

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätspferdeambulanz

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

Simultane Detektion der bovinen Papillomvirustypen 1 und 2 aus Pferde- und Rinderproben

DIPLOMARBEIT

zur Erlangung der Würde einer

MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

Romana Atteneder

Wien, im Jänner 2022

Betreuerin:

Priv.-Doz. Dr. Sabine Brandt

Research Group Oncology (RGO)

Klinische Abteilung für Chirurgie,

Universitätspferdeklinik

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachterin:

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

Klinische Abteilung für Chirurgie

Universitätspferdeklinik

Veterinärmedizinische Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Papillomviren	3
2.1.1. Humane Papillomviren	8
2.1.2. Bovine Delta-Papillomviren	12
2.2. Equine Sarkoide	18
3. FRAGESTELLUNG	28
4. MATERIAL & METHODEN	29
4.1. Probenauswahl und Einteilung	29
4.2. Methoden	30
4.2.1. Qualitative PCR	31
4.2.2. Quantitative Methoden	32
4.2.2.1. Standards	32
4.2.2.2. Duplex-Assay	33
4.2.2.3. Evaluierung der Spezifität des Duplex-Assays	33
4.2.2.4. Digitale PCR	34
4.2.2.5. Quantitative PCR	35
5. ERGEBNISSE	37
6. DISKUSSION	55
7. ZUSAMMENFASSUNG	60
8. SUMMARY	62
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64
10. LITERATURVERZEICHNIS	65
11. TABELLENVERZEICHNIS	83
12. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
13. DANKSAGUNG	85

1. EINLEITUNG

Papillomviren (PV) wurden erstmals 1933 von Richard E. Shope bei einer Population von wilden Baumwollschwanzkaninchen beschrieben. (1) Auf jene Grundlagenforschung aufbauend wurden im Laufe der folgenden Jahrzehnte über 300 verschiedene Typen von PVs bei verschiedenen Spezies identifiziert. (2)

PVs verursachen benigne bis maligne Haut- und Schleimhautveränderungen bei Menschen und Tieren. Das klinische Erscheinungsbild reicht hierbei von flachen bis zu exophytischen Läsionen, die gewöhnlicherweise spontan regressieren. In Einzelfällen ist eine Mutation der pathologischen Hautveränderungen zu kanzerogenen Neoplasien möglich. (3) Jene kanzerogenen Prozesse sind insbesondere im Bereich der Humanmedizin, aufgrund der mit Humanen Papillomviren (HPV) assoziierten Ausbildung von Zervixkarzinomen, ein Hauptbestandteil der derzeitigen Forschung auf diesem Gebiet. (4)

PVs sind normalerweise speziesspezifisch mit Ausnahme der Deltapapillomviren. Besonders hervorzuheben sind hierbei die bovinen Papillomviren (BPV) der Typen 1 und 2, die benigne Hauttumoren, sogenannte Sarkoide, beim Pferd und anderen Vertretern der Familie der Equidae induzieren. (5) Obwohl jene nur lokal aggressiven Neoplasien der Haut als vorwiegend kosmetisches Problem erscheinen, ist doch die Ausprägung der Erkrankung häufig mit einer Einschränkung der Lebens- und Nutzungsfunktion verbunden. Dies ist einerseits durch das Ausbleiben der zuvor erwähnten spontanen Regression und andererseits durch das gehäufte Auftreten an sogenannten Prädilektionsstellen, wie z.B. Genitalregion, Kopfbereich oder Thorax beziehungsweise die Region der Sattel- oder Gurtlage, begründet. (6, 7) Zusätzlich weist die Erkrankung einen progressiven Verlauf in Form von explosionsartiger Hyperproliferation bei unvollständiger chirurgischer Entfernung oder Verletzung der Oberfläche der Hauttumoren auf. Derzeit ist noch keine effektive standardisierte Therapie für die Behandlung von Sarkoiden etabliert. Deshalb ist eine möglichst frühe und zielgerichtete Diagnostik von Nöten, um die größtmögliche Effektivität der zurzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten zu gewährleisten. (8)

Eine gute diagnostische Methode ist gekennzeichnet durch eine einfache Durchführung, sowohl in Bezug auf die Probengewinnung als auch dem eigentlichen Analyse-Prozess, geringem finanziellen Aufwand und einer breiten Verfügbarkeit. Diese Eigenschaften im Kontext der Diagnostik von Sarkoiden betrachtet, werden durch den Nachweis von BPV DNS in Tumor-

oder Hautschuppen mittels Polymerase- Kettenreaktion (englisch: Polymerase chain reaction; abgek.: PCR) gewährleistet. Angesichts der bis heute ungeklärten Faktoren bezüglich der initialen Infektion mit BPV1 und/oder BPV2 und der daraus resultierenden Ausbildung von Sarkoiden, wurde in dieser Arbeit ein Testverfahren entwickelt, welches beide Typen spezifisch und quantitativ simultan detektieren konnte. Die Ergebnisse wurden anschließend unter Berücksichtigung des Schweregrades der Erkrankung analysiert.

Die Motivation für diese Arbeit lag in der Erforschung eines Parameters, der möglicherweise anhand seiner prognostischen Einsetzbarkeit dazu führt, eine rechtzeitige adäquate Therapie einzuleiten und dadurch einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Lebensqualität der an Sarkoiden erkrankten Pferde leisten kann.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Papillomviren

Papillomviren (PV) sind unbehüllte Desoxyribonucleinsäure (DNS) Viren, die unabhängig von der Art der Infektion und der klinischen Ausprägung eine konstante Morphologie aufweisen. Das ikosaedrische Kapsid mit einem Durchmesser von 55- 60 nm ist maßgeblich verantwortlich für die Bildung von parakristallinen Strukturen in infizierten Zellen. (3)

Hauptbestandteil der infektiösen Virionen sind die beiden Kapsidproteine L1 und L2, wobei das Kapsidprotein L1 mit 90 % den größeren Anteil trotz geringerer molekularer Masse (54 - 58 kDa) als das Kapsidprotein L2 mit einer Masse von 63 - 78 kDa am Aufbau einnimmt. (3) In absolut Zahlen bedeutet dies, dass ein Virion aus 360 L1 und 12 L2 Molekülen aufgebaut ist. Bei Analyse auf atomarer Ebene wurde eine vermehrte Expression des C- Terminus vom L1 Kapsidprotein an der Oberfläche der Virionen festgestellt und anhand dieser Lokalisation eine Beteiligung am Infektionsprozess hypothetisiert. (9)

Die aus 7300 - 8000 Nukleotiden bestehende und mit zellulären Histonen komplettierte DNS weist eine zirkulär geschlossene doppelsträngige Struktur auf. In der Literatur wird das Genom grob in 3 große Teile unterteilt. In eine Long control region (LCR) und offene Leserahmen, die einerseits für frühe Gene (englisch: early gene; abgek.: E) und andererseits für späte Gene (englisch: late gene; abgek.: L) kodieren. (3)

Die LCR ist einerseits definiert über ihre Lage zwischen dem 3' Ende des L1-Gens und dem 5' Ende des E6-Gens und andererseits über die Eigenschaft die für die DNS-Replikation und Transkription notwendigen cis-regulatorischen Signale zu beinhalten. Die Länge jener nicht kodierenden Region variiert abhängig vom Papillomvirus Typ zwischen 500 – 1000 Nukleotiden. (3)

Die frühen Gene kodieren für die zur DNS-Replikation und Transformation notwendigen Proteine, die auch die Zellproliferation hemmen und damit eine Zelltransformation mit-induzieren können. Die synthetisierten Proteine werden in der Literatur mit einem groß geschriebenen E und einer Zahl von 1- 8 bezeichnet. Die Proteine E1 und E2 sind essenziell für die virale DNS-Replikation, wobei E2 zusätzlich noch eine Funktion in der Kontrolle der Transkription der DNS besitzt. (3)

Das E3-Gen besitzt kein Startcodon, weshalb angenommen wurde, dass es nicht transkribiert wird. (3)

Die am häufigsten nachgewiesenen Proteine sind eine Gruppe kleinerer Proteine, die einen Prozess von alternativem Spleißen und post-translationaler Modifikationen zur Vervollständigung durchlaufen. Dazu gehört das E4-Protein, das in PV-Läsionen mit einem Anteil von bis zu 30% am Gesamtprotein sehr häufig nachgewiesen wird. Eine beobachtete Interaktion mit dem filamentösen Netzwerk der Zytokeratine in kultivierten Zellen legt die Vermutung nahe, dass E4 bei der Virusreplikation in vivo eine unterstützende Funktion hat. (10)

Die E5-, E6-, E7-gene kodieren für Proteine, die die Zellzykluskontrolle überwinden und die Zelltransformation nachhaltig beeinflussen. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie zu der Gruppe der viralen Onkoproteine gezählt. Je nach PV-Typ variiert die Präsenz und die Einflussgröße auf die Zelltransformation. So ist zum Beispiel E5 das wichtigste Onkoprotein bei BPV1, wohingegen bei karzinogenen HPV-Typen (hrHPV) die Proteine E6 und E7 diesen Platz einnehmen. (3)

Ein Onkoprotein ist anhand seiner Eigenschaft, die normale Funktion einer Zelle verändern zu können, charakterisiert. Die geschieht über eine Interaktion des Onkoproteins mit Zellproteinen des Wirtes, die für die Zellzykluskontrolle essenziell sind und Aufhebung deren Funktion. In diesem Zusammenhang gelten die Wechselwirkungen zwischen E6 und dem p53- Protein (11), E7 und p105Rb (12) und E5 und 16k Ductin/Untereinheit c (13) als die am besten erforschten.

Physiologisch stoppt das p53-Protein den Zellzyklus in der G1 Phase beim Auftreten von Schäden oder Stress in der Zelle, bis der normale Zustand wieder hergestellt ist. Wenn eine „Reparatur“ nicht möglich ist, leitet das p53- Protein den programmierten Zelltod/ Apoptose ein. Bei Vorhandensein von E6 wird p53 in vielen Fällen abgebaut, wodurch weder eine Pausierung des Zellzyklus noch eine Apoptose möglich sind und somit eine Proliferation von Zellen mit geschädigter/mutierter DNS stattfindet. Weiters erfüllt p53 eine Kontrollfunktion in der Expression von p21cip1, einem negativen Regulator des Zellzyklus. Somit kann bei nicht funktionalem p53 auch ein Ausbleiben der Synthese von p21cip1 und demzufolge eine unregulierte Zellteilung beobachtet werden. (14)

P105Rb hindert die Zellproliferation durch Bindung des Transkriptionsfaktors E2F bis ein stimulierendes Signal empfangen wird. Die Kopplung von E7 an p105Rb bewirkt eine funktionelle Deaktivierung von E2F und damit eine Aktivierung des Zellzyklus. (15)

Die 16k-Ductin/Untereinheit c ist einerseits in den "Gap Junctions" und in der vakuolären ATPase zu finden. Eine Interaktion zwischen 16k-Ductin/Untereinheit c und dem E5 Protein hemmt die "Gap Junctions" und führt zu einer Störung der Homöostase des Gewebes und in weiterer Folge zu einem Ausbleiben der Kontrolle der infizierten Zellen durch die umliegenden Gesunden. Im Bereich der vakuolären ATPase kommt es im Zuge des Vorhandenseins des E5-Proteins zu einer Alkalisierung der Endomembran-Kompartimente, was zu einer kontinuierlichen Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren und anderen zellulären Onkogenen führt, die ein Auslösen der Zellproliferation induzieren. Von der Alkalisierung durch E5 ist auch der Golgi-Apparat betroffen, was wiederum eine Hemmung des Transportes von Klasse 1 des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC 1) an die Zelloberfläche zur Folge hat. Die MHC1-Komplexe präsentieren physiologisch den T- Lymphozyten Peptidantigene und stellen dadurch einen wichtigen Mechanismus der Immunüberwachung dar (3, 16). Zusammengefasst lässt sich in Bezug auf die Immunantwort sagen, dass E5, E6, E7 durch eine Kombination aus der Herabregulierung der MHC 1 und einer Verhinderung der antiviralen Interferonreaktion das Immunsystem des Wirtes effektiv umgehen, was eine Grundvoraussetzung für eine Ausprägung von Neoplasien darstellt. (17)

