

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinik für Pferde

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

**Homöostase von BPV Episomen in in-vitro infizierten equinen Fibroblasten –  
ein Modell nahe am Sarkoid?**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Karen von Bloh

Wien, im 07.2023

Betreuer: Dr.med.vet. Edmund Hainisch, PhD.

Klinik für Pferde

Department für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachterin: Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Barbara Pratscher

Klinik für Kleintiere

Department für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

## **Eigenständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass in dieser Arbeit keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen einbezogen und die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitenden Tätigkeiten mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt wurden. Zudem erkläre ich, dass die zur Beurteilung vorgelegte Diplomarbeit eigenständig verfasst sowie die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht wurde.

Karen von Bloh

## **Abstrakt**

Equine Sarkoid sind lokal aggressive, nicht-metastasierende Hauttumore bei Equiden und die häufigste Hautneoplasie bei Pferden weltweit. Sie können das Wohlergehen der betroffenen Pferde stark beeinträchtigen und zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten führen. Die Erkrankung ist multifaktoriell bedingt mit dem Bovinen Papillomvirus-1 (BPV-1) und dem Bovinen Papillomvirus-2 (BPV-2) als wichtigsten ätiologischen Faktor. Die derzeit bestehenden *in vitro* Modelle haben einige Limitationen. Erst kürzlich konnte an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien ein *in vitro* Infektionsmodell mit equinen Fibroblasten etabliert werden. Diese Zellen wurden über mehrere Zellpassagen hinweg untersucht und wiesen viele Merkmale der natürlichen BPV-Infektion auf, was darauf hindeutet, dass diese Zellen Ähnlichkeiten mit der *in vivo* Situation haben könnten. In der nachfolgenden Arbeit wurde untersucht, ob episomale Virus DNS unabhängig des Infektionstiters in solchen Fibroblasten erhalten bleibt und repliziert wird. Außerdem wurde analysiert, ob im Laufe der Zellpassagen die Kopienzahl/Zelle der episomalen DNS ähnlich der in natürlichen Sarkoidzellen ist. Zu diesem Zweck wurden mit aufsteigender BPV-1/-2-Viruskonzentration infizierte equine Fibroblasten über mehrere Passagen kultiviert und die Gesamt-DNS isoliert. Anschließend wurde mittels qPCR die Kopienzahl/Zelle der viralen episomal vorliegenden DNS untersucht und mit Werten aus natürlichen Sarkoiden verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Virus DNS stabil in allen infizierten Zellen erhalten bleibt, repliziert wird und dass in allen Zellreihen das Replikationsniveau ähnlich jenen Sarkoidzellen ist. Diese Ergebnisse sind ein weiteres Indiz dafür, dass mit BPV-1 Virionen infizierte equine Fibroblasten ein geeignetes *in vitro* Modell einer natürlichen BPV-1 Infektion bei Pferden darstellen könnten.

Equine sarcoids are locally aggressive, non-metastatic skin tumours in equids and the most common skin neoplasms in horses worldwide, can severely compromise the welfare of affected horses and lead to significant economic losses. The disease is multifactorial with bovine papillomavirus 1 (BPV-1) and bovine papillomavirus 2 (BPV-2) as the major aetiological factors. Currently existing *in vitro* models have some limitations. Only recently,

an *in vitro* infection model with equine fibroblasts was established at the University of Veterinary Medicine in Vienna. These cells were studied over several cell passages and showed many features of the natural BPV infection, suggesting that these cells might have similarities to the *in vivo* situation. Subsequent work investigated whether episomal virus DNA is maintained and replicated in such fibroblasts regardless of infection titer. Furthermore, it was analysed whether in the course of cell passages the copy number/cell of episomal DNA is similar to that in natural sarcoid cells. For this purpose, equine fibroblasts infected with ascending BPV-1/-2 virus concentrations were cultured over several passages and total DNA was isolated. Subsequently, the copy number/cell of the viral episomal DNA was determined by qPCR and compared with values from naturally occurring sarcoids. It could be shown that the viral DNA is stably replicated in all infected cells and that in all cell series the replication level is similar to that of sarcoid cells. These results are further evidence that equine fibroblasts infected with BPV-1 virions may represent a suitable *in vitro* model of natural BPV-1 infection in horses.

## **Inhalt**

<b>1. Einleitung</b>	7
<b>1.1 Das equine Sarkoid</b>	7
<b>1.1.1 Pathogenese</b>	7
<b>1.1.2 Klinische Erscheinung</b>	9
<b>1.1.3 Diagnostik</b>	11
<b>1.1.4 Therapie</b>	12
<b>1.2 Papillomviren (PV)</b>	13
<b>1.2.1 BPV Allgemein</b>	14
<b>1.2.3 BPV in Pferden</b>	15
<b>1.3 Infektion von equinen Fibroblasten mit BPV-1 und BPV-2 Virionen</b>	18
<b>1.4 Ziel dieser Arbeit</b>	18
<b>2. Material und Methode</b>	20
<b>3. Ergebnisse</b>	25
<b>4. Diskussion</b>	30
<b>5. Zusammenfassung/Conclusion</b>	33
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	35
<b>Literatur</b>	36

## 1. Einleitung

### 1.1 Das equine Sarkoid

Das equine Sarkoid ist ein lokal aggressiver, nicht-metastasierender Hauttumor, der bei Pferden, Eseln, Maultieren und Zebras auftritt. (1) Diese Tumorart ist die häufigste Hautneoplasie bei Pferden weltweit und ist global verbreitet. (2–5) 12 % bis 67 % aller Neoplasmen von Pferden sind Sarkoide. Schätzungsweise zwischen 1 % und 11,5 % aller Pferde sind von dieser Erkrankung betroffen. (1) Auch wenn diese Erkrankung selbst nicht tödlich ist, kann die Größe und die Ausbreitung der Umfangsvermehrungen sowie ihr lokal aggressives Verhalten, das Wohlergehen der Pferde und ihren Nutzen stark beeinträchtigen. Dies kann zu der Notwendigkeit einer Euthanasie führen und somit erhebliche wirtschaftliche Verluste zur Folge haben. (2, 6) Das equine Sarkoid stellt den häufigsten dermatologischen Grund für eine Einschläferung eines Pferdes dar. (7)

#### 1.1.1 Pathogenese

Das equine Sarkoid ist eine multifaktorielle Krankheit, (2) bei der die Ätiologie und Pathogenese derzeit noch nicht vollständig verstanden sind. (1) Die Infektion von Pferden mit BPV ist einer der Hauptfaktoren für die Entstehung der Krankheit. (8, 9) Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Entstehung von Sarkoiden mit einer genetischen Prädisposition zusammenhängt. (4) So konnte in Appaloosa, Arabern, Quarter Horses und Englischen Vollblütern eine Rasseprädisposition gezeigt werden, American Standardbreds und Lipizzaner zeigen ein verringertes Risiko zu erkranken. (2) Bei englischen Vollblütern und Warmblütern ist das erhöhte Risiko mit den MHC-1 A3 und W13 Allelen assoziiert, während das verminderte Risiko bei American Standardbreds und Lipizzanern mit einem verringerten oder fehlenden W13 Allel in Verbindung gebracht wird. (2) Es kann zudem davon ausgegangen werden, dass bestimmte MHC-Klasse-2-Allele mit einer beeinträchtigten Immunantwort auf BPV und andere tumorassoziierte Antigene verbunden sind. (4) Jedoch konnte eine Studie an Schweizer Warmblütern keine höhere Prävalenz bei Nachkommen eines Hengstes mit Sarkoiden im Vergleich zu Nachkommen eines Hengstes ohne zeigen (2), was gegen eine genetische Prädisposition sprechen könnte. Der alleinige Kontakt mit dem Virus reicht nicht

für die Entwicklung eines Sarkoids aus. Neben der Genetik sind auch andere Umweltfaktoren wie Hauttraumata und der immunologische Status bei der Entstehung der Krankheit essenziell. (9) Bereits in den 60er Jahren wurde vermutet, dass ein Virus an der Entstehung von den Läsionen beteiligt sein könnte. In Studien konnte dies bestätigt werden, indem verletzte Haut von Sarkoid-freien Pferden mit Gewebe von Sarkoiden oder zellfreiem Überstand von zerkleinerten Tumoren beimpft wurde. An den beimpften Stellen traten Tumore auf, die morphologisch nicht von natürlich auftretenden Sarkoiden zu unterscheiden waren. Als die Inokulation von Pferdehaut mit gereinigtem BPV ebenfalls zu sarkoidartigen Läsionen führte, wurde erstmals vermutet, dass BPV das krankheitsauslösende Virus sein könnte. (3, 4) Mittlerweile konnten viele Studien die Anwesenheit von BPV-1 und BPV-2 zeigen. In Gewebeproben von erkrankten Pferden konnten sowohl BPV-1, BPV-2 als auch BPV-13 mittels PCR nachgewiesen und auch virale Nukleinsäure konnte in Fibroblasten gefunden werden. 1999 wiesen Nasir et al. erstmals in einer Studie nach, dass im Großteil der Läsionen BPV-Gene exprimiert werden. (10) Zudem konnte die Anwesenheit des BPV-E5-Proteins nachgewiesen werden, während in gesunden Pferden BPV-E5 nicht gefunden werden konnte. Der Nachweis von BPV-DNS, BPV-mRNS und BPV-Proteinen im Gewebe von equinen Sarkoiden weist auf eine direkte Beteiligung von BPV an dem Entstehen der Neoplasien hin. (11) Die genauen Mechanismen der Übertragung der Krankheit innerhalb der Pferdepopulation sind noch unklar. (6) Hypothesen für die Infektion sind sowohl der direkte als auch der indirekte Kontakt mit infizierten Kühen oder Pferden. (9) Zudem geht man davon aus, dass BPV-1 über passive Infektionsträger, Scheuern und Insektenvektoren übertragen wird. (2) Nach chirurgischen Exzisionen kommt es oft zu Rezidiven. Dies führte zu der Annahme, dass latente virale Genome im umliegenden gesunden Gewebe liegen, welche durch den Eingriff und die anschließende Wundheilung transkriptiv aktiv werden. 2001 konnten Martens et al mittels PCR virale DNS in chirurgisch entfernten Sarkoiden und in der umliegenden gesunden Haut nachweisen. (4) Eine latente virale Phase würde erklären, warum Tumore infolge von Verletzungen auftreten, da der zelluläre Proliferationsstimulus, eine virale Aktivierung auslösen könnte. Zudem würde sie erklären, wieso Tumore an verschiedenen Stellen des Körpers bei einem erkrankten Pferd auftreten, aber keine Metastasen. (12) Die Progression der Krankheit im Sinne eines verstärkten Wachstums sowie einer Transformation in aggressivere Typen nach einem Trauma lässt sich dadurch erklären,



dass BPV-1 und BPV-2 Genome in Fibroblasten als multiple Episome vorliegen, die sich synchron mit sich teilenden Zellen replizieren. Die verstärkte Zellteilung, die bei einer posttraumatischen Wundheilung auftritt, führt somit zu einer exponentiellen Vermehrung von viraler DNS und dementsprechend auch zu einer höheren Transkription. Dadurch werden vermehrt Onkoproteine exprimiert und es kommt zu einem verstärkten transformierenden Effekt, wodurch die Tumorprogression vorangetrieben wird. (8) Manche Pferde entwickeln nach einer BPV-Infektion Läsionen, während andere keine entwickeln. Bisher konnte noch nicht vollständig geklärt werden, woran dies liegt. (1) Auch die molekularen Mechanismen, die zu der neoplastischen Transformation von Sarkoiden führen, sind noch nicht vollständig verstanden. (13)

