die Streckseiten von Armen und Beinen am häufigsten betroffen. Ältere Kinder zeigen vermehrt Läsionen an den Beugeseiten der Gliedmaßen, wohingegen bei Erwachsenen überwiegend Kopf, Hals sowie Hände und weniger die Beugeseiten der Extremitäten betroffen sind (SILVERBERG et al., 2018). Aufgrund von Juckreizbedingter Selbsttraumatisierung treten im Verlauf der Erkrankung sekundäre Läsionen wie Exkorationen, nässende Dermatitis und Lichenifikation auf (SILVERBERG, 2017).

Beim Menschen stellt die atopische Dermatitis häufig die erste klinische Manifestation eines allergischen Krankheitsgeschehens mit dem Namen „atopischer Marsch“ dar. Unter dem atopischen Marsch versteht man das sequenzielle Voranschreiten einer atopischen Erkrankung, beziehungsweise deren Ausbreitung auf andere Organsysteme (SPERGEL und PALLER, 2003). So können Patienten mit atopischer Dermatitis nach und nach ebenso eine allergische Rhinitis und/oder allergisches Asthma entwickeln (SPERGEL und PALLER, 2003). In einer Studie entwickelten 43 % der Kinder mit atopischer Dermatitis allergisches Asthma und 45 % eine allergische Rhinitis (GUSTAFSSON et al., 2000). Der Schweregrad der AD stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung von Asthma und allergischer Rhinitis dar (SCHAFER et al., 1999; GUSTAFSSON et al., 2000). So ist das Risiko bei moderat bis schwer mit AD betroffenen Kinder höher als bei Kindern mit milder Ausprägung der AD (VON KOBYLETZKI et al., 2012). Der atopische Marsch ist ein Phänomen, das beim Hund nicht auftritt und stellt somit einen wichtigen Unterschied in der Erkrankung zwischen Menschen und Hunden dar (MARSELLA und DE BENEDETTO, 2017).

Wieder eine Gemeinsamkeit beider Spezies ist die Diagnosestellung der AD. Genau wie beim Hund basiert die Diagnosestellung der AD beim Menschen auf der Krankengeschichte des Patienten, dem klinischen Erscheinungsbild und dem Ausschluss anderer Hauterkrankungen (EICHENFIELD et al., 2017).

Therapeutisch stehen neben der Vermeidung von Kontakt zu Allergenen und irritierenden Faktoren verschiedenste Modalitäten zur Verfügung. Der Einsatz von

lokalen nicht-pharmakologischen und pharmakologischen Substanzen, von Phototherapie, systemischer Pharmakotherapie oder von Biologika sollte an jeden Patienten individuell angepasst werden (EICHENFIELD et al., 2017).

Zur Verbesserung der Hautfeuchtigkeit werden Bäder mit warmem Wasser und gegebenenfalls pH-neutralen, nicht parfümierten hypoallergenen Seifen mit anschließendem Einsatz von feuchtigkeitsspendenden Cremes, Salben oder Lotionen empfohlen (EICHENFIELD et al., 2017). Feuchtigkeitsspendende Präparate verbessern die Hautbarriere und führen zu einem reduzierten TEWL. Sie werden bei milder AD als primäre Therapie und bei moderater bis schwerer AD begleitend zu anderen Therapieansätzen eingesetzt, wobei sie einen sparenden Effekt verschreibungspflichtiger Medikamente ausüben können. Sie finden Anwendung in akuter Erkrankung, in der erhaltenden Therapie und auch zur Prävention weiterer Schübe (SCHNEIDER et al., 2013; EICHENFIELD et al., 2014).

Wenn die Therapie mit nicht-pharmakologischen Präparaten versagt, kommen zunächst lokal anwendbare Präparate mit pharmakologischen Eigenschaften zum Einsatz. Hierzu zählen überwiegend Glukokortikoide und Calcineurininhibitoren, für die eine Effektivität in der Therapie der akuten AD bei täglicher Anwendung sowie das Potential zur Vermeidung eines Rückfalls bei proaktiver Verabreichung zwei- bis dreimal in der Woche nachgewiesen wurde (SCHNEIDER et al., 2013; EICHENFIELD et al., 2014). In Bereichen mit dünner Haut ist beim Einsatz von Glukokortikoiden Vorsicht geboten, aufgrund lokaler Nebenwirkungen wie Hautatrophie und Teleangiektasie. Hier werden Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus oder Pimecrolimus bevorzugt, wobei diese Präparate nur bei Kindern über zwei Jahren und Erwachsenen angewendet werden dürfen (SCHNEIDER et al., 2013; EICHENFIELD et al., 2014).

In Fällen einer AD, die sich als therapieresistent auf lokale Therapie herausstellt, ist eine systemische Therapie notwendig. In Abhängigkeit des Patientenalters, der Krankengeschichte, der Kosten und Verfügbarkeit kommen eine Phototherapie, der Einsatz systemischer Glukokortikoide, anderer Immunsuppressiva oder Biologika infrage (SCHNEIDER et al., 2013; SIDBURY et al., 2014; EICHENFIELD et al., 2017). Zu den empfohlenen immunmodulatorischen Wirkstoffen gehören Ciclosporin, Methotrexat, Mycophenolat-Mofetil und Azathioprin (SIDBURY et al., 2014). Systemische Glukokortikoide sollten nur kurzfristig zur Therapie akuter

Schübe eingesetzt werden. Es wird von einem langfristigen Einsatz und einem Einsatz bei Kindern abgeraten (SCHNEIDER et al., 2013; SIDBURY et al., 2014). Die Wirksamkeit systemischer Antihistaminika wird kontrovers diskutiert, weshalb ein sporadischer Einsatz von Präparaten mit sedativer Wirkung lediglich bei Patienten empfohlen wird, die juckreiz-bedingte Schlafprobleme aufweisen (SCHNEIDER et al., 2013; SIDBURY et al., 2014). Seit 2017 ist Dupilumab, ein humaner monoklonaler Antikörper gegen den IL-4-Rezeptor  $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ), als erstes Biologikum zur Therapie von adulten Patienten mit therapieresistenter mittel- bis hochgradiger atopischer Dermatitis zugelassen (DELEANU und NEDELEA, 2019). IL-4R $\alpha$  ist ein Bestandteil wichtiger Rezeptoren, die die biologische Funktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 mediiieren (WANG und BECK, 2016). Durch die Bindung des Antikörpers an IL-4R $\alpha$  wird der durch IL-4 und IL-13 vermittelte fördernde Effekt auf die allergische Entzündung blockiert (DELEANU und NEDELEA, 2019). Eine Therapie mit Dupilumab zeigte sich effektiv in der Verbesserung von Hautläsionen sowie in der Reduktion von Juckreiz und damit einhergehend einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten (BECK et al., 2014). In einer Studie konnte unter Therapie eine reduzierte Expression von Th2-Biomarkern und Genen, die mit einer T-Zell-Aktivierung assoziiert sind, beobachtet werden. Nach vier Wochen unter Dupilumab-Therapie konnte eine Annäherung des Transkriptoms von läsionaler atopischer Haut an das von nicht-läsionaler Haut beobachtet werden (HAMILTON et al., 2014). Nemolizumab, ein humaner monoklonaler Antikörper gegen den IL-31-Rezeptor A (IL-31RA), ist ein Biologikum, das auf eine Minderung des IL-31-medierten Juckreizes abzielt, ähnlich der Wirkung von Lokivetmab bei Hunden (RUZICKA et al., 2017). Eine randomisierte, Placebo-kontrollierte Studie wies eine signifikante Verbesserung des Juckreizes bei erwachsenen Patienten mit mittel- bis hochgradiger AD unter Therapie mit Nemolizumab nach (RUZICKA et al., 2017). Nemolizumab ist noch nicht zugelassen und es bedarf weiterer Studien um die Langzeiteffektivität sowie die Sicherheit der Therapie zu beurteilen (DELEANU und NEDELEA, 2019). Neben vielen weiteren Biologika und niedermolekularen Stoffen werden auch Janus-Kinase-Inhibitoren als Therapeutikum für die humane AD erforscht (WANG und BECK, 2016). Im Gegensatz zur Tiermedizin gibt es für den Menschen bisher noch kein zugelassenes Präparat (MARSELLA und DE BENEDETTO, 2017).

Eine Allergen (-spezifische) Immuntherapie wird beim Menschen bislang überwiegend zur Therapie des allergischen Asthmas und wenig bei der atopischen Dermatitis eingesetzt (DELEANU und NEDELEA, 2019). Es existieren Daten, die für das Potential einer AIT sprechen, den klinischen Verlauf der AD zu verbessern und eine Reduktion lokal angewandter Glukokortikoide zu ermöglichen (WERFEL et al., 2006; BAE et al., 2013). Die Grundlage der Beweise für eine Wirksamkeit ist jedoch nur von mäßiger Qualität (BAE et al., 2013). Aufgrund des aktuellen Wissensstands wird daher eine AIT zur Therapie der AD beim Menschen nicht angeraten (DELEANU und NEDELEA, 2019). In schweren, unkontrollierbaren Fällen kann eine AIT jedoch in Betracht gezogen werden, da es keine Kontraindikationen gibt und eine AIT keine Verschlechterung der AD hervorruft (DARSOW, 2012; BAE et al., 2013).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Untersuchungsobjekte und Gewebeproben**

Um rassebedingte Variationen der miRNA-Expression zu minimieren wurden ausschließlich Labrador und Golden Retriever in die Studie eingeschlossen. Es wurden Hautproben von drei unterschiedlichen Gruppen, nämlich von Hunden mit atopischer Dermatitis, Hunden mit nicht-allergischer Hauterkrankung und hautgesunden Kontrollhunden, untersucht. Für die beiden Gruppen mit erkrankter Haut wurden zur Untersuchung Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben läsionaler Haut von Labrador und Golden Retrievern mit atopischer Dermatitis und nicht-allergischen Hauterkrankungen aus dem Archiv eines kommerziellen Labors für Tierpathologie (Fachpraxis für Tierpathologie München) verwendet. Außer einer Gewebeprobe aus dem Jahr 2017 wurden alle anderen im Laufe des Jahres 2016 entnommen und zur histopathologischen Untersuchung eingesandt. Vorbericht, klinisches Bild und histopathologischer Bericht wurden für jeden Patienten überprüft und, falls erforderlich und angebracht, zusätzliche Informationen durch telefonische Kontaktierung der einsendenden Tierärzte eingeholt. Einschlusskriterien für die Gruppe der atopischen Dermatitis waren ein mit atopischer Dermatitis übereinstimmender Vorbericht, ein typisches klinisches Bild sowie ein passender histopathologischer Bericht. Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn sie innerhalb von 14 Tagen vor Probenentnahme mit Glukokortikoiden, Antihistaminika, Immunsuppressiva oder Janus-Kinase-Inhibitoren behandelt wurden, um Wirkstoff-bedingte Veränderungen der miRNA-Expression auszuschließen. Für die Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen wurden Gewebeproben mit histopathologischer Diagnose einer Mykose, einer Demodikose und kutanem Mastzelltumor ausgewählt. Patienten wurden nur eingeschlossen, wenn sie keine vorberichtlichen, klinischen oder histopathologischen Anzeichen einer atopischen Dermatitis aufwiesen. Außerdem wurden dieselben Ausschlusskriterien die Medikation betreffend angewandt.

Die Gewebeproben der gesunden Kontrolltiere wurden prospektiv im Jahr 2016 gesammelt. Labrador und Golden Retriever, die zu verschiedenen chirurgischen Eingriffen in den Kleintierkliniken Hofheim und Oberhaching vorgestellt wurden, wurden auf ihre Eignung zur Studie überprüft. Für einen Einschluss in die Studie

mussten die Patienten gesunde Haut haben und es durfte weder anhand des Vorberichts, noch anhand des klinischen Erscheinungsbildes der Verdacht auf das Vorliegen einer AD oder eine anderen Hauterkrankung bestehen. Auch diese Patienten durften 14 Tage vor ihrem operativen Eingriff keine der vorher genannten Medikamente verabreicht bekommen haben. Anstatt eines geraden Hautschnitts wurde eine spindelförmige Inzision durchgeführt, um die Gewebeprobe zu gewinnen. Damit wurden den Tieren keine zusätzlichen Schmerzen, Leiden oder Schäden zugefügt. Das Hautstück wurde unmittelbar in 10 % neutral-gepuffertes Formalin gegeben und maximal über drei Tage fixiert. Anschließend wurde die Probe gemäß des Routineverfahrens für dermatohistopathologische Proben des Instituts für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München in Paraffin eingebettet.

Für jeden Hund lag eine Gewebeprobe zur Untersuchung vor.

Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission des Zentrums für Klinische Tiermedizin der LMU München überprüft und unter der Nummer 62-13-02-2016 zugelassen.

## **2. Auswahl der miRNAs**

Zur Untersuchung wurden 18 miRNAs ausgewählt, nämlich miR-18b, miR-21, miR-34b, miR-124, miR-142, miR-143, miR-146a, miR-146b, miR-155, miR-193b, miR-202, miR-215, miR-223, miR-363, miR-409, miR-423a, miR-451 und miR-1839. Als endogene Referenz-miRNAs wurden SNORD95 und RNU6 verwendet. Die Auswahl basiert auf einer Kombination von Ergebnissen einer Literaturrecherche, einer zuvor durchgeführten Pilotstudie und bisher unveröffentlichten Ergebnissen einer miRNA-Expressionsanalyse bei Beagles von Veterinärdermatologen aus Florida unter der Leitung von Dr. Domenico Santoro.

Bei der Literaturrecherche wurden auf der Online-Datenbank „PubMed“ veröffentlichte Studien zu dem Schlagwort „miRNA“ in Kombination mit „atopic dermatitis“, „atopy“, „allergic dermatitis“, „skin“ und deren Variationen durchsucht und auf ihre Relevanz überprüft. Da nach bestem Wissen der Autorin keine Veröffentlichungen dieses Themas bei Hunden existieren, wurde das Augenmerk auf Studien des Menschen, von Mausmodellen oder Zellkulturen gelegt.

Die Pilotstudie umfasste die Untersuchung einer gesunden Hautprobe und einer Hautprobe eines Hundes mit atopischer Dermatitis unter Verwendung eines *Dog miRNome miScript miRNA PCR Arrays (V16.0, 384-Well)* (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Dieser Array untersucht die Expression der, gemäß der Datenbank „miRBase“ Version 16 verzeichneten 277 meist exprimierten und am besten charakterisierten miRNA-Sequenzen des Hunde-miRNA-Genoms (miRNome).

### 3. RNA-Extraktion

Überschüssiges Paraffin wurde mithilfe eines Skalpells von den Blöcken entfernt, bevor sie in 10 µm dünne Schnitte mittels Mikrotom *Microm HM360* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) geschnitten wurden. Die ersten Schnitte wurden verworfen, um eine Kontamination zu verhindern und da die Oberfläche der Blöcke während der Lagerungszeit der Luft ausgesetzt war. Je nach Größe der eingebetteten Gewebeprobe wurden 1 - 6 Schnitte à 10 µm pro Block erstellt, um eine ungefähre Materialoberfläche von 750 mm<sup>2</sup> zu erreichen. Alle Schnitte einer Probe wurden in ein 2,0 ml *Safe-Lock-Röhrchen* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gegeben. Proben der AD-Gruppe wurden mit dem Buchstaben „A“ für „Atopic Dermatitis“ und fortlaufenden Nummern, die Proben der nicht-allergischen Hauterkrankungen mit dem Buchstaben „I“ für „Inflammation“ und fortlaufenden Nummern und die gesunden Kontrollproben mit dem Buchstaben „C“ für „Control“ und fortlaufenden Nummern beschriftet.

Unter Verwendung des *miRNeasy FFPE Kits* (QIAGEN) wurde dem Protokoll „Purification of total RNA, including miRNA, from FFPE tissue sections“ des Herstellers gefolgt und somit die Gesamt-RNA extrahiert. Demnach wurden zu den Schnitten 320 µl Deparaffinierungslösung gegeben und diese durch vortexen miteinander vermischt, gefolgt von einer anschließenden kurzen Zentrifugation. Das Gemisch wurde für 3 Minuten bei 56 °C inkubiert und dann bei Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden 240 µl des PKD-Puffers hinzugegeben, das Röhrchen erneut gevortext und für 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. In die entstandene untere klare Phase wurden dann 10 µl Proteinase K pipettiert. Es folgten zwei Inkubationsphasen, bei denen die Röhrchen zusätzlich geschüttelt wurden, zunächst für 15 Minuten bei 56 °C, gefolgt von 15 Minuten bei 80 °C. Die untere klare Phase wurde im Anschluss in ein neues 1,5 ml Röhrchen abpipettiert und für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für



15 Minuten bei 20.000 x g wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt, ohne das entstandene Pellet zu verwirbeln. Nun wurden 25 µl des Puffers *DNase Booster Buffer* und 10 µl der *DNase I Stock Solution* hinzugefügt, und durch Umdrehen des Röhrchens vermischt, um die empfindliche DNase nicht zu beschädigen. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde die Mischung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µl des RBC-Puffers und 1750 µl Ethanol 100 % hinzu pipettiert und gemischt. Von der entstandenen Mischung wurden 700 µl in die mitgelieferte *RNeasy MinElute Spin Column* gegeben, die vorher in ein 2 ml Auffangröhrchen gesetzt wurde. Bei geschlossenem Deckel wurde die Spin-Säule inklusive Auffangröhrchen für 15 Sekunden bei > 8.000 x g zentrifugiert und der Flow-through anschließend verworfen. Folgend wurden erneut 700 µl des Gemischs in die Spin-Säule gegeben und die folgenden Schritte wiederholt, bis das gesamte Volumen verbraucht wurde. Danach wurden 500 µl des RPE-Puffers in die Säule pipettiert, diese für 15 Sekunden bei > 8.000 x g bei geschlossenem Deckel zentrifugiert und der Flow-through verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal mit einer Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 2 Minuten wiederholt. Im Anschluss wurde der Flow-through zusammen mit dem Auffangröhrchen verworfen. Die Spin-Säule wurde nun vorsichtig entnommen und in ein neues 2,0 ml Röhrchen gegeben. Bei offenem Deckel wurde das Röhrchen für 5 Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert und der Flow-through mit dem Auffangröhrchen verworfen. Die Spin-Säule wurde erneut in ein neues 1,5 ml Röhrchen gesetzt und dann mit 25 µl RNase-freiem Wasser gefüllt. Um die RNA aus der Säule in dem RNase-freien Wasser zu lösen, wurde diese bei geschlossenem Deckel für 1 Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die RNA-Ausbeute wurde mittels *NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) gemessen. Als Leerkontrolle wurde RNase-freies Wasser verwendet.