Die späten L1- und L2-Gene kodieren für die entsprechenden Kapsidproteine mit ihren typspezifischen Epitopen. (18) Sie werden im Kern von differenzierten Keratinozyten exprimiert und bilden gemeinsam mit dem Genom ein infektiöses Virion. (3)

Eine Infektion beginnt mit dem Eindringen des PV in die Zellen der epithelialen Basalmembran. In Abhängigkeit von der Lokalisation erfordert dies eine Mikroläsion oder einen natürlich erleichterten Zugang zur Basalmembran, wie zum Beispiel über ein Haarfollikel oder wie bei der zervikalen Transformationszone, das Aufeinandertreffen säulenförmiger und geschichteter Epithelzellen. Es besteht die Vermutung, dass eine Interaktion der Viruspartikel mit Proteoglykanen auf der Zelloberfläche und sekundären Rezeptoren stattfindet, die eine Virusaufnahme erleichtern. (19–22)

In der produktiven Infektion wird nur in den Zellen der unteren Epithelschichten der Zellzyklus induziert, die sich in einem variablen Ausmaß, abhängig vom PV-Typ und Art der Läsion, zur Epitheloberfläche ausdehnen. (23)

Auf die initiale Infektion folgt eine erste Phase der Genomamplifikation, bevor eine konstante Kopienanzahl in episomaler Form in den Wirtszellen erhalten bleibt. (24, 25) Anhand einer Studie basierend auf mit rabbit oral papilloma Virus (ROPV) infizierten Zelllinien wird dieser

Zustand mit 200 Kopien pro Zelle angegeben, wobei mithilfe der Laser-Capture-Methoden nur 50- 100 Kopien pro Zelle in der Basalschicht produktiver Warzen gefunden wurden. (26) Analog dazu pendelte sich die Anzahl an viralen Episomen nach in vitro-Infektion von equinen Fibroblasten mit 20-2 Millionen BPV1-Virionen nach vier Passagen auf 150 bis 200 Kopien pro Zelle ein. (27) Eine elementare Rolle bei der Replikation der Episomen spielen die viralen Replikationsproteine E1 und E2. Ein Rückgang von jenen wird bei Stabilisierung der Episomenanzahl beobachtet. (28–30) Für die Genom-Partitionierung bei der Zellteilung sind Papillomvirustyp-abhängige Proteine beteiligt, wie beispielsweise für BPV1 das zelluläre Bromodomain enthaltende Protein 4 (BRD4) oder bei hrHPV E2-bindende Proteine. (31–34)

Die E6- und E7-Proteine fungieren als Schlüsselregulatoren für die Zellzyklusprogression, aber ihre genaue Rolle in infizierten Basalzellen ist noch nicht vollständig geklärt. Dies wird besonders bei der Analyse einer Infektion mit "low-risk" HPVs (lrHPV) deutlich, die normalerweise keine malignen Neoplasien induzieren außer bei einer Infektion einer basalen Stammzelle an einem Wundbereich. Bei diesen Papillomvirusvertretern wird davon ausgegangen, dass die Wundheilungsreaktion und deren Signalübertragung aus der lokalen Mikroumgebung für die anfängliche Proliferation der infizierten Zellen von entscheidender Bedeutung für die virale Genexpression und/oder Proteinfunktion ist. (35, 36) Bei karzinogenen hrHPVs hingegen stellen die viralen E6- und E7-Proteine wichtige Faktoren bei der Förderung der Zellproliferation in den basalen und parabasalen Zellschichten dar. (37) Dies hat eine Größenzunahme der Läsion zur Folge.

In den oberen Epithelschichten wird der Wiedereintritt in die S- Phase durch E6 und E7 Proteine induziert. Diese neu gestartete Genomamplifikation erfordert das Vorhandensein von E1 und E2. Deren intrazelluläre Konzentration nimmt nach der Hochregulierung des späten Promotors, z.B. p670 bei HPV16 (38), zu, was eine Fortführung der Expression von E6 und E7 durch den frühen Promotor, z.B. p97 bei HPV16, mit sich bringt. Die Genomamplifikation setzt sich fort, wenn die infizierte Zelle von der S- Phase in eine G2-ähnliche Phase übergeht, ehe sie in die finale Differenzierung eintritt. (39, 40)

Unter experimentellen Bedingungen konnte man einen Anstieg der Kopienanzahl pro Zelle um den logarithmischen Faktor 2 pro Amplifikation beobachten. (41) Die Beteiligung von E5 an diesem Prozess ist indirekt und gestaltet sich in der Funktion eines Dreipass-Transmembranproteins mit einem zytoplasmatischen C- Terminus. (42) E5 ist maßgeblich in die Bildung von

Koilozyten involviert (43) und kann die Apoptose und den intrazellulären Transport von endozytotischen Vesikeln beeinträchtigen. (44, 45) Es besteht die Vermutung, dass E5 die Fähigkeit besitzt die epidermalen Wachstumsfaktoren zu stabilisieren und sein Signal zu verstärken. Auch eine Verstärkung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP) wird postuliert. (46–49) Die zellulären MAP-Kinasen ERK 1/2, deren Aktivität von den vorgelagerten MAP-Kinasen 1/2 und p38 abhängt, regulieren die nukleäre E1-Akkumulation durch Phosphorylierung und Aktivierung eines nukleären Lokalisierungssignals innerhalb des E1-Proteins. Eine Erleichterung der Genomamplifikation während der S-Phase erfolgt per Anhäufung von Cyclin E und A und deren assoziierter Cyclin-abhängiger Kinase 2 durch Phosphorylierung und Hemmung der Kernexportsequenz von E1. (50, 51) Die Akkumulation von E1 im Zellkern begünstigt die virale Genomamplifikation durch eine Induktion einer DNS-Schadensreaktion. (52)

Das E4 reichert sich in sehr hohen Konzentrationen in den Zellen an, die die Virussythese unterstützen (53, 54), sodass ihm möglicherweise eine primäre Funktion in der Virionenfreisetzung und Übertragung zugesprochen werden kann. (55, 56) Zu den indirekten Folgen seiner Expression zählt die Optimierung der Genomamplifikation. (57–62)

Die Vollendung des Papillomvirus-Lebenszyklus beginnt mit der Expression der Kapsidproteine L2 und L1 und dem Austritt aus dem Zellzyklus. Durch eine Änderung der Nutzung der Spleißstellen kommt es zu einem Anstieg der Transkripte, die am späten Promotor beginnen und an der späten Polyadenylierungsstelle enden. (37) Dieser Prozess wird durch eine höhere E2-Expression und der damit verbundenen Herabregulierung von p97 erleichtert. (63, 64) Jene Veränderung bewirkt im Sinne der Genomverpackung einen Wechsel in der Transkription von E1^{E4} und E5 zu E1^{E4} und L1. (64–66)

Durch E2 wird L2 in die Replikation involviert. Gemeinsam mit L1 findet der Zusammenbau zu infektiösen Virionen im Zellkern statt, das so genannte „Assembly“. (67, 68) Die Virusreifung erfolgt in den oberflächlich absterbenden Keratinozyten. Diese verlieren ihre mitochondriale oxidative Phosphorylierung und unterstützen mit dem Wechsel von einer reduzierenden in eine oxidierende Umgebung die Stabilität der Virionen durch die steigende Bildung von Disulfidbrücken zwischen den L1 Molekülen. (69, 70) Eine Störung der Keratinstruktur durch Ausbildung von Amyloidfibrillen wird durch das verbliebene E4 Protein verursacht. (56, 71) Es wird angenommen, dass E4-Amyloidfasern eine elementare Funktion in der Freisetzung von Virionen haben und dadurch eine wichtige Rolle in der Virusübertragung spielen.

Die Ausprägung von kanzerogenen Prozessen wird auch durch die Integration von Virus-DNS in das Wirtszellgenom begünstigt. Integrationen werden nur bei hoch-karzinogenen PV-Typen wie etwa bei den high risk HPVs (hrHPV) beobachtet. Obwohl häufige fragile Stellen im Wirtszellgenom als Integrations-Hot-Spots gelten (72), ist der Prozess der Integration grundsätzlich ungerichtet. Die Assoziation von PV-Integration mit maligner Tumorprogression wird dadurch erklärt, dass das E2-Gen bei der Integration teilweise oder ganz deletiert wird. Zumal E2 die E6- und E7-Expression kontrolliert, führt ein Wegfall von E2 zur ungebremsten Überexpression und damit Überaktivität dieser Onkoproteine, was das Tumorwachstum fördert. (73)

Die Erforschung des PV-Lebenszyklus wird vorwiegend im Kontext von hrHPV-induziertem Gebärmutterhalskrebs vorangetrieben. Es wird angenommen, dass die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) des Schweregrads 2+ eine vermehrte Aktivität von E6/E7 und damit eine vermehrt fehlerhafte Genexpression in der Wirtszelle begünstigt. (74) Dieser Annahme folgend kann davon ausgegangen werden, dass die geringere Aktivität von E6/E7 bei CIN1 noch nicht ausreicht, um die Genexpression in infizierten Wirtszellen maßgeblich zu verändern.

Wie viele andere Viren besitzen PVs die Fähigkeit, eine latente Infektion ohne klinische Symptome zu etablieren. Häufig können PVs in intakten Epithelzellen nachgewiesen werden. Eine Reaktivierung von jenen erfolgt durch ein Trauma des Epithels und der damit verbundenen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und Stimulanzen für die Zellproliferation. Weitere typspezifischen Virus-Reservoirs, wie zum Beispiel Smegma bei equinen PV Typ 2-induzierten genitalen Plattenepithelkarzinomen (75) konnten identifiziert werden, jedoch bedarf es für konkrete Aussagen in dieser Richtung weitere Untersuchungen. (3)

2.1.1. Humane Papillomviren

Derzeit sind über 200 Typen von Humanen Papillomviren (HPV) bekannt und vollständig sequenziert, darunter 15-HPV Typen, die in Assoziation mit der Ausprägung von Karzinomen stehen. Aufgrund immer sensitiverer Nachweismethoden lässt sich bei der Anzahl der nachgewiesenen und neu sequenzierten PVs eine steigende Tendenz beobachten. (76)

HPVs sind ubiquitär vorkommend und können bei immunkompetenten Individuen ohne klinische Symptomatik als Bestandteil der physiologischen Hautflora nachgewiesen werden. (77–79)

Die HPVs werden aufgrund ihrer Nukleotidsequenz in fünf Gattungen eingeteilt, wobei Vertreter einer Gattung eine 60%ige Übereinstimmung im L1 Genom aufweisen. Daraus ergeben sich die humanmedizinisch relevanten Gattungen der Alpha-, Beta-, Gamma-, M μ - und N μ -Papillomviren. Die Differenzierung in einzelne Typen erfolgt durch eine mindestens 10%-ige Unterscheidung in der Nukleotidsequenz vom L1 Gen. (80, 81)

Auffällig ist, dass alle HPV-Typen mit striktem Tropismus für epitheliale Keratinozyten der Gattung der Alpha-Papillomviren angehören. Jene werden zusätzlich aufgrund ihres pathogenen Potenzials in „low-risk“ (lr) und „high-risk“ (hr) HPVs eingeteilt. (80)

Bei einer Infektion befällt das Virus in Abhängigkeit zum HPV-Typ die epithelialen Basalzellen, die im Bereich der Zelldifferenzierung einen stammzellähnlichen Charakter aufweisen. (82–84) Es wird auch die Möglichkeit beschrieben, dass HPV-Viren Basalzellen stammzellähnliche Eigenschaften verleihen. (85, 86) Es wird angenommen, dass der Zell-Tropismus über die virale Genexpression sowie über die regulatorischen Elemente der LCR-Region gesteuert wird. (87, 88) Zusätzlich könnte der Tropismus einzelner HPV-Typen durch eine Konformationsänderung des Kapsids und anschließender Furin-Spaltung des L2 Kapsidproteins beeinflusst werden. (89, 76)

