

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinik für Pferde/Pferdechirurgie

(LeiterIn: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Florian Jenner Dipl.ACVS Dipl.ECVS)

Sind Herpesviren mit equinen okulären Plattenepithelkarzinomen assoziiert?

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Michelle Koch

Wien, im November 2021

Betreuerin:

Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.nat.tech. Sabine Brandt

Klinik für Pferde/Pferdechirurgie

Department für Kleintiere und Pferde der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Gutachter:

Ao.Univ.-Prof Dr med.vet Sabine Sykora

Klinik für Pferde/Pferdechirurgie

Department für Kleintiere und Pferde der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT.....	4
2.1. Herpesviren.....	4
2.1.1. Humane Herpesviren.....	5
2.1.1.1. EBV.....	5
2.1.1.2. CMV.....	7
2.1.1.3. HSV.....	7
2.1.2. Herpesviren bei Equiden.....	8
2.1.2.1. EHV-1.....	8
2.1.2.2. EHV-2.....	10
2.1.2.3. EHV-3.....	11
2.1.2.4. EHV-4.....	12
2.1.2.5. EHV-5.....	12
2.1.2.6. AHV.....	13
2.2. Plattenepithelkarzinome.....	13
3. HYPOTHESE.....	16
4. MATERIAL & METHODEN.....	17
4.1. Material.....	17
4.1.1. Proben.....	17
4.2. Methoden.....	21
4.2.1. DNS-Extraktion.....	21
4.2.2. DNS-Validierung.....	22
4.2.2.1. Photometrie.....	23

4.2.2.2.	β-Aktin PCR.....	23
4.2.3.	Nested PCR.....	26
4.2.4.	Gelelektrophorese	28
4.2.5.	Gelextraktion	30
4.2.6.	Sequenzierung.....	31
4.3.	Auswertung.....	31
5.	ERGEBNISSE.....	33
6.	DISKUSSION	37
7.	ZUSAMMENFASSUNG.....	40
8.	SUMMARY	42
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	44
10.	LITERATURVERZEICHNIS	47
11.	TABELLENVERZEICHNIS.....	55
12.	ANHANG.....	56
12.1.	Verwendete Geräte und Materialien	56
12.1.1.	Verwendete Geräte	56
12.1.2.	Verwendete Reagenzien und Chemikalien	57
12.1.3.	Verwendete Materialien	58
12.1.4.	verwendete Kits.....	58
13.	DANKSAGUNG	59

1. EINLEITUNG

Plattenepithelkarzinome (PEK) sind bei Menschen, aber auch Katzen, Hunden, Rindern und Pferden sehr häufige, wenn nicht die häufigsten malignen Tumore (Dayyani et al. 2010, Scott 2003, Withrow et al. 2013).

Bei PEK handelt es sich um potentiell invasiv wachsende Tumoren der Keratinozyten. PEK entstehen über mehrere Vorstufen, das sind zunächst benigne Plaques, dann Papillome, bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung In-Situ-Karzinome, die letztlich die Basalmembran durchbrechen und infiltrativ wachsen. In diesem Stadium spricht man dann vom PEK (Scott 2003). Obwohl PEK prinzipiell überall dort entstehen können, wo Keratinozyten vorhanden sind, das heißt an beliebigen Haut- und Schleimhautstellen, sind je nach Spezies bestimmte Lokalisationen besonders häufig betroffen. Beim Menschen sind das der Zervikal- und Anogenitalbereich, Lunge, Verdauungstrakt, Mund- und Nasenhöhlen oder etwa Larynx und Pharynx (Dayyani et al. 2010, Scott 2003, Stanley 2001, Withrow et al., 2013, zur Hausen 1996). Bei Hunden und Katzen treten PEK häufig im Hals-Kopf-Bereich auf (Withrow et al. 2013). Beim Pferd wiederum entstehen PEK vorwiegend an mukokutanen Übergängen (Scott 2003). Betroffen sind vor allem die Anogenitalregion, die Augenregion und der Hals-Kopf-Bereich (Maulhöhle, Nasenhöhle, Sinus, Larynx, Pharynx) (Sykora und Brandt 2017). Da okuläre PEK beim Rind vor allem wirtschaftliche Bedeutung haben, haben Anson et al. (1982) bereits eine Untersuchung auf das bovine Herpesvirus 5 (BHV-5) vorgenommen.

Die Ätiologie von PEK ist weder im Human- noch im Veterinärbereich restlos geklärt und dürfte auch je nach Spezies und Lokalisation stark variieren. Bei Menschen sind 100 % aller Zervixkarzinome, etwa 50 % aller anogenitalen und ca. 25 % aller Hals-Kopf-PEK durch karzinogene humane Papillomviren - so genannte Hochrisiko-Papillomviren (hrHPV) - wie etwa die hrHPV-Typen 16 und 18 induziert (Dayyani et al. 2010). Daneben dürften auch Gamma-Herpesviren (GHV), vor allem das Epstein-Barr-Virus (EBV; auch genannt humanes Herpesvirus Typ 4 (HHV-4)) eine ätiologische Rolle bei Patienten mit Hals-Kopf-PEK spielen, die weder Alkohol, noch Tabak konsumieren und hrHPV-negativ sind. Alkohol- und Tabakkonsum, aber auch Umweltgifte sowie Ultraviolette-Strahlung (UV-Strahlung) zeichnen ebenfalls für die Entstehung mancher PEK, vor allem von Hals-Kopf-PEK bzw. kutanen PEK, verantwortlich (Baan et al. 2009, Bouvard et al. 2009, Parkin 2006, Secretan et al. 2009).

Ähnlich dürfte es sich bei Hunden und Katzen verhalten, wobei die Ätiopathogenese von PEK in diesen Spezies noch nicht restlos geklärt ist (Withrow et al. 2013). Beim Pferd wurde ein Papillomvirus entdeckt, das *Equus caballus* Papillomvirus Typ 2 (EcPV-2), das für praktisch 100 % aller genitalen PEK verantwortlich ist (Scase et al. 2010, Sykora und Brandt 2017). Darüber hinaus dürfte EcPV-2 etwa 20-25 % aller Kopf-Hals-PEK bei Equiden verursachen (Sykora et al. 2017). Bei den häufigen okulären PEK dürfte es sich allerdings um eine eigene Entität handeln, die nicht mit EcPV-2 assoziiert ist. Als Ursache steht UV-Strahlung in Kombination mit geringer Pigmentierung unter Verdacht, zumal häufig Pferderassen betroffen sind, deren Okularregion wenig pigmentiert ist und/oder die in höheren Lagen zu Hause sind (z.B. Haflinger). UV-Strahlung führt zu Veränderungen der DNS und kann auch Gene verändern, die für die Expression des Tumorsuppressors p53 verantwortlich sind. Dies hätte eine Dysregulation der Apoptose, eine Vermehrung von mutierten Keratinozyten und in weiterer Folge die Ausbildung eines PEK zur Folge (Narayanan et al. 2010). Aber auch karzinogene Papillomviren und GHV sind dafür bekannt, dass sie p53 und andere Tumorsuppressoren sowie das körpereigene Immunsystem deregulieren, um die Infektion erfolgreich etablieren zu können (Parkin 2006). Bei Haflingern ist zudem auch eine genetische Variante identifiziert worden, die mit der Entstehung von okulären PEK in Zusammenhang gebracht wird (Bellone et al. 2017, Lassaline et al. 2015).

Die humanen GHV Epstein-Barr-Virus und Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV bzw. HHV-8) gehören zu jenen sieben Virustypen, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Karzinogene der Klasse I kategorisiert wurden (Bouvard et al. 2009). In der Veterinärmedizin gibt es hingegen relativ wenig Forschung zu einem möglichen ätiologischen Zusammenhang von Herpesvirusinfektionen mit Krebserkrankungen im Allgemeinen, und PEK im Speziellen.

Da okuläre PEK beim Rind auch wirtschaftliche Bedeutung haben, wurde versucht, Herpesviren in Verbindung mit der Erkrankung nachzuweisen. Dafür wurden 31 okuläre PEK von Rindern auf bovine Herpesvirus 5 (BHV-5) -Infektion untersucht. Es konnte aus keiner der 31 Proben das Virus isoliert werden. Mittels indirekter Immunofluoreszenz-Analyse von Tumorzellkulturen mit anti-BHV-5 Antiserum wurde hingegen in 95 % der Tumorzellen perinukleär Fluoreszenz beobachtet. Insgesamt konnte also aus Gewebe kein BHV-5 isoliert werden, aber in 7/7 Zellkulturen von bovinen okulären PEK wurde BHV-5 Antigen mittels indirekter Fluoreszenz detektiert (Anson et al. 1982). Die zytoplasmatisch nachgewiesenen

BHV-5-Antigene waren jenen ähnlich, die schon 1966 bei EBV-vermittelten Neoplasien beschrieben wurden (Henle und Henle 1966). Da aber kein Virus aus den Tumorzellen isoliert werden konnte, gingen Anson et al. (1982) davon aus, dass kein Zusammenhang zwischen Antigennachweis und bovinen okulären PEK bestand.

Es wurde auch versucht, das cyprine Herpesvirus 1 (CyHV-1) aus PEK von Koikarpfen zu isolieren (Sirri et al. 2018). CyHV-1 wurde bereits 1967 ätiologisch mit Fischpocken assoziiert (Mawdesley-Thomas und Bucke 1967) und scheint onkogenes Potential zu besitzen (Calle et al. 1999). Interessanterweise wurde die maligne Transformation von Fischpocken zu kutanen PEK bereits beobachtet (Reavill und Roberts 2007). In 5/13 PEK-Proben von Kois konnten Sirri et al. (2018) auch virale DNS detektieren. Ein spezifisches CyHV-1-Genfragment wurde in diesen fünf Proben mittels Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen, so dass eine ätiologische Assoziation von CyHV-1 mit PEK bei Kois möglich erscheint (Sirri et al. 2018).

In Zusammenhang mit equiner Keratokonjunktivitis wurde Probenmaterial auf Anwesenheit der equinen GHV-Typen Equines Herpesvirus-2 (EHV-2) und EHV-5 untersucht. Ein direkter Zusammenhang von Herpesvirusinfektion mit Erkrankung konnte jedoch nicht bestätigt werden (Kershaw et al. 2001). In einer weiteren Studie wurden die Augen von 266 Lipizzanern ophthalmologisch beurteilt und von allen Pferden Nasen- und Augentupferproben entnommen. Diese wurden im Anschluss auf Anwesenheit von Herpesvirus-DNS untersucht. Die ophthalmologische Untersuchung führte zur Diagnose verschiedener Formen von Keratitiden bei einigen Pferden. Unabhängig vom Krankheitsstatus testeten 48,8 % der Lipizzaner positiv auf EHV-5- und 60,2 % positiv auf EHV-2-DNS (Rushton et al. 2013). Bis heute liegen keine publizierten Arbeiten vor, die Herpesvirusinfektionen am Auge in Zusammenhang mit okulären PEK zum Inhalt haben.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Herpesviren

Herpesviren sind behüllte, doppelsträngige DNS-Viren mit ikosaedrischer Struktur. Sie haben einen Durchmesser von 180-250 nm und gehören gemeinsam mit den Pockenviren zu den größten human- und tierpathogenen Viren. Das Herpesvirusgenom ist 100-300 Kilobasenpaare (kbp) groß und kodiert für mehr als 30 Strukturproteine und zahlreiche Nichtstrukturproteine. Die Replikation findet im Zellkern statt und ist von zellulären Faktoren (z.B. vom Nukleotidstoffwechsel) abhängig (Selbitz et al. 2015). Durch die Replikation im Zellkern kommt es zu den typischen Einschlusskörperchen in befallenen Zellen (Sodeik et al. 2012).

Die Nichtstrukturproteine sind vor allem für die Modulation der Immunantwort verantwortlich. Durch die veränderte Immunantwort entsteht eine latente Infektion (Selbitz et al. 2015). Nach einer ersten Infektion persistieren die Herpesviren lebenslang in Ganglien oder mononukleären Blutzellen (Cohrs und Gilden 2001).

Herpesviren sind in der Umwelt nicht besonders stabil. Daraus folgt, dass sie zwar über direkten Kontakt oder unbelebte Vektoren, nicht aber über weite Distanzen als Aerosol übertragen werden können (Selbitz et al. 2015). Sodeik et al. (2012) beschreiben ebenfalls nur eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch oder über Vektoren.

Die *Herpesviridae* werden weiter in *Alpha-, Beta- und Gamma-Herpesvirinae* unterteilt. Die *Alpha-Herpesvirinae* sind die Subfamilie mit der größten Anzahl an Krankheitserregern. Zu ihnen gehören unter anderem die Herpes-Simplex- und Varicella-Viren. Beispiele für Simplex-Viren sind z.B. das bovine Herpesvirus 2 und die humanen Herpesvirus-Typen 1 und 2. Zu den Varicella-Viren gehören u.a. das BHV-1, BHV-5, EHV-1, EHV-3, EHV-4, das feline Herpesvirus 1 (FHV-1) und das HHV-3, auch bekannt als Varicella-Zoster-Virus (VZV). In dieser Subfamilie sind die wichtigsten Tierseuchenerreger bei Pferd, Rind und Schwein, sowie wichtige Infektionserreger bei Hund und Katze enthalten (Selbitz et al. 2015, You et al. 2017). Alpha-Herpesviren persistieren in den Ganglien des spinalen Ganglions (Gl. spinale) (Cohrs und Gilden 2001).

Die *Beta-Herpesvirinae* spielen in der Veterinärmedizin nur eine unbedeutende Rolle (Selbitz et al. 2015). In der Humanmedizin hingegen können alle drei Untergruppen der *Herpesviridae* lebensbedrohliche Erkrankungen hervorrufen. Zu den bekanntesten humanen *Beta-Herpesvirinae* gehören das HHV-5, auch genannt humanes Cytomegalievirus (CMV), HHV-6 und HHV-7 (Jouanguy et al. 2020). Beta-Herpesviren persistieren hauptsächlich in myeloischen Vorläuferzellen aus dem Rückenmark (Cohrs und Gilden 2001, Kondo et al. 1991, Luppi et al. 1999).