Die extrahierte Gesamt-RNA wurde im Anschluss bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **4. Reverse Transkription**

Die Gesamt-RNA einer jeden Probe wurde mithilfe des *miScript II RT Kits* (QIAGEN) gemäß der Herstellerangaben in die komplementäre DNA (cDNA)

revers transkribiert. Die RNA einer jeden Probe wurde in einem Reaktionsröhrchen abhängig von ihrer Konzentration so mit RNase-freiem Wasser verdünnt, dass letztlich 12 µl Volumen mit einem RNA-Gehalt von 400 ng vorlagen. Die Röhrchen wurden dann auf Eis gelagert. Folgend wurde, ebenfalls auf Eis, der *Reverse-Transkription-Master-Mix* aus den in Tabelle 1 genannten Komponenten hergestellt.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des *Reverse-Transkription-Master-Mix*

<b>Komponente</b>	<b>Menge/Reaktion</b>
<i>5x miScript HiSpec Buffer</i>	4 µl
<i>10x miScript Nucleics Mix</i>	2 µl
<i>miScript Reverse Transcriptase Mix</i>	2 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8 µl</b>

Zu den 12 µl verdünnter RNA, die als Vorlage für die reverse Transkription diente, wurden anschließend 8 µl des *Reverse-Transkription-Master-Mix* hinzu pipettiert, sodass das Gesamtvolumen pro Röhrchen 20 µl betrug. Die Röhrchen wurden dann für den Vorgang der reversen Transkription für 60 Minuten bei 37 °C in einem *Mastercycler ep gradient S* (Eppendorf AG) inkubiert, gefolgt von 5 Minuten bei 95 °C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase. Als Kontrolle (No RT Kontrolle) wurde eine Mischung aus RNA, Puffer und Nukleinsäuren-Mix ohne den Reverse-Transkriptase-Mix eingeschlossen.

## 5. Quantitative Real-Time PCR

Zur Durchführung der quantitativen Real-Time PCR wurde das *miScript SYBR Green PCR Kit* (QIAGEN) gemäß dem vorgeschriebenen Protokoll für den Einsatz von *miScript Primer Assays* (QIAGEN) verwendet. Als miRNA-spezifische Vorwärtsprimer wurden die folgenden *miScript Primer Assays* benutzt: *cf\_miR-18b\_1*, *cf\_miR-21\_2*, *cf\_miR-34b\_1*, *cf\_miR-124\_1*, *cf\_miR-142\_1*, *cf\_miR-143\_1*, *cf\_miR-146a\_1*, *cf\_miR-146b\_1*, *cf\_miR-155\_1*, *cf\_miR-193b\_1*, *cf\_miR-202\_1*, *cf\_miR-215\_1*, *cf\_miR-223\_1*, *cf\_miR-363\_1*, *cf\_miR-409\_1*, *cf\_miR-423a\_1*, *cf\_miR-451\_1* und *cf\_miR-1839\_1*. Als endogene Kontroll-Assays wurden *hs\_RNU6-2\_11* und *SNORD95* hinzugefügt.

Die cDNA enthaltenen 20  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung der reversen Transkription wurden mit je 200  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser verdünnt. Dann wurde eine Reaktionsmischung bestehend aus *QuantiTect SYBR Green PCR Mix*, *miScript Universal-Primer*, *miScript Primer Assay* und RNase-freiem Wasser für jede zu untersuchende miRNA zubereitet und zusammen mit 1  $\mu\text{l}$  der verdünnten cDNA als Matrize in die Vertiefungen einer PCR-Platte gegeben (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Reaktionsmischung zum Nachweis von miRNAs mithilfe des *miScript SYBR Green PCR Kits* und *miScript Primer Assays*

<b>Komponente</b>	<b>Menge/Reaktion</b>
<i>2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix</i>	5 $\mu\text{l}$
<i>10x miScript Universal Primer</i>	1 $\mu\text{l}$
<i>10x miScript Primer Assay</i>	1 $\mu\text{l}$
RNase-freies Wasser	2 $\mu\text{l}$
Verdünnte cDNA	1 $\mu\text{l}$
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

Alle Proben wurden in doppelter Ausführung analysiert, sodass für jede miRNA zwei Vertiefungen je Probe mit der spezifischen Reaktionsmischung und der jeweiligen verdünnten cDNA der Probe bestückt wurden. Die negativen Kontrollproben bestanden zum einen aus Gesamt-RNA ohne reverse Transkription (No RT Kontrolle), zum anderen aus der Reaktionsmischung ohne Zugabe von cDNA (No Template Control). Insgesamt kamen vier 384-Well PCR-Platten namens *Framestar 384* (4titude Ltd, Wotton, Dorking, UK) zum Einsatz. Die Platten wurden nach ihrer Bestückung versiegelt und für 3 Minuten bei 410 x g zentrifugiert.

Die qPCR wurde unter Verwendung eines *QuantStudio 6 Flex* (Applied Biosystems, Life technologies, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Die DNA-Polymerase wurde durch Inkubation bei 95 °C für 15 Minuten aktiviert, gefolgt von 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (94 °C, 15 Sekunden), Primer-hybridisierung (55 °C, 30 Sekunden) und Extension (72 °C, 30 Sekunden).

Eine Übersicht der verwendeten Geräte findet sich in Tabelle 3.

**Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Microm HM360</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Mixer Uzusio VTX-3000L</i>	LMS Co., Ltd, Tokyo, Japan
<i>Centrifuge 5417 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Heraeus Multifuge 3 L-R</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer</i>	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
<i>Mastercycler ep gradient S</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>QuantStudio 6 Flex</i>	Applied Biosystems, Life technologies, Carlsbad, CA, USA

## 6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mithilfe des von QIAGEN zur Verfügung gestellten *Data Analysis Center* durchgeführt. Fold Change-Werte  $> 2$  und  $< 0,5$  wurden als Indikatoren einer Hoch-, beziehungsweise Herunterregulation festgelegt. Unterschiede der Expressionslevels wurden mittels Student's *t*-test ermittelt, wobei p-Werte unter 0,05 als statistisch signifikant angesehen wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) wurden mit *GraphPad QuickCalcs* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) berechnet.



## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Untersuchungsobjekte**

Die Gruppe der gesunden Kontrolltiere und die Gruppe der Hunde mit atopischer Dermatitis bestanden aus jeweils sieben Hunden, davon vier Golden Retriever und drei Labrador Retriever. Fünf Hunde, davon ein Golden Retriever und vier Labrador Retriever mit nicht-allergischen Hauterkrankungen erfüllten die Anforderungen für eine Studienteilnahme. Die detaillierten Informationen zu den eingeschlossenen Studienobjekten finden sich in Tabelle 4.

**Tabelle 4:** Patientendaten der in die Studie eingeschlossenen Retriever

<b>Nummer</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Hauterkrankung</b>
<b>Gesunde Hunde</b>				
<b>C1</b>	GR	7	M	Keine
<b>C2</b>	GR	10	M	Keine
<b>C3</b>	LR	10	MK	Keine
<b>C4</b>	GR	7	WK	Keine
<b>C5</b>	LR	3	WK	Keine
<b>C6</b>	LR	8	MK	Keine
<b>C7</b>	GR	4	M	Keine
<b>Atopische Hunde</b>				
<b>A1</b>	GR	7	M	AD
<b>A2</b>	GR	10	M	AD
<b>A3</b>	GR	6	M	AD
<b>A4</b>	GR	8	MK	AD
<b>A5</b>	LR	6	M	AD
<b>A6</b>	LR	6	MK	AD
<b>A7</b>	LR	4	M	AD
<b>Hunde mit nicht-allergischer Hauterkrankung</b>				
<b>I1</b>	LR	3	M	Mykose
<b>I2</b>	LR	9	M	Mykose
<b>I3</b>	LR	10	M	Demodikose
<b>I4</b>	LR	5	W	Mastzelltumor
<b>I5</b>	GR	10	W	Mastzelltumor

GR = Golden Retriever, LR = Labrador Retriever, M = männlich, W = weiblich, MK = männlich kastriert, WK = weiblich kastriert, AD = Atopische Dermatitis

## 2. qRT-PCR

Der durchschnittliche Gesamtgehalt der RNA  $\pm$  SD (ng/ $\mu$ l), der bei der gesunden Kontrollgruppe extrahiert wurde betrug  $53,27 \pm 28,29$  ng/ $\mu$ l, der der AD-Gruppe  $117,55 \pm 46,49$  ng/ $\mu$ l und der der Gruppe nicht-allergischer Hauterkrankungen  $132,72 \pm 31,52$  ng/ $\mu$ l. Der RNA-Gehalt einer jeden Probe ist in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** RNA-Gehalt (ng/ $\mu$ l) aller Einzelproben

Atopische Dermatitis		Gesund		Nicht-allergische Hauterkrankungen	
Nr.	RNA-Gehalt	Nr.	RNA-Gehalt	Nr.	RNA-Gehalt
A1	116,3	C1	24,5	I1	154,4
A2	155,9	C2	111,7	I2	108,5
A3	41,2	C3	45,5	I3	89,5
A4	167,7	C4	34,1	I4	154,4
A5	133,6	C5	60,6	I5	156,8
A6	139,7	C6	44,5		
A7	68,5	C7	52,0		

Alle ausgewählten miRNAs konnten in allen Proben detektiert werden, mit Ausnahme von miR-34b, dessen Expression in vier Proben (N1, A5, E4, E5) unentdeckt blieb, und miR-202, dessen Expression in zehn Proben (N1 - 3, N5 - 7, A2, A4, E4, E5) nicht nachgewiesen werden konnte. Diese zwei miRNAs wurden daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Beide Mastzelltumor-Proben (I4 und I5) der Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen wurden ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da die Expression von acht, beziehungsweise vier miRNAs (miR-18b, miR-34b, miR-124, miR-193b, miR-202, miR-215, miR-363 und miR409) unbestimmt blieb.

Die Expression von acht miRNAs war zwischen der gesunden Kontrollgruppe und Hunden mit Hauterkrankungen statistisch signifikant unterschiedlich (Fold Change (FC)  $> 2$ ;  $< 0,5$  und  $p < 0,05$ , Student's *t*-Test). Sieben miRNAs zeigten eine gesteigerte Expression, wobei die Expressionsunterschiede, gemessen in Fold Changes, Werte von 2,1 bis 9,1 aufwiesen. Eine miRNA zeigte eine reduzierte



Expression mit einem Fold Change von 0,4. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Signifikant hoch- und herunterregulierte miRNAs der atopischen und nicht-allergischen Dermatitis-Proben im Vergleich zu gesunder Haut

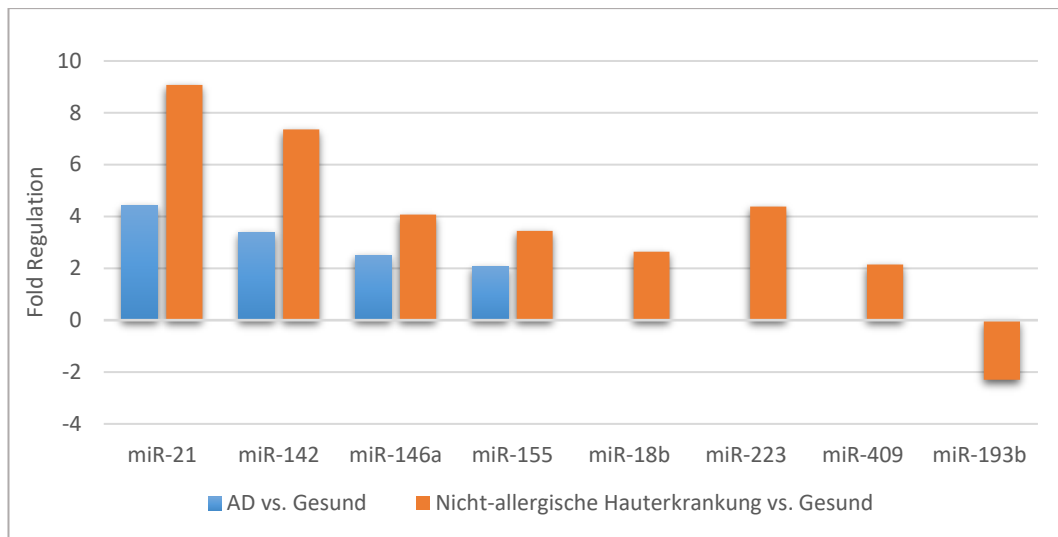
AD vs. Gesund			Nicht-allergische Hauterkrankungen vs. Gesund		
miRNA	Fold Change	p-Wert	miRNA	Fold Change	p-Wert
<b>Hochreguliert (Fold Change &gt; 2; p &lt; 0,05)</b>					
<b>miR-21</b>	4,42	0,0013	<b>miR-21</b>	9,08	0,0000
<b>miR-142</b>	3,40	0,0116	<b>miR-142</b>	7,36	0,0012
<b>miR-146a</b>	2,51	0,0002	<b>miR-146a</b>	4,08	0,0004
<b>miR-155</b>	2,07	0,0049	<b>miR-155</b>	3,44	0,0052
			<b>miR-18b</b>	2,64	0,0081
			<b>miR-223</b>	4,38	0,0095
			<b>miR-409</b>	2,15	0,0129
<b>Herunterreguliert (Fold Change &lt; 0,5; p &lt; 0,05)</b>					
			<b>miR-193b</b>	0,43	0,0142

Im Vergleich der AD-Gruppe mit der Gruppe der gesunden Hunde zeigten sich vier miRNAs signifikant überexprimiert. Dies waren miR-21, miR-142, miR-146a und miR-155. Dieselben vier und drei zusätzliche miRNAs (miR-18b, miR-223 und miR-409) wurden in der Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen im Vergleich zur gesunden Gruppe signifikant überexprimiert. In dieser Gruppe wurde mit miR-193b die einzige miRNA mit signifikanter Unterexpression gefunden (Tabelle 6). Die Richtung der Expressionsveränderungen jeder miRNA mit  $p < 0,05$  war bei beiden Hauterkrankungsgruppen gleich, der einzige Unterschied bestand im Grad der Über- oder Unterexpression. Die Gruppe der gemischten Hauterkrankungen wies in allen Fällen größere Fold Change-Werte auf (Abbildung 1).

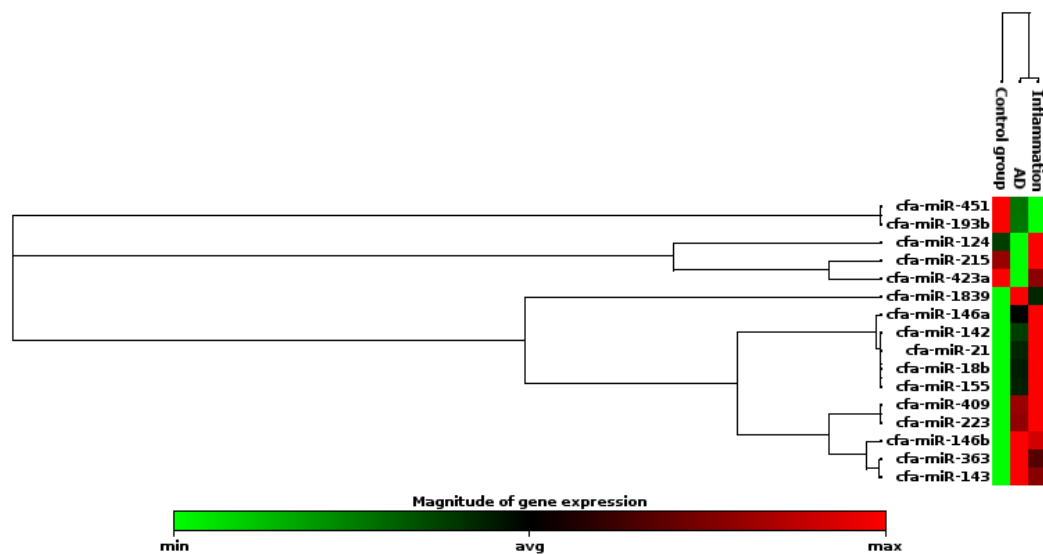
Eine Übersicht der relativen Expression aller miRNAs beider Testgruppen, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe, findet sich in Tabelle 7.

**Tabelle 7:** Relative Expression aller miRNAs beider Testgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Fold Regulation stellt den negativen Kehrwert des Fold Changes dar und repräsentiert die Werte in einer biologisch sinnvollen Weise.

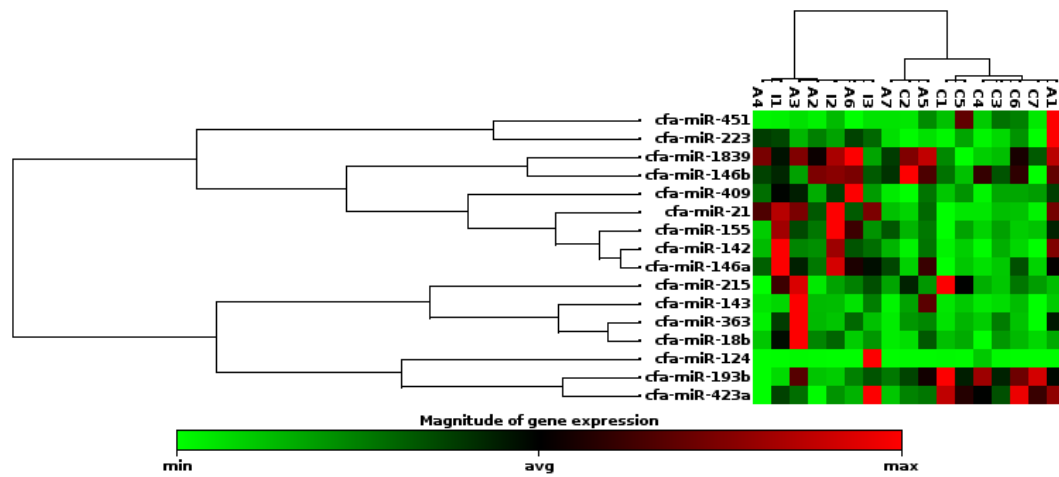
AD vs. Gesund				Nicht-allergische Hauterkrankungen vs. Gesund			
miRNA	Fold Change	Fold Regulation	p-Wert	miRNA	Fold Change	Fold Regulation	p-Wert
miR-18b	1,73	1,73	0,2019	miR-18b	2,64	2,64	0,0081
miR-21	4,42	4,42	0,0013	miR-21	9,08	9,08	0,0000
miR-34b	0,53	-1,87	0,1149	miR-34b	0,77	-1,28	0,4923
miR-124	0,38	-2,61	0,2373	miR-124	2,00	2,00	0,1552
miR-142	3,40	3,4	0,0116	miR-142	7,36	7,36	0,0012
miR-143	1,63	1,63	0,1867	miR-143	1,48	1,48	0,1783
miR-146a	2,51	2,51	0,0002	miR-146a	4,08	4,08	0,0004
miR-146b	1,69	1,69	0,4367	miR-146b	1,63	1,63	0,6913
miR-155	2,07	2,07	0,0049	miR-155	3,44	3,44	0,0052
miR-193b	0,58	-1,71	0,0252	miR-193b	0,43	-2,30	0,0142
miR-202	0,53	-1,87	0,1149	miR-202	0,77	-1,28	0,4923
miR-215	0,68	-1,46	0,4386	miR-215	1,07	1,07	0,9868
miR-223	3,66	3,66	0,0725	miR-223	4,38	4,38	0,0095
miR-363	1,48	1,48	0,1830	miR-363	1,32	1,32	0,3083
miR-409	1,93	1,93	0,0675	miR-409	2,15	2,15	0,0129
miR-423a	0,68	-1,46	0,0269	miR-423a	0,92	-1,07	0,7877
miR-451	0,67	-1,47	0,9016	miR-451	0,55	-1,79	0,3122
miR-1839	1,75	1,75	0,0056	miR-1839	1,32	1,32	0,3475



**Abbildung 1:** Expressionsunterschiede der signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs zwischen den Testgruppen und der Kontrollgruppe. Die Fold Regulation stellt den negativen Kehrwert des Fold Changes dar und repräsentiert die Werte in einer biologisch sinnvollen Weise.