Ein Großteil der heute bereits charakterisierten und vollständig sequenzierten HPV-Typen wird von den Vertretern der sogenannten lrHPVs gebildet. (86)

Die klinische Ausprägung lrHPV-induzierter Läsionen als benigne hyperplastische Veränderungen von Haut- und Schleimhautepithel ist charakterisiert durch einen vorwiegend selbstlimitierenden Verlauf und der Möglichkeit einer Eradikation durch das Immunsystem. Sie stellt somit eine Infektion mit einem potentiell regressiven oder gar asymptomatischen Verlauf dar. (86)

Nichtsdestotrotz kann eine Infektion mit einem lrHPV pathologische Veränderungen hervorrufen, die eine medizinische Behandlung erfordern und dagegen resistent sein können. Jene besonderen Verläufe, wie zum Beispiel bei der wiederkehrenden respiratorischen Papillo-

matose (RRP) und der Epidermodysplasia Verruciformis (EV) beschrieben, werden in der Literatur häufig durch ihre Persistenz im Wirt mit der Entwicklung bzw. Erhöhung der Prädisposition für Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. (76, 90, 91)

Einer der größten Unterschiede zu den hrHPVs ist, dass bei lrHPVs die Proteine E6 und E7, welche für die massive Zellproliferation der basalen und parabasalen Zellen verantwortlich sind, nicht zur extensiven Zellteilung genutzt werden, wodurch die Chance kanzerogene Prozesse zu induzieren deutlich geringer als bei hrHPV ausfällt. (86) Demzufolge wird ein Wiedereintritt in den Zellzyklus durch E6/E7 vermittelt und somit eine replikationskompetente Umgebung in den infizierten postmitotischen Zellen geschaffen. Dennoch bedarf es eines erhöhten E1/E2 Spiegels zur Kompensation der späten Promotoraktivierung, sodass die viralen und zellulären Genprodukte zusammenarbeiten können, um die nukleären HPV- Episome amplifizieren zu können. (86, 92, 93)

Die Replikation der Virus-DNS findet im Durchschnitt nur einmal pro Zellzyklus statt. Die Genexpression bleibt begrenzt, um die Gefahr des Auslösens einer potenziellen Immunantwort in dieser Phase zu minimieren. (86) Bis heute ist unklar, ob die zelluläre DNS-Replikation ein für die virale Genomamplifikation limitierender Faktor ist oder ob sie wie bei anderen Virusinfektionen gehemmt ist. (86)

Die häufigste klinische Manifestation einer Infektion mit einem lrHPV sind Genitalwarzen (lat. Condyloma acuminatum). (94) Die verantwortlichen lrHPV-Viren sind meistens HPV6 und 11, aber auch die HPV-Typen 2, 16, 18, 30- 33, 35, 39, 41- 45, 51- 56 und 59 können solche Pathologien hervorrufen. (95–97) Die Morphologie der Hautveränderungen ist breit gefächert und reicht von kleinen knotigen über weiche gestielte bis hin zu breitbasig verbundenen Veränderungen. Bei Männern treten jene häufig im koronalen Sulcus, der Eichel oder am Penischaft auf. Bei Frauen hingegen sind die Prädilektionsstellen die äußeren Geschlechtsorgane und die Zervix. (98) Wie oben bereits beschrieben ist auch eine Papillomausbildung im oralen Bereich möglich, die aufgrund ihrer Lokalisation eine Behandlung erfordern kann. Die Übertragung von lrHPVs erfolgt vorwiegend beim ungeschützten Geschlechtsverkehr. (99)

HrHPVs verursachen 5,2 % der Krebserkrankungen weltweit, wovon das Zervixkarzinom der vierthäufigste nachgewiesene maligne Tumor bei Frauen ist. (100–102)

Nahezu jede karzinogene Veränderung im Bereich der Zervix wird durch hrHPVs ausgelöst, wobei die Typen HPV16 und 18 mit 70% am häufigsten nachgewiesen werden. (103) Weiters

verursachen hrHPV 95 % der Analkarzinome, 70% der Karzinome im Oropharyngealbereich (104), 60% der Vaginakarzinome und 30% der Plattenepithelkarzinome am Penis. (105)

Präkanzeröse Läsionen des Gebärmutterhalses werden einem von 3 Schweregraden (Zervikale intraepitheliale Neoplasie: CIN1, 2, 3) zugewiesen. Die Einteilung basiert auf dem Schweregrad der Neoplasie und wird anhand der Ausdehnung der basalähnlichen Zellen an der Oberfläche des Epithels und dem Ausmaß der Zellteilung der suprabasalen Zellschicht objektiviert. Die Gruppe der CIN1 umfasst geringgradige Läsionen, bei welchen eine vorwiegend produktive Infektion nachgewiesen werden kann. Als Hauptmerkmal von CIN1-Läsionen gilt das Vorhandensein von Koilozyten in der suprabasalen Schicht. Das CIN2-Stadium umfasst die mittelgradigen Dysplasien, bei welchen die oberflächliche Zellschicht noch gut differenzierbar ist. CIN3 entspricht einer hochgradigen intraepithelialen Plattenepithel-Läsion mit invasivem Charakter. (99)

Obwohl hrHPVs häufig bei Zervixkarzinomen nachgewiesen werden können, führt eine Infektion nicht zwangsläufig zu Gebärmutterhalskrebs. Über 80 % der Frauen infizieren sich im Laufe ihres Lebens mit hrHPVs. (106) Die meisten Infektionen werden aber mit der Zeit durch das Immunsystem des Wirtes abgewehrt bzw. weisen einen asymptomatischen Verlauf auf. (99)

Das erhöhte Risiko, dass hrHPVs neoplastische Veränderungen induzieren, resultiert aus mehreren Co-Faktoren. Einer der bekanntesten Mechanismen liegt in der Ausprägung von persistenten Infektionen durch Umgehung der Immunüberwachung. Dies geschieht einerseits durch einen vollständig intraepithelial ablaufenden Lebenszyklus und andererseits durch eine Expression der Kapselproteine nur in differenzierten, absterbenden Schichten des Epithels, wo keine zelluläre Immunantwort mehr möglich ist. (83)

HrHPVs unterscheiden sich von IrHPVs auch dadurch, dass die produktive bald in eine abortive Infektion übergeht, wofür E6- und E7-induzierte Zellhyperproliferation und Apoptoseresistenz charakteristisch sind, was zur Entstehung von Tumoren führt. (76) Die meisten Gebärmutterhalskrebsarten weisen neben viralen Episomen im Zellkern auch eine oder mehrere integrierte hrHPV-DNS-Kopien pro Zelle auf. Die virale Integrationsstelle liegt häufig innerhalb des E1- oder E2-Gens (107, 108). Dadurch fehlt das entsprechende Protein, welches im Fall von E2 wie bereits erwähnt eine Überexpression von E6 und E7 zur Folge hat. (109–111) Integration findet man in der Regel ab dem Schweregrad CIN2. (112, 113)

Prädominant findet die Ausbildung der hrHPV-induzierten Tumoren in der Transformationszone des Gebärmutterhalses und des Anus sowie in den Krypten des Oropharynx statt. (114) Diese gelten als Orte, an denen die virale Genexpression schlecht kontrolliert wird. Dies lässt wiederum vermuten, dass die jeweiligen karzinogenen HPV-Typen einen Tropismus für Regionen aufweisen, die eine produktive Infektion nur schlecht oder gar nicht unterstützen. (83) Besonders deutlich wird dies, wenn man die Risiken vergleicht, an hrHPV-induzierten Neoplasien an Penis, Vagina, Vulva oder der Cervix und des Anus zu erkranken. (115)

Im Jahr 2006 wurde das erste Vakzin zur Vorbeugung von HPV-Infektionen in den Vereinigten Staaten zugelassen. Es ist ein quadrivalenter Impfstoff, der vor Infektionen durch die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 schützt. (116) 2009 folgte die Zulassung eines divalenten Impfstoffs zum Schutz vor HPV16 und 18. (116) Einen zuverlässigen Schutz vor 90% der Auslöser von Cervixkarzinomen bietet die 2014 in den USA auf den Markt gekommene nonavalente Impfung, die die HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, und 58 abdeckt. (117, 118)

Alle Impfstoffe beinhalten zur Induktion einer schützenden Immunantwort so genannte virusartige Partikel (Englisch „Virus-like-particles“ (VLPs)). Das sind quasi leere Viruskapseln ohne genomischen Inhalt, die daher sicher und ähnlich immunogen wie Wildtyp-Virionen sind. Die Vakzine bieten einen effektiven prophylaktischen Schutz, haben aber keine therapeutische Wirkung bei bereits erfolgten Infektionen. (119)

2.1.2. Bovine Delta-Papillomviren

Die Vertreter der bovinen Papillomviren (BPV) bilden eine kleine teils genetisch sehr heterogene Gruppe von PVs, die weltweit in suszeptiblen Individuen nachgewiesen werden konnte. (120) Bisher wurden 29 Typen detektiert und anhand ihrer L1-Nukleotidsequenz und biologischen Faktoren fünf PV-Genera zugeordnet. (120) Diese umfassen Delta-Papillomviren (BPV1, 2, 13, 14), Xi-Papillomviren (BPV3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 20, 23, 24, 26, 28, 29), Epsilon-Papillomviren (BPV 5, 8, 25), Dioxy-Papillomviren (BPV7) und Dyokappa-Papillomviren (BPV16, 18, 22). Die verbleibenden 3 BPV-Typen (BPV19, BPV21, BPV27) konnten noch nicht klassifiziert werden. (121, 122)

Eine Besonderheit bildet die Gruppe der Delta-Papillomviren, denen auch BPV1, 2, 13 und 14 angehören und die neben Keratinozyten auch Fibroblasten infizieren. Dies liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass Delta-PVs ein größeres Wirtsspektrum haben. Eindrucksvoll ist das für BPV1 und BPV2 belegt, die neben Rindern auch andere Paar- sowie Einhufer infizieren, zu denen auch Pferdeartige zählen. (120)

Neben der Induktion von kutanen Papillomen („Kuhwarzen“), spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Karzinomen in der Vesica Urinaria der großen Wiederkäuer. (123, 124) Die Pathogenität boviner Delta-Papillomviren ist auf die transformierende Aktivität der Onkoproteine E5, E6, E7 zurückzuführen, wobei E5 das Hauptonkoprotein darstellt. (125)

E5 ist ein kleines hydrophobes Protein, welches je nach PV-Typ aus 42 bis 83 Aminosäuren besteht. Das Protein weist eine einheitliche Struktur in Form einer Alpha-Helix mit transmembraner Komponente auf. (126) Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft ist E5 in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates infizierter Wirtszellen lokalisiert, wobei bei extensiver Expression in Zellkultur ein Nachweis auch in Plasmamembranen möglich ist. (127, 128) In vivo ist E5 in nahezu allen Epithelschichten sowie dermalen Fibroblasten exprimiert. In bereits differenzierten Keratinozyten von papillomatösen Veränderungen erhält man ein E5-spezifisches körniges Färbemuster, das auf eine Lokalisation von E5 an Orten viraler Kapsidsynthese hinweist. (129)

E5 verfügt über keinerlei enzymatische Aktivität und ist daher auf die Aktivierung von verschiedenen Kinasen und anderen Molekülen angewiesen, um Zellen transformieren zu können. Ein Mechanismus, der sehr wesentlich zur Zelltransformation beiträgt, ist die Bindung des E5-Proteins an den zellulären Rezeptor des „Platelet-Derived Growth Factor β “ (PDGF β). (130) Dadurch wird PDGF β aktiviert, was ähnlich wie bei anderen neoplastischen Prozessen eine zelluläre Transformation zur Folge hat. (131) Eine weitere wichtige Eigenschaft von E5 ist seine Fähigkeit, den MHC I auf Transkription- und Expressionsebene herabzuregulieren, indem E5 den pH in Zellorganellen in Richtung Alkalisierung anhebt. Entsprechend wird die MHC I-vermittelte Antigenerkennung unterdrückt, was dazu führt, dass Delta-BPVs der Immunüberwachung entkommen können. (132, 133) Nach einer Infektion mit Delta-BPVs kommt es zu einer Umwandlung von Keratinozyten und Fibroblasten, was zu Akanthose, i.e., einer Umwandlung der normalen Epidermis hin zu einer wenig geschichteten Epidermis, die hauptsächlich aus wenig differenzierten, hyperproliferativen Keratinozyten besteht. Analog hyperproliferieren auch die infizierten dermalen Fibroblasten. (134) Eine produktive Infektion im

Sinne einer Virionenbildung kann nur in der Epidermis stattfinden und ist eng an die Keratinozytendifferenzierung gekoppelt. Bei BPV-induzierter Akanthose wird die Infektion auch in der Epidermis abortiv, d.h. BPV liegt wie in der Dermis in Form multipler viraler Episome in den Keratinozyten vor und es werden keine infektiösen Viruspartikel mehr gebildet und in den Hautschuppen an die Umgebung abgegeben. (134, 135)

Papillome und Fibropapillome bei Wiederkäuern sind in der Regel auf eine BPV-Infektion zurückzuführen.

