

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

Tumorspezifische Mikro-  
Ribonukleinsäuren-  
Expressionsmuster des kaninen  
intestinalen T-Zell-Lymphoms

von Diana Joos

aus Radolfzell am Bodensee

München 2024



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:

Priv.-Doz. Dr. Karin Weber



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

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

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Thomas W.  
Göbel

Tag der Promotion: 10. Februar 2024



Meinen Eltern





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Kanine intestinale Lymphome .....</b>	<b>3</b>
1.1. Epidemiologie .....	3
1.1.1. Malignes Lymphom .....	3
1.1.2. Gastrointestinales Lymphom.....	4
1.2. Vorkommen.....	4
1.3. Klassifizierung .....	5
1.4. Klinik.....	6
1.5. Diagnose.....	8
1.5.1. Morphologische Untersuchung .....	10
1.5.2. Immunphänotypisierung.....	11
1.5.3. Ki-67-Index .....	13
1.5.4. PARR-Analyse .....	14
1.6. Prognose .....	16
<b>2. Mikro-Ribonukleinsäuren .....</b>	<b>18</b>
2.1. Entdeckung, Nomenklatur.....	18
2.2. Biogenese .....	19
2.2.1. Genomik und Transkription .....	19
2.2.2. MiRNA-Reifung.....	20
2.3. Wirkmechanismus .....	22
2.4. Biologische Funktionen von miRNAs .....	24
2.5. Veränderte miRNA-Expression bei Krebserkrankungen.....	25
2.6. Mechanismen der miRNA-Dysregulierung bei Krebserkrankungen .....	27
2.7. Veränderte miRNA-Expression im humanen T-Zell-Lymphom .....	28
2.8. Veränderte miRNA-Expression bei kaninen Lymphomen .....	30
<b>III. PUBLIKATION .....</b>	<b>33</b>
<b>IV.DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>56</b>
<b>VI.SUMMARY .....</b>	<b>59</b>

---

<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>100</b>



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Ago	Argonauten-Protein
ALCL	anaplastic large cell lymphoma
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloide Leukämie
bp	Basenpaar
CD	cluster of differentiation
CDR	complementarity determining region
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cfa	Canis lupus familiaris
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CTCL	cutaneous T-cell lymphoma
D	diverse
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dsRBD	doppelsträngige RNA-bindende Proteindomäne
EATL	enteropathy-associated T-cell lymphoma
eIF4G	eukaryoter Translations-Initiationsfaktor 4G
EXP5	Exportin 5
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
hsa	Homo sapiens
IBD	inflammatory bowel disease
Ig	Immunglobulin
J	joining
LBL	lymphoblastisches Lymphom
LCL	large-cell lymphoma

MF	Mycosis fungoides
miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRNA	micro-ribonucleic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
NK	Natürliche-Killerzellen
PABPC	Poly(A)-bindendes Protein C
PARR	Antigenrezeptor-Gen-Rearrangement
PCR	polymerase chain reaction
piRNA	PIWI-interacting ribonucleic acid
pre-miRNA	precursor micro-ribonucleic acid
pri-miRNA	primary micro-ribonucleic acid
PTCL	peripheral T-cell lymphoma
RBC	red blood cell
RISC	RNA-induced silencing complex
SCL	small-cell lymphoma
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SS	Sézary-Syndrom
TCR	T-Zell Rezeptor
Tiam1	T-Lymphom-Invasions- und Metastasierungsgen
UTR	untranslatierte Region
V	variable
WHO	World Health Organization

## I. EINLEITUNG

Das maligne Lymphom zählt zu den häufigsten Tumorerkrankungen des Hundes (DOBSON et al., 2002). Nach der multizentrischen Form gehören Lymphome des Magen-Darm-Trakts mit etwa 5–7 % aller kaninen Lymphomfälle zur zweithäufigsten Form (COUTO et al., 1989). Anders als bei Menschen handelt es sich primär um den T-Zell-Immumphänotyp (COYLE & STEINBERG, 2004; OHMURA et al., 2017).

Die sichere Diagnosestellung intestinaler T-Zell-Lymphome des Hundes stellt nach wie vor eine Herausforderung dar, da lymphatische neoplastische Läsionen häufig von einer benignen lymphoplasmazellulären Entzündung begleitet werden (COUTO et al., 1989; KLEINSCHMIDT et al., 2006). Zur sicheren Differenzierung wird derzeit ein aufwändiges diagnostisches Vorgehen – bestehend aus morphologischer Untersuchung, Immunphänotypisierung, Bestimmung des Ki-67-Index und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Antigenrezeptor-Gen-Rearrangement-Analyse (PARR-Analyse) zur Charakterisierung der B- oder T-Zell-Klonalität – unter Verwendung von invasiv entnommenen Vollschicht-Darmbiopsien empfohlen (CARRASCO et al., 2015).

Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) kommen in allen eukaryoten Zellen vor und sind einzelsträngige, kurze (~22) Nukleotide, nicht-kodierende Ribonukleinsäuren, die durch posttranskriptionelle Basenpaarung an teilweise komplementäre Sequenzen in den 3'-untranslatierten Regionen von Ziel-messengerRNAs (mRNAs) an der Steuerung fast aller biologischer Signalwege beteiligt sind (EULALIO et al., 2008; BARTEL, 2009; FABIAN et al., 2010). MiRNAs werden in nahezu allen Krebserkrankungen, darunter auch Lymphomen, verändert exprimiert (FERNANDEZ-MERCADO et al., 2015; SMOLARZ et al., 2022). Durch Steuerung der Tumorzellendifferenzierung und -apoptose können verstärkt exprimierte miRNAs als Onkogene die Tumorentstehung fördern, während in Tumoren vermindert exprimierten miRNAs eine tumorsuppressive Wirkung zugesprochen wird (ZHANG et al., 2007). Bislang existieren lediglich vereinzelte Berichte zur miRNA-Expression bei kaninen Lymphomen.

Ziel dieses Forschungsprojekts sind die Darstellung und der Vergleich der miRNA-Expressionsmuster in Formalin-fixierten sowie in Paraffin eingebetteten (FFPE)

Vollschicht-Darmproben von gesunden Hunden und Hunden mit intestinalen T-Zell-Lymphomen sowie lymphoplasmazellulären Enteritiden. Es ist davon auszugehen, dass sich das miRNA-Expressionsmuster von intestinalen T-Zell-Lymphomen signifikant von dem der anderen beiden Gruppen unterscheidet.

Anhand eines Vorversuchs mit zwei Proben pro Gruppe wurde eine vergleichende quantitative PCR auf miRNA-PCR-Array-Platten (Qiagen) mit vorgefertigten Reaktionen für 183 verschiedene reife kanine miRNAs durchgeführt. Anschließend wurden zwölf miRNAs mit auffälligen Expressionsveränderungen in der Lymphomgruppe ausgewählt. Die Expression dieser miRNAs wurde in allen Proben (n = 8 pro Gruppe) mit individuellen miRNA-Assays (miScript Primer Assays, Qiagen) analysiert.

Bei Menschen konnte anhand des miRNA-Expressionsprofils in Hautbiopsien mit einer Genauigkeit von 95 % zwischen gutartigen Hautveränderungen und kutanen T-Zell-Lymphomen unterschieden werden (RALFKIAER et al., 2011). Da das Expressionsprofil zirkulierender miRNAs das im Tumorgewebe beobachtete Expressionsmuster widerspiegelt (LAWRIE et al., 2008), könnten zukünftig im Blut zirkulierende miRNA-Biomarker eine attraktive Alternative zur Diagnose von kaninen intestinalen T-Zell-Lymphomen darstellen.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Kanine intestinale Lymphome**

Bei Hunden werden unter dem Begriff des malignen Lymphoms eine Reihe klinisch und morphologisch unterschiedlicher Formen von tumorös veränderten lymphatischen Zellen zusammengefasst. Am häufigsten ist das multizentrische nodale Lymphom, das durch eine generalisierte Vergrößerung der peripheren Lymphknoten gekennzeichnet ist. Zudem können die lymphatischen Organe Leber und Milz, das Knochenmark sowie prinzipiell jedes andere Organ davon betroffen sein. Neben dem multizentrischen Lymphom gibt es extranodale, außerhalb der Lymphknoten gelegene Formen des malignen Lymphoms. Folgende Organe können von der extranodalen Form betroffen sein: Mediastinum, Magen-Darm-Trakt, Haut, Augen, zentrales Nervensystem, Leber und Lunge (ZANDVLIET, 2016). Lymphome des Magen-Darm-Trakts zählen mit ca. 5–7 % aller Lymphomfälle zur häufigsten extranodalen Form (PATNAIK et al., 1977; COUTO et al., 1989).

#### **1.1. Epidemiologie**

##### **1.1.1. Malignes Lymphom**

Das maligne Lymphom zählt mit einer Inzidenz von mindestens 13–114 von 100.000 jährlich betroffenen Hunden zur häufigsten Tumorform des blutbildenden Systems (DORN et al., 1967; TESKE, 1994; DOBSON et al., 2002). Die Inzidenzrate steigt mit zunehmendem Alter an, sodass bei Hunden im Alter von unter einem Jahr eine Inzidenz von 1,5 Fällen pro 100.000 Tieren nachgewiesen wurde, während Hunde im Alter von über zehn Jahren eine Inzidenz von 84 Fällen pro 100.000 Tieren vorwiesen (DORN et al., 1967).

Grundsätzlich kann jede Hunderasse am malignen Lymphom erkranken, mittelgroße bis große Hunde sind jedoch deutlich häufiger betroffen (EDWARDS et al., 2003; PITTAWAY et al., 2019). Bei Bulldoggen, Rottweilern und Scott-Terriern scheint eine genetische Prädisposition vorzuliegen, die ein gehäuftes familiäres Auftreten des malignen Lymphoms bedingt (ONIONS, 1984; TESKE et al., 1994; LOBETTI, 2009). Davon abgesehen existieren widersprüchliche Angaben zu Rassen mit erhöhtem Risiko, an einem Lymphom zu erkranken, die

sich in Abhängigkeit vom jeweils untersuchten Land unterscheiden (YAU et al., 2017). Innerhalb Europas wurde eine deutliche Rasseprädisposition für Berner Sennenhunde, Rottweiler und Dobermänner beschrieben (COMAZZI et al., 2018). Darüber hinaus scheinen manche Rassen anfälliger für die Entwicklung spezifischer Immunphänotypen zu sein (MODIANO et al., 2005). So wurden anhand von epidemiologischen Untersuchungen bei Boxern signifikant häufiger T-Zell-Lymphome nachgewiesen, wohingegen bei Rottweilern von einer erhöhten Prävalenz zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen berichtet wurde (PASTOR et al., 2009; COMAZZI et al., 2018).

### **1.1.2. Gastrointestinales Lymphom**

An einem Lymphom mit gastrointestinaler Lokalisation können zwar Hunde jeden Alters erkranken, Tiere mittleren und hohen Alters (~6–9 Jahre) sind jedoch hauptsächlich betroffen (COUTO et al., 1989; COYLE & STEINBERG, 2004; RASSNICK et al., 2009). Während in manchen Studien kastrierte männliche Tiere deutlich überrepräsentiert waren (bis zu 90 % der Population), war bei anderen Forschungsarbeiten keine Geschlechtsprädisposition zu erkennen (COUTO et al., 1989; COYLE & STEINBERG, 2004; RASSNICK et al., 2009; COUTO et al., 2018; LANE et al., 2018). Eine Rasseprädisposition wurde für die beiden Rassen Boxer und Shar Pei beschrieben (STEINBERG et al., 1995; COYLE & STEINBERG, 2004). Eine Studie aus dem Jahr 2018 identifizierte ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines intestinalen T-Zell-Lymphoms bei Shiba Inu, Deutschen Schäferhunden, Cairn-Terriern, Boston-Terriern, Papillons, Möpsen und Maltesern (MATSUMOTO et al., 2018).

## **1.2. Vorkommen**

Gastrointestinale Lymphome bei Hunden können zum einen als Primärtumore im Magen-Darm-Trakt entstehen, zum anderen kann es sich dabei um eine Ausdehnung des malignen Lymphoms in den Magen-Darm-Trakt handeln (COUTO et al., 1989; RASSNICK et al., 2009; LANE et al., 2018). Am häufigsten ist der Dünndarm betroffen, gefolgt von Magen und Dickdarm (COUTO et al., 1989; COYLE & STEINBERG, 2004). Innerhalb des Dünndarms tritt die Erkrankung in absteigender Häufigkeit im Duodenum, Ileum, Jejunum und ileokolischen Übergang auf. Bei mehr als der Hälfte der betroffenen Hunde äußert sich die Erkrankung multifokal und kann somit an mehreren Stellen im Magen-



Darm-Trakt nachgewiesen werden (FRANCES et al., 2013; COUTO et al., 2018). Eine Vergrößerung der regionären Lymphknoten konnte je nach Studie in 6–60 % der Krankheitsfälle beobachtet werden (FRANCES et al., 2013; COUTO et al., 2018).

### 1.3. Klassifizierung

Bislang wurden kanine intestinale T-Zell-Lymphome entsprechend ihrer Kerngröße im Verhältnis zu den roten Blutkörperchen (red blood cells, RBCs) in großzellige Lymphome (large-cell lymphoma, LCL; >2 RBCs) und kleinzellige Lymphome (small-cell lymphoma, SCL; <2 RBCs) eingeteilt (VALLI et al., 2011; VALLI et al., 2013; MATSUMOTO et al., 2019).

In der Humanmedizin wurde das Enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphom (enteropathy-associated T-cell lymphoma, EATL) gemäß dem Klassifikationsschema der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) als Form des intestinalen T-Zell-Lymphoms anerkannt. Anhand von klinischen und morphologischen Kriterien wurden zwei Subtypen beschrieben: EATL Typ I (kürzlich umbenannt in EATL) und EATL Typ II (kürzlich umbenannt in monomorphes epitheliotropes intestinales T-Zell-Lymphom) (EGAN et al., 1995; CHOTT et al., 1998; GALE et al., 2000; DELEEUEW et al., 2007; DELABIE et al., 2011; ROBERTI et al., 2016; SWERDLOW et al., 2016). Als typische Merkmale für EATL Typ I-Läsionen wurden pleomorphe Lymphozyten mit unregelmäßigen Kernen, deutliche Nukleoli und Mitosefiguren sowie geringgradig ausgeprägte entzündliche Infiltrate und Nekrosen aufgeführt. Charakteristisch für EATL Typ II-Läsionen wurden monomorphe, kleine und mittelgroße Lymphozyten mit runden Kernen, unauffällige Nukleoli sowie lediglich minimale entzündliche Infiltrate und Nekrosen erachtet (ARPS & SMITH, 2013). Anders als bei Menschen, bei denen EATL Typ I mit einer Prävalenz von 80–90 % am häufigsten vorkommt, wurde auch bei Katzen die EATL-Klassifizierung etabliert und EATL Typ II mehrheitlich beobachtet (KIUPEL et al., 1999; MOORE et al., 2012).

Bei Hunden wurde die Zuordnung von intestinalen T-Zell-Lymphomen zu entsprechenden EATL-Typen noch nicht vereinheitlicht. Einige Forschungsprojekte versuchten jedoch, ihre Fälle entsprechend zu kategorisieren. Das Ergebnis der Studie von Coyle und Steinberg ließ zunächst vermuten, dass

Hunde eine hohe EATL Typ II-Inzidenz aufweisen, da es sich innerhalb der untersuchten Population bei 75 % der intestinalen Lymphome um T-Zell-Lymphome mit epitheliotropem Verhalten handelte (COYLE & STEINBERG, 2004). Im Gegensatz dazu wiesen spätere Studienergebnisse bei der Mehrheit der kaninen intestinalen Lymphom-Fälle Large-cell-Lymphome, also EATL Typ I nach, wohingegen Small-cell-Lymphome (EATL Typ II) selten vorkamen (OZAKI et al., 2006; CARRASCO et al., 2015).

Der Vergleich der morphologischen Kriterien von humanen EATL-Fällen und kaninen intestinalen T-Zell-Lymphomen brachte einige Unterschiede zwischen den beiden Spezies zutage. Während eine monomorphe Proliferation mittelgroßer Lymphozyten als charakteristisch für humane EATL Typ II-Fälle angesehen wird, war dieses Merkmal bei den kaninen intestinalen T-Zell-Lymphomen kaum nachvollziehbar. Außerdem waren entzündliche plasmazytäre Infiltrate vor allem bei Hunden mit Small-cell-Lymphomen (EATL Typ I) zu beobachten, wohingegen entzündliche Infiltrate bei Menschen dem EATL Typ II zugeordnet werden. Unter Einbeziehung sowohl morphologischer als auch immunphänotypischer Eigenschaften wiesen Large-cell-Lymphome des Hundes einige Gemeinsamkeiten mit humanen EATL Typ I-Kriterien auf. Doch das immunphänotypische Verhalten von kaninen intestinalen Small-cell-Lymphomen unterschied sich deutlich von dem humaner EATL Typ II-Fälle (MATSUMOTO et al., 2019).

Aktuell erfolgt die Einteilung der kaninen intestinalen T-Zell-Lymphome zum einen morphologisch entsprechend der Kerngröße in Large- und Small-cell-Lymphome. Zum anderen werden nach den Kriterien der WHO anaplastische große T-Zell-Lymphome (anaplastic large T-cell lymphoma, ALCL), angiotrope T-Zell-Lymphome, gemischte entzündliche periphere T-Zell-Lymphome (mixed inflammatory peripheral T-cell lymphoma, PTCL) sowie nicht weiter spezifizierte PTCL unterschieden. Die gemischten entzündlichen PTCL-Fälle werden zudem in histiozytär und eosinophil dominante Formen unterteilt (KOJIMA et al., 2021).

#### **1.4. Klinik**

Hunde, die an einem intestinalen Lymphom erkranken, zeigen anfangs häufig keine klinischen Symptome, sodass sich die Erkrankung erst in einem fortgeschrittenen Stadium bemerkbar macht (FRANCES et al., 2013). Den Patientenbesitzern fallen lediglich unspezifische Symptome wie Durchfall (teils mit Blutbeimengung),

Erbrechen, Gewichtsverlust und unterschiedlich stark ausgeprägte Inappetenz auf. Seltener werden Lethargie, vermehrte Darmgeräusche, angestrengte Atmung oder ein volumenvermehrtes Abdomen bemerkt (COUTO et al., 1989; FRANK et al., 2007; CARRASCO et al., 2015). In der Mehrzahl der Fälle werden die Symptome nur allmählich deutlicher, und die betroffenen Hunde sprechen für gewöhnlich unzureichend auf eine symptomatische Therapie an (COUTO et al., 1989).

Die klinische Untersuchung liefert ebenfalls unspezifische Befunde wie einen schlechten Allgemeinzustand, blasse und pappige Schleimhäute sowie in manchen Fällen eine Schmerzhaftigkeit während der Palpation des Bauchraums. Bei manchen Patienten können verdickte Darmschlingen oder eine Masse im vorderen und/oder mittleren Bauchraum ertastet werden (COUTO et al., 1989; FRANK et al., 2007; RASSNICK et al., 2009). Die hämatologischen Parameter zeigen mitunter eine milde bis moderat ausgeprägte Anämie, eine Leukozytose und Neutrophilie (mit/ohne Linksverschiebung) sowie eine Monozytose. Bei 61–80 % der Fälle geht die Erkrankung mit einer Hypalbuminämie einher. Weitere mögliche biochemische Veränderungen sind eine Hypocobalaminämie sowie selten eine Hyperkalzämie (COUTO et al., 1989; FRANK et al., 2007; LANE et al., 2018).

Bei 45 % der erkrankten Hunde konnten anhand von nativen Röntgenaufnahmen pathologische Veränderungen erfasst werden. Dazu zählten eine Hepato- und/oder Splenomegalie, ein weichteildichter Masseneffekt im Bereich des mittleren Bauchraums, freies Gas innerhalb der Bauchhöhle sowie Anzeichen einer Peritonitis (COUTO et al., 1989). Mithilfe von Positivkontrast-Röntgenaufnahmen des Bauchraums konnten zudem Unregelmäßigkeiten der intestinalen Schleimhautoberfläche, Füllungsdefekte des Darmlumens und Dickenunterschiede der Darmwand entdeckt werden, die als Hinweis auf eine infiltrativ wachsende Erkrankung des Magen-Darm-Trakts erachtet wurden (COUTO et al., 1989).

Die Ultraschalluntersuchung des Bauchraums lieferte im Fall von gastrointestinalen Lymphomen variable Befunde, die sich teils mit denen von gesundem oder auch entzündlich verändertem Darm überschneiden und daher als unspezifisch erachtet wurden. Bei 27 % der Fälle mit histopathologisch gesicherter Diagnose eines gastrointestinalen Lymphoms konnten sogar gar keine sonographischen Veränderungen nachgewiesen werden (FRANCES et al., 2013). Trotzdem wurden folgende sonographischen Veränderungen bei gastrointestinalen Lymphomen beschrieben: eine abnorme Darmwand-Schichtung, eine Verdünnung/Verdickung

der Darmwand, eine hyperechogene Streifenbildung der Darmschleimhaut, eine Verdickung der *Tunica muscularis propria*, Flüssigkeitsansammlungen im Darmlumen, vergrößerte abdominale Lymphknoten (Mittelwert: 0,6 cm), das Vorliegen einer Milzmasse sowie Aszites (meist Transsudat) (COUTO et al., 2018; LANE et al., 2018; MATSUMOTO et al., 2019). Gemäß Frances et al. waren die regionären Lymphknoten bei 60 % der Hunde mit gastrointestinalen Lymphomen und bei 90 % mit Lokalisation des Lymphoms im Dünndarm vergrößert. Aus diesem Grund schlussfolgerten die Autoren, dass das Vorhandensein einer abdominalen Lymphadenopathie in Verbindung mit einem sonographisch normalen Dünndarm als verdächtig für das Vorhandensein eines intestinalen Lymphoms angesehen und weitere Untersuchungen veranlasst werden sollten (FRANCES et al., 2013).

### **1.5. Diagnose**

Intestinale Lymphome werden durch die morphologische Auswertung zytologischer oder histologischer Präparate diagnostiziert, die perkutan, endoskopisch oder durch eine diagnostische Laparotomie gewonnen wurden.

Die perkutane Ultraschall-gestützte Probenentnahme ist wenig invasiv und eignet sich daher für Patienten in schlechter körperlicher Verfassung, die eine Anästhesie oder diagnostische Laparotomie nicht tolerieren würden. Anhand der zytologischen Untersuchung von Feinnadelaspiraten tief gelegener abdominaler Organe gelang eine Unterscheidung zwischen entzündlichen und neoplastischen Veränderungen mit einer Sensitivität von 88 % und einer Spezifität von 100 % (BONFANTI et al., 2004). Allerdings zeigte dieselbe Arbeitsgruppe, dass die sichere zytologische Diagnosestellung bei Lymphomen mit Lokalisation im Magen-Darm-Trakt lediglich mit einer Sensitivität von 71 % möglich war (BONFANTI et al., 2006).

Die Gastroduodenoskopie und Koloskopie stellen weitere Möglichkeiten zur minimal-invasiven Probengewinnung dar. Die Eingriffe werden unter Narkose durchgeführt, sodass zuvor sichergestellt werden muss, dass der Allgemeinzustand der Patienten eine Narkose zulässt. Der Vorteil ist, dass verdächtige Läsionen wie ein unregelmäßiges kopfsteinpflasterartiges Aussehen der Schleimhautoberfläche und solitäre Massen direkt visualisiert und beprobt werden können. Allerdings bleibt die Untersuchung auf die Schleimhautschicht beschränkt, und im Falle oberflächlich entnommener Proben könnten tief in der Schleimhaut gelegene

neoplastische Läsionen übersehen werden (MIURA et al., 2004; EVANS et al., 2006; KLEINSCHMIDT et al., 2006). Die transmurale, also alle Schichten der Darmwand betreffende Ausbreitung der Tumorzellen wird folglich in endoskopisch entnommenen Proben unter Umständen nicht ausreichend erfasst (KLEINSCHMIDT et al., 2006).

Die chirurgische Probengewinnung mittels diagnostischer Laparotomie ermöglicht die makroskopische Untersuchung des gesamten Darmtrakts, einschließlich des endoskopisch schwer zu erreichenden ileozäkalen Übergangs als einer der primären Lokalisationen des intestinalen Lymphoms. Durch die Entnahme von Vollschicht-Darmbiopsien konnte in 94 % der Fälle eine akkurate Diagnose gestellt werden. Es wird empfohlen, an mehreren Stellen Biopsien zu entnehmen, da Tumorzellen ein unregelmäßiges Verteilungsmuster aufweisen können (KLEINSCHMIDT et al., 2006). Der Nachteil ist, dass es sich um eine Operation unter Vollnarkose und somit um eine invasive Methode der Probengewinnung handelt. Bei Vorliegen einer Hypalbuminämie oder intensiven Infiltration von Entzündungs- und/oder Lymphomzellen im Bereich der Biopsiestelle besteht ein erhöhtes Risiko (bis zu 12 %) für die Entwicklung einer Nahtdehiszenz mit folgender Darmperforation (RALPHS et al., 2003; SHALES et al., 2005).

Zusätzlich zur histologischen Untersuchung, die in der Regel einige Tage in Anspruch nimmt, können endoskopisch entnommene Proben zytologisch nach Anwendung der „Squash-smear“-Technik (Schleimhautprobe wird zwischen zwei Objektträgern gequetscht und danach ausgestrichen) ausgewertet werden. Auf diese Weise ist eine Differenzierung zwischen intestinalem Lymphom und chronischer Enteritis am selben Tag der Probenentnahme innerhalb der Klinik möglich (Sensitivität 99 %, Spezifität 74 %) (MAEDA et al., 2017).

Nichtsdestotrotz stellt die eindeutige Diagnosestellung des kaninen intestinalen Lymphoms eine Herausforderung dar, da die neoplastischen lymphomatösen Läsionen oft durch begleitende gutartige Entzündungsreaktionen in der Schleimhaut, insbesondere durch eine lymphoplasmazelluläre Enteritis maskiert sein können (COUTO et al., 1989; KLEINSCHMIDT et al., 2006). Zur Erzielung genauer Ergebnisse wird derzeit ein schrittweises diagnostisches Vorgehen unter Verwendung von Vollschicht-Darmbiopsien empfohlen. Begonnen wird mit der morphologischen Untersuchung, gefolgt von der Immunphänotypisierung und der Bestimmung des Ki-67-Index. Abschließend findet die PCR zur PARR-Analyse

zwecks Charakterisierung der B- oder T-Zell-Klonalität Anwendung (CARRASCO et al., 2015).

### 1.5.1. Morphologische Untersuchung

Die morphologischen Veränderungen gastrointestinaler Lymphome wurden erstmals 1989 anhand von 20 primären gastrointestinalen Lymphom-Fällen detailliert beschrieben. Laut dieser Studie haben gastrointestinale Lymphome ihren Ursprung in der Submukosa von Magen (40 %), Dünndarm (47 %) und Dickdarm (13 %). Meist handelt es sich um diffuse Infiltrate in Submukosa und Lamina propria, mit variabler Größe der Tumorzellen. Das Tumorgeschehen wird vor allem bei den intestinal gelegenen Läsionen von einer lymphoplasmazellulären Entzündung begleitet. Der Übergang zwischen entzündlich und neoplastisch verändertem Gewebe ist nur undeutlich abgrenzbar, sodass in der Submukosa gelegene lymphomatöse Läsionen durch die begleitende Entzündung überlagert sein können (COUTO et al., 1989). Neben der lymphoplasmazellulären Entzündung wurde auch eine eosinophile Infiltration kaniner gastrointestinaler Lymphome beschrieben (OZAKI et al., 2006).

