



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsovetenskap

# **Genetiska aspekter på defekter i hudbarriären hos hundar med atopisk dermatit**

*Camilla Kretz*

*Uppsala  
2016*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2016:48*



# Genetiska aspekter på defekter i hudbarriären hos hundar med atopisk dermatit

Genetic aspects of defects in the skin barrier in dogs with atopic dermatitis

Camilla Kretz

*Handledare:* Göran Andersson, institutionen för husdjursgenetik

*Examinator:* Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grund nivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2016

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2016:48

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** atopisk dermatit hos hund, defekt hudbarriär, genetik

**Key words:** canine atopic dermatitis, skin barrier defects, genetics

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för husdjursgenetik



## Sammanfattning

Atopisk dermatit hos hund (CAD) är en av de vanligaste hudsjukdomarna hos hundar och karakteriseras av en typ 1-hypersensitivitetsreaktion. Symtomen kan vara av varierande svårighetsgrad, allt ifrån diffus klåda till inflammerad hud och hudlesioner. Inget av symtomen är dock patognomont. CAD är en multifaktoriell sjukdom som har en stark genetisk koppling och som oftare drabbar vissa raser än andra. Sjukdomen associeras framför allt med brister i immunsystemet och en defekt hudbarriär, men även miljöfaktorer påverkar prevalensen. CAD visar stora likheter med atopisk dermatit hos människa och hunden används i forskningen som modell för att identifiera genetiska riskfaktorer.

CAD är en multigenetisk sjukdom och en mängd genvarianter har identifierats som är associerade med ökad risk för att utveckla sjukdomen. Huvudsyftet med denna uppsats är att ta reda på vilka genvarianter kopplade till hudbarriären som hittills har påträffats och som är associerade med ökad risk för att utveckla CAD. Hudens yttersta skikt, epidermis, fungerar som ett försvar mot yttre påverkan. I det översta lagret, stratum corneum, bildar korneocyterna tillsammans med olika slags lipider ett skyddande lager och försvårar för allergener att penetrera huden. Stratum corneum fungerar åt motsatt håll också som en fuktbarriär. Andra viktiga komponenter i cellagren är olika slags adhesionsmolekyler, bl.a. desmosomer.

De vanligaste metoderna för att hitta gener har hittills utförts med microarray-teknik och PCR. Mängden mRNA i hudbiopsier från friska respektive sjuka individer jämförs. En nackdel med dessa metoder är att falskt positiva samband kan uppträda och att den förändrade gentranskriptionen i vävnaden bara är en sekundär effekt av själva sjukdomsprocessen. Exempel på genvarianter som forskarna har hittat med dessa metoder och som är associerade med ökad risk för att utveckla CAD är *S100A8/A9*, *SPINK5*, *SGPL1*, *PPAR $\gamma$*  och *FLG*. En annan metod är Genome-wide associations studies, GWAS. Den känner igen områden av SNP:ar på en region (haplotyp) i genomet som oftare förekommer hos sjuka individer i jämförelse med en frisk kontrollgrupp. Ingen tidigare identifierad genvariant behöver vara känd och risken för att någon genvariant skall förbises är därför mycket liten. Ett exempel på en genvariant som upptäckts med GWAS är *PKP2*, som kodar för proteinet plakophilin 2, ett protein som ingår i desmosomernas struktur. *PKP2* är en stark kandidatgen för CAD och intressant även för forskningen på AD på människa.

De genvarianter som är associerade till hudbarriären och ökad risk för att utveckla CAD innebär sannolikt att upptaget av allergen via huden ökar. Huruvida hudförändringarna är en primär orsak till CAD eller en konsekvens av den immunologiska reaktionen är fortfarande okänt.

*Nyckelord:* atopisk dermatit hos hund, defekt hudbarriär, genetik

## Abstract

Canine atopic dermatitis (CAD) is one of the most common skin diseases in dogs and is characterized by a type 1 hypersensitivity reaction. The symptoms can be of varying difficulty, ranging from diffuse itching to inflamed skin and skin lesions. None of the symptoms, however, is pathognomonic. CAD is a multifactorial disease with a strong genetic link, which often affects some breeds more often than others. The disease is primarily associated with immune system deficiencies and a defect skin barrier, but also environmental factors influence the prevalence. CAD shows great similarities with human atopic dermatitis, and the dog is used as a research model to identify genetic risk factors.

CAD is a multi-genetic disease and many gene variants have been identified that are associated with increased risk of developing the disease. The main purpose of this paper is to identify gene variants linked to skin barrier and their association with increased risk of developing CAD. The outermost layer of the skin, the epidermis, acts as a defence against external influences. In the top layer, the stratum corneum, the corneocytes form, together with different kinds of lipids, a protective layer and makes it difficult for allergens to penetrate the skin. The stratum corneum works in the opposite direction also as a moisture barrier. Other important components of the cell layers are different kinds of adhesion molecules, including desmosomes.

The most common methods for finding genes have so far been carried out with microarray technology and PCR. The amount of mRNA in skin biopsies from healthy and diseased individuals is generated and compared. A disadvantage of these methods is that false positive connection may occur and that the altered gene transcription in tissue is only a secondary effect of the disease process. Examples of gene variants that scientists have found using these methods with association to increased risk of developing CAD are *S100A8 / A9*, *SPINK5*, *SGPL1*, *PPAR $\gamma$*  and *FLG*. Another method is the Genome-Wide Association Studies, GWAS. It recognizes areas of SNPs in a region (haplotype) in the genome that often occurs in diseased individuals in comparison with a healthy control group. No previously identified gene variant needs to be known and the risk that one gene variant to be overlooked is therefore very small. An example of a gene variant detected with GWAS is *PKP2*, encoding the protein plakophilin 2, a protein contained in the structure of the desmosomes. *PKP2* is a strong candidate gene for CAD and of interest for research on the AD in humans.

The gene variants associated with CAD and leading to a defective skin barrier is likely to increase the absorption of allergens through the skin. Whether the lesion is a primary cause of CAD or a consequence of the immunological reaction is still unknown.

*Keywords:* canine atopic dermatitis, skin barrier defects, genetics

# Innehållsförteckning

<b>Förkortningar</b>	<b>4</b>
<b>1 Inledning</b>	<b>5</b>
1.1 Material och metoder	6
<b>2 Litteraturoversikt</b>	<b>7</b>
2.1 Atopisk dermatit hos hund – en bakgrund	7
2.1.1 Definition	7
2.1.2 Allergen	7
2.1.3 Immunförsvaret	8
2.1.4 Typiska symtom vid atopisk dermatit	9
2.2 Hudbarriären	9
2.2.1 Den intakta hudens uppbyggnad	10
2.2.2 Den defekta huden	12
2.3 Genetiska riskfaktorer för CAD	13
2.3.1 Några genetiska begrepp	14
2.3.2 Genome-Wide Association Studies (GWAS)	15
2.3.3 Genetikstudier som funnit samband mellan CAD och hudbarriären	16
<b>3 Diskussion</b>	<b>21</b>
<b>Referenslista</b>	<b>24</b>

## Förkortningar

AD	atopisk dermatit
CAD	canine atopic dermatitis
FLG	filaggrin
IL	interleukin
LD	linkage disequilibrium
PCR	polymerase chain reaction
PKP	plakophilin
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SGPL1	sphingosine-1-phosphate lyase-1
SKK	Svenska kennelklubben
SNP	single nucleotide polymorphism
SPINK5	serine protease inhibitor kazal type-5
TEWL	transepidermal water loss
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha



# 1 Inledning

Atopisk dermatit (AD) drabbar omkring 10 % av hundpopulationen och är en av de vanligaste hudsjukdomarna hos hundar (Hillier & Griffin, 2001). Kliande, torr och inflammerad hud är typiska symtom. Forskarna är överens om att hundens atopiska dermatit (eng. canine atopic dermatitis, CAD) är en komplex och multifaktoriell sjukdom med stark genetisk koppling, eftersom den är överrepresenterad inom vissa hundraser. Den visar också stora likheter med den humana formen av atopisk dermatit, kliniskt, histologiskt och immunologiskt m.m., och förhoppningen står till att framsteg inom framför allt genetikforskningen på CAD skall lösa gåtan med atopisk dermatit även hos människa (Tengvall, 2015).

Sjukdomens (CADs) arvbarhet är hög: en studie har visat att arvbarheten ligger mellan 0,13–0,81, med ett medeltal på 0,47 (Shaw *et al.*, 2004). Arvbarhet över 0,4 räknas som hög (Björnhag, 1989). Faktorer som anses vara förknippade med sjukdomen utöver det genetiska sambandet är obalans i immunsystemet, allergisk överkänslighet, miljöfaktorer, sekundära inflammationer orsakade av mikroorganismer samt defekter i hudbarriären (Nuttall *et al.*, 2013).