BPV1 verursacht bovine Fibropapillome an der Haut, wobei Penis und Zitzen als Prädilektionsstellen gelten. BPV2 verursacht hauptsächlich kutane Warzen, aber auch pharyngeale Fibropapillome und Harnblasentumoren. (136) Derlei Erkrankungen können mit einem großen wirtschaftlichen Verlust verbunden sein. (137)

Bei einer Ausbreitung der Fibropapillome an den Zitzen kann die Melkfähigkeit einerseits aufgrund der physikalischen Gegebenheiten und andererseits durch chronische Mastitiden und der daraus resultierenden Verformung der Milchgänge eingeschränkt sein. Auch bei keiner Weitervermarktung der Milch, wie zum Beispiel bei einer Mutterkuhherde, können die Tumoren an den Zitzen die Milchaufnahme durch die Kälber erschweren und sich negativ auf deren Entwicklung auswirken. Makroskopisch lässt sich unter der Haut eine wulstige Masse beobachten, die eine raue Oberfläche ausbildet, bis hin zur klassisch warzenähnlichen Struktur. (138)

BPV1-induzierte penile Fibropapillome weisen häufig stark blutende bis nekrotische Bereiche auf. Eine Ausbreitung über den Damm bis hin zur Rückenlinie ist möglich. Sofern die Veränderungen nicht spontan regressieren, können sie zum Verlust der Fortpflanzungsfähigkeit beim erkrankten Stier führen. (134)

Die klinische Ausprägung einer BPV2-Infektion manifestiert sich in Form von Hautwarzen im Stirn-, Hals-, Brust- und Kopfbereich. Warzen treten gehäuft bei der Umstallung von Jungtieren auf und manifestieren sich als Läsionen mit einem Durchmesser von 2 bis 10 cm. Durch Reiben und dem daraus resultierenden mechanischen Reiz kann es zu einer großflächigen Ausbreitung der Krankheit kommen, die sich durch sekundäre Infektionen nachteilig auf die Nutzungs- und Lebensprognose auswirkt. (135)

Die Entwicklung einer BPV-induzierten Läsion beginnt meist nach einem Monat Latenzzeit als Fibrom mit oder ohne Akanthose bis hin zum Fibropapillom. (134) Histologisch bildet sich eine

subkutane Masse aus anaplastischen Fibroblasten mit großen Kernen, die eine Dehnung des darüber liegenden Epithels verursachen. Das Erscheinungsbild gleicht einem gutartigen Fibrom, welches virale DNS in episomaler Form beinhaltet. Bei beginnender Proliferation der Keratinozyten nimmt das Stratum granulosum an Dicke zu und es bilden sich in den Kernen zentrale Bereiche aus, in denen die virale DNS-Replikation stattfindet. In den absterbenden Keratinozyten der Hornschicht wird Kapselprotein exprimiert, das gemeinsam mit der viralen DNS neue infektiöse Virionen bildet. (138)

Bei Identifizierung der entarteten Zellen durch das Immunsystem wird die Läsion von Makrophagen und Lymphozyten infiltriert, was schließlich zu einer spontanen Regression führt. Unter experimentellen Bedingungen benötigte der Prozess der Induktion bis hin zur Regression ein Jahr. (138)

Bei der Entwicklung von BPV2-assoziierten Fibropapillomen konnte festgestellt werden, dass das Stadium der Partikelbildung fehlt, sodass hier von einer nicht produktiven, rein episomalen Infektion ausgegangen wird. (135)

1960 wurde erstmals eine Assoziation zwischen BPV-Infektion und der Ausbildung von Harnblasenkrebs bei Rindern hergestellt. (139) Durch nachfolgende Studien konnte bewiesen werden, dass eine Infektion mit BPV in Kombination mit der Aufnahme von immunsuppressiv wirkenden Ko-Karzinogenen, die beispielsweise im Adlerfarn enthalten sind, eine Virusaktivierung und dadurch eine Begünstigung der Ausprägung von Harnblasenneoplasien bewirkt. (123) Auch wenn der Synergismus zwischen dem Virus und der Pflanze bis heute noch nicht vollständig geklärt ist, liegt die Vermutung nahe, dass BPV die Harnblasenschleimhaut infiziert und eine latente Infektion verursacht. (123, 140) Es wird angenommen, dass die virale Genexpression durch die Aufnahme von Immunsuppressiva, aber auch mutagenen und karzinogenen Stoffen aus dem Adlerfarn gefördert wird, was wiederum die Zelltransformation ankurbelt. (141)

Die Rolle der BPVs bei neoplastischen Prozessen in natürlich entstehenden Karzinomen der Harnblase wurde durch den alleinigen Nachweis von E5 Proteinen in transformierten Zellen nicht aber in „normalen“ aber dennoch infizierten Zellen bestätigt. (140)

BPV2-DNS konnte auch im Blut von Kühen, die an Blasenkrebs erkrankt waren, detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass periphere Blutzellen als Reservoir für latent vor-

handene BPV2 fungieren. (142) Als Beweis für die Möglichkeit einer mesenchymalen Karzinogenese konnte eine Interaktion von BPV2 E5 mit dem PDGF β sowohl in epithelialen als auch in vaskulären Tumoren beobachtet werden. (131, 143)

Im Gegensatz zu den normalerweise transienten Warzen bei Rindern löst eine Infektion mit BPV1, 2 und möglicherweise auch BPV13 (144) bei Pferden persistente Hauttumoren aus, die sogenannten Sarkoide.

Die ersten Erkenntnisse in Bezug auf die Ätiologie von Sarkoiden wurden durch Inokulationsversuche gewonnen. Vorreiter hierbei waren Montpellier und Kollegen (145), die erfolgreich eine Übertragung von Sarkoiden bei einem Maultier durchführten. Darauf aufbauend gelang 1951 und 1969 zwei weiteren Forschergruppen eine Induktion von sarkoid-artigen Tumoren durch intradermale Inokulation mit zellfreiem Kuhwarzenextrakt. Diese experimentell erhaltenen Tumoren, die als Pseudosarkoide bezeichnet werden, waren morphologisch und histologisch von natürlichen Sarkoiden nicht zu unterscheiden. Sie zeigten jedoch eine spontane Regression. (146, 147) Persistierende Pseudosarkoide konnten 1969 in wenigen Fällen mittels Injektion von zellfreiem Sarkoid-Extrakt in oberflächlich verletzte Haut induziert werden. (148)

Mit Hilfe moderner Nachweis- und Analysemethoden konnte die ätiologische Assoziation von BPV1 und 2 mit Sarkoiden inzwischen eindeutig belegt werden. (149–153) Erkenntnisse zur intraläsionalen Virustranskription in Sarkoiden bestätigten die aktive virale Beteiligung an der Ausbildung und des progressiven Verlaufs dieser Hauttumoren. (135, 154–157) Obwohl der Virus-DNS-Nachweis auch in intakter Haut von equinen Sarkoidpatienten möglich ist, findet man keine BPV1/2-DNS in anderen Tumorarten, wie etwa Melanomen oder Plattenepithelkarzinomen und auch nur selten in sarkoid-freien Pferden. (152, 158, 159)

Als mögliche Anpassung an den equiden Wirt wurde anhand einer Sequenzanalyse der BPV1-E5- und E2 Gene eine Reihe von synonymen und nicht-synonymen Punktmutationen identifiziert. (160–162) Die Mutationen im E5-Gen wurden mit einer verstärkten Codon-Nutzung in der Wirtszelle assoziiert. Hingegen zeigten die Mutationen im E2-Gen und der LCR Region eine Korrelation mit einer verbesserten Virusaktivität in Pferdefibroblasten. (160, 162, 163)

Die Virusübertragung ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, jedoch lässt der Nachweis von pferdespezifischen BPV1-Varianten in Sarkoiden die Vermutung zu, dass das Virus auch Equiden-intern und nicht nur von Rindern auf Equiden übertragen wird. (160–162) Daraufhin deutet auch die Beobachtung, dass Sarkoide in Clustern innerhalb von Pferde- und Zebraherden auftreten. (151, 164, 165) Ein weiterer Beweis für diese Vermutung konnte in einem 2008

durchgeführten Feldexperiment erbracht werden, wo eine Krankheitsübertragung von Eseln mit Sarkoiden auf gesunde Individuen durch gemeinsame Haltung in einer Box erzielt werden konnte. (166)

Der Hypothese folgend, dass eine Neuinfektion nur durch infektiöse Virionen möglich ist, kann eine Übertragung auf andere Individuen nur durch direkten oder indirekten Kontakt mit infizierten Tieren oder kontaminierten Flächen bzw. eventuell Insekten erfolgen. (167, 168)

Anhand der Prädilektionsstellen für die Entwicklung von Sarkoiden in Wundbereichen kann der Verdacht geäußert werden, dass eine Virionenübertragung durch Insekten möglich ist. Der Verdacht basiert auf dem Nachweis von viraler DNS in Augenfliegen (*Musca autumnalis*), die in unmittelbarer Nähe von Equiden mit Sarkoiden gefangen wurden. (169, 170) Weiters ist vorstellbar, dass Blut von an Sarkoiden erkrankten Pferden ein Virusreservoir darstellen könnte und dadurch bei trächtigen Stuten eine transplazentare Übertragung auf das Fohlen möglich wäre. (167, 171)

Lange wurde angenommen, dass die BPV1/2-Infektion in Equiden auf Fibroblasten beschränkt ist und daher keine Virionen produziert werden. Diese Theorie einer nicht produktiven Infektion in Pferdeartigen wurde aber inzwischen widerlegt. Hartl et al. (2011) haben Pseudosarkoide durch intradermale Inokulation mit BPV1-Virionen bei Jährlingen initiiert, wohingegen dies mit nackter Virus-DNS oder infizierten Fibroblasten nicht möglich war. (167, 172) Des Weiteren wurde eine Expression von L1-Kapsidproteinen in Sarkoiden festgestellt (154), was in Kombination mit der Tatsache, dass die Kapsidsynthese und der Virionen-Zusammenbau auf die epidermale Hornschicht beschränkt ist, den Verdacht einer produktiven Infektion unterstützt. (162) Bezugnehmend auf diesen Verdacht konnten mit Hilfe der Immunocapture-PCR (IC/PCR) in etwa der Hälfte untersuchter Sarkoide Strukturen nachgewiesen werden, die höchstwahrscheinlich Virionen entsprechen. (168) In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte auch gezeigt werden, dass die BPV1-Infektion nicht nur auf die Dermis beschränkt ist, sondern auch die Epidermis involvieren kann. (173)

Studien zur Sarkoidpathogenese haben gezeigt, dass die BPV1-Proteine E5 und E6 einen invasiven Phänotyp durch Steigerung des Zellwachstums induzieren. E7 fördert den Verlust der Kontaktinhibition, so dass in vitro infizierte Zellen sich stapeln und mehrere Schichten bilden können. (174, 175) Für die Transformation von Pferdefibroblasten ist die mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 und die Inaktivierung von p53 durch Translokation der Expression ins Zytoplasma entscheidend. (175, 176)