### **1.1.2 Klinische Erscheinung**

Jede Pferderasse sowie Maultiere, Esel und Zebras können am equinen Sarkoid erkranken. Die Krankheit kann sich in jedem Alter entwickeln, am häufigsten jedoch zwischen zwei und neun Jahren. (14) Nur selten kommt es in einem späteren Alter zum Auftreten von Läsionen. (2) Die Läsionen können überall am Körper auftreten, sind jedoch am ventralen Abdomen, der paragenital/inguinal Region, Kopf oder distalen Gliedmaßen zu finden. (7, 9) Stellen von vorherigen Verletzungen und Narben sowie Areale mit dünner Haut sind Prädilektionsstellen (2, 3) Sarkoide metastasieren nicht, haben jedoch auch nach vollständiger Entfernung eine hohe Rezidivrate. (11) Die rezidivierenden Läsionen sind dabei oft aggressiver und zeigen ein schnelleres Wachstum als der initiale Tumor. (1) Das Equine Sarkoid kann je nach Erscheinungsbild in die Typen okkult, verrukös, nodulär, fibroblastisch, gemischt und malevolent/maligne unterteilt werden. (1) Die okkulten und verrukösen Läsionen stellen die milden Typen dar. Noduläre, fibroblastische, gemischte und malevolente Typen stellen schwerwiegendere Ausprägungen dar. (8) Ein Individuum kann alle Typen aufweisen. (2) Okkulte Sarkoide präsentieren sich als flache, runde bis ovale alopetische Areale, die nur langsam wachsen und sich oft auch über Jahre nicht verändern. (11, 15) Die Oberfläche dieser Areale kann Hyperkeratose oder kleine Knötchen sowie Schuppen, Hautverdickungen und Hyperpigmentation aufweisen. (2, 11) Der verruköse Typ hat typischerweise ein warzenähnliches Erscheinungsbild. (11) Er zeigt eine raue, alopetische, erhabene Oberfläche,

die hyperkeratotisch und unregelmäßig sein kann. (2) Noduläre Sarkoide stellen sich als rundliche Massen mit intaktem Epithel dar. (11) Die über dem Sarkoid liegende Haut kann alopetisch oder ulzeriert sein. (2) Je nach der Involvierung der darüberliegenden Haut werden die Sarkoide dieses Typs in Gruppe A und Gruppe B eingeteilt (2) Der fibroblastische Typ stellt sich typischerweise mit einer ulzerierten Epidermis dar und weist oft Serumexudat auf. Diese Form zeigt üblicherweise ein aggressives klinisches Verhalten. (11, 15) Fibroblastische Sarkoide können ebenfalls unterteilt werden. Typ eins, welcher gestielt ist und Typ zwei, welcher eine breite, lokal invasive Wurzel besitzt. (2) Der malevolente/maligne Sarkoidtyp stellt die schwerste Form der Erkrankung dar. Dieser Typ ist sehr aggressiv und lokal invasiv und breitet sich in der angrenzenden Haut und Unterhaut aus. Er besteht aus vielen, teilweise ulzerierten Knoten und kann sich entlang der Lymphbahnen ausbreiten und diese infiltrieren. (2, 15) Beim gemischten Typ treten zwei oder mehr Typen zusammen auf. (2)



*Abbildung 1*

*oben links: Bild eines okkulten Sarkoids an der linken Wange eines Pferdes*

*oben rechts: Bild eines verrukösen Sarkoids in der Achselregion*

*unten links: Bild eines nodulären Sarkoids in der inguinalen Region*

*unten rechts: fibroblastisches Sarkoid am Ohr*

*Quelle: Hainisch EK, Jindra C, Kirnbauer R, Brandt S. Papillomavirus-like Particles in Equine Medicine. Viruses 2023; 15(2). doi: 10.3390/v15020345. (16)*

Sarkoide in verschiedenen anatomischen Regionen weisen verschiedene klinisch-pathologische Merkmale auf. So präsentieren sich periokuläre Sarkoide oft invasiv und invadieren die darunter liegende Muskulatur während Sarkoide am Ohr eher lokalisiert bleiben. In der Region des Ellbogens und des Gesichts zeigen die Sarkoide eine größere Tendenz zu einer lokalen Invasion und Transformation zu malignen Sarkoiden. (14) Okkulte, noduläre und verruköse Sarkoide können über Jahre hinweg unverändert bleiben und sich plötzlich, ohne einen erkennbaren Grund zu einem stark wachsenden, meist fibroblastischen Tumor entwickeln, welcher dann schwieriger zu behandeln ist. (11) Jeder der Sarkoidtypen kann sich nach einem Trauma zu einem aggressiven fibroblastischen oder malignen/malevolenten Tumor entwickeln. (2)

### **1.1.3 Diagnostik**

Die Diagnose des equinen Sarkoids kann aufgrund der klinischen Symptome zusammen mit der Histopathologie oder einer PCR-Untersuchung gestellt werden. (2, 17) Unter bestimmten Umständen ist die klinische Diagnose als alleinige Methode eine gute Alternative zu den aufwendigeren Diagnoseverfahren. (18) Sie basiert auf der Läsionenanzahl, der typischen Läsionenmorphologie, dem Auftreten von Rezidiven nach Behandlung, der Beobachtung von Wachstumsschüben und der Lokalisationen der Tumore. (18, 19) Die Schwere der Erkrankung wird klinisch ebenfalls anhand der Läsionenanzahl aber auch anhand der Sarkoidtypen und der Merkmale des Tumorwachstums bewertet. (15)

In verschiedenen Berichten wird die Histopathologie einer Biopsie nach wie vor als Gold-Standard für die Diagnosestellung betrachtet, obwohl sie viele Nachteile mit sich führt. (20) Die Entnahme einer Biopsie kann das Wachstum des verbleibenden Gewebes stimulieren und ein ruhendes Sarkoid kann sich in eine aggressivere, aktiv proliferative Form umwandeln. (17). Oft wäre eine komplette Exzision für die histopathologische Untersuchung besser geeignet als eine nicht-exzisionale Biopsie. Letztere weist nicht immer alle morphologischen Merkmale für eine korrekte Diagnose des equinen Sarkoids auf. Die komplette Exzision ist aber nicht immer geeignet. (17) Die histopathologische Diagnose erfolgt aufgrund des Auftretens von dermalen und epidermalen Abnormalitäten. (21) Typischerweise handelt es

sich um fibroblastische Tumoren mit desorganisierten gut differenzierten Fibroblasten und pseudoepitheliomatöser Hyperplasie und Hyperkeratose mit ausgeprägter Bildung von „Rete-Pegs“. Bei weniger typischen Sarkoiden kann die epidermale Komponente jedoch normal, atrophisch oder sogar fehlend sein. (12, 22) Eine Feinnadelaspiration ist nicht für die Gewinnung von Proben für eine Histopathologie empfohlen, da sie in der Regel kein Ergebnis liefert und dennoch das Tumorwachstum fördern können. (2)

Mittels einer PCR-Untersuchung kann BPV-1 oder BPV-2 DNS aus oberflächlichem Tumormaterial nachgewiesen werden. (2) Die PCR-Diagnose ist eine leicht durchzuführende Untersuchung und bringt idealerweise kein Trauma mit sich. Im Gegensatz zu einer Biopsie sinkt das Risiko einer Verschlimmerung bei der Probenentnahme für eine PCR-Untersuchung. (17)

#### **1.1.4 Therapie**

Die Behandlung von equinen Sarkoiden ist oft eine Herausforderung, (9) da es keine einheitlich wirksame Therapie gibt. (4) Die Wahl der Behandlungsmethode hängt vom Sarkoid-Typ und Lokalisation ab. Selbst Sarkoide mit gleicher Morphologie und Lokalisation reagieren oft unterschiedlich auf dieselbe Behandlung. (14) Sarkoide können äußerst selten spontan in Regression gehen. (1) In der Regel persistieren die Läsionen jedoch, zeigen sich behandlungsresistent und neigen dazu nach chirurgischer Exzision wieder aufzutreten. (3, 21) Rezidive sind widerstandsfähiger gegenüber Behandlungen und weisen eine schlechtere Prognose auf. (2) Kleine lokalisierte Tumore sprechen auf eine größere Anzahl an Behandlungsmöglichkeiten an. Früherkennung, ein früher Therapiebeginn und Ausdauer sind wichtig bei der Behandlung der Erkrankung. (14) Es gibt eine Vielzahl von Behandlungsmethoden. Zu diesen gehören die scharfe oder Laserchirurgie (23), der Einsatz von Plasma- und Ultraschallskalpell, die elektrochirurgische Exzision, Kryochirurgie und Ligatur (14), Chemotherapie, Radiotherapie und Elektrochemotherapie. (23) Aber auch Kryotherapie und Hyperthermie kann in der Behandlung von Sarkoiden angewendet werden. (2) Das gemeinsame Ziel aller Methoden ist es, alle Tumorzellen zu entfernen und die Besiedelung des chirurgischen Randes mit Zellen zu verhindern, die überlebt haben und zu einem neuen Tumor führen könnten. (14) In einer Review Studie von Offer et al. 2023 stellten

sich mit Regressionsraten von über 90 % Radiotherapie, Kryotherapie, intraläsionale Cisplatin Therapie und Elektrochemotherapie als die effizientesten Behandlungsmöglichkeiten des equinen Sarkoids dar. (23) Durch Kombinationen von verschiedenen Behandlungsmethoden kann die Prognose stark verbessert werden. (14) Zurzeit wird die Radiotherapie, genauer die Brachytherapie, als Goldstandard angesehen. (14, 23) Zu den Immuntherapeutischen Behandlungsmethoden gehören die Immunmodulierung mithilfe von Bacillus Clamette-Guerin (BCG), Autoinokulation, Hämotherapie und Impfungen. (14) Imiquimod ist ein Immunantwort-Modifikator, der starke antivirale und antitumorale Wirkungen aufweist (24) und in der Behandlung von equinen Sarkoiden eine gute Wirkung zeigt. (25) Die Autologe Reimplantation von inaktiviertem Sarkoidgewebe erzielt ebenfalls gute Ergebnisse in der Behandlung. (26) Zurzeit wird an der Veterinärmedizinischen Universität an einem weiteren immunotherapeutischen Ansatz mittels genveränderten Influenzaviren gearbeitet. Bisherige Ergebnisse lassen eine vielversprechende Therapie in naher Zukunft erhoffen. (27) Neben zytotoxischen und immunmodulierenden topischen Salben werden auch viele verschiedene andere topische Behandlungsmethoden wie Aciclovir, antimykotische und ätzende Mittel eingesetzt. Auch Phytotherapie kann bei der Behandlung von Sarkoiden zur Anwendung kommen. (14)