Die Studie von Coyle und Steinberg beschreibt anhand von 44 Fällen ausführlich die histopathologischen Veränderungen kaniner gastrointestinaler Lymphome, wobei der Dünndarm als häufigste Lokalisation genannt wird. Im Gegensatz zu Coutos Forschungsarbeit zeigten 75 % der neoplastischen Lymphozyten – wobei es sich ausschließlich um den T-Zell-Immunphänotyp handelte – eine ausgeprägte Infiltration der oberflächlichen Schleimhaut und des Drüsengewebes, also ein sogenanntes epitheliotropes Verhalten (COYLE & STEINBERG, 2004). Das Vorliegen von Epitheliotropismus bei kaninen gastrointestinalen T-Zell-Lymphomen wurde von zwei weiteren Studien bestätigt. Diese beschrieben eine transmurale Ausbreitung der lymphomatösen Zellen von der Schleimhaut bis in die *Tunica muscularis* oder *Tunica serosa* (FRENCH et al., 1996; OZAKI et al., 2006).

Einer weiteren Forschungsarbeit zufolge, die endoskopisch gewonnene Proben von kaninen Darmlymphomen und chronischen Enteropathie-Patienten (inflammatory bowel disease, IBD) untersuchte, liegt bei beiden Entitäten eine schwere lympho- und teilweise plasmazytäre Entzündung innerhalb der Lamina propria vor. Diese zeigte sowohl ein diffuses als auch ein multifokales Verteilungsmuster. Das Vorhandensein innerhalb des Epithels gelegener lymphomatöser Infiltrate des

Oberflächen- und Kryptenepithels wurde als einziger statistisch signifikanter morphologischer Parameter zur Unterscheidung der beiden Erkrankungen detektiert (CARRASCO et al., 2015).

Schließlich beschrieben Matsumoto et al. die morphologischen Charakteristika unter Berücksichtigung des Schweregrads des Lymphoms. Demnach zeigten Large-cell-Lymphome eine flächige Proliferation von großen und mittelgroßen neoplastischen Lymphozyten mit wenig klarem Zytoplasma sowie pleomorphen Zellkernen mit ausgeprägten Nukleoli und verstreutem Chromatin. Im Gegensatz dazu waren Small-cell-Lymphome durch die Vermehrung monomorpher, kleiner neoplastischer Lymphozyten gekennzeichnet, begleitet von einer Infiltration durch nicht-neoplastische Plasmazellen. Epitheliotropes Verhalten der neoplastischen Lymphozyten äußerte sich bei 94 % der Large-cell-Lymphome durch Infiltration des Drüsen- und/oder Kryptenepithels. Alle Small-cell-Lymphome zeigten Epitheliotropismus: 30 % in Form von intraepithelialen Nestern ( $\geq 5$  dicht zusammenliegende Lymphozyten), 70 % als intraepitheliale Plaques ( $\geq 5$  angrenzende Epithelialzellen, überlagert von gebündelten Lymphozyten) (MATSUMOTO et al., 2019).

Zudem existieren Berichte über Sonderformen des primären intestinalen Lymphoms. Bei einem irischen Wolfshund wurde ein von natürlichen Killerzellen ausgehendes großes granuläres intestinales Lymphom beschrieben, das mit Proteinverlust-Enteropathie, Thrombozytopenie und aggressivem klinischem Verlauf einherging (SNEAD, 2007). Eine aktuelle Fallserie wies bei 13 Hunden anaplastische großzellige T-Zell-Lymphome mit umfangreichen Nekrosen und Entzündungen sowie gelegentlicher Gefäßinvasion innerhalb der neoplastischen Massen nach, die zur Perforation der Darmwand neigten (STRANAHAN et al., 2019).

### **1.5.2. Immunphänotypisierung**

Die Immunphänotypisierung von Lymphomen wird sowohl diagnostisch als auch für die Einschätzung der Therapiewahl und der Prognose genutzt (LADIGES et al., 1988). Die Immunphänotypisierung von Lymphomen erfolgt mithilfe der monoklonalen Antikörper für Cluster of differentiation (CD)-Oberflächenantigene der B- und T-Lymphozyten. Während für den Nachweis von B-Zellen meist CD79a und CD20 verwendet werden, findet CD3 für den Nachweis von T-Zellen

Anwendung (FERRER et al., 1993; MILNER et al., 1996; JUBALA et al., 2005). Die Antigen-Antikörperbindung verursacht eine histochemische Reaktion, die dazu führt, dass sich positive Zellen verfärben, was mikroskopisch nachweisbar ist (BURKHARD & BIENZLE, 2015). Die Immunphänotypisierung kann sowohl mit zytologischem als auch histologischem Probenmaterial oder auch mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden (CANIATTI et al., 1996; MILNER et al., 1996; CULMSEE et al., 2001; GELAIN et al., 2008).

Unter Verwendung der beiden Marker CD3 und CD20 wurde im Jahr 2004 Archivmaterial (FFPE) von 44 kaninen gastrointestinalen Lymphomfällen untersucht, wobei keine nähere Klassifizierung der Lymphome berücksichtigt wurde. Dabei reagierten bis zu 75 % der Tumore positiv für den Marker CD3, also für den T-Zell-Phänotyp (COYLE & STEINBERG, 2004). Im Rahmen einer weiteren Studie wurden endoskopisch gewonnene Proben aus dem Duodenum – unter anderem morphologisch und immunhistochemisch (Marker: CD3, CD20) – zur Unterscheidung zwischen Lymphomen sowie benignen lymphoplasmazellulären Enteritis-Fällen untersucht. Bei allen morphologisch als Lymphom eingestuften Proben konnte die Diagnose mittels Immunhistochemie bestätigt werden: Es handelte sich fast ausschließlich um Large-cell-Lymphome. Des Weiteren gehörten alle Lymphomproben dem T-Zell-Immunphänotyp an. Den höheren Prozentsatz an T-Zell-Lymphomen erklärten sich die Autoren damit, dass lediglich Proben aus dem Darm verwendet wurden, da der B-Zell-Immunphänotyp vorwiegend in Proben aus dem Magen vorzufinden sein soll (CARRASCO et al., 2015). Zwei weitere Studien untersuchten Small-cell-Lymphome, wobei eine der beiden Arbeitsgruppen Probenmaterial aus Magen und Darmtrakt verwendete, während die andere Forschungsgruppe ausnahmslos intestinale Lymphome untersuchte. Die gastrointestinalen Lymphome reagierten in 95 % der Fälle für den T-Zell-Immunphänotyp. Doch alle intestinalen Lymphome waren T-Zell-Lymphome (COUTO et al., 2018; LANE et al., 2018).

In einer Fallserie mit drei kaninen intestinalen großzelligen T-Zell-Lymphomen wurde eine Koexpression von CD3 und CD20 beschrieben. Die neoplastischen Lymphozyten zeigten eine deutliche perimembranöse bis hin zu einer zytoplasmatischen Färbung für den CD3-Marker, und ein hoher Prozentsatz der Zellen reagierte für den CD20-Marker ebenfalls positiv. Zur Überprüfung des Immunphänotyps der Zellen wurde zudem eine PARR-Analyse durchgeführt, die



ein klonales Rearrangement für den T-Zell-Rezeptor gamma bestätigte. Bislang ist die therapeutische und prognostische Konsequenz der CD3/CD20-Koexpression unklar (NOLAND & KIUPEL, 2018).

Weitere Erkenntnisse zum immunphänotypischen Verhalten kaniner intestinaler T-Zell-Lymphome konnten durch deren Vergleich mit humanen EATL-Fällen erlangt werden. Dafür wurden endoskopisch gewonnene Proben (17 großzellige und 33 kleinzellige Lymphome) aus Duodenum und Ileum immunhistochemisch sowie mittels Immunfluoreszenz und PARR-Analyse untersucht. Alle neoplastischen Lymphozyten reagierten positiv für CD3 und negativ für CD79a und konnten somit dem T-Zell-Immunphänotyp zugeordnet werden. Auch in dieser Studie war für 18 % der großzelligen sowie für 64 % der kleinzelligen Lymphome eine Koexpression von CD20 nachvollziehbar, wobei diese im Vergleich mit den im Hintergrund innerhalb der Lamina propria gelegenen B-Zellen nur schwach ausgeprägt war. Außerdem war eine membranöse CD56-Expression in 12 % der großzelligen, jedoch nicht in kleinzelligen kaninen Lymphom-Fällen nachweisbar, wodurch diese sich von humanen EATL Typ II-Fällen (CD3 und CD56 positiv) unterschieden. Im Gegensatz dazu hatten kanine intestinale großzellige Lymphome Ähnlichkeit zu humanen EATL Typ I-Fällen (CD3 positiv, CD56 negativ). Zusammenfassend zeigten groß- und kleinzellige intestinale Lymphome des Hundes einen homogenen Immunphänotyp auf. Auch gemischte groß- und kleinzellige Fälle waren keine Seltenheit, was eine Transformation kleinzelliger Lymphome zu großzelligen Lymphomen beim intestinalen T-Zell-Lymphom des Hundes denkbar macht (MATSUMOTO et al., 2019).

### **1.5.3. Ki-67-Index**

Ki-67 ist ein Kernprotein, das streng mit der zellulären Proliferation, also mit der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation assoziiert ist. So wird Ki-67 in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) exprimiert, während es in ruhenden Zellen (G0) fehlt (BRUNO & DARZYNKIEWICZ, 1992). In der Onkologie wird der Ki-67-Index sowohl zur Diagnostik als auch zur Einschätzung der Prognose und des Therapieverlaufs verwendet (MELZER et al., 2006; FU et al., 2016; SCHLOTTER et al., 2017). Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten den Ki-67-Index als prognostischen Marker für das maligne Lymphom des Hundes (KIUPEL et al., 1999; PHILLIPS et al., 2000; SOKOŁOWSKA et al., 2012; SIERRA MATIZ et al., 2018).

Als Goldstandard zur Bestimmung des Ki-67-Index gilt die Immunhistochemie, gefolgt von einer manuellen Zählung der positiven Tumorzellen in den proliferativen Bereichen. Nachteile dieses Verfahrens sind die erforderliche invasive Probenentnahme, die fehlende Standardisierung, bedienerbedingte Abweichungen sowie hohe Kosten aufgrund des Arbeitsaufwands (PENAULT-LLORCA & RADOSEVIC-ROBIN, 2017; RIGILLO et al., 2021).

Im Jahr 2006 wurde die Anwendung des Ki-67-Index bei kaninen intestinalen T-Zell-Lymphomen erstmals erwähnt. Die Ki-67-Expression der neoplastischen Zellen war unabhängig vom Schweregrad über einen weiten Bereich von 4–53 % verteilt (OZAKI et al., 2006). Später wurde der Ki-67-Index als mögliches Diagnostikum zur Unterscheidung zwischen kaninen intestinalen T-Zell-Lymphomen und lymphoplasmazellulären Darmentzündungen evaluiert. Die Lymphomzellen zeigten einen signifikant höheren Ki-67-Index von 30–62 %, verglichen mit den entzündlich veränderten Zellen (25 %). Innerhalb der Lymphomgruppe waren außerdem Unterschiede der Ki-67-Expression entsprechend des Schweregrads des Lymphoms nachvollziehbar. So war die Ki-67-Expression bei Large-cell-Lymphom-Fällen höher als bei Small-cell-Lymphom- und Enteritis-Fällen. Die Autoren schlussfolgerten, dass sich der Ki-67-Index zwar nicht als alleiniger Parameter zur Unterscheidung zwischen Enteritis und Lymphom eignet, allerdings in ein Panel diagnostischer Tests integriert werden kann (CARRASCO et al., 2015). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Carrasco et al. wies eine weitere Studie eine höhere Anzahl an Ki-67-positiven Lymphozyten bei kaninen intestinalen Large-cell- als bei Small-cell-Lymphomen nach, wodurch ein aggressiveres Verhalten des Large-cell-Lymphoms vermutet wurde (MATSUMOTO et al., 2019).

#### **1.5.4. PARR-Analyse**

Zur Unterscheidung zwischen der T- und der B-Zell-Klonalität des Lymphoms sowie zwischen malignen (monoklonalen) und benignen (polyklonalen) lymphatischen Erkrankungszuständen wurde in den vergangenen Jahren der Nachweis eines klonalen Rezeptor-Gen-Rearrangements mittels PCR eingeführt, der sogenannten PCR für Antigenrezeptor-Gen-Rearrangement (PARR) (VERNAU & MOORE, 1999; BURNETT et al., 2003).

Lymphozyten binden mithilfe von Antigenrezeptoren Antigene. Die

Antigenrezeptoren – bei B-Lymphozyten Immunglobuline (Ig), bei T-Lymphozyten T-Zell-Rezeptoren (TCR) – entstehen aus vielen verschiedenen variablen (variable, V), diversen (diverse, D) und verbindenden (joining, J) Gensegmenten (TONEGAWA, 1983). Während der Reifung der Lymphozyten durchlaufen diese Gensegmente Umstrukturierungsprozesse (Rekombinationen), wodurch jeder Lymphozyt über eine DNA-Region verfügt, die in ihrer Länge und Sequenz einzigartig ist und in der sogenannten Komplementaritäts-determinierenden Region (complementarity determining region 1-3, CDR 1-3) liegt. Es wird zwischen variablen und konstanten Regionen der Antikörperrezeptoren unterschieden, wobei die variable Region der Antigenerkennung dient (TONEGAWA, 1983; LIPMAN et al., 2005). Zur Bildung dieser variablen Region werden drei oder zwei der genannten Gensegmente rekombiniert und bilden somit die CDR-Region (RAULET, 1989; SCHATZ et al., 1992). Die DNA-Abschnitte, die an die CDR-Region angrenzen, sind in allen Lymphozyten ähnlich und ermöglichen deren Verwendung als Primer (Startpunkte für DNA-replizierende DNAsen, DNA-Polymerasen), sodass der DNA-Abschnitt der individuellen CDR-Region vervielfältigt werden kann (BURNETT et al., 2003; VAN DONGEN et al., 2003).

Die entstandenen PCR-Produkte werden mithilfe der Gel-Elektrophorese aufgetrennt, wobei deren Wanderungsgeschwindigkeit durch das Gel von der Basenlänge der PCR-Produkte abhängt. Da neoplastisch veränderte Lymphozyten einen monoklonalen Ursprung haben, besitzt die Mehrzahl der Lymphome (> 98 %) identische (klonale) Rearrangements der Antigenrezeptoren. Diese wandern mit gleicher Geschwindigkeit durch das Gel und werden anhand der Gel-Elektrophorese als ein bis zwei Banden dargestellt. Im Kontrast hierzu haben entzündlich veränderte Lymphozyten eine polyklonale Zellpopulation. Folglich wandern die unterschiedlich großen PCR-Produkte nicht mit einheitlicher Geschwindigkeit durch das Gel, wodurch mehrere undeutlich abgrenzbare Banden entstehen (VAN DONGEN et al., 2003; BURKHARD & BIENZLE, 2015).

Bei intestinalen Lymphomen des Hundes wurde die PARR-Analyse mit unterschiedlichem Erfolg zur Differenzierung von Lymphomen und benignen lymphoplasmazellulären Enteritiden angewendet. Fukushima et al. beschrieben unter Verwendung endoskopisch gewonnener Proben von zwölf alimentären Lymphom-Fällen lediglich eine Sensitivität von 68 %, die weit unter der zuvor

beschriebenen von 91 % bei lymphoiden Neoplasien im Allgemeinen lag (BURNETT et al., 2003; FUKUSHIMA et al., 2009). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2009 untersuchte endoskopisch gewonnene Proben von 78 Hunden, die unter gastrointestinalen Symptomen litten. Die Proben wurden morphologisch und mittels PARR-Analyse getrennt evaluiert. Während alle Adenokarzinom-Fälle negative PARR-Ergebnisse erzielten, waren drei Lymphom-Fälle positiv für den TCR-Rezeptor (T-Zell-Lymphom). Bei einem der Lymphome handelte es sich um ein B-Zell-Lymphom (IgH-positiv). Unter den Enteritis-Fällen waren sechs dabei, die positiv für den TCR-Rezeptor reagierten, von denen zwei später zytologisch als Lymphome kategorisiert wurden. Außerdem war die mittlere Überlebenszeit der TCR-positiven Enteritis-Fälle signifikant kürzer als die der TCR-negativen Enteritiden, sodass davon ausgegangen wurde, dass die PARR-Analyse auch latente, morphologisch noch nicht nachweisbare, Lymphom-Fälle detektieren konnte (KANEKO et al., 2009). Ein weiteres Forschungsprojekt verglich die PARR-Ergebnisse zwischen intestinalen Lymphomen, lymphoplasmazellulären Darmentzündungen und gesundem Darm aus Vollschicht-Darmbiopsien. Monoklonale Rezeptor Rearrangements wurden bei 76 % der Lymphome gefunden, wobei der T-Zell-Rezeptor deutlich überwog (85 %). Alle Enteritis-Fälle sowie die Kontrollgruppe zeigten polyklonale Rearrangements (OHMURA et al., 2017).

### **1.6. Prognose**

Hunde, die an einem intestinalen T-Zell-Lymphom erkrankten, hatten eine schlechte Prognose. Kanine intestinale T-Zell-Lymphome des Magen-Darm-Trakts wiesen im Vergleich zu multizentrischen T-Zell-Lymphomen kürzere Überlebenszeiten und kürzere progressionsfreie Intervalle auf (DERAVI et al., 2017). Innerhalb der Gruppe der primären gastrointestinalen Lymphome zeigten Hunde mit T-Zell-Lymphomen kürzere mittlere Überlebenszeiten als solche, die unter einem B-Zell-Lymphom litten (drei Wochen vs. drei Monate), wobei diese Ergebnisse nicht statistisch signifikant waren (RASSNICK et al., 2009).

Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben im Fall eines High-grade-Lymphoms (LCL) einen zügig voranschreitenden klinischen Verlauf. Nach Diagnosestellung verstarben die Hunde innerhalb von 13–77 Tagen, trotz aggressiver Chemotherapie-Protokolle und/oder chirurgischer Tumorexzision (COUTO et al., 1989; FRANK et al., 2007; RASSNICK et al., 2009; MAEDA et al., 2017). Die

Forschungsgruppe um Rassnick et al. untersuchte insgesamt 18 Hunde, die sowohl unter primären gastrointestinalen Lymphomen als auch unter gastrointestinalen Manifestationen eines multizentrischen Lymphoms litten. Auf die Behandlung mit einem Chemotherapie-Protokoll, bestehend aus fünf unterschiedlichen Medikamenten (VELCAP = Vincristin, L-Asparaginase, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Prednisolon), gingen neun Hunde (50 %) zunächst in komplette und ein Hund (6 %) in partielle Remission. Jedoch erlitten acht Hunde innerhalb von 86 Tagen ein Rezidiv oder wiesen einen progressiven Krankheitsverlauf vor. Die mittlere Überlebenszeit betrug trotz Chemotherapie lediglich 2,5 Monate, und nur 18 % der Hunde überlebten länger als zwölf Monate. Innerhalb der Studienpopulation wurden Durchfall als initiales klinisches Anzeichen sowie fehlendes Ansprechen auf die Chemotherapie mit kürzeren Überlebenszeiten in Verbindung gebracht. Für Hunde mit Durchfallsymptomatik betrug die mittlere Überlebenszeit 2,5 Monate, für Hunde ohne Durchfallsymptomatik 30 Monate. Bei Ansprechen der Chemotherapie (komplette und partielle Remissions-Fälle) überlebten die Hunde im Mittel 3,8 Monate, während Tiere ohne Ansprechen auf die Therapie lediglich zehn Tage weiterlebten (RASSNICK et al., 2009). Davon abgesehen beeinflusste die Lokalisation der neoplastischen Lymphozyten innerhalb des Darmtrakts die Überlebenszeit. Fälle mit kolorektalem Ursprung schienen eine längere mittlere Überlebenszeit von 61 Tagen zu haben, verglichen mit Magen (17 Tage) und Dünndarm (13 Tage). Bei multifokaler Verteilung des Lymphoms an zwei oder mehr Stellen innerhalb des Magen-Darm-Trakts wurde eine mittlere Überlebenszeit von nur 4,5 Tagen beobachtet (COUTO et al., 1989; FRANK et al., 2007).

Im Jahr 2015 wurde erstmals von einem Unterschied bei der Prognose von gastrointestinalen kaninen High- und Low-grade-Lymphomen berichtet (NAKASHIMA et al., 2015). Im Gegensatz zu High-grade-Lymphomen (LCL) sprachen Low-grade-Lymphome (SCL) gut (bis zu 70 % der Studienpopulation) auf die chemotherapeutische Behandlung an. So wurden mittlere Überlebenszeiten von 535–628 Tagen beschrieben. Selbst bei Tieren, die nicht auf die Therapie ansprachen, betrug die mittlere Überlebenszeit 279–424 Tage (COUTO et al., 2018; LANE et al., 2018). Unter Verwendung von Steroiden in Kombination mit einem alkalisierenden Medikament (Chlorambucil, Cyclophosphamid, Lomustine) wurden bessere Resultate als allein mit einem Steroid erzielt. Das Vorhandensein

einer Anämie und von Gewichtsverlust korrelierte negativ mit der Überlebenszeit (COUTO et al., 2018).

## 2. Mikro-Ribonukleinsäuren

Bei Tieren unterscheidet man zwischen drei Gruppen kleiner nicht-kodierender Ribonukleinsäuren, die einen hemmenden Einfluss auf die Genexpression haben: Mikro-Ribonukleinsäuren (micro-ribonucleic acid, miRNA), kleine interferierende Ribonukleinsäuren (small interfering ribonucleic acid, siRNA) und mit PIWI-Proteinen interagierende Ribonukleinsäuren (PIWI-interacting ribonucleic acid, piRNA) (AMBROS & CHEN, 2007). MiRNA kommen in allen eukaryoten Zellen vor und sind einzelsträngige, kurze (~22 Nukleotide lange), nicht-kodierende Ribonukleinsäuren, die durch posttranskriptionelle Basenpaarung an teilweise komplementäre Sequenzen in den 3'-untranslatierten Regionen (UTR) von Ziel-messengerRNAs (mRNAs) an der Steuerung fast aller biologischer Signalwege beteiligt sind (EULALIO et al., 2008; BARTEL, 2009; FABIAN et al., 2010).

### 2.1. Entdeckung, Nomenklatur

Im Jahr 1993 wurden aus dem Gen *lin-4* des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) erstmals kurze RNA-Moleküle nachgewiesen, die durch temporäre posttranskriptionelle Hemmung der mRNA *lin-14* die Larvenentwicklung dieser Nematode steuerten (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993). Sieben Jahre später konnte eine ähnlich vermittelte Steuerung der zeitlichen Abfolge der Larvenentwicklung für RNA-Moleküle des Gen-Lokus *let-7* von *C. elegans* belegt werden (REINHART et al., 2000; SLACK et al., 2000). Außerdem wurden gleichartige *let-7* RNA-Moleküle mit ebenfalls temporärer Expression in Abhängigkeit des Entwicklungsstandes in einer Bandbreite anderer Tierarten erkannt, darunter Wirbeltiere, Manteltiere, Ringel- und Gliederfüßer. Hierdurch wurde den *let-7* RNA-Molekülen eine regulatorische Rolle in der Entwicklung von Metazoa zugesprochen (PASQUINELLI et al., 2000). Bald darauf wurden die RNAs *lin-4* und *let-7* einer umfangreichen Klasse kleiner endogener RNAs (genannt miRNAs) zugeordnet. Die miRNAs kommen in Würmern, Fliegen und Säugetieren mit teils temporärer, in der Mehrzahl jedoch zeitlich unabhängiger Expression vor (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; LEE & AMBROS, 2001).

Die Datenbank miRBase, zunächst „The microRNA Registry“ genannt, wurde zur

Vereinfachung der Namensgebung sowie zur Katalogisierung der miRNAs und ihrer Zielsequenzen gegründet. In der 22. Version von September 2018 sind über 38.000 Einträge zu 271 verschiedenen Spezies vermerkt (KOZOMARA et al., 2019). Zur Benennung der miRNAs werden die Vorsilbe „miR-“ und eine eindeutige Identifikationsnummer verwendet, wobei identische oder nahezu identische miRNAs dieselbe Nummer erhalten. Anstelle einer Nummer können miRNAs mit sehr ähnlichen Sequenzen auch einen Buchstaben erhalten und einer Familie zugeordnet werden. Tierische werden von pflanzlichen miRNAs durch die Verwendung eines Bindestrichs unterschieden (wie miR-14 vs. miR172). Identische miRNAs aus verschiedenen Organismen werden mit der gleichen Identifikationsnummer benannt, erhalten jedoch eine dreistellige Vorsilbe, die den Artnamen definiert, gefolgt von einem Bindestrich wie „cfa-“ für *Canis lupus familiaris* und „hsa-“ für *Homo sapiens*. Gene, die für miRNAs kodieren, erhalten ebenfalls eine dreistellige Vorsilbe, wobei Großschreibung, Silbentrennung und Kursivschrift den Konventionen des jeweiligen Organismus entsprechen. Jeder Genlokus produziert zwei reife miRNAs, ausgehend vom 3'- und 5'-Ende der prä-miRNA, die mit der Endsilbe „-3p“ oder „-5p“ benannt werden können. Ausgenommen von diesen Regeln sind die ersten entdeckten miRNAs lin-4 und let-7 sowie deren Gene (AMBROS et al., 2003).

## **2.2. Biogenese**

Alle miRNAs durchlaufen ein mehrstufiges (kanonisches) Verfahren, beginnend im Zellkern und endend im Zytoplasma, welches das primäre miRNA-Transkript in die aktive, ~22 Nukleotide lange reife miRNA umwandelt.

### **2.2.1. Genomik und Transkription**

Beim Säugetier sind miRNAs in allen Chromosomen, ausgenommen dem Y-Chromosom, vorhanden (GUO et al., 2009). Innerhalb des Genoms sind sie in verschiedenen Bereichen zu finden. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass die Mehrheit der miRNAs intergenetisch liegt (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; LEE & AMBROS, 2001; THATCHER et al., 2008), befinden sich beim Säugetier mehr als die Hälfte (~70 %) der bekannten miRNAs innerhalb proteinkodierender und nicht-kodierender definierter Transkriptionseinheiten. So werden 40 % der miRNAs durch Introns proteinkodierender, 10 % durch Introns nicht-kodierender Transkriptionseinheiten und 10 % durch Exons langer nicht-

kodierender Transkripte kodiert (RODRIGUEZ et al., 2004; KIM & NAM, 2006; KIM et al., 2009; OLENA & PATTON, 2010). Die Transkription kann sowohl mono- als auch polycistronisch, also gemeinsam mit anderen miRNAs innerhalb eines sogenannten Clusters erfolgen. Etwa 50 % der beim Säugetier bekannten miRNAs liegen in unmittelbarer Nähe zu anderen miRNAs in sogenannten Clustern (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; MOURELATOS et al., 2002). Für die meisten miRNA-Gene wurde die genaue Position der miRNA-Promotoren noch nicht kartiert (OZSOLAK et al., 2008). Intrinsisch gelegene miRNA-Gene haben häufig denselben Transkriptionsstartpunkt wie das Wirtsgen. Sie verfügen jedoch oft über mehrere Transkriptionsstartpunkte, weshalb manche intrinsisch gelegenen miRNA-Gene dennoch einen anderen Promoter als den des Wirtsgens aufweisen (OZSOLAK et al., 2008; MONTEYS et al., 2010). Die Transkription der meisten miRNA-Gene erfolgt durch die RNA-Polymerase II (LEE et al., 2004), doch es existieren auch Nachweise der Transkription durch die RNA-Polymerase III (PFEFFER et al., 2005; BORCHERT et al., 2006). Es entsteht das Primärtranskript (primary micro ribonucleic acid, pri-miRNA), das mehrere 100–1.000 Nukleotide lang ist und innerhalb einer lokalen Haarnadelstruktur die reife miRNA-Sequenz enthält (CAI et al., 2004; LEE et al., 2004).