Bovine Delta-Papillomviren können weltweit in Equinen Sarkoiden nachgewiesen werden. Obwohl die genomischen Sequenzen von BPV1 und 2 große Ähnlichkeiten aufweisen (<90% auf Aminosäureebene), hat man auf Basis der steigenden Sensitivität und Spezifität der Nachweismethoden geografische Prävalenzen festgestellt. So wird BPV1 vorwiegend in Zentral- und Nordeuropa und im Osten der USA nachgewiesen, wohingegen BPV2 gehäuft im Westen der USA und Südeuropa in Sarkoiden nachweisbar ist. (152) Auch einzelne genetische BPV1/2-Varianten kommen gehäuft in spezifischen Regionen vor. (160, 163, 177) 2013 wurde ein neues bovines Delta-Papillomvirustyp, das bovine Papillomvirus Typ 13 (BPV13) in Kuhwarzen und auch Sarkoiden in Brasilien identifiziert. (144, 178) Aufgrund der großen genetischen Ähnlichkeit zu BPV1 und 2 wird vermutet, dass BPV13 in Europa unterdiagnostiziert sein könnte. Für Österreich konnte dieser Verdacht zumindest beim Pferd nicht bestätigt werden. Von 135 Sarkoiden enthielt kein einziges BPV13-DNS. Es bedarf weiterer Forschung, um die weltweite Prävalenz von BPV13 in bovinen Papillomen und Sarkoiden bestimmen zu können. (179)

2.2. Equine Sarkoide

Das Equine Sarkoid ist definiert als benigner fibroblastischer Hauttumor, der bei allen Equiden auftreten kann. Es zählt heute zu den am häufigsten diagnostizierten Tumoren bei Pferden mit einer weltweiten Prävalenz von 1-12%. (180–183)

Erstmalig charakterisiert wurde die seit Jahrzehnten bekannte epitheliale Veränderung im Jahre 1936 von Jackson. (184, 185) Jener beschrieb diese als einzelne lokal invasive benigne neoplastische Veränderung der Haut mit einer variablen epidermalen Beteiligung, die häufig Rezidive ausbildet und nicht metastasiert. (184) Die Bezeichnung Sarkoid hat seine Herkunft aus dem Altgriechischen und bedeutet wörtlich übersetzt „fleischartig“, was den klinischen und pathologischen Unterschied zu Fibromen und Papillomen unterstreichen sollte.

Sarkoide werden anhand ihrer klinischen und histologischen Erscheinungsform in 6 Gruppen gegliedert, die an jeder Stelle des Körpers auftreten können. Häufig kann auch eine zeitgleiche Ausprägung von mehreren Formen von Sarkoiden an einer Hautstelle beobachtet werden, was als gemischtes Sarkoid bezeichnet wird. (186)

Das okkulte Sarkoid ist die mildeste und oberflächlichste klinische Erscheinung, die vorwiegend an leicht behaarten Hautstellen auftritt, wie beispielsweise im Bereich des Mundwinkels,

der Augen, der Innenseite der Vordergliedmaßen oder der Innenschenkel. Die Veränderungen sind zu Beginn der klinischen Manifestation oftmals schwer von einer Dermatophytose oder einer Infektion mit dem Bakterium *Pemphigus foliaceus* zu unterscheiden, da meist lediglich eine runde bis ovale, alopezische Hautverdickung beobachtet wird. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung bilden sich kleine 2 - 5 Millimeter große noduläre kutane Veränderungen oder aufgeraute Bereiche, die eine geringgradig hyperkeratotische Oberfläche aufweisen. Die Pathologien sind diffus verteilt und weisen einen langsam progressiven Charakter auf. Üblicherweise erfolgt eine Weiterentwicklung zur verrukösen Form, jedoch im Falle einer traumatischen Verletzung ist auch eine rapide Progression zu einem fibroblastischen Sarkoid möglich. (186)

Der größte Unterschied zwischen einem okkulten und einem verrukösen Sarkoid liegt in der verstärkten Hyperkeratose und der dadurch entstehenden geschuppten Erhabenheit der verrukösen Läsion. Die Veränderungen sind scharf abgegrenzt und können bei kleiner Größe einem Papillom oder einem Fibropapillom ähneln. Bei großflächigeren Läsionen wird häufig das Vorkommen einer Koaleszenz beobachtet. In der Peripherie verruköser Sarkoide ist bei genauerer Adspektion möglicherweise eine Zone mit leicht verdickter beziehungsweise veränderter Haut erkennbar, die auf eine vorrangegangene okkulte Ausprägung hinweisen kann. Die singulären Läsionen können sessil oder gestielt auftreten und weisen ein warzenartiges Aussehen auf. Gleich wie die okkulten Sarkoide zeigen verruköse Sarkoide ein langsames Wachstum und eine hohe Gutartigkeit, sofern keine zufällige oder iatrogene Verletzung erfolgt. Jedoch können sich auch ohne erkennbaren Auslöser spontan innerhalb der Veränderung kleine Knötchen mit fibroblastischem Charakter bilden. Diese Art tritt gehäuft im Gesicht, im Achselbereich, in der Leisten- und Scheidenregion auf. (186)

Die noduläre Form des Sarkoids ist als feste, gut abgrenzbare subkutane kugelförmige Veränderung mit variabler Größe definiert. Isolierte Knoten können einen Durchmesser von 0,5 bis 20 cm aufweisen, wohingegen bei multiplen Knoten in Extremfällen tausende Knoten gebündelt zu einem großen Tumor vorhanden sein können. (186)

Fibroblastische Sarkoide treten vorzugsweise an der Leiste, den Augenlidern, den unteren Gliedmaßen und am Kronrand auf. Unabhängig von der Lokalisation ist eine vermehrte Ausprägung an Hautwunden und traumatisch verletzten anderen Sarkoiden nachweisbar. (186)

Es werden 2 Arten von fibroblastischen Sarkoiden unterschieden. (186)

Typ 1, auch als pedunkuläre Form bezeichnet, kann an jeder Stelle des Körpers auftreten und wird aufgrund ihrer möglichen differentiellen klinischen Ausprägung und der damit verbundenen Therapieansätze in 2 Untergruppen (Typ 1a und Typ 1b) eingeteilt. (186)

Veränderungen vom Typ 1a sind schmal gestielt und ohne erkennbare Beteiligung tieferer Hautschichten am Ansatz. Die Bestätigung für ein Fehlen jener tiefen Verwurzelung erfordert eine Biopsie, jedoch ist die vollständige Ausprägung einer Pathologie erst durch eine histologische Untersuchung nach chirurgischer Entfernung erkennbar. (186)

Sarkoide vom Typ 1b sind ebenfalls mit einem schmalen Hals mit der Umgebung verbunden aber weisen eine tiefere Verwurzelung in den Hautschichten auf als Läsionen vom Typ 1a. Häufig ist der intrakutane Teil stark invasiv und größer als das oberflächliche Kompartiment, insbesondere, wenn frühere Behandlungsversuche unternommen wurden. Durch die große Beteiligung von tieferen Hautschichten ist die Behandlung schwieriger als bei fibroblastischen Sarkoiden vom Typ 1a. (186)

Sessile Sarkoide bilden die Gruppe der Typ 2 fibroblastischen Sarkoide. Sie besitzen eine ausgedehnte breite Basis und die befallene Stelle fällt oft größer aus, als bei der ersten palpatrischen Untersuchung vermutet wird. Histologisch sind sessile Sarkoide mit den fibroblastischen Typ-1b Sarkoiden ident, jedoch ist die anwendbare therapeutische Bandbreite und deren Erfolg deutlich geringer. (186)

Der wohl deutlichste Unterschied von fibroblastischen Sarkoiden zu anderen Formen ist die ausgeprägte Ulzeration und Serumexsudation, die häufig von Sekundärinfektionen oder Myiasis betroffen sein können. Die Ätiologie, ob sich eine Läsion aus einem einzelnen Herd entwickelt hat, oder ob eine Progression von okkulten, verrukösen oder nodulären Formen stattgefunden hat, ist selten feststellbar. (186)

Sobald ein fibroblastischer Zustand erreicht ist, hat die Läsion ein typisches fibroblastisches Verhalten und Aussehen. Beide Formen fibroblastischer Läsionen können sich aus jedem anderen Sarkoidtyp entwickeln. (186)

Die klinische Erscheinung von fibroblastischen Sarkoiden ist vergleichbar mit der von Hypergranulationsgewebe oder einem Staphylokokken-induzierten Pyogranulom. Im Falle einer Wunde an den Gliedmaßen, wo es häufig zu einer Ausbildung von Hypergranulationsgewebe kommt, ist es nicht selten, dass Sarkoidkomponenten an den Wundrändern nachweisbar sind.

Hierfür ist eine Biopsie in die Tiefe und ein erfahrener Begutachter zur Vermeidung von Fehldiagnosen unerlässlich. (186)

Interessanterweise treten vorwiegend bei Wunden am Körperstamm verruköse Sarkoide auf, wohingegen bei Läsionen an den Gliedmaßen eine gehäufte Entwicklung von fibroblastischen Sarkoiden beobachtet wird. (186)

Auch fibroblastische Sarkoide metastasieren nicht. Sie können aber durch ihren lokal aggressiven Charakter mit schneller Progression zu einer erheblichen Einschränkung physiologischer Prozesse je nach Lokalisation führen. (186)

Bei der gemischten Form der Sarkoide wird vermutet, dass es sich hierbei um eine Übergangsform von okkulten, verrukösen und nodulären Läsionen zu einer fibroblastischen Form handelt. Die Verteilung beziehungsweise die Zusammensetzung der verschiedenen Typen ist variabel. Diese Sarkoidausprägung ist häufig das Resultat einer konstanten mechanischen Reizung einer anfänglich milden Form. (186)

Die malevolente Form eines Sarkoids tritt vorwiegend in Hautarealen des Kiefers, des Gesichtes, des Ellenbogens und des Oberschenkelinnenbereiches auf. Vorrangegangene Traumata bei anderen Sarkoidtypen sind deren gängige Vorgeschichte. Es besteht auch die Möglichkeit einer spontanen Ausbildung malevolenter Sarkoide ausgehend von multiplen, lokal invasiven, ulzerierenden Pathologien, die gegebenenfalls eine ausgedehnte Infiltration der Lymphgefäße und eine Ausbreitung auf lokale Lymphknoten aufweisen können. (186, 187)

Die eindeutige Zuteilung eines Sarkoids zu einer der sechs klinischen Formen gestaltet sich nicht immer einfach, insbesondere während einer traumatisch induzierten Progression zu schwereren Formen. Auch gibt es histologisch keinen erkennbaren Unterschied zwischen Fibroblasten, die aus verschiedenen klinischen Sarkoidtypen isoliert wurden. (188)

Die klinischen Erscheinungsbilder sind in vielen Fällen pathognomonisch und eine Diagnose kann in vielen Fällen allein anhand klinischer Parameter gestellt werden. Als Hilfestellung und gleichzeitige Vereinheitlichung von Befunden wurde 2018 ein Diagnose-Protokoll vorgestellt. Dies ermöglicht auch unerfahrenen Veterinärmedizinern eine Vielzahl von Sarkoidformen anhand der klinischen Symptome von anderen Hautveränderungen zu unterscheiden und rechtzeitig eine geeignete Therapie einzuleiten. (189)

Trotz einer aussagekräftigen Morphologie kann eine weiterführende Diagnostik zur eindeutigen Identifizierung erforderlich sein. (190)

Der heutige Gold-Standard für die Diagnostik von Sarkoiden ist analog zu anderen Hautveränderungen die histopathologische Untersuchung von Tumorgewebe. Dies bietet den Vorteil, eine exakte Diagnose zu liefern. (190) Ein sehr großer Nachteil besteht aber in der invasiven Gewinnung der Gewebeprobe, die das Tumorstadium und die Progression zu einer multiplen Erkrankung nachweislich fördert. (191–194) Es wird geraten, für den Fall einer Sarkoiddiagnose bereits einen Therapieplan zu haben.