Zu den *Gamma-Herpesvirinae* gehören u.a. aus der Humanmedizin das HHV-4, auch bekannt als Epstein-Barr-Virus, und HHV-8 (Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus) und aus der Veterinärmedizin das EHV-2, EHV-5 und EHV-7 (Selbitz et al. 2015). Gamma-Herpesviren persistieren in den B-Lymphozyten (Cohrs und Gilden 2001).

2.1.1. Humane Herpesviren

Es gibt eine Reihe von Herpesviren, die den Menschen infizieren können. Von diesen haben allerdings nur vier Bedeutung als Pathogene. Diese sind das Herpes Simplex Virus (HSV), das Varicella-Zoster-Virus, das Epstein-Barr-Virus und das humane Cytomegalievirus (Chang 1983).

Humane Herpesviren können eine Reihe von Erkrankungen auslösen, die zum Teil auch tödlich verlaufen können (Chang 1983).

Im weiteren Verlauf wird nur Bezug auf EBV, CMV und HSV genommen, da es sich bei EBV um Gamma-Herpesviren und bei CMV und HSV um sehr häufig auftretende, pathogene Herpesviren handelt.

2.1.1.1. EBV

Beim Epstein-Barr-Virus handelt es sich um ein GHV. Es wird auch humanes Herpesvirus 4 genannt.

Das virale Genom besteht aus 172 kbp (Santpere et al. 2014) und ist von einer Kapsel und einer äußeren Hülle umgeben. Es handelt sich um lineare DNS, die für fast 100 virale Proteine kodiert, die etwa in die Replikation, Expression und die Modulation des Immunsystems des Wirtes involviert sind (Cohen 2000).

Eine Erstinfektion findet häufig im Kindesalter statt und läuft asymptomatisch oder mild ab. Findet eine Infektion erst im jugendlichen Alter statt, kann sich diese im Pfeifferschen Drüsenfieber äußern (Heawchaiyaphum et al. 2020, Straus et al. 1993, Vockerodt et al., 2015). Auch in Kombination mit einer Reihe von Vorerkrankungen, wie zum Beispiel X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankungen, kann das Virus, v.a. durch eine nicht kontrollierte Infektion, ein B-Zell-Lymphom auslösen (Cohen 2000, Sodeik et al. 2012). Bei EBV handelt es sich um ein onkogenes Herpesvirus, welches in B-Zellen latent persistiert (Sodeik et al. 2012). EBV kann aber sowohl in epithelialen Zellen, als auch in B-Lymphozyten nachgewiesen werden. In epithelialen Zellen führt eine EBV-Infektion *in vitro* zu einer aktiven Replikation des Virus und einer Lyse der Zellen (Sixbey et al. 1983). EBV scheint sich auch in bestimmten lymphoiden Zellen zu vermehren, und zeigt dort häufig eine latente Infektion im Lymphgewebe (Chang 1983, Cohen 2000).

Bei fast 90 % der Erwachsenen kann EBV im Speichel nachgewiesen werden (Longnecker et al. 2013). Es handelt sich in der Regel um eine orale Infektion, die über den Speichel übertragen wird (Yao et al. 1985).

Das Virus gelangt nach der Infektion über die Tonsillen in das lymphatische System. Da B-Lymphozyten physiologisch nur wenige Tage leben, werden sie über bestimmte, virale Proteine zur Proliferation angeregt. Die befallenen Lymphozyten wandern in Keimzentren und werden dort über bestimmte Signale zu Gedächtniszellen. Diese sind nun langlebig und können eine, wie oben beschriebene, Persistenz des Virus in B-Lymphozyten, die als latente Infektion bezeichnet wird, verursachen (Sodeik et al. 2012). Eine Reaktivierung (akute Infektion) findet nur bei einem geringen Anteil der befallenen Zellen statt (Cohen 2000).

EBV ist auch mit einer Reihe von Tumorerkrankungen assoziiert. Dazu gehören das Hodgkin-Lymphom, das Burkitts-Lymphom und nasopharyngeale Karzinome, aber auch die orale Haarleukoplakie und das orale PEK. Außerdem konnte eine onkogene Wirkung in *in vitro*-Studien von EBV infizierten B-Lymphozyten durch Unsterblichkeit und Transformation

der Zellen bestätigt werden. Das lässt allerdings keinen Rückschluss auf die Transformation im Epithel zu (Cohen 2000).

2.1.1.2. CMV

Das CMV ist ein Beta-Herpesvirus, das auch unter der alternativen Bezeichnung humanes Herpesvirus 5 bekannt ist. In den meisten Fällen bleiben CMV-Infektionen symptomlos, bei Schwangeren kann das Virus allerdings die Plazenta und den Fötus infizieren. In den USA wird ca. 1 % aller Kinder mit CMV-Infektion geboren. In 7 % dieser Kinder wird ein Zusammenhang mit der Infektion eine verkleinerte Gehirnmasse und/oder eine stark vergrößerte Leber und Milz festgestellt. Auch Hörverlust oder geistige Retardierung können CMV-induziert sein. In immunsupprimierten Patienten wie etwa Transplant- oder AIDS-Patienten ist eine CMV-Infektion häufig mit Pneumonitis oder Hepatitis assoziiert (Carter und Saunders 2013). Ob CMV auch als karzinogenes Virus agiert, ist noch nicht gesichert. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass CMV eine aktive Rolle bei der Entstehung und/oder Progression von humanen, kolorektalen Karzinomen und Blasenkarzinomen spielen könnte (Cantalupo et al. 2018).

2.1.1.3. HSV

Das Herpes-Simplex-Virus gehört zu den *Alpha-Herpesvirinae* und besitzt wie alle Herpesviren eine Proteinkapsel aus symmetrisch angeordneten Einheiten und eine äußere Hülle (Widener und Whitley 2014).

HSV verursacht latente Infektion und persistiert in sensorischen Ganglien (Widener und Whitley 2014). Zudem hat es einen hohen zytopathogenen Effekt und eine relativ kurze Replikationszeit, wodurch eine schnelle Vermehrung möglich ist. Virale Erkrankungen von Augen, Mund und Genitaltrakt werden am häufigsten durch das hier beschriebene Virus ausgelöst (Widener und Whitley 2014).

Das HSV wird in zwei Typen eingeteilt, die jeweils etwas verschiedene Erkrankungen auslösen. Eine Infektion mit HSV-1 verursacht die typischen orofazialen Läsionen, kann aber bei Kindern auch zu Enzephalitiden führen. Eine Infektion mit HSV-2 führt zu genitalem Herpes, aseptischen Enzephalitiden und verheerenden Infektionen beim Neugeborenen (Widener und Whitley 2014).

In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass eine Reaktivierung von HSV durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel UV-Licht und Traumata, ausgelöst werden kann. Durch die beschriebenen Umstände steigt die Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Konzentration in der Haut. PGE₂ scheint also eine Rolle bei der Reaktivierung des Virus aus den Ganglien zu spielen (Blyth et al. 1976, Hill et al. 1978).

Neuerdings wird HSV auch mit oralen Plattenepithelkarzinomen in kausale Verbindung gebracht. *In vitro* ist HSV in der Lage, tierische Zellen zu transformieren. *In vivo* wirkt HSV ko-karzinogen mit bestimmten Chemikalien. Allerdings konnten bislang keine Onkoproteine für dieses Virus identifiziert werden. Man nimmt aber an, dass HSV-1 und HSV-2 indirekt zur Entstehung von Tumoren etwa durch Störung von Immunmechanismen beitragen könnten (Patil et al. 2016).

Der Mensch scheint der einzige Wirt und daher auch das alleinige Reservoir für HSV zu sein. Da das Virus außerhalb des Wirtes sehr instabil ist, ist eine Übertragung nur direkt von Mensch zu Mensch möglich. Ein Nachweis von HSV kann aus frischen Fieberblasen oder anderen mit HSV assoziierten Läsionen mittels Zytologie oder Virusisolation erfolgen (Chang 1983).

2.1.2. Herpesviren bei Equiden

2.1.2.1. EHV-1

Das equine Herpesvirus 1 ist ein Alpha-Herpesvirus, welches einen seuchenhaften Spätabort und die equine Herpesmyeloenzephalopathie (EHM) auslösen kann. Etwa 52 % der Pferde sind seropositiv für EHV-1, auch wenn sie keine Symptome zeigen (Yildirim et al. 2015).

Obwohl sich das Virus im Epithel der oberen Atemwege vermehrt, zeigen Pferde meistens keine respiratorischen Symptome. Auch der Übertragungsweg erfolgt, mit Ausnahme des Aborts, über Sekrete der Atemwege. Bei einem Abort sind die Fruchthüllen, das Fruchtwasser und die abortierten Föten hoch kontagiös, weswegen strikte Hygiene eingehalten werden muss, um eine Ansteckung weiterer Pferde zu verhindern. Eine Infektion erfolgt entweder direkt von Pferd zu Pferd oder indirekt über einen Vektor. Das Virus scheint häufig schon von der Mutterstute auf das Fohlen übertragen zu werden (Foote et al. 2004, Schulman et al. 2015, Yildirim et al. 2015).

EHV-1 kann zum einen asymptomatisch in Neuronen des *Nervus trigeminus* (N. trigeminus) und den dazugehörigen Ganglien, sowie in Leukozyten persistieren (Slater et al. 1994a, Slater et al. 1994b). Bei einer erneuten Aktivierung des Virus erfolgt wiederum eine Vermehrung im respiratorischen Epithel. Die equine Herpesmyeloenzephalopathie verläuft meist letal (Wilson 1997). Wichtig ist zu wissen, dass sich das Virus über den gesamten Körper ausbreiten kann. Es vermehrt sich zunächst in den lokalen Blutgefäßen (in den Endothelzellen) und infiziert Lymphozyten und Monozyten, welche anschließend durch das lymphatische System erfasst werden, so dass eine zellassozierte Virämie entsteht. In den befallenen Endothelzellen vermehrt sich das Herpesvirus und zerstört die Gefäßwand, was in weiterer Folge zu Durchblutungsstörungen mit Ischämie und Nekrosen führt. Je nach betroffenem Organ, entstehen dann die verschiedenen Krankheitsbilder wie zum Beispiel Abort oder Parese/Paralyse (Edington et al. 1986, Pusterla et al. 2009, Reed und Toribio 2004, Slater et al. 1994a, Sutton et al. 1998, van Maanen 2002, Wilson 1997). Bei neurologisch auffälligen Pferden kann nicht immer EHV-1 nachgewiesen werden, jedoch sollten auch diese Pferde vorsorglich als kontagiös eingestuft werden (Wilson 1997).

Wie oben genannt, gibt es verschiedene klinische Bilder einer EHV-1 Infektion. Zum einen kann es zu einem Spätabort, vor allem im letzten Trimester (Schulman et al. 2015), oder zur Geburt lebensschwacher Fohlen und zum anderen zu neurologischen Ausfällen kommen (Reed und Toribio 2004).

Eine EHV-1-Infektion geht typischerweise mit Fieber, Nasenausfluss und Apathie einher. Häufig ist eine kurze Fieberphase von einem folgenden Abort oder neurologischen Ausfällen begleitet (Allen und Bryans 1986).

Respiratorische Symptome treten vor allem bei jungen Pferden mit einem geringen immunologischen Schutz auf und können von einer bakteriellen Sekundärinfektion begleitet werden. Dadurch kann sich die Erkrankungszeit verlängern (van Maanen 2002). Ältere Pferde hingegen zeigen kaum respiratorische, dafür häufiger neurologische Symptome, die von kaudal nach kranial fortschreiten. Neurologische Erscheinungen kommen im Allgemeinen aber nur sporadisch vor (Pusterla et al. 2009).

Diagnostiziert wird eine EHV-1-Infektion in der Regel mittels Immunfluoreszenz (Edington et al. 1996), Polymerase-Kettenreaktion (Sutton et al. 1998, Taktaz Hafshejani et al. 2015) oder einer Virusanzucht (Sutton et al. 1998).

Es besteht eine Kreuzimmunität zum genetisch sehr nahe verwandten equinen Herpesvirus 4 (Haas et al. 2016, Reed und Toribio 2004).

2.1.2.2. EHV-2

Beim equinen Herpesvirus 2 handelt es sich um ein GHV (Telford et al. 1993). Es persistiert hauptsächlich in B-Lymphozyten, Makrophagen und auch Langerhansschen Zellen. Das Virus war das erste equine GHV, das 1962 aus einem Fohlen mit respiratorischen Symptomen isoliert wurde (Haas et al. 2016, Kershaw et al. 2001, Plummer und Waterson 1963, Telford et al. 1993).

Es wird angenommen, dass fast jedes Fohlen ab einem Alter von einem halben Jahr eine latente Infektion mit den Gamma-Herpesviren EHV-2 und EHV-5 aufweist. Diese Viren vermehren sich im respiratorischen Epithel der oberen Atemwege und werden beim Fohlen auch mit einigen anderen Erkrankungen assoziiert. Dazu gehören unter anderem Rhinitiden, Pharyngitiden, Konjunktivitiden/Keratokonjunktivitiden und Pneumonien, seltener Leistungsschwäche, Dermatitiden und Ulzera in der Maulhöhle (Kershaw et al. 2001, Selbitz et al. 2015).

Durch die Persistenz in den B-Lymphozyten kann eine Virämie ausgelöst und das Immunsystem geschwächt werden. Diese Eigenschaft wird vor allem EHV-2 nachgesagt (Haas et al. 2016).

Der Nachweis von EHV-2 und EHV-5 wird regelmäßig auch bei gesunden Pferden beschrieben, weswegen ein kausaler Zusammenhang einer Infektion mit den oben genannten Krankheitsbildern nicht abschließend geklärt ist (Haas et al. 2016).