## **1.2 Papillomviren (PV)**

PV sind unbehüllte Viren, die als ikosaedrisches Kapsid aufgebaut sind und ein zirkuläres, doppelsträngiges DNS-Genom mit bis zu 8 Kilobasenpaare (kpb) enthalten. (6, 8) Papillomviren sind normalerweise wirtsspezifisch und zellspezifisch für Keratinozyten. (6) Mittlerweile weiß man jedoch, dass Delta-Papillomviren nicht Spezies-spezifisch sind, sondern andere Spezies und auch Fibroblasten infizieren können, was zu einer anderen Pathologie als bei ihrer normalen Wirtsspezies führt. (2, 4, 28) BPV-1 und BPV-2 sind ebenfalls Delta-Papillomaviren, die diese Eigenschaften aufzeigen und gutartige Fibropapillome beim Rind und Sarkoide bei Equiden induzieren. (28, 29)

PV sind sehr resistent gegen physikalische und chemische Reagenzien. Sie werden nach 30 Minuten bei 67 °C nicht inaktiviert, sind bei einem pH-Wert zwischen vier und acht und in Ether stabil und überleben problemlos in 50 % Glycerin, wenn sie eingefroren oder

lyophilisiert werden. (30) Das Genom von PV enthält offene Leserahmen, die in eine „early“ (E) Region und eine „late“ (L) Region unterteilt sind. Die "early" Region kodiert dabei für regulatorische Proteine (E1, E2, E4) und für zwei oder drei transformierende/onkogene Proteine (E6, E7 und oft E5). Die „late“ Region kodiert die zwei Kapsidproteine (L1 und L2) (2, 8) Zusätzlich umfasst das Genom auch eine nicht-kodierende lange Kontrollregion (LCR) welche zur Virus Replikation und Transkription notwendige cis Elemente enthält. (6, 8) Der Lebenszyklus von PV ist strikt mit der epithelialen Zelldifferenzierung verknüpft. Die Early-Gen Expression und DNA-Replikation tritt dabei in den undifferenzierten basalen und suprabasalen Zellschichten auf. Die Expression der Late Gene hingegen ist auf die differenzierten Zellen begrenzt, wo neue Virionen gebildet und freigesetzt werden. (3) Die Produktivität der Infektion ist somit von der Zelldifferenzierung der Keratinozyten abhängig. (5) PV verursachen epitheliale Läsionen der Haut und Mukosa. (31) Die Familie der PV umfasst sowohl tierische als auch menschliche Viren. Bei einer Infektion mit PV entstehen hyperproliferative Läsionen (Warzen, Papillome, Kondylome), die normalerweise benigne sowie selbstlimitierend sind und in spontane Regression gehen. (4) Allerdings wurden viele Mechanismen für die Umgehung des Immunsystems beschrieben, die zur Persistenz und zur malignen Progression der PV-assoziierten Erkrankung führen können. (4) Eine maligne Transformation wird mit der Infektion von Kaninchen mit dem Shope-Papillomvirus, mit bestimmten humanen PV (HPV) und BPV in Verbindung gebracht. (12) PV können nicht aktiv die Haut ihres Wirts durchdringen. Daher ist eine Verletzung der Haut eine der Voraussetzungen für eine PV-Infektion. (7) Die Virionen dringen über basale Keratinozyten in den Wirt ein. Keratinozyten haben dabei die geeignete Oberfläche und Sekundärrezeptorenmoleküle für die Anheftung und Aufnahme der Viren. (6, 7)

### **1.2.1 BPV Allgemein**

Bisher wurden 44 BPV-Genotypen charakterisiert. Diese sind größtenteils unklassifiziert oder können einer der drei Gattungen -Xipapillomviren, Epsilonpapillomviren und Deltapapillomviren- zu geordnet werden. (32) Die BPV der Gattung Xipapillomviren und der Gattung Epsilonpapillomviren induzieren Fibropapilloma bei Rindern. (28) PV der Gattung der Delta-PV können im Gegensatz zu anderen PV, Fibroblasten infizieren und besitzen ein

breiteres Wirtsspektrum. (5, 33) Es wird vermutet, dass die Fähigkeit auch Fibroblasten infizieren zu können, mit dem erweiterten Wirtsspektrum zusammenhängt. (8) Zu den Delta-PV gehören BPV-1, BPV-2, BPV-13 und BPV-14. (2, 28, 33)

BPV-1, BPV-2 und BPV-13 sind eng miteinander verwandt, welches sich durch eine große genetische Ähnlichkeit mit >90 % auf Proteinebene des L1 Kapsidproteins zeigt. (5) Sie induzieren gutartige Fibropapillome beim Rind und Sarkoide bei Equiden. (28, 29) BPV-14 kann Katzen infizieren und spielt eine Rolle bei der Entstehung des felines Sarkoids. (33) Es wurde zudem gezeigt, dass BPV auch in Mäusen fibroblastische Tumore und in Hamstern maligne fibroblastische Tumore induzieren kann. (2)

Erst vor kurzem konnte das Delta-PV Ovis-aries-PV-2 in einem Schwein nachgewiesen werden. Dies gibt Hinweise darauf, dass nicht nur Delta-BPV sondern noch weitere Delta-PV ebenfalls in der Lage dazu sind weitere Spezies als ihre eigentliche Wirtsspezies zu infizieren. (33)

### **1.2.3 BPV in Pferden**

Die Virulenz von BPV bei Pferden ist ein seltenes Beispiel für die Art-übergreifende Übertragung von PV-Infektionen. (1) BPV wurde in den frühen 1950er Jahren erstmals mit der Entwicklung von Sarkoiden in Verbindung gebracht (21) Seitdem berichteten weltweit verschiedene Gruppen über das Auftreten von BPV-1 und BPV-2 in equinen Sarkoiden (4) Die Detektionsrate viraler DNS reicht dabei in den unterschiedlichen Berichten von 73 % bis hin zu 100 %. (1, 4, 7) E5, E6 und E7 kodieren für die Onkogene von BPV-1, wobei E5 als das bedeutendste transformierende Gen angesehen wird. (10) Die BPV-1 Proteine E5 und E6 fördern das Zellwachstum und rufen einen invasiven Phänotypen hervor. E7 dahingegen unterstützt die Unabhängigkeit der Zellverankerung. (7) In einer Studie von Nasir et al. 1999 konnten in 90 % der Tumore onkogene Transkripte nachgewiesen werden. Dabei konnte in 80 % der untersuchten Tumore eine Expression von E5 gefunden werden. (10) Auch Carr et al. wiesen die Expression von BPV-Proteinen in equinen Sarkoiden nach. (12) In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl early als auch late Gene intraläsional transkribiert werden. So kann mittels PCR E5 in 100 % und L1 in 84 % der DNS-Proben von Sarkoiden gefunden werden. Bei Sarkoiden befindet sich die BPV-DNS in Form von

mehreren episomalen Kopien in den Kernen der infizierten Zellen. (3) Diese viralen Episome replizieren sich synchron zur Zellteilung. (5) Die E2-, E5-, L1- und L2-DNS-Spiegel, die E2-, E5-, E6- und E7-mRNS-Menge, sowie der E5-Proteingehalt korrelieren positiv mit dem Schweregrad der Krankheit. (1) In einigen Sarkoiden konnte eine Co-Existenz von dermaler BPV-1 und epidermalen BPV-2 Infektion beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass ein Pferd mit mehr als einem BPV-Typen gleichzeitig infiziert sein kann. (21, 22) Noch ist die Biologie und Epidemiologie von BPV im Wirt Pferd aber noch zu großen Teilen unbekannt. (3). Lange konnte BPV-DNS nur in Fibroblasten und nicht in epidermalen Zellen von Sarkoiden nachgewiesen werden. (9, 30) Bogaert et al. konnten zeigen, dass nicht nur Fibroblasten, sondern auch Keratinozyten von BPV-1 und BPV-2 infiziert werden. Sie konnten BPV in latent infizierter Haut und in Frühstadien von Sarkoiden nachweisen. (22) Brandt et al. zeigten BPV-Genome und -Proteine auch in der Dermis und Epidermis in fortgeschritteneren und aggressiveren Tumoren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die BPV-1 Infektion nicht auf die Dermis, wie bisher angenommen, beschränkt ist, sondern auch die Epidermis inkludiert, wo virale Onkoproteine exprimiert werden. (34) Wilson et al. konnten virusähnliche Partikel in Sarkoiden nachweisen. (35) Dieser Fund ist sowohl im Hinblick auf eine Therapie als auch eine mögliche Impfung von Bedeutung.

Die Autoren wiesen außerdem BPV-1 und BPV-2 DNS nicht nur in den Läsionen, sondern in niedrigeren Konzentrationen in der normalen Haut und den mononukleären Zellen im peripheren Blut bei erkrankten Pferden nach. (8) Carr et al. untersuchten klinisch gesunde Hautproben von erkrankten Pferden. In 65 % dieser Proben konnten sie BPV-DNS detektieren. Der BPV-Typ war jeweils derselbe wie im Tumorgewebe. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass das Virus als latentes Plasmid mit geringer Kopienanzahl in klinisch gesunder Haut bei erkrankten Pferden vorliegt. (21) Es gibt mehrere Studien, in denen das Vorliegen von BPV-DNS in der Haut von gesunden Pferden untersucht worden ist. Diese Studien kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. In mehreren Studien konnte BPV-DNS nicht in der Haut von gesunden Pferden nachgewiesen werden. (3, 4, 21) Die Ergebnisse von Carr et al. 2001 und Bogaert et al. 2008 suggerieren Hinweise auf eine latente Infektion von Pferden, die jedoch bislang nicht unabhängig bestätigt werden konnten. (9, 21)



Die intradermale Inokulation von Pferden mit hohen Konzentrationen von BPV-1 Genomen, Sarkoidzellen oder Hitze-denaturierten Virionen hat keine offensichtliche Wirkung. Daraus lässt sich schließen, dass intakte Virionen für die Infektion notwendig sind. (6) Die Produktivität von BPV in Pferden war lange umstritten. Virale Genome von BPV-1 und BPV-2, nicht aber intakte Virionen, konnten bisher in Sarkoiden nachgewiesen werden. (2)

Für die produktive Infektion bei Pferden spricht der Nachweis von L1 Transkripten in Sarkoiden. (10) Zudem scheint der Nachweis von L1 Kapsomeren in der Epidermis von Sarkoiden auf eine produktive Infektion hinzudeuten. (34) Unter der Annahme, dass Sarkoide produktive Läsionen seien, könnten Pferde BPV-Infektionen verbreiten und andere Pferde anstecken. (3) Auch die Tatsache, dass bei gemeinsamer Benutzung von Sattelzeug und Bürsten von erkrankten und nicht-erkrankten Pferden in einigen Fällen eine Ansteckung beobachtet werden konnte, spricht für eine produktive Infektion. (Brandt/Hainisch persönliche Mitteilung)

Die Hypothese einer produktiven BPV-Infektion beim Pferd wird auch durch die Entdeckung einer einzigartigen Deletion in der L2 Sequenz in der aus Pferden isolierten BPV-DNS gestützt. (35) 1994 konnten Reid et al. zwei Sequenzänderungen in E5 von BPV-1 aus Eselsarkoiden finden. (4) Chambers et al. analysierten in einer späteren Studie die E5 Sequenz verschiedener Läsionen von Pferden und verglichen sie mit der E5 Sequenz von Rinder-BPV. Dabei zeigten alle E5 Sequenzen der equinen Sarkoide Sequenzvariationen und enthielten alle die gleiche Nukleotidsubstitution - A3939G. Diese Nukleotidsubstitution war dieselbe, die zuvor schon in BPV-1 Sequenzen von Eselsarkoiden gefunden wurde. (36) Nasir et al. konnten zudem Sequenzänderungen der LCR-Region innerhalb der E2-Bindungsstelle und Sequenzvariationen in E2 von aus Sarkoiden gewonnenen BPV-1 finden. (37) Allerdings konnte in einer späteren Studie diese LCR-Variation in Schweizer Rindern gefunden werden. Sie stellt somit keine pferdespezifische Variation dar. (38)