Eine nicht invasive Nachweismethode besteht in der Durchführung einer BPV1/2-PCR zum Nachweis viraler DNS etwa aus nicht invasiv entnommenen Sarkoidschuppen. (153, 195) Dieses Verfahren ist hoch sensitiv und weist selbst wenige BPV-DNS-Moleküle verlässlich nach. (149, 152, 158, 196) Die Probengewinnung ist auch mittels Tupferabstrich machbar. Es ist möglich, dass die Abstrich-Methode für Hauttumoren, die ein intaktes Epithel aufweisen wie zum Beispiel noduläre Läsionen, weniger geeignet ist, da die Virus-DNS ja vorrangig in den Fibroblasten ist. Alternativ können Tumorschuppen oder periläsionale Haarwurzeln für eine Diagnostik verwendet werden. (197, 198)

Zur Verbesserung der diagnostischen PCR-Methode führten Gysens und Martens eine Studie zur Evaluierung der Probenentnahme mittels Feinnadelaspiration durch. Bei dieser Studie gelangten sie zu dem Erkenntnis, dass eine Feinnadelaspirationsbiopsie eine Erhöhung der Sensitivität bei Sarkoiden mit intaktem Epithel und eine Verbesserung der Spezifität, durch Verringerung des Kontaminationsrisikos, bewirkt. Das Risiko durch diese Entnahmetechnik eine Progression des Tumors auszulösen, wurde bislang nicht untersucht. (190) Zumal das progressive Wachstum in Folge jeder Art von Trauma vielfach belegt ist, (162, 199) erscheint diese Vorgangsweise wenig ratsam. Das PCR-Verfahren wird heutzutage in den meisten Laboren angeboten und stellt eine schnelle und kostengünstige diagnostische Möglichkeit dar, die sowohl in Kliniken als auch in einer Fahrpraxis angewendet werden kann.

Die Vielzahl der derzeit etablierten Therapiemöglichkeiten macht deutlich, dass momentan keine universelle Therapie mit garantierter Erfolgsquote zur Verfügung steht. Aus diesem Grund ist es wichtig, die geeignetste Therapie hinsichtlich Sarkoid-Typen, Lokalisation, Ausdehnung, finanzieller Bereitschaft des Besitzers usw. zu wählen. Auch neigen Sarkoide dazu, Rezidive auszubilden, die therapieresistenter sein können als der Primärtumor, weshalb eine gründliche Anamnese bezüglich des Krankheitsverlaufes inklusive etwaiger Vorbehandlungen essenziell ist. (200)

Eine der erprobtesten Behandlungsmethoden ist die chirurgische Entfernung.

Hierbei ist es wichtig die chirurgischen Prinzipien der Tumorchirurgie einzuhalten, um die Wahrscheinlichkeit der Rezidivbildung gering zu halten. Jene Prinzipien schreiben eine vollständige Entfernung des Tumors vor, bei welcher auch der Umschneidungsradius so gewählt wird, dass keine Tumorzellen an den Schnitträndern mehr nachweisbar sind. (201) Der empfohlene Abstand liegt bei 1 - 2 cm vom sichtbaren Rand der Pathologie und basiert auf der 2001 durchgeführten Studie, bei der in 33% der Proben BPV-DNS an den mit einem Rand von 1,6 cm umschnittenen Sarkoiden nachgewiesen werden konnte. (202) Während der Operation ist auf eine Verhinderung der Verteilung der Tumorzellen im Operationsbereich zu achten. (201) Die Durchführbarkeit der Exzision mittels Skalpell ist abhängig von der Lage, der Ausbreitung, der Abgrenzbarkeit und der Art des Sarkoids. Besonders in Bezug auf die Abgrenzbarkeit sollte im Falle einer undeutlichen Grenze zwischen gesundem und verändertem Gewebe eine andere Therapiemöglichkeit in Betracht gezogen werden, da eine erfolgreiche vollständige Entfernung nicht gewährleistet werden kann. (200)

Die Erfolgsquote der chirurgischen Entfernung ohne Zusatzbehandlungen liegt im Bereich von 30 - 82 %, wobei die Ausprägung der meisten Rezidive nach 6 Monaten beobachtet wird. (202–204) Die Behandlung weist eine geringere Heilungschance bei Sarkoiden im periokulären Bereich auf. 82 % von 28 behandelten Sarkoiden zeigten eine Rezidivbildung direkt an den Wundrändern oder in unmittelbarer Nähe von jenen. (205) In diesen Fällen würde die Wahl eines anderen Therapieansatzes oder eine zusätzliche Behandlung möglicherweise die Heilungschancen verbessern.

Als Weiterentwicklung der chirurgischen Therapie wurde die Wirkung der Elektrochirurgie auf Sarkoide untersucht. Für die Anwendung dieser Methode wurde eine Erfolgsquote von 86,8 % ermittelt. (204) Hierbei wurden die Tumoren mit einem elektrochirurgischen Instrument unter Einhaltung der „No-touch technique“ mit einem mindestens 1,2 cm breiten Sicherheitsrand entnommen. Die Wunde wurde nach einer Spülung mit Chlorhexidinlösung routinemäßig verschlossen. Ein zusätzlicher Einsatz von Cisplatin-Perlen reduziert die Erfolgsrate dieser Behandlung, wenn er unmittelbar nach der Exzision erfolgt. (204) Ursache dafür ist, dass Cisplatin cytotoxisch wirkt. Eine Zusatzbehandlung etwa drei Wochen nach der Operation mit Cisplatin reduziert hingegen die Rezidivrate deutlich. (198, 206)

Die Verwendung eines Diodenlasers zur Behandlung von allen Sarkoidarten und Lokalisationen führte bei 83 % zu einem Therapieerfolg ohne Rezidivierung. Die häufigste Rezidivausbildung wurde beim verrukösen Typ und bei Lokalisation im Kopf- und Halsbereich beobachtet.

(207). Diese Prädispositionen sind noch nicht genau erforscht, aber es wird davon ausgegangen, dass es an der limitierten Möglichkeit der Einhaltung einer Sicherheitszone bei der Entfernung liegt, beziehungsweise an der unklaren Grenze von betroffenem Gewebe zu gesundem Gewebe. (200, 201)

Eine weitere Methode der Laserchirurgie ist die Verwendung eines Kohlenstoffdioxidlasers. Es wurde berichtet, dass dieser Laser mit einer geringeren Therapieerfolgsrate (62 - 66,7 %) assoziiert ist als der Diodenlaser. (208, 209) Neuere Daten widersprechen dieser Beobachtung. (210) Zur Erhöhung der Chance auf eine erfolgreiche Therapie wird generell empfohlen, den Abstand zwischen Exzisionsrand und makroskopischer Grenze des Tumors zu erweitern, sowie eine Kombination mit anderen Therapieformen. (211)

Die Kryochirurgie findet häufig Einsatz als Kombinationstherapie mit chirurgischer Entfernung. Sie weist hierbei Erfolgsraten von 70 - 80 % auf. (212–214) Die therapeutische Wirkung basiert auf der Ausbildung von großen Eiskristallen, die die Zellwand des tumorös entarteten Gewebes schädigen. Dies wird herbeigeführt indem das Gewebe mit zum Beispiel flüssigem Stickstoff schnell auf mindestens - 20 °C abgekühlt wird. Der anschließend langsame Anstieg auf Raumtemperatur verursacht nicht nur eine intrazelluläre Eiskristallbildung, sondern auch eine Thrombenbildung und damit die Unterbrechung der Blutversorgung, was zusätzlich die Ausbildung einer Nekrose herbeiführt. Zu den Komplikationen gehört eine starke Kontraktion der chirurgischen Narbe, die je nach Lage weitere Folgeschäden mit sich bringt. Für die Behandlung von periokulären Sarkoiden ist dieses Verfahren nicht geeignet. Bei 28 Fällen kam es in 91 % innerhalb von 12 Wochen zu einem aggressiven Wiederauftreten der Sarkoide. (205) Dieses Verfahren wurde in den letzten Jahren vom vermehrten Einsatz der Diodenlaser abgelöst. (211)

Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die Ligatur eines Sarkoids. Es werden gute Erfolge in der Behandlung erzielt, jedoch ist sie nur bei gestielten Sarkoiden anwendbar. Dies impliziert, dass vorwiegend noduläre oder fibroblastische Sarkoide auf diese Weise behandelt werden können. Durch das Setzen einer Ligatur wird durch die unterbrochene Blutzufuhr eine Ischämie hervorgerufen, die wiederum in einer Nekrose resultiert. Das Ligaturmaterial können sogenannte Elastratorringe für kleinere Tumoren, Nahtmaterial oder Lycraligatur für größere Tumoren sein. Es empfiehlt sich zur Vorbeugung von Rezidiven eine Kombination mit anderen Therapien. (201)

Topische Behandlungen bieten den Vorteil, dass sie leicht einsetzbar sind und einen im Vergleich zu den anderen Behandlungsmethoden geringen finanziellen Aufwand mit sich bringen. Sie können an fast allen Lokalisationen angewendet werden, mit Ausnahme des periokulären Bereiches, da hierbei Schäden am Auge bei Kontakt mit dem Therapeutikum auftreten können. (200)

Salben haben eine limitierte Wirkung bei größeren Läsionen und werden vorwiegend bei kleinen oberflächlichen Tumoren angewendet. Bei der Anwendung sollte darauf geachtet werden, dass die umliegende Haut durch ein Verwischen oder Verlaufen des Therapeutikums nicht geschädigt wird. Eine generalisierte Erfolgsquote ist nicht beschrieben, da viele unterschiedliche Substanzen zur Anwendung kommen. (200)

Die Verwendung von 5-Fluorouracil (5-FU) erreichte eine Erfolgsquote von 67 % bei einer Anwendung an oberflächlichen Läsionen rund um die Augenregion (205), jedoch konnte das Ergebnis 2018 bei zweimaliger täglicher Anwendung nicht reproduziert werden. (215) In Kombination mit einer nachfolgenden Behandlung mit Bleomycin konnte bei 77 % eine Heilung erzielt werden. (200, 215) Das Chemotherapeutikum 5-FU wird auch in der in Liverpool entwickelten Salbe AW5 gemeinsam mit dem Wirkstoff Thiouracil und anderen Schwermetallen zur Therapie von Sarkoiden verwendet. Berichten zufolge kann mit jener eine Erfolgsrate von 75 - 80 % erreicht werden. (201) Nachteil dieser Behandlungsmethode ist die starke Gewebereizung, die unter anderem schmerzhaft für das Pferd ist und zu Schwierigkeiten bei der Applikation führen kann. (200)

Imiquimod wird als Immunmodulator in der Therapie von oberflächlichen Sarkoiden eingesetzt. Die Behandlung wird 3x wöchentlich empfohlen. Die Behandlungsdauer ist vom Individuum abhängig und kann sich über bis zu 32 Wochen erstrecken. Die Salbe kann vom Besitzer appliziert werden, jedoch ist nach einer Zeit aufgrund der Gewebereizung mit Abwehrreaktionen zu rechnen. Die berichtete Erfolgsrate liegt bei 60 - 84,4 %. (204, 216, 217) Obwohl in 84,4 % der Fälle eine komplette Remission beschrieben wurde, so entwickelten sich in 7,3 % der Fälle Rezidive. (217) Eine Kombination von Imiquimod mit Tazarotene erzielte einen 100 % Behandlungserfolg in einer retrospektiven Studie. Tazarotene werden aufgrund ihrer Eigenschaft Einfluss auf die Zellbildung, -wachstum und -differenzierung auszuüben, in der Humanmedizin für die topische Behandlung von Neurodermitis und Akne eingesetzt. (218)

Intraläsionale Chemotherapie wird in vielen Fällen mit Cisplatin durchgeführt. Aufgrund der Gesundheits- und Sicherheitsaspekte für den Anwender sollte es nur in ausgewählten Fällen

als Therapie in Betracht gezogen werden. Bei der Anwendung von Cisplatin-Injektionen konnte ein Erfolg in 96 % der Fälle erreicht werden. (219) Dieser Therapieerfolg konnte in weiterführenden Studien nicht reproduziert werden. Als Beispiel dient hierfür die Anwendung an periokulären Tumoren mit einer Erfolgsquote von 33 % (205) Bei der Anwendung an Pathologien an anderen Lokalisationen wurde ein Erfolg in 53 % erzielt. (204)

Cisplatin kann auch intraläsional in Form von bioresorbierbaren Kügelchen (engl. Beads) eingesetzt werden. Der erfolgreiche Einsatz konnte in 91 % der 22 Fälle über 2 Jahre erwiesen werden. Die Nebenwirkungen waren gering und äußerten sich in kleinen alopezischen Bereichen, geringgradiger Schwellung und Narbenbildung. (206) Im Vergleich zu einer Cisplatin-Injektion ist das Sicherheitsrisiko bei der Verwendung von Beads aufgrund des erleichterten Handlings geringer. Weiter ist die Frequenz der Therapieanwendung geringer, da eine kontinuierliche Abgabe von Cisplatin über etwa zwei Wochen stattfindet. (220) Die Beads werden meist in Kombination mit einer chirurgischen Entfernung angewendet, wo sie in das neuentstandene Wundbett eingelegt werden.