2.1.2.3. EHV-3

Das Equine Herpesvirus 3 ist wiederum ein Alpha-Herpesvirus. Die Erkrankung, die durch eine EHV-3-Infektion ausgelöst wird, ist das Koitalexanthem (Haas et al. 2016, Kleiboeker und Chapman 2004). Es handelt sich dabei meistens um eine gutartige und mild verlaufende Erkrankung, die durch den Deckakt, engen Körperkontakt oder auch iatrogen übertragen werden kann (Metcalf 2001, Selbitz et al. 2015). Ein Eindringen über den Respirationstrakt ist eher selten (Haas et al. 2016).

Die epithelialen Veränderungen sind hauptsächlich von Leukozyten infiltriert. Die Vermehrung des Virus findet im mehrschichtigen Epithel statt (Edington et al. 1986) und die oberen Epithelschichten werden abgestoßen. Das abgestorbene Gewebe wird durch Ersatzgewebe aufgefüllt, welches allerdings schlechter durchblutet ist. Dadurch entstehen die typischen Krötenflecken des Koitalexanthems (Haas et al. 2016).

Das klinische Bild beginnt nach einer Inkubationszeit von 2-10 Tagen mit Effloreszenzen, die sich später zu Pusteln weiterentwickeln. Die Pusteln können ulzerieren, heilen in der Regel nach 2-3 Wochen spontan aus und es bleiben farblose (weiße) Narben zurück. Diese weißen Flecken bleiben eine lange Zeit erhalten (Haas et al. 2016, Selbitz et al. 2015).

Wenn die Tiere einmal infiziert wurden, bleiben sie ihr Leben lang Träger des Virus. Auch wenn es sich um eine latente Infektion handelt, können gesunde Tiere durch reaktiviertes Virus angesteckt werden, weswegen diese Tiere aus der Zucht ausgeschlossen werden sollten. Die Trächtigkeit bei den Stuten ist allerdings nicht gefährdet (Selbitz et al. 2015).

Das Virus kann aus Schleimhautveränderungen isoliert werden, und eine Differenzierung mit Immunfluoreszenz ist möglich (Kleiboeker und Chapman 2004). Es besteht keine Kreuzimmunität zu den Alpha-Herpesviren EHV-1 und EHV-4 (Haas et al. 2016).

2.1.2.4. EHV-4

Das equine Herpesvirus 4 ist, ebenso wie das EHV-1, ein Alpha-Herpesvirus und mit diesem eng verwandt (Foote et al. 2004).

Circa 84 % der Pferde sind, trotz fehlender Symptome, seropositiv für EHV-4. Es scheint aber je nach Region verschiedene Prävalenzen zu geben (Yildirim et al. 2015).

EHV-4 löst vor allem respiratorische Erkrankungen aus, die auch als Rhinopneumonitis bezeichnet werden. Bei immunkompetenten Pferden bleibt die Erkrankung meist asymptomatisch oder beschränkt sich auf die oberen Atemwege. Ausgeprägtere Pneumonien bis in die tieferen Atemwege, die häufig mit einer bakteriellen Sekundärinfektion einhergehen, treten hauptsächlich bei Fohlen und Neonaten auf (van Maanen 2002), da dort das Immunsystem noch nicht komplett ausgebildet ist.

Die klinischen Symptome des Respirationstraktes lassen sich nicht von einer Infektion mit EHV-1 unterscheiden. Die Diagnose erfolgt mittels eines Abstriches des Nasopharynx und anschließender PCR (Izume et al. 2017), wodurch die beiden Viren unterschieden werden können. Neurologische Symptome sind möglich, kommen aber nur sehr selten vor (Thein et al. 1993). Es besteht eine Kreuzimmunität zu EHV-1 (Haas et al. 2016).

2.1.2.5. EHV-5

Das equine Herpesvirus 5 ist ebenfalls ein GHV und persistiert in Abwehrzellen, in diesem Fall hauptsächlich in den B-Lymphozyten (Telford et al. 1993). Die allgemeinen Krankheitsbilder entsprechen jenen von EHV-2 und wurden bereits unter Punkt „2.1.2.2. EHV-2“ beschrieben.

EHV-5 wird verdächtigt, die equine multinoduläre Lungenfibrose (EMPF) zu verursachen. Dieser Verdacht wurde mittels eines Infektionsversuchs erhärtet. Allerdings konnten Antigene nur bei infizierten Pferden in den Lungenläsionen nachgewiesen werden. Vermutlich sind noch weitere ätiologische Faktoren notwendig, um EMPF auszulösen (Williams et al. 2013).

2.1.2.6. AHV

Esel, Maulesel und Maultiere können sich mit den verschiedenen equinen Alpha- (EHV-1, -3, -4), Beta- und Gamma-Herpesviren (EHV-2, -5) infizieren und analoge Pathologien zum Pferd entwickeln. Darüber hinaus wurden spezifische asinine Herpesviren (AHV) identifiziert. Das Gamma-Herpesvirus AHV-2 (das auch EHV-7 genannt wird), ist EHV-2 und EHV-5 genetisch sehr ähnlich, kann die Symptome einer respiratorischen Erkrankung induzieren und wird auch in gesunden Tieren gefunden. Wenig Information gibt es zu AHV-3 (auch bekannt als EHV-8), AHV-4, AHV-5 und AHV-6 (Jerele et al. 2020). AHV-5 wurde bislang in den Lungen von Eseln mit interstitieller Pneumonie oder Fibrose detektiert, sowie in Tieren mit neurologischen Symptomen (Thiemann und denBoom 2012).

Neben den oben genannten Tierarten, können sich auch Pferde mit dem asinen Herpesvirus infizieren. Es scheint eine ähnliche Klinik wie EHV-2 und -5 Infektionen zu verursachen und wird auch in Materialien gefunden, die nicht mit respiratorischen Erkrankungen assoziiert sind. AHV-5 wird auch sporadisch in klinisch gesunden Pferden nachgewiesen. Kontakt mit Eseln oder Maultieren scheint keine zwingende Voraussetzung für eine AHV Infektion zu sein (Rushton et al. 2014).

2.2. Plattenepithelkarzinome

Das Plattenepithelkarzinom ist ein invasiver maligner epithelialer Tumor, der durch neoplastische Veränderungen von Keratinozyten entsteht. Generell kann diese Neoplasie bei allen Haussäugetieren an der Haut oder Schleimhaut auftreten (Scott 2003).

Beim Pferd ist das PEK, nach dem Sarkoid, der zweithäufigste Hauttumor, und der häufigste Tumor an Augenlidern und Genitalien. PEK treten vor allem an mukokutanen Übergängen auf (Scott 2003). Zusätzlich wurde das Vorkommen von PEK im Kopfbereich in den *Sinus paranasales*, dem Maulbereich und dem Kieferknochen beschrieben (Dugan et al. 1991, Knottenbelt 2009, Lassaline et al. 2015, Scott 2003, Sykora und Brandt 2017). Prädisponiert scheinen auch wenig behaarte, nicht pigmentierte Körperstellen zu sein, die der UV-Strahlung ausgesetzt sind, wie etwa die Augenregion (Scott 2003).

Der Verlauf des klinischen Bildes zeigt sich zu Beginn mit einer Hautläsion, die sich in weiterer Folge von einer weißen Plaque über ein Papillom, und in der Folge Karzinom in situ (CIS) bis hin zum PEK präsentiert. Das PEK wächst unaufhörlich zu einer unter Umständen blumenkohlartigen Umfangsvermehrung an, die im Unterschied zum CIS die Basalmembran durchbricht. Im schlimmsten Falle kann das PEK streuen und über die Lymph- und Blutbahnen in distante Organe metastasieren (Knottenbelt 2009, Scott 2003).

Die Therapie von equinen PEK bzw. deren Vorstufen ist umso erfolgreicher, je früher die Erkrankung erkannt wird. Üblicherweise wird der Tumor großzügig chirurgisch entfernt, um einer Rezidivierung vorzubeugen. Bei penilen Tumoren kann das bedeuten, dass die gesamte Struktur im Sinne einer penilen en-bloc Resektion entfernt wird (van den Top et al. 2008). Okuläre PEK betreffen entsprechend des keratinozytären Tropismus der Erkrankung epitheliale Strukturen wie etwa die Konjunktiva, Sklera oder Nickhaut. Aufgrund der Lokalisation werden okuläre Läsionen häufig früh erkannt und sind chirurgisch gut therapierbar (Scott 2003). Anders verhält es sich bei „Hals-und-Kopf“-PEK (Maul- oder Nasenhöhle, Larynx, Pharynx). Wie penile PEK wachsen sie unbemerkt im Verborgenen und werden erst indirekt dadurch entdeckt, dass das erkrankte Pferd Folgesymptome zeigt, z.B. Fress- und/oder Atembeschwerden, Schwellungen oder Nasenausfluss. Für einen chirurgischen Eingriff ist es dann oft zu spät, da sich die Tumormasse bereits zu sehr ausgebreitet und mesenchymale wie knöcherne Strukturen zerstört hat (Scott 2003, Sykora und Brandt 2017).

Hinsichtlich der Ätiologie von equinen PEK stellen sich noch einige Fragen. 2010 wurde in Kooperation mit der Forschungsgruppe Onkologie (RGO) der Vetmeduni Wien ein neues, equines Papillomvirus aus genitalen PEK identifiziert, das die Bezeichnung *Equus caballus Papillomvirus 2* erhielt (Scase et al. 2010). DNS und auch Boten-Ribonukleinsäuren (mRNS) des Virus wurde von der RGO und anderen Forschungsgruppen in der Folge je nach Nachweismethode in bis zu 100 % aller genitalen PEK und deren Vorstufen detektiert. In okulären PEK wurde das Virus hingegen nicht nachgewiesen und in Proben von gesunden Pferden war es ebenfalls nur zu < 9 % je nach Forschungsgruppe nachweisbar. Entsprechend wurde postuliert, dass EcPV-2 an der Entstehung genitaler PEK maßgeblich beteiligt ist (Sykora und Brandt 2017).

Auch etwa 20 % der equinen „Hals-und-Kopf“-PEK dürften durch EcPV-2 verursacht werden (Sykora et al. 2017). Dies deckt sich mit humanen Daten, die zeigen, dass ca. 25 % aller

„Hals-und-Kopf“-PEK durch karzinogene Humane Papillom Virus-Typen (HPV) - meist HPV16 - induziert sind (Dayyani et al. 2010).

Equine okuläre PEK stellen hingegen eine eigene Entität dar, von der man denkt, dass UV-Strahlung für die Entstehung mitverantwortlich sein könnte (Scott 2003). Die genaue Ätiologie okulärer PEK ist aber noch unbekannt.

3. HYPOTHESE

Im Humanbereich werden in den letzten Jahren auch Herpesviren mit der Entstehung von PEK in Verbindung gebracht, wie in der Einleitung beschrieben. Bei equinen okulären PEK konnte bislang keine Papillomvirusinfektion als Ursache festgemacht werden.

Dies führte zur wissenschaftlichen Hypothese, dass equine Herpesviren bei der Entstehung okulärer PEK und deren Vorstufen eine aktive pathogene Rolle spielen.

Um diese Hypothese zu testen, wurden DNS-Isolate aus okulären PEK und PEK-Vorstufen sowie aus Augentupferproben von tumorfreien Pferden auf Anwesenheit von Herpesvirus-DNS untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine zweistufige („nested“) Consensus-Herpesvirus-PCR eingesetzt. Im Anschluss wurden Amplifikationsprodukte erwarteter Größe und ausreichender Konzentration aufgereinigt und sequenziert, um den detektierten Herpesvirustyp zu identifizieren. Letztendlich wurden die Anzahlen an Herpesvirus-positiven Proben von PEK-Patienten und gesunden Pferden statistisch miteinander verglichen, um daraus gegebenenfalls einen ersten Hinweis auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen okulärer PEK-Erkrankung und Herpesvirusinfektion zu erhalten.

4. MATERIAL & METHODEN

4.1. Material

4.1.1. Proben

Als Proben der Versuchsgruppe wurden 43 DNS-Isolate von 29 Pferden mit okulären Veränderungen in Form eines Plattenepithelkarzinoms verwendet. Diese Proben wurden im Zeitraum von 2001-2021 an der Veterinärmedizinischen Universität Wien gesammelt. Es handelte sich hauptsächlich um Gewebeproben der tumorösen Veränderungen, aber auch in wenigen Fällen (zusätzlich) um okuläre Tupper und periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs). Die Proben sind zum Großteil in anderen Studien bereits auf Anwesenheit von EcPV-2-DNS untersucht worden (Sykora und Brandt 2017). Mit Ausnahme von zwei periokulären Läsionen (AL1 und MO1) (Kainzbauer et al. 2012), wurden alle okulären PEK negativ getestet (Sykora und Brandt 2017). Das Alter der Pferde variierte zwischen 4 und 25 Jahren. Es handelte sich bei den equinen Patienten um verschiedene Rassen. Die Versuchsgruppe bestand aus 15 Haflingern, sechs Warmblütern (davon ein Trakehner, ein ungarisches Warmblut und vier Pferde ohne weitere Differenzierung), zwei Paint Horses, ein Criollo, ein Noriker, ein Connemara Pony, ein Welsh Pony, ein Lusitano und ein Isländer. Die am häufigsten vertretene Fellfarbe in der Versuchsgruppe war der Fuchs mit 18 Pferden, gefolgt von vier Schecken, vier Schimmeln, zwei Braunen und einem Rappen. In einem Fall wurde sowohl das Auge mit Veränderung, als auch das augenscheinlich gesunde Auge untersucht.