Die Annahme vom Vorhandensein von pferdespezifischen Sequenzvariationen konnte mittlerweile widerlegt werden, Erst vor kurzem sequenzierten Gysen et al. BPV-1 und BPV-2 sowohl von Läsionen bei Rindern als auch von equinen Sarkoiden. Dabei konnten sie feststellen, dass keine wirtsspezifische Phylogenie besteht. (39) Dies wird durch die Entdeckung von geografischen Gruppen aber keinen wirtsspezifischen Gruppen von Koch et

al. unterstützt. Sie konnten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Sequenzvariationen und Wirt feststellen. (38) Es wurden aber sowohl synonyme als auch nicht-synonyme Punktmutationen in manchen Pferdeproben nachgewiesen. Zudem waren teilweise größere Deletionen in der „Late“ Region in Proben, die von equinen Sarkoiden gewonnen wurden, enthalten. Dies deutet auf pferdespezifische Mutationen in Subpopulationen von BPV-1 und BPV-2 von Pferden hin. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass BPV-1 und BPV-2 von Rindern auf Pferde übertragen werden. (39)

### **1.3 Infektion von equinen Fibroblasten mit BPV-1 und BPV-2 Virionen**

Da PV ein spezifisches zelluläres Umfeld benötigen, um den produktiven Lebenszyklus zu absolvieren und infektiöse Virionen zu produzieren, ist es schwer virale Partikel *in vitro* zu generieren. (12) Yuan et al. konnten mit aus Rinderwarzen extrahiertem BPV-1 sowohl Rinderfibroblasten als auch Mäusezellen transformieren. Dies gelang jedoch nicht mit equinen Zelllinien. (29) Eine erstmalige erfolgreiche *in vitro* Infektion von equinen, primären Zellen wurde von Hainisch et al. dokumentiert.(5)

Infizierte equine Fibroblasten wiesen einen immortalisierten Phänotyp mit deutlich gesteigerter Proliferation und dem Fehlen von Kontak inhibition auf. Weitere Beobachtungen waren eine sarkoid-ähnliche Zellmorphologie, Hyperproliferation, Unabhängigkeit von Anoikis und Präsenz viraler DNS und RNS. Die infizierten equinen Fibroblasten wiesen also in allen Passagen wichtige Merkmale von natürlich infizierten Sarkoidzellen auf. Daher gehen Hainisch et al. davon aus, dass die Infektion von equinen Fibroblasten mit BPV-1 und BPV-2 Virionen zu unsterblichen Zellen führt, die den natürlich vorkommenden Sarkoidzellen sehr ähnlich sind. (5) In ihren Untersuchungen erreichte die Viruslast unabhängig vom Infektionstiter nach der vierten Zellpassage ein nahezu konstantes Level von 150 Kopien/Zelle. (5)

### **1.4 Ziel dieser Arbeit**

In dieser Arbeit sollen die Ergebnisse von Hainisch et al. im Hinblick auf die Virusreplikation über mehrere Zellpassagen hinweg auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft und untersucht werden. Es soll untersucht werden, ob episomale Virus-DNS in mit BPV-1 Virionen infizierten Fibroblasten, die mit unterschiedlicher Viruskonzentration infiziert wurden, erhalten und repliziert wird. Zudem soll ermittelt werden, ob im Laufe der Zellpassagen

unabhängig vom BPV-Infektionstiter die Kopienzahl/Zelle der episomalen Virus-DNS ähnlich jenen in Sarkoidzellen ist und die Ergebnisse mit den Ergebnissen von Hainisch et al. 2022 verglichen werden. Die Ergebnisse der Arbeit sollen dabei helfen zu ermitteln, ob mit BPV-1 Virionen infizierte Fibroblasten als ein *in vitro* Modell einer natürlichen BPV-Infektion bei Pferden geeignet sind.

## **2. Material und Methode**

### **Zellen**

Die für den nachfolgenden Versuch genutzten Zellen wurden analog zu dem Paper „Bovine Papillomvirus Typ 1 or 2 Virion-Infected Primary Fibroblasts Constitute a Near-Natural Equine Sarcoid Model“ (5) von Hainisch et al. 2022 gewonnen und kultiviert. Bei den Zellen handelte es sich um equine Fibroblasten eines gesunden und somit nicht mit BPV-1 infizierten Pferdes (19 Jahre alter deutscher Reitponywallach namens Arcus, nachfolgend mit „Arc“ bezeichnet). Die Fibroblasten wurden post mortem mit einer Hautstanze von Augenlid (LI), Präputium (P) und Achsel (A) entnommen und von Christoph Jindra laut Hainisch et al. (5) kultiviert. Die Fibroblasten wurden anschließend gemäß der Publikation (5) mit BPV-1 Virionen in unterschiedlichen Konzentrationen infiziert (siehe Tabelle 1) und danach passagiert. Für jeden Entnahmeort verblieb eine Kontrollgruppe mit nicht infizierten Fibroblasten, die analog zu den infizierten Zellen passagiert wurden.

Die Zellreihe der Achsel mit dem Infektionstiter  $2 \times 10^6$  wurde von einer weiteren Person ein zweites Mal passagiert. (A2).

### **DNS-Extraktion**

Die DNS wurde mit Hilfe des DNS Extraktionssets DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) laut Herstellerangaben aus den Zellen extrahiert.

Nachfolgend wurde die so aufgereinigte DNS der Zellen in den in Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 angeführten Zellpassagen untersucht. Die Probe A mit der Infektionsverdünnung -5 der Zellpassage 9 musste mangelnder DNS-Qualität mit der Probe A der Infektionsverdünnung -5 der Zellpassage 8 ersetzt werden.

**Tabelle 1 – Untersuchte Passagen und Benennung der Proben**

Infektions- titer	Entnahmeort Achsel			Entnahmeort Präputium			Entnahmeort Lid		
	2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>
Passagen									
7	A i 1-1 p7	A i 1-3 p7	A i 1-5 p7	P i 1-1 p7	P i 1-3 p7	P i 1-5 p7	L i 1-1 p7	L i 1-3 p7	L i 1-5 p7
9	A i 1-1 p9	A i 1-3 p9	A i 1-5 p8	P i 1-1 p9	P i 1-3 p9	P i 1-5 p9	L i 1-1 p9	L i 1-3 p9	L i 1-5 p9
11	A i 1-1 p11	A i 1-3 p11	A i 1-5 p11	P i 1-1 p11	P i 1-3 p11	P i 1-5 p11	L i 1-1 p11	L i 1-3 p11	L i 1-5 p11
14	A i 1-1 p14	A i 1-3 p14	A i 1-5 p14	P i 1-1 p14	P i 1-3 p14	P i 1-5 p14	L i 1-1 p14	L i 1-3 p14	L i 1-5 p14
16	A i 1-1 p16	A i 1-3 p16	A i 1-5 p16	P i 1-1 p16	P i 1-3 p16	P i 1-5 p16	L i 1-1 p16	L i 1-3 p16	L i 1-5 p16
18	A i 1-1 p18	A i 1-3 p18	A i 1-5 p18	P i 1-1 p18	P i 1-3 p18	P i 1-5 p18	L i 1-1 p18	L i 1-3 p18	L i 1-5 p18
19	A i 1-1 p19	A i 1-3 p19	A i 1-5 p19	P i 1-1 p19	P i 1-3 p19	P i 1-5 p19	L i 1-1 p19	L i 1-3 p19	L i 1-5 p19
21	A i 1-1 p21	A i 1-3 p21	A i 1-5 p21	P i 1-1 p21	P i 1-3 p21	P i 1-5 p21	L i 1-1 p21	L i 1-3 p21	L i 1-5 p21
23	A i 1-1 p23	A i 1-3 p23	A i 1-5 p23	P i 1-1 p23	P i 1-3 p23	P i 1-5 p23	L i 1-1 p23	L i 1-3 p23	L i 1-5 p23

**Tabelle 2 – Untersuchte Passagen und Benennung der Proben des 2. Versuchs vom Entnahmeort Achsel**

	Entnahmeort Achsel 2. Versuch
Infektionstiter	2x10 <sup>6</sup>
Passagen	
2	A2 i 1-1 p2
4	A2 i 1-1 p4
6	A2 i 1-1 p6
7	A2 i 1-1 p7
8	A2 i 1-1 p8
9	A2 i 1-1 p9
10	A2 i 1-1 p10
12	A2 i 1-1 p12
13	A2 i 1-1 p13
14	A2 i 1-1 p14
15	A2 i 1-1 p15
17	A2 i 1-1 p17
18	A2 i 1-1 p18
19	A2 i 1-1 p19
20	A2 i 1-1 p20
22	A2 i 1-1 p22
24	A2 i 1-1 p24
25	A2 i 1-1 p25
26	A2 i 1-1 p26
27	A2 i 1-1 p27
28	A2 i 1-1 p28
29	A2 i 1-1 p29

## qPCR

Um herauszufinden wie viele Viruspartikel/Zelle in den jeweiligen Proben vorhanden waren, wurden jeweils die Konzentration des Gens E2 und des Gens Luteinizing Hormon B (LHB) mittels einer qPCR (qTower<sup>3</sup> G/Analytik Jena) gemessen. Dabei ist LHB die Kennzahl dafür, wie viele Zellen in der Probe enthalten sind und E2 wie viele virale Episome in der Probe enthalten sind. Sowohl die infizierten als auch die Kontrollgruppe wurde jeweils in den gleichen Zellpassagen untersucht (siehe Tab. 1 und Tab.2). Die 15 µl qPCR-Reaktionen bestanden aus H<sub>2</sub>O, PCR Buffer B2 (Solis Biodyne), 0,2 mM von 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) mix (Solis Biodyne), genspezifische Primer F1 (10 µM), genspezifischer Primer R1 (10 µM), 0,2 µM FAM markierte Hydrolysesonde (10 µM) und 1U HotFirePol (5 U/µl, Solis Biodyne) sowie 2 µl der jeweiligen DNS.

Die genutzten Primer für das Gen E2 waren:

bpvE2f: 5'-ACAGAGGACGGCTGGCAG-3'

bpvE2r: 5'-TAAACGCGTCCAGCACCG-3'

Mit FAM markierte Hydrolysesonde für das Gen E2 wurde verwendet:

bpvE2-FAM/BHQ1: 5'-ATTCCCCAGCCAGTGTGCACCTACC-3'

Die genutzten Primer für das Gen LHB waren:

eqLHBf: 5'-TCTCCAGGTGCGGGTGAT-3'

eqLHB r: 5'-GAGCCGGATGGAAGCAAAG-3'

Mit FAM markierte Hydrolysesonder für das Gen LHB diente folgende Sequenz:

eqLHB-FAM/BHQ1: 5'-ATTCCCCAGCCAGTGTGCACCTACC-3'

Die Proben wurden im Triplikate gemessen. Für jeden qPCR-Lauf wurden auch Kontrollen ohne Template durchgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Um den  $r^2$  Wert und die qualitative und quantitative Nachweisgrenze ermitteln zu können, wurde je eine Standardreihe für das jeweils zu untersuchende Gen gemessen. Das Zyklusprogramm der qPCR für die Amplifikation betrug 95 °C für 15 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95 °C und anschließenden 60 Sekunden bei 60 °C.