**Abbildung 2:** Gruppenbasierte nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse. Die Farbe Rot steht für eine hohe, die Farbe Schwarz eine durchschnittliche und die Farbe Grün eine niedrige Expression der miRNAs. Dendrogramme zeigen eine ähnliche miRNA-Expression von Proben, beziehungsweise eine Co-Regulation von miRNAs an.



**Abbildung 3:** Nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse der Einzelproben. Die Farbe Rot steht für eine hohe, die Farbe Schwarz eine durchschnittliche und die Farbe Grün eine niedrige Expression der miRNAs. Dendrogramme zeigen eine ähnliche miRNA-Expression von Proben, beziehungsweise eine Co-Regulation von miRNAs an.

Abbildung 2 und Abbildung 3 zeigen die Ergebnisse einer nicht-überwachten hierarchische Clusteranalyse, die basierend auf der miRNA-Expression der Proben durchgeführt wurde. Bei dieser Analyse wurden die Proben unabhängig davon, welcher Gruppe sie ursprünglich angehörten, ausschließlich anhand der Ähnlichkeit ihrer miRNA-Expression gruppiert. Außerdem zeigt die erzeugte Heatmap mittels einer Farbcodierung den Grad der Expression der miRNAs an. Die zusätzlich generierten Dendrogramme geben einen Überblick über die Ähnlichkeit von Proben untereinander (anhand ihrer miRNA-Expression) oder zeigen, im Falle der einzelnen miRNAs, eine mögliche Co-Regulation an.

Anhand des Clusterings wurden fast alle Proben gesunder Haut von denen erkrankter Haut separiert. Lediglich die Proben A1 und A5 waren vermischt mit den Proben gesunder Haut. Das Dendrogramm zeigt, dass eine große Ähnlichkeit der miRNA-Expression zwischen den Proben A2 - 4, A6 und A11 - 3 vorliegt. Die Proben sind innerhalb dieser Gruppierung allerdings untereinander vermischt, sodass eine Unterscheidung der Proben aus der Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen von den Proben der atopischen Dermatitis anhand der miRNA-Expression nicht möglich ist. Wie in der Gruppenübersicht der Clusteranalyse gut zu sehen ist, unterscheidet sich die miRNA-Expression gesunder Haut von der Expression erkrankter Haut. Die miRNAs mit einer hohen Expression in entzündeter Haut zeigen überwiegend eine niedrige Expression in gesunder Haut,

und umgekehrt. Auch die Aufzweigung des Dendrogramms verdeutlicht erneut, dass sich die Gruppe der AD und die Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen ähnlich sind und sich von der Kontrollgruppe unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen der Gruppe der atopischen Dermatitis und der Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen anhand der Clusteranalyse ist nicht möglich.

Die signifikant überexprimierten miRNAs der AD-Gruppe gruppierten sich bei der Analyse nebeneinander und die Aufzweigungen des Dendrogramms zeigen, dass diese miRNAs möglicherweise co-reguliert werden.

## V. DISKUSSION

In dieser Studie wurde die kutane Expression von 18 Ziel-miRNAs aus gesunden, atopischen und nicht-allergisch entzündeten Hautproben von Labrador und Golden Retrievern untersucht. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen gesunder und entzündeter Haut gefunden, allerdings konnte die atopische Dermatitis nicht von nicht-allergischer Entzündung differenziert werden.

Die Studie bestätigt bisherige Erkenntnisse über die Möglichkeit einer erfolgreichen RNA-Extraktion aus FFPE-Hautproben, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde (LOVENDORF et al., 2012). Der Einsatz von etwa 400 ng Gesamt-RNA pro Probe resultierte generell in einer verlässlichen miRNA-Detektion unter Verwendung von miRNA Primer Assays.

Die beiden Mastzelltumorproben (I4 und I5) aus der Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da acht, beziehungsweise vier miRNAs (miR-18b, miR-34b, miR-124, miR-193b, miR-202, miR-215, miR-363 und miR-409) nicht detektiert werden konnten. Eine schlechte Qualität der Proben als Grund für dieses Resultat erscheint unwahrscheinlich, da sich die Ausbeute der Gesamt-RNA beider Proben nicht von dem RNA-Gehalt der anderen Proben unterschied. Da es sich bei beiden Proben um kutane Mastzelltumoren handelte, ist möglich, dass die undetektierten miRNAs in Mastzelltumorgewebe nicht oder zu gering exprimiert werden. Nach bestem Wissen der Autorin liegt bisher nur eine veröffentlichte Studie vor, die die miRNA-Expression in Mastzelltumoren von Hunden untersuchte (FENGER et al., 2014). In der Studie wurde ein Set von 377 humanen miRNAs untersucht, von denen 151 eine hundertprozentige Konservierung zwischen Hund und Mensch aufweisen. Von den acht nicht detektierten miRNAs findet in der Studie lediglich miR-18b Erwähnung, für die eine gesteigerte Expression bei hochgradig malignen Mastzelltumoren im Vergleich zu geringgradig malignen Mastzelltumoren nachgewiesen wurde (FENGER et al., 2014). Ob die restlichen sieben miRNAs von Interesse in der Studie untersucht wurden, ist nicht ersichtlich. Daher kann abschließend keine Aussage darüber gemacht werden, ob der fehlende Expressionsnachweis der genannten miRNAs in den Mastzelltumorproben auf den Gewebetyp zurückzuführen ist oder andere Gründe dafür verantwortlich waren.

Zwei miRNAs, nämlich miR-34b und miR-202 konnten in multiplen Proben nicht nachgewiesen werden. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Beide miRNAs wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die kutane Expression von vier miRNAs (miR-21, miR-142, miR-146a und miR-155) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen atopischen und gesunden Hunden. Diese Ergebnisse stimmen mit multiplen Studien überein, die eine hohe Expression dieser miRNAs in der Haut von Menschen mit AD nachgewiesen haben (SONKOLY et al., 2007; SONKOLY et al., 2010; RALFKIAER et al., 2014; MA et al., 2015). Generell handelt es sich bei miR-21, miR-146a und miR-155 um die meist untersuchten miRNAs in Bezug auf das Immunsystem (REBANE und AKDIS, 2014). Da sie nicht nur von Keratinozyten, sondern auch von infiltrierenden Immunzellen exprimiert werden, ist es nicht überraschend, dass eine gesteigerte Expression dieser miRNAs auch in anderen allergischen Erkrankungen und T-Zell-medierten Hautkrankheiten wie Kontaktdermatitis, Asthma, eosinophiler Ösophagitis und Psoriasis nachgewiesen wurde (SONKOLY et al., 2007; MEISGEN et al., 2012; VENNEGAARD et al., 2012; LU und ROTHENBERG, 2013; MALMHALL et al., 2014).

Da nach dem besten Wissen der Autorin keine bisher veröffentlichten Studien über die miRNA-Expression bei Hunden mit atopischer Dermatitis vorliegen, werden vergleichend Ergebnisse von Studien des Menschen, von Mausmodellen, oder Zellkulturen herangezogen.

MiR-142 zeigte sich in dieser Studie in atopischer Haut überexprimiert. Eine hohe Expression konnte bereits bei Menschen und Mäusen mit Kontaktdermatitis, bei Menschen mit AD sowie in läsionaler Haut bei Menschen mit Psoriasis gezeigt werden (SONKOLY et al., 2007; SONKOLY et al., 2010; VENNEGAARD et al., 2012). Es besteht ein Zusammenhang zwischen miR-142-Expression und T-Zellen, unter anderem im Hinblick auf eine T-Zell-Aktivierung. Eine Studie untersuchte die miRNA-Expression in allergischer Kontaktdermatitis und zeigte, dass eine Hochregulation von miR-142 nur bei sensibilisierten Patienten auftrat, was eine Rolle von miR-142 im erworbenen Immunsystem vermuten lässt (VENNEGAARD et al., 2012). Außerdem wurde eine gesteigerte Expression von miR-142 in IL-4-behandelten Keratinozyten und einem Mausmodell der humanen AD gefunden (BAO et al., 2018). Somit wurden Keratinozyten als mögliche Quelle einer hohen miR-142-Expression identifiziert. In einer anderen Studie wurde der Effekt von

miR-142 auf humane und murine Mastzellen *in vitro* untersucht, und es zeigte sich eine verstärkte FcεRI-mediierte Degranulation für miR-142-transfizierte Mastzellen. Dies zeigt einen weiteren möglichen Mechanismus auf, durch den miR-142 zu einer allergischen Entzündung beitragen kann (YAMADA et al., 2014). Im Hinblick auf die atopische Dermatitis als T-Zell-mediierte Erkrankung und einer möglichen Rolle von Mastzellen in deren Pathogenese, stellt die gesteigerte Expression von miR-142 in dieser Studie einen plausiblen Fund dar. Durch Beeinflussung einer T-Zell-Aktivierung und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Mastzellen spielt miR-142 möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der AD.

Sowohl die Expression von miR-146a, als auch die von miR-142 war nicht nur in der Haut atopischer Hunde hochreguliert, sondern auch in der Haut von Menschen mit AD und Psoriasis (SONKOLY et al., 2007; RALFKIAER et al., 2014; REBANE et al., 2014). Wahrscheinlich wird miR-146a überwiegend von infiltrierenden Immunzellen, insbesondere von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen, dendritischen Zellen und Mastzellen exprimiert (SONKOLY et al., 2007). Während eine Studie keine Expression von miR-146a in Keratinozyten nachweisen konnte, berichten drei andere Studien gegenteilige Ergebnisse (SONKOLY et al., 2007; REBANE et al., 2014; HERMANN et al., 2017; SRIVASTAVA et al., 2017). Eine Überexpression von miR-146a wurde in menschlichen Keratinozyten und Fibroblasten nachgewiesen, die unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-17 und IFNγ standen. MiR-146a führt zu einer Suppression entzündungsfördernder Mediatoren im Rahmen von Toll-like-Rezeptor-Signalwegen sowie NFκB-abhängigen Entzündungsreaktionen (TAGANOV et al., 2006; MEISGEN et al., 2014; REBANE et al., 2014; HERMANN et al., 2017). Dadurch wird ein entzündungshemmender Effekt erzielt. Als Angriffspunkt dieses Mechanismus dienen CARD10, IRAK1 und TRAF6, Schlüsselmoleküle, die dem TLR-Signalweg nachgeschaltet sind oder vorgeschaltet dem NFκB-Signalweg als Signalumsetzer dienen. Durch Abzielen von miR-146a auf die Expression dieser Moleküle entsteht ein potenter negativer Rückkoppelungsmechanismus (TAGANOV et al., 2006; MEISGEN et al., 2014; REBANE et al., 2014). Die Kontrolle über NFκB-mediierte Entzündungsprozesse verleiht miR-146 eine essentielle regulatorische Funktion in Angelegenheiten der angeborenen Immunität. Aufgrund dieser Erkenntnisse kann eine gesteigerte miR-146a-



Expression als Reaktion auf einen entzündlichen Stimulus als ein generelles Charakteristikum der Haut angesehen werden (MEISGEN et al., 2014; REBANE et al., 2014). Es wird vermutet, dass es sich bei einer Steigerung der miR-146a-Expression um einen Versuch des Körpers handelt, eine überschießende und damit schädliche Entzündung zu lindern (SRIVASTAVA et al., 2017). Die Tatsache, dass trotz hoher Expression von miR-146a ein Entzündungsvorgang vorliegt, verdeutlicht, dass dies allein nicht ausreichend ist, um eine Kontrolle zu erzielen. Dennoch kann miRNA-146a als möglicher Angriffspunkt zukünftiger Therapieansätze dienen. In Nanokomplexen zusammen mit zellpenetrierenden Peptiden zeigte sich miR-146a nämlich in der Lage, humane Keratinozyten zu penetrieren und dort eine Suppression ihrer direkten Ziele zu erreichen (URGARD et al., 2016). Die subkutane Injektion dieser Nanokomplexe führte zu einer reduzierten Schwellung der Ohren und einer geringeren Expression entzündungsfördernder Faktoren in einem Mausmodell der irritierenden Kontaktdermatitis. Damit wurde das mögliche Potential für den Einsatz von miR-146a als therapeutischen Wirkstoff bei entzündlichen Hauterkrankungen aufgezeigt (URGARD et al., 2016).

Im Gegensatz zu miR-146a, weist miR-155 entzündungsfördernde Eigenschaften auf. Durch spezifisches Binden von CTLA4, einem Inhibitor der T-Zell-Aktivierung, sorgt miR-155 für eine gesteigerte Proliferation von aktivierten CD4+ T-Zellen (SONKOLY et al., 2010). Erhöhte Expressionslevel bei Menschen mit AD sind überwiegend auf die Expression durch infiltrierende Immunzellen wie beispielsweise CD4+ T-Helferzellen und DC zurückzuführen, obwohl auch Fibroblasten, Mastzellen sowie menschliche Keratinozyten nachgewiesenermaßen in der Lage sind, miR-155 zu exprimieren (SONKOLY et al., 2010; MA et al., 2015; BAO et al., 2018). Neben CTLA4 ist auch SOCS1, ein negativer Regulator des JAK/STAT-Signalwegs, ein direktes Ziel für miR-155. Der JAK/STAT-Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Dysregulation der Immunantwort bei atopischer Dermatitis, die überschießende Th2-Immunantwort, die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und die Unterdrückung von regulatorischen T-Zellen mit eingeschlossen (BAO et al., 2013). Durch die Unterdrückung der Expression von SOCS1 beeinflusst miR-155 die durch den JAK/STAT-Signalweg vermittelte Regulation von Aktivierung, Differenzierung sowie Funktion der Lymphozyten und kann so zur Pathogenese der AD beitragen (YAO et al., 2012; MA et al., 2015).

Außerdem fördert miR-155 insbesondere die Differenzierung von Th17-Zellen und deren Funktion, wodurch es zu einem erhöhten Prozentsatz an Th17-Zellen und einer gesteigerten Expression von IL-17-mRNA in peripheren T-Zellen, in der Haut und im Plasma von Menschen mit AD kommt (YAO et al., 2012; MA et al., 2015). Th17-Zellen sind IL-17-produzierende CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems spielen und in entzündliche Erkrankungen wie beispielsweise atopischer Dermatitis involviert sind. Neben IL-17 produzieren Th17-Zellen auch IL-21 und IL-22, wodurch sie nicht nur zur Immunabwehr eines Individuums beitragen, sondern auch eine pathogene Rolle bei der Entstehung einer überschießenden Entzündung in verschiedenen Geweben spielen können (BETTELLI et al., 2008). Ma et al. zeigten in ihrer Studie, dass eine positive Korrelation zwischen miR-155-Expression und dem Schweregrad einer AD vorlag, wodurch miR-155 auch zu einem möglichen Angriffspunkt neuer miRNA-basierter Therapeutika für die atopische Dermatitis wird (MA et al., 2015). Außer in atopischer Dermatitis konnte eine Rolle von miR-155 in der Regulation einer Th2-medierten allergeninduzierten eosinophilen Atemwegsentzündung festgestellt werden (MALMHALL et al., 2014). Die Expression von miR-155 hatte eine gesteigerte Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten zum Entzündungsort zur Folge, was einen weiteren Mechanismus aufzeigt, durch den miR-155 zu einer allergischen Entzündung beitragen kann.

MiR-21 zeigte in dieser Studie die größten FC-Werte im Vergleich von gesunder und atopischer Haut. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem anderer Studien, die eine signifikante Hochregulierung in läsionaler Haut von Menschen mit AD und Psoriasis, als auch in der Haut von Mäusen und Menschen mit Kontaktdermatitis nach Allergenexposition nachwiesen (SONKOLY et al., 2007; MEISGEN et al., 2012; VENNEGAARD et al., 2012). Eine Rolle von miR-21 in multiplen allergischen Konditionen konnte weiterhin durch eine stark ausgeprägte Expression in Patienten mit eosinophiler Ösophagitis und verschiedenen experimentellen Asthmodellen nachgewiesen werden (LU und ROTHENBERG, 2013). MiR-21 wird sowohl von Keratinozyten und Fibroblasten, als auch von Immunzellen wie Mastzellen, DC sowie epidermalen und dermalen Lymphozyten exprimiert (SONKOLY et al., 2007; MEISGEN et al., 2012). Ein möglicher Mechanismus, durch den miR-21 an T-Zell-vermittelten Hautentzündungen beteiligt sein kann, ist die gesteigerte Expression während einer T-Zell-Aktivierung, bei der miR-21 die

Apoptose von aktivierten T-Zellen unterdrückt (MEISGEN et al., 2012; LU und ROTHENBERG, 2013). IL-12p35 ist eine errechnete Zielstruktur für miR-21 und stellt ein Schlüsselmolekül in der Th2-Polarisierung dar (LU et al., 2009; SAWANT et al., 2013). Daraus resultierend kann miR-21 durch eine gesteigerte Expression zu einer Suppression von IL12p35 und somit einer überschießenden Th2-Immunantwort führen, wie sie typischerweise in der frühen Phase der atopischen Dermatitis gefunden werden kann. Auf diese Weise und durch T-Zell intrinsische Wege, kann miR-21 in eine allergische Entzündung involviert sein (SAWANT et al., 2013). Außerdem scheint miR-21 ebenfalls einen Einfluss auf das Degranulationsverhalten von Mastzellen zu haben. Eine Studie zeigte, dass bei Mäusen eines Modells der allergischen Kontaktallergie eine Linderung der Symptome durch die lokale Anwendung des pflanzlichen Wirkstoffs Berberin erzielt werden konnte (LI et al., 2018). Dieser lindernde Effekt scheint zumindest teilweise durch eine unterdrückte miR-21-Expression vermittelt zu sein, die durch Berberin erzielt wird. In vitro wurde nachgewiesen, dass reduzierte Spiegel von miR-21 zu einer geringeren Degranulation muriner Mastzellen und somit einer reduzierten Infiltration von Entzündungszellen führte (LI et al., 2018). Dadurch trägt eine hohe Expression von miR-21 möglicherweise, ähnlich wie bei miR-142, durch eine gesteigerte Mastzelldegranulation und folgender Entzündungszellrekrutierung zum Entzündungsgeschehen der AD bei.

Alle vier signifikant überexprimierten miRNAs in atopischer Haut waren ebenfalls in den Hautproben von Hunden mit Demodikose und Dermatophytose im Vergleich zu gesunder Haut überexprimiert. Dieses Ergebnis zusammen mit dem Nachweis anderer Studien, dass eine hohe Expression auch in anderen Hauterkrankungen beim Menschen wie Psoriasis (SONKOLY et al., 2007; MEISGEN et al., 2012; HERMANN et al., 2017; SRIVASTAVA et al., 2017), Kontaktdermatitis (VENNEGAARD et al., 2012; URGARD et al., 2016) oder Hidradenitis suppurativa (HESSAM et al., 2017) gefunden wurde, spricht für eine generelle Rolle dieser miRNAs bei Entzündungen der Haut. Eine gesteigerte Expression von miR-21, miR-142, miR-146a und miR-155 scheint somit eher ein charakteristisches Merkmal entzündlicher Hauterkrankungen im Allgemeinen, als ein cAD-spezifisches Muster zu sein.

Außerdem ist die Expression dieser miRNAs und ihre Rolle in der Regulation wichtiger pathogener Mechanismen von allergischer Entzündung nicht auf die Haut

begrenzt, sondern kann auch in anderen Organsystemen und bei Erkrankungen wie allergischem Asthma und eosinophiler Ösophagitis nachgewiesen werden (LU und ROTHENBERG, 2013). Dies ist darauf zurückzuführen, dass miR-21, miR-142, miR-146a und miR-155 unter anderem durch Immunzellen exprimiert werden, die im gesamten Organismus vorkommen können und in unzählige Vorgänge des Immunsystems involviert sind.