Sarkoide können auch immuntherapeutisch behandelt werden, etwa durch Verabreichung eines Derivats des Mycobacterium bovis. Dieser Impfstoff wurde ursprünglich zum Schutz vor Tuberkulose von Calmette und Guérin entwickelt und 1921 erstmalig eingesetzt. (221) Der Impfstoff, auch bekannt unter dem Namen Bacillus Calmette Guérin (BCG) hat keinen direkten Effekt auf Sarkoide, jedoch löst die Verabreichung intraläsional eine zellvermittelte Immunantwort aus, die sich gegen Tumorzellen richtet. (222, 223) Die Anwendung war bei nodulären und einigen fibroblastischen Sarkoiden in 58 - 69 % der Fälle therapeutisch erfolgreich. Eine Unwirksamkeit wurde bei der Behandlung von verrukösen und okkulten Sarkoiden beobachtet. (204, 205) Es wird eine mehrmalige intratumorale Injektion alle 2 - 4 Wochen empfohlen, wobei eine Regression von periokulären Sarkoiden ab der dritten Verabreichung eintritt. (224) Interessanterweise ist die Erfolgsquote bei Sarkoiden am Körper geringer als bei jenen im Augenbereich. (181, 225–227)

Die Radiotherapie gilt als Goldstandard in der Behandlung von periokulären Sarkoiden. (205, 228, 229) Jedoch ist eine Therapie mit dieser Methode aufgrund des Sicherheitsrisikos für den Anwender und dem hohen finanziellen Aufwand weltweit kaum verfügbar. (228) Dennoch wird empfohlen, diese erfolgversprechende Therapiemöglichkeit bei therapieresistenten Sarkoiden in Betracht zu ziehen. (200)

Die virale Ätiologie von Sarkoiden und deren relativ hohe Therapieresistenz vor allem in fortgeschrittenen Stadien befeuern Bestrebungen, neue therapeutische und auch prophylaktische Impfstoffe zu entwickeln. 2021 wurde diesbezüglich eine Studie veröffentlicht, in der modifizierte humane Influenzaviren eine Regression der Sarkoide durch Induktion einer Immunantwort bewirkten. (230) Bereits 1998 wurden humane Influenzaviren, denen der C-terminale Teil des Nicht-Struktur-Gens NS1 fehlt (deINS), hergestellt. (231, 232) NS1-deletierte Influenzaviren können die infektionsinduzierte Interferon- (IFN) Antwort durch den Wirt nicht mehr antagonisieren und daher in immunkompetenten Organismen nicht mehr replizieren, was einer Lebendattenuierung gleichkommt. Stattdessen lösen NS1-deletierte Influenzaviren eine starke IFN-Antwort aus, was zur Rekrutierung zahlreicher Immunzellen unterschiedlichen Typs an den Ort der Infektion führt. (231–233) Zur Therapie von Sarkoiden wurden Influenza A und B Viren entwickelt, die eine partielle NS1-Deletion (iNS1) aufweisen, so dass die Replikationsfähigkeit in IFN-empfindlichen Tumorzellen bei gleichbleibender Lebendattenuierung minimal erhalten bleibt. Zusätzlich wurden in die NS1-Deletionsstelle überlappende BPV1-E6- und E7-Sequenzen als Tumorantigene eingebaut. Die Charakteristika dieser modifizierten Influenzaviren (iNSA/E6E7equ und INSB/E6E7equ) liegen entsprechend in der Immunogenität des Influenza-Vektorgerüsts und der Expression von BPV1-Antigenen. Die Verabreichung des Wirkstoffes durch intratumorale Injektion führte bei 20 von 29 Pferden zu einer Rückbildung der Sarkoide. Die systemische sarkoidspezifische Immunantwort wurde durch die generalisierte Rückbildung auch von nicht injizierten Sarkoiden im selben Patienten bestätigt. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob die Injektion zu einer dauerhaften Immunität führt. (230)

3. FRAGESTELLUNG

1. BPV1/2 Ko-Infektionen als Sarkoidursache und die potenzielle negative Auswirkung auf die klinische Ausprägung waren kaum Thema der bisherigen Forschung auf dem Gebiet der Bovinen Papillomvirusinfektionen bei Equiden. Eine Doppelinfection könnte die ätiologische Grundlage für eine hochgradige, lokal aggressive Ausbildung von Sarkoiden oder deren Therapieresistenz sein.

2. Aufgrund jener mangelnden Grundlagenforschung wurde bislang kein sensitives Detektionssystem etabliert, welches einen simultanen und quantitativen Nachweis von BPV1- und 2-DNS garantiert.

Das Ziel der Arbeit war die Etablierung, Evaluierung und Validierung eines derartigen Nachweissystems, um retrospektiv mögliche Kausalitäten zwischen Doppelinfectionen und dem Schweregrad der klinischen Symptomatik zu identifizieren.

4. MATERIAL & METHODEN

4.1. Probenauswahl und Einteilung

Insgesamt wurden Proben von Sarkoidgewebe von 67 Pferden für den Versuch ausgewählt. Die Auswahl erfolgte anhand des klinischen Erscheinungsbildes, unabhängig von Alter, Geschlecht, Rasse und Vorbehandlung.

Zur Objektivierung jener klinischen Ausprägung einer Infektion mit dem Bovinen Papillomvirus Typ 1/2 wurden die Einteilungskriterien aus der Studie „*Influenza virus vector iNS1 expressing bovine papillomavirus 1 (BPV1) antigens efficiently induces tumour regression in equine sarcoid patients*“ (230) verwendet. (Tab. 1)

TABELLE 1: SARKOIDEINTEILUNG NACH SCHWEREGRAD

Gruppe	1. Geringgradig	2. Mittelgradig	3. Hochgradig
Eigenschaften	Kein fibroblastisches Sarkoid	Sarkoid Anzahl 3: 1- 20mm \emptyset Kein fibroblastisches Sarkoid	mehr als 3 Läsionen
	Sarkoid Anzahl 2: 2-20 mm \emptyset	Sarkoid Anzahl 2: 1- 30 mm \emptyset	periokuläre Lokalisation
	Sarkoid Anzahl 1: 1 – 30 mm \emptyset	maximal ein fibroblastisches Sarkoid $\emptyset \geq 20$ mm	Fibroblastische Sarkoide ab 20 mm \emptyset
			Malevolenter Charakter
Probenanzahl vor Analyse	20	8	39
BPV DNS nachgewiesen	14	3	34

Tabelle 1 veranschaulicht die Einteilungskriterien zu den 3 Gruppen. „Probenanzahl vor der Analyse“ zeigt die Zuteilung der 67 Proben zu den jeweiligen Gruppen. „BPV DNS nachgewiesen“ stellt die angepasste Anzahl der Proben unter Berücksichtigung des Ausschlusses von 16 Proben dar.

Gemäß dieser Klassifikation ergaben sich 3 Gruppen, wobei die „Gruppe 1 geringgradige Erkrankung“ 20 Proben, „Gruppe 2 mittelgradige Erkrankung“ 8 Proben und „Gruppe 3 hochgradige Erkrankung“ 39 Proben beinhaltete. (Tab. 1)

Die Recherche der Krankheitsgeschichte erfolgte im Tierspitalinformationssystem (abgekürzt TIS; 2001 Applikation Orbis VetWare von Agfa HealthCare) der Vetmeduni Vienna und archivierte Proben-Begleitschreiben.

Zur Gewinnung von speziesübergreifenden Daten wurden 24 Proben, die anlässlich eines Ausbruchs klinischer Papillomatose bei Kühen nahe Bristol gewonnen wurden, zusätzlich unter den gleichen Konditionen analysiert.

Alle Proben lagen bereits als extrahierte DNS in Puffer AE (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gelagert und bei -20°C konserviert vor und wurden von der Forschungsgruppe „Research Group Oncology“ (abgek.: RGO; Abteilung Pferdechirurgie) der Vetmeduni-Pferdeklinik zur Verfügung gestellt.

4.2. Methoden

Für die eindeutige Detektion von BPV1- und 2-DNS wurde für jede Probe eine qualitative PCR mit typspezifischen Primern und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt.

Zur Validierung des Testsystems bzw. der Primer wurde eine digitale PCR (dPCR) für die Bestimmung der exakten Viruslast und eine quantitative BPV1 und BPV2 PCR von Verdünnungsreihen ausgeführt. Zur Ermittlung der analytischen Sensitivität, analytischen Spezifität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden aus dem Sarkoid-Probenpool 9 Proben ausgewählt und ebenfalls mittels quantitativer PCR (qPCR) analysiert.

Die 24 Proben der Kühe waren bereits vor Beginn der Arbeit mittels qualitativer PCR von E.K. Hainisch auf das Vorhandensein von BPV1- und 2-DNS untersucht worden. Infolgedessen wurde für diese Proben nur mehr eine quantitative PCR für die Ermittlung der Kopien pro Zelle durchgeführt.

Qualitative PCR

Alle Proben waren vor Versuchsbeginn bereits positiv im Rahmen anderer Studien oder in Rahmen einer vorangegangenen Diagnostik, aber unspezifisch auf BPV1/2-DNS getestet worden. Das impliziert, dass die Proben eventuell schon älter waren. Zum genauen Nachweis, ob es sich um eine Infektion mit BPV1, BPV2, oder um eine Doppelinfection handelte, wurde zunächst eine Typ-spezifische Standard-PCR durchgeführt. Amplifikationsprodukte (16µl) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht visualisiert. In diesem Versuch wurde zeitgleich die PCR-Kompatibilität der DNS-Proben überprüft.

Für den Typ-spezifischen Nachweis von BPV1- und BPV2-DNS wurden Primer entworfen und von der Firma Eurofins Genomics (Wien, Österreich) hergestellt. (Tab. 2)

TABELLE 2: TYP SPEZIFISCHE BPV1 UND BPV2 PRIMER

BPV 1	For: 5'-TGCCTTTTCTTCATCTGACTGGTG-3' Rev: 5'-TGGATCCTATTGATGCAAGCGATGAT-3'
BPV 2	For: 5'-CCACTACAAGCCTGGCATCTG-3' Rev: 5'-CGTGCAGTTTGAGGCAGGT-3'

BPV1-Nachweis:

Von der bereits extrahierten DNS wurden jeweils 2 µl zu 18 µl Mastermix hinzugefügt, bestehend aus 1 x HF-Buffer (Thermo Scientific, Wien, Österreich), 1.5 mM MgCl₂, 0,6 µl DMSO, 200 nM dNTPs, jeweils 200 nM Primer (vorwärts und rückwärts) und 0,4 U Phusion Hot Start DNA-Polymerase (Thermo Scientific).

Die Mischungen wurden anschließend zur Amplifikation der DNS in einem Thermocycler (Bioer, Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland) für 5 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen à 95°C für 15 s, 66.1°C für 30 s, 72°C für 30 s und schließlich 5 min bei 72°C inkubiert.