### **Standardreihen**

Verdünnungsreihen des Plasmids pML-BPV1, das den gesamten Leserahmen von BPV-1 enthält, dienen als Standard.

Es wurde eine 1:10 sowie eine 1:100 Verdünnung mit bereit gestelltem pML-BPV1 hergestellt. Von beiden Verdünnungen sowie von einer Negativkontrolle wurden jeweils 1,5 µg zu chemisch kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien gegeben. Diese wurden 45 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Sekunden in einem 42 °C heißem Wasserbad geschockt. Anschließend wurde 200 µl SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und alles bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die *E. Coli* ausplattiert und erneut bei 37° inkubiert. Anschließend konnte PML-BPV1 gewonnen werden. Das so generierte PML-BPV1 besaß eine Konzentration von  $6,38 \times 10^{10}$  Kopien/µl. 1:4 Verdünnungen beginnend ab  $10^6$  Kopien/µl bis zu 0,1 Kopien/µl wurde für die Standardreihe generiert. Um das Plasmid auch bei niedrigen Konzentrationen zu stabilisieren und der natürlichen Infektion nahe zu sein, wurde Hintergrund-DNS von equinen Fibroblasten zur Verdünnung verwendet.

Für die Standardreihe des Gens LHB wurde DNS equiner Fibroblasten eingesetzt. Auch hier kamen 1:4 Verdünnungen mit destilliertem Wasser zum Einsatz.

### **Ergebnisauswertung**

Die Ergebnisse wurden mittels des Programms qPCRsoft 4.1 (Analytik Jena) dargestellt. Der  $r^2$  Wert wurde mit Hilfe der Standardreihen bestimmt und lag in allen Durchgängen über 0,992. Die PCR-Effizienz wurde mittels PCR Miner (<http://miner.ewindup.cn/miner/>) für jede Probe einzeln bestimmt. Zur Effizienzbereinigung der Mean CT Werte wurde der Mittelwert aller Effizienzen der jeweiligen Platte genutzt. Bei einer Standardabweichung größer als 0,5

innerhalb eines Triplets wurde die Probe die, die größte Abweichung hatte, aus der Auswertung herausgenommen und der Mittelwert und die Standardabweichung der übrigen zwei Proben neu bestimmt. Wenn die Standardabweichung trotz dessen noch größer als 0,5 war, wurde das Triplet erneut pipettiert und mittels qPCR gemessen. Aus den Ergebnissen konnte im Anschluss die Anzahl von Virusgenom pro Zelle errechnet werden.



### 3. Ergebnisse

#### Präputium

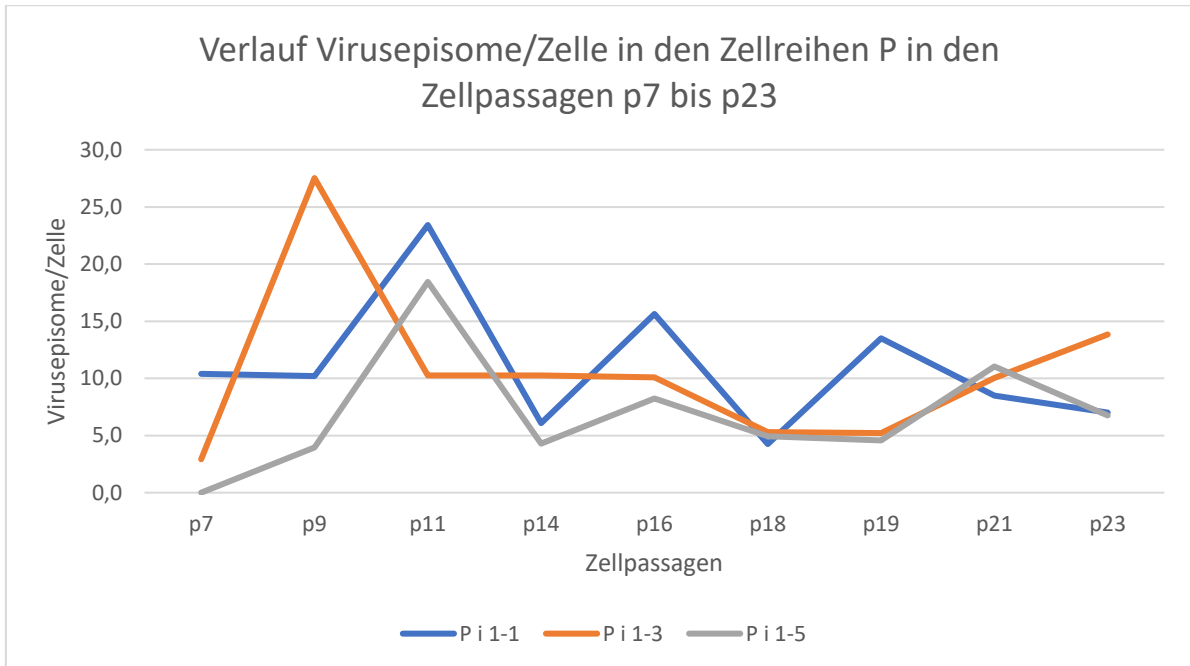


Abbildung 2– Verlauf der episomalen DNS in den Zellreihen mit dem Entnahmeort Präputium

Virale Episome waren kurz nach erfolgter Infektion mit BPV-1 in Korrelation mit der eingesetzten Virusmenge für die Infektion. So weist die Zellreihe mit dem Infektionstiter  $2 \times 10^6$  die höchste Viruslast mit 10 Kopien pro Zelle auf. Die Zellreihe mit dem Infektionstiter  $2 \times 10^5$  hat in p7 eine Viruskonzentration von 3 Episomen/Zelle und in der Zellreihe mit einem Infektionstiter von  $2 \times 10^4$  ist in p7 die virale DNS unterhalb der Nachweisgrenze. Unabhängig von dem Infektionstiter steigt die Viruslast in allen drei Zellreihen des Präputiums an. P i 1-1 und P i 1-5 erreichen ihren höchsten Peak in Zellpassage p11 mit 23 bzw. 18 Episomen/Zelle. P i 1-3 erreicht bei Zellpassage p9 die höchste Konzentration mit 28 Kopien. Nach dem jeweiligen Peak sinkt die Kopienzahl in allen drei Zellreihen. In P i 1-1 und P i 1-5 steigt sie in Zellpassage p16 noch einmal geringgradig auf 16 bzw. 8 Episome/Zelle an. Diese beiden Zellreihen zeigen über alle Zellpassagen hinweg eine ähnliche Verlaufskurve der Viruskonzentration. Ab Zellpassage p21 pendelt sich die Viruskonzentration in allen drei

Zellreihen des Präputiums in eine Größenordnung von 7-14 Kopien ein. Dabei weisen P i 1-1 und P i 1-5 beide in Zellpassage p23 7 Kopien/Zelle und P i 1-3 14 Kopien/Zelle auf.

## Lid

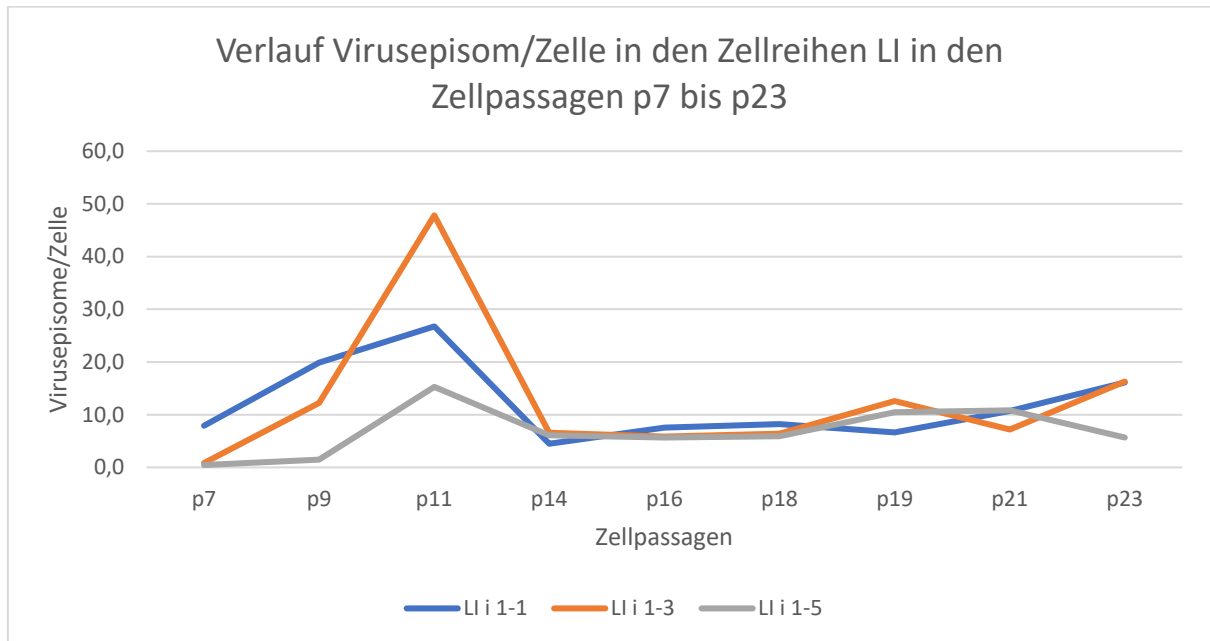


Abbildung 3 - Verlauf der episomalen DNS in den Zellreihen mit dem Entnahmeort Lid

Ähnlich den Ergebnissen, die bei den infizierten Fibroblasten des Präputiums gemessen wurden, korreliert die Konzentration episomaler DNS in Fibroblasten des Lids in p7 mit dem Infektionstiter der Zellreihen. So zeigt LI i 1-1 8 Episome/Zelle und LI i 1-3 1 Episom/Zelle in p7. Die virale Episomenkonzentration pro Zelle in LI i 1-5 ist ebenso wie P i 1-5 in Zellpassage p7 unterhalb der Nachweisgrenze. Alle drei Zellreihen zeigen unabhängig von ihrem Infektionstiter einen Maximalwert in Zellpassage p11. Die Höhe der maximalen Viruskonzentration korreliert dabei nicht mit dem Infektionstiter. So erreicht LI i 1-3 mit einem Infektionstiter von  $2 \times 10^5$  die höchste Viruskonzentration mit 48 Episomkopien/Zelle, während LI i 1-1 mit einem höheren Infektionstiter maximal 27 Episomenkopien/Zelle aufweist. Die höchste Konzentration in LI i 1-5 beträgt 15 Kopien/Zelle. Nach diesem Peak sinkt die Konzentration in allen drei Zellreihen bis zur Zellpassage p14 auf 5-7 Kopien/Zelle und pendelt sich bis inkl. Zellpassage p23 in einer Größenordnung von 5-16 Kopien/Zelle ein.