Eine Limitation dieser Studie stellt die begrenzte Anzahl untersuchter Proben, insbesondere der Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen, dar. Nur wenige Proben, die für diese Gruppe in Frage kamen, erfüllten die Einschlusskriterien. Zudem mussten die beiden Mastzelltumorproben wegen unzufriedenstellender miRNA-Detektion im Nachhinein ausgeschlossen werden.

Eine weitere Limitation ergibt sich aus dem retrospektiven Charakter des Studienprotokolls zur Sammlung der Proben hauterkrankter Hunde. Die Diagnose einer cAD wurde angenommen, sofern die histopathologischen Befunde mit den, von den einsendenden Tierärzten berichteten, klinischen Anzeichen übereinstimmte. Eine gründliche diagnostische Aufarbeitung war für eine Studienteilnahme nicht zwingend erforderlich. Eine solche wäre natürlich wünschenswert gewesen, um tatsächlich nur Hunde mit gesicherter Diagnose der AD zu integrieren. Die dafür erforderlichen detaillierten Patientendaten waren retrospektiv nicht in ausreichender Menge vorliegend, weshalb eine gesicherte Ausschlussdiagnose einer AD als Einschlusskriterium dieser Studie zu einer ungenügend großen Untersuchungsgruppe geführt hätte. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hunde nicht doch Medikamente verabreicht bekommen haben, die die miRNA-Expression beeinflusst haben können, ohne dass diese angegeben wurden. Weiterhin kann nicht mit abschließender Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Patienten der Gruppen der nicht-allergischen Hauterkrankungen und der gesunden Kontrolltiere nicht doch eine allergische Hauterkrankung aufwiesen, zu der keine Angabe gemacht wurde oder die unerkannt geblieben ist.

Da lediglich 18 miRNAs in dieser Studie untersucht wurden, ist es möglich, dass ein spezifisches Expressionsprofil der cAD aufgrund der getroffenen Auswahl an miRNAs unentdeckt blieb. Die Auswahl der miRNAs erfolgte nach bestem Wissen und mit der Bemühung die relevantesten miRNAs zur untersuchten Fragestellung zu identifizieren, es bleibt jedoch bislang unbekannt, ob die untersuchten miRNAs

tatsächlich diejenigen mit der wichtigsten Rolle bei allergischer Dermatitis darstellen. Außerdem orientierte sich die Auswahl der miRNAs überwiegend an Ergebnissen von humanmedizinischen Studien, Zellkulturen oder Mausmodellen. Obwohl sich die atopische Dermatitis des Menschen und des Hundes sehr ähnlich sind, ist dennoch nicht auszuschließen, dass im Hinblick auf die miRNA-Expression möglicherweise Unterschiede vorliegen und somit beim Hund andere miRNAs als beim Menschen eine Rolle bei der Pathogenese der AD spielen. Für weitere Studien mit größerem Umfang, sowohl an zu untersuchenden miRNAs, als auch der Studienpopulation, besteht somit weiterhin die Möglichkeit ein krankheitsspezifisches miRNA-Expressionsmuster für die canine atopische Dermatitis zu entdecken.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine signifikant erhöhte Expression von miR-21, miR-142, miR-146a und miR-155 in läsionaler atopischer Haut im Vergleich zu gesunder Haut von Labrador und Golden Retrievern gefunden wurde. Die Expression dieser miRNAs war jedoch nicht spezifisch für eine allergische Entzündung, da atopische und nicht-allergische Entzündung ähnliche Expressionsmuster zeigten. Basierend auf dieser Studie sind keine der untersuchten miRNAs in der Lage eine atopische Dermatitis bei Labrador oder Golden Retrievern von anderen entzündlichen Hauterkrankungen zu differenzieren. Die untersuchten miRNAs mit signifikant hoher Expression scheinen eine generelle Assoziation mit entzündlichen Hautzuständen aufzuweisen.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine häufig auftretende Hauterkrankung bei Hunden, die neben der namensgebenden Entzündung mit Juckreiz einher geht. In den meisten Fällen sind die im Laufe der allergischen Sensibilisierung gebildeten IgE-Antikörper gegen Umweltallergene gerichtet. Die Pathogenese stellt ein komplexes Zusammenspiel aus Umweltfaktoren, Störungen des angeborenen und erworbenen Immunsystems sowie einer beeinträchtigten Hautbarriere dar. Bislang ist eine aufwändige diagnostische Aufarbeitung zur Diagnosestellung der AD notwendig, da keiner der kommerziell verfügbaren Allergietests geeignet ist, um zwischen einer caninen atopischen Dermatitis und anderen Hauterkrankungen zu differenzieren. Labrador und Golden Retriever sind genetisch prädisponierte Rassen für eine atopische Dermatitis.

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, einzelsträngige RNA-Moleküle, die posttranskriptionell entweder mittels mRNA-Abbau oder durch translationale Unterdrückung die Genexpression regulieren können (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993). Sie sind in vielen wichtigen biologischen Prozessen beteiligt und eine veränderte Regulation der Expression wurde in verschiedenen Erkrankungen beobachtet. Es wird vermutet, dass die Expression von miRNAs gewebsspezifisch ist und je nach Krankheit charakteristische Expressionsprofile vorliegen können. In einer allergischen Entzündung sind miRNAs in der Lage, sowohl Einfluss auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, als auch auf Keratinozyten auszuüben und dadurch den Verlauf der Erkrankung maßgeblich mitzubestimmen. Eine AD-spezifische miRNA-Expression könnte für neue diagnostische und therapeutische Ansätze von großem Interesse sein.

Das Ziel dieser Studie war es, die miRNA-Expression von 18 miRNAs aus der Haut von Labrador und Golden Retrievern mit atopischer Dermatitis zu untersuchen und diese mit den Ergebnissen von gesunder Haut sowie nicht-allergisch entzündeter Haut zu vergleichen. Abschließend sollte die Frage beantwortet werden, ob ein AD-spezifisches Expressionsmuster existiert.

Zur Untersuchung wurden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Hautproben von sieben gesunden sowie sieben atopischen Labrador und Golden Retrievern gesammelt. Die Gruppe der nicht-allergischen Hauterkrankungen bestand aus

Proben von fünf Hunden mit Dermatophytose, Demodikose oder kutanem Mastzelltumor. Aus den Proben wurde die gesamte RNA extrahiert, revers transkribiert und anschließend für eine quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Unter Verwendung von miRNA Primer Assays wurden die folgenden 18 miRNAs untersucht: miR-18b, miR-21, miR-34b, miR-124, miR-142, miR-143, miR-146a, miR-146b, miR-155, miR-193b, miR-202, miR-215, miR-223, miR-363, miR-409, miR-423a, miR-451 sowie miR-1839. Als endogene Referenz-miRNAs wurden SNORD95 und RNU6 verwendet. Die Auswahl der miRNAs erfolgte anhand von bisher berichteten Ergebnissen zum Thema „miRNA-Expression in allergischen Hauterkrankungen“ und einer zuvor durchgeführten Pilotstudie.

In läsionaler atopischer Haut konnte im Vergleich zu gesunder Haut eine signifikant erhöhte Expression von miR-21, miR-142, miR-146a und miR-155 nachgewiesen werden. Die Hautproben mit Dermatophytose und Demodikose zeigten eine signifikant erhöhte Expression von miR-21, miR-142, miR-146a, miR-155, miR-18b, miR-223 sowie miR-409 und eine erniedrigte Expression von miR-193b im Vergleich mit den gesunden Kontrollproben. Beide Mastzelltumorproben wurden aufgrund von ungenügender miRNA-Expression ausgeschlossen. Während sich die miRNA-Expression von erkrankter Haut und gesunder Haut in dieser Studie unterschied, war eine Differenzierung zwischen atopischer Dermatitis und den anderen Hauterkrankungen nicht möglich.

Abschließend stellt sich die nachgewiesene miRNA-Expression der atopischen Haut als nicht spezifisch für eine allergische Entzündung heraus, da atopische und nicht-allergische Entzündung ähnliche Expressionsmuster zeigten. Basierend auf dieser Studie sind somit keine der untersuchten miRNAs in der Lage, eine atopische Dermatitis bei Labrador oder Golden Retrievern von anderen entzündlichen Hauterkrankungen zu differenzieren. Die untersuchten miRNAs mit signifikant hoher Expression scheinen eine generelle Assoziation mit entzündlichen Hautzuständen aufzuweisen.

## VII. SUMMARY

Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory, pruritic skin disease, that commonly affects dogs. During allergic sensitisation IgE-antibodies are produced, that are most commonly directed against environmental allergens. The underlying pathogenesis is a complex interplay of environmental factors, alterations of the innate immune system, the adaptive immune system and skin barrier dysfunction. To date, an elaborate and time-consuming diagnostic work-up is needed in order to diagnose atopic dermatitis, as none of the commercially available tests are suitable to differentiate atopic dermatitis from other skin diseases. Labrador and Golden retrievers are genetically predisposed to develop atopic dermatitis.

MicroRNAs (miRNAs) are short, single-stranded RNA molecules, that regulate gene expression in a post-transcriptional manner either by mRNA-degradation or via translational repression. They are involved in many biological processes, and alterations of their expression have been found in numerous diseases. They are proposed to be tissue-specific and different diseases may have characteristic miRNA expression patterns. In allergic inflammation miRNAs can exert an influence on cells of the innate immune-system, the adaptive immune-system and on keratinocytes, thereby contributing to the course of the disease. An AD-specific miRNA expression profile may be of great interest for future therapeutic and diagnostic approaches.

The objective of this study was to investigate the cutaneous expression of 18 miRNAs in Labrador and Golden retrievers with atopic dermatitis and to compare it with the expression in healthy and non-allergic inflamed skin. In the end the question, whether there is an AD-specific expression pattern, should be answered.

For investigation formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples of seven healthy and seven atopic Labrador and Golden retrievers were collected. The group of non-allergic skin diseases consisted of five specimens with mycosis, demodicosis or cutaneous mast cell tumours. Total RNA was extracted, reverse transcribed and then used for quantitative real-time polymerase chain reaction. Using miRNA primer assays, the following 18 miRNAs were investigated: miR-18b, miR-21, miR-34b, miR-124, miR-142, miR-143, miR-146a, miR-146b, miR-155, miR-193b, miR-202, miR-215, miR-223, miR-363, miR-409, miR-423a, miR-451 and



miR-1839. As endogenous controls SNORD95 and RNU6 were chosen. The selection of miRNAs was based on reported data and a previously performed pilot study.

Lesional atopic skin showed a significantly higher expression of miR-21, miR-142, miR-146a and miR-155 compared to healthy skin. In skin specimen of mycosis and demodicosis miR-21, miR-142, miR-146a, miR-155, miR-18b, miR-223 and miR-409 were significantly higher and miR-193b significantly lower expressed than in control skin. Both mast cell tumours were excluded from analysis, as those specimens showed insufficient miRNA expression. Whereas miRNA expression of diseased skin differed from healthy skin, a differentiation between atopic dermatitis and other skin diseases was not possible.

In the end, the herein detected miRNA expression of atopic skin turns out to be not specific of allergic inflammation, as atopic and non-allergic inflammation showed similar expression patterns. Based on this study, none of the evaluated miRNAs allowed differentiation of atopic dermatitis from other skin diseases. The investigated overexpressed miRNAs seem to be associated with inflammatory skin conditions in general.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aberg L, Varjonen K, Ahman S. Results of allergen-specific immunotherapy in atopic dogs with *Malassezia* hypersensitivity: a retrospective study of 16 cases. *Vet Dermatol* 2017; 28: 633-e157.

Abramo F, Campora L, Albanese F, della Valle MF, Cristino L, Petrosino S, Di Marzo V, Miragliotta V. Increased levels of palmitoylethanolamide and other bioactive lipid mediators and enhanced local mast cell proliferation in canine atopic dermatitis. *BMC Vet Res* 2014; 10: 21.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J* 2015; 8: 17.

Akdis M, Palomares O, van de Veen W, van Splunter M, Akdis CA. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1438-49; quiz50-1.

Almqvist C, Garden F, Kemp AS, Li Q, Crisafulli D, Tovey ER, Xuan W, Marks GB. Effects of early cat or dog ownership on sensitisation and asthma in a high-risk cohort without disease-related modification of exposure. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2010; 24: 171-8.

Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* 2007; 130: 101-12.

Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 475-88.

Anturaniemi J, Uusitalo L, Hielm-Bjorkman A. Environmental and phenotype-related risk factors for owner-reported allergic/atopic skin symptoms and for canine atopic dermatitis verified by veterinarian in a Finnish dog population. *PLoS One* 2017; 12: e0178771.

Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006; 368: 733-43.

Auxilia ST, Hill PB. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? *Veterinary Dermatology* 2000; 11: 247-54.

Bachmann MF, Zeltins A, Kalnins G, Balke I, Fischer N, Rostaher A, Tars K, Favrot C. Vaccination against IL-31 for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142: 279-81.e1.

Bae JM, Choi YY, Park CO, Chung KY, Lee KH. Efficacy of allergen-specific immunotherapy for atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 110-7.

Bao L, Zhang H, Chan LS. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. *Jakstat* 2013; 2: e24137.

Bao L, Chau C, Bao J, Tsoukas MM, Chan LS. IL-4 dysregulates microRNAs involved in inflammation, angiogenesis and apoptosis in epidermal keratinocytes. *Microbiol Immunol* 2018; 62: 732-6.

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. *Anim Genet* 2009; 40: 793-4.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33.

Baumer W, Rossbach K, Mischke R, Reines I, Langbein-Detsch I, Luth A, Kleuser B. Decreased concentration and enhanced metabolism of sphingosine-1-phosphate in lesional skin of dogs with atopic dermatitis: disturbed sphingosine-1-phosphate homeostasis in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 266-8.

Bawankar P, Loh B, Wohlbold L, Schmidt S, Izaurralde E. NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain. *RNA Biol* 2013; 10: 228-44.

Beccati M, Martini V, Comazzi S, Fanton N, Cornegliani L. Lymphocyte subpopulations and Treg cells in dogs with atopic dermatitis receiving ciclosporin therapy: a prospective study. *Vet Dermatol* 2016; 27: 17-e5.

Beck LA, Thaci D, Hamilton JD, Graham NM, Bieber T, Rocklin R, Ming JE, Ren H, Kao R, Simpson E, Ardeleanu M, Weinstein SP, Pirozzi G, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Hager MD, Stahl N, Yancopoulos GD, Radin AR. Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2014; 371: 130-9.

Beg MS, Brenner A, Sachdev J, Ejadi S, Borad M, Kang Y-K, Lim H, Kim TY, Bader A, Stoudemire J, Smith S, Kim S, Hong D. Abstract C43: Safety, tolerability, and clinical activity of MRX34, the first-in-class liposomal miR-34 mimic, in patients with advanced solid tumors. *Molecular Cancer Therapeutics* 2015; 14: C43.

Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, Borad M, Kang YK, Stoudemire J, Smith S, Bader AG, Kim S, Hong DS. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 2017; 35: 180-8.

Beilharz TH, Humphreys DT, Clancy JL, Thermann R, Martin DI, Hentze MW, Preiss T. microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PLoS One* 2009; 4: e6783.

Bensignor E, Olivry T. Treatment of localized lesions of canine atopic dermatitis with tacrolimus ointment: a blinded randomized controlled trial. *Vet Dermatol* 2005; 16: 52-60.

Bensignor E, Pin D, Bourdeau P. Évaluation d'un protocole alternant shampooing et mousse dans les dermatites allergiques canines : essai multicentrique randomisé, contrôlé en simple insu. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 2013; 48: 49–55.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-6.

Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453: 1051-7.

Biasiolo M, Sales G, Lionetti M, Agnelli L, Todoerti K, Bisognin A, Coppe A, Romualdi C, Neri A, Bortoluzzi S. Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA\* expression. *PLoS One* 2011; 6: e23854.

Bieber T, Novak N, Herrmann N, Koch S. Role of dendritic cells in atopic dermatitis: an update. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 41: 254-8.

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

Bizikova P, Linder KE, Paps J, Olivry T. Effect of a novel topical diester glucocorticoid spray on immediate- and late-phase cutaneous allergic reactions in Maltese-beagle atopic dogs: a placebo-controlled study. *Vet Dermatol* 2010; 21: 70-9.

Bizikova P, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MN, Marsella R, Nuttall T, Santoro D. Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine

atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015a; 26: 95-e26.

Bizikova P, Santoro D, Marsella R, Nuttall T, Eisenschenk MN, Pucheu-Haston CM. Review: Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015b; 26: 79-e24.

Blaskovic M, Rosenkrantz W, Neuber A, Sauter-Louis C, Mueller RS. The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *Vet J* 2014; 199: 39-43.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 2004; 10: 185-91.

Bollag WB. Paradoxical effects of sphingosine-1-phosphate. *J Invest Dermatol* 2003; 120: xiii-xiv.

Bond R, Curtis CF, Hendricks A, Ferguson EA, Lloyd DH. Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. *Vet Rec* 2002; 150: 448-9.

Bonkobara M, Miyake F, Yagihara H, Yamada O, Azakami D, Washizu T, Cruz PD, Ariizumi K. Canine Epidermal Langerhans Cells Express  $\alpha$  and  $\gamma$  but not  $\beta$  Chains of High-Affinity IgE Receptor. *Veterinary Research Communications* 2005; 29: 499-505.

Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 558-62.

Bracht J, Hunter S, Eachus R, Weeks P, Pasquinelli AE. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *Rna* 2004; 10: 1586-94.

Braun JE, Huntzinger E, Fauser M, Izaurralde E. GW182 proteins directly recruit

- cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell* 2011; 44: 120-33.
- Brauweiler AM, Goleva E, Leung DYM. Th2 cytokines increase *Staphylococcus aureus* alpha toxin-induced keratinocyte death through the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). *J Invest Dermatol* 2014; 134: 2114-21.
- Brazis P, Queralt M, de Mora F, Ferrer L, Puigdemont A. Comparative study of histamine release from skin mast cells dispersed from atopic, ascaris-sensitive and healthy dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66: 43-51.
- Brazis P, De Mora F, Ferrer L, Puigdemont A. IgE enhances Fc epsilon RI expression and IgE-dependent TNF-alpha release from canine skin mast cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85: 205-12.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3: e85.
- Broderick JA, Salomon WE, Ryder SP, Aronin N, Zamore PD. Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *Rna* 2011; 17: 1858-69.
- Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 985408.
- Bruet V, Bourdeau PJ, Roussel A, Imperato L, Desfontis JC. Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea infestation and its role in diagnosis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 487-e93.
- Brunner PM, Guttman-Yassky E. Racial differences in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2018;
- Bulkowska M, Rybicka A, Senses KM, Ulewicz K, Witt K, Szymanska J, Taciak B, Klopfleisch R, Hellmen E, Dolka I, Gure AO, Mucha J, Mikow M, Gizinski S,

Krol M. MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumours. *BMC Cancer* 2017; 17: 728.

Cafarchia C, Otranto D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4868-9.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* 2004; 10: 1957-66.

Campbell JJ, Coyner KS, Rankin SC, Lewis TP, Schick AE, Shumaker AK. Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. *Vet Dermatol* 2010; 21: 619-25.