Hudens yttersta lager, epidermis, är uppbyggt för att vara motståndskraftigt mot yttre faktorer och för att bevara fukt. Hudlesioner – vare sig de är orsakade av mekanisk påverkan eller defekter i hudens struktur – utgör en inkörsport för bl.a. bakterier och miljöallergener av olika slag (Cork *et al.*, 2009).

Huvudsyftet med denna litteraturstudie är att redogöra för forskningsläget gällande genetik bakom CAD. Med hänsyn till ämnets bredd och till uppsatsens begränsade omfång läggs tonvikten på de genvarianter som är kopplade till hudbarriären och som är associerade med ökad risk för att utveckla CAD. Vilka genvarianter som forskningen har identifierat och vilka skador i hudbarriären som de är förknippade med är några frågeställningar som uppsatsen vill försöka besvara.

Hundens genom kartlades 2005 (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) och sedan dess används ofta hunden som modell för olika sjukdomar hos människan. Varför är hundens genom så lämpligt att använda? En ytterligare fråga som uppsatsen vill försöka ge svar på är vilka gentekniker som används och deras för- och nackdelar.

Uppsatsen kommer inte att redogöra för diagnostik eller behandling av CAD, däremot ges en kort bakgrund till sjukdomens etiologi och symtom. En beskrivning av hudbarriären och en introduktion till genetikdelen av uppsatsen ingår också.

## 1.1 Material och metoder

Vid litteratursökningen har databaserna Web of Science, PubMed och Google Scholar utnyttjats. Söktermerna har varit "atopic dermatitis" AND genome OR genetic AND canine OR dog. Resterande artiklar har hittats via referenslistorna i de framsökta artiklarna.

De senaste fem årens uppsatser (från 2010 och framåt) som skrivits vid SLU och som publicerats i Epsilon har studerats, för att undvika allt för stora ämneslikheter. De flesta uppsatser om CAD har fokus på de immunologiska verkningsmekanismerna.

## 2 Litteraturöversikt

### 2.1 Atopisk dermatit hos hund – en bakgrund

#### 2.1.1 Definition

Atopisk dermatit hos hund (CAD) beskrevs kliniskt först på 1970-talet. Definitionen har tagit längre tid än så, beroende på sjukdomens komplexitet med ett spektrum av olika symtom samt otillräckliga vetenskapliga studier på området (Olivry *et al.*, 2001). Den moderna och nu gällande definitionen av CAD är inte äldre än tio år och lyder: ”A genetically predisposed inflammatory and pruritic allergic skin disease with characteristic clinical features associated with IgE antibodies most commonly directed against environmental allergens” (Halliwell, 2006) (’En genetiskt predisponerad inflammatorisk och kliande allergisk hudsjukdom med karakteristiska kliniska kännetecken associerad med IgE-antikroppar, oftast riktade mot miljöallergener’).

#### 2.1.2 Allergen

De vanligast förekommande allergener som är kopplade till CAD är olika arter av *Dermatophagoides*, d.v.s. husdammskvalster, framför allt *D. farinae* (Nuttall *et al.*, 2013). Flera olika kvalsterproteiner (t.ex. Der p1) som framkallar en allergisk reaktion har identifierats (Cork *et al.*, 2009). Kvalsterallergener är potenta proteaser som ökar permeabiliteten i epitelet vilket kan öka upptaget av allergener genom huden. Andra allergen är förråds kvalster (t.ex. *Acarus siro*), pollen och allergen från andra hundar, hästar, katter och människan (Bizikova *et al.*, 2015). Studier har också visat att hundar kan reagera på grupper av allergener som liknar varandra, vilket tyder på att det förekommer korsreaktioner eller ko-sensitisering (Nuttall *et al.*, 2013).

### 2.1.3 Immunförsvaret

Atopisk dermatit (AD) karakteriseras av en typ I-hypersensitivitetsreaktion, vilken utmärks av ett omotiverat T-hjälparcell typ 2-svar (Th2-svar) och en överproduktion av IgE-antikroppar. AD genererar i det akuta skedet framför allt ett Th2-svar, men övergår i en kronisk fas från ett Th2-svar till ett Th1-svar (Tizard, 2013). Höga IgE-nivåer har emellertid inte rutinmässigt kunnat kopplas samman med CAD, snarare är höga IgE-nivåer betingade av ett högt tryck av endoparasiter (Roque *et al.*, 2011; Owczarek-Lipska *et al.*, 2012). En studie har visat att schäfrar med CAD har lägre halter av IgA-antikroppar (Tengvall *et al.*, 2013). IgA-brist har även påvisats i flera andra hundraser, men en generell koppling till CAD är fortfarande oklar (Olsson *et al.*, 2014).

#### *Antigenpresentation och MHC2*

Första gången ett allergen passerar individens epitelbarriär (i huden, bronkerna eller tarmslemhinnan; här *i huden*) orsakar det ingen allergisk reaktion. Vad som sker är att allergenet tas om hand av dendritiska celler – i huden kallas de Langerhanska celler – som sönderdelar det i små peptider intracellulärt. Peptiderna binder på major histocompatibility complex II, MHC2-molekyler, och komplexet transporteras sedan till ytan av den Langerhanska cellen. I en regional lymfknuta presenterar den Langerhanska cellen antigenet för naiva T-lymfocyter som utvecklas vidare till Th1- eller Th2-celler. Vilken T-hjälparcell som utvecklas beror bl.a. på vilka cytokiner som frisätts av den Langerhanska cellen, men i den akuta fasen av AD är det Th2-celler som aktiveras. Th2-cellerna stimulerar B-celler som bundit antigenet via sin B-cellsreceptor att differentiera till plasmaceller och att börja producera allergenspecifika IgE för vidare transport ut i kroppen (Tizard, 2013; Day, 2014).

#### *Inflammation*

Mastceller finns framför allt i kroppens bindvävslager, i ytan på slemhinnorna, huden och kring nerver. När de allergenspecifika IgE-antikropparna bildas i lymfknutorna transporteras de vidare i kroppen och fäster till IgE-specifika receptorer som är uttryckta framför allt på mastceller. De är nu redo att reagera på allergenet som de blivit sensitiserade för. När allergenet tar sig in i kroppen nästa gång korsbinder det med två IgE-molekyler på mastcellens yta vilket utlöser en degranulering med frisättning av inflammatoriska enzymer och cytokiner. Frisättning av bl.a. histamin och serotonin sker inom några sekunder. Efter ett par minuter frisätts bl.a. leukotriener och prostaglandiner och efter några timmar cytokiner, bl.a. interleukin 4 (IL4), IL6 och tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Även basofiler och eosinofiler är involverade i typ I-hypersensitivitetsreaktionen. Basofiler kan liksom mastceller binda IgE vid sin yta och frisätta bl.a. IL3 och histamin. Antagligen är

basofilerna främst aktiva i den kroniska fasen av atopisk dermatit. Eosinofiler förekommer i stora mängder i vävnad där det finns mastceller och där det pågår en typ I-hypersensitivitetsreaktion. Eosinofiler frisätter bl.a. IL8 (Tizard, 2013).

Även Th2-cellerna producerar interleukiner av olika slag, bl.a. IL-4, IL-5, IL-6 och IL-13. Th2-cellens produktion av IL-4 stimulerar ytterligare IgE-produktion. IL-31 produceras också av Th2-celler och IL-31-receptorer finns uttryckta på keratinocyterna i huden (Tizard, 2013). IL-31 har visat samband med klåda och inflammation som orsakats av CAD (Marsella, 2014).

#### 2.1.4 Typiska symtom vid atopisk dermatit

Diagnostiseringen av CAD är komplicerad eftersom inget av de symtom som kännetecknar sjukdomen är patognomont, samtidigt som symtomen kan variera mellan individer. Allmän klåda, torr hud eller öroninflammation, otitis externa, är normalt de första symtomen. Torra, röda utslag (seborré) är utmärkande och huden blir ofta inflammerad. På grund av den intensiva klådan uppstår ofta lesioner i huden. Håravfall och hyperpigmentering förekommer också. De vanligaste predilektionsställena är tassarna, armhålorna, buken och ytterörat (Favot *et al.*, 2010; Tizard, 2013), men vilka områden som drabbas skiljer sig ofta mellan olika hundraser (Wilhem *et al.*, 2011).