### 2.2.2. MiRNA-Reifung

Die pri-miRNA durchläuft auf dem Weg zur fertiggestellten miRNA zwei Reifungsschritte, die durch die beiden Endonukleasen Drosha und Dicer gesteuert werden. Dabei handelt es sich um Proteine vom Typ RNase III, die spezifisch an doppelsträngiger RNA wirksam werden (KIM et al., 2009). Im ersten Schritt spaltet Drosha im Zellkern den Stamm der pri-miRNA-Haarnadelstruktur und setzt eine kleine, ~65 Nukleotide lange haarnadelförmige Vorläufer-miRNA (precursor micro-ribonucleic acid, pre-miRNA) frei (LEE et al., 2002; LEE et al., 2003). Drosha formt zusammen mit seinem essentiellen Kofaktor – dem DiGeorge syndrome critical region gene DGCR8 (auch bekannt als Pasha in *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) und als PASH-1 in *C. elegans*) – den sogenannten Mikroprozessorkomplex von 500 Kilodalton (DENLI et al., 2004; GREGORY et al., 2004; HAN et al., 2004; LANDTHALER et al., 2004). Typischerweise besteht das Primärtranskript (pri-miRNA) aus einem Stamm von ~33 Basenpaaren (bp), einer terminalen Schleife sowie flankierenden einzelsträngigen RNA-Abschnitten zum 3'-und 5'-Ende. DGCR8 erkennt die pri-miRNA anhand der einzelsträngigen



RNA-Segmente sowie des Stamms und unterstützt Drosha bei der Spaltung des Substrats etwa elf Basenpaare entfernt von der Verbindung zwischen einzel- und doppelsträngiger RNA (ZENG & CULLEN, 2005; HAN et al., 2006). Alternativ können bestimmte miRNAs, sogenannte miRtrons, die Prozessierung durch Drosha/DGCR8 überspringen, sodass durch Spleißen des Primärtranskripts direkt pre-miRNA entsteht (OKAMURA et al., 2007).

Das Protein Exportin 5 (EXP5) bildet – zusammen mit dem GTP-bindenden Kernprotein RAN-GTP und der pre-miRNA – einen Transportkomplex und entlässt die pre-miRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma (BOHNSACK et al., 2004; KIM, 2004; LUND et al., 2004). EXP5 erkennt die pre-miRNA anhand des mehr als 14 Basenpaare langen doppelsträngigen RNA-Stamms sowie des kurzen 3'-Überhangs (1–8 Nukleotide) (GWIZDEK et al., 2003; LUND et al., 2004; ZENG & CULLEN, 2004).

Im Zytoplasma wird die Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) durch Dicer in der Nähe der terminalen Schleife gespalten, wodurch ein kleines, ~22 Nukleotide langes miRNA/miRNA\* Duplex mit 5'-Phosphatgruppe und zwei Nukleotide langem 3'-Überhang freigesetzt wird (BERNSTEIN et al., 2001; GRISHOK et al., 2001; HUTVÁGNER et al., 2001; KETTING et al., 2001).

Dicer vereint sich mit doppelsträngigen RNA-bindenden Proteindomänen (dsRBD), die zu doppelsträngiger RNA-Helix binden und somit bei deren Lokalisation helfen (KIM et al., 2009). So interagiert humanes Dicer für die pre-miRNA Prozessierung mit zwei eng verwandten Proteinen: TRBP (TAR RNA-binding protein, auch bekannt als TARBP2) und PACT (auch bekannt als PRKRA) (CHENDRIMADA et al., 2005; HAASE et al., 2005; LEE et al., 2006; LEE et al., 2013). Dicer 1 von *D. melanogaster* interagiert mit zwei Isoformen des RNA-bindenden Proteins Loquacious, die je drei dsRBDs enthalten (FÖRSTEMANN et al., 2005; JIANG et al., 2005; SAITO et al., 2005). TRBP beeinflusst die Prozessierungs-Effizienz einiger pre-miRNAs und bestimmt die Länge der reifen miRNAs (CHAKRAVARTHY et al., 2010; FUKUNAGA et al., 2012; LEE & DOUDNA, 2012). Dicer bindet die pre-miRNA bevorzugt am zwei Nukleotide langen 3'-Überhang, der initial durch Drosha generiert wurde (ZHANG et al., 2004). Im Allgemeinen liegen die Dicer-Spaltstellen in einem festen Abstand von typischerweise 21–25 Nukleotiden Länge zum 3'-Ende des doppelsträngigen RNA-Terminus (sogenannte 3'-Zählregel) (ZHANG et al., 2002; ZHANG et al., 2004;

VERMEULEN et al., 2005; MACRAE et al., 2006; MACRAE et al., 2007).

Gefolgt von der Prozessierung durch Dicer, wird das miRNA-Duplex auf ein Argonauten-Protein (Ago) geladen, um zusammen mit anderen Proteinen zunächst den pre-RISC, also den Vorläufer des RNA-induced silencing complex (RISC, oder miRNA-induced silencing complex, miRISC) zu bilden (TABARA et al., 1999; HAMMOND et al., 2001; MOURELATOS et al., 2002). Dabei verbleibt einer der beiden Stränge im Ago-Protein als reife miRNA (Führungsstrang, miRNA), während der andere Strang (Passagierstrang, miRNA\*) abgebaut wird. Die thermodynamische Stabilität der Stränge entscheidet darüber, welcher von ihnen abgebaut wird. Der Strang mit verhältnismäßig instabiler Basenpaarung am 5'-Ende überlebt typischerweise (wie GU- statt GC-Paar) (KAWAMATA & TOMARI, 2010). Der andere Strang (miRNA\*) wird in der Regel abgebaut und entfernt, sodass das Ergebnis aus dem funktionsfähigen RISC mit reifer miRNA besteht (KAWAMATA & TOMARI, 2010; HA & KIM, 2014).

### 2.3. Wirkmechanismus

Als Teil des RISC ist die reife miRNA in der Lage, die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene zu regulieren, indem sie zum größten Teil durch partielle Komplementarität an Ziel-mRNAs bindet und hauptsächlich zur mRNA-Degradierung oder Translationshemmung führt (EULALIO et al., 2008). Genauer ausgedrückt, kann die miRNA-RISC-vermittelte Genhemmung auf drei Wegen erfolgen: durch translationale Reprimierung, Destabilisierung der mRNA oder direkte mRNA-Spaltung. Eine einzige miRNA kann an mehrere mRNAs binden, und eine mRNA kann von mehreren synergistisch wirkenden miRNAs reguliert werden (LIM et al., 2005; RAJEWSKY, 2006). Derzeit wird davon ausgegangen, dass etwa 30–60 % der humanen proteinkodierenden Gene unter der Kontrolle von miRNAs stehen (BARTEL, 2009; FRIEDMAN et al., 2009).

MiRNAs interagieren mit ihren Ziel-mRNAs durch Basenpaarung. In Pflanzen paaren die meisten miRNAs mit nahezu perfekter Komplementarität an mRNAs, wobei der mRNA-Abbau durch endonukleolytische Spaltung in der Mitte des miRNA-mRNA-Duplexes induziert wird (JONES-RHOADES et al., 2006). Im Gegensatz dazu bilden tierische miRNAs mit wenigen Ausnahmen ein unvollkommenes Basenpaar mit ihren Ziel-mRNAs. Die sogenannte „Seed“-Region – ein Bereich am 5'-Ende der miRNAs, der sich über die Nukleotide 2–8

ausdehnt –ist für die Zielerkennung essentiell und bildet den Kern der miRNA-mRNA-Bindung. GU-Paare, Fehlpaarungen und Ausbuchtungen innerhalb des „Seed“-Bereichs beeinflussen die Repression deutlich. Ebenfalls wichtig sind Ausbuchtungen oder Fehlpaarungen im zentralen Bereich der miRNA-mRNA-Verbindung, um eine Ago-vermittelte endonukleolytische Spaltung der mRNA zu verhindern. Außerdem muss zur Stabilisierung der Interaktion eine angemessene Komplementarität zur 3'-Hälfte, insbesondere zu den Basenpaaren 13–16 der miRNA bestehen. Für gewöhnlich liegen miRNA-Bindungsstellen bei tierischen mRNAs in der 3'-UTR-Region und sind in mehreren Kopien vorhanden. Im Allgemeinen sind für eine erfolgreiche Repression mehrere Bindungsstellen für die gleiche oder verschiedene miRNAs erforderlich. Liegen diese nahe beieinander (10–40 Nukleotide voneinander entfernt), so wirken sie häufig zusammen (DOENCH & SHARP, 2004; BRENNECKE et al., 2005; LEWIS et al., 2005; GRIMSON et al., 2007; NIELSEN et al., 2007; FILIPOWICZ et al., 2008).

Die genauen Mechanismen der Translationshemmung sind noch nicht geklärt. Generell erfolgt der Translationsvorgang in den drei Schritten Initiation, Elongation und Termination. Eine mRNA erfüllt die Voraussetzungen zur Translation, wenn sie über eine 5'-cap-Struktur und einen 3'-Poly(A)-Schwanz verfügt (JACKSON et al., 2010). Das zytoplasmatische Poly(A)-bindende Protein C (PABPC) interagiert mit dem eukaryoten Translations-Initiationsfaktor 4G (eIF4G), der wiederum durch Interaktion mit dem cap-bindenden Protein eIF4e mit der cap-Struktur assoziiert ist. Es entstehen zirkuläre mRNAs, die vor Abbau geschützt sind und effizient translatiert werden können (DERRY et al., 2006). Die Translationshemmung kann sowohl während der Initiation als auch danach, also in der Elongation durch vorzeitiges Abfallen der Ribosomen (ribosome drop-off) stattfinden (HUMPHREYS et al., 2005; PETERSEN et al., 2006).

In Eukaryoten können mRNAs auf zwei verschiedenen Wegen abgebaut werden, die auf der allmählichen Verkürzung des mRNA-Poly(A)-Schwanzes beruhen. Entweder wird der mRNA-Körper durch Exosom-katalysierten progressiven 3'→5'-Zerfall abgebaut, oder es wird, katalysiert durch die Exonuklease XRN, zunächst das Cap entfernt und anschließend kommt es zum weiteren 5'→3'-Abbau (PARKER & SONG, 2004; FILIPOWICZ et al., 2008).

Eine direkte mRNA-Spaltung ist nur bei nahezu perfekter miRNA/mRNA-Komplementarität möglich, tritt folglich bei Tieren nur sehr selten auf und wurde

zwischen miR-196 und HOXB8 beschrieben (LLAVE et al., 2002; YEKTA et al., 2004).

#### **2.4. Biologische Funktionen von miRNAs**

Die Aufdeckung der biologischen Funktion einzelner miRNAs erfolgt meist durch tierische Knockout-Modelle und transgene Überexpressionsversuche, wobei zum Nachweis eines phänotypischen Effekts normalerweise die Deaktivierung von mehreren Mitgliedern einer miRNA-Familie erforderlich ist (HAMMOND, 2015; VIDIGAL & VENTURA, 2015). Obwohl die genetische Inaktivierung einer miRNA die Repressionseffekte auf ihre Ziel-mRNA abschwächen könnte, tolerieren die meisten Gene des Organismus dies gut (VIDIGAL & VENTURA, 2015).

Im Allgemeinen sind miRNAs für die Entwicklung einzelner Gewebe nicht notwendig, denn trotz Deletion der kardial-spezifischen miR-208 in Mäusen entwickeln diese ein Herz. Dementgegen entwickeln miR-208-defiziente Tiere Defekte in der Stressreaktion und eine kardiale Hypertrophie. Da viele gewebespezifische miRNAs bei Krankheiten reduziert sind, wird vermutet, dass sie für die Aufrechterhaltung des Gewebedifferenzierungszustands erforderlich sein könnten (HAMMOND, 2015).

Gewebespezifische miRNAs werden oft mit Erkrankungen des jeweiligen Gewebes in Verbindung gebracht. Durch Analyse der miRNA-Expressionsprofile von Gewebsbiopsien verschiedener Organe bei Menschen konnte gezeigt werden, dass etwa 17 % der miRNAs und miRNA-Familien in bestimmten Geweben dominant exprimiert wurden. So konnte die gewebespezifische Expression von miR-122 in der Leber, miR-9 und miR-124 im Gehirn, miR-7 in der Hypophyse, miR-205-5p in der Haut, miR-514a-3p in den Hoden und miR-192-5p im Dickdarm nachgewiesen werden (LUDWIG et al., 2016).

Wie bereits erwähnt, regulieren miRNAs etwa 60 % der humanen Gene (BARTEL, 2009). Dadurch sind sie an der Regulation verschiedenster biologischer Prozesse wie der Zellzykluskontrolle, der Entwicklung und Differenzierung von Zellen, der Apoptose sowie der Steuerung von Stoffwechselfvorgängen maßgeblich beteiligt (HARFE, 2005; BOEHM & SLACK, 2006; JOVANOVIC & HENGARTNER, 2006; CARLETON et al., 2007). Auf diese Weise spielen miRNAs auch bei Krankheitsprozessen – darunter neurodegenerativen und Stoffwechselstörungen

sowie Krebs – eine wichtige Rolle (JIN et al., 2004; POY et al., 2004; LU et al., 2005; VOLINIA et al., 2006). Des Weiteren üben sie eine Schlüsselfunktion bei der Stammzellendifferenzierung aus (HEINRICH & DIMMELER, 2012). So können miRNAs auch die Bildung von Krebsstammzellen regulieren (SHIMONO et al., 2009; PETER, 2010; SHIMONO et al., 2015). Mittlerweile wurde die miRNA-Dysregulierung auch als kausaler Faktor bei der Progression verschiedener Krankheitsprozesse bestätigt, darunter Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen, Nierenerkrankungen und Krebs (PAUL et al., 2018).

### **2.5. Veränderte miRNA-Expression bei Krebserkrankungen**

Im Jahr 2002 wurde während Untersuchungen zur chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämie (B-CLL) erstmals ein Zusammenhang zwischen veränderter miRNA-Regulation und Krebs bei Menschen nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass die miRNAs des miR-15-a/16-1-Clusters in einer Region auf dem Genom (Chromosom 13q14) lagen, die bei mehr als der Hälfte der Patienten fehlte oder herunterreguliert war. Dies ließ eine tumorhemmende Wirkung dieser miRNAs vermuten (CALIN et al., 2002). Dieselbe Forschungsgruppe kartierte daraufhin alle bis dahin bekannten miRNA-Gene und stellte fest, dass sich mehr als 50 % innerhalb krebsassoziierter Genomregionen oder an fragilen, für Deletionen oder Mutationen anfälligen Stellen innerhalb des Genoms befanden (CALIN et al., 2004).

Mittlerweile existieren etliche Belege für die Beteiligung von miRNAs an fast allen Krebserkrankungen. Sie beeinflussen die Tumorentstehung entweder durch Steuerung der Tumorzellendifferenzierung und -apoptose oder durch die Regulation von Krebs-Onkogenen (wie RAS, MYC, p53, c-myc) und Tumorsuppressoren (wie PTEN, RB2). Folglich werden miRNAs mit erhöhter Expression in Tumoren als Onkogene (daher auch „Onkomirs“ genannt) angesehen. Diese fördern durch die negative Regulation von Tumorsuppressor-Genen und/oder Genen, die die Zelldifferenzierung oder Apoptose kontrollieren, die Tumorentstehung. Demgegenüber ist die Expression einiger miRNAs in Krebszellen vermindert. Solche miRNAs gelten als tumorhemmend und werden als Tumorsuppressoren bezeichnet (ZHANG et al., 2007). Manche miRNAs haben duale, somit onkogene und tumorhemmende regulatorische Wirkungen. Dies ist wahrscheinlich den verschiedenen Zelltypen mit ihren individuellen Expressionsprofilen sowie der Vielfalt der zu regulierenden Zielgenen geschuldet (BARTEL, 2009; CORTEZ et

al., 2011).

Die Erstellung genomweiter miRNA-Expressionsprofile ermöglichte mit hoher Genauigkeit die Unterscheidung verschiedener Krebsarten sowie die Identifizierung des Ursprungsgewebes schlecht differenzierter Tumore, wohingegen sich mRNA-Profile als sehr ungenaue Gewebeindikatoren herausstellten (LU et al., 2005; VOLINIA et al., 2006). So entwickelte eine Studie einen Klassifikator – bestehend aus 48 miRNAs – der aus einer Stichprobe von 336 primären und metastasierenden Tumoren die Herkunft des Gewebes in 86 % (einschließlich 77 % der metastasierten Tumoren) genau vorhersagen konnte (ROSENFELD et al., 2008). In Anbetracht dessen, dass Krebserkrankungen undefinierten Ursprungs etwa 4 % aller malignen Erkrankungen ausmachen und mit einer schlechten Prognose verbunden sind, bietet die weitere Entwicklung von miRNA-Klassifikatoren eindeutige Vorteile für die klinische Diagnose und anschließende frühzeitige Behandlung (OIEN & EVANS, 2008). Darüber hinaus sind miRNAs aufgrund ihrer geringen Größe im Vergleich zu langen mRNAs stabiler, sodass bei ihnen die Erstellung von Expressionsprofilen auch aus fixiertem Gewebe oder anderem biologischem Material möglich ist (LI et al., 2007; HALL et al., 2012). MiRNAs können zuverlässig aus gefrorenem und in Paraffin eingebettetem Gewebe, aus Blut (Gesamtblut, Plasma oder Serum), aus zirkulierenden Exosomen sowie aus verschiedenen biologischen Flüssigkeiten wie Urin, Speichel und sogar Sputum extrahiert werden (LI et al., 2007; XI et al., 2007; TAYLOR & GERCEL-TAYLOR, 2008; HANKE et al., 2010; MICHAEL et al., 2010; XIE et al., 2010; YU et al., 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass Expressionsprofile zirkulierender miRNAs das im Tumorgewebe beobachtete Expressionsmuster widerspiegeln und somit eine attraktive Möglichkeit darstellen, sie als leicht nachweisbare Tumor-Biomarker zu verwenden (LAWRIE et al., 2008).

Im Laufe des vergangenen Jahrzehnts wiesen zahlreiche humanmedizinische Studien zirkulierende miRNAs nach, die im Plasma und Serum von Krebspatienten verändert reguliert waren und anhand derer eine Unterscheidung zu gesunden Individuen möglich war (HO et al., 2022). So waren bei Magenkrebs-Patienten die miRNAs miR-20a-5p und miR-221 in Plasma- und Serumproben verstärkt exprimiert. Darüber hinaus konnte die Erkrankung anhand der veränderten Expression der miRNAs miR-221-3p, miR-378c-3p und miR-744-5p bereits fünf

Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome frühzeitig erkannt werden (SONG et al., 2012). MiR-21-5p war im Darmgewebe und im Plasma von Patienten mit kolorektalen Tumoren erhöht exprimiert, und anhand der Plasmakonzentration von miR-21-5p konnte Darmkrebs mit einer Sensitivität und einer Spezifität von 90 % diagnostiziert werden (KANAAAN et al., 2012).

## **2.6. Mechanismen der miRNA-Dysregulierung bei Krebserkrankungen**

Bei Krankheitszuständen, einschließlich Krebserkrankungen, bedingen verschiedenste Mechanismen eine Dysregulierung und damit Veränderung der miRNA-Expression. Übergeordnet können dabei strukturelle genetische Veränderungen und epigenetische Änderungen unterschieden werden (IORIO & CROCE, 2012).

Zu den strukturellen Veränderungen zählen Chromosomenanomalien. Wie bereits erwähnt, liegen die miRNAs des miR-15-a/16-1 Clusters in einer Region auf dem Genom (Chromosom 13q14), die bei mehr als der Hälfte der B-CLL Patienten fehlt oder herunterreguliert ist (CALIN et al., 2004). Bei verschiedenen Tumortypen wurde gezeigt, dass die miRNA-Expression als Folge eines Defekts während der miRNA-Biogenese, etwa durch abnormale Aktivität der Enzyme Drosha oder Dicer verändert ist (THOMSON et al., 2006; NAKAMURA et al., 2007; MERRITT et al., 2008). Auch die Dysregulierung verschiedener miRNA-Biogenese-Kofaktoren beeinflusst die miRNA-Expression. So zeigen DGCR8-Knockout-Mäuse einen frühen Entwicklungsstillstand sowie Defekte in der Proliferation und Differenzierung von embryonalen Stammzellen (WANG et al., 2007). Lin-28 ist in der Lage die let-7-Biogenese zu blockieren, und ist in 15 % der menschlichen Tumore aktiviert, besonders bei weniger differenzierten Krebsformen (VISWANATHAN et al., 2008).

Bei epigenetischen Veränderungen handelt es sich um vererbare Veränderungen der Genexpression, die nicht auf eine Veränderung der DNA-Sequenz zurückzuführen sind (HOLLIDAY, 1987). Abweichende miRNA-Expressionsspiegel können durch epigenetische Veränderungen von miRNA-Promotoren, deren Methylierungsstatus oder von Histonmustern bedingt sein (FABBRI et al., 2013). Bei Tumorerkrankungen können DNA-Hypomethylierungen, Hypermethylierungen tumorhemmender Gene sowie miRNA-Inaktivierungen infolge von DNA-Methylierung beobachtet werden

(ESTELLER, 2008). So verursachte die epigenetische Unterdrückung der tumorsuppressiven miRNA miR-127 bei primären Prostatakarzinomen und Blasen Tumoren die Hochregulierung des Proto-Onkogens BCL6, das ein direktes Ziel von miR-127 ist (SAITO et al., 2006). Die miR-29-Familie ist verantwortlich für die Expressionskontrolle *ex novo* der DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B bei Lungenkrebs – das heißt, miRNAs kontrollieren auch den zellulären Methylierungsstatus durch Abwandlung der für die epigenetische Kontrolle verantwortlichen Enzyme (FABBRI et al., 2007).

Ein weiterer wichtiger und komplexer Regulationsmechanismus der miRNA-Expression ist die Transkriptionskontrolle (LEE et al., 2004). Diese Form der miRNA-vermittelten Dysregulierung wurde bei Krebserkrankungen erstmals durch die transkriptionelle Aktivierung des miR-17/92-Clusters nachgewiesen, induziert durch das MYC-Onkogen. Die Hochregulation des miR-17/92-Clusters modulierte die anti-apoptotische Wirkung von E2F1 und vermittelte so die MYC-proliferative Wirkung (O'DONNELL et al., 2006). Weiterhin sind Gene, die miRNAs der miR-34-Familie kodieren, direkte transkriptionelle Ziele von p53. Die exzessive Expression von miR-34 induziert einen Zellzyklus-Arrest sowohl in primären als auch in aus Tumoren abgeleiteten Zelllinien – das heißt p53 unterdrückt die Tumorbildung durch die transkriptionelle Aktivierung von miR-34 (HE et al., 2007).

### **2.7. Veränderte miRNA-Expression im humanen T-Zell-Lymphom**

T-Zell-Lymphome bilden eine heterogene Gruppe von T-Zell-abgeleiteten lymphoiden Neoplasien, die 10–15 % der Non-Hodgkin-Lymphome ausmachen. Natürliche Killerzellen-(NK)-Lymphome gehören ebenfalls zur T-Zell-Kategorie und werden als T-Zell- oder NK-Zell-Lymphome bezeichnet. Gemäß der WHO-Einteilung werden des Weiteren drei Untergruppen differenziert: kutane T-Zell-Lymphome, nodale und extranodale Formen (JAFFE et al., 2013; MATUTES, 2018).

Beim Menschen wurde die miRNA-Expression in B-Zell-Lymphomen umfassend untersucht, bislang ist jedoch wenig über die miRNA-Expression in T-Zell-Lymphomen bekannt (IKEDA & TAGAWA, 2014; FERNANDEZ-MERCADO et al., 2015; SAKI et al., 2015). MiRNAs spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der physiologischen Lymphopoese. Eine Reihe von Studien zeigte, dass



verschiedene miRNAs, darunter miR-17~92, miR-155 und miR-181 an der Initiierung, Hemmung und Beendigung der T-Zell-Differenzierung beteiligt sind. Daher steht eine miRNA-Dysregulierung in Zusammenhang mit der Entwicklung von T-Zell-Tumoren, also der Pathogenese von Leukämien und Lymphomen (SAKI et al., 2015).

Bei kutanen T-Zell-Lymphomen (cutaneous T-cell lymphoma, CTCL) gelten vorrangig die miRNAs miR-21, miR-155 und miR-214 als onkogen (GLUUD et al., 2020). In malignen CTCL-Zellen ist die miR-155-Expression (ebenso wie die des Wirtsgens BIC) durch Regulation des Transkriptionsfaktors STAT 5 hochreguliert. Der STAT5/BIC/miR-155-Signalweg fördert also die Proliferation von malignen T-Zellen (KOPP et al., 2013). Es existieren zunehmende Belege, dass miRNA-Expressionsanalysen bei CTCL als Biomarker für diagnostische, prognostische sowie behandlungsvorhersagende Werkzeuge eingesetzt werden können (GLUUD et al., 2020). CTCL ist charakterisiert durch die Proliferation neoplastischer T-Zellen innerhalb eines chronisch entzündlich veränderten Umfelds. Es werden zwei Untergruppen unterschieden: die häufig auftretende, meist indolent verlaufende Form Mycosis fungoides (MF) sowie das seltene Sézary-Syndrom (SS), bei dem es sich um eine hoch-aggressive leukämische Form des CTCL handelt, die mit extensiven exfoliativen Erythemen einhergeht (HRISTOV et al., 2019). Aufgrund der Ähnlichkeit von CTCL mit gutartigen entzündlichen Dermatosen stellt die eindeutige Diagnose – vergleichbar jener des kaninen intestinalen Lymphoms – eine Herausforderung dar (KIM et al., 2005; HRISTOV et al., 2019). Bereits 2011 konnte gezeigt werden, dass sich miRNA-Expressionsprofile in Hautbiopsien (FFPE) von CTCL-Fällen, gutartigen entzündlichen Hautläsionen und normaler Haut deutlich voneinander unterscheiden. Mittels nur drei verschieden exprimierter miRNAs (miR-155 hochreguliert; miR-203 und miR-205 herunterreguliert) wurde eine diagnostische Genauigkeit von 95 % bei der Differenzierung von malignen und benignen Krankheitszuständen erreicht (RALFKIAER et al., 2011). Eine weitere Studie mit größerer Fallzahl bestätigte dieses Ergebnis innerhalb einer unabhängigen Patientenkohorte mit einer Sensitivität von 90 %, einer Spezifität von 98 % und einer Gesamtgenauigkeit von 94 % (MARSTRAND et al., 2014). Außerdem geht das Fortschreiten eines frühen Stadiums von MF zu fortgeschrittenem CTCL mit der Überexpression der onkogen wirkenden miRNA-Cluster miR-17/92, miR-

106b/25 und miR-106a/363 einher, was neben dem diagnostischen Nutzen auch eine Risikovorhersage ermöglichte (RALFKIAER et al., 2014). Schließlich wurde der 3-miR-Klassifikator auch in Plasmaproben evaluiert und konnte ebenfalls überzeugen (94 % Sensitivität, 100 % Spezifität). Die Ergebnisse (alle fünf Monate) wiederholter Plasmakontrollen spiegelten den klinischen Verlauf wider und dienten zur Diagnose und Krankheitsüberwachung (DUSÍLKOVÁ et al., 2017). Ein weiterer prognostischer miRNA-Klassifikator, bestehend aus den miRNAs miR-106b-5p, miR-148a-3p und miR-338-3p detektierte bei Patienten im frühen MF-Stadium ein hohes Risiko für das Voranschreiten der Erkrankung, einhergehend mit einer reduzierten Gesamt-Überlebenszeit (LINDAHL et al., 2018). Außerdem konnte anhand von miRNA-Expressionsmustern aus peripheren mononukleären Blutzellen abgeschätzt werden, inwiefern MF-Patienten auf die Therapie mit extrakorporaler Photopherese ansprechen. Dabei zeigten Patienten mit raschem Anstieg (drei Monate post Therapie) der Expression der miRNAs miR-223, miR-191 und miR-342 ein besseres Ansprechen auf die Therapie (MCGIRT et al., 2015). Des Weiteren waren miR-125b mit einer gesteigerten Tumorzell-Resistenz und einem verstärkten Tumorwachstum sowie miR-122 mit einem reduzierten Ansprechen der Tumorzellen auf die Chemotherapie verbunden (MANFÈ et al., 2012; MANFÈ et al., 2013). Da die detektierten miRNA-Biomarker auch einen funktionellen Einfluss auf die Tumorpathologie zu haben scheinen, könnten sie als relevante Ziele zukünftiger individueller Therapiestrategien infrage kommen (GLUUD et al., 2020).