Campbell KL, Dorn GP. Effects of oral sunflower oil and olive oil on serum and cutaneous fatty acid concentrations in dogs. *Res Vet Sci* 1992; 53: 172-8.

Celedon JC, Wright RJ, Litonjua AA, Sredl D, Ryan L, Weiss ST, Gold DR. Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1239-43.

Chakraborty C, Das S. Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers. *Tumour Biol* 2016; 37: 5705-14.

Chandradoss SD, Schirle NT, Szczepaniak M, MacRae IJ, Joo C. A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. *Cell* 2015; 162: 96-107.

Chekulaeva M, Mathys H, Zipprich JT, Attig J, Colic M, Parker R, Filipowicz W. miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18: 1218-26.

Chen TA, Halliwell RE, Pemberton AD, Hill PB. Identification of major allergens



of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. *Vet Dermatol* 2002; 13: 141-50.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006.

Chen XF, Zhang LJ, Zhang J, Dou X, Shao Y, Jia XJ, Zhang W, Yu B. MiR-151a is involved in the pathogenesis of atopic dermatitis by regulating interleukin-12 receptor beta2. *Exp Dermatol* 2018; 27: 427-32.

Chen Y, Boland A, Kuzuoglu-Ozturk D, Bawankar P, Loh B, Chang CT, Weichenrieder O, Izaurralde E. A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Mol Cell* 2014; 54: 737-50.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436: 740-4.

Chermprapai S, Broere F, Gooris G, Schlotter YM, Rutten V, Bouwstra JA. Altered lipid properties of the stratum corneum in Canine Atopic Dermatitis. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2018; 1860: 526-33.

Chervet L, Galichet A, McLean WH, Chen H, Suter MM, Roosje PJ, Muller EJ. Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2010; 19: e343-6.

Chesney CJ. Food sensitivity in the dog: a quantitative study. *J Small Anim Pract* 2002; 43: 203-7.

Choi MJ, Maibach HI. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am J Clin Dermatol* 2005; 6: 215-23.

Christie M, Boland A, Huntzinger E, Weichenrieder O, Izaurralde E. Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins. *Mol Cell* 2013; 51: 360-73.

Colombo S, Hill PB, Shaw DJ, Thoday KL. Effectiveness of low dose immunotherapy in the treatment of canine atopic dermatitis: a prospective, double-blinded, clinical study. *Vet Dermatol* 2005; 16: 162-70.

Cooke A, Prigge A, Wickens M. Translational repression by deadenylases. *J Biol Chem* 2010; 285: 28506-13.

Cosgrove SB, Wren JA, Cleaver DM, Walsh KF, Follis SI, King VI, Tena JK, Stegemann MR. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel(R)) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 587-97, e141-2.

Cosgrove SB, Cleaver DM, King VL, Gilmer AR, Daniels AE, Wren JA, Stegemann MR. Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. *Vet Dermatol* 2015; 26: 171-9, e35.

Darsow U. Allergen-specific immunotherapy for atopic eczema: updated. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12: 665-9.

Dave VP, Ngo TA, Pernestig AK, Tilevik D, Kant K, Nguyen T, Wolff A, Bang DD. MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics. *Lab Invest* 2018;

Day MJ. Expression of major histocompatibility complex class II molecules by dermal inflammatory cells, epidermal Langerhans cells and keratinocytes in canine

dermatological disease. *J Comp Pathol* 1996; 115: 317-26.

De Benedetto A, Agnihotri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol* 2009; 129: 14-30.

De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol* 2012; 132: 949-63.

de Jager M, Groenink W, Bielsa i Guivernau R, Andersson E, Angelova N, Ponec M, Bouwstra J. A novel in vitro percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives. *Pharm Res* 2006; 23: 951-60.

DeBoer D, Morris M. Multicentre open trial demonstrates efficacy of sublingual immunotherapy in canine atopic dermatitis (abstract). *Veterinary Dermatology* 2012; 23: 64-5.

DeBoer DJ. Strategies for management of recurrent pyoderma in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990; 20: 1509-24.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001a; 81: 271-6.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based "allergy" tests. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 277-87.

DeBoer DJ, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXI): antihistamine pharmacotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 81: 323-9.

Deboer DJ, Schafer JH, Salsbury CS, Blum JR, Beale KM, Vitale CB, Muse R, Moriello KA, Garfield RA, Keefe TJ, McArthur TR. Multiple-center study of reduced-concentration triamcinolone topical solution for the treatment of dogs with known or suspected allergic pruritus. *Am J Vet Res* 2002; 63: 408-13.

DeBoer DJ, Verbrugge M, Morris M. Clinical and immunological responses of dust mite sensitive, atopic dogs to treatment with sublingual immunotherapy (SLIT). *Vet Dermatol* 2016; 27: 82-7e23.

Deleanu D, Nedelea I. Biological therapies for atopic dermatitis: An update. *Exp Ther Med* 2019; 17: 1061-7.

Dell DL, Griffin CE, Thompson LA, Griffies JD. Owner assessment of therapeutic interventions for canine atopic dermatitis: a long-term retrospective analysis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 228-e47.

DeMora F, Garcia G, Puigdemont A, Arboix M, Ferrer L. Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflamm Res* 1996; 45: 424-7.

Deniz G, van de Veen W, Akdis M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 527-35.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-5.

Derry MC, Yanagiya A, Martineau Y, Sonenberg N. Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 537-43.

Di Marco M, Ramassone A, Pagotto S, Anastasiadou E, Veronese A, Visone R. MicroRNAs in Autoimmunity and Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci* 2018; 19

Dimich-Ward H, Chow Y, Chung J, Trask C. Contact with livestock--a protective effect against allergies and asthma? *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 1122-9.

Ding XC, Grosshans H. Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *Embo j* 2009; 28: 213-22.

Dip R, Carmichael J, Letellier I, Strehlau G, Roberts E, Bensignor E, Rosenkrantz W. Concurrent short-term use of prednisolone with cyclosporine A accelerates pruritus reduction and improvement in clinical scoring in dogs with atopic dermatitis. *BMC Vet Res* 2013; 9: 173.

Dirksen K, Verzijl T, Grinwis GC, Favier RP, Penning LC, Burgener IA, van der Laan LJ, Fieten H, Spee B. Use of Serum MicroRNAs as Biomarker for Hepatobiliary Diseases in Dogs. *J Vet Intern Med* 2016a; 30: 1816-23.

Dirksen K, Verzijl T, van den Ingh TS, Vernooij JC, van der Laan LJ, Burgener IA, Spee B, Fieten H. Hepatocyte-derived microRNAs as sensitive serum biomarkers of hepatocellular injury in Labrador retrievers. *Vet J* 2016b; 211: 75-81.

Dryden MW, Payne PA, Smith V, Berg TC, Lane M. Efficacy of selamectin, spinosad, and spinosad/milbemycin oxime against the KS1 *Ctenocephalides felis* flea strain infesting dogs. *Parasit Vectors* 2013; 6: 80.

Egli KS, Schiessl B, Roosje PJ, Seewald W, Forster U, Peel JE, Welle MM. Evaluation of the usefulness of sensitization to aeroallergens as a model for canine atopic dermatitis in genetically predisposed Beagles. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1329-36.

Eichenfield LF, Tom WL, Berger TG, Krol A, Paller AS, Schwarzenberger K, Bergman JN, Chamlin SL, Cohen DE, Cooper KD, Cordoro KM, Davis DM, Feldman SR, Hanifin JM, Margolis DJ, Silverman RA, Simpson EL, Williams HC, Elmets CA, Block J, Harrod CG, Smith Begolka W, Sidbury R. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol* 2014; 71: 116-32.

Eichenfield LF, Ahluwalia J, Waldman A, Borok J, Udkoff J, Boguniewicz M. Current guidelines for the evaluation and management of atopic dermatitis: A comparison of the Joint Task Force Practice Parameter and American Academy of Dermatology guidelines. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139: S49-s57.

Eichenseer M, Johansen C, Mueller RS. Efficacy of dimetinden and hydroxyzine/chlorpheniramine in atopic dogs: a randomised, controlled, double-blinded trial. *Vet Rec* 2013; 173: 423.

Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, Hsu SH, Ghoshal K, Villen J, Bartel DP. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell* 2014; 56: 104-15.

Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002; 196: 1645-51.

Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1337-43.

Elkayam E, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, Hannon GJ, Joshua-Tor L. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 2012; 150: 100-10.

Elmen J, Lindow M, Silahatoglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, Hedtjarn M, Hansen JB, Hansen HF, Straarup EM, McCullagh K, Kearney P, Kauppinen S. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res* 2008a; 36: 1153-62.

Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM,

Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008b; 452: 896-9.

Eman SR, Kubesy AA, Baraka TA, Torad FA, Shaymaa IS, Mohammed FF. Evaluation of hepatocyte-derived microRNA-122 for diagnosis of acute and chronic hepatitis of dogs. *Vet World* 2018; 11: 667-73.

Enright N, Simonato M, Henshall DC. Discovery and validation of blood microRNAs as molecular biomarkers of epilepsy: Ways to close current knowledge gaps. *Epilepsia Open* 2018; 3: 427-36.

Epstein TG, Bernstein DI, Levin L, Khurana Hershey GK, Ryan PH, Reponen T, Villareal M, Lockey JE, Lemasters GK. Opposing effects of cat and dog ownership and allergic sensitization on eczema in an atopic birth cohort. *J Pediatr* 2011; 158: 265-71.e1-5.

Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 2007; 21: 2558-70.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008; 132: 9-14.

Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119: 3573-85.

Eyileten C, Wicik Z, De Rosa S, Mirowska-Guzel D, Soplinska A, Indolfi C, Jastrzebska-Kurkowska I, Czlonkowska A, Postula M. MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Ischemic Stroke-A Comprehensive Review and Bioinformatic Analysis. *Cells* 2018; 7

Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA, Chen CY, Shyu AB, Yates JR, 3rd, Hannon GJ, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* 2009; 35: 868-80.

Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 351-79.

Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 586-93.

Faehnle CR, Elkayam E, Haase AD, Hannon GJ, Joshua-Tor L. The making of a slicer: activation of human Argonaute-1. *Cell Rep* 2013; 3: 1901-9.

Fanton N, Santoro D, Cornegliani L, Marsella R. Increased filaggrin-metabolizing enzyme activity in atopic skin: a pilot study using a canine model of atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2017; 28: 479-e111.

Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 23-31.

Feingold KR, Brown BE, Lear SR, Moser AH, Elias PM. Effect of essential fatty acid deficiency on cutaneous sterol synthesis. *J Invest Dermatol* 1986; 87: 588-91.

Feng C, Bai M, Yu NZ, Wang XJ, Liu Z. MicroRNA-181b negatively regulates the proliferation of human epidermal keratinocytes in psoriasis through targeting TLR4. *J Cell Mol Med* 2017; 21: 278-85.

Fenger JM, Bear MD, Volinia S, Lin TY, Harrington BK, London CA, Kisseberth WC. Overexpression of miR-9 in mast cells is associated with invasive behavior and spontaneous metastasis. *BMC Cancer* 2014; 14: 84.



Fenger JM, Roberts RD, Iwenofu OH, Bear MD, Zhang X, Couto JI, Modiano JF, Kisseberth WC, London CA. MiR-9 is overexpressed in spontaneous canine osteosarcoma and promotes a metastatic phenotype including invasion and migration in osteoblasts and osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer* 2016; 16: 784.

Fennessy M, Coupland S, Popay J, Naysmith K. The epidemiology and experience of atopic eczema during childhood: a discussion paper on the implications of current knowledge for health care, public health policy and research. *J Epidemiol Community Health* 2000; 54: 581-9.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.

Fischer N, Rostaher A, Favrot C. [Intralymphatic immunotherapy: An effective and safe alternative route for canine atopic dermatitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2016; 158: 646-52.

Forsythe P, Paterson S. Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. *Vet Rec* 2014; 174 Suppl 2: 13-21.

Foster AP, Jackson HA, Stedman K, Knowles TG, Day MJ, Shaw SE. Serological responses to house dust mite antigens in atopic dogs while receiving allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Dermatology* 2002; 13: 211-29.

Foster AP, Littlewood JD, Webb P, Wood JL, Rogers K, Shaw SE. Comparison of intradermal and serum testing for allergen-specific IgE using a Fcepsilon RIalpha-based assay in atopic dogs in the UK. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 93: 51-60.

Fraser MA, McNeil PE, Gettinby G. Studies of serum total immunoglobulin E concentrations in atopic and non-atopic dogs. *Vet Rec* 2003; 152: 159-63.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.

Fukao A, Mishima Y, Takizawa N, Oka S, Imataka H, Pelletier J, Sonenberg N, Thoma C, Fujiwara T. MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Mol Cell* 2014; 56: 79-89.

Fukaya T, Tomari Y. MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in drosophila. *Mol Cell* 2012; 48: 825-36.

Fukaya T, Iwakawa HO, Tomari Y. MicroRNAs block assembly of eIF4F translation initiation complex in *Drosophila*. *Mol Cell* 2014; 56: 67-78.

G. Harvey R, C. Noble W. A Temporal Study Comparing the Carriage of *Staphylococcus intermedius* on Normal Dogs with Atopic Dogs in Clinical Remission. *Veterinary Dermatology* 2008; 5: 21 - 5.

Gadeyne C, Little P, King VL, Edwards N, Davis K, Stegemann MR. Efficacy of oclacitinib (Apoquel(R)) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia. *Vet Dermatol* 2014; 25: 512-8, e86.

Gaitero L, Russell SJ, Monteith G, LaMarre J. Expression of microRNAs miR-21 and miR-181c in cerebrospinal fluid and serum in canine meningoencephalomyelitis of unknown origin. *Vet J* 2016; 216: 122-4.

Gao W, He HW, Wang ZM, Zhao H, Lian XQ, Wang YS, Zhu J, Yan JJ, Zhang DG, Yang ZJ, Wang LS. Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease. *Lipids Health Dis* 2012; 11: 55.

Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 113-26.

Gedon NKY, Mueller RS. Atopic dermatitis in cats and dogs: a difficult disease for animals and owners. *Clin Transl Allergy* 2018; 8: 41.

Gehring U, Bolte G, Borte M, Bischof W, Fahlbusch B, Wichmann HE, Heinrich J. Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 847-54.

Ghaemmaghami AM, Gough L, Sewell HF, Shakib F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1468-75.

Ghasabi M, Mansoori B, Mohammadi A, Duijf PH, Shomali N, Shirafkan N, Mokhtarzadeh A, Baradaran B. MicroRNAs in cancer drug resistance: Basic evidence and clinical applications. *J Cell Physiol* 2019; 234: 2152-68.

Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, Mitsui H, Cardinale I, de Guzman Strong C, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 1344-54.

Glos K, Linek M, Loewenstein C, Mayer U, Mueller RS. The efficacy of commercially available veterinary diets recommended for dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2008; 19: 280-7.

Glud M, Klausen M, Gniadecki R, Rossing M, Hastrup N, Nielsen FC, Drzewiecki KT. MicroRNA expression in melanocytic nevi: the usefulness of formalin-fixed, paraffin-embedded material for miRNA microarray profiling. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1219-24.

Gonzales AJ, Humphrey WR, Messamore JE, Fleck TJ, Fici GJ, Shelly JA, Teel JF, Bammert GF, Dunham SA, Fuller TE, McCall RB. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*

2013; 24: 48-53.e11-2.

Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ, Zhang M, Mann DW, Mitton-Fry M. Oclacitinib (APOQUEL((R))) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther* 2014; 37: 317-24.

Gonzales AJ, Fleck TJ, Humphrey WR, Galvan BA, Aleo MM, Mahabir SP, Tena JK, Greenwood KG, McCall RB. IL-31-induced pruritus in dogs: a novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics. *Vet Dermatol* 2016; 27: 34-e10.

Gough L, Sewell HF, Shakib F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 enhances the IgE antibody response to a bystander antigen. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1594-8.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-40.

Griffin CE, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 81: 363-83.

Griffin CE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 81: 255-69.

Grimes JA, Prasad N, Levy S, Cattley R, Lindley S, Boothe HW, Henderson RA, Smith BF. A comparison of microRNA expression profiles from splenic hemangiosarcoma, splenic nodular hyperplasia, and normal spleens of dogs. *BMC Vet Res* 2016; 12: 272.

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP.

MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007; 27: 91-105.

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001; 106: 23-34.

Grone A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88: 1-12.

Gu S, Jin L, Zhang F, Huang Y, Grimm D, Rossi JJ, Kay MA. Thermodynamic stability of small hairpin RNAs highly influences the loading process of different mammalian Argonautes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 9208-13.

Gu S, Jin L, Huang Y, Zhang F, Kay MA. Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain. *Curr Biol* 2012; 22: 1536-42.

Gulati N, Lovendorf MB, Zibert JR, Akat KM, Renwick N, Tuschl T, Krueger JG. Unique microRNAs appear at different times during the course of a delayed-type hypersensitivity reaction in human skin. *Exp Dermatol* 2015; 24: 953-7.

Gustafsson D, Sjoberg 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.

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 509-24.

Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 207-8.

Halliwell RE. The localization of IgE in canine skin: an immunofluorescent study.

J Immunol 1973; 110: 422-30.

Halliwell REW, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 81: 159-67.

Halova I, Draberova L, Draber P. Mast cell chemotaxis - chemoattractants and signaling pathways. *Front Immunol* 2012; 3: 119.

Hamilton JD, Suarez-Farinas M, Dhingra N, Cardinale I, Li X, Kostic A, Ming JE, Radin AR, Krueger JG, Graham N, Yancopoulos GD, Pirozzi G, Guttman-Yassky E. Dupilumab improves the molecular signature in skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 1293-300.

Hammerberg B, Olivry T, Orton SM. Skin mast cell histamine release following stem cell factor and high-affinity immunoglobulin E receptor cross-linking in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2001; 12: 339-46.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-6.

Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 87: 3-14.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004; 18: 3016-27.

Hanifin JM, Reed ML. A population-based survey of eczema prevalence in the United States. *Dermatitis* 2007; 18: 82-91.

Hara J, Higuchi K, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G. High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 406-

13.

Hauck V, Hugli P, Meli ML, Rostaher A, Fischer N, Hofmann-Lehmann R, Favrot C. Increased numbers of FoxP3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood from dogs with atopic dermatitis and its correlation with disease severity. *Vet Dermatol* 2016; 27: 26-e9.

Hauptmann J, Dueck A, Harlander S, Pfaff J, Merkl R, Meister G. Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20: 814-7.

Hayashiya S, Tani K, Morimoto M, Hayashi T, Hayasaki M, Nomura T, Une S, Nakaichi M, Taura Y. Expression of T helper 1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002; 49: 27-31.

Heishima K, Meuten T, Yoshida K, Mori T, Thamm DH. Prognostic significance of circulating microRNA-214 and -126 in dogs with appendicular osteosarcoma receiving amputation and chemotherapy. *BMC Vet Res* 2019; 15: 39.

Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, Griffin C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 2015; 11: 196.

Heratizadeh A, Wichmann K, Werfel T. Food allergy and atopic dermatitis: how are they connected? *Curr Allergy Asthma Rep* 2011; 11: 284-91.

Hermann H, Runnel T, Aab A, Baurecht H, Rodriguez E, Magilnick N, Urgard E, Sahmatova L, Prans E, Maslovskaja J, Abram K, Karelson M, Kaldvee B, Reemann P, Haljasorg U, Ruckert B, Wawrzyniak P, Weichenthal M, Mrowietz U, Franke A, Gieger C, Barker J, Trembath R, Tsoi LC, Elder JT, Tkaczyk ER, Kisand K, Peterson P, Kingo K, Boldin M, Weidinger S, Akdis CA, Rebane A. miR-146b Probably Assists miRNA-146a in the Suppression of Keratinocyte Proliferation and Inflammatory Responses in Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2017; 137: 1945-54.