## 2.2 Hudbarriären

En defekt hudbarriär utgör en ökad risk att utveckla atopisk dermatit. En förändrad och ömtålig hud ökar vattenförlusten genom huden samt blir en inkörsport för allergener som aktiverar immunförsvaret. Under senare år har det som kallas outside-inside-outside-hypotesen uppmärksamrats inom forskningen rörande AD hos människa. Tidigare har forskarna framför allt fokuserat på de immunologiska orsakerna till sjukdomen och hudbarriärens nedsatta funktion har betraktats som en sekundär effekt. Outside-inside-outside-hypotesens ståndpunkt är att sjukdomen inleds med en förändrad hudbarriär och följs av ett immunsvår, som i nästa steg ytterligare försämrar hudstrukturen (Elias & Steinhoff, 2008). Hypoteserna har i viss mån även använts inom forskningen på CAD (Marsella *et al.*, 2010; Olivry, 2011), men vad som anses vara orsak och verkan är dock fortfarande inte utrett (Wolf & Wolf, 2012; Chamber *et al.*, 2014). I en nyligen utförd studie utsattes 12 beaglar (sex stycken tidigare sensitiserade och sex stycken kontroller) för *Demotophagoides farinae*. Hudbiopsier visade att det fanns 587 stycken annorlunda uttryckta gener (mRNA) hos de tidigare sensitiserade hundarna; 361 gener var uppreglerade och associerade med immunförsvaret och inflammation, 226 var nedreglerade och associerade med hudbarriären (bl.a. differentiering av korneocyter och tight junctions). Resultatet av studien visade att hudbarriären hos de sensi-

tiserade hundarna försämrades som en konsekvens av den allergiska reaktionen och inflammationen och inte tvärtom (Schamber *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Den intakta hudens uppbyggnad

#### *Subcutis och dermis*

Hudens uppgift är att skydda kroppen bl.a. från mekanisk påverkan, uttorkning, ultraviolettt strålning, smuts och bakterier. Huden ger även information till andra celler (effektorceller) om den allergenbearbetning som sker i de yttre hudlagren (Ross & Pawlina, 2011) (se ovan, ”Immunförsvaret”).

Hudens lager består av *epidermis* (överhuden), *dermis* (läderhuden) och *subcutis* (underhuden; grek. *hypodermis*). Subcutis består främst av fett och bindväv och beroende på mängden underhudsfett varierar tjockleken. Det ovan liggande lagret – dermis – består av bindväv (framför allt av kollagen I och III samt elastin), blodkärl, nerver, svettkörtlar och hårfolliklar (Ross & Pawlina, 2011).

#### *Epidermis – stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum och stratum lucidum*

*Epidermis* består av fem skikt: stratum corneum (hornlagret), stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum och stratum basale. Hundens epidermis är något tunnare (3–5 cell-lager) i jämförelse med människans (10–15 cell-lager) (Tengvall, 2015).

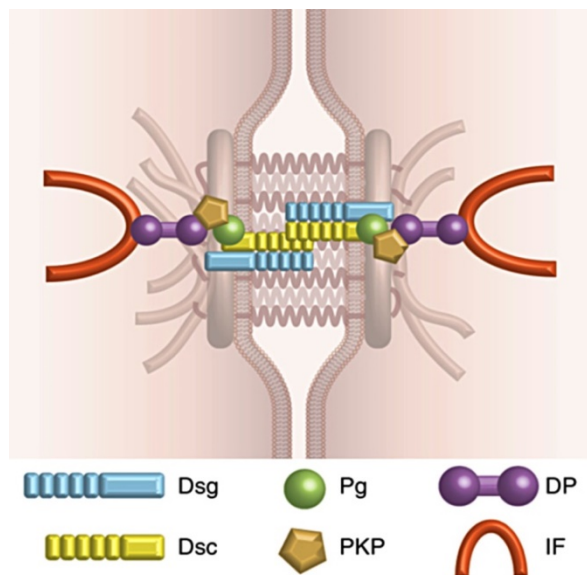
*Stratum basale* (basallagret), det djupast liggande skiktet närmast dermis, består av ett lager av kubiska till cylinderformade stamceller, basalceller, från vilka keratinocyter bildas genom mitos. Basalcellerna fäster i basalmembranet via *hemidesmosomer* och till varandra via *desmosomer* och tight junctions. När keratinocyterna prolifererar och mognar migrerar de uppåt till nästa lager, stratum spinosum, där de plattas ut. Ju högre upp cellerna kommer i epitelet desto mer tillplattade blir de. Förutom keratinocyter innehåller stratum basale även melanocyter, som tillverkar färgämnet melanin, och Merkelceller, som förmedlar trycksignaler till nervutskott (Ross & Pawlina, 2011). Desmosomerna är viktiga adhesionsmolekyler som fördelar krafter mellan cellerna och det intercellulära utrymmet. De är uppbyggda av tre olika familjer av proteiner: cadheriner, armadilloproteiner och plakiner. Cadherinerna binder till varandra transmembrant och armadilloproteinerna, bl.a. plakoglobin (PG) och plakophilin (PKP), fungerar som bryggor till bl.a. desmoplakin (DP) (Figur 1) (Green & Simpson, 2007).

I *stratum spinosum* (taggcellslagret) har cellerna kontakt med varandra via ”taggar”. Cellernas taggar fäster till varandra via desmosomer och de kan tillsammans liknas vid en brygga. I spinosum finns även de tidigare nämnda Langerhanska

cellerna, immunceller med långa utskott som löper mellan keratinocyterna (Ross & Pawlina, 2011).

I *stratum granulosum* innehåller cellerna små korn, granula, av flera typer, bl.a. keratohyalin, vilka bl.a. innehåller prekursorer till proteinet filaggrin. Granulan släpps ut i keratinocyternas cytoplasma och inleder keratiniseringen av det översta cellagret, *stratum corneum* (Ross & Pawlina, 2011). I *stratum granulosum* finns även s.k. lamellära kroppar som består av olika slags lipider. De lamellära kropparna utvecklas i det översta hudlagret till extracellulära lipidlameller, vilka är mycket viktiga för hudens motståndskraft mot allergener och för att huden inte skall förlora fukt (Marsella *et al.*, 2010).

*Stratum lucidum* består av ett tunt lager av tillplattade och döda keratinocyter och förekommer bara på vissa delar av kroppen med tjock hud (Ross & Pawlina, 2011).



Figur 1. Schematisk bild över desmosomens uppbyggnad. Desmosomproteinerna består av tre familjer: cadheriner, armadilloproteiner och plakiner. Cadherinerna desmoglein (Dsgs) och desmocollin (Dscs) finns transmembrant och binder till armadilloproteinerna plakoglobin (PG) och plakophilin (PKPs) 1–3. Desmoplakin (DP) binder till det intermediära filamentet (IF). Desmosomernas struktur skiljer sig något åt beroende på celltyp. Modifierad efter Green & Simpson, 2007.

### *Stratum corneum* – skyddet mot omvärlden

*Stratum corneum*, slutligen, består av flera skikt av döda och utplattade keratinocyter, som här kallas *korneocyter*, vilka är celler som är helt keratiniserade, utan cellkärnor eller organeller, och som tillsammans med fria fettsyror, kolesterol och ceramider (lipider) bildar en skyddande hudbarriär (Marsella *et al.*, 2011). Desmosomerna kallas i det här lagret för *korneodesmosomer* och deras funktion är att

binda ihop korneocyterna och ge stratum corneum hållfasthet och styrka. Korneodesmosomernas bindningar till varandra regleras bl.a. av proteaser och proteashämmare (Cork *et al.*, 2009). Korneocyterna kan liknas vid tegelstenar och det omgivande lipidlagret vid murbruk (Lopez-Pajares *et al.*, 2013). Korneocyterna innehåller en 'naturligt fuktgivande faktor' (natural moisturizing factor, NMF), som utgår från profilaggrin och filaggrin och som bidrar till att binda vatten (figur 2). Även de lipidlameller som omsluter korneocyterna har denna funktion (Cork *et al.*, 2009).