Tab. 1: Information zu den Proben erkrankter Pferde

Nr.	Code	Rasse	Alter	Farbe	Sex	Diagnose	DNS-Probe
1	AL1	Paint	25	Schecke	S	CIS periokulär rechts	Tumorgewebe
	AL2						PBMCs
2	ALO	Haflinger	22	Fuchs	S	Okuläres PEK links, Plaque rechts	PEK

3	AM1	Criollo	12	Schecke	W	Okuläres PEK links,	Konjunktiva	
	AM2						Descemetocelle links	PEK 1
	AM3							PEK 2
	AM4							PEK 3
	AM5							PEK 4
	AM6							PBMCs
4	AN1	Haflinger	13	Fuchs	W	Okuläre Plaque & okuläres PEK rechts und links	Orales PEK	
	AN2						Okuläres PEK rechts	
5	ANE	Haflinger	6	Fuchs	S	Okuläres PEK rechts	Tumorgewebe	
6	BE1	Haflinger	14	Fuchs	S	Okuläres PEK	Intakte Konjunktiva	
	BE2						PEK	
7	BO1	Warmblut	19	Fuchs	W	Okuläres PEK	Tumorgewebe	
	BO2						PBMCs	
8	DAR	Paint	13	Schecke	S	Okuläres PEK	Tumorgewebe	
9	DEX	Trakehner	16	Schecke	W	Okuläres CIS Nickhaut rechts	Tumorgewebe	
10	FEE	Noriker	17	Schimmel	S	Okuläres CIS/PEK beidseits	Tumorgewebe	
11	HAN	Haflinger	11	Fuchs	W	Okuläres PEK	Tumorgewebe	
12	JHC	Haflinger	11	Fuchs	W	Konjunktivales PEK rechts, Vorstufe links	Tumorgewebe	
13	KIR	Haflinger	19	Fuchs	S	Okuläres PEK Limbus rechts	Tumorgewebe	
14	LAD	Haflinger	14	Fuchs	S	Okuläres PEK Unterlid & Nickhaut rechts	Tumorgewebe	
15	LIL	Haflinger	20	Fuchs	S	PEK Nickhaut rechts	Tumorgewebe	
16	MO1	Connemara	15	Schimmel	S	Okuläres PEK links (später Metastasen, u.a. periokulär)	Periokuläre Läsion	
17	NAD	Warmblut	19	Braun	W	Okuläres PEK	Tumorgewebe	
18	NAP	Ungarisches Warmblut	24	Fuchs	W	PEK Nickhaut rechts	Tumorgewebe	
19	NEP	Warmblut	19	Fuchs	W	Keratitis und CIS rechts	Tupfer	
20	NIN	Haflinger	4	Fuchs	W	Okuläres PEK rechts	Tumorgewebe	
21	OC1	Welsh Pony	17	Schimmel	W	Konjunktivales PEK rechts	Tumorgewebe	
	OC3						Nickhaut	

22	PA1	Warmblut	17	Braun	W	Okuläres PEK rechts	Tumorgewebe
	PA2						PEK-Abstrich
23	PU1	Haflinger	13	Fuchs	S	CIS/PEK temporal limbal rechts, dann infiltratives PEK	Tumorgewebe
	PU2						Rezidiv
24	RUB	Haflinger	12	Fuchs	S	Okuläres CIS, dann PEK	Tumorgewebe
25	ST1	Haflinger	16	Fuchs	W	Okuläre Hyperplasie und okuläres PEK links	Korneales PEK
	ST2						Korneales PEK
26	UR1	Lusitano	20	Schimmel	W	Keratitis, präkanzerogene Läsion links	Tumorgewebe
	UR2						Augentupfer rechts
27	VIC	Haflinger	15	Fuchs	S	Okuläres CIS rechts	Augentupfer
28	VID	Isländer	10	Rappe	W	Okuläres PEK rechts, Plaque links	Tumorgewebe
29	WI1	Haflinger	5	Fuchs	W	Konjunktivales PEK rechts	Okuläres PEK

(PEK = Plattenepithelkarzinom; CIS = Carcinoma in situ; W = Wallach, S = Stute)

Als Referenzproben wurden 30 okuläre Tupfer von Pferden ohne Erkrankungen am Auge verwendet. Die Tiere waren zwischen 2 und 37 Jahre alt (bei einem Pferd war das Alter unbekannt) und gehörten verschiedenen Rassen an. Es handelte sich um zehn Warmblüter, sieben Traber, sieben Haflinger, drei Shetlandponys, zwei Isländer und ein Halbblut. Die am häufigsten vertretene Fellfarbe mit 13 Pferden war der Fuchs, gefolgt von elf Braunen, vier Schimmeln und einem Rappen. Bei einem Pferd ist die Fellfarbe nicht bekannt.

Tab. 2: Information zu den Pferden ohne PEK von denen okuläre Tupferproben entnommen wurden

Nr.	Code	Rasse	Alter (Jahre)	Farbe	Geschlecht
1	BEN	Traber	25	Fuchs	W
2	BIL	Warmblut	19	Braun	W
3	BUS	Halbblut	14	Braun	S

4	CAR	Traber	15	Braun	S
5	CLO	Oldenburger	7	Braun	W
6	DP	Haflinger	14	Braun	S
7	DUD	Traber	14	Braun	W
8	ELM	Shetlandpony	20	Schimmel	S
9	GRA	Westfale	17	?	H
10	GOR	Haflinger	12	Fuchs	S
11	HAN	Ungarisches Warmblut	24	Schimmel	W
12	JEN	Traber	37	Rappe	S
13	LUX	Haflinger	11	Fuchs	S
14	MER	Isländer	10	Fuchs	W
15	MIN	Traber	?	Braun	S
16	MIS	Haflinger	2	Fuchs	S
17	RAM	Warmblut	24	Braun	W
18	ROS	Warmblut	37	Fuchs	W
19	SAM	Haflinger	14	Fuchs	S
20	SAY	Traber	11	Braun	W
21	SER	Ungarisches Warmblut	14	Fuchs	W
22	SIN	Isländer	2	Fuchs	S
23	SON	Warmblut	27	Braun	S
24	SOJ	Haflinger	10	Fuchs	S
25	SOP	Shetlandpony	16	Schimmel	S
26	TAP	Shetlandpony	7	Schimmel	S
27	VAL	Warmblut	3	Fuchs	W
28	VAN	Traber	11	Braun	W

29	WOL	Haflinger	13	Fuchs	S
30	ZOL	Oldenburger	12	Fuchs	W

(S: Stute; W: Wallach; H: Hengst)

4.2. Methoden

Für die Untersuchung auf Herpesvirus-DNS in okulären Plattenepithelkarzinomen mussten die Proben zunächst auf das Vorhandensein von DNS PCR-kompatibler Qualität untersucht werden. Dies erfolgte zum einen mittels einer photometrischen Messung und zum anderen mit einer β -Aktin PCR von allen verwendeten Proben.

Proben in denen DNS guter Qualität vorhanden war, wurden mittels einer „nested“ PCR auf Anwesenheit von Herpesvirus-DNS untersucht und eine Gelelektrophorese angeschlossen. Im positiven Fall wurden die entsprechenden PCR-Produkte ausgeschnitten und sequenziert.

4.2.1. DNS-Extraktion

Eine neuerliche DNS-Extraktion aus Gewebeproben war teilweise notwendig, um hochqualitative DNS und somit ein möglichst gutes PCR-Ergebnis zu erhalten.

Zur DNS-Extraktion aus Gewebeproben wurden von, bei -20 °C gelagerten, okulären PEKs etwa 25 mg Material mittels einer sterilen Skalpellklinge (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 180 μ l ATL-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 20 μ l Proteinase K (Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und mittels regulierbarem Vortex RS-VA 10 (Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland) gründlich vermischt. Anschließend wurden die Proben bei 56 °C über Nacht im Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) lysiert.

Nach der Lyse wurden die Proben erneut gründlich mittels Vortex RS-VA 10 vermischt. Für die weiteren Schritte wurde das „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland)

verwendet. Sofern nicht anders beschrieben, fand die weitere Extraktion bei Raumtemperatur statt.

Zu den lysierten Proben wurden 200 µl AL-Puffer und 200 µl Ethanol 96 % (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) gegeben. Nach jeder Zugabe des Reagenzes wurde die Probe mittels regulierbarem Vortex RS-VA 10 gründlich durchmischt und abschließend in eine beschriftete DNeasy-Säule pipettiert. Die Säule wurde in ein Sammelgefäß („collection tube“) gegeben und bei 8000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für eine Minute zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde verworfen und die Säule in ein Neues gegeben.

Nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffer auf die Säule erfolgte eine erneute, wie oben beschriebene, Zentrifugation. Das Sammelgefäß wurde verworfen und die DNeasy-Säule in ein neues Gefäß gegeben. Anschließend wurden 500 µl AW2-Puffer in die Säule appliziert und drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Das Trocknen der Membran ist wichtig, da eventuelle Ethanolreste die folgenden Reaktionen beeinträchtigen können.

Die DNeasy-Säule wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, 200 µl AE-Puffer wurden direkt auf die Membran der Säule pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die abschließende Zentrifugation bei 8000 rpm für eine Minute, um die DNS von der Membran in das Röhrchen zu eluieren.

Die DNS-Extrakte wurden in beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert und dann für die DNS-Validierung und PCR eingesetzt.

4.2.2. DNS-Validierung

Um zu überprüfen, ob in den Proben DNS guter Qualität vorhanden war, wurden die Extrakte zum einen photometrisch gemessen, und zum anderen einer β -Aktin PCR unterzogen. Wenn die Proben bereits vor einer β -Aktin PCR positiv auf EHV testeten, wurde auf eine anschließende β -Aktin PCR verzichtet. Auch Proben, bei denen photometrisch keine optische Dichte nachgewiesen werden konnte, wurden mittels β -Aktin PCR untersucht. War auch diese negativ, erfolgte eine erneute DNS-Extraktion (siehe 4.2.1.).

4.2.2.1. Photometrie

Bei einer Photometrie („Lichtmessung“) wird die Konzentration einer gelösten Substanz (hier DNS) durch Messung des Lichts, das diese absorbiert (Extinktion), bestimmt. Licht einer bestimmten Wellenlänge wird von einer bestimmten Substanz in der Lösung absorbiert. Wenn eine Kalibrierung bei einer bestimmten Wellenlänge für den entsprechenden Analyten durchgeführt wird, ist eine quantitative Auswertung des Ergebnisses möglich (Bartels et al. 2018).

Für die hier verwendete Photometrie wurde das NanoPhotometer® von Implen (München, Deutschland) mit dem Programm „Nucleic Acid“ genutzt. Dieses arbeitet mit UV-Strahlung bei 260 nm und ist ein Mikrovolumenphotometer. Das bedeutet, dass ein sehr kleines Volumen der Probe auf das Messfenster appliziert wird. Das Licht wird von unten durch die Probe geschickt und durch einen Spiegel oberhalb der auf dem Messfenster aufgetragenen Probe zum Detektor geleitet.

Zum Festlegen des Blindwerts wurde 1 µl AE-Puffer (das DNS-Lösungsmittel) auf das Messfenster pipettiert und das Messergebnis als Nullwert festgelegt. Anschließend wurde 1 µl jeden DNS-Extrakts auf das Fenster pipettiert und die Extinktion gemessen. Auf Basis des festgelegten Nullwertes errechnete das Gerät die DNS-Konzentration und gab sie gemäß der gewählten Einstellung in ng/µl an.

Alle für die Diplomarbeit verwendeten Proben von okulären PEK wurden zunächst mittels Photometrie und anschließend mittels β -Aktin PCR qualitativ validiert. Auch bei laut photometrischer Messung hohen DNS-Konzentrationen wurde eine β -Aktin PCR durchgeführt, um zu bestätigen, dass die gemessene DNS nicht fragmentiert vorlag.

4.2.2.2. β -Aktin PCR

Bei einer PCR wird ein bestimmtes DNS-Fragment mittels des Enzyms DNS-Polymerase amplifiziert. Nach Hitzedenaturierung der DNS-Doppelstränge in Einzelstränge („DNA denaturation“) werden eigens ausgesuchte kurze DNS-Oligonukleotide - so genannte 5'- und 3'-Primer - eingesetzt, die an der invers komplementären Stelle des DNS-Plus-

und -Minusstrangs binden („Primer Annealing“) und dann von 5´ nach 3´ durch die Polymerase mit Hilfe der zugesetzten Basen-Bausteine (desoxyNukleosidTriPhosphate; dNTP) jeweils verlängert werden („Elongation“). Dieser Zyklus wird etwa 30-45 mal wiederholt. Gibt man die Anzahl der vorhandenen, zu amplifizierenden Ausgangsmoleküle mit „x“ an, und jene der Zyklen mit „n“, so entstehen nach erfolgter PCR $x \cdot 2^n$ Amplifikationsprodukte. Man kann also ausgehend von wenigen (theoretisch einem) vorhandenen Ausgangs-DNS-Molekülen eine Region daraus so stark vervielfältigen, dass sie einfach visualisiert und, wenn gewünscht, auch weiter prozessiert - wie etwa sequenziert - werden kann (Mullis 1990, Selbitz et al. 2015).

Zur Validierung der DNS-Extrakte wurde eine β -Aktin-PCR durchgeführt, das heißt, es wurde ein hochkonserviertes Gen, ein sogenanntes „Housekeeping Gene“, amplifiziert. Das β -Aktin-Gen ist zwischen den Arten hoch konserviert, im Genom jeder Zelle vorhanden und eignet sich daher sehr gut zur Untersuchung von DNS auf PCR-Kompatibilität (Azizkhan et al. 1993).

Für die PCR wurde in Anlehnung an ein etabliertes Protokoll (Brandt et al. 2008) ein Mastermix mit spezifischen 5´- und 3´-Primern, einem 5x VeriFi PCR Puffer (PCR Biosystems, Wayne, USA) und einer VeriFi™ Polymerase (PCR Biosystems, Wayne, USA) nach dem in Tab. 3 gezeigten Verhältnis hergestellt. Die Mengen waren je nach Anzahl der Proben anzupassen und der Mastermix wurde mittels Vortex RS-VA 10 gut durchmischt.