## **2.8. Veränderte miRNA-Expression bei kaninen Lymphomen**

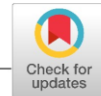
Bislang existieren lediglich vereinzelte Berichte zum miRNA-Expressionsmuster bei kaninen Lymphomen. Im Jahr 2010 wurde die miRNA-Expression bei Hunden erstmals untersucht, wobei Lymphknoten-Proben von gesunden Tieren mit B- und T-Zell-Lymphom-Fällen verglichen wurden. Die Expression unterschied sich sowohl zwischen gesunden Tieren und Lymphom-Fällen als auch zwischen den B- und T-Zell-Lymphomen. Im T-Zell-Lymphom (verglichen zum B-Zell-Lymphom) waren miR-181 deutlich überexprimiert und miR-29 signifikant herunterreguliert. Des Weiteren wies dieses Forschungsprojekt übereinstimmende Ergebnisse bei der Verwendung von zwei verschiedenen Probenmaterialien nach: frisch gefrorene sowie FFPE Proben des Lymphknotens. In dieser Studie fiel kein signifikanter miRNA-Expressionsunterschied durch den Vergleich von Low-grade- und High-

grade-Lymphomen auf (MORTARINO et al., 2010). Im Gegensatz dazu konnten bei FFPE-Proben primärer kaniner Milzlymphome abweichende miRNA-Expressionen in Abhängigkeit vom Grad der Erkrankung festgestellt werden. Während gemäß der WHO als low-grade klassifizierte Lymphome reduzierte miR-155-Spiegel vorwiesen, war miR-17-5p bei Medium-/High-grade-Lymphomen erhöht, sodass das miR-17-5p/miR-155-Verhältnis als neuer Gradierungsmarker für Milzlymphome vorgeschlagen wurde (ALBONICO et al., 2013). Uhl et al. verglichen die miRNA-Expression aus Lymphknotenmaterial von B- und T-Zell-Lymphom-Fällen sowie von kaninen B- und T-Zell-Lymphom-Zelllinien mit peripheren mononukleären Zellen und Lymphknoten gesunder Tiere. Beobachtet wurde eine Hochregulierung der onkogenen miRNAs miR-19a+b und miR-17-5p sowie eine reduzierte Expression der tumorsuppressiven miRNAs miR-203, miR-218 und miR-181 (UHL et al., 2011). Die Expression zirkulierender miRNAs wurde aus dem Serum von an Lymphomen erkrankten sowie gesunden Hunden verglichen, wobei die Lymphomproben im Vergleich zu den gesunden Kontrollen niedrigere Expressionen der miRNAs let-7b, miR-223, miR-25 und miR-92a sowie eine Hochregulation von miR-423a zeigten. Diese Studie klassifizierte die Lymphomfälle nach Schweregrad und anatomischer Form, doch der B-/T-Zell-Immunphänotyp wurde nicht berücksichtigt (FUJIWARA-IGARASHI et al., 2015). Beim multizentrischen Lymphom des Hundes wurde der Nachweis einer Leberbeteiligung aus Serumproben anhand des signifikanten neunfachen miR-122-Anstiegs im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beschrieben (RAMADAN et al., 2019). Eine umfangreiche Studie aus dem Jahr 2019 bestätigte die miRNA-Dysregulierung bei Hunden mit multizentrischen B- und T-Zell-Lymphomen im Plasma und in Lymphknotenaspiraten. Die Expressionsmuster unterschieden sich deutlich zwischen dem B- und dem T-Zell-Immunphänotyp, und das T-Zell-Lymphom zeigte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorheriger Studien eine erhöhte Expression der miR-181-Familie. Die Expressionen zwischen Lymphknoten- und den entsprechenden Plasmaproben wurden verglichen und wiesen bei der gesunden Kontrollgruppe lediglich eine verändert exprimierte miRNA nach, wohingegen bei der Lymphomgruppe einige miRNAs zwischen den beiden Gewebearten anders exprimiert wurden. Die Autoren schlussfolgerten, dass die verstärkte miRNA-Produktion und -Freisetzung aus neoplastisch veränderten Lymphknoten durch entsprechend veränderte miRNA-Konzentrationen im Plasma wiedergespiegelt werden und folglich einen potentiellen diagnostischen Nutzen als

zirkulierende Biomarker darstellen (CRAIG et al., 2019). Abschließend konnte die vergleichende miRNA-Expressionsanalyse aus FFPE-Lymphknoten von Hunden mit diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen und gesunden Tieren eine verminderte Expression von miR-155 und der let-7 Familie sowie eine verstärkte Expression von miR-34a nachweisen. Durch Kombination der Expressionslevel von miR-34a und let-7f oder aber auch let-7b und let-7f konnten Tumorproben und Kontrollen zu 100 % differenziert werden. Let-7f alleine konnte zu 97 % zwischen den beiden Entitäten unterscheiden (ELSHAFIE et al., 2021).

## III. PUBLIKATION

Received: 26 April 2019 | Revised: 20 January 2020 | Accepted: 21 January 2020  
 DOI: 10.1111/vco.12570



### ORIGINAL ARTICLE

Veterinary and Comparative Oncology | WILEY

# Tumour-specific microRNA expression pattern in canine intestinal T-cell-lymphomas

Diana Joos<sup>1</sup> | Miriam Leipzig-Rudolph<sup>2,3</sup> | Karin Weber<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

<sup>2</sup>Specialty Practice for Veterinary Pathology von Bomhard and Pflegehaar, Munich, Germany

<sup>3</sup>Institute of Veterinary Pathology at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

#### Correspondence

Dr Karin Weber, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, 80539 München, Germany.  
 Email: karin.weber@lmu.de

#### Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: 399128212

#### Abstract

Intestinal T-cell lymphomas are common in dogs, but histopathological diagnosis remains challenging because of accompanying enteritis with lymphocyte involvement. Invasively taken full-layer biopsies are still required for reliable differentiation. The detection of specific microRNA expression patterns in canine intestinal T-cell lymphoma could provide new possibilities to differ intestinal lymphoma from benign inflammation and could lead to further understanding of lymphomagenesis. The objective of this study was to characterize microRNA expression in distinct groups of formalin-fixed and paraffin-embedded samples from canine intestinal T-cell lymphomas, lymphoplasmacellular enteritis and healthy intestinal tissue. In a preliminary test with two samples per group, total RNA was extracted (RNEasy FFPE Kit, Qiagen), reverse transcribed (miScript II RT Kit, Qiagen) and pre-amplified (miScript PreAmp PCR Kit, Qiagen). We performed comparative quantitative PCR on microRNA PCR Array plates (Qiagen) with pre-fabricated reactions for 183 different mature canine microRNAs. Subsequently, 12 microRNAs with conspicuous expression changes in the lymphoma group were selected and microRNA expression of all samples (n = 8) per group was analysed with individual microRNA assays (miScript Primer Assays, Qiagen) on the reverse transcribed RNA without pre-amplification. Our results revealed lymphoma-specific expression patterns, with down-regulation of the tumour-suppressing microRNAs miR-194, miR-192, miR-141 and miR-203, and up-regulation of oncogenic microRNAs, including microRNAs from the miR-106a~363 cluster. In addition, we detected only slight expression alterations between healthy intestinal tissue and lymphoplasmacellular enteritis cases. We conclude that microRNA expression patterns can be used to separate T-cell lymphomas from healthy tissue and benign inflammatory disorders.

#### KEYWORDS

dog, lymphoma, microRNA, reverse transcriptase polymerase chain reaction

## 1 | INTRODUCTION

Malignant lymphoma is one of the most frequent canine malignancies, with an increasing age-adjusted occurrence up to 107 cases per

100 000 dogs annually.<sup>1</sup> Following multi-centric lymphoma, gastrointestinal lymphoma represents the second commonest lymphoma form, accounting for approximately 5 to 7% of all canine lymphoma cases.<sup>2</sup> The most commonly affected anatomic location is the small intestine,

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Veterinary and Comparative Oncology* published by John Wiley & Sons Ltd.

and neoplastic cells show pre-dominantly T-cell origin.<sup>3,4</sup> In comparison to the multi-centric form, the prognosis of intestinal lymphoma is poor, with median survival times of 13 to 77 days despite multi-agent chemotherapy and/or surgical intervention.<sup>5,6</sup> The definite diagnosis of canine intestinal lymphoma remains challenging, since the neoplastic lymphomatous lesions are often masked by concomitant benign inflammatory reactions in the mucosa, especially lymphoplasmacellular enteritis (LE).<sup>2</sup> To achieve accurate results, a stepwise diagnostic approach using full-thickness biopsies beginning with morphological examination, followed by immunophenotyping and determining the Ki67 index and finally PCR for antigen receptor gene rearrangement analysis (PARR) to characterize clonality, is recommended.<sup>7</sup>

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small (~22 nucleotides), single-stranded, non-coding RNA molecules found in almost all eukaryotic cells, which post-transcriptionally regulate protein synthesis by base pairing to partially complementary sequences in the 3' untranslated regions (UTRs) of target mRNAs.<sup>8-10</sup> MiRNAs influence a variety of cell signalling pathways and can act either as oncogenes or as tumour suppressors.<sup>11,12</sup> More than 50% of miRNA genes are located in cancer-associated genomic regions or in fragile sites.<sup>13</sup>

In humans, miRNA expression in B-cell lymphomas has been studied extensively, but less is known about miRNA expression in T-cell lymphomas.<sup>14,15</sup> In a study analysing human cutaneous T-cell lymphomas, miRNA expression patterns differed significantly from both benign inflammatory skin diseases and normal skin. A diagnostic accuracy of over 95% in the differentiation benign/malignant was achieved using a set of only three differentially expressed miRNAs (miR-155, miR-203, miR-205).<sup>16</sup> The progression of an early stage of mycosis fungoides to advanced cutaneous T-cell lymphoma appears to be accompanied by the overexpression of several oncogenic miRNA clusters, indicating miRNA profiling might be helpful for both diagnosis and risk prediction in cancer.<sup>17</sup> Overexpression of the miR-106a~363 cluster in human T-cell lymphomas was described in 2007, and the oncogenic potential was proven in a transgenic mouse model, where forced overexpression induced T-cell lymphoma.<sup>18,19</sup>

Few studies have investigated miRNA expression patterns in canine lymphoma. In non-neoplastic lymph nodes and in lymph nodes of lymphoma cases, the expression of a small miRNA-panel was analysed and compared. The expression patterns of B- and T-cell lymphomas were different from normal tissue and from each other.<sup>20</sup> In primary canine splenic lymphoma, the miR-17-5p/miR-155 M ratio was investigated as a potential new marker for grading.<sup>21</sup> Another study investigated the miRNA expression in lymph nodes of lymphoma cases and canine B- and T-cell lymphoma cell lines and revealed an increased expression of oncogenic miRNAs and down-regulation of known tumour-suppressing miRNAs compared with non-neoplastic lymph nodes.<sup>22</sup> A recent study determined the profile of circulating miRNAs in serum samples from dogs with and without lymphoma. The sample set included dogs with several different anatomic forms of lymphoma, and the immunophenotype (B-cell or T-cell lymphoma) was not assessed. Several miRNAs were found to be differentially expressed in the lymphoma group compared with the healthy group.<sup>23</sup> To the best of our

knowledge, no studies on miRNA expression in canine intestinal T-cell lymphoma have been reported to date.

The purpose of our study was to characterize miRNA expression in well-defined groups of FFPE samples from canine intestinal T-cell lymphomas, lymphoplasmacellular enteritis and healthy intestinal tissue. Using canine-specific miRNA-arrays and assays, we could detect lymphoma-specific expression patterns, with marked down-regulation of tumour-suppressing miRNAs and up-regulation of oncogenic miRNAs, including miRNAs from the miR-106a~363 cluster.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Ethic statement

The study was approved by the XXX Committee on Research Ethics (Number: 58-23-10-2015).

### 2.2 | Sample collection

Formalin-fixed, paraffin-embedded full-thickness tissue specimens of canine small intestine that had been taken for diagnostic purposes were used for this study. All samples were analysed by histopathological examination by certified veterinary pathologists. The samples were classified in three groups (n = 8 each): healthy control group (C), lymphoplasmacellular enteritis (LE) and intestinal T-cell lymphoma (T) (Table 1). The final diagnosis T-cell lymphoma had been confirmed in an earlier study via a combination of histopathological examination, immunohistochemistry using CD3, CD20 and CD79a antibody staining and polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis (PARR).<sup>4</sup> Two tumour samples showed large nuclei and high-grade mitosis, two samples showed large nuclei and intermediate grade mitosis, one sample showed large nuclei and low-grade mitosis and three samples showed intermediate nucleus size and high-grade mitosis. Two cases of LE were also confirmed by immunohistochemistry staining and PARR, the remaining LE cases were diagnosed by histopathological examination only.

### 2.3 | MicroRNA expression analysis

#### 2.3.1 | RNA extraction

Total RNA including microRNA was isolated from two to four 10 µm thick tissue sections using the miRNEasy FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The sections were treated with Deparaffinization Solution (QIAGEN), and RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Total RNA was eluted with 30 µL of RNase-free water. RNA concentration was determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware).

**TABLE 1** Details of the patient groups

T-cell lymphoma (n = 8)	
Age	Median, 8.1 years; range, 5-11 years
Sex	Male, 5; female, 3 (spayed 1)
Breed	6 pure breeds (Golden Retriever, Bernese Mountain Dog, Poodle, Yorkshire Terrier, Belgian Shepherd, Maltese); 1 mixed breed; 1 not specified
Lymphoplasmacellular enteritis (n = 8)	
Age	Median, 7.1 years; range, 1-12 years
Sex	Male, 4 (castrated 2); female, 4 (spayed 3)
Breed	4 pure breeds (Yorkshire Terrier, Magyar Vizsla, Labrador Retriever, Coton de Tulear); 4 mixed breeds
Healthy control (n = 8)	
Age	Median, 7.7 years; range, 6 weeks-12 years
Sex	Male, 3; female, 5 (spayed 3)
Breed	7 pure breeds (Dachshund, Yorkshire Terrier, Golden Retriever, Entlebucher Mountain Dog, Austrian Black and Tan Hound, German Shepherd, White Shepherd); 1 not specified

Note: Characteristics of the dogs in the T-cell lymphoma group (n = 8), lymphoplasmacellular enteritis group (n = 8) and healthy control group (n = 8) used in the study.

### 2.3.2 | Expression analysis using microRNA arrays

As a preliminary test, microRNA expression was analysed in two samples of each group on custom-made microRNA arrays (384-well plate, QIAGEN) containing 183 different mature canine microRNAs, four expression controls (SNORD 61, SNORD 68, SNORD 95 and RNU6-6P), one reverse transcription control and one PCR control for each sample. Total RNA (100 ng) was reverse transcribed using the miScript II RT Kit (QIAGEN). The cDNA was pre-amplified using the miScript PreAmp PCR Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions on a Mastercycler (ependorf AG, Hamburg, Germany) with a miScript PreAmp universal primer and a custom miScript PreAmp primer mix. The pre-amplified cDNA was diluted with 100  $\mu$ L RNase-free water.

The array plates were run on a 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ABI PRISM, Foster City, California) using the miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) with a reaction volume of 10  $\mu$ L per well. The amplification protocol consisted of an initial activation step at 95°C for 15 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 15 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds and extension at 70°C for 30 seconds. In order to account for spurious PCR amplification of contaminating genomic DNA, a control containing total RNA without reverse transcription was included. The plates were inspected by melting curve analysis after amplification to confirm a single PCR product in each well. Relative quantification was carried out using the miScript miRNA PCR Array Data Analysis software (Qiagen) using three different normalization methods (normalization with SNORD95 and RNU6-6P, normalization using the global Ct mean of all expressed miRNAs, and normalization using four miRNAs cfa-miR-631/cfa-miR-23b/cfa-miR-320/cfa-miR-125a automatically selected by the software).

### 2.3.3 | Expression analysis using microRNA assays

Based on the expression results of the microRNA arrays, 12 canine microRNA assays and two microRNA control assays were selected, and microRNA expression was analysed on all samples of the C, LE and T group (n = 8 each). RNA extraction was carried out as described for the arrays.

Reverse transcription was performed using the miScript II RT Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions with 1700 ng total RNA per sample. The cDNA was diluted 1:25 with RNase-free water, and the samples were analysed by real-time PCR without pre-amplification.

Real-time PCR was run on a QuantStudio 6 Flex System (Applied Biosystems) using the miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) with an universal primer (QIAGEN) and specific miScript Primer Assays (QIAGEN). The assays hs\_RNU\_6-2 and hs\_SNORD95 were used as endogenous control assays. As target assays, cf\_miR-194, cf\_miR-18b, cf\_miR-203, cf\_miR-141, cf\_miR-20b, cf\_miR-192, cf\_miR-210, cf\_miR-363, cf\_miR-34a, cf\_miR-9, cf\_miR-142, cf\_miR-130b and cf\_miR-19a were selected. All samples were run as duplicates in a reaction volume of 10  $\mu$ L, containing 5  $\mu$ L QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1  $\mu$ L miScript Universal Primer, 1  $\mu$ L miScript Primer Assay, 2  $\mu$ L RNase-free water and 1  $\mu$ L of the diluted RT reaction. The amplification protocol was run as described for the arrays. In order to account for spurious PCR amplification of contaminating genomic DNA, a control containing total RNA without reverse transcription was included. The plates were inspected by melting curve analysis after amplification to confirm a single PCR product in each well. Relative quantification was carried out using the miScript miRNA PCR Array Data Analysis software (Qiagen) with SNORD95 and RNU6 2 as endogenous controls.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | MiRNA expression profiling using MiRNA Arrays

Expression of miRNAs was measured in two samples per group (Healthy intestinal tissue, T-cell lymphoma and lymphoplasmacellular enteritis) using custom-made miRNA arrays. From the 183 mature canine miRNAs tested, quality control showed that few (0.5-3%) miRNAs were not expressed or below threshold, 3% to 22% were expressed with Ct values between 25% and 30%, and 75% and 91% were expressed with Ct values < 25. The expression results of the arrays are shown in Supplementary Table S1. A large number of miRNAs (> 50%) were differentially expressed more than 2-fold between control tissue and both the lymphoma and enteritis group. For further analysis, 12 miRNAs were selected using the criteria overall expression (Ct values < 25), high differential expression between groups, and available information on possible functional roles in lymphoma pathophysiology.

Table 2 shows the expression differences of 12 selected miRNAs on the arrays when using different normalization strategies. While the

**TABLE 2** Expression differences in the arrays T-cell lymphoma vs healthy using different normalization methods

miRNA	RNU6B/ SNORD95	Global Ct mean	Automatically selected
cfa-miR-194	-81.0	-44.0	-19.4
cfa-miR-192	-101.5	-55.1	-24.3
cfa-miR-141	-52.9	-28.8	-12.7
cfa-miR-203	-42.3	-23.0	-11.1
cfa-miR-19a	1.3	2.4	5.5
cfa-miR-34a	-2.5	-1.4	1.68
cfa-miR-142	5.7	10.5	23.9
cfa-miR-130b	3.7	6.8	15.4
cfa-miR-9	2.7	5.0	11.4
cfa-mir-363	22.3	41.9	93.3
cfa-miR-20b	10.6	19.6	44.4
cfa-miR-18b	41.2	75.8	172.3

Note: Three different normalization methods were applied to the miRNA expression arrays. The fold regulation of 12 selected miRNAs is shown for a comparison T-cell lymphoma vs healthy control for normalization with RNU6B and SNORD95, for normalization using the Global Ct mean of all expressed miRNAs, and for normalization using four miRNAs automatically selected by the software.

expression changes differ in absolute numbers, the trends for up- or down-regulation are concordant regardless of the normalization method.

### 3.2 | MiRNA expression profiling using miRNA assays

Expression of the 12 selected miRNAs was tested on all samples (n = 8 per group) with individual miRNA assays. The expression

changes between healthy intestinal tissue and lymphoplasmacellular enteritis cases were not statistically significant when tested with individual assays (all *P*-values > .05). The expression changes between normal intestinal tissue and T-cell lymphoma cases (down- or up-regulation) could be confirmed and were statistically significant in 11 miRNAs. The expression changes between lymphoplasmacellular enteritis cases and tumour tissue were similar to the comparison healthy intestinal tissue vs tumour tissue and statistically significant in six miRNA assays (Table 3). Hierarchical cluster analysis using the expression results of the 12 selected miRNAs separated a group of 7 T-cell lymphoma cases from the other samples, while samples of healthy intestinal tissue and lymphoplasmacellular enteritis could not be discriminated by this method (Figure 1).

## 4 | DISCUSSION

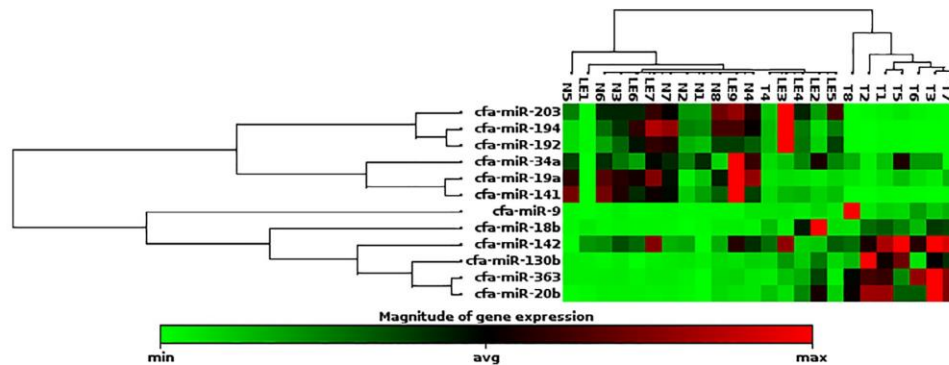
This study provides the first overview of miRNA expression patterns of FFPE samples from intestinal T-cell lymphoma, lymphoplasmacellular enteritis and healthy enteric tissue in dogs. The initial screening with arrays for canine miRNA revealed high amounts of detectable miRNAs in canine enteric tissue and differences in miRNA expression levels between healthy control tissue, tissue from dogs with lymphoplasmacellular enteritis, and neoplastic tissue. Since different normalization methods can affect the expression results considerably, we used three normalization methods on the miRNA arrays. For the selected miRNAs, the results were concordant for up- and down-regulation regardless of the normalization method. This finding is in agreement with a study on miRNA expression in samples from colorectal cancer, which showed that highly differentially expressed miRNAs can be detected using different reference genes or combinations of reference genes.<sup>24</sup>

**TABLE 3** miRNA expression analysis

miRNA	T-cell lymphoma vs healthy			Enteritis vs healthy			T-cell lymphoma vs enteritis		
	Array	Assay	<i>P</i> value assay	Array	Assay	<i>P</i> value assay	Array	Assay	<i>P</i> value assay
cfa-miR-194	-81.0	-95.7	.0006	-5.9	-1.3	.7009	-19.9	-72.6	.0045
cfa-miR-192	-101.5	-64.1	.0012	-4.9	1.1	.2834	-28.9	-72.2	.0039
cfa-miR-141	-52.9	-56.8	.0002	-4.3	-2.5	.3861	-17.1	-22.9	.0270
cfa-miR-203	-42.3	-19.0	.0001	-3.8	-1.1	.4599	-15.7	-17.1	.0008
cfa-miR-19a	1.3	-4.9	.0009	6.7	-2.5	.4004	-7.2	-2.0	.0941
cfa-miR-34a	-2.5	-2.5	.0383	-8.1	-1.3	.9907	2.4	-1.9	.1660
cfa-miR-142	5.7	3.1	.0008	-1.1	1.8	.0822	4.6	1.7	.0622
cfa-miR-130b	3.7	4.4	.0057	-2.5	1.4	.1524	6.5	3.2	.0163
cfa-miR-9	2.7	6.7	.1118	-8.9	1.1	.3063	17.3	5.9	.1319
cfa-mir-363	22.3	9.0	.0003	-1.6	1.8	.1155	24.9	4.9	.0016
cfa-miR-20b	10.6	10.3	.0002	-2.9	2.0	.1374	22.1	5.1	.0032
cfa-miR-18b	41.2	13.6	.0002	1.4	4.6	.1476	21.0	2.9	.7950

Note: Fold regulation of 12 selected miRNAs in T-cell lymphoma compared with healthy intestinal tissue, lymphoplasmacellular enteritis compared with healthy intestinal tissue and T-cell lymphoma compared with lymphoplasmacellular enteritis using miRNA arrays (n = 2 samples per group) and miRNA assays (n = 8 samples per group). *P*-values < .05 were considered significant.





**FIGURE 1** Cluster analysis. The colour intensity from green to red shows the degree of down-regulation (green) to up-regulation (red) compared with the other samples. A group of seven T-cell lymphoma cases (T) clusters on the right side, while nearly all samples of the lymphoplasmacellular enteritis group (LE) as well as the healthy control group (N) cluster on the left side. MiRNAs with tumour suppressor function like miR-194, miR-192, miR-141 and miR-203 show low expression levels in T-cell lymphoma samples, whereas miRNA-18b, miR-20b and miR-363, which belong to the oncogenic cluster miR-106a~363, are strongly expressed in the tumour group

In a subsequent test with larger sample groups, the expression of several individual miRNAs was found to be significantly different in a group of canine intestinal T-cell lymphomas. In comparison to the other two groups, up-regulation of the miRNAs miR-18b, miR-20b and miR-363 combined with decreased expression of miR-194, miR-192, miR-141 and miR-203 was observed.