### 2.2.2 Den defekta huden

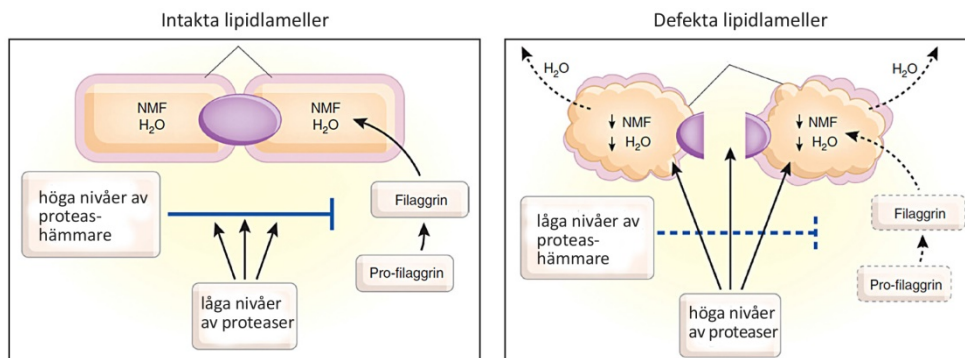
Flera studier har visat att hudens struktur och sammansättning är förändrad hos atopiska hundar. Fortfarande är forskarna som tidigare nämnts inte på det klara med om förändringarna är primära eller sekundära till CAD. En studie visade att lipidlamellerna i stratum corneum uppvisade stor heterogenitet, onormal struktur och minskad tjocklek i huden hos atopiska hundar (Inman *et al.*, 2001). Ett försök av Marsella *et al.* beskrev hur allergener förändrade det ultrastrukturella utseendet av epidermis. Ett extrakt av *Dermatophagoides farinae* applicerades direkt på huden på atopiska hundar och elektronmikroskopbilder kunde åskådliggöra att det intracellulära utrymmet ökade och att utrymmet fylldes med amorfa lipider. Lipidlamellerna visade sig också vara mer oorganiserade än tidigare (Marsella *et al.*, 2010). En annan studie där sensitiserade hundar utsattes för *D. farinae* visade att ceramidhalten i stratum corneum temporärt minskade, enligt forskargruppen som en sekundär effekt av inflammationen (Stahl *et al.*, 2012).

På människor med AD har den vattenförlust som sker genom huden (transepidermal water loss, TEWL) uppmätts och mängden fukt som avges genom huden har visat sig hänga samman med sjukdomens svårighetsgrad. Däremot har inga genvarianter identifierats som är associerade med ökad risk för TEWL (Marsella *et al.*, 2011). Resultat vid TEWL-mätning på hundar har visat att det sker en högre vattenförlust via huden på atopiska hundar, men eftersom mätningarna är svåra att återupprepa är TEWL inte en tillförlitlig metod för att mäta och jämföra hudens barriärfunktion (Olivry, 2011). Ett förändrat Th-2-svar och en bakterieinfektion kan också resultera i ett minskat ceramidinnehåll i huden, vilket i sin tur leder till en ökad TEWL (Marsella *et al.*, 2011).

Proteinet filaggrin samt olika proteaser och proteashämmare är också mycket viktiga komponenter i hudbarriären. En minskning av profilaggrin eller filaggrin leder till ett svagare stratum corneum och större vattenförlust. En defekt hudbarriär som ett resultat av reducerat filaggrin anses som den kanske viktigaste orsaken till ett ökat upptag av allergener via huden hos människor (Sandilands *et al.*, 2009). Hudbiopsier från hundar med CAD som utsatts för allergen visade i en undersökning att filaggrin uttrycktes heterogent i jämförelse med friska individer (Marsella



*et al.*, 2011). En annan studie visade emellertid att uttrycket av filaggrin inte kunde relateras till graden av AD på hundar (Marsella, 2013). Proteasernas funktion är att bryta korneodesmosomernas bindningar till varandra och på så sätt reglera hudavstötningen (fjällningen/mjällningen) som ständigt pågår i den friska huden (figur 2). En störning i balansen mellan proteaserna och proteashämmarna kan allvarligt störa hudbarriärens funktion (Cork *et al.*, 2009).



Figur 2. Schematisk bild över proteaser och proteashämmare. Vid höga nivåer av proteashämmare förmår inte proteaserna bryta sönder korneodesmosomernas bindningar. Om så sker löses lipidlamellerna som omger korneocyterna sönder och det sker en vattenförlust genom huden. Bilden är modifierad efter Cork *et al.*, 2009.

Hudens pH är ännu en komponent som är kopplad till atopisk dermatit. I stratum granulosum är pH-värdet neutralt, för att i stratum corneum vanligtvis hålla sig mellan 4,5–6 (Ross & Pawlina, 2011). Hudens normalt något sura yta fungerar antibakteriellt och bevarar hudbarriärens homeostas. En förändring i pH-värdet kan exempelvis påverka hudavstötningen negativt (Cork *et al.*, 2009).

### 2.3 Genetiska riskfaktorer för CAD

Sedan hundens genom kartlades (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) har ett intensivt sökande efter gener som är kopplade till olika sjukdomar pågått. Atopisk dermatit är en komplex sjukdom där flera genetiska riskfaktorer samverkar med miljöfaktorer vid utvecklandet av sjukdomen. Hundens genom har genomgått två s.k. bottlenecks (flaskhalsar): den första när urhunden skiljdes från vargen och den andra under de senaste århundradena när de moderna hundraserna avlades fram utifrån fenotyper.

Single nucleotide polymorphisms (SNP) som finns på samma haplotyp – en samling alleler som nedärvs tillsammans – sägs vara i *kopplingsojämvikt* (linkage disequilibrium, LD) med varandra (Tengvall, 2015). Hundar har en stark LD och människan en svag LD (Wood *et al.*, 2010). Detta innebär att längre haplotyper

delas inom en och samma hundras och att hundens genom är förhållandevis enklare att genomsöka än människans. Hos hundar är de genförändringar som är associerade med ökad risk för att utveckla sjukdom i en ras (som drabbats av sjukdom) identiska, de är "identiska genom arv" (eng. identical-by-descent). Hos människor är detta endast fallet mellan familjemedlemmar eller nära släktingar, vilket betyder att personer med en och samma sjukdom kan ha olika mutationer som ger samma sjukdomsfenotyp (Tengvall, 2015).

Genetiska associationsstudier av människans genom kräver fler individer i de fall-kontroll-grupper som analyseras jämfört med vad som krävs vid motsvarande studier på hundar, omkring 1000 individer (Nuttall, 2013). För komplexa sjukdomar vid studier av hundens genom ger ett antal om 100 affekterade respektive 100 friska individer en chans på 97 % att hitta ett associerat locus (Lindblad-Toh *et al.*, 2005).

Den studiepopulation som väljs ut baseras först på en epidemiologisk studie där en lämplig hundras identifieras. Idealiskt är om de genetiska riskfaktorerna segregerar i populationen, d.v.s. de skall inte vara för vanliga och inte för ovanliga. När en sådan population har identifierats väljs de individer ut som skall ingå i studien; en frisk kontrollgrupp jämförs med en grupp sjuka individer. När det gäller CAD jämförs vanligen en frisk kontrollgrupp med atopiska hundar med hudlesioner, men även ibland med atopiska hundar utan hudlesioner. Den kliniska valideringen görs av en veterinär. Urvalsprinciperna måste vara strikta. Flera faktorer måste tas hänsyn till för att resultaten inte skall bli missvisande. Både fall- och kontrollgrupperna skall vara så obesläktade som möjligt, risken är annars att det uppkommer falska kopplingar som inte har med den eftersökta fenotypen (sjukdomen) att göra. Individerna skall också komma ur samma population och inte vara stratifierade (det skall inte finnas subpopulationer) (Tengvall *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Några genetiska begrepp

#### *Regulatoriska mutationer respektive strukturella mutationer*

I varje gen finns regulatoriska regioner som styr var, när och i vilka celler som genen skall komma till uttryck. Den regulatoriska regionen läses av regulatoriska transkriptionsfaktorer, ett slags proteiner med DNA-bindande regioner som reglerar transkriptionen, d.v.s. RNA-syntesen. En *regulatorisk mutation* innebär att genens kodande region är intakt men att en mutation antingen leder till att en gen är aktivt transkriberad, "påslagen" (*överuttryckt*), hela tiden eller till att en gen blir helt eller delvis "tyst" (*underuttryckt*) (Griffiths, 2012). De flesta mutationer som associerats till CAD är regulatoriska, och det förekommer skillnader mellan olika raser och populationer när det gäller vilka genvarianter som är överuttryckta respektive underuttryckta (Tengvall, 2015).

### *Penetrans*

*Penetrans* innebär att en genvariant kan ha olika genomslagskraft, dels beroende på vilken typ av mutation det rör sig om men också av alla de andra genvarianter individen har, den ”genetiska bakgrunden”. Exempelvis behöver en individ med en dominant (sjuklig) mutation inte uppvisa sjukdomstecken på grund av att genen hos denna individ har en reducerad penetrans. Individer med full penetrans drabbas däremot av sjukdomen. Fenotypen kommer med andra ord att skilja sig mellan individerna, trots att de har samma (defekta) gen. Till komplexiteten hör också att andra gener kan fungera skyddande respektive sjukdomsstimulerande. Även miljöfaktorer kan påverka fenotypen hos olika individer med samma genotyp (Griffiths, 2012).