Tab. 3: Mastermix β -Aktin PCR

Reagenz/Chemikalie	V(μ l) pro Probe
Aqua Destillata	17,75
5x VeriFi Puffer	5
3´ β -Aktin Primer	1
5´ β -Aktin Primer	1
PCRBIO HS VeriFi™ Polymerase	0,25

Es wurden 0,2 ml PCR SoftTubes (Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland) mit einer Probennummer beschriftet und in jedes Tube 24 μ l Mastermix pipettiert. In die vorbereiteten Gefäße wurden dann noch 1 μ l des jeweiligen DNS-Extraktes der Probe gegeben.

Zusätzlich wurden zwei weitere PCR SoftTubes für eine Positiv- und eine Wasserkontrolle beschriftet und mit 24 µl Mastermix und 1 µl entsprechender Probe befüllt. Als Positivkontrolle diente EHV-1-haltige equine DNS und für die Wasserkontrolle wurde an Stelle von DNS steriles Wasser eingesetzt. Derartige Kontrollen sind wichtig, um einen korrekten Ablauf der PCR zu bestätigen. Nur wenn diese Proben das gewünschte Ergebnis zeigen, kann die PCR ausgewertet werden. Die Negativkontrolle wird grundsätzlich gemacht, um unspezifische Reaktionen, und die Wasserkontrolle, um mögliche Kontaminationen ausschließen zu können, die die Ergebnisse verfälschen würden. Bei der β -Aktin PCR wurde allerdings keine Negativkontrolle inkludiert.

Die mit Probe und Mastermix befüllten PCR SoftTubes (0,2 ml) wurden verschlossen in den „LifeECO Thermo Cycler“ (Bioer Technologie, Hangzhou, China) gestellt. Ein auf Primer, Polymerase und Produktlänge abgestimmtes Temperaturprogramm (siehe Tab. 4) wurde gestartet. Es folgte eine DNS-Amplifikation in 45 Zyklen.

Tab. 4: Temperaturprogramm β -Aktin PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 Minuten	
95 °C	15 Sekunden	45x
61 °C	30 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
72 °C	5 Minuten	
15 °C	∞	

PCR-Produkte (16 µl versetzt mit 4 µl „Loading Dye“ von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden dann für die Gelelektrophorese (siehe 4.2.4.) in die Taschen eines 1,5 %igen Agarosegels (siehe Tab. 9) pipettiert. Nach erfolgter gelelektrophoretischer Trennung der Amplifikationsprodukte wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet, fotografiert und beurteilt, ob die PCR die gewünschten Produkte mit einer Größe von 620 Basenpaare (bp) amplifiziert hatte. War dies der Fall, wurde die entsprechende Proben-DNS für die weitere Untersuchung auf equine Herpesviren eingesetzt. War keine Bande sichtbar, wurde eine erneute DNS-Extraktion aus einer gefrorenen Gewebeprobe durchgeführt.

4.2.3. Nested PCR

Für den Nachweis von Herpesvirus-DNS in den DNS-Proben wurde eine zweistufige „nested“ PCR durchgeführt. Das bedeutet, dass in einer ersten PCR eine größere DNS-Sequenz amplifiziert und dieses Produkt für eine weitere PCR eingesetzt wird. In der zweiten PCR werden Primer verwendet, die innerhalb der amplifizierten Sequenz binden und dadurch ein kleineres DNS-Fragment vervielfältigen. Diese Methode erhöht die Sensitivität und Spezifität, sodass genau der gewünschte Abschnitt nachgewiesen wird. Nachteil dieser Methode ist allerdings die deutlich erhöhte Kontaminationsgefahr (Selbitz et al. 2015).

Für die in dieser Diplomarbeit genutzte „nested“ PCR wurden Universal-Herpesvirus-Primer verwendet, die ein sehr großes Spektrum an humanen und tierischen Herpesviren erkennen. Im positiven Fall wurden die PCR-Produkte bei ausreichender Bandenstärke aus dem Gel gereinigt und bidirektional sequenziert, um den detektierten Herpesvirus-Typ zu bestimmen. Das verwendete PCR-Protokoll wurde aus „Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR“ (VanDevanter et al. 1996) mit geringfügigen Änderungen übernommen.

Der Mastermix für die erste PCR wird wie in Tab. 5 beschrieben, hergestellt:

Tab. 5: Mastermix Universalherpesprimer PCR 1

Reagenz/Chemikalie	V (µl) pro Probe
Aqua Dest.	13,6
10x Herpes Spezial Puffer (siehe Tab. 6)	2,5
DMSO	2,25
VORTEX	
dNTPs (10 mM)	0,4
5'DFA Primer	0,25
5'ILK Primer	0,25
3'KGI Primer	0,25

Tab. 6: Zusammensetzung 10x Herpes Spezial Puffer

Reagenz/Chemikalie	Für 100 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,11 g
MgCl ₂	0,19 g
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	8,11 g
β-Mercaptoethanol	14 µl
Bovines Serumalbumin	1 g
Aqua Dest.	Auf 100 ml aufgefüllt

Es wurde für jede Probe ein PCR SoftTube (0,2 ml) beschriftet und mit 19,5 µl Mastermix befüllt. Genau wie schon bei 4.2.2.2. beschrieben, wurden auch Kontrollen mitgetestet. Als Positivkontrolle diente eine Herpesvirus-positive Pferde-DNS, als Negativkontrolle Herpesvirus-freie Pferde-DNS und als Wasserkontrolle steriles Wasser. Es wurden 5 µl des jeweiligen DNS-Extraktes in den vorgelegten Mastermix pipettiert. Da die Taq DNA Polymerase (Roche, Wien, Österreich) sehr temperaturempfindlich ist, wurde hier bereits das PCR-Gerät gestartet (Tab. 7) und anschließend jeweils 0,5 µl Taq DNA Polymerase 5 U/µl (Roche, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) in jedes SoftTube (0,2 ml) gegeben. Die Reaktionsgefäße werden schnellstmöglich in den „GeneTouch Thermo Cycler“ (Bioer Technologie, Hangzhou, China) verbracht und das Programm gestartet.

Tab. 7: Temperaturprogramm PCR 1

Temperatur	Zeit	Zyklen
92 °C	2 Minuten	
92 °C	30 Sekunden	35x
46 °C	1 Minute	
72 °C	1 Minute	
72 °C	5 Minuten	
15 °C	∞	

Nach Ablauf der ersten PCR wurde der Mastermix für die zweite PCR, wie in Tab. 8 dargestellt, angesetzt.

Tab. 8: Mastermix Universalherpesprimer PCR 2 („nested PCR“)

Reagenz/Chemikalie	V(μ l) pro Probe
Aqua Dest.	17,85
10x Herpes Puffer	2,5
DMSO	2,25
VORTEXING	
dNTPs (10mM)	0,4
5'TGVn(f)	0,25
3'IYG(r)	0,25

Auch hier wurden, wie oben beschrieben, PCR SoftTubes (0,2 ml) für jede Probe inkl. Positiv-, Negativ- und Wasserkontrollen vorbereitet. In jedes PCR SoftTube (0,2 ml) wurden 23,5 μ l Mastermix vorgelegt und anschließend 1 μ l des entsprechenden PCR-Produktes der ersten PCR und letztlich 0,5 μ l Taq DNA Polymerase 5 U/ μ l gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden sofort in den „GeneTouch Thermal Cycler“ (Bioer Technologie, Hangzhou, China) verbracht und das gleiche Programm gestartet.

Das PCR-Produkt der zweiten PCR wurde für die Gelelektrophorese (siehe 4.2.4.) auf ein 2 %iges Agarose-Gel (siehe Tab. 9) aufgetragen. Nach erfolgter Trennung der DNS-Fragmente wurde das Gel unter UV-Licht mit Hilfe des „FluorChem FC3“ (Proteinsimple, San Jose, USA) ausgewertet. Banden in korrekter Höhe wurden ausgeschnitten, aus dem Gel isoliert und sequenziert (Eurofins Genomics, Wien, Österreich).

4.2.4. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese erfolgt eine Trennung der DNS-Fragmente nach ihrer Größe. Da die DNS negativ geladen ist, wandert sie zum positiven Pol. Kleine Fragmente wandern schneller als große und erscheinen daher weiter unten auf dem Gel.

Für die Gelelektrophorese wurden 1,5%ige (β -Aktin) bzw. 2%ige (universal HV) Agarose-Gele verwendet. Zur Herstellung wurde die entsprechende Menge „Biozym LE Agarose“ (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) eingewogen (siehe Tab. 9) und in 150 ml

1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gelöst. Das Lösen erfolgt unter Zuhilfenahme einer Mikrowelle. Das Agarose/TAE-Puffer-Gemisch wurde so lange in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurden 6 µl Ethidiumbromid (EtBr) (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) zu dem Gemisch hinzugegeben, geschwenkt und das Gel gegossen.

Tab. 9: Agarose-Gel

% Agarose-Gel	m(g) Agarose (Biozym)
1,5 %	2,25
2 %	3,00

Für jede Probe wurden 4 µl „6x DNA Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf eine Wachsoberfläche (Parafilm®M) aufgebracht. Anschließend wurden 16 µl des entsprechenden PCR Produktes zu den jeweiligen 4 µl des „DNA Loading Dye“ hinzu pipettiert.

Die Elektrophorese-Kammer (Biorad, Wien, Österreich) wurde mit TAE-Puffer befüllt, sodass das Gel komplett bedeckt war. Dann wurden die Geltaschen mit den Proben geladen. Um die Größe der gewonnenen DNS-Fragmente bestimmen zu können, wurde auch eine Geltasche mit 4 µl DNS-Leiter („GeneRuler DNA Ladder Mix“ von ThermoScientific, Wien, Österreich) zwischen den Proben und den Kontrollen geladen.

Die Trennung der Fragmente erfolgte mittels „Mini Electrophoresis Power Supply E143“ (Consort, Turnhout, Belgien) bei einer Spannung von etwa 140 mV für 30 Minuten.

Nach erfolgter Auftrennung der DNS wurde jedes Gel im „FluorChem FC3“ (Proteinsimple, San Jose, USA) begutachtet. Gele waren nur auswertbar, wenn zumindest bei der Positivkontrolle eine Bande erwarteter Größe erkennbar waren, und die Negativ- und Wasserkontrolle keine Banden aufwiesen. Proben mit Banden auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle wurden als positiv bewertet. Zur Dokumentation wurden Gelfotos unter Ultraviolett-Licht im „FlourChem FC3“ (Proteinsimple, San Jose, USA) aufgenommen. Prominente PCR-Produkte wurden ausgestochen und wie unter 4.2.5. beschrieben einer Gelextraktion und einer anschließenden Sequenzierung unterzogen.

4.2.5. Gelextraktion

Um eine Gelextraktion durchzuführen, musste die entsprechende Bande aus dem Agarosegel mittels „x-tracta Generation II“ (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) ausgestochen werden. Um die Banden während des Ausstechens erkennen zu können, musste unter UV-Licht gearbeitet werden. Da sehr schwache Banden kaum extrahierbar und sequenzierbar sind, wurden nur stärkere Banden ausgestochen und extrahiert.

Durch das Wiegen der beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäße wurde das Gewicht des jeweiligen Gelstücks ermittelt. Nach dem Ausstechen der Banden erfolgte eine erneute Aufnahme des jeweiligen Gels mittels „FluorChem FC3“ (Proteinsimple, San Jose, USA), um sicher zu gehen, dass die gesamte Bande ausgestochen wurde. Waren noch Reste der gewünschten Bande auf dem Bild erkennbar, wurde nachgestochen, bis die gesamte Bande aus dem Gel erhalten wurde.

Für die anschließende Isolation der DNS aus dem Gel wurde das „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Schritte, bei denen keine Temperatur angegeben ist, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zentrifugationen fanden, soweit nicht anders angegeben, bei 14000 rpm für eine Minute statt.

Zu jedem ausgestochenen Gelstück erfolgte im ersten Schritt die Zugabe von „Binding Buffer“ (Bindungspuffer) im Verhältnis 1+1 (w/v) (Bsp.: Gel wog 120 mg → 120 µl Bindungspuffer wurden zugegeben) und es wurde bei 56 °C im Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für mindestens zehn Minuten bzw. bis zur kompletten Lösung des Gelfragments inkubiert. Während der Inkubation wurde das 1,5 ml Reaktionsgefäß mehrmals geschüttelt und am Ende mittels regulierbarem Vortex RS-VA 10 (Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland) gründlich vermischt. Die Lösung sollte eine gelbe Farbe zeigen, da dann der pH-Wert für die DNS-Bindung optimal ist.

Da die gewünschte Bande bei 280 bp lag, wurde das gleiche Volumen Isopropanol (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) zugegeben und anschließend erneut mittels Vortex gründlich vermischt.

Der Inhalt jedes 1,5 ml Reaktionsgefäßes wurde in die „GeneJET purification column“ (Reinigungssäule) überführt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Inhalt des

Sammelgefäßes wurde danach entleert, sodass das Gefäß für die weiteren Schritte zur Verfügung stand. Dann wurden erneut 100 µl Bindungspuffer in die Säule pipettiert und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen.

In einem nächsten Schritt wurde 700 µl „Wash Buffer“ (Waschpuffer) pro Säule hinzugefügt, welcher vor erstmaliger Verwendung mit 40 ml Ethanol 96 % (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) versetzt wurde, gegeben. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und die leere Säule erneut zentrifugiert, um den Waschpuffer komplett aus der Säule zu entfernen.

Dann wurde jede Säule in ein neues, beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Mittig auf die Membran der Säule wurden 50 µl „Elution Buffer“ (Elutionspuffer) pipettiert und zentrifugiert. Die so eluierte, aufgereinigte DNS wurde dann für die Sequenzierung vorbereitet.

4.2.6. Sequenzierung

Für jede der zu sequenzierenden Proben wurden je zwei Reaktionsgefäße beschriftet und mit 15 µl der jeweiligen Probe befüllt. Dann wurden in ein Reaktionsgefäß 2 µl 5'TGVn Primer, und in das zweite Reaktionsgefäß 2 µl 3'IYHn Primer pipettiert. Anschließend wurden die Probenröhrchen mit einer fortlaufenden Nummer beklebt, die Sequenzierung angefordert und die Proben eingeschickt (Eurofins Genomics, Wien, Österreich).