Hessam S, Sand M, Skrygan M, Gambichler T, Bechara FG. Expression of miRNA-155, miRNA-223, miRNA-31, miRNA-21, miRNA-125b, and miRNA-146a in the Inflammatory Pathway of Hidradenitis Suppurativa. *Inflammation* 2017; 40: 464-72.

Hightower K, Marsella R, Flynn-Lurie A. Effects of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 88-95.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 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? *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001b; 81: 227-31.

Hillier A, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 81: 289-304.

Hobi S, Mueller RS. Efficacy and safety of rush immunotherapy with alum-precipitated allergens in canine atopic dermatitis. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2014; 42: 167-73.

Hobi S, Klinger C, Classen J, Mueller RS. The effects of a topical lipid complex therapy on dogs with atopic dermatitis: a double blind, randomized, placebo-controlled study. *Vet Dermatol* 2017; 28: 369-e84.

Horvath-Ungerboeck C, Widmann K, Handl S. Detection of DNA from undeclared animal species in commercial elimination diets for dogs using PCR. *Vet Dermatol* 2017; 28: 373-e86.



Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, De Benedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DY. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 150-5.

Hubbard TL, White PD. Comparison of subjective and objective intradermal allergy test scoring methods in dogs with atopic dermatitis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011; 47: 399-405.

Hulanicka M, Garncarz M, Parzeniecka-Jaworska M, Jank M. Plasma miRNAs as potential biomarkers of chronic degenerative valvular disease in Dachshunds. *BMC Vet Res* 2014; 10: 205.

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16961-6.

Huntzinger E, Braun JE, Heimstadt S, Zekri L, Izaurralde E. Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *Embo j* 2010; 29: 4146-60.

Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 99-110.

Huntzinger E, Kuzuoglu-Ozturk D, Braun JE, Eulalio A, Wohlbald L, Izaurralde E. The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 978-94.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-8.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme

complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.

Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 22-32.

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.

Ipsaro JJ, Joshua-Tor L. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22: 20-8.

Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011; 365: 1315-27.

Ito T, Liu YJ, Arima K. Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders--TSLP programs the "Th2 code" in dendritic cells. *Allergol Int* 2012; 61: 35-43.

Iwasaki S, Kawamata T, Tomari Y. *Drosophila* argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell* 2009; 34: 58-67.

Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 2010; 39: 292-9.

Jackson HA, Miller HR, Halliwell RE. Canine leucocyte histamine release: response to antigen and to anti-IgE. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 53: 195-206.

Jackson HA, Orton SM, Hammerberg B. IgE is present on peripheral blood monocytes and B cells in normal dogs and dogs with atopic dermatitis but there is no correlation with serum IgE concentrations. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;

85: 225-32.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 113-27.

Jaeger K, Linek M, Power HT, Bettenay SV, Zabel S, Rosychuk RA, Mueller RS. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Vet Dermatol* 2010; 21: 118-22.

Jang YH, Choi JK, Jin M, Choi YA, Ryoo ZY, Lee HS, Park PH, Kim SU, Kwon TK, Jang MH, Im SH, Moon SY, Lee WJ, Lee SJ, Kim DW, Kim SH. House Dust Mite Increases pro-Th2 Cytokines IL-25 and IL-33 via the Activation of TLR1/6 Signaling. *J Invest Dermatol* 2017; 137: 2354-61.

Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013; 368: 1685-94.

Jassies-van der Lee A, Rutten VP, Bruijn J, Willemsse T, Broere F. CD4+ and CD8+ skin-associated T lymphocytes in canine atopic dermatitis produce interleukin-13, interleukin-22 and interferon-gamma and contain a CD25+ FoxP3+ subset. *Vet Dermatol* 2014; 25: 456-e72.

Jinek M, Fabian MR, Coyle SM, Sonenberg N, Doudna JA. Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 238-40.

Jonas S, Izaurralde E. The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev* 2013; 27: 2628-41.

Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 2015; 16: 421-33.

Jung S, Bohan A. Genome-wide sequencing and quantification of circulating microRNAs for dogs with congestive heart failure secondary to myxomatous mitral valve degeneration. *Am J Vet Res* 2018; 79: 163-9.

Kawamata T, Seitz H, Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16: 953-60.

Kennis RA. Food allergies: update of pathogenesis, diagnoses, and management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; 36: 175-84, vii-viii.

Kent MS, Zwingenberger A, Westropp JL, Barrett LE, Durbin-Johnson BP, Ghosh P, Vinnall RL. MicroRNA profiling of dogs with transitional cell carcinoma of the bladder using blood and urine samples. *BMC Vet Res* 2017; 13: 339.

Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2008a; 123: 337-44.

Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008b; 123: 337-44.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001; 15: 2654-9.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115: 209-16.

Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M. Childhood farm environment and asthma and sensitization in young adulthood. *Allergy* 2002; 57: 1130-5.

Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol* 2008; 126: 332-7.

Kim JP, Chao LX, Simpson EL, Silverberg JI. Persistence of atopic dermatitis (AD): A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2016; 75: 681-7.e11.

Kimura T, Doi K. Dorsal skin reactions of hairless dogs to topical treatment with corticosteroids. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 528-35.

Kirsch CM, Sigal E, Djokic TD, Graf PD, Nadel JA. An in vivo chemotaxis assay in the dog trachea: evidence for chemotactic activity of 8,15-diHETE. *J Appl Physiol* (1985) 1988; 64: 1792-5.

Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007; 5: e203.

Klukowska-Rotzler J, Chervet L, Muller EJ, Roosje P, Marti E, Janda J. Expression of thymic stromal lymphopoietin in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 54-9.e13-4.

Klunker S, Trautmann A, Akdis M, Verhagen J, Schmid-Grendelmeier P, Blaser K, Akdis CA. A second step of chemotaxis after transendothelial migration: keratinocytes undergoing apoptosis release IFN-gamma-inducible protein 10, monokine induced by IFN-gamma, and IFN-gamma-inducible alpha-chemoattractant for T cell chemotaxis toward epidermis in atopic dermatitis. *J Immunol* 2003; 171: 1078-84.

Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 293: 2269-71.

Kobayashi H, Tomari Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1859: 71-81.

Kobayashi T, Momoi Y, Iwasaki T. Cyclosporine A inhibits the mRNA expressions of IL-2, IL-4 and IFN-gamma, but not TNF-alpha, in canine mononuclear cells. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 887-92.

Kobayashi T, Kano R, Nagata M, Hasegawa A, Kamata H. Genotyping of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine healthy skin and atopic dermatitis by internal spacer 1 (IGS1) region analysis. *Vet Dermatol* 2011; 22: 401-5.

Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, Nomicos E, Polley EC, Komarow HD, Murray PR, Turner ML, Segre JA. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012; 22: 850-9.

Kong HH, Segre JA. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Investigating the Skin Microbiome. *J Invest Dermatol* 2017; 137: e119-e22.

Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010; 101: 2087-92.

Koshkin A, K. Singh S, Nielsen P, K. Rajwanshi V, Kumar R, Meldgaard M, Erik Olsen C, Wengel J. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* 1998; 54: 3607-30.

Kozlov G, Safaee N, Rosenauer A, Gehring K. Structural basis of binding of P-body-associated proteins GW182 and ataxin-2 by the Ml1e domain of poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 2010; 285: 13599-606.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50: 298-301.

Kunne T, Swarts DC, Brouns SJ. Planting the seed: target recognition of short guide RNAs. *Trends Microbiol* 2014; 22: 74-83.

Kurtdede A, Kurtdede N, Ergün E, Guzel M. Mast cells in the dog skin: distribution, density, heterogeneity and influence of fixation techniques. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2005; 52: 7-12.

Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 145-51.

Kwochka KW. The structure and function of epidermal lipids. *Veterinary Dermatology* 1993; 1993 v.4 no.4: pp. 151-9.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735-9.

Lamhamedi-Cherradi SE, Martin RE, Ito T, Kheradmand F, Corry DB, Liu YJ, Moyle M. Fungal proteases induce Th2 polarization through limited dendritic cell maturation and reduced production of IL-12. *J Immunol* 2008; 180: 6000-9.

Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A,

Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007; 129: 1401-14.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.

Lauber B, Molitor V, Meury S, Doherr MG, Favrot C, Tengvall K, Bergvall K, Leeb T, Roosje P, Marti E. Total IgE and allergen-specific IgE and IgG antibody levels in sera of atopic dermatitis affected and non-affected Labrador- and Golden retrievers. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149: 112-8.

Lawrence MG, Steinke JW, Borish L. Basic science for the clinician: Mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016; 117: 138-42.

Lawrence P, Ceccoli J. Advances in the Application and Impact of MicroRNAs as Therapies for Skin Disease. *BioDrugs* 2017; 31: 423-38.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.

Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-4.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo j* 2002; 21: 4663-70.



Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo j* 2004; 23: 4051-60.

Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 651-7.

Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 2006; 7: 314-20.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-98.

Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 36.

Li Q, Freeman LM, Rush JE, Laflamme DP. Expression Profiling of Circulating MicroRNAs in Canine Myxomatous Mitral Valve Disease. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 14098-108.

Li W, Liu F, Wang J, Long M, Wang Z. MicroRNA-21-Mediated Inhibition of Mast Cell Degranulation Involved in the Protective Effect of Berberine on 2,4-Dinitrofluorobenzene-Induced Allergic Contact Dermatitis in Rats via p38 Pathway. *Inflammation* 2018; 41: 689-99.

Lian TM, Halliwell RE. Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66: 203-23.

Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013; 14: 536-42.

Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 2003; 17: 991-1008.

Lin TY, London CA. A functional comparison of canine and murine bone marrow derived cultured mast cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 320-34.

Lin TY, London CA. Characterization and modulation of canine mast cell derived eicosanoids. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 135: 118-27.

Linde YW. Dry skin in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1992; 177: 9-13.

Little PR, King VL, Davis KR, Cosgrove SB, Stegemann MR. A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. *Vet Dermatol* 2015; 26: 23-30, e7-8.

Liu A, Xu X. MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol* 2011; 724: 259-67.

Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, Wiggins JF, Bader AG, Fagin R, Brown D, Tang DG. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011; 17: 211-5.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004; 305: 1437-41.

Lloyd DH, Viac J, Werling D, Reme CA, Gatto H. Role of sugars in surface microbe-host interactions and immune reaction modulation. *Vet Dermatol* 2007; 18: 197-204.

Loewenstein C, Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Vet Dermatol* 2009; 20: 84-98.

Loflath A, von Voigts-Rhetz A, Jaeger K, Schmid M, Kuechenhoff H, Mueller RS. The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus - a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Vet Dermatol* 2007; 18: 427-31.

Loorigh van Beeck FA, Hoekstra H, Brunekreef B, Willemse T. Inverse association between endotoxin exposure and canine atopic dermatitis. *Vet J* 2011; 190: 215-9.

Lourenco AM, Schmidt V, Sao Braz B, Nobrega D, Nunes T, Duarte-Correia JH, Matias D, Maruhashi E, Reme CA, Nuttall T. Efficacy of proactive long-term maintenance therapy of canine atopic dermatitis with 0.0584% hydrocortisone aceponate spray: a double-blind placebo controlled pilot study. *Vet Dermatol* 2016; 27: 88-92e25.

Lovendorf MB, Zibert JR, Hagedorn PH, Glue C, Odum N, Ropke MA, Skov L. Comparison of microRNA expression using different preservation methods of matched psoriatic skin samples. *Exp Dermatol* 2012; 21: 299-301.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8.

Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol* 2009; 182: 4994-5002.

Lu TX, Rothenberg ME. Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 3-13; quiz 4.

Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stahler C, Meese E, Keller A. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 3865-77.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-8.

Lv Y, Qi R, Xu J, Di Z, Zheng H, Huo W, Zhang L, Chen H, Gao X. Profiling of serum and urinary microRNAs in children with atopic dermatitis. *PLoS One* 2014; 9: e115448.

Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 2005; 434: 666-70.

Ma L, Xue HB, Wang F, Shu CM, Zhang JH. MicroRNA-155 may be involved in the pathogenesis of atopic dermatitis by modulating the differentiation and function of T helper type 17 (Th17) cells. *Clin Exp Immunol* 2015; 181: 142-9.

Machado DC, Horton D, Harrop R, Peachell PT, Helm BA. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2972-80.

Machado ML, Cafarchia C, Otranto D, Ferreira RR, Bianchi SP, Latrofa MS, Parisi A, Ferreira L. Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions. *Med Mycol* 2010; 48: 889-92.

Maeda S, Fujiwara S, Omori K, Kawano K, Kurata K, Masuda K, Ohno K,

Tsujimoto H. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88: 79-87.

Maeda S, Ohmori K, Yasuda N, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Increase of CC chemokine receptor 4-positive cells in the peripheral CD4 cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1467-73.

Maeda S, Tsukui T, Saze K, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H, Iwabuchi S. Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 103: 83-92.

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. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 131: 298-302.

Maeda S, Maeda S, Ohno K, Kaji N, Hori M, Fujino Y, Tsujimoto H. Protease-activated receptor-2 induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in canine keratinocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 153: 17-25.

Majewska A, Gajewska M, Dembele K, Maciejewski H, Prostek A, Jank M. Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Vet Res* 2016; 12: 174.

Makunin IV, Pheasant M, Simons C, Mattick JS. Orthologous microRNA genes are located in cancer-associated genomic regions in human and mouse. *PLoS One* 2007; 2: e1133.

Malmhall C, Alawieh S, Lu Y, Sjostrand M, Bossios A, Eldh M, Radinger M. MicroRNA-155 is essential for T(H)2-mediated allergen-induced eosinophilic inflammation in the lung. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 1429-38, 38.e1-7.

Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 2005; 19: 2979-90.

Marioni-Henry K, Zaho D, Amengual-Batle P, Rzechorzek NM, Clinton M. Expression of microRNAs in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disease. *Acta Vet Scand* 2018; 60: 80.

Marsella R, Nicklin CF. Sulphido-leukotriene production from peripheral leukocytes and skin in clinically normal dogs and house dust mite positive atopic dogs. *Vet Dermatol* 2001a; 12: 3-12.

Marsella R. Update on the role of leukotrienes in the pathogenesis of atopy: a comparative review. *Vet Dermatol* 2001; 12: 63-74.

Marsella R, Olivry T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXII): nonsteroidal anti-inflammatory pharmacotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 81: 331-45.

Marsella R, Nicklin CF. Intradermal skin test reactivity to histamine and substance P is blunted in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2001b; 12: 149-54.

Marsella R, Nicklin CF, Saglio S, Lopez J. Investigation on the clinical efficacy and safety of 0.1% tacrolimus ointment (Protopic) in canine atopic dermatitis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, cross-over study. *Vet Dermatol* 2004; 15: 294-303.

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* 2006a; 17: 24-35.

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*

2006b; 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* 2006c; 17: 111-20.

Marsella R, Girolomoni G. Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped potential. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2351-7.

Marsella R, Samuelson D, Doerr K. Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 81-8.

Marsella R, Saridomichelakis MN. Environmental and oral challenge with storage mites in beagles experimentally sensitized to *Dermatophagoides farinae*. *Vet Dermatol* 2010; 21: 105-11.

Marsella R, Olivry T, Carlotti DN. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2011; 22: 239-48.

Marsella R, Sousa CA, Gonzales AJ, Fadok VA. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 194-207.

Marsella R, Papastavros V, Ahrens K, Santoro D. Decreased expression of caspase-14 in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet J* 2016; 209: 201-3.

Marsella R, Cornegliani L, Ozmen I, Bohannon M, Ahrens K, Santoro D. Randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study on the effects of topical blackcurrant emulsion enriched in essential fatty acids, ceramides and 18-beta glycyrrhetic acid on clinical signs and skin barrier function in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2017; 28: 577-e140.

Marsella R, De Benedetto A. Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update

and Comparative Review. *Vet Sci* 2017; 4

Marsella R, Ahrens K, Sanford R. Investigation of the correlation of serum IL-31 with severity of dermatitis in an experimental model of canine atopic dermatitis using beagle dogs. *Vet Dermatol* 2018; 29: 69-e28.

Marsh KA, Ruedisueli FL, Coe SL, Watson TGD. Effects of zinc and linoleic acid supplementation on the skin and coat quality of dogs receiving a complete and balanced diet. *Veterinary Dermatology* 2008; 11: 277 - 84.

Martin DD, Martin AL. Pain management and anesthesia in veterinary dermatology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; 36: 1-14, v.

Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as diagnostic and therapeutic tools for Alzheimer's disease: advances and limitations. *Neural Regen Res* 2019; 14: 242-55.

Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002; 110: 563-74.

Mason IS, Lloyd DH. The role of allergy in the development of canine pyoderma. *Journal of Small Animal Practice* 1989; 30: 216-8.

Masukawa Y, Narita H, Sato H, Naoe A, Kondo N, Sugai Y, Oba T, Homma R, Ishikawa J, Takagi Y, Kitahara T. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res* 2009; 50: 1708-19.

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 2007; 317: 1764-7.

Mathys H, Basquin J, Ozgur S, Czarnocki-Cieciura M, Bonneau F, Aartse A,



Dziembowski A, Nowotny M, Conti E, Filipowicz W. Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression. *Mol Cell* 2014; 54: 751-65.

Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 2005; 123: 607-20.

McCandless EE, Rugg CA, Fici GJ, Messamore JE, Aleo MM, Gonzales AJ. Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 157: 42-8.

McEwan NA. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2000; 68: 279-83.

McManus MT. MicroRNAs and cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 253-8.

Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010; 140: 771-6.

Meijer HA, Kong YW, Lu WT, Wilczynska A, Spriggs RV, Robinson SW, Godfrey JD, Willis AE, Bushell M. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* 2013; 340: 82-5.

Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans* 2014; 42: 1135-40.

Meisgen F, Xu N, Wei T, Janson PC, Obad S, Broom O, Nagy N, Kauppinen S, Kemeny L, Stahle M, Pivarcsi A, Sonkoly E. MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis. *Exp Dermatol* 2012; 21: 312-4.

Meisgen F, Xu Landen N, Wang A, Rethi B, Bouez C, Zuccolo M, Gueniche A,

Stahle M, Sonkoly E, Breton L, Pivarcsi A. MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory responses in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 1931-40.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; 15: 185-97.

Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 447-59.

Mendelsohn C, Rosenkrantz W, Griffin CE. Practical cytology for inflammatory skin diseases. *Clin Tech Small Anim Pract* 2006; 21: 117-27.

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.

Meury S, Molitor V, Doherr MG, Roosje P, Leeb T, Hobi S, Wilhelm S, Favrot C. Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. *Vet Dermatol* 2011; 22: 327-34.

Michels GM, Ramsey DS, Walsh KF, Martinon OM, Mahabir SP, Hoovers JD, Walters RR, Dunham SA. A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized, anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2016a; 27: 478-e129.

Michels GM, Walsh KF, Kryda KA, Mahabir SP, Walters RR, Hoovers JD, Martinon OM. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the safety of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2016b; 27: 505-e136.

Mishima Y, Fukao A, Kishimoto T, Sakamoto H, Fujiwara T, Inoue K. Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated silencing in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 1104-9.

Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 98: 12-23.

Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* 2005; 19: 2837-48.