### 2.3.2 Genome-Wide Association Studies (GWAS)

Genome-wide association studies (GWAS; ung. ’Genom-vida associationsstudier’) är en metod som förutsättningslöst (eng. unbiased) söker efter genetiska varianter som är associerade med en väl definierad fenotyp, t.ex. ökad risk att utveckla sjukdom. Metoden har flera fördelar gentemot andra kandidatgenmetoder därför att studien kan utföras förutsättningslöst utan att någon tidigare identifierad genvariant behöver vara känd. GWAS identifierar områden av SNP:ar på en region (haplotyp) i genomet som oftare förekommer hos sjuka individer i jämförelse med en frisk kontrollgrupp och ett helt genom kan undersökas på detta sätt, utan risk för att någon genvariant skall förbises (Griffiths, 2012).

Den första GWAS-studien på CAD gjordes 2009 och identifierade bl.a. två ras-specifika SNP:ar hos golden retrievers som var associerade till CAD, varav en (*RAB3C*) är kopplad till hudbarriären (Wood *et al.*, 2009b). Studien använde tyvärr ett för litet antal SNP:ar och hade stora ”luckor”, konstaterade forskarna själva, bl.a. täcktes inte regionen för filaggrin (Wood *et al.*, 2010).

En GWAS-studie görs genom att ett stort antal SNP-markörer genotypas. Mängden markörer bestäms av antalet informativa SNP:ar som fungerar i alla populationer i den undersökta arten i fråga, för närvarande innehåller den array som används för hund cirka 170 000 SNP:ar. Resultaten valideras av en eller flera statistiska metoder för att få en signifikans för varje SNP på  $p < 0,05$ . Fram träder en s.k. Manhattan-plot (se figur 3A) som definierar en region på en kromosom där genetisk association förekommer. Efter att en region har identifierats måste regionen sekvenseras hos sjuka hundar och jämföras med en sekvens från en frisk hund i syfte och förhoppning att identifiera en eller flera positioner i genomet som kan utgöra en kandidatmutation (den genvariant som orsakar sjukdomen). De intressanta regionerna genomgår ytterligare finmappningar och resekvenserings, både i sjuka och friska individer (se figur 3B–C) (Tengvall *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Genetikstudier som funnit samband mellan CAD och hudbarriären

Forskningen har i dagsläget funnit åtskilliga genvarianter kopplade till AD hos hund, framför allt genom microarray-analyser av mRNA men även några GWAS-studier. Microarray-analyser kan undersöka stora mängder av gener, men risken med metoden är att falskt positiva kopplingar uppträder (Nuttall, 2013). De genvarianter som hittills upptäckts visar associationer till bland annat immunförsvaret och hudbarriären. Övriga patofysiologiska områden där forskarna hittat associationer med CAD är bl.a. inflammation, cellcykel, apoptos, reparation eller uppkomst av skador, reglering av transkription eller translation (Merryman-Simpson *et al.*, 2008; Schamber *et al.*, 2014).

I Tabell 1 redovisas de genvarianter som forskarna hittills associerat med hudbarriären och CAD. Tabellen utgår med några undantag från Nuttalls indelning (Nuttall, 2013). Ändringar eller tillägg redovisas i tabellen. Efter tabellen redogörs för några av dessa genvarianter.

Tabell 1. *Gener kopplade till hudbarriären inblandade i atopisk dermatit på hund. Modifierad efter Nuttall, 2013.*

Gen	Uppreglerad/ Nedreglerad	Typ av studie	Förmodad relevans för CAD
GOLGA4 underfamilj a5 GOLGA4 underfamilj a4	Uppreglerad	Microarray	Golgi-apparaten; glykolysering och transport av proteiner och lipider (Merryman-Simpson <i>et al.</i> , 2008)
SPINK5	Uppreglerad	qPCR	Reglering av proteolys och keratinocyt-differentiering; filaggrinfunktion; Th2-polarisering
SGPL1	Uppreglerad	qPCR	Reglering av hudbarriären; antimikrobiell aktivitet; keratiocytproliferation och differentiering
Mucin-15	Uppreglerad	Microarray	Celladhesion till matrix
PKP2 <sup>1</sup>	Uppreglerad	GWAS	Hudstrukturen; uppreglerar T-cellsaktivitet och överlevnad
Mucin-2	Nedreglerad	Microarray	Mucinskyddet i mucosan
Tight junction protein 3	Nedreglerad	Microarray	Signaltransduktion; celladhesion
S100A8 <sup>2</sup>	Uppreglerad	microarray; qPCR	Har flera funktioner i immunförsvaret, men påverkar även proliferationen av keratinocyter och fibroblaster (Kerkhoff <i>et al.</i> , 2012)
PPAR $\gamma$	Nedreglerad	qPCR	Minskad bildning av lamellära kroppar och lipidbearbetning, antiinflammatorisk
FLG		SNP	Förändring av filaggrinuttrycket och funktionen inom CAD och human AD
FLG2 <sup>3</sup>	Nedreglerad	microarray; RT-PCR	Samverkar med filaggrin (Schamber <i>et al.</i> , 2014)
FLG <sup>4</sup>	Uppreglerad	qRT-PCR	(Santoro <i>et al.</i> , 2013)

ASPRV1 <sup>5</sup>	Nedreglerad	microarray; RT-PCR	Asparbinsyrapeptidas, medverkar i processen från profilaggrin till filaggrin (Schamber <i>et al.</i> , 2014)
RAB3C		GWAS	Inblandad i bildningen av hudbarriären och fettlagret i epidermis (Wood <i>et al.</i> , 2009b)

<sup>1</sup>Nuttall (2013) placerar PKP2 i kategorin "Inflammation eller immunologi". PKP2 har senare identifierats som en möjlig kandidatgen med koppling till hudbarriärens funktion (Tengvall, 2013).

<sup>2</sup> Nuttall (2013) placerar S100A8 i kategorin "Inflammation eller immunologi".

<sup>3-5</sup> Ej noterade hos Nuttall (2013).

### *Filaggrin, FLG*

Inom forskningen på människa anses identifieringen av genetiska mutationer (*loss of function*) i proteinet filaggrin (*FLG*) vara den största riskfaktorn för utvecklingen av AD. Filaggrin upprätthåller en stark hudbarriär genom att binda till keratinfilament i stratum corneum (Tengvall, 2015) och mutationer i *FLG* predisponerar för ökad sensitisering av allergen via huden (Marsella *et al.*, 2011; Olivry, 2011). Filaggrin omvandlas till natural moisturizing factor (NMF) som bevarar ett lågt pH i huden och fungerar antibakteriellt (Cork *et al.*, 2009). Några enhetliga forskningsresultat som visar på samband mellan filaggrin och CAD har inte kunnat beläggas. En GWAS-studie har hittat en förändrad filaggrin-gen (*FLG*) hos labrador retrievers i Storbritannien, men urvalet var litet och statistiskt osäkert (Wood *et al.*, 2010). En annan GWAS-studie på west highland white terriers i USA kunde avfärda en koppling mellan CAD och filaggrin i denna ras (Salzmann *et al.*, 2011). En undersökning visade att uttrycket av mRNA-filaggrin (*FLG*) i huden är högre hos atopiska hundar. Biopsier från sex stycken friska respektive sju sjuka hundar jämfördes med hjälp av quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). Märkligt nog överensstämde inte resultatet med uttrycket av själva proteinet filaggrin i huden. Orsaken kan enligt forskarna vara en ökad degradering av proteinet, vilket via en feed-back-mekanism skulle kunna leda till ett ökat uttryck av *FLG*-mRNA. Det förändrade uttrycket av filaggrin kunde alternativt bero på att Th2-cytokiner minskar mängden av filaggrin, d.v.s. utan hjälp av genetisk mutation (Santoro *et al.*, 2013). Slutligen fann den tidigare nämnda studien av Schamber *et al.* (se avsnitt 2.2) att filaggrin 2 (*FLG2*) samt ett asparbinsyrapeptidas (*ASPRV1*), som är involverat i processen av profilaggrin till filaggrin, var nedreglerade hos de sensiterade hundarna (Schamber *et al.*, 2014).