4.3. Auswertung

Die Auswertung der Sequenziererergebnisse erfolgte durch Sequenzvergleich mit den in der Gendatenbank „GenBank“ hinterlegten Herpesvirussequenzen unter Verwendung des Computerprogramms „Nucleotide BLAST“ des „National Center for Bioinformatics“ (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Zugriff 20.09.2021)).

Statistische Auswertungen zur Normalverteilung erfolgten mittels Varianzanalyse (<https://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx> (Zugriff 20.09.2021)), zur

Signifikanz mittels Student's t-Test (<https://www.socscistatistics.com/tests/studentttest> (Zugriff 20.09.2021)).

5. ERGEBNISSE

Alle Proben der Versuchsgruppe wurden photometrisch zur DNS-Validierung gemessen. In sieben Fällen war dies nicht möglich, da nicht ausreichend Material vorlag. Die Ergebnisse schwankten zwischen 2,85 ng/µl und 2662,7 ng/µl. Die DNS-Extrakte der Kontrollgruppe wurden nicht photometrisch gemessen.

Im folgenden Abschnitt sind alle PCR-Testergebnisse tabellarisch zusammengefasst, positive Ergebnisse wurden blau unterlegt. In Fällen, wo PCR-Produkte auch sequenziert und der amplifizierte Herpesvirustyp dadurch identifiziert werden konnte, ist dieser in der jeweils letzten Spalte angegeben. Folgende Tabelle zeigt die Resultate für die Herpesvirus-PCR von Proben erkrankter Pferde:

Tab. 10: Ergebnisse für Proben von Pferden mit okulären PEK

Nr.	Code	Lokalisation Probenentnahme	DNS in ng/µl	β-Aktin- PCR	HV- PCR	HV-Typ
1	AL1	Tumorgewebe	64,450	+	+	EHV-2
	AL2	PBMCs	/	+	-	
2	ALO	PEK DNA	/	+	-	
3	AM1	Konjunktiva	3,7000		+	EHV-2
	AM2	PEK DNA 1	303,05	+	-	
	AM3	PEK DNA 2	189,50	+	-	
	AM4	PEK DNA 3	477,00	+	-	
	AM5	PEK DNA 4	2662,7	+	-	
	AM6	PBMCs	258,80	+	-	
4	AN1	Orales PEK	92,558	+	-	
	AN2	Okuläres PEK rechts	417,85	+	-	
5	ANE	Tumorgewebe	103,80	+	+	
6	BE1	Intakte Konjunktiva	125,65	+	-	
	BE2	PEK DNA	154,05	+	-	
7	BO1	Tumorgewebe	4,7500		+	AHV-5
	BO2	PBMCs	188,75		+	EHV-2
8	DAR	Tumor DNA	/	+	-	

9	DEX	Tumorgewebe	87,900		+	EHV-2
10	FEE	Tumorgewebe	55,550	+	-	
11	HAN	Tumorgewebe	25,700	+	-	
12	JHC	Tumorgewebe	48,800	+	+	
13	KIR	Tumorgewebe	201,05		+	EHV-5
14	LAD	Tumorgewebe	/	+	-	
15	LIL	Tumorgewebe	29,350		+	
16	MO1	Periokuläre Läsion (PEK)		+	+	EHV-2
17	NAD	Tumorgewebe	356,50		+	
18	NAP	Tumorgewebe	190,55	+	+	EHV-2
19	NEP	Tupfer	/	+	-	
20	NIN	Tumorgewebe	/	+	-	
21	OC1	Tumorgewebe	6,4500	+	-	
	OC3	Nickhaut	10,350		+	
22	PA1	Tumorgewebe	29,200		+	EHV-5, AHV-5
	PA2	PEK-Abstrich	230,85		+	EHV-5
23	PU1	Tumorgewebe	2,8500	+	-	
	PU2	Rezidiv	80,050		+	EHV-5
24	RUB	Tumorgewebe	188,99		+	EHV-5
25	ST1	Korneales PEK	22,450	+	+	EHV-5
	ST2	Korneales PEK	5,6500	+	+	EHV-5
26	UR1	Tumorgewebe OS	63,350	+	-	
	UR2	Kontrolle OD	29,200	+	-	
27	VIC	Augentupfer	57,600	+	-	
28	VID	Tumorgewebe	97,750	+	-	
29	WI1	Okuläres PEK rechts	446,90	+	+	
	WI2	Okulärer Abstrich links	/	+	+	

Die hier nachstehende Tabelle (Tab. 11) beinhaltet die Resultate der Herpesvirus-PCR von Augentupferproben tumorfreier Kontrollpferde:

Tab. 11: Ergebnisse für Augentupferproben von Pferden ohne PEK

Nr.	Code	β -Aktin-PCR	HV-PCR	HV-Typ
1	BEN	+	+	
2	BIL	+	-	
3	BUS	+	+	
4	CAR	+	+	EHV-5
5	CLO	+	+	AHV-5
6	DP	+	+	EHV-5
7	DUD	+	+	EHV-2
8	ELM	+	-	
9	GRA	+	+	EHV-5
10	GOR	+	-	
11	HAN	+	+	
12	JEN	+	+	
13	LUX	+	-	
14	MER	+	-	
15	MIN	+	-	
16	MIS	+	-	
17	RAM	+	+	EHV-2
18	ROS	+	-	
19	SAM	+	-	
20	SAY	+	-	
21	SER	+	-	
22	SIN	+	-	
23	SON	+	-	
24	SOJ	+	+	EHV-2
25	SOP	+	-	
26	TAP	+	-	
27	VAL	+	+	AHV-5
28	VAN	+	+	
29	WOL	+	-	
30	ZOL	+	+	EHV-2

Zusammengefasst testeten demnach 21/44 Proben erkrankter Pferde bzw. 17/29 equinen Patienten positiv für Herpesvirus-DNS. Von den 30 gesunden Pferden (30 Proben) testeten 14 positiv für Herpesvirus-DNS. Statistisch ergab sich für den Ergebnisvergleich ein t-Wert von 0,91 bei einem p-Wert von 0,18 (<https://www.socscistatistics.com/tests/studentttest> (Zugriff 20.09.2021)). Dies bedeutet, dass erkrankte Pferde bei $p < 0,05$ nicht signifikant häufiger Herpesvirus-DNS-positiv waren, als tumorfreie Pferde.

In den Tumorproben wurde sechsmal EHV-2, sechsmal EHV-5 und zweimal AHV-5 (einmal in Form einer Ko-Infektion mit EHV-5) nachgewiesen. In den Augentupferproben gesunder Pferde wurde viermal EHV-2, dreimal EHV-5 und zweimal AHV-5 nachgewiesen. Bei all diesen Herpesvirustypen handelte es sich um Gamma-Herpesviren.

6. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden DNS-Extrakte von Augentumoren von 29 Pferden (44 Proben) mit Erkrankungen in Form eines okulären Plattenepithelkarzinoms oder seiner Vorstufen, sowie 30 DNS-Extrakte von Augentupferproben von Pferden, die aus anderen Gründen an der Veterinärmedizinische Universität Wien vorstellig wurden, auf Gamma-Herpesviren (EHV-2, EHV-5 und ASH-5) getestet. Bei dem untersuchten Probenmaterial handelte es sich bei der Kontrollgruppe aus ethischen Gründen ausschließlich um DNS aus okulären Tupferproben. Bei den erkrankten Pferden handelte es sich bei 37 Proben um DNS aus Tumorgewebe, bei vier um DNS aus okulären Tupfern und bei drei um DNS-Isolate aus peripheren, mononukleären Blutzellen. Statistisch gesehen konnte in dieser Untersuchung kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Detektion von Herpesvirus-DNS zwischen tumorfreien und tumorerkrankten Pferden festgestellt werden. Es war lediglich eine Tendenz erkennbar, dass Tumoren zu einem höheren Prozentsatz positiv auf die Gamma-Herpesviren EHV-2, EHV-5 und ASH-5 testeten, als Augentupferproben tumorfreier Pferde. Ein solches Ergebnis war teilweise zu erwarten, da ein großer Prozentsatz an Pferden latent v.a. mit EHV-2 und EHV-5 infiziert sind (Kershaw et al. 2001, Rushton et al. 2014, Rushton et al. 2013).

Auffällig war, dass ausschließlich Gamma-Herpesviren in den Proben gefunden wurden, obwohl die angewandte Consensus-PCR zum Nachweis aller bekannten equiden Herpesvirustypen geeignet ist (VanDevanter et al. 1996). Ein möglicher Grund dafür kann sein, dass die Gamma-Herpesviren, zu welchen EHV-2, EHV-5, AHV-5 gehören, in den B-Lymphozyten persistieren. Diese zirkulieren im Blut und wandern nach Aktivierung durch ein entsprechendes Agens in sekundäre lymphatische Organe oder in Lymphfollikel (Haas et al. 2016, Selbitz et al. 2015, Sodeik et al. 2012). Im subkonjunktivalen Bindegewebe des Auges befinden sich einige Lymphfollikel, in denen sich aktivierte B-Lymphozyten aufhalten können (Achilles et al. 2020). Die Alpha-Herpesviren (EHV-1, EHV-3, EHV-4) persistieren hauptsächlich in sensorischen Neuronen des N. trigeminus und dem Trigeminalganglion. Sie müssen durch bestimmte Faktoren wie Stress usw. reaktiviert werden, um in eine virämische Phase überzugehen (Haas et al. 2016). Aufgrund der oben genannten divergierenden Orte der Persistenz und Reaktivierung von Alpha- versus Gamma-Herpesviren kann erklärt werden, warum in den untersuchten Proben ausschließlich Letztere identifiziert wurden.

Wenn man das Ergebnis dieser Arbeit, mit den Ergebnissen der Studie von Anson et al. (1982) zu Herpesviren in bovinen okuläre PEK vergleicht, fällt auf, dass bei den bovinen Tumoren aus keiner Probe BHV-5 kultiviert werden konnte, aber mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse in 7/7 Zellkulturen BHV-5-Antigene nachgewiesen wurden. In der Studie wurde kein kausaler Zusammenhang zwischen der Entstehung von PEK und Herpesviren dargestellt. Das Ergebnis kann nicht direkt mit dem Ergebnis unserer Arbeit verglichen werden, da in der Studie von Anson et al. (1982) keine PCR durchgeführt wurde. Des Weiteren wurde nur auf das bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) und BHV-5 untersucht. Beide gehören zu der Gruppe der Alpha-Herpesviren, welche in der vorliegenden Arbeit in keiner Probe nachgewiesen werden konnten (Anson et al. 1982).

Auch ein Vergleich mit der Studie über cyprine PEK ist nicht zur Gänze gegeben, da es sich bei den Fischen um kutane PEK handelte, und nicht um okuläre wie in der vorliegenden Arbeit. In der Studie wurde zwar ein kausaler Zusammenhang von PEK mit der Präsenz von Cyprinen Herpesviren Typ 1 hergestellt, allerdings wurde dort keine tumorfreie Kontrollgruppe auf CyHV-1 beprobt, wodurch die Aussagekraft ungenügend ist (Sirri et al. 2018).

Aufgrund dessen, dass in der vorliegenden Studie nicht gänzlich übereinstimmendes Probenmaterial aus Patienten- und Kontrollgruppe getestet wurde, war eine adäquate Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht vollständig gegeben. Ein limitierender Faktor in dieser Arbeit war, dass okuläre Tumorproben nicht mit analogem Gewebe von gesunden Augen verglichen wurde, sondern ausschließlich mit Augentupfern tumorfreier Pferde. Diese enthielten zum Großteil Tränenflüssigkeit und epitheliale Zellen von der Oberfläche der Cornea und der Konjunktiva (Ozkan et al. 2017). Im Gegensatz dazu ist von den Tumoren zusammenhängendes Gewebe entnommen worden. Es ist davon auszugehen, dass diese Proben neben Tumorzellen auch normale Epithelzellen und Fibroblasten enthielten, sowie Endothelzellen und Immunzellen wie etwa T- und B-Lymphozyten/Plasmazellen, dendritische Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Ji et al. 2020). Equine Gamma-Herpesviren persistieren vorwiegend in B-Lymphozyten (Sorel and Dewals 2018), was die Möglichkeit eröffnet, dass die Detektion von latenten Gamma-Herpesviren lediglich aus Tumor-B-Zellen erfolgt sein könnte.

In weiteren Schritten wird versucht werden, Gewebeproben von Pferden mit PEK sowohl von dem erkrankten Auge, als auch vergleichend von dem gesunden Auge zu untersuchen, um einen genaueren Zusammenhang der PEK mit den Herpesviren herzustellen. Zudem ist

geplant, die Herpesviren-DNS mittels einer quantitativen PCR (qPCR) zu amplifizieren, um die tatsächliche Virus-DNS-Konzentration pro Zelle in den jeweiligen Proben bestimmen zu können. Ein sehr wichtiger Schritt wäre auch der Nachweis selektierter Boten-Ribonukleinsäuren aus Tumorgewebe versus gesundem Probenmaterial. Dadurch könnte der Aktivierungsstatus des Virus im Gewebe ermittelt werden. Derzeit wird angestrebt, Zellen aus equinen, okulären Tumoren in Kultur zu nehmen, die unterschiedlichen Zellfraktionen anzureichern und im Anschluss einem Gamma-Herpesvirus-Screening auf DNS- und RNS-Ebene zuzuführen, um den jeweils infizierten Zelltyp nebst Reaktivierungsstatus des Virus identifizieren zu können.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die hier präsentierte Studie einen ersten guten Schritt dahingehend darstellt, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von equinen okulären PEK und Gamma-Herpesviren zu untersuchen. Diesem werden weitere wissenschaftliche Schritte auf dem Gebiet folgen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Herpesviren sind eine Familie von DNS-Viren, die genetisch heterolog, funktionell jedoch sehr ähnlich sind. Dies beinhaltet auch deren Fähigkeit, eine lebenslange, latente Infektion in ihrem Wirt zu etablieren. Herpesviren bei Menschen und Tieren werden in Alpha-, Beta- und Gamma-Herpesviren unterteilt. Bei Menschen sind bestimmte Gamma-Herpesviren krebserregend, so das Epstein-Barr-Virus (EBV), das bestimmte Formen von Lymphomen und Hals-Kopf-Plattenepithelkarzinomen induziert.