Miyoshi T, Takeuchi A, Siomi H, Siomi MC. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 1024-6.

Momen-Heravi F, Trachtenberg AJ, Kuo WP, Cheng YS. Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *J Dent Res* 2014; 93: 86s-93s.

Morales CA, Schultz KT, DeBoer DJ. Antistaphylococcal antibodies in dogs with recurrent staphylococcal pyoderma. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 42: 137-47.

Morris DO, Clayton DJ, Drobatz KJ, Felsburg PJ. Response to *Malassezia pachydermatis* by peripheral blood mononuclear cells from clinically normal and atopic dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63: 358-62.

Mudd JC, Murphy P, Manion M, Debernardo R, Hardacre J, Ammori J, Hardy GA, Harding CV, Mahabaleshwar GH, Jain MK, Jacobson JM, Brooks AD, Lewis S, Schacker TW, Anderson J, Haddad EK, Cubas RA, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. Impaired T-cell responses to sphingosine-1-phosphate in HIV-1 infected lymph nodes. *Blood* 2013; 121: 2914-22.

Mueller RS, Bettenay SV. Evaluation of the safety of an abbreviated course of injections of allergen extracts (rush immunotherapy) for the treatment of dogs with

atopic dermatitis. *Am J Vet Res* 2001; 62: 307-10.

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* 2005a; 16: 27-31.

Mueller RS, Fieseler KV, Zabel S, Rosychuk RAW. Conventional and rush immunotherapy in canine atopic dermatitis. In: *Advances in Veterinary Dermatology* V. Hillier A, Foster AP, Kwochka KW, eds. Oxford: Blackwell Publishing 2005b: 60-9.

Mueller RS, Olivry T. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (4): can we diagnose adverse food reactions in dogs and cats with in vivo or in vitro tests? *BMC Vet Res* 2017; 13: 275.

Mueller RS, Unterer S. Adverse food reactions: Pathogenesis, clinical signs, diagnosis and alternatives to elimination diets. *Vet J* 2018; 236: 89-95.

Mueller RS, Jensen-Jarolim E, Roth-Walter F, Marti E, Janda J, Seida AA, DeBoer D. Allergen immunotherapy in people, dogs, cats and horses - differences, similarities and research needs. *Allergy* 2018; 73: 1989-99.

Nadif R, Zerimech F, Bouzigon E, Matran R. The role of eosinophils and basophils in allergic diseases considering genetic findings. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13: 507-13.

Nakanishi K, Weinberg DE, Bartel DP, Patel DJ. Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* 2012; 486: 368-74.

Nakanishi K, Ascano M, Gogakos T, Ishibe-Murakami S, Serganov AA, Briskin D, Morozov P, Tuschl T, Patel DJ. Eukaryote-specific insertion elements control human ARGONAUTE slicer activity. *Cell Rep* 2013; 3: 1893-900.

Nakanishi K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2016; 7: 637-60.

Nardoni S, Mancianti F, Corazza M, Rum A. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathologia* 2004; 157: 383-8.

Nardoni S, Dini M, Taccini F, Mancianti F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Vet Microbiol* 2007; 122: 172-7.

Nishifuji K, Yoon JS. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol* 2013; 24: 60-72.e15-6.

Nodtvedt A, Egenvall A, Bergvall K, Hedhammar A. Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish population of insured dogs. *Vet Rec* 2006a; 159: 241-6.

Nodtvedt A, Bergvall K, Emanuelson U, Egenvall A. Canine atopic dermatitis: validation of recorded diagnosis against practice records in 335 insured Swedish dogs. *Acta Vet Scand* 2006b; 48: 8.

Nodtvedt A, Bergvall K, Sallander M, Egenvall A, Emanuelson U, Hedhammar A. A case-control study of risk factors for canine atopic dermatitis among boxer, bullterrier and West Highland white terrier dogs in Sweden. *Vet Dermatol* 2007; 18: 309-15.

Novak N, Koch S, Allam JP, Bieber T. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 50-9.

Novak N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 879-86.

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 T, Reece D, Roberts E. Life-long diseases need life-long treatment: long-term safety of ciclosporin in canine atopic dermatitis. *Vet Rec* 2014; 174 Suppl 2: 3-12.

Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2002; 87: 379-84.

Nuttall TJ, McEwan NA, Bensignor E, Cornegliani L, Lowenstein C, Reme CA. Comparable efficacy of a topical 0.0584% hydrocortisone aceponate spray and oral ciclosporin in treating canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 4-10, e1-2.

Olivry T, Moore PF, Affolter VK, Naydan DK. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 579-85.

Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol* 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, Hill PB. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001; 81: 305-9.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001a; 81: 311-6.

Olivry T, Marsella R, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001a; 81: 347-62.

Olivry T, Dunston SM, Murphy KM, Moore PF. Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Vet Dermatol* 2001b; 12: 49-58.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2001b; 81: 317-22.

Olivry T, Steffan J, Fisch RD, Prelaud P, Guaguere E, Fontaine J, Carlotti DN. Randomized controlled trial of the efficacy of cyclosporine in the treatment of atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221: 370-7.

Olivry T, Dunston SM, Rivierre C, Jackson HA, Murphy KM, Peters E, Dean GA. A randomized controlled trial of misoprostol monotherapy for canine atopic dermatitis: effects on dermal cellularity and cutaneous tumour necrosis factor-alpha. *Vet Dermatol* 2003; 14: 37-46.

Olivry T, Mueller RS. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2003; 14: 121-46.

Olivry T, Deangelo KB, Dunston SM, Clarke KB, McCall CA. Patch testing of experimentally sensitized beagle dogs: development of a model for skin lesions of atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2006; 17: 95-102.

Olivry T, Deboer DJ, Prelaud P, Bensignor E. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Vet Dermatol* 2007; 18: 390-1.

Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prelaud P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 2010a; 21: 233-48.

Olivry T, Bizikova P. A systematic review of the evidence of reduced allergenicity and clinical benefit of food hydrolysates in dogs with cutaneous adverse food reactions. *Vet Dermatol* 2010; 21: 32-41.

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. *Vet Dermatol* 2010b; 21: 4-22.

Olivry T, Wofford J, Paps JS, Dunston SM. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Vet Dermatol* 2011; 22: 188-96.

Olivry T. Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 11-6.

Olivry T, Bizikova P. A systematic review of randomized controlled trials for prevention or treatment of atopic dermatitis in dogs: 2008-2011 update. *Vet Dermatol* 2013; 24: 97-117.e25-6.

Olivry T, Saridomichelakis M. Evidence-based guidelines for anti-allergic drug withdrawal times before allergen-specific intradermal and IgE serological tests in dogs. *Vet Dermatol* 2013; 24: 225-e49.

Olivry T, Saridomichelakis M, Nuttall T, Bensignor E, Griffin CE, Hill PB. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol* 2014; 25: 77-85, e25.



Olivry T, Mueller RS, Prelaud P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): duration of elimination diets. *BMC Vet Res* 2015a; 11: 225.

Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prelaud P, International Committee on Allergic Diseases of A. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Vet Res* 2015b; 11: 210.

Olivry T, Mayhew D, Paps JS, Linder KE, Peredo C, Rajpal D, Hofland H, Cote-Sierra J. Early Activation of Th2/Th22 Inflammatory and Pruritogenic Pathways in Acute Canine Atopic Dermatitis Skin Lesions. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 1961-9.

Olivry T, Mueller RS. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (5): discrepancies between ingredients and labeling in commercial pet foods. *BMC Vet Res* 2018; 14: 24.

Oosthuizen W, Ten Berg PWL, Francis B, Campbell S, Macklin V, Milne E, Gow AG, Fisher C, Mellanby RJ, Dear JW. Sensitivity and specificity of microRNA-122 for liver disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1637-44.

Osawa R, Akiyama M, Shimizu H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergol Int* 2011; 60: 1-9.

Otsuka A, Kabashima K. Mast cells and basophils in cutaneous immune responses. *Allergy* 2015; 70: 131-40.

Ownby DR, Johnson CC, Peterson EL. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *Jama* 2002; 288: 963-72.

Park S, Ohya F, Yamashita K, Nishifuji K, Iwasaki T. Comparison of response to

immunotherapy by intradermal skin test and antigen-specific IgE in canine atopy. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 983-8.

Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 2005; 434: 663-6.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86-9.

Pellerin L, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C, Mechin MC, Hansmann B, Rodriguez E, Weindinger S, Schmitt AM, Serre G, Paul C, Simon M. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 1094-102.

Pelucchi C, Galeone C, Bach JF, La Vecchia C, Chatenoud L. Pet exposure and risk of atopic dermatitis at the pediatric age: a meta-analysis of birth cohort studies. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 616-22.e7.

Peng W, Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 566-74.

Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 2007; 26: 611-23.

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.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005; 309: 1573-6.

Pinheiro D, Singh Y, Grant CR, Appleton RC, Sacchini F, Walker KR, Chadbourne AH, Palmer CA, Armitage-Chan E, Thompson I, Williamson L, Cunningham F, Garden OA. Phenotypic and functional characterization of a CD4(+) CD25(high) FOXP3(high) regulatory T-cell population in the dog. *Immunology* 2011; 132: 111-22.

Plant JD, Gortel K, Kovalik M, Polissar NL, Neradilek MB. Development and validation of the Canine Atopic Dermatitis Lesion Index, a scale for the rapid scoring of lesion severity in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 515-e103.

Plant JD, Neradilek MB, Polissar NL, Fadok VA, Scott BA. Agreement between allergen-specific IgE assays and ensuing immunotherapy recommendations from four commercial laboratories in the USA. *Vet Dermatol* 2014; 25: 15-e6.

Popa I, Pin D, Remoue 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. *Vet Res Commun* 2011; 35: 501-9.

Popa I, Remoue N, Osta B, Pin D, Gatto H, Haftek M, Portoukalian J. The lipid alterations in the stratum corneum of dogs with atopic dermatitis are alleviated by topical application of a sphingolipid-containing emulsion. *Clin Exp Dermatol* 2012; 37: 665-71.

Presnyak V, Collier J. The DHH1/RCKp54 family of helicases: an ancient family of proteins that promote translational silencing. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1829:

817-23.

Proverbio D, Perego R, Spada E, Ferro E. Prevalence of adverse food reactions in 130 dogs in Italy with dermatological signs: a retrospective study. *J Small Anim Pract* 2010; 51: 370-4.

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.

Pucheu-Haston CM, Santoro D, Bizikova P, Eisenschenk MN, Marsella R, Nuttall T. Review: Innate immunity, lipid metabolism and nutrition in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015a; 26: 104-e28.

Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MN. Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015b; 26: 124-e32.

Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Eisenschenk MN, Santoro D, Nuttall T, Marsella R. Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015c; 26: 115-e30.

Pyun BY. Natural history and risk factors of atopic dermatitis in children. *Allergy Asthma Immunol Res* 2015; 7: 101-5.

Raap U, Wichmann K, Bruder M, Stander S, Wedi B, Kapp A, Werfel T. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin*

Immunol 2008; 122: 421-3.

Raditic DM, Remillard RL, Tater KC. ELISA testing for common food antigens in four dry dog foods used in dietary elimination trials. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2011; 95: 90-7.

Rahman MM, Alkhoury H, Tang F, Che W, Ge Q, Ammit AJ. Sphingosine 1-phosphate induces neutrophil chemoattractant IL-8: repression by steroids. *PLoS One* 2014; 9: e92466.

Ralfkiaer U, Lindahl LM, Litman T, Gjerdrum LM, Ahler CB, Gniadecki R, Marstrand T, Fredholm S, Iversen L, Wasik MA, Bonefeld CM, Geisler C, Krejsgaard T, Glue C, Ropke MA, Woetmann A, Skov L, Gronbaek K, Odum N. MicroRNA expression in early mycosis fungoides is distinctly different from atopic dermatitis and advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Anticancer Res* 2014; 34: 7207-17.

Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 2005; 123: 621-9.

Rebane A, Zimmermann M, Aab A, Baurecht H, Koreck A, Karelson M, Abram K, Metsalu T, Pihlap M, Meyer N, Folster-Holst R, Nagy N, Kemeny L, Kingo K, Vilo J, Illig T, Akdis M, Franke A, Novak N, Weidinger S, Akdis CA. Mechanisms of IFN-gamma-induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1297-306.

Rebane A, Akdis CA. MicroRNAs in allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014; 14: 424.

Rebane A, Runnel T, Aab A, Maslovskaja J, Ruckert B, Zimmermann M, Plaas M, Karner J, Treis A, Pihlap M, Haljasorg U, Hermann H, Nagy N, Kemeny L, Erm T, Kingo K, Li M, Boldin MP, Akdis CA. MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 836-47 e11.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-6.

Reiter LV, Torres SM, Wertz PW. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Vet Dermatol* 2009; 20: 260-6.

Rentoft M, Fahlen J, Coates PJ, Laurell G, Sjostrom B, Ryden P, Nylander K. miRNA analysis of formalin-fixed squamous cell carcinomas of the tongue is affected by age of the samples. *Int J Oncol* 2011; 38: 61-9.

Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011; 12: 9-23.

Ricci EP, Limousin T, Soto-Rifo R, Rubilar PS, Decimo D, Ohlmann T. miRNA repression of translation in vitro takes place during 43S ribosomal scanning. *Nucleic Acids Res* 2013a; 41: 586-98.

Ricci R, Granato A, Vascellari M, Boscarato M, Palagiano C, Andrighetto I, Diez M, Mutinelli F. Identification of undeclared sources of animal origin in canine dry foods used in dietary elimination trials. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2013b; 97 Suppl 1: 32-8.

Ricklin ME, Roosje P, Summerfield A. Characterization of canine dendritic cells in healthy, atopic, and non-allergic inflamed skin. *J Clin Immunol* 2010; 30: 845-54.

Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 753-63.

Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 5944-53.

Rodrigues Hoffmann A, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Elkins Stephenson C, Mansell J, Steiner JM, Dowd SE, Olivry T, Suchodolski JS. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS One* 2014; 9: e83197.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.

Rolland T, Tasan M, Charlotiaux B, Pevzner SJ, Zhong Q, Sahni N, Yi S, Lemmens I, Fontanillo C, Mosca R, Kamburov A, Ghiassian SD, Yang X, Ghamsari L, Balcha D, Begg BE, Braun P, Brehme M, Broly MP, Carvunis AR, Convery-Zupan D, Corominas R, Coulombe-Huntington J, Dann E, Dreze M, Dricot A, Fan C, Franzosa E, Gebreab F, Gutierrez BJ, Hardy MF, Jin M, Kang S, Kiros R, Lin GN, Luck K, MacWilliams A, Menche J, Murray RR, Palagi A, Poulin MM, Rambout X, Rasla J, Reichert P, Romero V, Ruyssinck E, Sahalie JM, Scholz A, Shah AA, Sharma A, Shen Y, Spirohn K, Tam S, Tejada AO, Trigg SA, Twizere JC, Vega K, Walsh J, Cusick ME, Xia Y, Barabasi AL, Iakoucheva LM, Aloy P, De Las Rivas J, Tavernier J, Calderwood MA, Hill DE, Hao T, Roth FP, Vidal M. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell* 2014; 159: 1212-26.

Roque JB, O'Leary CA, Duffy DL, Kyaw-Tanner M, Gharahkhani P, Vogelnest L, Mason K, Shipstone M, Latter M. Atopic dermatitis in West Highland white terriers is associated with a 1.3-Mb region on CFA 17. *Immunogenetics* 2012; 64: 209-17.

Rosbach K, Baumer W. PCR detects bands consistent with the expression of receptors associated with pruritus in canine dorsal root ganglia. *Vet Dermatol* 2014; 25: 9-e4.

Rothers J, Stern DA, Spangenberg A, Lohman IC, Halonen M, Wright AL. Influence of early day-care exposure on total IgE levels through age 3 years. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1201-7.

Roudebush P. Ingredients and foods associated with adverse reactions in dogs and cats. *Vet Dermatol* 2013; 24: 293-4.

Roviezzo F, Brancaleone V, De Gruttola L, Vellecco V, Bucci M, D'Agostino B, Cooper D, Sorrentino R, Perretti M, Cirino G. Sphingosine-1-phosphate modulates vascular permeability and cell recruitment in acute inflammation in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 830-7.

Rozalski M, Rudnicka L, Samochocki Z. MiRNA in atopic dermatitis. *Postepy Dermatol Alergol* 2016; 33: 157-62.

Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16: 203-22.

Ruzicka T, Hanifin JM, Furue M, Pulka G, Mlynarczyk I, Wollenberg A, Galus R, Etoh T, Mihara R, Yoshida H, Stewart J, Kabashima K. Anti-Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2017; 376: 826-35.

Ryu I, Park JH, An S, Kwon OS, Jang SK. eIF4GI facilitates the MicroRNA-mediated gene silencing. *PLoS One* 2013; 8: e55725.

Saevik BK, Thoresen SI, Taugbol O. Fatty acid composition of serum lipids in atopic and healthy dogs. *Res Vet Sci* 2002; 73: 153-8.

Saevik BK, Bergvall K, Holm BR, Saijonmaa-Koulumies LE, Hedhammar A, 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. *Vet Dermatol* 2004; 15: 137-45.

Sahabi K, Selvarajah GT, Abdullah R, Cheah YK, Tan GC. Comparative aspects of microRNA expression in canine and human cancers. *J Vet Sci* 2018; 19: 162-71.

Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2331-6.

Sakai M, Spee B, Grinwis GCM, Penning LC, van Wolferen ME, van der Laan



LJW, Fieten H. Association of circulating microRNA-122 and microRNA-29a with stage of fibrosis and progression of chronic hepatitis in Labrador Retrievers. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 151-7.

Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, Huang LC, Johnson D, Scanlon ST, McKenzie AN, Fallon PG, Ogg GS. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med* 2013; 210: 2939-50.

Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* 2019; 234: 5451-65.

Salomon WE, Jolly SM, Moore MJ, Zamore PD, Serebrov V. Single-Molecule Imaging Reveals that Argonaute Reshapes the Binding Properties of Its Nucleic Acid Guides. *Cell* 2015; 162: 84-95.

Salzmann CA, Olivry TJ, Nielsen DM, Paps JS, Harris TL, Olby NJ. Genome-wide linkage study of atopic dermatitis in West Highland White Terriers. *BMC Genet* 2011; 12: 37.

Santoro D, Marsella R, Ahrens K, Graves TK, Bunick D. Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 329-36, e73.

Santoro D, Marsella R, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MN, Nuttall T, Bizikova P. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. *Vet Dermatol* 2015; 26: 84-e25.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Gioulekas D, Leontidis L. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 61-73.

Saridomichelakis MN, Olivry T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J* 2016; 207: 29-37.

Sawant DV, Wu H, Kaplan MH, Dent AL. The Bcl6 target gene microRNA-21 promotes Th2 differentiation by a T cell intrinsic pathway. *Mol Immunol* 2013; 54: 435-42.

Schafer T, Heinrich J, Wjst M, Adam H, Ring J, Wichmann HE. Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1280-4.

Schamber P, Schwab-Richards R, Bauersachs S, Mueller RS. Gene expression in the skin of dogs sensitized to the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *G3 (Bethesda)* 2014; 4: 1787-95.

Schiessl B, Zemann B, Hodgkin-Pickart LA, de Weck AL, Griot-Wenk M, Mayer P, Nefzger M, Schneider H, Liehl E. Importance of early allergen contact for the development of a sustained immunoglobulin E response in a dog model. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 125-34.