## Achsel

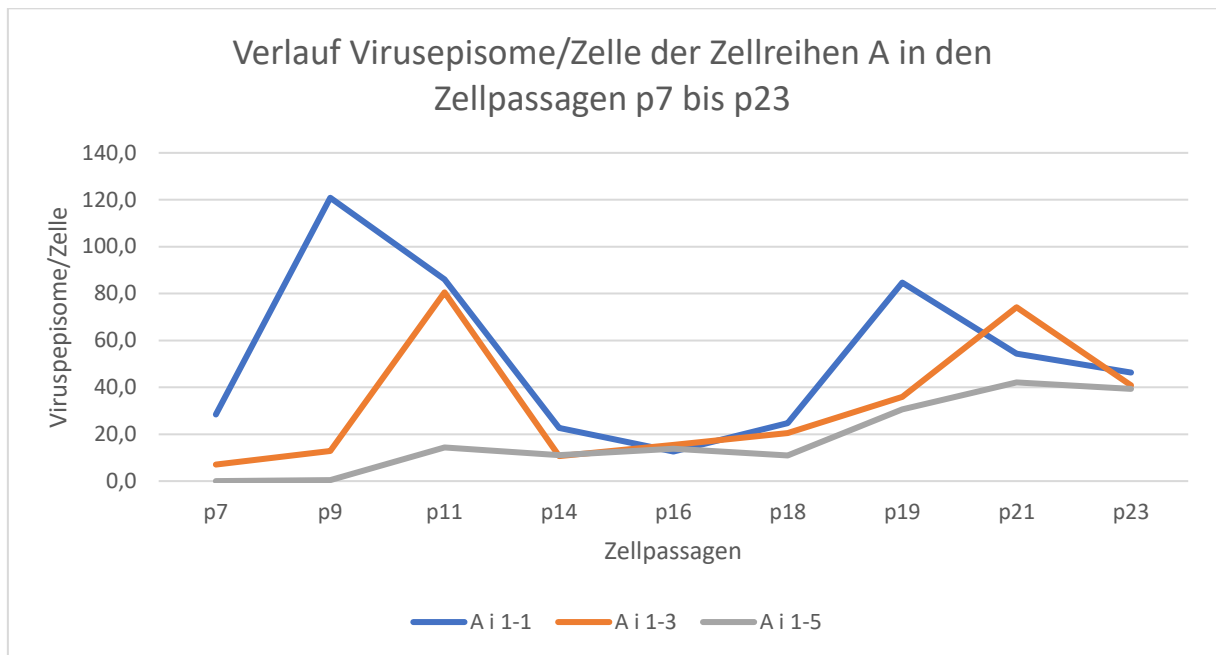


Abbildung 4 - Verlauf der episomalen DNS in den Zellreihen mit dem Entnahmeort Achsel

Ebenso wie in den Zellreihen des Präputiums als auch des Lids, korreliert auch in den Zellreihen der Achsel die episomale Virus-DNS in der Zellpassage p7 mit dem verwendeten Infektionstiter. A i 1-1 zeigt dabei 38 Episome/Zelle und A i 1-3 7 Episome/Zelle. In der Zellreihe A i 1-5 mit einem Infektionstiter von  $2 \times 10^4$  Virionen ist wie in den Zellreihen der anderen beiden Entnahmeorte mit diesem Infektionstiter die virale Episomenkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze. A i 1-1 zeigt mit 121 Episome/Zelle einen Maximalwert in Zellpassage p9, bevor die virale DNS-Konzentration wieder stark absinkt und in Zellpassage p16 einen Minimalwert von 13 Episomen/Zelle erreicht. In Zellpassage p19 wird ein weiterer Peak mit 85 Episome/Zelle erreicht. In Zellpassage p23 sind 46 Episome/Zelle nachweisbar. Die Zellreihe A i 1-3 hat bei p11 ihren Maximalwert mit 81 Episome/Zelle und zeigt in Zellpassage p14 mit 11 Episomen/Zelle die virale Episomenkonzentration. Ebenso wie die Zellreihe A i 1-1 zeigt sie einen weiteren Peak. Dieser ist in Zellpassage p21 mit 74 Episomen/Zelle. Danach sinkt die Konzentration auf 41 Episome/Zelle. Die Viruskonzentration in der Zellreihe A i 1-5 steigt bis zur Zellpassage p23 stetig an bis sie 39 Episome/Zelle erreicht. Auch in den Zellreihe der Achsel ist somit in der Zellpassage p23 ein Einpendeln der viralen Episomenkonzentration zu erkennen.

**Vergleich der Viruskonzentration in den zwei identisch hergestellten Zellreihen des Entnahmeortes Achsel mit einem Infektionstiter von  $2 \times 10^6$  Virionen**

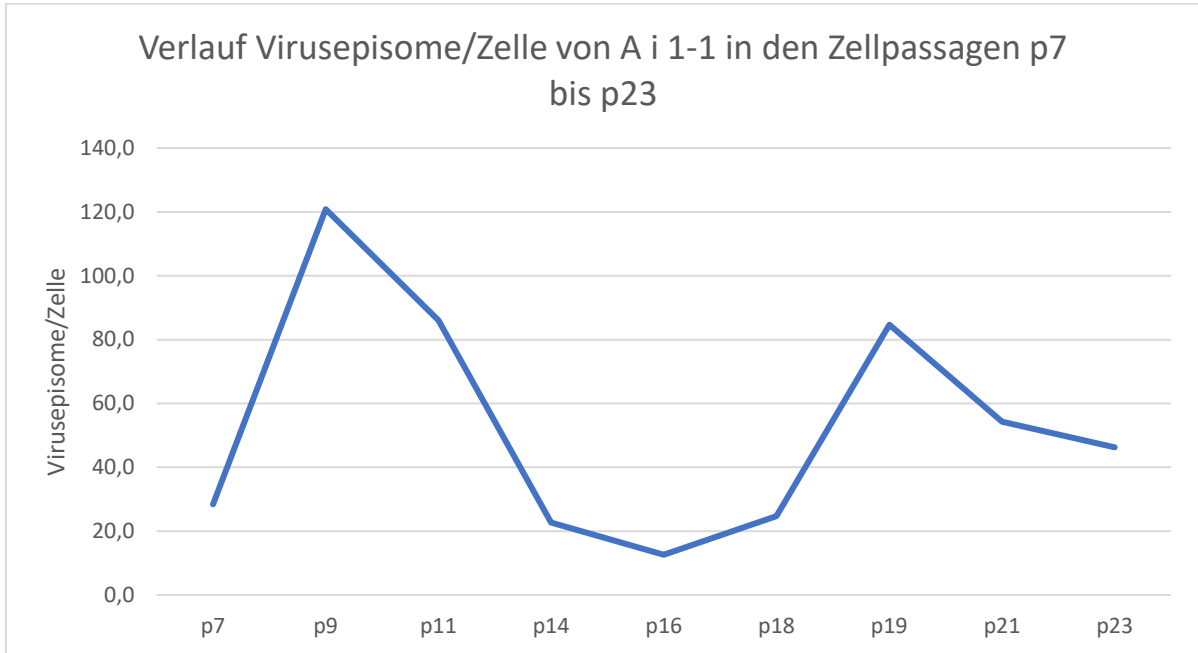


Abbildung 5 - Verlauf der episomalen DNS in der Zellreihe A i 1-1; Subkultivierung durchgeführt von Mitarbeiter, welcher alle Zellreihen von A, P und L subkultiviert hat

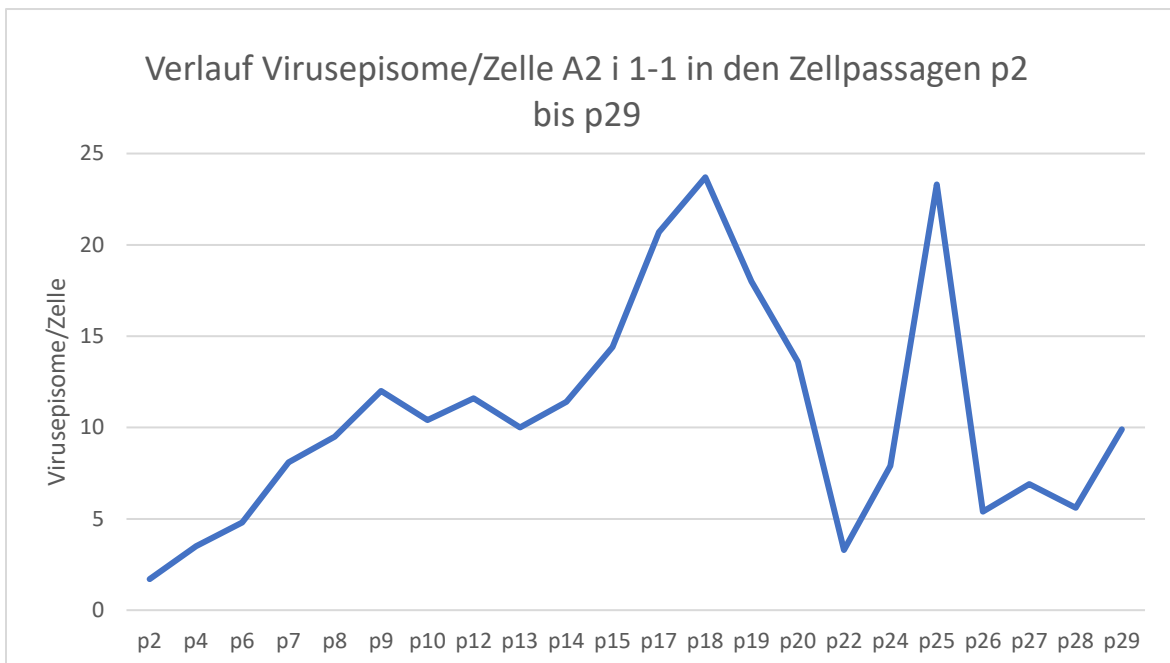


Abbildung 6 - Verlauf der episomalen DNS in der Zellreihe A2 i 1-1; Subkultivierung durchgeführt von zweitem Mitarbeiter

Die Zellreihen in Abbildung 5 und Abbildung 6 wurden beide aus Fibroblasten der Achselregion kultiviert und mit der Anfangskonzentration  $2 \times 10^6$  infiziert. Auffällig ist die stark unterschiedliche Konzentration von Episomen/Zelle in den beiden Zellreihen. Während die Viruskonzentration in der Zellpassage p7 in der Zellreihe von Versuch 2 (Abbildung 6) 8 Episome/Zelle beträgt, beträgt sie bei Versuch 1 (Abbildung 5) in der gleichen Zellpassage 28 Episome/Zelle und ist somit dreimal höher als in der Zellreihe A2. Die größte episomale Viruskonzentration bei Zellreihe A beträgt 121 Episome in p9, während sie in der Zellreihe A2 mit 24 Episomen in Zellpassage p18 nur fast 1/5 davon beträgt. Auch die geringste Konzentration ist stark unterschiedlich in den Zellreihen. Sie beträgt bei A2 3 Episome/Zelle in Zellpassage p22 (Anmerkung: Zur Vergleichbarkeit ab Zellpassage p7 betrachtet) und bei Zellreihe A 13 Episome/Zelle. Die niedrigste Episomenkonzentration ist also in A mehr dreimal so hoch wie in A2. Zusätzlich zu der unterschiedlich hohen Viruskonzentrationen unterscheiden sich auch die Verlaufskurven der viralen Konzentration über die Zellpassagen hinweg stark in ihrer Form. So steigt sie bei A2 stetig bis zur Zellpassage p18 an, wo sie ihren Peak erreicht, um dann bis p22 auf 3 Episome/Zelle stark abzufallen. Innerhalb der nächsten drei Zellpassagen bis zur Zellpassage p25 verachtfacht sich die Anzahl der Episome/Zelle auf 23 und erreicht somit einen zweiten Peak. Danach folgt ein starker Rückgang der viralen DNS, sodass sich die Anzahl der Episome binnen einer Zellpassage auf fast 1/5 mit 5 Episome/Zelle in Zellpassage 26 verringert. In den nachfolgenden Zellpassagen p27, p28 und p29 ist ein steigender Trend erkennbar.