### *SPINK5, SGPL1 och PPAR $\gamma$*

En kvantitativ s.k. qPCR-studie, som undersökte uttrycket av mängden mRNA i biopsier från både friska hundar och hundar med AD (17 respektive 20 stycken av olika raser), hittade skillnader i flera proteashämmare, bl.a. serine protease inhibitor kazal type-5 (SPINK5) och sphingosine-1-phosphate lyase-1 (SGPL1). SPINK5 befanns vara uppreglerad i hudlesioner, och resultaten stod även i proportion med en graderad skala (intradermal allergen test, IDT) efter kliniska symptom som användes i studien. SPINK5 reglerar bl.a. keratinocyternas differentiering och proteolysen i epitelet. SGPL1, som också var uppreglerad, är bl.a. involverad i keratinocyternas proliferation och differentiering (Wood *et al.*, 2009a). Samma studie påvisade också att peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) var relaterad till CAD. PPAR $\gamma$  har en antiinflammatorisk funktion men är också associerad till hudbarriären. Resultaten visade en signifikant skillnad mellan atopiska hundar med hudlesioner (där PPAR $\gamma$  var underuttryckt) respektive utan lesioner. PPAR $\gamma$  har även visat sig vara inblandad i AD hos människa (Wood *et al.*, 2009a).

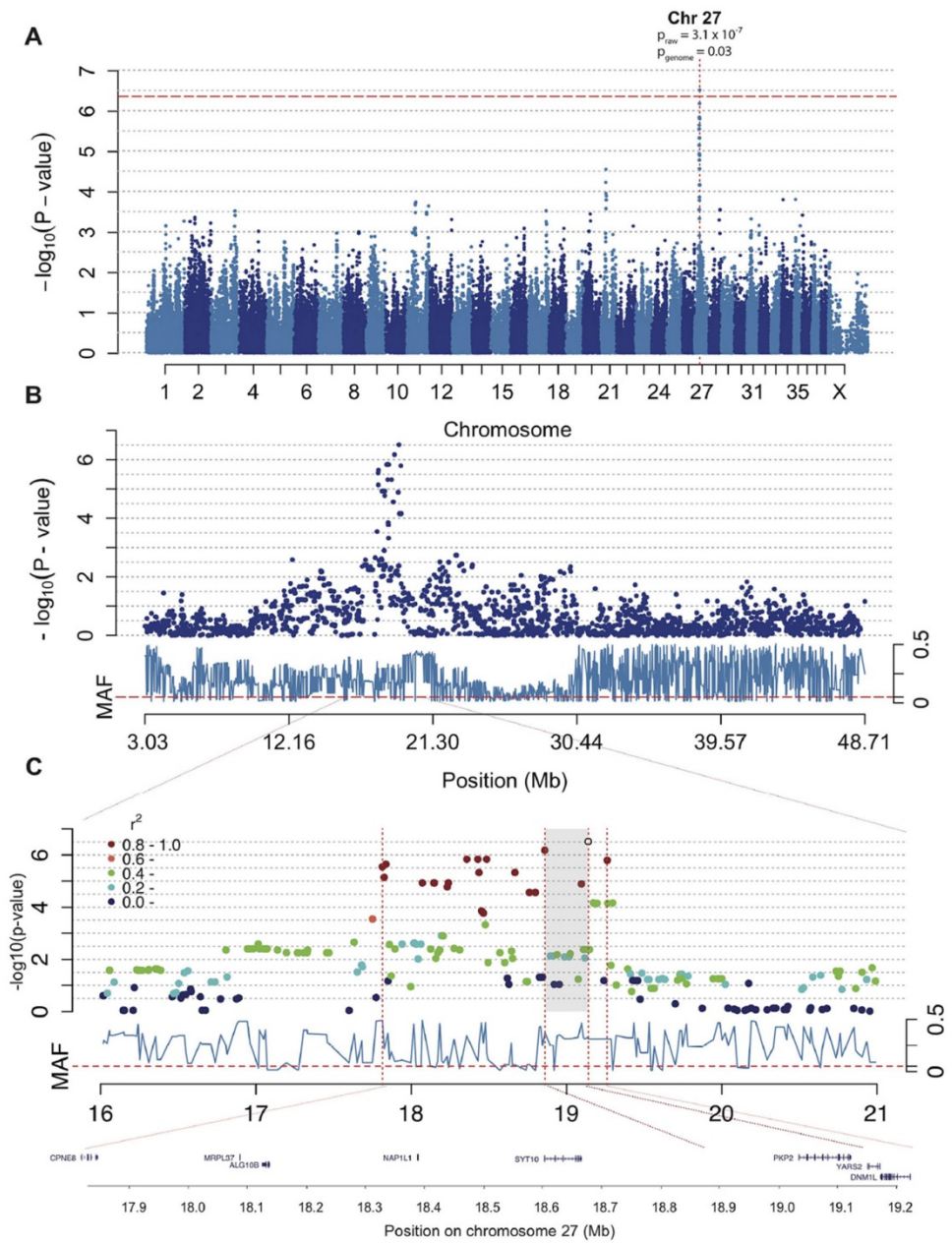
Mutationer i gener som kodar för proteaser och proteashämmare har påvisats inom forskning på människa. Exempelvis kan en mutation i genen *KLK7* (gen som kodar för ett kallikrein, ett serinproteas) leda till ökad hudavstötning (fjällning) i stratum corneum. *KLK7* tycks däremot inte utgöra kandidatgen för CAD, åtminstone inte i raserna boxer eller west highland white terrier (Marsella *et al.*, 2011).

### *S100A8/A9*

Genvarianterna *S100A8/A9* kodar för ett proinflammatoriskt cytokin, S100 kalciumbindande protein A, som bland annat finns uttryckt i epitelet och som ökar keratinocyternas differentiering vid inflammation. *S100A8/A9* binder även till keratinfilament i epidermis (Kerkhoff *et al.*, 2012). En microarray-studie visade ett nästan 23 gånger så högt uttryck av *S100A8* i huden på atopiska hundar med hudlesioner (16 st.), i jämförelse med huden hos atopiska hundar utan hudlesioner (17 st.). Forskarna konstaterade att *S100A8* antagligen främst har en inflammatorisk funktion, eftersom det inte var särskilt förekommande i atopisk hud utan hudlesioner. Samtidigt kunde nedregleringen av gener som är relaterade till kalciumtransporten, bl.a. *S100A8*, i atopisk hud utan hudlesioner här tyda på en brist av antiinflammatoriska stimuli (Merryman-Simpson *et al.*, 2008). *S100A8* har också funnits korrelerad till CAD i andra studier (Wood *et al.*, 2009a). I en studie på människa lokaliserades S100-proteiner till kromosom 1q21, i närheten av bl.a. profilaggrin och andra genvarianter relaterade till epidermis, vilket kan tyda på att de regleras tillsammans. Studien fann emellertid inte att *S100A8/A9* var uppreglerad vid AD på människa (Kerkhoff *et al.*, 2012).

### *Plakophilin 2, PKP2*

Plakophilin (PKP) är ett centralt protein som ingår i desmosomernas struktur (figur 1). I en GWAS-studie på svenska schäfrar togs blodprov från alla hundar som ingick i studien (91 hundar med CAD och 88 kontroller). Åtta regulatoriska gener på kromosom 27 utmärkte sig – *CPNE8*, *MRPC37*, *ALG10B*, *NAP1L1*, *SYT10*, *PKP2*, *YARS2* och *DNM1L* – varav de två starkast associerade SNParna täckte regionen runt *PKP2* (figur 3C). I huden finns PKP2 uttryckt i stratum basale och stratum spinosum, d.v.s. i de djupare lagren av epidermis. Efter en resequensering av regionen på kromosom 27 och närmare associationsstudier av SNP:ar och riskhaplotyper bekräftades att *PKP2* sannolikt är en stark kandidatgen för CAD och av intresse för vidare studier på AD på människa. Studien kunde också visa att det fanns skillnader mellan två subpopulationer bland de svenska schäfrarna, en brukstyp och en utställningstyp, där den senare visade större sannolikhet för att utveckla CAD och som dessutom visade sig ha lägre IgA-nivåer än den andra subpopulationen (se ovan, 2.1.3, ”Immunförsvaret”) (Tengvall *et al.*, 2013).



Figur 3. A. Manhattan-plot som visar signifikant association vid kromosom 27. B visar SNPar fördelade över hela kromosom 27. I C ses de två starkast associerade SNPar (skuggat område) som omger PKP2-genen. De röda prickarna representerar SNPar med högt LD. Minor allele frequencies (MAF). Modifierad efter Tengvall *et al.*, 2013.