Schirle NT, MacRae IJ. The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 2012; 336: 1037-40.

Schirle NT, Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. Structural basis for microRNA targeting. *Science* 2014; 346: 608-13.

Schlotter YM, Rutten VP, Riemers F, Davenport G, Knol EF, Willemsse T. Altered expression of fatty acid desaturases in the skin of dogs with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2009; 54: 49-52.

Schlotter YM, Riemers FM, Rutten VP, Knol EF, Willemsse T. Enzymes involved in the conversion of arachidonic acid to eicosanoids in the skin of atopic dogs. *Exp Dermatol* 2010; 19: e317-9.

Schlotter YM, Rutten VP, Riemers FM, Knol EF, Willemse T. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 143: 20-6.

Schmidt MF. Drug target miRNAs: chances and challenges. *Trends Biotechnol* 2014; 32: 578-85.

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.

Schneider L, Tilles S, Lio P, Boguniewicz M, Beck L, LeBovidge J, Novak N, Bernstein D, Blessing-Moore J, Khan D, Lang D, Nicklas R, Oppenheimer J, Portnoy J, Randolph C, Schuller D, Spector S, Tilles S, Wallace D. Atopic dermatitis: a practice parameter update 2012. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 295-9.e1-27.

Schwartzman RM, Rockey JH, Halliwell RE. Canine reaginic antibody. Characterization of the spontaneous anti-ragweed and induced anti-dinitrophenyl reaginic antibodies of the atopic dog. *Clin Exp Immunol* 1971; 9: 549-69.

Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell* 2002; 10: 537-48.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115: 199-208.

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.

Shibata S, Maeda S, Maeda S, Chimura N, Kondo N, Fukata T. Augmentation of CCL17 and CCL28 gene expression by TNF-alpha, IL-1beta, or IFN-gamma in

cultured canine keratinocytes. *Res Vet Sci* 2010; 88: 422-6.

Shimada K, Yoshihara T, Yamamoto M, Konno K, Momoi Y, Nishifuji K, Iwasaki T. Transepidermal water loss (TEWL) reflects skin barrier function of dog. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 841-3.

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. *Vet Dermatol* 2009; 20: 541-6.

Shin C. Cleavage of the star strand facilitates assembly of some microRNAs into Ago2-containing silencing complexes in mammals. *Mol Cells* 2008; 26: 308-13.

Sidbury R, Davis DM, Cohen DE, Cordoro KM, Berger TG, Bergman JN, Chamlin SL, Cooper KD, Feldman SR, Hanifin JM, Krol A, Margolis DJ, Paller AS, Schwarzenberger K, Silverman RA, Simpson EL, Tom WL, Williams HC, Elmets CA, Block J, Harrod CG, Begolka WS, Eichenfield LF. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. *J Am Acad Dermatol* 2014; 71: 327-49.

Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M. Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *J Clin Pathol* 2009; 62: 84-8.

Silverberg JI, Vakharia PP, Chopra R, Sacotte R, Patel N, Immaneni S, White T, Kantor R, Hsu DY. Phenotypical Differences of Childhood- and Adult-Onset Atopic Dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018; 6: 1306-12.

Silverberg JI. Adult-Onset Atopic Dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019; 7: 28-33.

Silverberg NB. Typical and atypical clinical appearance of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2017; 35: 354-9.

Silvestre Salvador JF, Romero-Perez D, Encabo-Duran B. Atopic Dermatitis in Adults: A Diagnostic Challenge. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2017; 27: 78-88.

Simou C, Thoday KL, Forsythe PJ, Hill PB. Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Vet Dermatol* 2005; 16: 385-91.

Sinke JD, Thepen T, Bihari IC, Rutten VP, Willemse T. Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 57: 13-23.

Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Saaf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M, Norstedt G, Alenius H, Homey B, Scheynius A, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One* 2007; 2: e110.

Sonkoly E, Janson P, Majuri ML, Savinko T, Fyhrquist N, Eidsmo L, Xu N, Meisgen F, Wei T, Bradley M, Stenvang J, Kauppinen S, Alenius H, Lauerma A, Homey B, Winqvist O, Stahle M, Pivarcsi A. MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 581-9 e1-20.

Sontheimer EJ. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 127-38.

Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002; 3: 673-80.

Sousa CA, Halliwell RE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XI): the relationship between arthropod hypersensitivity and atopic dermatitis in the dog.

Vet Immunol Immunopathol 2001; 81: 233-7.

Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. J Allergy Clin Immunol 2003; 112: S118-27.

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. Am J Pathol 2002; 161: 1961-71.

Srivastava A, Nikamo P, Lohcharoenkal W, Li D, Meisgen F, Xu Landen N, Stahle M, Pivarecsi A, Sonkoly E. MicroRNA-146a suppresses IL-17-mediated skin inflammation and is genetically associated with psoriasis. J Allergy Clin Immunol 2017; 139: 550-61.

Stahl J, Paps J, Baumer W, Olivry T. Dermatophagoides farinae house dust mite allergen challenges reduce stratum corneum ceramides in an experimental dog model of acute atopic dermatitis. Vet Dermatol 2012; 23: 497-e97.

Steffan J, Alexander D, Brovedani F, Fisch RD. Comparison of cyclosporine A with methylprednisolone for treatment of canine atopic dermatitis: a parallel, blinded, randomized controlled trial. Vet Dermatol 2003; 14: 11-22.

Steffan J, Parks C, Seewald W. Clinical trial evaluating the efficacy and safety of cyclosporine in dogs with atopic dermatitis. J Am Vet Med Assoc 2005; 226: 1855-63.

Stehle ME, Hanczaruk M, Schwarz SC, Gobel TW, Mueller RS. Effects of polyunsaturated fatty acids on isolated canine peripheral blood mononuclear cells and cytokine expression (IL-4, IFN-gamma, TGF-beta) in healthy and atopic dogs. Vet Dermatol 2010; 21: 112-7.

Studemann C, Bauersachs S, Weber K, Wess G. Detection and comparison of microRNA expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls. BMC Vet Res 2013; 9: 12.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989; 299: 1259-60.

Suarez-Farinas M, Tintle SJ, Shemer A, Chiricozzi A, Nograles K, Cardinale I, Duan S, Bowcock AM, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 954-64.e1-4.

Suzuki HI, Katsura A, Yasuda T, Ueno T, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K. Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22: 512-21.

Swinnen C, Vroom M. The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Vet Dermatol* 2004; 15: 31-6.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12481-6.

Takkouche B, Gonzalez-Barcala FJ, Etminan M, Fitzgerald M. Exposure to furry pets and the risk of asthma and allergic rhinitis: a meta-analysis. *Allergy* 2008; 63: 857-64.

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.

Taszkun I. The evaluation of Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI) test in dogs with atopic dermatitis (AD) treated with cyclosporine or prednisone. *Pol J Vet Sci* 2010; 13: 681-8.

Taugbol O, Baddaky-Taugbol B, Saarem K. The fatty acid profile of subcutaneous fat and blood plasma in pruritic dogs and dogs without skin problems. *Can J Vet Res* 1998; 62: 275-8.

Tengvall K, Kierczak M, Bergvall K, Olsson M, Frankowiack M, Farias FH, Pielberg G, Carlborg O, Leeb T, Andersson G, Hammarstrom L, Hedhammar A, Lindblad-Toh K. Genome-wide analysis in German shepherd dogs reveals association of a locus on CFA 27 with atopic dermatitis. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003475.

Theerawatanasirikul S, Sailasuta A, Thanawongnuwech R, Suriyaphol G. Alterations of keratins, involucrin and filaggrin gene expression in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2012; 93: 1287-92.

Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 792-9.

Timm K, Mueller RS, Nett-Mettler CS. Long-term effects of intralymphatic immunotherapy (ILIT) on canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2018; 29: 123-e49.

Tiwari J, Gupta G, de Jesus Andreoli Pinto T, Sharma R, Pabreja K, Matta Y, Arora N, Mishra A, Sharma R, Dua K. Role of microRNAs (miRNAs) in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Panminerva Med* 2018; 60: 25-8.

Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2010; 58: 1-7.

Torres SM, Diaz SF, Nogueira SA, Jessen C, Polzin DJ, Gilbert SM, Horne KL. Frequency of urinary tract infection among dogs with pruritic disorders receiving long-term glucocorticoid treatment. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227: 239-43.

Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* 2011; 19: 1116-22.

Tse K, Horner AA. Defining a role for ambient TLR ligand exposures in the genesis



and prevention of allergic diseases. *Semin Immunopathol* 2008; 30: 53-62.

Urgard E, Lorents A, Klaas M, Padari K, Viil J, Runnel T, Langel K, Kingo K, Tkaczyk E, Langel U, Maimets T, Jaks V, Pooga M, Rebane A. Pre-administration of PepFect6-microRNA-146a nanocomplexes inhibits inflammatory responses in keratinocytes and in a mouse model of irritant contact dermatitis. *J Control Release* 2016; 235: 195-204.

van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. High frequency of IL-4-producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 389-94.

van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Curr Probl Dermatol* 2016; 49: 8-26.

Vaughan JW, McLaughlin TE, Perzanowski MS, Platts-Mills TA. Evaluation of materials used for bedding encasement: effect of pore size in blocking cat and dust mite allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 227-31.

Veenhof EZ, Knol EF, Schlotter YM, Vernooij JC, Rutten VP, Willemsse T. Characterisation of T cell phenotypes, cytokines and transcription factors in the skin of dogs with cutaneous adverse food reactions. *Vet J* 2011; 187: 320-4.

Vennegaard MT, Bonefeld CM, Hagedorn PH, Bangsgaard N, Lovendorf MB, Odum N, Woetmann A, Geisler C, Skov L. Allergic contact dermatitis induces upregulation of identical microRNAs in humans and mice. *Contact Dermatitis* 2012; 67: 298-305.

Verlinden A, Hesta M, Millet S, Janssens GP. Food allergy in dogs and cats: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 259-73.

von Kobyletzki LB, Bornehag CG, Hasselgren M, Larsson M, Lindstrom CB,

Svensson A. Eczema in early childhood is strongly associated with the development of asthma and rhinitis in a prospective cohort. *BMC Dermatol* 2012; 12: 11.

von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 9-19.

von Mutius E, Vercelli D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 861-8.

Vu AT, Baba T, Chen X, Le TA, Kinoshita H, Xie Y, Kamijo S, Hiramatsu K, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 985-93, 93.e1-3.

Wahle E, Winkler GS. RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1829: 561-70.

Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 2007; 21: 1857-62.

Walters RW, Bradrick SS, Gromeier M. Poly(A)-binding protein modulates mRNA susceptibility to cap-dependent miRNA-mediated repression. *Rna* 2010; 16: 239-50.

Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, Stewart GA, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB, Robinson C. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 1999; 104: 123-33.

Wan J, Mitra N, Hoffstad OJ, Margolis DJ. Influence of FLG mutations and TSLP polymorphisms on atopic dermatitis onset age. *Ann Allergy Asthma Immunol*

2017; 118: 737-8.e1.

Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, Freed I, Howell BG, Shahid S, Shivji GM, Mak TW, Sauder DN. CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J Immunol* 2000; 165: 6783-90.

Wang D, Beck LA. Immunologic Targets in Atopic Dermatitis and Emerging Therapies: An Update. *Am J Clin Dermatol* 2016; 17: 425-43.

Wang J, Liew OW, Richards AM, Chen YT. Overview of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Apoptosis. *Int J Mol Sci* 2016; 17

Wang N, Zhou Z, Liao X, Zhang T. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure. *IUBMB Life* 2009; 61: 566-71.

Wang SS, Wu LJ, Li JJ, Xiao HB, He Y, Yan YX. A meta-analysis of dysregulated miRNAs in coronary heart disease. *Life Sci* 2018; 215: 170-81.

Wang YS, Chi KH, Chu RM. Cytokine profiles of canine monocyte-derived dendritic cells as a function of lipopolysaccharide- or tumor necrosis factor-alpha-induced maturation. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 118: 186-98.

Watanabe S, Kano R, Sato H, Nakamura Y, Hasegawa A. The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 769-73.

Wee LM, Flores-Jasso CF, Salomon WE, Zamore PD. Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell* 2012; 151: 1055-67.

Welle MM, Olivry T, Grimm S, Suter M. Mast cell density and subtypes in the skin of dogs with atopic dermatitis. *J Comp Pathol* 1999; 120: 187-97.

Werfel T, Breuer K, Rueff F, Przybilla B, Worm M, Grewe M, Ruzicka T, Brehler R, Wolf H, Schnitker J, Kapp A. Usefulness of specific immunotherapy in patients with atopic dermatitis and allergic sensitization to house dust mites: a multi-centre, randomized, dose-response study. *Allergy* 2006; 61: 202-5.

Wertz PW. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 2000; 208: 7-11.

Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D, Bader AG. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 2010; 70: 5923-30.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75: 855-62.

Wilhem S, Kovalik M, Favrot C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2011; 22: 143-9.

Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11: 7-13.

Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar-Kaminska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv Clin Exp Med* 2017; 26: 865-74.

Wolf R, Wolf D. Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2012; 30: 329-34.

Wood SH, Ke X, Nuttall T, McEwan N, Ollier WE, Carter SD. Genome-wide association analysis of canine atopic dermatitis and identification of disease related SNPs. *Immunogenetics* 2009a; 61: 765-72.

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* 2009b; 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. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 138: 193-7.

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 4034-9.

Yamada Y, Kosaka K, Miyazawa T, Kurata-Miura K, Yoshida T. miR-142-3p enhances FcεRI-mediated degranulation in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 443: 980-6.

Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 1054-63.

Yang Z, Zeng B, Wang C, Wang H, Huang P, Pan Y. MicroRNA-124 alleviates chronic skin inflammation in atopic eczema via suppressing innate immune responses in keratinocytes. *Cell Immunol* 2017; 319: 53-60.

Yao R, Ma YL, Liang W, Li HH, Ma ZJ, Yu X, Liao YH. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PLoS One* 2012; 7: e46082.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-6.

Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, Tomari Y. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 17-23.

Yoon JS, Nishifuji K, Sasaki A, Ide K, Ishikawa J, Yoshihara T, Iwasaki T. Alteration of stratum corneum ceramide profiles in spontaneous canine model of atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2011; 20: 732-6.

Yuan YR, Pei Y, Ma JB, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G, Chen HY, Dauter Z, Tuschl T, Patel DJ. Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* 2005; 19: 405-19.

Zaniboni MC, Samorano LP, Orfali RL, Aoki V. Skin barrier in atopic dermatitis: beyond filaggrin. *An Bras Dermatol* 2016; 91: 472-8.

Zdanowicz A, Thermann R, Kowalska J, Jemielity J, Duncan K, Preiss T, Darzynkiewicz E, Hentze MW. Drosophila miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. *Mol Cell* 2009; 35: 881-8.

Zekri L, Huntzinger E, Heimstadt S, Izaurralde E. The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 6220-31.

Zekri L, Kuzuoglu-Ozturk D, Izaurralde E. GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *Embo j* 2013; 32: 1052-65.

Zemann B, Griot-Wenk M, Marti E, Mayer P, Eder C, Nefzger M, Schneider H, de Weck A, Liehl E. Allergic pulmonary and ocular tissue responses in the absence of serum IgE antibodies (IgE) in an allergic dog model. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 373-8.

Zeng YP, Nguyen GH, Jin HZ. MicroRNA-143 inhibits IL-13-induced dysregulation of the epidermal barrier-related proteins in skin keratinocytes via targeting to IL-13Ralpha1. *Mol Cell Biochem* 2016; 416: 63-70.

Zhi L, Kim P, Thompson BD, Pitsillides C, Bankovich AJ, Yun SH, Lin CP, Cyster JG, Wu MX. FTY720 blocks egress of T cells in part by abrogation of their adhesion on the lymph node sinus. *J Immunol* 2011; 187: 2244-51.

Zhou H, Arcila ML, Li Z, Lee EJ, Henzler C, Liu J, Rana TM, Kosik KS. Deep annotation of mouse iso-miR and iso-moR variation. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 5864-75.

Zur G, White SD, Ihrke PJ, Kass PH, Toebe N. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part II. Response to hyposensitization. *Vet Dermatol* 2002a; 13: 103-11.

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* 2002b; 13: 89-102.

## **IX. ANHANG**

### **1. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Zusammensetzung des <i>Reverse-Transkription-Master-Mix</i> .....	99
Tabelle 2: Reaktionsmischung zum Nachweis von miRNAs mithilfe des <i>miScript SYBR Green PCR Kits</i> und <i>miScript Primer Assays</i> .....	100
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte .....	101
Tabelle 4: Patientendaten der in die Studie eingeschlossenen Retriever .....	104
Tabelle 5: RNA-Gehalt (ng/ $\mu$ l) aller Einzelproben.....	105
Tabelle 6: Signifikant hoch- und herunterregulierte miRNAs der atopischen und nicht-allergischen Dermatitis-Proben im Vergleich zu gesunder Haut .....	106
Tabelle 7: Relative Expression aller miRNAs beider Testgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe .....	107

### **2. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Expressionsunterschiede der signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs zwischen den Testgruppen und der Kontrollgruppe .....	108
Abbildung 2: Gruppenbasierte nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse .....	108
Abbildung 3: Nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse der Einzelproben....	109





## **X. DANKSAGUNG**

Aus tiefstem Herzen möchte ich Danke sagen!

Allen voran meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Mueller, der mich auf die spannende Welt der Dermatologie und der MicroRNAs aufmerksam gemacht hat. Vielen Dank für jede korrekturgelesene Zeile, für jeden Ratschlag, die ausnahmslos positive und motivierende Art und das Vertrauen in mich. Ich bin unsagbar froh und dankbar, dass ich diese Doktorarbeit unter seiner Betreuung anfertigen durfte!

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Dr. Karin Weber, ohne die ich diese Studie nicht hätte durchführen können. Ihre Erfahrung, ihre Ratschläge und ihre Hilfe bei der Durchführung der miRNA-Expressionsanalyse waren sehr wertvoll für mich.

Ich möchte mich bei Dr. Wolf von Bomhard dafür bedanken, dass er sein Archiv für mich durchforstet und mir die Proben der erkrankten Haut zur Verfügung gestellt hat. Bei der Suche nach passenden hautgesunden Patienten wäre ich ohne die Unterstützung der Tierklinik Oberhaching und der Tierklinik Hofheim leer ausgegangen. Ich bedanke mich daher sehr herzlich bei Dr. Peter Scabell, Dr. Martin Kessler und deren Klinikteams für ihre Hilfe bei der Probenentnahme. Für die Einbettung meiner Hautproben und die freundliche Unterstützung bedanke ich mich ebenfalls sehr herzlich bei Dr. Mounir Majzoub-Altweck vom Institut für Tierpathologie.

Meine Doktorandenzeit an der Medizinischen Kleintierklinik werde ich immer in guter Erinnerung behalten, nicht zuletzt wegen der vielen wunderbaren Menschen, die ich dort kennenlernen durfte. Vielen Dank an alle, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Ihr habt mich motiviert, unterstützt, gefördert aber auch gefordert und ich habe euch dafür fest in mein Herz geschlossen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und Elias Stehle für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung, auf die ich jederzeit und in jedweder Lebenslage zählen kann. Danke, dass ihr mich zu einem so glücklichen Menschen macht! Für die Möglichkeit zu studieren und zu promovieren bin ich meinen Eltern und Großeltern unendlich dankbar. Das ist keine Selbstverständlichkeit. Vielen Dank für alles, was ihr für mich getan habt!