So far, there is only limited knowledge about miRNA expression patterns in canine lymphoma and existing studies mainly focused on their diagnostic applicability. In 2010, the expression of a small group of 11 miRNAs was quantified and compared between non-neoplastic lymph nodes and lymphoma samples from FFPE and fresh-frozen tissue.<sup>20</sup> The results of the fresh-frozen samples were consistent with those of the FFPE samples, which suggests that our findings obtained from archive material are transferable to freshly obtained samples. In the lymph node samples of canine T-cell lymphomas, miR-181a was significantly elevated and miR-29b significantly decreased compared with healthy lymph nodes.<sup>20</sup> In our study, both miRNAs showed no expression differences in any of the groups. Possible explanations for discrepancies among several expression analyses are biological variations between lymphoma sub-types, the usage of different assays (human MicroRNA Taqman assay or SYBR Green based assay) contributing to experimental bias, or the selected type of normalization.<sup>22,25,26</sup>

Another miRNA expression analysis in lymphoma diseased lymph nodes (B- and T-cell lymphomas) of dogs detected increased amounts of oncogenic miRNAs and down-regulation of tumour-suppressing miRNAs compared with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and healthy lymph nodes. In comparison to healthy lymph nodes, the miRNAs miR-106a, miR-17-5p and miR-20a showed an augmented expression in canine T-cell lymphoma samples.<sup>22</sup> For miR-106a, we found a slightly increased expression in our lymphoma samples, and a distinctively higher expression of the miRNAs miR-18b, miR-20b and miR-363. The miRNAs miR-106a, miR-18b, miR-20b and miR-363 are encoded within the miR-106a~363 polycistronic cluster, consisting of 6 adjacent miRNAs located on chromosome X in mice and humans.<sup>27</sup>

Pronocogenic effects have been reported for the miR-106a~363 cluster and its two paralogs miR-17~92 and miR-106b~25 in a variety of tumours, indicating their critical role in carcinogenesis.<sup>27</sup> Correspondingly, miR-106a~363 overexpression was detected in 46% of human T-cell leukemias, comparing blood and marrow samples from acute and chronic T-leukaemia cases to healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMC).<sup>19</sup> A further study compared FFPE samples from healthy lymph nodes with samples from human anaplastic large cell lymphomas, an aggressive T-cell lymphoma, revealing high expression levels of miR-20b and miR-106a.<sup>28</sup> Moreover forced expression of the miR-106a~363 cluster during thymocyte maturation led to the formation of severe T-cell lymphomas in transgenically modified mice.<sup>18</sup> Furthermore, small RNA sequencing of bone marrow from human T-cell acute lymphoblastic leukaemia patients compared with healthy controls, revealed overexpression of three miRNAs of the miR-106a~363 cluster, for which an oncogenic effect by inhibition of apoptotic gene targets was demonstrated.<sup>29</sup> Taken together, our findings of miR-106a~363 deregulation in FFPE samples from canine intestinal T-cell lymphomas agree with similar investigations in humans and mice, which highlights the possibility for cross-species regulatory pathways of miRNAs in T-cell lymphomas.

For miR-194 and miR-192, which belong to the related miRNA clusters miR-194-2~miR-192 and miR-194-1~miR-215, down-regulation and convergent tumour suppressive effects in human malignancies such as colorectal cancer, renal cell carcinoma and multiple myeloma have been reported.<sup>30-32</sup> In addition, lower miR-194 and miR-192 expression levels in peripheral blood or bone marrow samples of human acute lymphoblastic leukaemia, compared with healthy controls, were described,<sup>33</sup> and a tumour suppressive function through cell cycle interference was successfully demonstrated for miR-192 in an acute lymphoblastic leukaemia cell line.<sup>34</sup> Likewise, decreased miR-192 levels in marrow samples from patients with acute myeloid leukaemia compared with healthy controls, as well as miR-192 dependent tumour suppressive cell cycle regulation in two acute

myeloid leukaemia cell lines have been observed.<sup>35</sup> In line with these findings, our analysis also showed miR-192 and miR-194 down-regulation in the malignant tissue compared with the other two groups. Although miR-215 was not tested with a singleplex assay, it shows a very low expression compared with the two other groups in the arrays. This is in line with the down-regulation of miR-192 and miR-194, since these three miRNAs were found to have common targets and form a network of tumour suppressors.<sup>31,36,37</sup> To the best of our knowledge, studies on the functional role of these miRNAs in dogs have not been published to date.

The miR-141 down-regulation found in the tumour group in our study shows parallels to an investigation in humans, which revealed significantly decreased miR-141 expression levels in cutaneous T-cell lymphomas compared with inflammatory skin diseases via microarray profiling in skin biopsies.<sup>38</sup> A tumour suppressive function was demonstrated for miR-141 in hepatocellular carcinoma cells, preventing tumour cell invasion and migration by targeting the T lymphoma invasion and metastasis (Tiam1) gene.<sup>39</sup>

A tumour suppressive function has been shown for miR-203 in human haematopoietic malignancies, where a loss of its expression leads to up-regulation of the oncogene ABL-1.<sup>40</sup> MiR-203 inactivation may be because of both genetic and epigenetic mechanisms and epigenetic silencing more frequently occurs in lymphoid than myeloid malignancies.<sup>40,41</sup> Similar to our findings, a significantly decreased miR-203 expression in FFPE samples from human cutaneous T-cell lymphomas compared with benign skin disorders and healthy skin, was reported. Besides miR-203, miR-205 levels were also considerably decreased in the neoplastic samples compared with benign diseases.<sup>16</sup> However, miR-205 showed no conspicuous expression changes between the different groups in our study.

The significance of our results was limited because of the small number of samples and the use of archive material, although the results obtained from FFPE samples and freshly frozen tissue should match well.<sup>20</sup> Since we did not excise the tumour region from the slides for analysis the miRNA expression represents a mixture of tissues, which might dilute tumour specific changes. Inflammatory processes in both enteritis and tumour samples might lead to concordant shifts in some miRNAs. Tumour sample T4 shows a miRNA expression pattern that is quite different to the other tumour samples. The histological pattern of this tumour shows a low mitose rate, but large nuclei. Information about any pre-treatment or treatment of the animals and of the aggressiveness and clinical behaviour of the tumours is lacking, which adds to the variability of the results, and the reason for the different expression pattern remains elusive. Since we focused on highly differentially expressed miRNAs, miRNAs with medium and small differences were not analysed, but could also have important biological effects in this tumour entity.

Taken together, our study revealed a distinct miRNA expression pattern in canine intestinal T-cell lymphoma. In particular, the increased expression of the oncogenic miRNAs miR-18b, miR-20b and miR-363 and down-regulation of the tumour suppressive miRNAs miR-192, miR-194, miR-141 and miR-203 was noted. The spontaneously developing tumours of the dog may serve as an additional model

for the role of miRNAs in tumour pathophysiology and as diagnostic biomarkers, or can even be used to test the effectiveness of miRNA-based tumour therapeutics, which may benefit both dogs and humans.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—399128212.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### ORCID

Karin Weber  <https://orcid.org/0000-0002-0541-4355>

#### REFERENCES

- Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract.* 2002;43(6):240-246.
- Couto CG, Rutgers HC, Sherding RG, Rojko J. Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *J Vet Intern Med/Am Coll Vet Intern Med.* 1989;3(2):73-78.
- Coyle KA, Steinberg H. Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol.* 2004;41(2):141-146.
- Ohmura S, Leipig M, Schopper I, et al. Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs. *Vet Comp Oncol.* 2017;15(1):194-207.
- Frank JD, Reimer SB, Kass PH, Kiupel M. Clinical outcomes of 30 cases (1997-2004) of canine gastrointestinal lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2007;43(6):313-321.
- Rassnick KM, Moore AS, Collister KE, et al. Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. *J Vet Intern Med/Am Coll Vet Intern Med.* 2009;23(2):317-322.
- Carrasco V, Rodríguez-Bertos A, Rodríguez-Franco F, et al. Distinguishing intestinal lymphoma from inflammatory bowel disease in canine duodenal endoscopic biopsy samples. *Vet Pathol.* 2015;52(4):668-675.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-233.
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell.* 2008;132(1):9-14.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:351-379.
- Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis.* 2012;33(6):1126-1133.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2999-3004.
- Ikeda S, Tagawa H. Dysregulation of microRNAs and their association in the pathogenesis of T-cell lymphoma/leukemias. *Int J Hematol.* 2014;99(5):542-552.
- Fernandez-Mercado M, Manterola L, Lawrie CH. MicroRNAs in lymphoma: regulatory role and biomarker potential. *Curr Genomics.* 2015; 16(5):349-358.

16. Ralfkiaer U, Hagedorn PH, Bangsgaard N, et al. Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2011;118(22):5891-5900.
17. Ralfkiaer U, Lindahl LM, Litman T, et al. MicroRNA expression in early mycosis fungoides is distinctly different from atopic dermatitis and advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Anticancer Res*. 2014;34(12):7207-7217.
18. Koppers DA, Schmitt TM, Hwang HC, Samraj L, Clurman BE, Fero ML. The miR-106a-363Xpcl1 miRNA cluster induces murine T cell lymphoma despite transcriptional activation of the p27Kip1 cell cycle inhibitor. *Oncotarget*. 2017;8(31):50680-50691.
19. Landais S, Landry S, Legault P, Rassart E. Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its implication in human T-cell leukemia. *Cancer Res*. 2007;67(12):5699-5707.
20. Mortarino M, Gioia G, Gelain ME, et al. Identification of suitable endogenous controls and differentially expressed microRNAs in canine fresh-frozen and FFPE lymphoma samples. *Leuk Res*. 2010;34(8):1070-1077.
21. Albonico F, Mortarino M, Avallone G, Gioia G, Comazzi S, Roccabianca P. The expression ratio of miR-17-5p and miR-155 correlates with grading in canine splenic lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013;155(1-2):117-123.
22. Uhl E, Krimer P, Schliekelman P, Tompkins SM, Suter S. Identification of altered MicroRNA expression in canine lymphoid cell lines and cases of B- and T-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50(11):950-967.
23. Fujiwara-Igarashi A, Igarashi H, Mizutani N, et al. Expression profile of circulating serum microRNAs in dogs with lymphoma. *Vet J*. 2015;205(2):317-321.
24. Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin MJ, Miller N. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:173.
25. Robertus JL, Kluiver J, Weggemans C, et al. MiRNA profiling in B non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma. *Br J Haematol*. 2010;149(6):896-899.
26. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods (San Diego, Calif)*. 2010;50(4):244-249.
27. Khuu C, Utheim TP, Sehic A. The three paralogous microRNA clusters in development and disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. *Scientifica*. 2016;2016:1379643.
28. Merkel O, Hamacher F, Laimer D, et al. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16228-16233.
29. Dawidowska M, Jaksik R, Drobna M, et al. Comprehensive investigation of miRNome identifies novel candidate miRNA-mRNA interactions implicated in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasia (New York, NY)*. 2019;21(3):294-310.
30. Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, et al. p53-Responsive micromRNAs 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Research*. 2008;68(24):10094-10104.
31. Khella HW, Bakhet M, Allo G, et al. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2231-2239.
32. Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*. 2010;18(4):367-381.
33. Schotte D, De Menezes RX, Akbari Moqadam F, et al. MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(5):703-711.
34. Sayadi M, Ajdary S, Nadali F, Rostami S, Edalati Fahtabad M. Tumor suppressive function of microRNA-192 in acute lymphoblastic leukemia. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017;17(3):248-254.
35. Ke S, Li RC, Lu J, Meng FK, Feng YK, Fang MH. MicroRNA-192 regulates cell proliferation and cell cycle transition in acute myeloid leukemia via interaction with CCNT2. *Int J Hematol*. 2017;106(2):258-265.
36. Nakaoka T, Saito Y, Shimamoto Y, et al. Cluster microRNAs miR-194 and miR-215 suppress the tumorigenicity of intestinal tumor organoids. *Cancer Sci*. 2017;108(4):678-684.
37. Senanayake U, Das S, Vesely P, et al. miR-192, miR-194, miR-215, miR-200c and miR-141 are downregulated and their common target ACVR2B is strongly expressed in renal childhood neoplasms. *Carcinogenesis*. 2012;33(5):1014-1021.
38. Sandoval J, Diaz-Lagares A, Salgado R, et al. MicroRNA expression profiling and DNA methylation signature for deregulated microRNA in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2015;135(4):1128-1137.
39. Liu Y, Ding Y, Huang J, et al. MiR-141 suppresses the migration and invasion of HCC cells by targeting Tiam1. *PLoS One*. 2014;9(2):e88393.
40. Bueno MJ, Perez de Castro I, Gomez de Cedron M, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell*. 2008;13(6):496-506.
41. Chim CS, Wong KY, Leung CY, et al. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in hematological malignancies. *J Cell Mol Med*. 2011;15(12):2760-2767.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Joos D, Leipzig-Rudolph M, Weber K. Tumour-specific microRNA expression pattern in canine intestinal T-cell-lymphomas. *Vet Comp Oncol*. 2020;1-7. <https://doi.org/10.1111/vco.12570>

## IV. DISKUSSION

Die vorliegende Forschungsarbeit liefert erste Erkenntnisse zu miRNA-Expressionsmustern in FFPE-Proben von intestinalen T-Zell-Lymphomen, lymphoplasmazellulären Enteritiden und gesundem Darmgewebe bei Hunden. Zunächst wurde der Vorversuch mit miRNA-Arrays durchgeführt, die gleichzeitig 183 verschiedene reife kanine miRNAs testen. Hiermit konnte gezeigt werden, dass mithilfe der Extraktion von Gesamt-RNA aus zwei bis vier Paraffinschnitten ausreichende Mengen an miRNA für die weitere Analyse gewonnen werden können. Darüber hinaus unterschieden sich die miRNA-Expressionswerte zwischen gesundem Kontrollgewebe, Gewebe von Hunden mit lymphoplasmazellulärer Enteritis und neoplastischem Gewebe deutlich. Da unterschiedliche Normalisierungsmethoden die Expressionsergebnisse erheblich beeinflussen können, wurden drei Normalisierungsmethoden für die miRNA-Arrays verwendet. Die Richtung der miRNA-Expressionsänderung (Hoch-oder Runterregulierung) stimmte unabhängig von der Normalisierungsmethode überein. Dies deckt sich mit dem Ergebnis einer Untersuchung zur miRNA-Expression in Proben von kolorektalen Tumoren. Demnach waren unter Verwendung verschiedener Referenzgene oder von deren Kombinationen signifikante Expressionsunterschiede von miRNAs nachvollziehbar (CHANG et al., 2010). Im anschließenden Testdurchlauf mit größeren Stichprobengruppen (n = 8) wurde die Expression von zwölf verschiedenen miRNAs mithilfe von miRNA-Assays gemessen. Hierdurch konnte eine signifikant unterschiedliche miRNA-Expression in der Gruppe der T-Zell-Lymphome des Hundedarms nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen war eine Hochregulierung der miRNAs miR-18b, miR-20b und miR-363 in Verbindung mit einer verminderten Expression von miR-194, miR-192, miR-141 und miR-203 zu beobachten.

Nach aktuellem Kenntnisstand liegen lediglich vereinzelte Berichte zur miRNA-Expression von kaninen malignen Lymphomen vor. Drei weitere Forschungsprojekte befassten sich mit der miRNA-Expression des gastrointestinalen Lymphoms (LYNGBY et al., 2022; IRVING et al., 2023; KEHL et al., 2023). Der erste Bericht zur miRNA-Expression bei kaninen malignen Lymphomen stammt aus dem Jahr 2010. Darin wurde die Expression einer kleinen Gruppe von elf miRNAs im Lymphknoten von gesunden Hunden und bei Hunden

mit B- und T-Zell-Lymphomen verglichen. Hierzu wurden zwei verschiedene Probenmaterialien – frisch gefrorenes Material und FFPE-Proben – verwendet, welche übereinstimmende Untersuchungsergebnisse hervorbrachten (MORTARINO et al., 2010). FFPE-Proben bieten den Vorteil, dass sie problemlos über Jahre archiviert werden können, während frisches Gewebe nur selten zur Verfügung steht. Allerdings führt Formalin zur Denaturierung von Nukleinsäuren, weshalb die Verwendung von FFPE-Proben anstelle von frischem Gewebe zur Isolierung und Quantifizierung von miRNAs als umstritten galt. Doch durch die Verwendung eines geeigneten miRNA-Isolierungs- und Normalisierungsprotokolls konnten übereinstimmende miRNA-Quantifizierungen aus frisch gefrorenem und aus FFPE-Probenmaterial erzielt werden (MORTARINO et al., 2010; LEITE et al., 2011; VOJTECHOVA et al., 2017; MALNAR & REŽEN, 2019). Unterschiedliche Fixierungsprotokolle, der Transport und die Transportzeiten zum Labor sowie Archivierungszeiten könnten die Ergebnisse der miRNA-Quantifizierung aus FFPE-Proben ebenfalls verfälschen. Bei der miRNA-Quantifizierung aus FFPE-Darmproben, die bis zu acht Jahre archiviert wurden, waren jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Alter des FFPE-Materials zu beobachten (KEHL et al., 2023). Dies lässt den Rückschluss zu, dass die in der vorliegenden Studie erlangten Ergebnisse aus Archivmaterial des Darms auf frisch gewonnenes Probenmaterial übertragbar sind.

Während der Malignitätsgrad – High-grade- oder Low-grade-Lymphome – bei Mortarino et al. nicht mit einer signifikanten Änderung der miRNA-Expression assoziiert war, zeigten FFPE-Proben primärer kaniner Milzlymphome entsprechend dem Schweregrad der Erkrankung abweichende miRNA-Expressionswerte. Gemäß der WHO als low-grade klassifizierte Lymphome zeigten reduzierte miR-155-Spiegel, während Medium-/High-grade-Lymphome eine erhöhte miR-17-5p-Expression aufwiesen (MORTARINO et al., 2010; ALBONICO et al., 2013). Für das vorliegende Forschungsprojekt wurde Archivmaterial aus einer vorangegangenen Studie verwendet, die keine Einteilung der Tumorproben entsprechend ihres Schweregrads vorgenommen hatte (OHMURA et al., 2017). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorproben auf ihre morphologischen Kriterien hin erneut untersucht. Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden: Zwei Proben zeigten große Zellkerne und hochgradige Mitosen; zwei Proben zeigten große Zellkerne und mittelgradige Mitosen; eine Probe zeigte

große Zellkerne und geringgradige Mitosen; und drei Proben zeigten mittelgroße Zellkerne und hochgradige Mitosen. Folgendermaßen konnten alle Tumorproben entsprechend ihrer Kerngröße im Verhältnis zu den roten Blutkörperchen oder dem Vorliegen hochgradiger Mitosen als Large-cell-Lymphome und somit als High-grade-Lymphome klassifiziert werden (VALLI et al., 2011; NAKASHIMA et al., 2015; MATSUMOTO et al., 2019). Abgesehen von Tumorprobe T4, deren miRNA-Expressionsmuster sich deutlich von dem der anderen Tumorproben unterschied, waren keine Abweichungen der miRNA-Expressionen innerhalb der Gruppe der intestinalen T-Zell-Lymphome zu vermerken. Da ausschließlich High-grade-Lymphome untersucht wurden, war keine Aussage über eine vom Schweregrad abhängige miRNA-Expressionsänderung möglich. Der Grund für die abweichende miRNA-Expression der Probe T4 ist unklar.

Craig et al. führten eine miRNA-Expressionsanalyse mit einer Gruppe von 38 ausgewählten miRNAs in frisch entnommenen und eingefrorenen Lymphknoten aspiraten sowie im Plasma von gesunden Hunden und Hunden mit multizentrischen B- und T-Zell-Lymphomen durch. Verglichen mit gesunden Hunden war in der T-Zell-Lymphomgruppe eine signifikante Hochregulierung der miRNAs miR-130b, miR-181c und miR-182 vermerkbar, wohingegen die miRNAs miR-21, miR-26b, miR-99a, miR-125b, miR-150 und miR-155 deutlich unterexprimiert waren (CRAIG et al., 2019). Übereinstimmend hierzu wurde von einer erhöhten Expression der miRNAs miR-130b, miR-181c und miR-182 in verschiedenen humanen lymphatischen Neoplasien berichtet (STEINHILBER et al., 2015; MALOUF et al., 2021). So war miR-182 in anaplastischen großzelligen Lymphomzellen im Vergleich zu gesunden T-Zellen deutlich überexprimiert (STEINHILBER et al., 2015). Außerdem war miR-130b im Knochenmark von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) verstärkt exprimiert und zeigte im Mäusemodell bei Hemmung von Tumorsuppressor-Genen einen onkogenen Effekt (MALOUF et al., 2021). Ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen von Craig et al. war eine verminderte Expression der tumorsuppressiven miR-150 bei einer Mehrzahl von humanen Lymphomen nachvollziehbar. Da miR-150 in reifen ruhenden B- und T-Lymphozyten von Mäusen nachgewiesen wurde, könnte die reduzierte miR-150-Expression in neoplastisch veränderten Lymphknoten eine Verminderung des Anteils ruhender Lymphozyten widerspiegeln (CRAIG et al., 2019).

Bei den Untersuchungsergebnissen von Craig et al. ist hervorzuheben, dass beim humanen Lymphom als onkogen geltende miRNAs wie miR-21, miR-99a, miR-125b und miR-155 in den T-Zell-Lymphomen des Hundes herunterreguliert waren (LAWRIE, 2013; CHENG et al., 2018). So waren in humanen NK-Lymphomen miR-21 und miR-155 überexprimiert und förderten die Lymphomentstehung durch Dysregulierung des AKT-Signalwegs via Hemmung der Tumorsuppressorgene PTEN und SHIP1 (YAMANAKA et al., 2009). Außerdem ging die Herunterregulierung der onkogenen miRNAs miR-155, miR-130 und miR-21 mit einem reduzierten Wachstum von humanen CTCL-Zellen einher (HAN et al., 2022). Eine Überexpression von miR-125b wurde mit Chromosomenanomalien bei verschiedenen lymphatischen Neoplasien des Menschen in Verbindung gebracht. Ebenso konnte eine ektopische miR-125b-Expression in hämatopoetischen Stammzellen lymphoproliferative Störungen hervorrufen (BOUSQUET et al., 2010). Im peripheren Blut von humanen T-Zell-Lymphomen war die veränderte miR-26b-Expression mit einer erheblichen Dysregulierung von Genen assoziiert, die mit dem Zellzyklus, der Zellproliferation und der Signalübertragung zusammenhängen (SHADABI et al., 2021). Zusammengefasst deutet die im kaninen T-Zell-Lymphom nachgewiesene Herunterregulierung von miRNAs, die in der Humanmedizin als onkogen gelten, darauf hin, dass diese bei Hunden eher als Tumorsuppressoren agieren. In der vorliegenden Studie konnte anhand des Vorversuchs zwar eine verstärkte miR-130b-Expression in der Gruppe der T-Zell-Lymphome nachgewiesen werden, diese war allerdings nicht statistisch signifikant. Ansonsten war in der vorliegenden Arbeit keine Expressionsänderung der von Craig et al. beschriebenen verändert exprimierten miRNAs nachvollziehbar.

Bei der bereits erwähnten Studie von Mortarino et al. unterschied sich die miRNA-Expression sowohl zwischen gesunden und an Lymphomen erkrankten Tieren als auch zwischen dem B- und dem T-Zell-Immunphänotyp innerhalb der Lymphomgruppe. Im Vergleich zu B- waren bei T-Zell-Lymphomen miR-181 deutlich überexprimiert und miR-29 signifikant herunterreguliert (MORTARINO et al., 2010). Uhl et al. verglichen die miRNA-Expression im Lymphknoten von B- und T-Zell-Lymphomen sowie in kaninen B- und T-Zell-Lymphom-Zelllinien mit der Expression im Lymphknoten gesunder Tiere. Dabei wurde eine Hochregulierung der onkogenen miRNAs miR-19a+b und miR-17-5p sowie eine reduzierte Expression der tumorsuppressiven miRNAs miR-203, miR-218 und

miR-181 beobachtet (UHL et al., 2011). Zwischen den verschiedenen Studien zur miRNA-Expression bei Hunden wurden widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der miR-181-Expression im Lymphknoten von T-Zell-Lymphomen des Hundes erlangt. Während Mortarino et al. und Craig et al. von einer verstärkten Expression im Vergleich zu B-Zell-Lymphomen oder zur gesunden Kontrolle berichteten, war die miR-181-Expression bei Uhl et al. gegenüber den gesunden Proben signifikant vermindert (MORTARINO et al., 2010; UHL et al., 2011; CRAIG et al., 2019). Hingegen war in der zugrundeliegenden Studie in keiner der Gruppen eine Expressionsänderung für miR-181 nachweisbar. Die miR-181-Familie gilt als essentiell für die Entwicklung von B- und T-Zellen und ist an der Differenzierung des Thymus beteiligt (DOOLEY et al., 2013). Im peripheren Blut und im Knochenmark von Menschen mit akuter myeloider Leukämie (AML) war die verstärkte miR-181-Expression mit einem spezifischen Tumorphänotyp assoziiert, was einen regulatorischen Einfluss auf die Tumorentwicklung und -differenzierung und somit eine onkogene Wirkung vermuten ließ (DEBERNARDI et al., 2007). Außerdem war miR-181 in verschiedenen Leukämiezelllinien wie auch in zytogenetisch normalen, jedoch auf molekularer Ebene als Hochrisiko (bei Vorliegen folgender Mutationen: FLT3-ITD positiv und/oder NPM1-Wildtyp) eingeschätzten AML-Fällen hochreguliert, und die verstärkte miR-181-Expression war mit einer schlechteren Prognose assoziiert (RAMKISSOON et al., 2006; MARCUCCI et al., 2008; JINLONG et al., 2015). Auf der anderen Seite agierte miR-181 in humanen chronischen lymphozytären Leukämien (CLL) durch Hemmung des Onkogens TCL-1 als Tumorsuppressor (PEKARSKY et al., 2006). Es wird davon ausgegangen, dass diese duale – sowohl onkogene als auch tumorsuppressive – Wirkung auf unterschiedliche Zelltypen mit individuellen Expressionsprofilen und damit mit einer Vielzahl von zu unterdrückenden Zielgenen einhergeht (BARTEL, 2009).

Eine Reihe von Gründen kommt infrage, weshalb die Ergebnisse von miRNA-Expressionsanalysen der vorliegenden Resultate von den verschiedenen bereits existierenden Berichten abweichen. Es wurde nachgewiesen, dass miRNA-Expressionsprofile gewebespezifisch sind. Daher ist bei unterschiedlichen Studien unter Verwendung verschiedener Probenmaterialien (Lymphknoten, Milz, Darm, Plasma, Zelllinien) mit gewissen Abweichungen im miRNA-Expressionsmuster zu rechnen (LUDWIG et al., 2016). Des Weiteren handelte es sich um verschiedene



Lymphom-Subtypen mit unterschiedlich ausgeprägten Schweregraden, die nicht vereinheitlicht zwischen den Studien definiert waren (UHL et al., 2011). Die Verwendung unterschiedlicher miRNA-Assays (humaner MicroRNA-Taqman-Assay oder SYBR-Green-basierter Assay) könnte ebenfalls mit experimentell bedingten Abweichungen einhergehen (BENES & CASTOLDI, 2010). Darüber hinaus müssen die gewonnenen Daten aus der RT-PCR zur Erlangung präziser und reproduzierbarer Ergebnisse im Sinne einer relativen Quantifizierung normalisiert werden. Dadurch werden Faktoren korrigiert, die andernfalls zu einer ungenauen Quantifizierung führen könnten (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; MEYER et al., 2010; SCHWARZENBACH et al., 2015). Zu diesen Faktoren gehören Schwankungen in der Menge der Eingangs-RNA, möglicher RNA-Abbau oder das Vorhandensein von Inhibitoren in den RNA-Proben sowie Unterschiede in der Handhabung der Proben (GINZINGER, 2002). Hierzu stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Derzeit existieren jedoch keine einheitlichen Normalisierungsmethoden für Studien zur miRNA-Quantifizierung (MEYER et al., 2010).