Beim Pferd ist das Plattenepithelkarzinom (PEK) ein häufiger, maligner Tumor, der aus epithelialen Keratinozyten hervorgeht. Bei Equiden entstehen PEK hauptsächlich an mukokutanen Übergängen - d.h. in der Anogenital, der Hals-Kopf- und der Augenregion. Man weiß inzwischen, dass faktisch 100 % aller anogenitalen PEK durch das Equine Papillomvirus Typ 2 (EcPV-2) induziert sind. Dieses Virus verursacht wahrscheinlich auch 20-25 % aller Hals-Kopf-PEK bei Pferdeartigen. Okuläre PEK dürften allerdings eine eigene Entität darstellen, bei deren Entstehung Papillomviren keine Rolle spielen, sondern vielmehr Ultraviolette-Strahlung (UV-Strahlung) und bislang unbekannte Faktoren.

Auf Basis humanmedizinischer Daten hinsichtlich der aktiven Beteiligung von Herpesviren bei bestimmten PEK-Formen im Hals-Kopf-Bereich, stellten wir die Hypothese auf, dass Herpesviren mit der Entstehung okulärer PEK bei Equiden assoziiert sind. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden DNS-Isolate aus okulären PEK und deren Vorstufen bzw. Augentupferproben von tumorfreien Kontrollpferden auf Anwesenheit von Herpesvirus-DNS mittels Herpesvirus-consensus-PCR untersucht. Amplifikationsprodukte in hoher Konzentration wurden zudem sequenziert und mittels Sequenzvergleich identifiziert.

Insgesamt testeten 21/44 Tumor-DNS-Isolate bzw. 17/29 equinen Patienten positiv für Herpesvirus-DNS. Von den 30 gesunden Pferden (30 Proben) testeten 14 positiv für Herpesvirus-DNS. Erkrankte Pferde waren bei $p < 0,05$ nicht signifikant häufiger Herpesvirus-DNS-positiv, als tumorfreie Pferde. In den Tumorproben wurde EHV-2 in 6/21, EHV-5 in 6/21 und AHV-5 (einmal in Form einer Ko-Infektion mit EHV5) in 2/21 Fällen nachgewiesen. In gesunden Pferden wurde EHV-2 in 4/14, EHV-5 in 3/14 und AHV-5 in 2/14 Augentupfern nachgewiesen. Bei all diesen Herpesvirustypen handelte es sich um Gamma-Herpesviren. Da eine Vielzahl von Equiden weltweit latent mit Gamma-Herpesviren

infiziert ist, war dieses Ergebnis nicht ganz überraschend. In einem nächsten Schritt ist nun geplant, die jeweils Herpesvirus-positiven Zelltypen in okulären PEK zu identifizieren, um nach dieser erstmaligen Studie auf dem Gebiet präzisere Informationen zur Ätiologie okulärer PEK in Zusammenhang mit Gamma-Herpesvirus-Infektionen zu erhalten.

8. SUMMARY

Herpesviruses are a family of DNA viruses that are genetically highly heterogeneous but share common functional features. These include the ability to switch from lytic to latent infection with lifelong persistence. Herpesviruses in birds and mammals are sub-classified as alpha-, beta- and gamma-herpesviruses. In humans, specific gamma-herpesviruses have been shown to induce cancer disease. Notably Epstein-Barr-Virus (EBV) has been recognized as major aetiological agent of lymphomas and subtypes of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

In equids, squamous cell carcinoma (SCC) is a common, malignant tumour disease arising from epithelial keratinocytes. Tumours mainly develop at muco-cutaneous junctions, i.e. the anogenital, the head-and-neck and the ocular regions. It is widely accepted today that equine papillomavirus type 2 (EcPV-2) infections cause virtually 100 % of anogenital SCCs in equids. In addition, 20 to 25 % of equid HNSCCs has likely induced by EcPV-2. Ocular SCC seem to represent a different tumour entity that is not related to papillomavirus infection, but rather associated with overexposure to ultraviolet light and other, so far unknown factors.

Based on the reported association of human HNSCC subtypes with gamma-herpesvirus, and possibly also alpha-herpesvirus infection (Herpes simplex virus), we hypothesized that equid ocular SCCs and related precursor lesions are caused – at least in part – by herpesviruses. To address this postulate, a series of DNA isolates derived from ocular SCC versus ocular swabs collected from tumour-free horses were subjected to herpesvirus DNA screening using a herpesvirus consensus PCR approach.

High-yield amplicons were sequenced to identify the detected herpesvirus type. In total 21/44 samples from 29 horses affected by ocular SCCs or SCC precursor lesions scored positive for herpesvirus DNA. From the 30 control horses, 14/30 swabs tested positive. At $p < 0.05$, the difference between herpesvirus detection rates in the patient and the control group was not significant. However, a tendency towards tumour samples more frequently harbouring herpesvirus DNA was noted. In the patient group, EHV-2 DNA was identified in 6/21, EHV-5 in 6/21, and AHV-5 in 2/21 PCR-positive cases (in one case in combination with EHV-5). In the control group, EHV-2 DNA was found in 4/14, EHV-5 in 3/14, and AHV-5 in 2/14 PCR-positive cases. Due to the high numbers of clinically healthy horses being latently infected

by gamma-herpesviruses, this finding is not completely surprising. In a next step, focus will be put on identifying the cell type infected by gamma-herpesviruses in ocular SCC.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AHV	asinines Herpesvirus
BHV	bovines Herpesvirus
bp	Basenpaare
CIS	Carcinoma in situ (englisch) = Karzinom in situ
CMV	Zytomegalievirus
CyHV	cyprines Herpesvirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy- <u>N</u> ukleosid-Triphosphate
EBV	Epstein-Barr-Virus
EcPV	Equus caballus Papillomvirus
EHM	equine Herpesmyeloenzephalopathie
EHV	equines Herpesvirus
EMPF	equine multinoduläre Lungenfibrose
EtBr	Ethidiumbromid
FHV	felines Herpesvirus
GHV	Gamma-Herpesvirus
Gl.	Ganglion
HHV	humanes Herpesvirus

HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma (englisch) = Kopf und Hals Plattenepithelkarzinom
HPV	Humanes Papillomvirus
hrHPV	Hochrisiko-Papillomviren
HSV	Herpes simplex Virus
kbp	Kilobasenpaare
KSHV	Kaposi-Sarkom assoziiertes Virus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNS	messenger Ribonukleinsäure (englisch) = Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
N.	Nervus
NCBI	National Center for Bioinformatics
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PEK	Plattenepithelkarzinom
PGE ₂	Prostaglandin E2
qPCR	quantitative PCR
RGO	Research Group oncology

rpm	rounds per minute (englisch) = Umdrehungen pro Minute
SCC	Squamous cell carcinoma (englisch) = Plattenepithelkarzinom
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
UV	Ultraviolett
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
μ l	Mikroliter

10. LITERATURVERZEICHNIS

Achilles, W., Černý, H., Kratwald-Junghanns, M.-E., Schilder, A., Simoens, P., 2020. Anatomie für die Tiermedizin. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.

Allen, G.P., Bryans, J.T., 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog Vet Microbiol Immunol* 2, 78-144.

Anson, M.A., Benfield, D.A., McAdaragh, J.P., 1982. Bovine herpesvirus-5 (DN599) antigens in cells derived from bovine ocular squamous cell carcinoma. *Can J Comp Med* 46, 334-337.

Azizkhan, J.C., Jensen, D.E., Pierce, A.J., Wade, M., 1993. Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3, 229-254.

Baan, R., Grosse, Y., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Coglianò, V., Group, W.H.O.I.A.f.R.o.C.M.W., 2009. A review of human carcinogens--Part F: chemical agents and related occupations. *Lancet Oncol* 10, 1143-1144.

Bartels, E., Brink, K., Fastert, G., Ignatowicz, E., 2018. Technische Mathematik und Datenauswertung für Laborberufe, 7th ed. Haan-Gruiten: Verlag Europa-Lehrmittel Nourney Vollmer GmbH & Co. KG.

Bellone RR, Liu J, Petersen JL, Mack M, Singer-Berk M, Drögemüller C, Malvick J, Wallner B, Brem G, Penedo MC, Lassaline M. 2017. A missense mutation in damage-specific DNA binding protein 2 is a genetic risk factor for limbal squamous cell carcinoma in horses. *International journal of cancer*, 141 (2): 342-353

Blyth, W.A., Hill, T.J., Field, H.J., Harbour, D.A., 1976. Reactivation of herpes simplex virus infection by ultraviolet light and possible involvement of prostaglandins. *J Gen Virol* 33, 547-550.

Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Coglianò, V., Group, W.H.O.I.A.f.R.o.C.M.W., 2009. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10, 321-322.

- Brandt, S., Haralambus, R., Schoster, A., Kirnbauer, R., Stanek, C., 2008. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. *J Gen Virol* 89, 1390-1395.
- Calle, P.P., McNamara, T., Kress, Y., 1999. Herpesvirus-associated papillomas in koi carp (*Cyprinus carpio*). *J Zoo Wildl Med* 30, 165-169.
- Cantalupo, P.G., Katz, J.P., Pipas, J.M., 2018. Viral sequences in human cancer. *Virology* 513, 208-216.
- Carter, J.B., Saunders, V.A., 2013. *Virology - Principles and Applications*, 2nd ed. Wiley, Chichester, UK.
- Chang, T.W., 1983. Herpes simplex virus infection. *Int J Dermatol* 22, 1-7.
- Cohen, J.I., 2000. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343, 481-492.
- Cohrs, R.J., Gildea, D.H., 2001. Human herpesvirus latency. *Brain Pathol* 11, 465-474.
- Dayyani, F., Etzel, C.J., Liu, M., Ho, C.H., Lippman, S.M., Tsao, A.S., 2010. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2, 15.
- Dugan, S.J., Curtis, C.R., Roberts, S.M., Severin, G.A., 1991. Epidemiologic study of ocular/adnexal squamous cell carcinoma in horses. *J Am Vet Med Assoc* 198, 251-256.
- Edington, N., Bridges, C.G., Patel, J.R., 1986. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch Virol* 90, 111-124.
- Foot, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., 2004. Detection of EHV-1 and EHV-4 DNA in unweaned Thoroughbred foals from vaccinated mares on a large stud farm. *Equine Vet J* 36, 341-345.
- Haas, L., Osterrieder, K., Selbitz, H.-J., Valentin-Weigand, P., Samson-Himmelstjerna, G., 2016. Infektionskrankheiten, in: Brehm, W., Gehlen, H., Ohnesorge, B., Wehrend, A. (Eds.), *Handbuch Pferdepraxis*, 4th ed. Enke Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 1108-1135.

Heawchaiyaphum, C., Iizasa, H., Ekalaksananan, T., Burassakarn, A., Kiyono, T., Kanehiro, Y., Yoshiyama, H., Pientong, C., 2020. Epstein-Barr Virus Infection of Oral Squamous Cells. *Microorganisms* 8.

Henle, G., Henle, W., 1966. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* 91, 1248-1256.

Hill, T.J., Blyth, W.A., Harbour, D.A., 1978. Trauma to the skin causes recurrence of herpes simplex in the mouse. *J Gen Virol* 39, 21-28.

Izume, S., Kirisawa, R., Ohya, K., Ohnuma, A., Kimura, T., Omatsu, T., Katayama, Y., Mizutani, T., Fukushi, H., 2017. The full genome sequences of 8 equine herpesvirus type 4 isolates from horses in Japan. *J Vet Med Sci* 79, 206-212.

Jerele, S., Davis, E., Mapes, S., Pusterla, N., Navas Gonzalez, F.J., Iglesias Pastrana, C., Abdelfattah, E.M., McLean, A., 2020. Survey of Serum Amyloid A and Bacterial and Viral Frequency Using qPCR Levels in Recently Captured Feral Donkeys from Death Valley National Park (California). *Animals (Basel)* 10.

Ji, A.L., Rubin, A.J., Thrane, K., Jiang, S., Reynolds, D.L., Meyers, R.M., Guo, M.G., George, B.M., Mollbrink, A., Bergenstrahle, J., Larsson, L., Bai, Y., Zhu, B., Bhaduri, A., Meyers, J.M., Rovira-Clave, X., Hollmig, S.T., Aasi, S.Z., Nolan, G.P., Lundeberg, J., Khavari, P.A., 2020. Multimodal Analysis of Composition and Spatial Architecture in Human Squamous Cell Carcinoma. *Cell* 182, 497-514 e422.

Jouanguy, E., Beziat, V., Mogensen, T.H., Casanova, J.L., Tangye, S.G., Zhang, S.Y., 2020. Human inborn errors of immunity to herpes viruses. *Curr Opin Immunol* 62, 106-122.

Kainzbauer, C., Rushton, J., Tober, R., Scase, T., Nell, B., Sykora, S., Brandt, S., 2012. Bovine papillomavirus type 1 and *Equus caballus* papillomavirus 2 in equine squamous cell carcinoma of the head and neck in a Connemara mare. *Equine Vet J* 44, 112-115.

Kershaw, O., von Oppen, T., Glitz, F., Deegen, E., Ludwig, H., Borchers, K., 2001. Detection of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis. *Virus Res* 80, 93-99.