Bei A fällt die Viruskonzentration nach dem Peak in der Zellpassage p11 ebenfalls stark ab, pendelt sich aber zwischen p14 bis p18 auf einem niedrigen Level zwischen 13 und 25 Episome/Zelle ein. Wie bei A2 ist auch bei dem A ein zweiter Peak mit 85 Episome/Zelle in Zellpassage p19. Der zweite Peak ist im Verhältnis zum ersten Peak im Gegensatz zu A2, in dem beide Peaks ungefähr die gleiche Episomenkonzentration haben, deutlich geringer. Zudem ist gegenüber A2 nach diesem zweiten Peak kein steigender Trend der viralen Konzentration in den nachfolgenden Zellpassagen erkennbar, sondern ein leichtes Sinken der Viruskonzentration bis auf 46 Episome/Zelle in Zellpassage p23.

#### 4. Diskussion

Im Jahr 2022 wurden erstmals equine Zellen *in vitro* erfolgreich mit BPV-1 infiziert und wiesen zahlreiche Merkmale von immortalisierten natürlichen Sarkoidzellen auf. (5) In dieser hier vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob episomale Virus-DNS in diesen Fibroblasten mit unterschiedlich hohem Infektionstiter über mehrere Zellpassagen hinweg erhalten bleibt und repliziert wird und ob die Kopienzahl/Zelle unabhängig vom Infektionstiter ähnlich jenen in Sarkoidzellen ist. Somit soll untersucht werden, ob die Hypothese, dass mit BPV-1 Virionen infizierte Fibroblasten als ein *in vitro* Modell einer natürlichen BPV-Infektion bei Pferden geeignet sind, korrekt ist.

Die momentanen *in vitro* Modelle basieren auf aus Sarkoiden gewonnenen Fibroblasten und mit BPV-1 Genomen transformierten Fibroblasten. Diese Modelle zeigen viele wichtige Merkmale von natürlich infizierten Fibroblasten (29), sie können jedoch die episomale Infektion über einen längeren Zeitraum nicht aufrechterhalten und sind nicht für die Untersuchung von Infektionswegen geeignet. (5) Obwohl sie eine wesentliche Rolle bei der Verbesserung des Verständnisses von der BPV-1 vermittelten neoplastischen Transformation gespielt haben (5), sind die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden. (13) Auch die Biologie und Epidemiologie von BPV in dem Fremdwirt Pferd (3) sowie die Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung ist noch in großen Teilen unbekannt. (1) In der 2022 veröffentlichten Publikation wurde eine immortalisierte Zelllinie generiert, die viele Merkmale einer natürlichen BPV-1 Infektion zeigte. Ebenso wurden die viralen Episomenkopien/Zelle mittels qPCR analog zu dieser Arbeit untersucht. Die virale DNS-Kopienanzahl erreichte ab der vierten Zellpassage post Infektion ein konstantes Level von circa 150 Kopien/Zelle unabhängig davon, mit welcher Anfangskonzentration die Zellen infiziert wurden. (5) Diese Beobachtung kann in dieser Arbeit analog festgestellt werden. Interessanterweise fiel jedoch die Anzahl der episomalen Kopien im Vergleich deutlich geringer aus. Dies könnte mit der unterschiedlichen Dauer der Kryokonservierung zu begründen sein. So ist auch bei dem Vergleich der beiden Zellreihen A i 1-1, die von zwei unterschiedlichen Mitarbeitern subkultiviert wurden, interessant, dass die Zellreihen, obwohl vollkommen gleich behandelt, verschieden hohe virale DNS-Konzentrationen und eine unterschiedliche Verlaufsform der episomalen DNS über die verschiedenen Zellpassagen hinweg zeigen. Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Zelllinien ist ebenfalls die

Dauer der Kryokonservierung, was jedoch keinen derartigen beobachteten Effekt haben sollte. Um solche unerwarteten potenziellen Auswirkungen ausschließen zu können, wäre es von Interesse, genau diese Variable der unterschiedlichen Kryokonservierung infizierter Zellen näher zu untersuchen.

Eine weitere Ursache könnten wiederholte Auftau-Einfrier-Zyklen der DNS selbst sein, die dazu beitragen können, dass die Qualität der DNS abnimmt. Durch die stattfindende Degradation könnten eventuell gerade die als Episom vorliegenden viralen Genome reduziert werden.

Um nachzuweisen, ob sich die Zelllinien A aber wirklich auf diese Größenordnung einpendeln, wären weitere Untersuchungen mit mehr Zellpassagen notwendig. Die berichtete Größenordnung von circa 150 Kopien/Zelle konnte in dieser Arbeit lediglich in der Zellreihe A i 1-1 in der Zellpassage p9 des ersten Versuchs gemessen werden. In einer Studie von Haralambus et al. konnten in Sarkoiden BPV-1 DNS-Konzentrationen zwischen  $<1$  und 570 Kopien pro Tumorzelle nachgewiesen werden. (15) Derartige Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest *in vitro* ein physiologisches Virusreplikationsniveau besteht.

Grundsätzlich ist eine erfolgreiche, stabile Infektion Fibroblasten unabhängig von der eingesetzten Viruskonzentration. Dies konnte in diesen Versuchen gezeigt werden. Bei allen Zelllinien war über den gesamten Zeitraum episodale Virus-DNS messbar mit Ausnahme der geringsten Infektionskonzentration von  $2 \times 10^4$  Virionen. In diesem Versuchsaufbau war die virale DNS-Konzentration anfänglich unterhalb der Nachweisgrenze. Dennoch haben infizierte Zellen einen deutlichen Wachstumsvorteil, wodurch die Menge der viralen Episome binnen weniger Passagen messbar wurde. Interessanterweise konnte bei Fibroblasten, die aus der Achsel als Zelllinie kultiviert wurden, deutlich höhere Kopienzahlen gemessen werden verglichen mit den Zelllinien des Lids und des Präputiums. Diese Beobachtung ist im Hinblick darauf interessant, dass eine signifikante Korrelation zwischen intraläsionaler DNS-Viruslast und dem klinischen ermittelten Schweregrad der Erkrankung besteht. (15) Die gefährlichsten anatomischen Regionen für das Auftreten von Sarkoiden scheint unter anderem die Region der Achsel zu sein. In dieser Region besteht eine größere Tendenz für eine lokale Invasion und Transformation zu malignen Sarkoiden. (14) Diese Beobachtungen sowie die höhere Viruslast in den Fibroblasten der Achsel-Zelllinien in diesem Versuch könnten einen

Hinweis darauf geben, dass die Lokalisation der Infektion eine Auswirkung auf den Schweregrad der Erkrankung haben könnte. Unter dieser Hypothese, scheint ein *in vitro* Modell mit BPV-1 Virionen infizierten equinen Fibroblasten die Anfälligkeit für die Entwicklung verschiedener Schweregrade in den unterschiedlichen Regionen zu repräsentieren. Dies könnte in weiteren Studien helfen, eine Erklärung zu finden, warum die Läsionen oft regionsabhängig unterschiedlich starke Ausprägungsformen haben.

In Sarkoiden konnten bei BPV-1 sowohl in E5, L2 als auch in der LCR Sequenzveränderungen gezeigt werden. (4, 35–37) Zurzeit ist noch nicht bekannt, ob und wie diese Sequenzvarianten die biologischen Funktionen, Pathogenese und das klinische Auftreten von BPV-1 in Pferden beeinflusst. Beobachtungen bei HPV legen nahe, dass solche genetischen Punktmutationen teilweise einen großen Einfluss auf die Onkogenität des Virus haben können (40–43) In diesem Kontext stellt sich die Frage, ob ein *in vitro* Modell, das auf Virionen aus Kuhwarzen basiert, eine vollständige Untersuchung im Hinblick auf die Neuinfektion, Entwicklung und Pathogenese in equinen Sarkoiden erlaubt. Dies gilt es in weiteren Studien zu untersuchen.



## 5. Zusammenfassung/Conclusion

In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse von Hainisch et al. im Hinblick auf die Erhaltung und Replikation des Virus in den von mit Bovinen Papillomvirus-1 Virionen infizierten equinen Fibroblasten abstammenden Zellreihen repliziert werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zellreihen von mit Bovinen Papillomvirus-1 Virionen infizierten equinen Fibroblasten, ein geeignetes *in vitro* Modell für das equine Sarkoid darstellen könnten. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass episodale Virus Desoxyribonukleinsäure über viele Zellpassagen hinweg erhalten bleibt und die Virusreplikationsrate ähnlich denen in Sarkoidpatienten ist. Zudem zeigen diese Zelllinien im Gegensatz zu den bisherigen *in vitro* Modellen den Vorteil, dass sie die Virus Desoxyribonukleinsäure während des Einfrierens, Lagerns und Auftauens stabil beinhalten. Somit könnte ein *in vitro* Modell, das auf mit Bovinen Papillomvirus-1 infizierten equinen Fibroblasten aufbaut, eine große Rolle in der weiteren Erforschung und dem Verständnis der Erkrankung spielen. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, inwieweit die Region, aus der die Fibroblasten gewonnen werden und die Art der Subkultivierung einen Einfluss auf die Viruslast und die Stabilität dieser hat. Darüber hinaus ist es wichtig den Zusammenhang der teilweise in Pferden auftretenden Punktmutationen und pferdespezifischen Mutationen in Subpopulationen von Bovinen Papillomvirus-1 und Bovinen Papillomvirus-2 und der Pathogenese sowie der klinischen Erscheinung der Infektion zu untersuchen und zu ermitteln, ob ein geeignetes *in vitro Modell* welches auf Virionen aus Kuhwarzen basiert auch im Hinblick auf diese Mutationen geeignet ist.

In this work, we managed to replicate the results of Hainisch et al. with regard to the maintenance and replication of the virus in cell lines derived from equine fibroblasts infected with bovine Papillomvirus-1 virions. Our results suggest that cell lines of equine fibroblasts infected with bovine Papillomvirus-1 virions may represent a suitable *in vitro* model for the equine sarcoid. We successfully showed that episomal virus desoxyribonucleic acid is maintained across multiple cell passages and that the virus replication rate is similar to those in sarcoid patients. Moreover, in contrast to previous *in vitro* models, these cell lines show the advantage of stably containing viral desoxyribonucleic acid during freezing, storage and

thawing. An *in vitro* model based on equine fibroblasts infected with bovine papillomavirus-1 could play a major role in further research and understanding of the disease. However, further studies are needed to clarify to what extent the body-region from which the fibroblasts are obtained and the type of subcultivation have an influence on the viral load and the stability of these. In addition, it is important to investigate the relationship between the point mutations and horse-specific mutations in subpopulations of bovine Papillomavirus-1 and bovine papillomavirus-2, which occur in some horses, and the pathogenesis and clinical manifestation of the infection and to determine whether a suitable *in vitro* model based on virions from cow warts is also suitable with regard to these mutations.