Die Normalisierung wird regelmäßig auf der Grundlage von vordefinierten konstanten endogenen Kontrollen durchgeführt. Hierzu dienen entweder sogenannte Referenz-miRNAs, welche mithilfe von programmierten Algorithmen wie geNorm und NormFinder bestimmt werden. Alternativ können andere kleine und nicht-kodierende RNAs wie kleine nukleäre, kleine nukleoläre RNA oder 5-s-rRNA verwendet werden (PELTIER & LATHAM, 2008; MESTDAGH et al., 2009; PRADERVAND et al., 2009; BENES & CASTOLDI, 2010). Diese kleinen RNA-Moleküle ähneln miRNAs hinsichtlich ihrer RNA-Stabilität und -Größe. Zudem werden sie häufig exprimiert. Obwohl diese Transkripte in einzelnen Analysen eine konstante Expression zeigen, können ihre Expressionsspiegel unter veränderten Versuchsbedingungen sowie durch das Vorliegen verschiedener Erkrankungsformen beeinflusst werden (MAHDIPOUR et al., 2015). Die Verwendung von mehr als einem Referenzgen erhöht die Genauigkeit der Quantifizierung im Vergleich zur Verwendung eines einzigen Referenzgens (VANDESOMPELE et al., 2002). Die kleinen nicht-kodierenden RNA-Gene RNU6A und RNU6B werden am häufigsten angewendet. Es handelt sich jedoch nicht um miRNAs. Folglich spiegeln sie nicht den biochemischen Charakter der miRNA-Moleküle in Bezug auf ihre Transkription, ihre Prozessierung und ihre

gewebsspezifischen Expressionsmuster wider. Hierdurch könnten Sie vor allem bei vorliegenden Krankheitsprozessen fälschlich abweichende miRNA-Expressionsergebnisse herbeiführen (GEE et al., 2011; BENZ et al., 2013). Auch die miRNA miR-16 eignet sich aufgrund ihrer konstanten Expression in verschiedenen Probenmaterialien als Normalisierungsfaktor (MCDERMOTT et al., 2013; MÜLLER et al., 2014). Zudem können synthetische sogenannte „Spike-in“-miRNAs wie die miRNA cel-miR-39 von *C. elegans* zur Normalisierung analysebedingter Schwankungen eingesetzt werden (XU et al., 2014; DONG et al., 2015; WANG et al., 2015).

Für die vorliegende miRNA-Array-Analyse erfolgte die relative Quantifizierung mit der Software miScript miRNA PCR Array Data Analysis (Qiagen). Dabei wurde die Normalisierung mithilfe von drei verschiedenen Methoden durchgeführt: mit SNORD95 und RNU6-6P, mit dem globalen Ct-Mittelwert aller exprimierten miRNAs sowie mit den vier miRNAs cfa-miR-631/cfa-miR-23b/cfa-miR-320/cfa-miR-125a, welche von der Software automatisch ausgewählt wurden. Die relative Quantifizierung der miRNA-Assays wurde ebenfalls mit der Software miScript miRNA PCR Array Data Analysis (Qiagen) durchgeführt, wobei SNORD95 und RNU6 2 als endogene Kontrollen dienten.

Neben der Normalisierung stellen die verwendeten Kontrollen einen weiteren entscheidenden Faktor bei der vergleichenden miRNA-Expressionsanalyse dar. So verglich die Studiengruppe von Uhl et al. B- und T-Zell-Lymphom-Zelllinien und Lymphknotenproben von Lymphomfällen mit peripheren mononukleären Zellen und Lymphknotenzellen gesunder Hunde, wobei isolierte Populationen reiner nicht-neoplastischer B- und T-Lymphozyten des Hundes besser geeignet gewesen wären, aber laut den Autoren nicht zur Verfügung standen (UHL et al., 2011).

In der vorliegenden Untersuchung zeigten die T-Zell-Lymphomproben eine leicht erhöhte Expression von miR-106a sowie eine deutlich erhöhte Expression der miRNAs miR-18b, miR-20b und miR-363. Übereinstimmend hierzu konnten Uhl et al. eine signifikante miR-106a-Überexpression bei T-Zell-Lymphomen verglichen mit gesundem Lymphknotengewebe bei Hunden nachweisen (UHL et al., 2011). Die sechs miRNAs miR-106a, miR-18b, miR-19b-2, miR-20b, miR-92a-2 und miR-363 werden innerhalb des polycistronischen Clusters miR-106a~363 kodiert, der bei Menschen und Mäusen auf dem X-Chromosom liegt (VENTURA et al., 2008; KHUU et al., 2016). Für den miR-106a~363-Cluster und seine beiden

Paralogons miR-17~92 und miR-106b~25 konnten in einer Reihe von Tumoren proonkogene Wirkungen festgestellt werden, was auf ihre entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung hinweist (LUM et al., 2007; KHUU et al., 2016). So waren miRNAs des miR-106a~363-Clusters bei T-Zell-Lymphomen von transgenetisch modifizierten Mäusen im Vergleich zur miRNA-Expression im Thymus überexprimiert. Darüber hinaus führte die verstärkte Expression des miR-106a~363-Clusters während der Thymozytenreifung zur Entstehung von T-Zell-Lymphomen (KUPPERS et al., 2011; KUPPERS et al., 2017). Durch den Vergleich von akuten und chronischen T-Zell-Leukämiefällen mit gesunden peripheren mononukleären Blutzellen aus Blut- und Knochenmarksproben konnte eine Überexpression des miR-106a~363-Clusters in 46 % der humanen T-Zell-Leukämien detektiert werden (LANDAIS et al., 2007). Eine weitere Studie verglich FFPE-Proben von gesunden Lymphknoten mit Proben von humanen anaplastischen großzelligen Lymphomen – einem aggressiven T-Zell-Lymphom – und zeigte hohe Expressionswerte von miR-20b und miR-106a (MERKEL et al., 2010). Bei Menschen handelt es sich bei der akuten lymphoblastischen T-Zell-Leukämie (T-ALL) um eine aggressive, von Thymozyten ausgehende Tumorform. Durch Sequenzierung kleiner RNAs aus dem Knochenmark von pädiatrischen T-ALL-Patienten war eine Überexpression von miR-363, miR-20b und miR-18b im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachvollziehbar. Weiterhin deutete eine Analyse *in silico* darauf hin, dass die beiden miRNAs miR-363 und miR-20b durch Hemmung der Apoptose einen onkogenen Effekt hatten (DAWIDOWSKA et al., 2019). Dieselbe Forschungsgruppe bestätigte daraufhin, dass eine Hochregulierung von miR-363 und miR-20b in T-ALL-Zellen (*in vitro*) mittels posttranskriptioneller Hemmung der beiden Tumorsuppressor-Gene PTEN und BIM zum einen die leukämischen Zellen vor Apoptose schützte und zum anderen deren Proliferation verstärkte (DROBNA et al., 2020). Des Weiteren war das Fortschreiten eines frühen Stadiums von MF zu fortgeschrittenem CTCL mit der Überexpression der onkogen wirkenden miRNA-Cluster miR-17/92, miR-106b/25 und miR-106a/363 verbunden, wodurch die Autoren zu dem Schluss kamen, dass miRNA-Expressionsprofile zu diagnostischen als auch zu Zwecken der Risikovorhersage angewandt werden können (RALFKIAER et al., 2014). Übereinstimmend hierzu wurden zur Einschätzung der Prognose von chronischen lymphozytären Leukämiefällen (B- und T-Zell-Immunphänotyp) periphere mononukleäre Blutproben anhand eines Expressions-Cut-offs als positiv oder negativ für miR-

20b-5p eingeteilt. Dabei wiesen miR-20b-5p-positive Fälle prognostisch einen günstigeren Verlauf auf (PAPAGEORGIOU et al., 2018). Zusammenfassend stimmt die in der vorliegenden Studie nachgewiesene miR-106a~363-Dysregulierung in FFPE-Proben von intestinalen T-Zell-Lymphomen bei Hunden mit ähnlichen Untersuchungen bei Menschen und Mäusen überein. Dies lässt den Rückschluss zu, dass in T-Zell-Lymphomen speziesübergreifende miRNA-Regulationswege vorliegen.

Ähnlich dem Design der vorliegenden Studie erforschten zwei aktuelle Forschungsprojekte aus dem Jahr 2023 miRNA-Expressionsunterschiede zwischen entzündlich und neoplastisch verändertem Darmgewebe bei Hunden (IRVING et al., 2023; KEHL et al., 2023). Irving et al. untersuchten endoskopisch gewonnene FFPE-Proben des Duodenums. Diese Proben wurden in drei Gruppen – gesunder Darm/geringgradige lymphoplasmazelluläre Enteritis, schwere lymphoplasmazelluläre Enteritis und T-Zell-Lymphome – unterteilt, deren miRNA-Expressionen verglichen wurden. Anhand des miRNA-Expressionsmusters konnte zwischen geringgradig ausgeprägter Enteritis sowie schweren Enteritiden und T-Zell-Lymphomen unterschieden werden. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen hochgradig ausgeprägten Enteritis-Fällen und T-Zell-Lymphomen war allerdings nicht festzustellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie war die miR-363-Expression zwar bei schweren im Vergleich zu milden Enteritis-Fällen signifikant erhöht, doch in der T-Zell-Lymphomgruppe war keine deutliche Expressionsänderung für miR-363 nachweisbar. Obwohl miR-20b eine veränderte Expression in den schweren Enteritis-Fällen sowie den T-Zell-Lymphomen im Vergleich zu mild ausgeprägten Darmentzündungen zeigte, war diese nicht signifikant (IRVING et al., 2023). Kehl et al. verglichen die miRNA-Expression zwischen entzündlich verändertem Darmgewebe (lymphoplasmazelluläre Enteritis, transmurale Enteritis), Darmtumoren (Karzinome, B- und T-Zell-Lymphome) und gesundem Darmgewebe aus Dün- und Dickdarmproben (FFPE) bei Hunden. Innerhalb der Lymphomgruppe handelte es sich bei allen Dünndarmproben um T-Zell-Lymphome und bei allen Dickdarmproben um B-Zell-Lymphome. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen war im Dünndarm eine Differenzierung der verschiedenen Gruppen (entzündlich, neoplastisch oder gesund) anhand des miRNA-Expressionsmusters möglich. Doch

anders als in der vorliegenden Studie war keine abweichende miR-18b-Expression im T-Zell-Lymphom des Dünndarms feststellbar. Darüber hinaus war die miR-20b-Expression im T-Zell-Lymphom sowie bei lymphoplasmazellulären Enteritis-Fällen herunterreguliert (KEHL et al., 2023).

Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist, dass die Wirkweise der miRNAs des miR-106a~363-Clusters noch nicht zur Gänze geklärt ist und dass diese auch tumorsuppressiv sein kann. Dafür spricht, dass die Expression von miR-20b in verschiedenen humanen Kolorektaltumoren herunterreguliert war und die Transfektion von humanen Mundhöhlenkarzinomzellen mit miR-20b zu einer verringerten Proliferation der Tumorzellen führte (KHUU et al., 2014; YAMAGUCHI et al., 2014). Obwohl miR-20b Bestandteil des miR-106a~363-Clusters ist, wird sie bei humanen T-Zell-Leukämien im Gegensatz zu den anderen miRNAs des Clusters nicht übermäßig exprimiert (LANDAIS et al., 2007). Des Weiteren war die miR-363-Expression in FFPE-Proben von extranodalen nasalen NK/T-Zell-Lymphomen (NKTL) verglichen zu gesunden NK-Zellen erniedrigt. Eine verstärkte miR-363-Expression in NKTL-Tumorzelllinien führte zu einem verringerten Wachstum der Tumorzellen (NG et al., 2011). Diese widersprüchlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass miRNAs gewebespezifische und manchmal widersprüchliche Funktionen ausüben können (CORTEZ et al., 2011).

MiR-194 und miR-192, die zu den verwandten miRNA-Clustern miR-194-2~miR-192 und miR-194-1~miR-215 zählen, waren bei einigen Tumorformen des Menschen – darunter kolorektalen Adenokarzinomen, Nierenzellkarzinomen und multiplen Myelomen – herunterreguliert und übten eine gemeinsame tumorsuppressive Wirkung aus (BRAUN et al., 2008; PICHIORRI et al., 2010; KHELLA et al., 2013). In den humanen kolorektalen Tumorzelllinien wurde die tumorsuppressive Wirkung mittels p53-abhängiger Hochregulierung von miR-192 und miR-215 und daraus resultierendem Stillstand des Zellzyklus vermittelt (BRAUN et al., 2008; GEORGES et al., 2008; SCHETTER et al., 2008). In peripheren Blut- oder Knochenmarksproben von Menschen mit ALL wurden die miRNAs miR-194 und miR-192 im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermindert exprimiert (SCHOTTE et al., 2011). Weiterhin führte die miR-192-Überexpression in einer ALL-Zelllinie zu einem Stopp der Tumorzellproliferation, das heißt, miR-192 wirkte durch Störung des Zellzyklus tumorsuppressiv (SAYADI et al., 2017).

In Übereinstimmung dazu wurden verringerte miR-192-Spiegel in Knochenmarksproben von Patienten mit AML im Vergleich zu gesunden Kontrollen sowie eine miR-192-abhängige tumorsuppressive Zellzyklusregulation in zwei Zelllinien der akuten myeloiden Leukämie beobachtet (KE et al., 2017).

Ähnliche Berichte existieren zu miR-194. Während miR-194-5p in Knochenmarkszellen von Patienten mit AML herunterreguliert war, bewirkte die miR-194-5p-Überexpression eine Unterdrückung der Tumorzellproliferation, induzierte deren Apoptose und hemmte die Migration sowie Invasion der AML-Zellen (DUAN et al., 2020). In einer weiteren Studie konnte miR-194-5p durch negative Regulierung von BCLAF1 auf das Überleben und die Differenzierung gesunder hämatopoetischer Vorläuferzellen des Menschen Einfluss nehmen, und das miR-194-5p/BCLAF1-Gleichgewicht war bei Patienten mit AML gestört (DELL'AVERSANA et al., 2017). Vaira et al. verglichen die miRNA-Expressionsmuster von intestinalen T-Zell-Lymphomen mit anderen peripheren T-Zell-Lymphomen bei Menschen. Die intestinalen T-Zell-Lymphome konnten deutlich anhand ihres Expressionsprofils differenziert werden. Darüber hinaus gelang mithilfe des miRNA-Expressionsprofils eine Unterscheidung zwischen Vorstufen des intestinalen T-Zell-Lymphoms (Zöliakie, refraktäre Erkrankung Typ 2) und intestinalen T-Zell-Lymphomen, da entsprechend dem Schweregrad der Erkrankung eine progressive Abnahme der Expression der miR-192/215-Familie zu vermerken war (VAIRA et al., 2020). In Übereinstimmung mit den bisherigen Berichten bei Menschen zeigte die vorliegende Arbeit, dass miR-192 und miR-194 im malignen Gewebe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen herunterreguliert waren. Obwohl miR-215 in dem vorliegenden Projekt nicht mit einem einzelnen miRNA-Assay getestet wurde, war die miR-215-Expression in der miRNA-Array-Analyse (Vorversuch) im intestinalen T-Zell-Lymphom verglichen zu den beiden anderen Gruppen sehr gering. Dies steht im Einklang mit der Herunterregulierung von miR-192 und miR-194. Ebenso wurde festgestellt, dass diese drei miRNAs übereinstimmende Genabschnitte regulieren und ein Netzwerk von Tumorsuppressoren bilden (SENANAYAKE et al., 2012; KHELLA et al., 2013; NAKAOKA et al., 2017). Neben den genannten Berichten zur miR-192- und miR-194-Expression bei Menschen wies das bereits erwähnte Forschungsprojekt von Kehl et al. eine erniedrigte miR-194-Expression bei intestinalen Neoplasien (T-Zell-Lymphome und Karzinome) sowie entzündlichen Darmveränderungen

(lymphoplasmazelluläre Enteritis und transmurale Enteritis) im Vergleich mit gesundem Hundedarm nach. Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen war eine miR-192-Runterregulierung im intestinalen T-Zell-Lymphom verglichen zu gesundem Darm, entzündlich verändertem Darm sowie intestinalen Karzinomen nachvollziehbar. Zudem gelang Kehl et al. eine klare Unterscheidung zwischen den beiden Enteritis-Gruppen, da miR-20b, miR-126 und miR-194 in Fällen von lymphoplasmazellulärer Enteritis herunterreguliert waren. Diese Runterregulierung war in der Gruppe der T-Zell-Lymphome noch stärker ausgeprägt, und zudem waren die beiden miRNAs miR-214 und miR-192 vermindert exprimiert. Beide Erkrankungen sind dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Mehrheit der vorhandenen Zellen um Lymphozyten handelt, was eine ähnliche Veränderung in der miRNA-Expression erklären könnte. Außerdem geben diese ähnlichen Expressionsänderungen Grund zu der Annahme, dass es sich bei der lymphoplasmazellulären Enteritis um ein Vorstadium des T-Zell-Lymphoms handeln könnte. Folglich könnten miRNA-Analysen dabei helfen, die Erkrankung im Frühstadium zu erkennen (KEHL et al., 2023).

Verglichen zu den beiden anderen Gruppen war in der vorliegenden Arbeit eine verminderte miR-141-Expression im intestinalen T-Zell-Lymphom zu vermerken. Passend dazu war die miR-141-Expression gemäß einer miRNA-Array-Studie (mit 937 verschiedenen reifen miRNAs) in humanen CTCL-Fällen verglichen mit entzündlichen Hauterkrankungen erniedrigt (SANDOVAL et al., 2015). Bei Mäusen mit bestrahlungsinduzierten lymphoblastischen T-Zell-Lymphomen (T-LBL) sowie im Mediastinum und Lymphknoten von humanen T-LBL-Fällen war eine erniedrigte miR-141-Expression mit der Hochregulierung des Onkogens SMO assoziiert. SMO beeinflusste als Teil des GLI/Hh-Signalwegs das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen (GONZÁLEZ-GUGEL et al., 2013). In hepatozellulären Karzinomzellen des Menschen verhinderte miR-141 durch Regulation des T-Lymphom-Invasions- und Metastasierungsgens (Tiam1) die Invasion und Migration der Tumorzellen (LIU et al., 2014). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei miR-141 um einen Tumorsuppressor handelt.

Bei Hunden wurde in Lymphknoten von B- und T-Zell-Lymphomen sowie kaninen B- und T-Zell-Lymphom-Zelllinien verglichen zu gesunden Lymphknoten von einer verminderten Expression des Tumorsuppressors miR-203 berichtet (UHL et al., 2011). Ähnlich zum Aufbau der zugrundeliegenden Studie wurden beim Menschen

die miRNA-Expressionsprofile zwischen CTCL-Fällen, gutartigen entzündlichen Hautläsionen und normaler Haut verglichen und wichen deutlich voneinander ab. Wie bereits erwähnt, gelang mit Hilfe von nur drei verschiedenen exprimierten miRNAs (miR-155 hochreguliert; miR-203 und miR-205 herunterreguliert) eine Differenzierung von malignen und benignen Erkrankungsformen mit 95 % diagnostischer Genauigkeit (RALFKIAER et al., 2011). Übereinstimmende Resultate konnten später auch aus Plasmaproben gewonnen werden, weshalb die Nutzung des 3-miR-Klassifikators als Möglichkeit zur Diagnostik und zur Überwachung des Krankheitsverlaufs in Betracht gezogen wurde (DUSÍLKOVÁ et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit war ebenfalls eine signifikant verminderte miR-203-Expression in der Gruppe der intestinalen T-Zell-Lymphome verglichen mit den anderen beiden Gruppen nachweisbar. Hingegen zeigte miR-205 keine auffälligen Expressionsänderungen zwischen den verschiedenen Gruppen. In bestrahlungsinduzierten T-Zell-Lymphomen von Mäusen sowie verschiedenen humanen malignen Tumoren des hämatopoetischen Systems konnte eine verminderte miR-203-Expression mit der Hochregulierung von Onkogenen (darunter ABL-1) in Verbindung gebracht werden (BUENO et al., 2008). Die veränderte miR-203-Expression war sowohl auf genetische als auch auf epigenetische (Methylierung) Mechanismen zurückzuführen, wobei eine epigenetische Unterdrückung häufiger bei lymphoiden als bei myeloiden Tumoren auftrat. Nach Wiederherstellung der miR-203-Expression in den Lymphomzellen waren eine verminderte Zellproliferation und ein verstärkter Zelltod der Tumorzellen aufgefallen, weshalb miR-203 eine tumorsuppressive Wirkung zugesprochen wurde (BUENO et al., 2008; CHIM et al., 2011).

Im Jahr 2015 wurde erstmals über die Expression zirkulierender miRNAs im Serum von kaninen Lymphomen berichtet. Die miRNA-Expression von verschiedenen Lymphomfällen, darunter 31 multizentrische und 16 alimentäre Fälle, wurde mit der von gesunden Hunden verglichen. Der Schweregrad und die anatomische Form des Lymphoms wurden bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt, allerdings nicht der B- oder T-Zell-Immunphänotyp. Verglichen zu den gesunden Kontrollen war miR-25 in Serumproben der Lymphomgruppe signifikant herunterreguliert (FUJIWARA-IGARASHI et al., 2015). Im Kontrast hierzu zeigte miR-25 keine signifikante Expressionsänderung in kaninen Lymphomzellen verglichen zu gesunden peripheren mononukleären Blut- und gesunden



Lymphknotenzellen (UHL et al., 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit war miR-25 in keiner der Gruppen deutlich verändert exprimiert. Bei Menschen wurde von einer miR-25-Überexpression in hepatozellulären Karzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus berichtet. Des Weiteren ist miR-25 an verschiedenen Regulationswegen von Genen beteiligt, die für die Tumorentstehung relevant sind (wie p53, E-cadherin) (LI et al., 2009; POLISENO et al., 2010; SUH et al., 2012; XU et al., 2012). Die Autoren vermuteten, dass der verringerte miR-25-Spiegel im Serum kaniner Lymphome auf einen erhöhten lokalen Verbrauch zur Regulation von für die Tumorentstehung relevanten Genen zurückzuführen sein könnte (CHEN et al., 2012; FUJIWARA-IGARASHI et al., 2015). Wie bereits erwähnt, verglichen Craig et al. die miRNA-Expression aus Lymphknotenaspiraten und Plasmaproben von multizentrischen B- und T-Zell-Lymphomen sowie gesunden Hunden. Dabei fiel auf, dass sich die Expressionsspiegel der meisten miRNAs in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe unterschieden. Während in der Gruppe der gesunden Hunde lediglich eine miRNA eine korrelierende Expression zwischen den Lymphknotenaspiraten und den Plasmaproben zeigte, war eine gleichartige Expressionsänderung für acht miRNAs in der Gruppe der T-Zell-Lymphome sowie für sechs miRNAs in der Gruppe der B-Zell-Lymphome zu vermerken. Dies lässt vermuten, dass die verstärkte miRNA-Produktion und -Freisetzung aus neoplastisch veränderten Lymphozyten mit entsprechend veränderten miRNA-Spiegeln im Plasma verbunden ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass miRNAs ein potentieller diagnostischer Nutzen als zirkulierende Biomarker zugeschrieben werden kann (CRAIG et al., 2019).

Schließlich wurde das diagnostische Potential von miRNAs zur Unterscheidung zwischen gesunden Hunden und Hunden mit lymphoplasmazellulären Darmentzündungen sowie gastrointestinalen Neoplasien (darunter Lymphome, Sarkome, Karzinome, Mastzelltumore) in frisch gewonnenen Kot- und Serumproben untersucht. Im Kot konnte anhand der miRNAs miR-451 und miR-223 mit einer Sensitivität von 96 % und einer Spezifität von 90 % zwischen malignen und benignen gastrointestinalen Erkrankungen unterschieden werden. In den Serumproben gelang eine Unterscheidung zwischen Darmtumoren und lymphoplasmazellulären Enteritiden mithilfe der miRNAs miR-20b, miR-148-3p und miR-652 mit einer Sensitivität von 86–91 % sowie einer Spezifität von 90 % (LYNGBY et al., 2022). Bei Menschen wurde bereits Serum-miR-20b als

Biomarker sowohl für Magenkrebs als auch für entzündliche Darmerkrankungen vorgeschlagen (IBORRA et al., 2013; YANG et al., 2017). Während bei Hunden signifikant erhöhte Mengen von miR-20b in der Gruppe der gastrointestinalen Tumore verglichen zu jener der entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen wurden, fielen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen entzündlichen Darmveränderungen und gesunden Hunden auf. Hieraus lässt sich schließen, dass miR-20b, anders als beim Menschen, als spezifischer Biomarker für Magen-Darm-Krebs fungieren könnte (LYNGBY et al., 2022).

Neben der Anwendung von miRNAs als diagnostische Biomarker untersuchten Craig et al. deren Nutzen zur Einschätzung der Prognose und Therapieüberwachung. Hierzu wurden neun B-Zell-Lymphom-Fälle mit dem 25-wöchigen Chemotherapie-Protokoll CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristine, Prednisolon) behandelt, und die miRNA-Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie zum Zeitpunkt eines Rückfalls – definiert als Wiederkehr der peripheren Lymphknotenvergrößerung – verglichen. Beim B-Zell-Lymphom waren die Hochregulierung der miR-181-Familie und die Herunterregulierung von miR-29b und miR-150 mit einem schlechteren Ansprechen auf Therapie und Überleben assoziiert. Sowohl bei B- als auch bei T-Zell-Lymphomen stand eine höhere Expression von miR-155 und miR-222 mit einer schlechteren Prognose in Verbindung (CRAIG et al., 2019).

Die geringe Probenanzahl und die Verwendung von Archivmaterial grenzte die Aussagekraft des zugrundeliegenden Projekts ein, wenngleich die Ergebnisse von FFPE-Proben auf frisch gefrorenes Probenmaterial übertragbar sein sollten. Neoplastisch veränderte Areale wurden nicht aus dem Objektträgermaterial von gesundem und entzündlich verändertem Darm separiert, weshalb die gewonnenen miRNA-Expressionsmuster Mischungen aus verschiedenen Geweben repräsentieren. Dies könnte zu einer Maskierung tumorspezifischer Veränderungen geführt haben. Entzündliche Prozesse – sowohl in Enteritis- als auch in entzündlich überlagerten Tumorproben – könnten zu fälschlich übereinstimmenden Verschiebungen bei einigen miRNAs geführt haben. Wie bereits erwähnt, zeigte die Tumorprobe T4 ein miRNA-Expressionsmuster, welches sich deutlich von dem der anderen Tumorproben unterschied. Da weder Informationen über die Vorbehandlung oder Behandlung der Tiere noch über die Aggressivität und das klinische Verhalten der Tumore vorlagen, bestand eine große Variabilität bei den

Ergebnissen, und der Grund für die unterschiedlichen Expressionsmuster bleibt unklar. Da wir uns auf hochgradig differentiell exprimierte miRNAs konzentrierten, wurden miRNAs mit mittleren und geringen Expressionsunterschieden nicht analysiert, die jedoch ebenfalls wichtige biologische Effekte in den T-Zell-Lymphomen haben könnten.