### 3 Diskussion

Multifaktoriella sjukdomar med komplex genetisk bakgrund är en utmaning, inte minst för forskningen men också i den kliniska verkligheten. Atopisk dermatit hos hund (CAD) är en sådan sjukdom.

CAD associeras framför allt med defekter i immunsystemet och hudbarriären, men även miljöfaktorer påverkar prevalensen. Syftet med den här uppsatsen har varit att ge en överblick över den genetiska bakgrunden till CAD med tyngdpunkt på hudbarriären och de genvarianter som är förenade med ökad risk för att utveckla sjukdomen. En av frågeställningarna har varit att ta reda på vilka genvarianter som forskningen har hittat och vilka skador i hudbarriären som de är associerade med. För att kunna besvara den frågan har en beskrivning av en frisk respektive defekt hudbarriär varit nödvändig.

CAD uppvisar en klar genetisk koppling och förekommer oftare i vissa hundraser än andra. Hundar och människor lever i samma miljöer, de utsätts för samma allergen och uppvisar likartade symtom. Både hos människor och hundar har prevalensen av AD ökat, sannolikt på grund av en samverkan mellan genetik och miljö (Cork *et al.*, 2009). Tack vare att hundens genom innehåller längre haplotyper som nedärvs tillsammans är hundens genom relativt enklare att söka igenom än människans. En annan viktig aspekt är att de genförändringar som är associerade med ökad risk att utveckla sjukdom är identiska hos alla de hundar inom rasen som drabbas av sjukdom. Inom genetik identifieras sådana mutationer som "identiska genom arv" (eng. identical-by-descent). Hos människa är det bara fallet mellan familjemedlemmar eller nära släktingar och därför kan olika patienter ha helt olika mutationer som ger samma sjukdomsfenotyp. Av den orsaken fungerar hunden ofta som en utmärkt modell för att identifiera genetiska riksfaktorer för människans sjukdomar, så även vid AD (Tengvall, 2015).

Den exakta nedärvningen av de olika mutationerna som leder till CAD och andra komplexa sjukdomar kan sannolikt inte helt utredas. Nedärvningen anses vara komplex med ett stort antal samverkande genetiska riskfaktorer. De skillnader som finns mellan raser i olika geografiska områden beträffande fenotyperna kan

delvis förklaras med att genpolerna varierar (Nuttall *et al.*, 2013), och att hundraser antagligen uppvisar olika SNP:er med olika penetrans för en och samma sjukdom (Wood *et al.*, 2009b).

En av frågeställningarna i den här uppsatsen har varit att ta reda på vilka genvarianter som hittills har påträffats och som visar samband med CAD. Tim Nuttall sammanfattade i en review-artikel 90 genvarianter (Nuttall, 2013). De flesta genvarianter är regulatoriska och leder antingen till upp- eller nedreglerat genuttryck inom bl.a. följande patofysiologiska områden: inflammation eller immunologi, cellcykel, apoptos, transport eller reglering, hudbarriär och reglering av transkription eller translation. Tabell 1 utgör en bearbetad översikt över de genvarianter som forskarna funnit mellan hudbarriären och CAD. Det finns inte utrymme i den här litteraturstudien att närmare gå in i de övriga patofysiologiska områden som Nuttall listar och som antagligen innehåller genvarianter som på ett eller annat sätt är involverade i hudbarriären.

De vanligaste metoderna för att hitta gener har utförts med microarray-teknik och PCR. I de flesta studier har forskarna tagit hudbiopsier från sjuka respektive friska hundar varifrån mängden mRNA tas fram. Om genuttrycken skiljer sig åt finns en koppling. Flera studier delar in studiepopulationen i tre kategorier: friska, atopiska hundar utan hudlesioner samt atopiska hundar med lesioner. Risken är att falskt positiva kopplingar uppträder och att den förändrade gentranskriptionen i vävnaden bara är en sekundär effekt av själva sjukdomsprocessen (inflammationen) (Nuttall, 2013). En defekt hudbarriär innebär sannolikt att upptaget av allergen ökar, men huruvida hudförändringarna är en primär orsak till CAD eller en konsekvens av den immunologiska reaktionen är fortfarande okänt.

Flera studier har använt sig av genome-wide associations studies (GWAS), en hypotesfri metod som kan söka igenom hela genom utan att någon tidigare misstänkt genvariant måste vara känd. GWAS anses vara den metod som har flest fördelar i förhållande till andra gentekniker. För att inte resultaten skall bli vilseledande bör de individer som jämförs vara av samma ras, så obeläktade som möjligt och ej stratifierade. Hänsyn måste även tas till t.ex. variationer inom en ras och skillnader mellan raser från olika geografiska områden (Wood *et al.*, 2010; Bizikova *et al.*, 2015; Tengvall, 2015). Det har visat sig att de flesta studier som behandlats i den här uppsatsen, med undantag av Tengvall *et al* 2013, inte har tagit dessa premisser i beaktande, och det är uppenbart att det behövs mer forskning som använder sig av strikta populationsunderlag.

Några av genvarianterna med koppling till CAD har belagts i flera studier. Inom forskning på människa anses mutationer i filaggrin-genen vara den största riskfaktorn för utveckling av AD, men samma enhetliga resultat har inte kunnat påvisas i studier av CAD. Exempelvis hittade en GWAS-studie en förändrad filaggrin-gen hos labrador retrievers i Storbritannien, medan en annan GWAS på west highland

white terriers i USA inte kunde finna en koppling mellan CAD och filaggrin i denna ras (Wood *et al.*, 2010; Salzmänn *et al.*, 2011). Resultaten stämmer väl överens med uppfattningen att genotyperna för CAD är rasspecifika och att detta även förklarar de skillnader som förekommer i de kliniska fenotyperna (Bizikova *et al.*, 2015). Proteaser och proteashämmare reglerar hudavstötningen genom att bryta (eller hämma brytningen av) korneodesmosomernas bindningar till varandra. *SPINK5* och *SGPL1* visade sig i en studie vara uppreglerade i atopisk hud (Wood *et al.*, 2009a). *PPAR $\gamma$*  är en antiinflammatorisk molekyl som också är kopplad till hudbarriären. En undersökning har pekat på att *PPAR $\gamma$*  är markant nedreglerat i huden på atopiska hundar med lesioner i jämförelse med hundar med AD utan lesioner (Wood *et al.*, 2009a). *S100A8/A9* kodar för S100 kalciumbindande protein A, som är involverad bl.a. i keratinocyternas differentiering. Flera studier har hittat samband mellan *S100A8/A9* och CAD. *S100A8/A9* har sannolikt främst en inflammatorisk funktion eftersom förändringarna syns främst i hud med lesioner (Merryman-Simpson *et al.*, 2008), förmodligen gäller samma sak för *PPAR $\gamma$* . I en nyligen genomförd GWAS-studie där blodprov togs på svenska schäfrar utmärkte sig en region kring *PKP2* på kromosom 27. Det gör plakophilin 2-genen till en mycket stark kandidatgen för CAD och intressant även för forskningen på AD på människa (Tengvall *et al.*, 2013). Det är den enda studien i denna litteraturoversikt som använt sig av ett tillräckligt stort populationsunderlag som tillhör samma ras och samma geografiska område. Den stratifiering som upptäcktes mellan två subpopulationer kunde forskarna korrigera för.

Nya rön inom CAD, både kliniska och inom genetiken, kan i framtiden förhoppningsvis leda till förebyggande och mer riktade behandlingar. Däremot är det inte troligt att framstegen inom den genetiska forskningen kommer att kunna användas i avelsarbetet eftersom det av flera anledningar är omöjligt att avla bort en genetiskt komplex sjukdom (Bizikova *et al.*, 2015) med hög arvbarhet och hög prevalens inom en och samma ras. I Svenska kennelklubbens (SKKs) rekommendationer och information om DNA-tester finns flera förbehåll när det gäller DNA-tester av sjukdomar. Enligt SKKs grundregler får en individ som bär på ett sjukdomsanlag bara paras med en konstaterat frisk individ: ”Hund som visat sig vara bärare av enkelt anlag för allvarlig sjukdom med recessiv nedärvning får användas i avel, men endast i kombination med genetiskt/hereditärt friförklarad hund”. Men ännu mer komplicerat blir det när sjukdomen har en komplex genetisk bakgrund och där en ”utbredd användning av DNA-tester kan [---] medföra negativa konsekvenser för rasens hälsa och avelsbas”, eftersom uppfödare inom organisationen är skyldiga att ta hänsyn till resultatet av alla DNA-tester (”Information och policy om DNA-tester”, <http://www.skk.se/sv/uppfodning/halsa/dnatester/Generell-policy/>).