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Fibroblasten aus der Region der Achsel
A2	Fibroblasten aus der Region der Achsel, kultiviert durch einen 2. Mitarbeiter
ARC	Bezeichnung der gewonnenen Fibroblasten
BPV	Bovines Papillomvirus/Bovine Papillomviren
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Early Gene
FAM	Floureszenzfarbstoff
HPV	Humanes Papillomvirus/Humane Papillomaviren
kbp	Kilobasenpaare
L	Late Gene
LI	Fibroblasten aus der Region des Augenlides
LCR	Lange Kontrollregion
PV	Papillomvirus/Papillomviren
LHB	Gen "Luteinizing Hormon B"
mM	Millimol/L
P	Fibroblasten aus der Region des Präputiums
qPCR	quantitative PCR
U	atomare Masseneinheit
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol/L

## Literatur

1. Ogłuszka M, Starzyński RR, Pierzchała M, Otrocka-Domagala I, Raś A. Equine Sarcoids-Causes, Molecular Changes, and Clinicopathologic Features: A Review. *Vet Pathol* 2021; 58(3):472–82. doi: 10.1177/0300985820985114.
2. Bergvall KE. Sarcoids. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2013; 29(3):657–71. doi: 10.1016/j.cveq.2013.09.002.
3. Brandt S, Haralampus R, Shafti-Keramat S, Steinborn R, Stanek C, Kirnbauer R. A subset of equine sarcoids harbours BPV-1 DNA in a complex with L1 major capsid protein. *Virology* 2008; 375(2):433–41. doi: 10.1016/j.virol.2008.02.014.
4. Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SWJ, Love S, Campo MS et al. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt 5):1055–62. doi: 10.1099/vir.0.18947-0.
5. Hainisch EK, Jindra C, Reicher P, Miglinci L, Brodesser DM, Brandt S. Bovine Papillomavirus Type 1 or 2 Virion-Infected Primary Fibroblasts Constitute a Near-Natural Equine Sarcoid Model. *Viruses* 2022; 14(12). doi: 10.3390/v14122658.
6. Hartl B, Hainisch EK, Shafti-Keramat S, Kirnbauer R, Corteggio A, Borzacchiello G et al. Inoculation of young horses with bovine papillomavirus type 1 virions leads to early infection of PBMCs prior to pseudo-sarcoid formation. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 10):2437–45. doi: 10.1099/vir.0.033670-0.
7. Nasir L, Brandt S. Papillomavirus associated diseases of the horse. *Vet Microbiol* 2013; 167(1-2):159–67. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.08.003.
8. Pratscher B, Hainisch EK, Sykora S, Brandt S, Jindra C. No evidence of bovine papillomavirus type 1 or 2 infection in healthy equids. *Equine Vet J* 2019; 51(5):612–6. doi: 10.1111/evj.13061.
9. Bogaert L, Martens A, van Poucke M, Ducatelle R, Cock H de, Dewulf J et al. High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. *Vet Microbiol* 2008; 129(1-2):58–68. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.11.008.
10. Nasir L, Reid SW. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Res* 1999; 61(2):171–5. doi: 10.1016/s0168-1702(99)00022-2.
11. Bogaert L, van Poucke M, Baere C de, Dewulf J, Peelman L, Ducatelle R et al. Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. *J Gen Virol* 2007; 88(Pt 8):2155–61. doi: 10.1099/vir.0.82876-0.
12. Elizabeth A. Carr, DVM, PhD, Alain P. Théon, DVM, MS, Bruce R. Madewell, VMD, MS, Margaret E. Hitchcock P, Richard Schlegel, MD, PhD, John T. Schiller P. Expression of a transforming gene (E5) of bovine papillomavirus in sarcoids obtained from horses. *American journal of veterinary research* 2001; 62(8):1212–7.
13. Podstawski P, Samiec M, Skrzyszowska M, Szmatoła T, Semik-Gurgul E, Ropka-Molik K. The Induced Expression of BPV E4 Gene in Equine Adult Dermal Fibroblast Cells as a Potential Model of Skin Sarcoid-like Neoplasia. *Int J Mol Sci* 2022; 23(4). doi: 10.3390/ijms23041970.

14. Knottenbelt DC. The Equine Sarcoid: Why Are There so Many Treatment Options? *Vet Clin North Am Equine Pract* 2019; 35(2):243–62. doi: 10.1016/j.cveq.2019.03.006.
15. Haralambus R, Burgstaller J, Klukowska-Rötzler J, Steinborn R, Buchinger S, Gerber V et al. Intralesional bovine papillomavirus DNA loads reflect severity of equine sarcoid disease. *Equine Vet J* 2010; 42(4):327–31. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00078.x.
16. Hainisch EK, Jindra C, Kirnbauer R, Brandt S. Papillomavirus-like Particles in Equine Medicine. *Viruses* 2023; 15(2). doi: 10.3390/v15020345.
17. Martens A, Moor A de, Ducatelle R. PCR detection of bovine papilloma virus DNA in superficial swabs and scrapings from equine sarcoids. *The Veterinary Journal* 2001; 161(3):280–6. doi: 10.1053/tvjl.2000.0524,
18. Koch C, Martens A, Hainisch EK, Schüpbach G, Gerber V, Haspeslagh M. The clinical diagnosis of equine sarcoids - Part 1: Assessment of sensitivity and specificity using a multicentre case-based online examination. *Vet J* 2018; 242:77–82. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.08.009.
19. Haspeslagh M, Gerber V, Knottenbelt DC, Schüpbach G, Martens A, Koch C. The clinical diagnosis of equine sarcoids-Part 2: Assessment of case features typical of equine sarcoids and validation of a diagnostic protocol to guide equine clinicians in the diagnosis of equine sarcoids. *Vet J* 2018; 240:14–8. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.08.010.
20. Cosandey J, Hamza E, Gerber V, Ramseyer A, Leeb T, Jagannathan V et al. Diagnostic and prognostic potential of eight whole blood microRNAs for equine sarcoid disease. *PLoS One* 2021; 16(12):e0261076. doi: 10.1371/journal.pone.0261076.
21. Carr EA, Théon AP, Madewell BR, Griffey SM, Hitchcock ME. Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and nonneoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States. *American journal of veterinary research* 2001; 62(5):741–4. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.741.
22. Bogaert L, Martens A, Kast WM, van Marck E, Cock H de. Bovine papillomavirus DNA can be detected in keratinocytes of equine sarcoid tumors. *Vet Microbiol* 2010; 146(3-4):269–75. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.032.
23. Offer KS, Dixon CE, Sutton D. Treatment of equine sarcoids: A systematic review. *Equine Vet J* 2023. doi: 10.1111/evj.13935.
24. Nogueira S, Torres S, Malonet ED, Diaz SF, Jessen C, Gilbert S. Efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment Blackwell Publishing Ltd of equine sarcoids: a pilot study. *Veterinary Dermatology* 2006; 17(4):259-265. doi: 10.1111/j.1365-3164.2006.00526.x.
25. Petterson CM, Broström H, Humblott P, Bergvall KE. Topical treatment of equine sarcoids with imiquimod 5% cream or *Sanguinaria canadensis* and zinc chloride – an open prospective study. *Veterinary Dermatology* 2020; 31(6):471-e126. doi: 10.1111/vde.12900.
26. Rothacker CC, Boyle AG, Levine DG. Autologous vaccination for the treatment of equine sarcoids: 18 cases (2009–2014). *Can Vet J* 2015; 56(7):709–14.

27. Jindra C, Hainisch EK, Rümmele A, Wolschek M, Muster T, Brandt S. Influenza virus vector iNS1 expressing bovine papillomavirus 1 (BPV1) antigens efficiently induces tumour regression in equine sarcoid patients. *PLoS One* 2021; 16(11):e0260155. doi: 10.1371/journal.pone.0260155.
28. F. Bocaneti, G. Altamura, A. Corteggio, E. Velescu, F. Roperto, G. Borzacchiello. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. *Transboundary and Emerging Diseases* 2016; 63(1):14–23.
29. Yuan ZQ, Gault EA, Gobeil P, Nixon C, Campo MS, Nasir L. Establishment and characterization of equine fibroblast cell lines transformed in vivo and in vitro by BPV-1: Model systems for equine sarcoids. *Virology* 2008; 373(2):352–61.
30. Bogaert L, Martens A, Baere C de, Gasthuys F. Detection of bovine papillomavirus DNA on the normal skin and in the habitual surroundings of horses with and without equine sarcoids. *Res Vet Sci* 2005; 79(3):253–8. doi: 10.1016/j.rvsc.2004.12.003.
31. Christensen ND, Budgeon LR, Cladel NM, Hu J. Recent advances in preclinical model systems for papillomaviruses. *Virus Res* 2017; 231:108–18. doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.004.
32. PaVE. Reference genomes for Animal papillomavirus; 2023 [Stand: 31.07.2023]. Verfügbar unter: [https://pave.niaid.nih.gov/explore/reference\\_genomes/animal\\_genomes](https://pave.niaid.nih.gov/explore/reference_genomes/animal_genomes).
33. Munday JS, Fairley R, Lowery I. Detection of *Ovis aries* papillomavirus type 2 DNA sequences in a sarcoid-like mass in the mouth of a pig. *Vet Microbiol* 2020; 248:108801. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108801.
34. Brandt S, Tober R, Corteggio A, Burger S, Sabitzer S, Walter I et al. BPV-1 infection is not confined to the dermis but also involves the epidermis of equine sarcoids. *Vet Microbiol* 2011; 150(1-2):35–40. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.12.021.
35. Wilson AD, Armstrong ELR, Gofton RG, Mason J, Toit N de, Day MJ. Characterisation of early and late bovine papillomavirus protein expression in equine sarcoids. *Vet Microbiol* 2013; 162(2-4):369–80.
36. Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SWJ, Love S, Campo MS et al. Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids. *Virus Res* 2003; 96(1-2):141–5. doi: 10.1016/s0168-1702(03)00175-8.
37. Nasir L, Gault E, Morgan I.M., Chambers G, Ellsmore VA, Campo MS. Identification and functional analysis of sequence variants in the long control region and the E2 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 isolated from equine sarcoids. *Virology* 2007; 364(2):355–61. doi: 10.1016/j.virol.2007.02.019.
38. Koch C, Ramsauer AS, Drögemüller M, Ackermann M, Gerber V, Tobler K. Genomic comparison of bovine papillomavirus 1 isolates from bovine, equine and asinine lesional tissue samples. *Virus Res* 2018; 244:6–12. doi: 10.1016/j.virusres.2017.11.005.
39. Gysens L, Vanmechelen B, Maes P, Martens A, Haspeslagh M. Complete genomic characterization of bovine papillomavirus type 1 and 2 strains infers ongoing cross-species transmission between cattle and horses. *Vet J* 2023; 298-299:1–6. doi: 10.1016/j.tvjl.2023.106011.

40. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J. gen. Virol.* 2000; 81(8):1975–81. doi: 10.1099/0022-1317-81-8-1975.
41. Giannoudis A., Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *Journal of Pathology* 2001; 193:295–302. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999.
42. Schmidt M, Kedzia W, Gozdicka-Jozefiak A. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *Journal of Clinical Virology* 2001; 23(1-2):65–77. doi: 10.1016/s1386-6532(01)00189-5.
43. Veress G, Murvai M, Szarka K, Juhasz A, Konya J, Gergerly L. Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *European Journal of Cancer* 2001; 37(15):1946–52. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00222-2.