Zusammenfassend konnte anhand dieser Forschungsarbeit ein charakteristisches miRNA-Expressionsmuster bei intestinalen T-Zell-Lymphomen des Hundes nachgewiesen werden. Insbesondere die erhöhte Expression der onkogenen miRNAs miR-18b, miR-20b und miR-363 sowie die Herunterregulierung der tumorsuppressiven miRNAs miR-192, miR-194, miR-141 und miR-203 wurden festgestellt. Durch Aufklärung von miRNAs, die für die Lymphomentstehung und -entwicklung verantwortlich sind, könnten die miRNA-gezielte Therapie oder die Wiederherstellung physiologischer Spiegel als neue Strategien für eine individualisierte Behandlung dienen (JARDIN & FIGEAC, 2013). Die sich spontan entwickelnden Tumore des Hundes teilen viele Merkmale der Erkrankung beim Menschen. Hunde könnten deshalb als Tiermodell für die Erforschung menschlicher Krebserkrankungen dienen, da sie in der gleichen Umgebung leben und ähnlichen, potentiell die Krebsentwicklung fördernden Faktoren ausgesetzt sind (RODNEY L. PAGE et al., 2013; WAGNER et al., 2013).

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Lymphom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen des blutbildenden Systems bei Hunden. Nach der multizentrischen Form zählen Lymphome des Magen-Darm-Trakts mit 5–7 % aller Lymphomfälle zur zweithäufigsten Lymphomform. Meist handelt es sich um den T-Zell-Immunphänotyp. Die Prognose von intestinalen Lymphomen ist verglichen mit dem multizentrischen Lymphom schlecht. Trotz Chemotherapie und/oder chirurgischer Tumorexzision beträgt die mediane Überlebenszeit 13–77 Tage. Eine frühe Diagnosestellung und ein frühzeitiger Therapiebeginn könnten erheblich zu deren Verlängerung beitragen. Allerdings ist die eindeutige Diagnosestellung von intestinalen Lymphomen mitunter schwierig, da die neoplastischen lymphatischen Läsionen häufig durch begleitende gutartige Entzündungsreaktionen in der Schleimhaut, insbesondere durch eine lymphoplasmazelluläre Enteritis verdeckt werden. Zur korrekten Diagnosestellung wird derzeit ein aufwändiges Vorgehen – bestehend aus morphologischer Untersuchung, Immunphänotypisierung, Bestimmung des Ki-67-Index und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Antigenrezeptor-Gen-Rearrangement-Analyse (PARR-Analyse) zwecks Charakterisierung der B- oder der T-Zell-Klonalität

– unter Verwendung von invasiv entnommenen Vollschicht-Darmbiopsien empfohlen.

Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) gehören zu einer Klasse von kleinen (~22 Nukleotide langen), einzelsträngigen, nicht-kodierenden RNA-Molekülen, die in fast allen eukaryoten Zellen zu finden sind. Sie steuern durch posttranskriptionelle Basenpaarung an teilweise komplementäre Sequenzen in den 3'-untranslatierten Regionen von Ziel-messengerRNAs (mRNAs) die Proteinsynthese. Bei verschiedenen Krebserkrankungen, darunter auch Lymphomen, werden miRNAs verändert exprimiert. Durch Steuerung der Tumorzelldifferenzierung und -apoptose können verstärkt exprimierte miRNAs als Onkogene die Tumorentstehung fördern, während in Tumoren vermindert exprimierten miRNAs eine tumorsuppressive Wirkung zugesprochen wird.

Bereits 2011 zeigte ein Forschungsprojekt, dass sich miRNA-Expressionsprofile in Hautbiopsien von kutanen T-Zell-Lymphomen, gutartigen entzündlichen

Hautläsionen und gesunder Haut deutlich voneinander unterscheiden. Anhand von lediglich drei verändert exprimierten miRNAs (miR-155 hochreguliert; miR-203 und miR-205 herunterreguliert) konnte mit einer diagnostischen Genauigkeit von über 95 % zwischen benignen und malignen Hauterkrankungen differenziert werden. Zur miRNA-Expression bei Lymphomen des Hundes liegen bislang lediglich vereinzelte Berichte vor, wovon lediglich drei Forschungsprojekte sich auf die miRNA-Analyse des gastrointestinalen Lymphoms konzentrierten.

Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Darstellung und der Vergleich des miRNA-Expressionsmusters in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Vollschicht-Darmproben von gesunden Hunden, Hunden mit intestinalen T-Zell-Lymphomen und Hunden mit lymphoplasmazellulären Darmentzündungen.

Für das zugrundeliegende Forschungsprojekt wurden FFPE-Vollschicht-Dünndarmproben von Hunden verwendet. Das Probenmaterial wurde in drei Gruppen – gesundes Darmgewebe, lymphoplasmazelluläre Enteritiden und intestinale T-Zell-Lymphome – unterteilt. Die endgültige Diagnose des T-Zell-Lymphoms war im Rahmen einer vorangegangenen Studie durch eine Kombination aus morphologischer Untersuchung, immunhistochemischer Untersuchung mit den Antikörpern CD3, CD20 und CD79a sowie durch eine PARR-Analyse bestätigt worden. Zunächst wurde im Rahmen eines Vorversuchs mit zwei Proben pro Gruppe die Gesamt-RNA aus zwei bis vier 10µm dicken Gewebeschnitten extrahiert (RNEasy FFPE Kit, Qiagen), revers transkribiert (miScript II RT Kit, Qiagen) und präamplifiziert (miScript PreAmp PCR Kit, Qiagen). Auf miRNA-PCR-Array-Platten (Qiagen) mit vorgefertigten Reaktionen für 183 verschiedene reife kanine miRNAs wurde eine vergleichende quantitative PCR durchgeführt. Anhand der Ergebnisse des Vorversuchs wurden zwölf miRNAs mit auffälligen Expressionsveränderungen in der Lymphomgruppe für den folgenden Versuch ausgewählt. Im darauffolgenden Testdurchlauf wurde die miRNA-Expression aller Proben (n = 8) pro Gruppe mithilfe von individuellen miRNA-Assays (miScript Primer Assays, Qiagen) an der revers transkribierten RNA ohne Präamplifikation analysiert.

Anhand des durchgeführten Vorversuchs konnte belegt werden, dass mithilfe der Extraktion von Gesamt-RNA aus zwei bis vier Paraffinschnitten ausreichende Mengen an miRNA für die weitere Analyse gewonnen werden können. Darüber hinaus unterschieden sich die miRNA-Expressionswerte zwischen gesundem

Kontrollgewebe, Gewebe von Hunden mit lymphoplasmazellulärer Enteritis und neoplastisch verändertem Gewebe deutlich. Obwohl unterschiedliche Normalisierungsmethoden die Expressionsergebnisse erheblich beeinflussen können, stimmte die Richtung der miRNA-Expressionsänderung (Hoch- oder Runterregulierung) unabhängig von der Normalisierungsmethode überein.

Der anschließende Testdurchlauf mit größeren Stichprobengruppen (n = 8) wies ein für das intestinale T-Zell-Lymphom charakteristisches Expressionsmuster nach. Dabei hervorzuheben war die verminderte Expression der tumorsuppressiven miRNAs miR-194, miR-192, miR-141 und miR-203 sowie die Hochregulierung der onkogenen miRNAs miR-18b, miR-20b und miR-363, die dem miR-106a~363-Cluster angehören. Darüber hinaus konnten keine signifikanten miRNA Expressionsänderungen beim Vergleich von gesundem Darmgewebe und lymphoplasmazellulären Enteritiden festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte anhand der vorliegenden Forschungsarbeit ein charakteristisches miRNA Expressionsmuster für das intestinale T-Zell-Lymphom des Hundes nachgewiesen werden. Die vergleichende miRNA-Expressionsanalyse ermöglichte eine Unterscheidung zwischen malignen und benignen Krankheitszuständen in FFPE-Darmproben des Hundes. Durch die Aufklärung von miRNAs, die für die Lymphomentstehung und -entwicklung verantwortlich sind, könnte die miRNA-gezielte Therapie oder die Wiederherstellung physiologischer Spiegel als neue Strategien für eine individualisierte Behandlung dienen. Des Weiteren teilen die sich spontan entwickelnden Tumore des Hundes viele Merkmale der Erkrankung beim Menschen. Hunde könnten deshalb als Tiermodell für die Erforschung menschlicher Krebserkrankungen dienen, da sie in der gleichen Umgebung leben und ähnlichen, potentiell die Krebsentwicklung fördernden Faktoren ausgesetzt sind.

## VI. SUMMARY

Malignant lymphoma is one of the most frequent malignancies of the hematopoietic system in dogs. Following multicentric lymphoma, gastrointestinal lymphoma represents the second commonest lymphoma form, accounting for 5–7 % of all lymphoma cases. Neoplastic cells show predominantly T-cell origin. In comparison to multicentric lymphoma, prognosis of intestinal lymphoma is poor, with median survival times of 13–77 days despite chemotherapy and/or surgical tumor excision. Early diagnosis and initiation of therapy could be beneficial in order to prolong survival. The definite diagnosis of canine intestinal lymphoma remains challenging, since concomitant benign inflammatory reactions in the mucosa, especially lymphoplasmacellular enteritis often mask neoplastic lymphomatous lesions. To achieve accurate results, a stepwise diagnostic approach using full-thickness biopsies – consisting of morphological examination, immunophenotyping, determination of the Ki67 index and polymerase chain reaction (PCR) for antigen receptor gene rearrangement analysis (PARR) to characterize B- or T- cell clonality – is recommended.

Micro-ribonucleic acids (miRNAs) are a class of small (~22 nucleotides), single-stranded, non-coding RNA molecules found in almost all eukaryotic cells, which post-transcriptionally regulate protein synthesis through base pairing to partially complementary sequences in the 3'-untranslated regions (UTRs) of target messenger RNAs (mRNAs). In various cancers, including lymphoma, miRNAs show aberrant expression. Through regulation of tumor cell differentiation and apoptosis, overexpressed miRNAs function as oncogenes and promote cancer development, while underexpressed miRNAs act as tumor suppressors and inhibit carcinogenesis.

In a study analyzing human cutaneous T-cell lymphoma, miRNA expression patterns differed significantly from both benign inflammatory skin diseases and normal skin. A set of only three differentially expressed miRNAs (miR-155 upregulated; miR-203 and miR-205 downregulated) achieved a diagnostic accuracy of over 95 % in the differentiation benign/malignant. To date, few studies have investigated miRNA expression patterns in canine lymphoma, of which only three research projects focused on miRNA analysis in gastrointestinal lymphoma.

The purpose of our study was to characterize miRNA expression in well-defined groups of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) full-thickness intestinal samples from healthy intestinal tissue, canine intestinal T-cell lymphoma and lymphoplasmacellular enteritis.

For this study, we used FFPE full-thickness tissue specimens of canine small intestine. We divided the samples into three groups – healthy controls, lymphoplasmacellular enteritis and intestinal T-cell lymphoma. The final diagnosis T-cell lymphoma had been confirmed in a previous study via a combination of morphologic examination, immunohistochemistry using CD3, CD20 and CD79a antibody staining and PARR analysis. In a preliminary test with two samples per group, total RNA was extracted from two to four 10µm thick tissue sections (RNEasy FFPE Kit, Qiagen), reverse transcribed (miScript II RT Kit, Qiagen) and pre-amplified (miScript PreAmp PCR Kit, Qiagen). We performed comparative quantitative PCR on miRNA PCR Array plates (Qiagen) with pre-fabricated reactions for 183 different mature canine miRNAs. Subsequently, twelve miRNAs with conspicuous expression changes in the lymphoma group were selected and miRNA expression of all samples (n = 8 per group) was analyzed with individual miRNA Assays (miScript Primer Assays, Qiagen) on the reverse transcribed RNA without pre-amplification.

The initial screening with arrays for canine miRNA revealed high amounts of detectable miRNAs in enteric tissue and differences in miRNA expression levels between healthy control tissue, tissue from dogs with lymphoplasmacellular enteritis and neoplastic tissue. Although different normalization methods can significantly affect the expression results, the trends for up- or downregulation were concordant regardless of the normalization method used.

The subsequent test with larger sample groups (n = 8 per group) showed a T-cell lymphoma characteristic expression pattern. In particular, we noted downregulation of the tumor suppressive miRNAs miR-194, miR-192, miR-141 and miR-203 as well as increased expression of the oncogenic miRNAs miR-18b, miR-20b and miR-363. In addition, we detected only slight expression alterations between healthy intestinal tissue and lymphoplasmacellular enteritis cases.

Taken together, our study revealed a distinct miRNA expression pattern in canine intestinal T-cell lymphoma. Comparative miRNA expression analysis enabled



---

differentiation of malignant and benign diseases in FFPE intestinal samples. The spontaneously developing tumors of the dog may serve as an additional model for the role of miRNAs in tumor pathophysiology and as diagnostic biomarkers, or can even be used to test the effectiveness of miRNA-based tumor therapeutics, which may benefit both dogs and humans.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Albonico F, Mortarino M, Avallone G, Gioia G, Comazzi S, Roccabianca P. The expression ratio of miR-17-5p and miR-155 correlates with grading in canine splenic lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 155: 117-23.

Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. *Rna* 2003; 9: 277-9.

Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 2007; 134: 1635-41.

Arps DP, Smith LB. Classic versus type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: diagnostic considerations. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1227-31.

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

Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 2010; 50: 244-9.

Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D, Vucur M, Gautheron J, Koch A, Zimmermann H, Janssen J, Nieuwenhuijsen L, Luedde M, Frey N, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med* 2013; 45: e42.

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.

Boehm M, Slack FJ. MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle* 2006; 5: 837-40.

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.

Bonfanti U, Bussadori C, Zatelli A, De Lorenzi D, Masserdotti C, Bertazzolo W, Faverzani S, Ghisleni G, Capobianco R, Caniatti M. Percutaneous fine-needle biopsy of deep thoracic and abdominal masses in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 2004; 45: 191-8.

Bonfanti U, Bertazzolo W, Bottero E, De Lorenzi D, Marconato L, Masserdotti C, Zatelli A, Zini E. Diagnostic value of cytologic examination of gastrointestinal tract tumors in dogs and cats: 83 cases (2001-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229: 1130-3.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 1097-101.

Bousquet M, Harris MH, Zhou B, Lodish HF. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 21558-63.

Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, Wolff S, Moll UM, Schepeler T, Ørntoft TF, Andersen CL, Dobbstein M. p53-Responsive microRNAs 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res* 2008; 68: 10094-104.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3: e85.

Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992; 25: 31-40.

Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, Croce CM, Fernández-Piqueras J, Malumbres M. Genetic and epigenetic

silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008; 13: 496-506.

Burkhard MJ, Bienzle D. Making Sense of Lymphoma Diagnostics in Small Animal Patients. *Clin Lab Med* 2015; 35: 591-607.

Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver CS, Moore PF, Avery AC. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol* 2003; 40: 32-41.

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.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-9.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004.

Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol* 1996; 33: 204-12.

Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 2007; 6: 2127-32.

Carrasco V, Rodriguez-Bertos A, Rodriguez-Franco F, Wise AG, Maes R, Mullaney T, Kiupel M. Distinguishing Intestinal Lymphoma From Inflammatory

Bowel Disease in Canine Duodenal Endoscopic Biopsy Samples. *Vet Pathol* 2015; 52: 668-75.

Chakravarthy S, Sternberg SH, Kellenberger CA, Doudna JA. Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *J Mol Biol* 2010; 404: 392-402.

Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin MJ, Miller N. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 173.

Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* 2012; 3: 28-37.

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.

Cheng Z, Zhou L, Hu K, Dai Y, Pang Y, Zhao H, Wu S, Qin T, Han Y, Hu N, Chen L, Wang C, Zhang Y, Wu D, Ke X, Shi J, Fu L. Prognostic significance of microRNA-99a in acute myeloid leukemia patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2018; 53: 1089-95.

Chim CS, Wong KY, Leung CY, Chung LP, Hui PK, Chan SY, Yu L. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 2760-7.

Chott A, Haedicke W, Mosberger I, Födinger M, Winkler K, Mannhalter C, Müller-Hermelink HK. Most CD56+ intestinal lymphomas are CD8+CD5-T-cell lymphomas of monomorphic small to medium size histology. *Am J Pathol* 1998; 153: 1483-90.

Comazzi S, Marelli S, Cozzi M, Rizzi R, Finotello R, Henriques J, Pastor J, Ponce

F, Rohrer-Bley C, Rutgen BC, Teske E. Breed-associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: an European canine lymphoma network study. *BMC Vet Res* 2018; 14: 232.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 467-77.

Couto CG, Rutgers HC, Sherding RG, Rojko J. Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *J Vet Intern Med* 1989; 3: 73-8.

Couto KM, Moore PF, Zwingenberger AL, Willcox JL, Skorupski KA. Clinical characteristics and outcome in dogs with small cell T-cell intestinal lymphoma. *Vet Comp Oncol* 2018; 16: 337-43.

Coyle KA, Steinberg H. Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol* 2004; 41: 141-6.

Craig KKL, Wood GA, Keller SM, Mutsaers AJ, Wood RD. MicroRNA profiling in canine multicentric lymphoma. *PLoS One* 2019; 14: e0226357.

Culmsee K, Simon D, Mischke R, Nolte I. Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2001; 48: 199-206.

Dawidowska M, Jaksik R, Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Kosmalka M, Sędek Ł, Machowska L, Lalik A, Lejman M, Ussowicz M, Kałwak K, Kowalczyk JR, Szczepański T, Witt M. Comprehensive Investigation of miRNome Identifies Novel Candidate miRNA-mRNA Interactions Implicated in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Neoplasia* 2019; 21: 294-310.

Debernardi S, Skoulakis S, Molloy G, Chaplin T, Dixon-McIver A, Young BD. MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid

leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. *Leukemia* 2007; 21: 912-6.

Delabie J, Holte H, Vose JM, Ullrich F, Jaffe ES, Savage KJ, Connors JM, Rimsza L, Harris NL, Müller-Hermelink K, Rüdiger T, Coiffier B, Gascoyne RD, Berger F, Tobinai K, Au WY, Liang R, Montserrat E, Hochberg EP, Pileri S, Federico M, Nathwani B, Armitage JO, Weisenburger DD. Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project. *Blood* 2011; 118: 148-55.

Deleeuw RJ, Zettl A, Klinker E, Haralambieva E, Trottier M, Chari R, Ge Y, Gascoyne RD, Chott A, Müller-Hermelink HK, Lam WL. Whole-genome analysis and HLA genotyping of enteropathy-type T-cell lymphoma reveals 2 distinct lymphoma subtypes. *Gastroenterology* 2007; 132: 1902-11.

Dell'Aversana C, Giorgio C, D'Amato L, Lania G, Matarese F, Saeed S, Di Costanzo A, Belsito Petrizzi V, Ingenito C, Martens JHA, Pallavicini I, Minucci S, Carissimo A, Stunnenberg HG, Altucci L. miR-194-5p/BCLAF1 deregulation in AML tumorigenesis. *Leukemia* 2017; 31: 2315-25.

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

Deravi N, Berke O, Woods JP, Bienzle D. Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Vet Immunol Immunopathol* 2017; 191: 5-13.

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.

Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 2002; 43: 240-6.

Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004; 18: 504-11.

Dong W, Li B, Wang Z, Zhang Z, Wang J. Clinical significance of microRNA-24 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Neoplasma* 2015; 62: 250-8.

Dooley J, Linterman MA, Liston A. MicroRNA regulation of T-cell development. *Immunol Rev* 2013; 253: 53-64.

Dorn CR, Taylor DO, Hibbard HH. Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am J Vet Res* 1967; 28: 993-1001.

Drobna M, Szarzyńska B, Jaksik R, Sędek Ł, Kuchmiy A, Taghon T, Van Vlierberghe P, Szczepański T, Witt M, Dawidowska M. hsa-miR-20b-5p and hsa-miR-363-3p Affect Expression of PTEN and BIM Tumor Suppressor Genes and Modulate Survival of T-ALL Cells In Vitro. *Cells* 2020; 9

Duan MY, Li M, Tian H, Tang G, Yang YC, Peng NC. Down-regulation of lncRNA NEAT1 regulated by miR-194-5p/DNMT3A facilitates acute myeloid leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2020; 82: 102417.

Dusílková N, Bašová P, Polívka J, Kodet O, Kulvait V, Pešta M, Trněný M, Stopka T. Plasma miR-155, miR-203, and miR-205 are Biomarkers for Monitoring of Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Int J Mol Sci* 2017; 18

Edwards DS, Henley WE, Harding EF, Dobson JM, Wood JL. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol* 2003; 1: 200-6.

Egan LJ, Walsh SV, Stevens FM, Connolly CE, Egan EL, McCarthy CF. Celiac-associated lymphoma. A single institution experience of 30 cases in the combination chemotherapy era. *J Clin Gastroenterol* 1995; 21: 123-9.

Elshafie NO, Nascimento NCD, Lichti NI, Kasinski AL, Childress MO, Santos



APD. MicroRNA Biomarkers in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Vet Pathol* 2021; 58: 34-41.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-59.

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

Evans SE, Bonczynski JJ, Broussard JD, Han E, Baer KE. Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229: 1447-50.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15805-10.

Fabbri M, Calore F, Paone A, Galli R, Calin GA. Epigenetic regulation of miRNAs in cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013; 754: 137-48.

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

Fernandez-Mercado M, Manterola L, Lawrie CH. MicroRNAs in Lymphoma: Regulatory Role and Biomarker Potential. *Curr Genomics* 2015; 16: 349-58.

Ferrer L, Fondevila D, Rabanal R, Tarres J, Ramis A. Immunohistochemical detection of CD3 antigen (pan T marker) in canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 616-20.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-

transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102-14.

Förstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE, Zamore PD. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* 2005; 3: e236.

Frances M, Lane AE, Lenard ZM. Sonographic features of gastrointestinal lymphoma in 15 dogs. *J Small Anim Pract* 2013; 54: 468-74.

Frank JD, Reimer SB, Kass PH, Kiupel M. Clinical outcomes of 30 cases (1997-2004) of canine gastrointestinal lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2007; 43: 313-21.

French RA, Seitz SE, Valli VE. Primary epitheliotropic alimentary T-cell lymphoma with hepatic involvement in a dog. *Vet Pathol* 1996; 33: 349-52.

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

Fu DR, Kato D, Endo Y, Kadosawa T. Apoptosis and Ki-67 as predictive factors for response to radiation therapy in feline nasal lymphomas. *J Vet Med Sci* 2016; 78: 1161-6.

Fujiwara-Igarashi A, Igarashi H, Mizutani N, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Ohno K, Tsujimoto H. Expression profile of circulating serum microRNAs in dogs with lymphoma. *Vet J* 2015; 205: 317-21.

Fukunaga R, Han BW, Hung JH, Xu J, Weng Z, Zamore PD. Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell* 2012; 151: 533-46.

Fukushima K, Ohno K, Koshino-Goto Y, Uchida K, Nomura K, Takahashi M,

Nakashima K, Fujino Y, Tsujimoto H. Sensitivity for the detection of a clonally rearranged antigen receptor gene in endoscopically obtained biopsy specimens from canine alimentary lymphoma. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 1673-6.

Gale J, Simmonds PD, Mead GM, Sweetenham JW, Wright DH. Enteropathy-type intestinal T-cell lymphoma: clinical features and treatment of 31 patients in a single center. *J Clin Oncol* 2000; 18: 795-803.

Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, Patil M, Sheldon H, Betts G, Homer J, West C, Ragoussis J, Harris AL. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer* 2011; 104: 1168-77.

Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, Marconato L, Comazzi S. Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 121: 179-88.

Georges SA, Biery MC, Kim SY, Schelter JM, Guo J, Chang AN, Jackson AL, Carleton MO, Linsley PS, Cleary MA, Chau BN. Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer Res* 2008; 68: 10105-12.

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503-12.

Gluud M, Willerslev-Olsen A, Gjerdrum LMR, Lindahl LM, Buus TB, Andersen MH, Bonfeld CM, Krejsgaard T, Litvinov IV, Iversen L, Becker JC, Persson JL, Koralov SB, Litman T, Geisler C, Woetmann A, Odum N. MicroRNAs in the Pathogenesis, Diagnosis, Prognosis and Targeted Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Cancers (Basel)* 2020; 12

González-Gugel E, Villa-Morales M, Santos J, Bueno MJ, Malumbres M, Rodríguez-Pinilla SM, Piris M, Fernández-Piqueras J. Down-regulation of specific miRNAs enhances the expression of the gene Smoothed and contributes to T-cell

lymphoblastic lymphoma development. *Carcinogenesis* 2013; 34: 902-8.

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.

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele 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.

Guo X, Su B, Zhou Z, Sha J. Rapid evolution of mammalian X-linked testis microRNAs. *BMC Genomics* 2009; 10: 97.

Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara IG, Dargemont C. Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem* 2003; 278: 5505-8.

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

Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Lainé S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 2005; 6: 961-7.

Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, Miller CJ, West CM. Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. *Br J Cancer* 2012; 107: 684-94.

Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001; 293: 1146-50.

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.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901.

Han Z, Estephan RJ, Wu X, Su C, Yuan YC, Qin H, Kil SH, Morales C, Schmolze D, Sanchez JF, Tian L, Yu J, Kortylewski M, Rosen ST, Querfeld C. MicroRNA Regulation of T-Cell Exhaustion in Cutaneous T Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol* 2022; 142: 603-12.e7.

Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2010; 28: 655-61.

Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 410-5.

He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; 447: 1130-4.

Heinrich EM, Dimmeler S. MicroRNAs and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment. *Circ Res* 2012; 110: 1014-22.

Ho PTB, Clark IM, Le LTT. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci* 2022; 23

Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987; 238: 163-70.

Hristov AC, Tejasvi T, Wilcox RA. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2019; 94: 1027-41.

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.

Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint 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.

Iborra M, Bernuzzi F, Correale C, Vetrano S, Fiorino G, Beltrán B, Marabita F, Locati M, Spinelli A, Nos P, Invernizzi P, Danese S. Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2013; 173: 250-8.

Ikeda S, Tagawa H. Dysregulation of microRNAs and their association in the pathogenesis of T-cell lymphoma/leukemias. *Int J Hematol* 2014; 99: 542-52.

Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4: 143-59.

Irving JR, Hiron TK, Davison LJ, Xia D, Beck S, Werling D, Williams J. Characterization of canine intestinal microRNA expression in inflammatory bowel disease and T-cell lymphoma. *J Comp Pathol* 2023; 204: 23-9.

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.
- Jaffe ES, Nicolae A, Pittaluga S. Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas in the WHO classification: pearls and pitfalls. *Mod Pathol* 2013; 26 Suppl 1: S71-87.
- Jardin F, Figeac M. MicroRNAs in lymphoma, from diagnosis to targeted therapy. *Curr Opin Oncol* 2013; 25: 480-6.
- Jiang F, Ye X, Liu X, Fincher L, McKearin D, Liu Q. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes Dev* 2005; 19: 1674-9.
- Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, Nelson DL, Moses K, Warren ST. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci* 2004; 7: 113-7.
- Jinlong S, Lin F, Yonghui L, Li Y, Weidong W. Identification of let-7a-2-3p or/and miR-188-5p as prognostic biomarkers in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2015; 10: e0118099.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2006; 57: 19-53.
- Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 2006; 25: 6176-87.
- Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VE, Getzy DM, Fosmire SP, Coffey D, Bellgrau D, Modiano JF. CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet Pathol* 2005; 42: 468-76.
- Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Roberts H, Keskey B, Pan J, Galandiuk S. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg* 2012; 256: 544-51.