## Referenslista

- Bizikova, P., Pucheu-Haston, C.M., Eisenschenk, M.N.C., Marsella, R., Nuttall, T. & Santoro, D. (2015). Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(2).
- Björnhag, G., Jonsson, E., Lindgren, E., Malmfors, B. (1989). Husdjur - ursprung, biologi och avel. Kap. Avelslärans grunder av Birgitta Malmfors. Bok. LTs förlag, Stockholm. Centraltryckeriet i Borås., ss. 315-354.
- Cork, M.J., Danby, S.G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M.E., Moustafa, M., Guy, R.H., Macgowan, A.L., Tazi-Ahnini, R. & Ward, S.J. (2009). Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129(8), ss. 1892-908.
- Elias, P.M. & Steinhoff, M. (2008). "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 128(5), ss. 1067-70.
- Green, K.J. & Simpson, C.L. (2007). Desmosomes: New perspectives on a classic. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), ss. 2499-2515.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Carroll, S.B., Doebley, J. (2012). *Introduction to genetic analysis*. International 10. ed. New York: New York : W. H. Freeman. Kap. 6, 19, ss. 199–234, 655–697.
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(3-4), ss. 207–208.
- Hillier, A. & Griffin, C.E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): Incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), ss. 147-151.
- Inman, A.O., Olivry, T., Dunston, S.M., Monteiro-Riviere, N.A. & Gatto, H. (2001). Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Veterinary Pathology*, 38(6), ss. 720-723.
- Kerckhoff, C., Voss, A., Scholzen, T.E., Averill, M.M., Zaenker, K.S. & Bornfeldt, K.E. (2012). Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology. *Experimental Dermatology*, 21(11), ss. 822-826.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X.H., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., deJong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M.J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.P., Parker, H.G., Pollinger, J.P., Searle, S.M.J., Sutter, N.B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E.S. & Broad Inst Genome Sequencing, P. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), ss. 803-819.
- Lopez-Pajares, V., Yan, K., Zarnegar, B.J., Jameson, K.L. & Khavari, P.A. (2013). Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. *Trends in Genetics*, 29(1), ss. 31-40.

- Marsella, R. (2014). The aberrant immune system in atopic dermatitis. In Noli, C., Foster A., Rosenkrantz, W. (red.). *Veterinary Allergy*. Chichester: Wiley Blackwell. E-bok, ss. 16-23.
- Marsella, R. (2013). Does filaggrin expression correlate with severity of clinical signs in dogs with atopic dermatitis? *Vet Dermatol*, 24(2), ss. 266-e59.
- Marsella, R., Olivry, T., Carlotti, D.-N. & Int Task Force On Canine Atopic, D. (2011). Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(3), ss. 239-248.
- Marsella, R., Samuelson, D. & Doerr, K. (2010). Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), ss. 80-87.
- Merryman-Simpson, A.E., Wood, S.H., Fretwell, N., Jones, P.G., McLaren, W.M., McEwan, N.A., Clements, D.N., Carter, S.D., Ollier, W.E. & Nuttall, T. (2008). Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Veterinary Dermatology*, 19(2), ss. 59-66.
- Nuttall, T. (2013). The genomics revolution: will canine atopic dermatitis be predictable and preventable? *Veterinary Dermatology*, 24(1), ss. 10-e4.
- Nuttall, T., Uri, M. & Halliwell, R. (2013). Canine atopic dermatitis - what have we learned? *Veterinary Record*, 172(8), ss. 201-207.
- Olivry, T. (2011). Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1-2), ss. 11-16.
- Olivry, T., DeBoer, D.J., Griffin, C.E., Halliwell, R.E., Hill, P.B., Hillier, A., Marsella, R. & Sousa, C.A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Vet Immunol Immunopathol*, 81(3-4), ss. 143-6.
- Olsson, M., Frankowiack, M., Tengvall, K., Roosje, P., Fall, T., Ivansson, E., Bergvall, K., Hansson-Hamlin, H., Sundberg, K., Hedhammar, A., Lindblad-Toh, K. & Hammarstrom, L. (2014). The dog as a genetic model for immunoglobulin A (IgA) deficiency: Identification of several breeds with low serum IgA concentrations. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(3-4), ss. 255-259.
- Owczarek-Lipska, M., Lauber, B., Molitor, V., Meury, S., Kierczak, M., Tengvall, K., Webster, M.T., Jagannathan, V., Schlotter, Y., Willemse, T., Hendricks, A., Bergvall, K., Hedhammar, A., Andersson, G., Lindblad-Toh, K., Favrot, C., Roosje, P., Marti, E. & Leeb, T. (2012). Two Loci on Chromosome 5 Are Associated with Serum IgE Levels in Labrador Retrievers. *Plos One*, 7(6).
- Roque, J.B., O'Leary, C.A., Kyaw-Tanner, M., Latter, M., Mason, K., Shipstone, M., Vogelnest, L. & Duffy, D. (2011). High allergen-specific serum immunoglobulin E levels in nonatopic West Highland white terriers. *Veterinary Dermatology*, 22(3), ss. 257-266.
- Ross, M.H. & Pawlina, W. (2011). *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*, ss. 488-512. Sixth Edition.
- Salzmann, C.A., Olivry, T.J., Nielsen, D.M., Paps, J.S., Harris, T.L. & Olby, N.J. (2011). Genome-wide linkage study of atopic dermatitis in West Highland White Terriers. *BMC Genetics*, 12(1), ss. 1-6.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D. & McLean, W.H.I. (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science*, 122(9), ss. 1285-1294.
- Santoro, D., Marsella, R., Ahrens, K., Graves, T.K. & Bunick, D. (2013). Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 24(3), ss. 329-e73.
- Schamber, P., Schwab-Richards, R., Bauersachs, S. & Mueller, R.S. (2014). Gene expression in the skin of dogs sensitized to the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *G3 (Bethesda)*, 4(10), ss. 1787-95.

- Shaw, S.C., Wood, J.L.N., Freeman, J., Littlewood, J.D. & Hannant, D. (2004). Estimation of heritability of atopic dermatitis in Labrador and Golden Retrievers. *American Journal of Veterinary Research*, 65(7), ss. 1014-1020.
- Stahl, J., Paps, J., Baeumer, W. & Olivry, T. (2012). Dermatophagoides farinae house dust mite allergen challenges reduce stratum corneum ceramides in an experimental dog model of acute atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 23(6).
- Svenska kennelklubben (2014-10-09). *SKKs avelskommitté informerar om genetiska tester*. Tillgänglig: <http://www.skk.se/Global/Dokument/Uppfodning/Informationsartikel-om%20dna-tester.pdf> [2016-03-15]
- Tengvall, K. (2015). Genetic Studies in Dogs Implicate Novel Genes Involved in Atopic Dermatitis and IgA Deficiency. Akad. avh. Uppsala universitet, Medicinska och farmaceutiska vetenskapsområdet, Medicinska fakulteten, Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi. ORCID-id: 0000-0003-0424-3571. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2015. , 88 s. ISSN 1651-6206; 1128
- Tengvall, K., Kierczak, M., Bergvall, K., Olsson, M., Frankowiack, M., Farias, F.H.G., Pielberg, G., Carlborg, O., Leeb, T., Andersson, G., Hammarstrom, L., Hedhammar, A. & Lindblad-Toh, K. (2013). Genome-Wide Analysis in German Shepherd Dogs Reveals Association of a Locus on CFA 27 with Atopic Dermatitis. *Plos Genetics*, 9(5).
- Tizard, I.R. (2013). *Veterinary immunology : an introduction*. 9. ed. St. Louis, Mo: St. Louis, Mo: Saunders Elsevier. Kap. 28, ss. 326–345.
- Wilhem, S., Kovalik, M. & Favrot, C. (2011). Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(2), ss. 143–149.
- Wolf, R. & Wolf, D. (2012). Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*, 30(3), ss. 329–334.
- Wood, S.H., Clements, D.N., Ollier, W.E., Nuttall, T., McEwan, N.A. & Carter, S.D. (2009a). Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *Journal of Dermatological Science*, 55(1), ss. 27–33.
- Wood, S.H., Ke, X., Nuttall, T., McEwan, N., Ollier, W.E. & Carter, S.D. (2009b). Genome-wide association analysis of canine atopic dermatitis and identification of disease related SNPs. *Immunogenetics*, 61(11-12), ss. 765–772.
- Wood, S.H., Ollier, W.E., Nuttall, T., McEwan, N.A. & Carter, S.D. (2010). Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 138(3), ss. 193–197.