- Kleiboeker, S.B., Chapman, R.K., 2004. Detection of equine herpesvirus 3 in equine skin lesions by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 16, 74-79.
- Knottenbelt, D.C., 2009. Squamous cell carcinoma, in: Knottenbelt, D.C. (Ed.), *Pascoe's Principles and Practice of Equine Dermatology*, Second Edition ed. Saunders Elsevier, London, UK, pp. 427-433.
- Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M., Yamanishi, K., 1991. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 72 (Pt 6), 1401-1408.
- Lassaline, M., Cranford, T.L., Latimer, C.A., Bellone, R.R., 2015. Limbal squamous cell carcinoma in Haflinger horses. *Vet Ophthalmol* 18, 404-408.
- Longnecker, R.M., Kieff, E., Cohen, J.I., 2013. *Epstein-Barr Virus - Fields Virology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Luppi, M., Barozzi, P., Morris, C., Maiorana, A., Garber, R., Bonacorsi, G., Donelli, A., Marasca, R., Tabilio, A., Torelli, G., 1999. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol* 73, 754-759.
- Mawdesley-Thomas, L.E., Bucke, D., 1967. Fish pox in the roach (*Rutilus rutilus* L.). *Vet Rec* 81, 56-57.
- Metcalf, E.S., 2001. The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Anim Reprod Sci* 68, 229-237.
- Mullis, K.B., 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48, 579-582.
- Narayanan, D.L., Saladi, R.N., Fox, J.L., 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 49, 978-986.
- Ozkan, J., Nielsen, S., Diez-Vives, C., Coroneo, M., Thomas, T., Willcox, M., 2017. Temporal Stability and Composition of the Ocular Surface Microbiome. *Sci Rep* 7, 9880.
- Parkin, D.M., 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118, 3030-3044.

Patil, S.P., Sodhi, S.J., Tambe, S.D., Gada, V., Vikhe, D., 2016. Viruses in oral squamous cell carcinoma: a review. *Pravara Med Rev*, 4-7.

Plummer, G., Waterson, A.P., 1963. Equine herpes viruses. *Virology* 19, 412-416.

Pusterla, N., David Wilson, W., Madigan, J.E., Ferraro, G.L., 2009. Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: a review of recent developments. *Vet J* 180, 279-289.

Reavill, D., Roberts, H., 2007. Diagnostic cytology of fish. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 10, 207-234, vii.

Reed, S.M., Toribio, R.E., 2004. Equine herpesvirus 1 and 4. *Vet Clin North Am Equine Pract* 20, 631-642.

Rushton, J.O., Kolodziejek, J., Nell, B., Nowotny, N., 2014. Prevalence of asinine herpesvirus type 5 (AsHV-5) infection in clinically normal Lipizzaner horses. *Vet J* 200, 200-203.

Rushton, J.O., Kolodziejek, J., Tichy, A., Nell, B., Nowotny, N., 2013. Detection of equid herpesviruses 2 and 5 in a herd of 266 Lipizzaners in association with ocular findings. *Vet Microbiol* 164, 139-144.

Santpere, G., Darre, F., Blanco, S., Alcamí, A., Villoslada, P., Mar Alba, M., Navarro, A., 2014. Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project. *Genome Biol Evol* 6, 846-860.

Scase, T., Brandt, S., Kainzbauer, C., Sykora, S., Bijmolt, S., Hughes, K., Sharpe, S., Foote, A., 2010. Equus caballus papillomavirus-2 (EcPV-2): an infectious cause for equine genital cancer? *Equine Vet J* 42, 738-745.

Schulman, M.L., Becker, A., van der Merwe, B.D., Guthrie, A.J., Stout, T.A., 2015. Epidemiology and reproductive outcomes of EHV-1 abortion epizootics in unvaccinated Thoroughbred mares in South Africa. *Equine Vet J* 47, 155-159.

Scott, D.W., Miller, W. H. Jr. , 2003. Squamous cell carcinoma, in: Scott, D.W., Miller, W. H. Jr. (Ed.), *Equine Dermatology*, 1 ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, pp. 707-712.

Secretan, B., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Cogliano, V., Group, W.H.O.I.A.f.R.o.C.M.W., 2009. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol* 10, 1033-1034.

Selbitz, H.-j., Truyen, U., Valentin-Weigand, P., 2015. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 10th ed. Enke Verlag, Stuttgart, Germany.

Sirri, R., Ciulli, S., Barbe, T., Volpe, E., Lazzari, M., Franceschini, V., Errani, F., Sarli, G., Mandrioli, L., 2018. Detection of Cyprinid Herpesvirus 1 DNA in cutaneous squamous cell carcinoma of koi carp (*Cyprinus carpio*). *Vet Dermatol* 29, 60-e24.

Sixbey, J.W., Vesterinen, E.H., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Walton, L.A., Pagano, J.S., 1983. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature* 306, 480-483.

Slater, J.D., Borchers, K., Field, H.J., 1994a. Equine herpesvirus-1: a neurotropic alphaherpesvirus. *Vet Rec* 135, 239-240.

Slater, J.D., Borchers, K., Thackray, A.M., Field, H.J., 1994b. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J Gen Virol* 75 (Pt 8), 2007-2016.

Social Science Statistics <https://www.socscistatistics.com/tests/studentttest> (Zugriff 20.09.2021)

Social Science Statistics <https://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx> (Zugriff 20.09.2021)

Sodeik, B., Messerle, M., Schulz, T.F., 2012. herpesviren, in: Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, g.-D., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. (Eds.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 540-561.

Sorel, O., Dewals, B.G., 2018. The Critical Role of Genome Maintenance Proteins in Immune Evasion During Gammaherpesvirus Latency. *Front Microbiol* 9, 3315.

- Stanley, M.A., 2001. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* 52, 45-59.
- Straus, S.E., Cohen, J.I., Tosato, G., Meier, J., 1993. NIH conference. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 118, 45-58.
- Sutton, G.A., Viel, L., Carman, P.S., Boag, B.L., 1998. Pathogenesis and clinical signs of equine herpesvirus-1 in experimentally infected ponies in vivo. *Can J Vet Res* 62, 49-55.
- Sykora, S., Brandt, S., 2017. Papillomavirus infection and squamous cell carcinoma in horses. *Vet J* 223, 48-54.
- Sykora, S., Jindra, C., Hofer, M., Steinborn, R., Brandt, S., 2017. Equine papillomavirus type 2: An equine equivalent to human papillomavirus 16? *Vet J* 225, 3-8.
- Taktaz Hafshejani, T., Nekoei, S., Vazirian, B., Doosti, A., Khamesipour, F., Anyanwu, M.U., 2015. Molecular Detection of Equine Herpesvirus Types 1 and 4 Infection in Healthy Horses in Isfahan Central and Shahrekord Southwest Regions, Iran. *Biomed Res Int* 2015, 917854.
- Telford, E.A., Studdert, M.J., Agius, C.T., Watson, M.S., Aird, H.C., Davison, A.J., 1993. Equine herpesviruses 2 and 5 are gamma-herpesviruses. *Virology* 195, 492-499.
- Thein, P., Darai, G., Janssen, W., Bergle, R.D., Strube, W., Floss, G., 1993. [Recent information about the etiopathogenesis of paralytic forms of herpesvirus infection in horses]. *Tierarztl Prax* 21, 445-450.
- Thiemann, A., denBoom, P., 2012. Herpesvirus infection in equids. *Vet Rec* 170, 547-548.
- van den Top, J.G., de Heer, N., Klein, W.R., Ensink, J.M., 2008. Penile and preputial squamous cell carcinoma in the horse: a retrospective study of treatment of 77 affected horses. *Equine Vet J* 40, 533-537.
- van Maanen, C., 2002. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet Q* 24, 58-78.
- VanDevanter, D.R., Warrenner, P., Bennett, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M., 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 34, 1666-1671.

Vockerodt, M., Yap, L.F., Shannon-Lowe, C., Curley, H., Wei, W., Vrzalikova, K., Murray, P.G., 2015. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *J Pathol* 235, 312-322.

Widener, R.W., Whitley, R.J., 2014. Herpes simplex virus. *Handb Clin Neurol* 123, 251-263.

Williams, K.J., Robinson, N.E., Lim, A., Brandenberger, C., Maes, R., Behan, A., Bolin, S.R., 2013. Experimental induction of pulmonary fibrosis in horses with the gammaherpesvirus equine herpesvirus 5. *PLoS One* 8, e77754.

Wilson, W.D., 1997. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 13, 53-72.

Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L., 2013. Squamous cell carcinoma, in: Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L. (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, pp. 310-312.

Yao, Q.Y., Rickinson, A.B., Epstein, M.A., 1985. A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 35, 35-42.

Yildirim, Y., Yilmaz, V., Kirmizigul, A.H., 2015. Equine herpes virus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in horses and donkeys in northeastern Turkey. *Iran J Vet Res* 16, 341-344.

You, Y., Cheng, A.C., Wang, M.S., Jia, R.Y., Sun, K.F., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Chen, S., Liu, M.F., Zhao, X.X., Chen, X.Y., 2017. The suppression of apoptosis by alpha-herpesvirus. *Cell Death Dis* 8, e2749.

zur Hausen, H., 1996. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288, F55-78.

11. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Proben erkrankte Pferde.....	Seite 16
Tab. 2: Augentupferproben Pferde ohne okuläre Tumoren/PEK.....	Seite 18
Tab. 3: Mastermix β -Aktin PCR.....	Seite 23
Tab. 4: Temperaturprogramm β -Aktin PCR.....	Seite 24
Tab. 5: Mastermix Universalherpesprimer PCR 1.....	Seite 25
Tab. 6: Zusammensetzung 10x Herpes spezial Puffer.....	Seite 26
Tab. 7: Temperaturprogramm PCR 1.....	Seite 26
Tab. 8: Mastermix Universalherpesprimer PCR 2 („nested PCR“).....	Seite 27
Tab. 9: Agarose-Gel.....	Seite 28
Tab. 10: Ergebnisse für Proben von Pferden mit okulären PEK.....	Seite 32
Tab. 11: Ergebnisse für Augentupferproben von Pferden ohne PEK.....	Seite 34
Tab. 12: Verwendete Geräte.....	Seite 55
Tab. 13: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.....	Seite 56
Tab. 14: Verwendete Materialien.....	Seite 57
Tab. 15: Verwendete Kits.....	Seite 57

12. ANHANG

12.1. Verwendete Geräte und Materialien

12.1.1. Verwendete Geräte

Tab. 12: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
NanoPhotometer®NP80	IMPLEN GmbH, München, Deutschland
Biohit PROLINE™ Plus 0,5-10µl	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pipetman Classic™ 2-20µl	Gilson, Middleton, USA
Pipetman Classic™ 20-200µl	Gilson, Middleton, USA
Pipetman Classic™ 100-1000µl	Gilson, Middleton, USA
LifeECO Thermal Cycler	Bioer Technologie, Hangzhou, China
GeneTouch Thermal Cycler	Bioer Technologie, Hangzhou, China
RS-VA 10 (regelbarer Vortexer)	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR, Wien, Österreich
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sigma 1-15K Mikrozentrifuge	Sigma Zentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland
Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Mini Electrophoresis Power Supply E143	Consort, Turnhout, Belgien
FlourChem FC3	Proteinsimple, San Jose, USA

12.1.2. Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Tab. 13: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Wien, Österreich
Ethanol 96%	Sigma-Aldrich, Wien, Österreich
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, Wien, Österreich
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopropanol (x%)	Sigma-Aldrich, Wien, Österreich
Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCRBIO HS VeriFi™ Polymerase (2u/μl)	PCR Biosystems, Wayne, USA
3' β-Aktin Primer (5'CGT-CRT-ACT-CCT-GCT-TGC-TGA-TCC3')	Eurofins Genomics, Wien, Österreich
5' β-Aktin Primer (5'TCA-CCC-ACA-CTG-TGC-CCA-TCT-ACG3')	Eurofins Genomics, Wien, Österreich
5x PCR VeriFi Buffer	PCR Biosystems, Wayne, USA
Taq DNA Polymerase 5u/μl	Roche, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich
dNTPs (10mM)	Roche, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich
5' DFA Primer	Eurofins Genomics, Wien, Österreich
5' ILK Primer	Eurofins Genomics, Wien, Österreich
3' KGI Primer	Eurofins Genomics, Wien, Österreich
5' TGVn(f) Primer	Eurofins Genomics, Wien, Österreich
3' IYGn(r) Primer	Eurofins Genomics, Wien, Österreich

12.1.3. Verwendete Materialien

Tab. 14: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Pipettenspitzen 1-20µl one touch steril	Sorenson BioScience, Murray, USA
Pipettenspitzen 1-40µl steril, mit Filter	Labcon North America, Petaluma, USA
Pipettenspitzen 1-200µl steril mit Filter	Labcon North America, Petaluma, USA
Pipettenspitzen 100-1000µl steril mit Filter	Labcon North America, Petaluma, USA
PCR SoftTubes, 0,2ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
x-tracta Generation II	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Parafilm®M	Bemis Company, Neenah, USA
Sterile Skalpellklingen (21)	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Erlenmeyerkolben 250ml	Sigma-Aldrich, Wien, Österreich

12.1.4. verwendete Kits

Tab. 15: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

13. DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich noch bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung der Arbeit unterstützt haben.

Allen voran bei Sabine, die mir diese interessante Arbeit auch in Coronazeiten ermöglicht hat, und mit immer mit Rat und Tat beiseite stand, wenn ich einmal nicht weiter wusste.

Des Weiteren möchte ich mich bei Lea bedanken, die mir im Labor immer zur Seite gestanden hat. Ohne ihr Wissen und ihre Unterstützung hätte die Laborarbeit deutlich länger gedauert und wäre nicht mit so viel Spaß verbunden gewesen.

Vielen Dank auch an meine Freunde, die mich auch in stressigen Zeiten ertragen haben.

Zu guter Letzt geht ein ganz besonderer Dank an meine Eltern, ohne die dieses Studium überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Die Unterstützung auch in schwierigen Zeiten weiß ich sehr zu schätzen.