Kaneko N, Yamamoto Y, Wada Y, Shimokawa Miyama T, Hiraoka H, Itamoto K, Mizuno T, Nakaichi M, Takahashi T, Watari T, Okuda M. Application of polymerase chain reaction to analysis of antigen receptor rearrangements to support endoscopic diagnosis of canine alimentary lymphoma. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 555-9.

Kawamata T, Tomari Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 368-76.

Ke S, Li RC, Lu J, Meng FK, Feng YK, Fang MH. MicroRNA-192 regulates cell proliferation and cell cycle transition in acute myeloid leukemia via interaction with CCNT2. *Int J Hematol* 2017; 106: 258-65.

Kehl A, Valkai M, Van de Weyer AL, Brockmann M, Steiger K, Schusser B, Aupperle-Lellbach H. miRNA Profiles of Canine Intestinal Carcinomas, Lymphomas and Enteritis Analysed by Digital Droplet PCR from FFPE Material. *Vet Sci* 2023; 10

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.

Khella HW, Bakhet M, Allo G, Jewett MA, Girgis AH, Latif A, Girgis H, Von Both I, Bjarnason GA, Yousef GM. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2013; 34: 2231-9.

Khuu C, Jevnaker AM, Bryne M, Osmundsen H. An investigation into anti-proliferative effects of microRNAs encoded by the miR-106a-363 cluster on human carcinoma cells and keratinocytes using microarray profiling of miRNA transcriptomes. *Front Genet* 2014; 5: 246.

Khuu C, Utheim TP, Sehic A. The Three Paralogous MicroRNA Clusters in Development and Disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. *Scientifica (Cairo)* 2016; 2016: 1379643.



Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, Ubriani R, Vittorio CC, Junkins-Hopkins JM, Wysocka M, Rook AH. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 2005; 115: 798-812.

Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 156-9.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22: 165-73.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 126-39.

Kiupel M, Teske E, Bostock D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol* 1999; 36: 292-300.

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

Kojima K, Chambers JK, Ii T, Nibe K, Mizuno T, Uchida K. Histopathological features and immunophenotyping of canine transmural gastrointestinal lymphoma using full-thickness biopsy samples. *Vet Pathol* 2021: 3009858211030523.

Kopp KL, Ralfkiaer U, Gjerdrum LM, Helvad R, Pedersen IH, Litman T, Jønson L, Hagedorn PH, Krejsgaard T, Gniadecki R, Bonfeld CM, Skov L, Geisler C, Wasik MA, Ralfkiaer E, Ødum N, Woetmann A. STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cell Cycle* 2013; 12: 1939-47.

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: D155-d62.

Kuppers DA, Hwang HC, Jackson AL, Linsley PS, Clurman BE, Fero ML. Effect

of Xpc11 activation and p27(Kip1) loss on gene expression in murine lymphoma. *PLoS One* 2011; 6: e14758.

Kuppers DA, Schmitt TM, Hwang HC, Samraj L, Clurman BE, Fero ML. The miR-106a~363(Xpc11) miRNA cluster induces murine T cell lymphoma despite transcriptional activation of the p27(Kip1) cell cycle inhibitor. *Oncotarget* 2017; 8: 50680-91.

Ladiges WC, Keast M, Appelbaum F, Storb R. Phenotypic characterization of canine lymphoma, using monoclonal antibodies and a microlymphocytotoxicity assay. *Am J Vet Res* 1988; 49: 870-2.

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

Landais S, Landry S, Legault P, Rassart E. Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its implication in human T-cell leukemia. *Cancer Res* 2007; 67: 5699-707.

Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 2004; 14: 2162-7.

Lane J, Price J, Moore A, Dandrieux JRS, Clifford C, Curran K, Choy K, Cannon C. Low-grade gastrointestinal lymphoma in dogs: 20 cases (2010 to 2016). *J Small Anim Pract* 2018; 59: 147-53.

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.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse

large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 672-5.

Lawrie CH. MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review. *Br J Haematol* 2013; 160: 571-81.

Lee HY, Doudna JA. TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *Rna* 2012; 18: 2012-9.

Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, Doudna JA. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 6568-76.

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, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Droscha 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.

Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo j* 2006; 25: 522-32.

Leite KR, Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Piantino CB, Sañudo A, Camara-Lopes LH, Srougi M. miRNA analysis of prostate cancer by quantitative real time

PCR: comparison between formalin-fixed paraffin embedded and fresh-frozen tissue. *Urol Oncol* 2011; 29: 533-7.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.

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 Y, Tan W, Neo TW, Aung MO, Wasser S, Lim SG, Tan TM. Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 1234-42.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-73.

Lindahl LM, Besenbacher S, Rittig AH, Celis P, Willerslev-Olsen A, Gjerdrum LMR, Krejsgaard T, Johansen C, Litman T, Woetmann A, Odum N, Iversen L. Prognostic miRNA classifier in early-stage mycosis fungoides: development and validation in a Danish nationwide study. *Blood* 2018; 131: 759-70.

Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *Ilar j* 2005; 46: 258-68.

Liu Y, Ding Y, Huang J, Wang S, Ni W, Guan J, Li Q, Zhang Y, Ding Y, Chen B, Chen L. MiR-141 suppresses the migration and invasion of HCC cells by targeting Tiam1. *PLoS One* 2014; 9: e88393.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 2002; 297: 2053-6.

Lobetti RG. Lymphoma in 3 related Rottweilers from a single household. *J S Afr Vet Assoc* 2009; 80: 103-5.

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.

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

Lum AM, Wang BB, Li L, Channa N, Bartha G, Wabl M. Retroviral activation of the mir-106a microRNA cistron in T lymphoma. *Retrovirology* 2007; 4: 5.

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

Lynby JG, Gødia M, Brogaard L, Kristensen AT, Fredholm M, Skancke E, Morris J, Dupont N, Salavati Schmitz S, Argyle D, Sánchez A, Bjørnvad CR, Cirera S, Nielsen LN. Association of fecal and serum microRNA profiles with gastrointestinal cancer and chronic inflammatory enteropathy in dogs. *J Vet Intern Med* 2022; 36: 1989-2001.

Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 2006; 311: 195-8.

MacRae IJ, Zhou K, Doudna JA. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 934-40.

Maeda S, Tsuboi M, Sakai K, Ohno K, Fukushima K, Kanemoto H, Hiyoshi-Kanemoto S, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Yonezawa T, Uchida K, Matsuki N. Endoscopic Cytology for the Diagnosis of Chronic Enteritis and Intestinal Lymphoma in Dogs. *Vet Pathol* 2017; 54: 595-604.

Mahdipour M, van Tol HT, Stout TA, Roelen BA. Validating reference microRNAs for normalizing qRT-PCR data in bovine oocytes and preimplantation embryos. *BMC Dev Biol* 2015; 15: 25.

Malnar M, Režen T. Factors affecting RNA quantification from tissue long-term stored in formalin. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2019; 96: 61-6.

Malouf C, Antunes ETB, O'Dwyer M, Jakobczyk H, Sahm F, Landua SL, Anderson RA, Soufi A, Halsey C, Ottersbach K. miR-130b and miR-128a are essential lineage-specific codrivers of t(4;11) MLL-AF4 acute leukemia. *Blood* 2021; 138: 2066-92.

Manfè V, Biskup E, Rosbjerg A, Kamstrup M, Skov AG, Lerche CM, Lauenborg BT, Odum N, Gniadecki R. miR-122 regulates p53/Akt signalling and the chemotherapy-induced apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma. *PLoS One* 2012; 7: e29541.

Manfè V, Biskup E, Willumsgaard A, Skov AG, Palmieri D, Gasparini P, Laganá A, Woetmann A, Ødum N, Croce CM, Gniadecki R. cMyc/miR-125b-5p signalling determines sensitivity to bortezomib in preclinical model of cutaneous T-cell lymphomas. *PLoS One* 2013; 8: e59390.

Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Vukosavljevic T, Paschka P, Whitman SP, Langer C, Baldus CD, Liu CG, Ruppert AS, Powell BL, Carroll AJ, Caligiuri MA, Koltz JE, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations

in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5078-87.

Marstrand T, Ahler CB, Ralfkiaer U, Clemmensen A, Kopp KL, Sibbesen NA, Krejsgaard T, Litman T, Wasik MA, Bonefeld CM, Grønbaek K, Gjerdum LM, Gniadecki R, Ralfkiaer E, Geisler C, Woetmann A, Røpke MA, Glue C, Skov L, Odum N. Validation of a diagnostic microRNA classifier in cutaneous T-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2014; 55: 957-8.

Matsumoto I, Uchida K, Nakashima K, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Tsujimoto H, Nakayama H. Pathological features of intestinal T-cell lymphoma in Shiba dogs in Japan. *Vet Comp Oncol* 2018; 16: 417-23.

Matsumoto I, Nakashima K, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Tsujimoto H, Nakayama H, Uchida K. Immunohistochemical Profiling of Canine Intestinal T-Cell Lymphomas. *Vet Pathol* 2019; 56: 50-60.

Matutes E. The 2017 WHO update on mature T- and natural killer (NK) cell neoplasms. *Int J Lab Hematol* 2018; 40 Suppl 1: 97-103.

McDermott AM, Kerin MJ, Miller N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *PLoS One* 2013; 8: e83718.

McGirt LY, Baerenwald DA, Vonderheid EC, Eischen CM. Early changes in miRNA expression are predictive of response to extracorporeal photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 2269-71.

Melzer K, Guscetti F, Rohrer Bley C, Sumova A, Roos M, Kaser-Hotz B. Ki67 reactivity in nasal and periocular squamous cell carcinomas in cats treated with electron beam radiation therapy. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 676-81.

Merkel O, Hamacher F, Laimer D, Sifft E, Trajanoski Z, Scheideler M, Egger G,

Hassler MR, Thallinger C, Schmatz A, Turner SD, Greil R, Kenner L. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 16228-33.

Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng JF, Nick AM, Deavers MT, Mourad-Zeidan A, Wang H, Mueller P, Lenburg ME, Gray JW, Mok S, Birrer MJ, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Bar-Eli M, Sood AK. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 2641-50.

Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009; 10: R64.

Meyer SU, Pfaffl MW, Ulbrich SE. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol Lett* 2010; 32: 1777-88.

Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, Alevizos I. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 2010; 16: 34-8.

Milner RJ, Pearson J, Nesbit JW, Close P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-mixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. *Onderstepoort J Vet Res* 1996; 63: 309-13.

Miura T, Maruyama H, Sakai M, Takahashi T, Koie H, Yamaya Y, Shibuya H, Sato T, Watari T, Tokuriki M, Hasegawa A. Endoscopic findings on alimentary lymphoma in 7 dogs. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 577-80.

Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, Avery PR, Lindblad-Toh K, Ostrander EA, Cutter GC, Avery AC. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk.



Cancer Res 2005; 65: 5654-61.

Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, Davidson BL. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna* 2010; 16: 495-505.

Moore PF, Rodriguez-Bertos A, Kass PH. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Vet Pathol* 2012; 49: 658-68.

Mortarino M, Gioia G, Gelain ME, Albonico F, Roccabianca P, Ferri E, Comazzi S. Identification of suitable endogenous controls and differentially expressed microRNAs in canine fresh-frozen and FFPE lymphoma samples. *Leuk Res* 2010; 34: 1070-7.

Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 2002; 16: 720-8.

Müller V, Gade S, Steinbach B, Loibl S, von Minckwitz G, Untch M, Schwedler K, Lübke K, Schem C, Fasching PA, Mau C, Pantel K, Schwarzenbach H. Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: a translational research project within the Geparquinto trial. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 147: 61-8.

Nakamura T, Canaani E, Croce CM. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10980-5.

Nakaoka T, Saito Y, Shimamoto Y, Muramatsu T, Kimura M, Kanai Y, Saito H. Cluster microRNAs miR-194 and miR-215 suppress the tumorigenicity of intestinal tumor organoids. *Cancer Sci* 2017; 108: 678-84.

Nakashima K, Hiyoshi S, Ohno K, Uchida K, Goto-Koshino Y, Maeda S, Mizutani

N, Takeuchi A, Tsujimoto H. Prognostic factors in dogs with protein-losing enteropathy. *Vet J* 2015; 205: 28-32.

Ng SB, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay JL, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong YL, Shimizu N, Aozasa K, Chng WJ. Dysregulated microRNAs affect pathways and targets of biologic relevance in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* 2011; 118: 4919-29.

Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *Rna* 2007; 13: 1894-910.

Noland EL, Kiupel M. Coexpression of CD3 and CD20 in Canine Enteropathy-Associated T-cell Lymphoma. *Vet Pathol* 2018; 55: 241-4.

O'Donnell KA, Yu D, Zeller KI, Kim JW, Racke F, Thomas-Tikhonenko A, Dang CV. Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2373-86.

Ohmura S, Leipig M, Schopper I, Hergt F, Weber K, Rutgen BC, Tsujimoto H, Hermanns W, Hirschberger J. Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs. *Vet Comp Oncol* 2017; 15: 194-207.

Oien KA, Evans TR. Raising the profile of cancer of unknown primary. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4373-5.

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007; 130: 89-100.

Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010; 222: 540-5.

Onions DE. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 909-12.

Ozaki K, Yamagami T, Nomura K, Narama I. T-cell lymphoma with eosinophilic infiltration involving the intestinal tract in 11 dogs. *Vet Pathol* 2006; 43: 339-44.

Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 2008; 22: 3172-83.

Papageorgiou SG, Kontos CK, Tsiakanikas P, Stavroulaki G, Bouchla A, Vasilatou D, Bazani E, Lazarakou A, Scorilas A, Pappa V. Elevated miR-20b-5p expression in peripheral blood mononuclear cells: A novel, independent molecular biomarker of favorable prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2018; 70: 1-7.

Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 121-7.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller 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.

Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Fournel-Fleury C, Ponce F. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 301-10.

Patnaik AK, Hurvitz AI, Johnson GF. Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet Pathol* 1977; 14: 547-55.

Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, Singha RS,

Malakar AK, Chakraborty S. Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol* 2018; 233: 2007-18.

Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 2006; 66: 11590-3.

Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *Rna* 2008; 14: 844-52.

Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology* 2017; 49: 166-71.

Peter ME. Regulating cancer stem cells the miR way. *Cell Stem Cell* 2010; 6: 4-6.

Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006; 21: 533-42.

Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005; 2: 269-76.

Phillips BS, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 111-7.

Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, Zhou W, Benson DM, Jr., Hofmainster C, Alder H, Garofalo M, Di Leva G, Volinia S, Lin HJ, Perrotti D, Kuehl M, Aqeilan RI, Palumbo A, Croce CM. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2

autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 2010; 18: 367-81.

Pittaway C, Schofield I, Dobson J, O'Neill DG, Brodbelt DC. Incidence and risk factors for the diagnosis of lymphoma in dogs in UK primary-care practice. *J Small Anim Pract* 2019;

Poliseno L, Salmena L, Riccardi L, Fornari A, Song MS, Hobbs RM, Sportoletti P, Varmeh S, Egia A, Fedele G, Rameh L, Loda M, Pandolfi PP. Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal* 2010; 3: ra29.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432: 226-30.

Pradervand S, Weber J, Thomas J, Bueno M, Wirapati P, Lefort K, Dotto GP, Harshman K. Impact of normalization on miRNA microarray expression profiling. *Rna* 2009; 15: 493-501.

Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 2006; 38 Suppl: S8-13.

Ralfkiaer U, Hagedorn PH, Bangsgaard N, Løvendorf MB, Ahler CB, Svensson L, Kopp KL, Vennegaard MT, Lauenborg B, Zibert JR, Krejsgaard T, Bonefeld CM, Søkilde R, Gjerdrum LM, Labuda T, Mathiesen AM, Grønæk K, Wasik MA, Sokolowska-Wojdylo M, Queille-Roussel C, Gniadecki R, Ralfkiaer E, Geisler C, Litman T, Woetmann A, Glue C, Røpke MA, Skov L, Odum N. Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2011; 118: 5891-900.

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, Røpke MA, Woetmann A, Skov L, Grønæk 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.

Ralphs SC, Jessen CR, Lipowitz AJ. Risk factors for leakage following intestinal anastomosis in dogs and cats: 115 cases (1991-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 73-7.

Ramadan ES, Kubesy AA, Baraka TA, Torad FA, Salem SI, Salem NY. Expression of blood hepatocyte-derived microRNA-122 in canine multicentric lymphoma with hepatic involvement. *Vet Res Commun* 2019; 43: 231-8.

Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, Keyvanfar K, McCoy JP, Jr., Sloand EM, Kajigaya S, Young NS. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 2006; 30: 643-7.

Rassnick KM, Moore AS, Collister KE, Northrup NC, Kristal O, Chretien JD, Bailey DB. Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 317-22.

Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 175-207.

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.

Rigillo A, Fuchs-Baumgartinger A, Sabattini S, Škor O, Agnoli C, Schwendenwein I, Bettini G, Rütgen BC. Ki-67 assessment-agreeability between immunohistochemistry and flow cytometry in canine lymphoma. *Vet Comp Oncol* 2021;

Roberti A, Dobay MP, Bisig B, Vallois D, Boéchat C, Lanitis E, Bouchindhomme

B, Parrens MC, Bossard C, Quintanilla-Martinez L, Missiaglia E, Gaulard P, de Leval L. Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma features a unique genomic profile with highly recurrent SETD2 alterations. *Nat Commun* 2016; 7: 12602.

Rodney L. Page, David M. Vail, Withrow SJ (2013) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier Health Sciences

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.

Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, Barshack I. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 462-9.

Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 2005; 3: e235.

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006; 9: 435-43.

Saki N, Abroun S, Soleimani M, Hajizamani S, Shahjahani M, Kast RE, Mortazavi Y. Involvement of MicroRNA in T-Cell Differentiation and Malignancy. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2015; 9: 33-49.

Sandoval J, Díaz-Lagares A, Salgado R, Servitje O, Climent F, Ortiz-Romero PL, Pérez-Ferriols A, Garcia-Muret MP, Estrach T, Garcia M, Nonell L, Esteller M,

Pujol RM, Espinet B, Gallardo F. MicroRNA expression profiling and DNA methylation signature for deregulated microRNA in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 1128-37.

Sayadi M, Ajdary S, Nadali F, Rostami S, Edalati Fahtabad M. Tumor suppressive function of microRNA-192 in acute lymphoblastic leukemia. *Bosn J Basic Med Sci* 2017; 17: 248-54.

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

Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama* 2008; 299: 425-36.

Schlotter CM, Tietze L, Vogt U, Heinsen CV, Hahn A. Ki67 and lymphocytes in the pretherapeutic core biopsy of primary invasive breast cancer: positive markers of therapy response prediction and superior survival. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2017; 32

Schotte D, De Menezes RX, Akbari Moqadam F, Khankahdani LM, Lange-Turenhout E, Chen C, Pieters R, Den Boer ML. MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2011; 96: 703-11.

Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* 2015; 61: 1333-42.

Senanayake U, Das S, Vesely P, Alzoughbi W, Fröhlich LF, Chowdhury P, Leuschner I, Hoefler G, Guertl B. miR-192, miR-194, miR-215, miR-200c and miR-141 are downregulated and their common target ACVR2B is strongly expressed in renal childhood neoplasms. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1014-21.



Shadabi S, Delrish N, Norouzi M, Ehteshami M, Habibian-Sezavar F, Pourrezaei S, Madihi M, Ostadali M, Akhgar F, Shayeghpour A, Razavi Pashabayg C, Aghajanian S, Mozhgani SH, Jazayeri SM. Comprehensive high-throughput meta-analysis of differentially expressed microRNAs in transcriptomic datasets reveals significant disruption of MAPK/JNK signal transduction pathway in Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Infect Agent Cancer* 2021; 16: 49.

Shales CJ, Warren J, Anderson DM, Baines SJ, White RA. Complications following full-thickness small intestinal biopsy in 66 dogs: a retrospective study. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 317-21.

Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Pera RA, Lao K, Clarke MF. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009; 138: 592-603.

Shimono Y, Mukohyama J, Nakamura S, Minami H. MicroRNA Regulation of Human Breast Cancer Stem Cells. *J Clin Med* 2015; 5

Sierra Matiz OR, Santilli J, Anai LA, Da Silva MCL, Sueiro FA, Sequeira JL, Magalhães LF, Magalhães GM, Tinucci Costa M, Calazans SG. Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. *J Vet Diagn Invest* 2018; 30: 263-7.

Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 2000; 5: 659-69.

Smolarz B, Durczyński A, Romanowicz H, Szyłło K, Hogendorf P. miRNAs in Cancer (Review of Literature). *Int J Mol Sci* 2022; 23

Snead EC. Large granular intestinal lymphosarcoma and leukemia in a dog. *Can Vet J* 2007; 48: 848-51.

Sokołowska J, Micun J, Malicka E, Lechowski R. Proliferation activity in canine lymphomas. *Pol J Vet Sci* 2012; 15: 727-34.

Song MY, Pan KF, Su HJ, Zhang L, Ma JL, Li JY, Yuasa Y, Kang D, Kim YS, You WC. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *PLoS One* 2012; 7: e33608.

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

Steinhilber J, Bonin M, Walter M, Fend F, Bonzheim I, Quintanilla-Martinez L. Next-generation sequencing identifies deregulation of microRNAs involved in both innate and adaptive immune response in ALK+ ALCL. *PLoS One* 2015; 10: e0117780.

Stranahan LW, Whitley D, Thaiwong T, Kiupel M, Oliveira F. Anaplastic Large T-Cell Lymphoma in the Intestine of Dogs. *Vet Pathol* 2019: 300985819852132.

Suh SS, Yoo JY, Nuovo GJ, Jeon YJ, Kim S, Lee TJ, Kim T, Bakacs A, Alder H, Kaur B, Aqeilan RI, Pichiorri F, Croce CM. MicroRNAs/TP53 feedback circuitry in glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 5316-21.

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127: 2375-90.

Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999; 99: 123-32.

Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as

- diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 13-21.
- Teske E, de Vos JP, Egberink HF, Vos JH. Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet Q* 1994; 16: 134-6.
- Teske E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q* 1994; 16: 209-19.
- Thatcher EJ, Bond J, Paydar I, Patton JG. Genomic organization of zebrafish microRNAs. *BMC Genomics* 2008; 9: 253.
- Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 2006; 20: 2202-7.
- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-81.
- Uhl E, Krimer P, Schliekelman P, Tompkins SM, Suter S. Identification of altered MicroRNA expression in canine lymphoid cell lines and cases of B- and T-Cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50: 950-67.
- Vaira V, Gaudio G, Laginestra MA, Terrasi A, Agostinelli C, Bosari S, Di Sabatino A, Vanoli A, Paulli M, Ferrero S, Roncoroni L, Lombardo V, Perera LP, Fabris S, Vecchi M, Pileri S, Elli L. Deregulation of miRNAs-cMYC circuits is a key event in refractory celiac disease type-2 lymphomagenesis. *Clin Sci (Lond)* 2020; 134: 1151-66.
- Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, Johnson Y, Jones C, Kiupel M, Labelle P, Lester S, Miller M, Moore P, Moroff S, Roccabianca P, Ramos-Vara J, Ross A, Scase T, Tvedten H, Vernau W. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol* 2011; 48: 198-211.

Valli VE, Kass PH, San Myint M, Scott F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol* 2013; 50: 738-48.

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-317.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: Research0034.

Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008; 132: 875-86.

Vermeulen A, Behlen L, Reynolds A, Wolfson A, Marshall WS, Karpilow J, Khvorova A. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *Rna* 2005; 11: 674-82.

Vernau W, Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 145-64.

Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol* 2015; 25: 137-47.

Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA

processing by Lin28. *Science* 2008; 320: 97-100.

Vojtechova Z, Zavadil J, Klozar J, Grega M, Tachezy R. Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PLoS One* 2017; 12: e0179645.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-61.

Wagner S, Willenbrock S, Nolte I, Murua Escobar H. Comparison of non-coding RNAs in human and canine cancer. *Front Genet* 2013; 4: 46.

Wang P, Yang D, Zhang H, Wei X, Ma T, Cheng Z, Hong Q, Hu J, Zhuo H, Song Y, Jia C, Jing F, Jin Q, Bai C, Mao H, Zhao J. Early Detection of Lung Cancer in Serum by a Panel of MicroRNA Biomarkers. *Clin Lung Cancer* 2015; 16: 313-9.e1.

Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2007; 39: 380-5.

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.

Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rna* 2007; 13: 1668-74.

Xie Y, Todd NW, Liu Z, Zhan M, Fang H, Peng H, Alattar M, Deepak J, Stass SA, Jiang F. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung

cancer. *Lung Cancer* 2010; 67: 170-6.

Xu T, Liao Z, O'Reilly MS, Levy LB, Welsh JW, Wang LE, Lin SH, Komaki R, Liu Z, Wei Q, Gomez DR. Serum inflammatory miRNAs predict radiation esophagitis in patients receiving definitive radiochemotherapy for non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol* 2014; 113: 379-84.

Xu X, Chen Z, Zhao X, Wang J, Ding D, Wang Z, Tan F, Tan X, Zhou F, Sun J, Sun N, Gao Y, Shao K, Li N, Qiu B, He J. MicroRNA-25 promotes cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421: 640-5.

Yamaguchi T, Iijima T, Wakaume R, Takahashi K, Matsumoto H, Nakano D, Nakayama Y, Mori T, Horiguchi S, Miyaki M. Underexpression of miR-126 and miR-20b in hereditary and nonhereditary colorectal tumors. *Oncology* 2014; 87: 58-66.

Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo YM, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, Shimizu N, Ichinohasama R, Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* 2009; 114: 3265-75.

Yang R, Fu Y, Zeng Y, Xiang M, Yin Y, Li L, Xu H, Zhong J, Zeng X. Serum miR-20a is a promising biomarker for gastric cancer. *Biomed Rep* 2017; 6: 429-34.

Yau P, Dhand NK, Thomson PC, Taylor RM. Retrospective study on the occurrence of canine lymphoma and associated breed risks in a population of dogs in NSW (2001-2009). *Aust Vet J* 2017; 95: 149-55.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004; 304: 594-6.

Yu L, Todd NW, Xing L, Xie Y, Zhang H, Liu Z, Fang H, Zhang J, Katz RL, Jiang F. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int J Cancer* 2010; 127: 2870-8.

Zandvliet M. Canine lymphoma: a review. *Vet Q* 2016; 36: 76-104.

Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 4776-85.

Zeng Y, Cullen BR. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* 2005; 280: 27595-603.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12.

Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo j* 2002; 21: 5875-85.

Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118: 57-68.

## VIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil. Karin Weber für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas und ihre Bereitschaft, mich auf meinem akademischen Weg zu begleiten. Ich bedanke mich herzlich für ihre Vorbereitungen, ihre Hilfe bei der gemeinsamen Arbeit im Labor sowie ihre Geduld. Ihre Anleitung und Ihr Feedback waren von unschätzbarem Wert für meine wissenschaftliche Entwicklung und ermöglichten die Erstellung der Publikation und dieses Manuskripts.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Frau Dr. Miriam Leipzig-Rudolph für die Überlassung des Probenmaterials.

Bei Frau Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil. Katrin Hartmann möchte ich mich für die Ermöglichung der Promotion an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München bedanken.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung bei allen Zielen, die ich mir setze. Ihr haltet mir stets den Rücken frei und habt mir meinen bisherigen Werdegang ermöglicht. Ihr glaubt immer an mich und seid mein fester Fels in der Brandung.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund Lucas für seine Geduld, sein Verständnis und die aufmunternden Worte wann immer ich sie gebraucht habe.