Zur Auswertung wurden ein 1,5 % TAE-Agarosegele (Biozym) mit 0.6 µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) hergestellt, auf welches die amplifizierten Proben zu je 16 µl vermengt mit 4 µl Loading dye (Thermo Scientific) aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte unter einer Spannung von 130 V für die Dauer von 30 Minuten. Zur groben Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte diente eine Gene Ruler 100 bp DNS-Leiter (Thermo Scientific) Die positiven und negativen Kontrollen bestanden aus bereits eindeutig positiv bzw. negativ auf BPV 1/2 getesteten Kuhproben und synthetisch hergestellten BPV1- bzw. BPV2-Plasmiden. Zusätzlich wurde eine Wasserprobe als no template control (ntc) in jedes Experiment inkludiert.

Die Auswertung inklusive Foto-Dokumentation wurde unter UV-Licht (Imager Protein simple, Biozym) durchgeführt.

BPV2-Nachweis:

Die Detektion von BPV2-DNS erfolgte analog zu BPV1-DNS und unterschied sich in der Herstellung des Mastermix nur durch den Einsatz von BPV2-spezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primern.

Für die Amplifikation wurde ein Temperaturprotokoll am Thermocycler eingestellt, bei welchem die Proben 45 Zyklen, bestehend aus 5 Minuten bei 98°C, 30 Sekunden bei 67°C und 72°C für 30 Sekunden durchliefen. Die Auftrennung und Auswertung erfolgte wie für BPV1 beschrieben.

4.2.1. Quantitative Methoden

4.2.1.1. Standards

Für die Herstellung interner Standards als Referenzgrößen wurde jeweils eine 1:4 Verdünnungsreihe für BPV1 und BPV2 bestehend aus TE-Puffer und entsprechenden Plasmiden hergestellt. Die Bestimmung der Ausgangskonzentration der bereits vorliegenden Plasmid-Proben wurde photometrisch durchgeführt. Für die daraus erstellte Verdünnungsreihe errechneten sich somit die Standards mit den folgenden Werten an Kopien pro µl: 1.000.000, 250.000, 62.500, 15.625, 3.096 und 976.

4.2.1.2. Duplex-Assay

Ein Duplex-Assay dient dem simultanen Nachweis von 2 verschiedenen Nukleotidsequenzen. Ein derartiger Assay wurde entsprechend zum gleichzeitigen und quantitativen Nachweis von BPV1- und BPV2-DNS etabliert. Zu diesem Zweck wurden neben Typ-spezifischen Primern auch zwei Typ-spezifische DNS-Sonden erdacht und eingesetzt: Eine FAM -konjugierte für BPV1 und eine HEX-konjugierte für BPV2 (Eurofins).

Die Primer entsprachen jenen der qualitativen PCR. (Tab. 2)

Der Duplex-Mastermix bestand aus 1 x PCR Buffer B2 (Solis BioDyne, Tartu, Estland), 3,5 mM MgCl₂, 200 nM dNTP (beide von Solis BioDyne), 250 nM pro Primer (BPV1 + 2, vorwärts und rückwärts, Eurofins), 200 nM FAM und Hex Sonde (Eurofins) und 1 U Hotfire DNA Polymerase (Solis BioDyne).

4.2.1.3. Evaluierung der Spezifität des Duplex-Assays

Die Ermittlung der Spezifität der selbst designten Assays erfolgte mittels quantitativer PCR.

Auf einer 96 Well-Platte wurden in Triplikaten die Verdünnungsreihen von BPV1 und BPV2 Plasmid dem Schema in Tabelle 3 folgend miteinander vermischt. (Tab. 3) und der PCR in Triplikaten zugeführt. Zusätzlich wurden die Verdünnungsreihen der beiden Standards ebenfalls in Triplikaten mittels Singleplex Assay analysiert. Als "Leerkontrolle" wurde steriles H₂O als Probe verwendet.

Mit der Zugabe von 2 µl Probe zu je 13 µl Duplex Mastermix wurde ein Gesamtvolumen von 15 µl pro Reaktionsbereich erreicht.

Die 96 Well-Platte durchlief, nach kurzer Zentrifugation für 30 Sekunden bei 4.000 rpm, im Thermocycler qTower3G (Analytik Jena, Jena, Deutschland) das folgende Temperatur Programm: 95 °C für 15 Minuten gefolgt von 45 Zyklen à 95°C für 15 Sekunden und 60 °C für 60 Sekunden.

TABELLE 3: PIPETTIERSCHEMA FÜR DEN DUPLEX ASSAY

BPV 1 Plasmid (Kopien/ µl)	10 000	1 000	100	10	1	0	0
	+	+	+	+	+	+	+
BPV 2 Plasmid (Kopien/ µl)	0	1	10	100	1000	10 000	0

4.2.1.4. Digitale PCR

Eine Ermittlung der genauen, absoluten Werte der Standards geschah mittels der Durchführung einer dPCR. Hierfür wurden die Verdünnungen aus den beiden Verdünnungsreihen der Standards ausgewählt, die bei der vorangegangenen qPCR die besten Ergebnisse erzielt hatten.

Für BPV1 stellte jene die 3. Verdünnungsstufe mit einem errechneten Wert von 15.625 Kopien/µl dar und für BPV2 die 2. Verdünnungsstufe mit einem Wert von 62.500 Kopien/µl.

Die dPCR fand auf einem naica® System für Crystal Digital PCR™ (Stilla Technologies, Villejuif, Frankreich) statt. Für die Durchführung wurden 2 Mastermischungen mit den für die BPV-Typen jeweils spezifischen Primern und Sonden (HEX: BPV2, FAM: BPV1) hergestellt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 500 nM und die Sonden in einer Konzentration von 400 nM zu einem Gemisch von 1 x Buffer A (10x) und 4 x Buffer B (beide naica® multiplex PCR MIX 10X; Stilla Technologies) hinzugefügt.

Das Zielvolumen für die 4 Messkammern des Crystal dPCR Sapphire Chips (Stilla Technologies), war 25 µl. Jede BPV-Probe wurde zwei Mal auf den Chip aufgetragen. Einmal in einem Volumen von 3 µl und einmal in einem Volumen von 1 µl mit Supplementierung von 2 µl H₂O.

Das Temperaturprotokoll gestaltete sich wie folgt:

Die Starttemperatur von 95 °C wurde für 3 Minuten gehalten, danach begannen 45 Zyklen à 95°C für 10 Sekunden und 60 °C für 40 Sekunden.

Der technische Hintergrund einer dPCR: "Die Probe wird zunächst durch ein Netzwerk von Mikrokanälen geleitet und in eine große Anordnung einzelner Tröpfchen, auch

"Tröpfchenkristall" genannt, aufgeteilt. Die PCR wird dann auf dem Chip durchgeführt und der Kristall wird abgebildet, um die Tröpfchen zu erkennen, die amplifizierte Targets enthalten. Der letzte Schritt besteht darin, die Anzahl dieser positiven Tröpfchen zu zählen, um die absolute Menge der Nukleinsäuren genau zu bestimmen" (<https://www.medicaexpo.de/prod/stilla-technologies/product-128149-942174.html>)

4.2.1.5. Quantitative PCR

Von den bereits mittels Standard-PCR analysierten Proben wurden die 9 vielversprechendsten ausgewählt. Ausschlaggebend war dabei die subjektive Beurteilung der Stärke und klaren Abgrenzbarkeit der Bande im Kontext der Schwere der Erkrankung. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf einem ausgewogenen Anteil an BPV1- bzw. BPV2-positiven Ergebnissen und nachgewiesenen Doppelinfektionen. Die Proben DER, FRI, HOS, ARI, ELL, FIN, GLO, MAU, RON wurden anhand dieser Kriterien weiterführend mittels quantitativer PCR analysiert.

Diese 9 Proben wurden anschließend auf einer 96 Well Platte mit jeweils einem Volumen von 2 µl im doppelt angesetzten Triplikat jeweils für den BPV1/2 Nachweis pipettiert. Bei dieser qPCR wurde zusätzlich für spätere Umrechnungen der Ergebnisse in Kopien pro Zelle eine 1:4 Verdünnungsreihe equiner LHB-DNS aufgetragen. Das equine Gen für das Luteinisierende Hormon Beta (LHB) ist ein omnipräsenten Gen, das als eine Kopie pro Zelle vorkommt und als qPCR-Referenzgen Anwendung findet.

Die Positiv- und Negativ-Kontrollen bildeten die zuvor quantifizierten Standards für BPV1 und BPV2, als "no-template control" (ntc) diente H₂O.

Die qPCR erforderte die Herstellung von 4 Mastermischungen. Für die 3 Singleplex-Mastermischungen, welche zum Nachweis von BPV1, BPV2 bzw. LHB verwendet wurden, wurden je Mix und Well 1 x PCR Buffer B2 (10 x; Solis Biodyne) mit 3,5 mM MgCl₂ (Solis Biodyne), 0,2 mM dNTP mix (Solis Biodyne), 200 nM indikationsabhängige Vorwärts und Rückwärts Primer und 1 U Hotfire Polymerase (5U, Solis Biodyne) vermengt.

Die FAM-Sonde wurde für den Nachweis von BPV1 und LHB DNS eingesetzt, wohingegen die HEX-Sonde als Detektor für BPV2 DNS fungierte. Die Sonden wurden in einer Konzentration von jeweils 200 nM hinzugefügt.

Für die Auswertung und Amplifikation der Standards wurde der Duplex-Mastermix verwendet. Die Zusammensetzung gleicht der in Punkt „2.1. Spezifitätsevaluierung der Assays“ bereits beschrieben.

Das Gesamtvolumen von 15 µl pro Well setzte sich aus 13 µl Mastermix und 2 µl Template DNS zusammen.

Das Temperaturprogramm war äquivalent zu dem bei Punkt „2.1. Spezifitätsevaluierung der Assays“ bereits angeführten Einstellungen.

Die zuvor mittels Standard-PCR analysierten Warzenproben der 24 Kühe aus Bristol wurden ident zu den Sarkoidproben mittels qPCR analysiert. Aufgrund der höheren Probenanzahl und gleichzeitigen Analyse der 4 LHB-Verdünnungen für späterer Berechnungen wurde ein 2. Durchgang benötigt.

Die Proben wurden gleich wie in Punkt „2. Quantitative PCR“ beschrieben im doppelten Triplikate auf einer 96 Well Platte mit dem jeweiligen Mastermix pipettiert. Die Zusammensetzungen der Mastermixe wurden bereits unter demselben Punkt angeführt.

Die erste 1:4 Verdünnungsstufe vom BPV1- und BPV2-Plasmid bildeten die Positiv- und Negativkontrollen. Als ntc diente wie bisher H₂O.

5. ERGEBNISSE

5.1. Ergebnisse der Plasmid-qPCR

Mittels qPCR der Plasmid-Verdünnungsreihen konnte BPV1-DNS mit einer Effizienz von 0,73 und einem R² Wert von 0,99 amplifiziert werden. Für BPV2-DNS lag die Effizienz bei 0,75 und R²-Wert bei 0,99.

Die Mischungen definierter Konzentrationen von BPV1 und BPV2 lieferten im FAM-Kanal für BPV1 Cycle Threshold (CT)-Werte für eine Konzentration von 10.000 bis 10 Kopien/μl. Bei einer Konzentration von 1 Kopie/μl konnte kein Signal mehr gemessen werden. Der Nachweis von BPV2-DNS gelang von einer Kopien-Anzahl von 10.000 bis einschließlich 100 Kopien pro μl.

Die Standards im Singleplex-Assay lieferten keine falsch positiven Signale. Das BPV 1 Plasmid in einer Konzentration von 10⁶ Kopien/μl erreichte einen CT- Wert von 16,72 und zeigte eine der Verdünnungsreihe folgende aufsteigende Tendenz der CT-Werte. Lediglich die N4-Verdünnungsstufe wies einen niedrigeren CT-Wert auf als die vorangegangene Verdünnungsstufe N3.

Bei BPV 2 wurde ein CT-Wert von 16,08 bei für 10⁶ Kopien/μl generiert. Auch hier wiesen die Werte mit zunehmender Verdünnung einen höheren CT- Wert auf.

Eine Auflistung der Gesamten Ergebnisse sind in Tabelle 4 zu finden.

TABELLE 4: ERGEBNISSE STANDARDS I DUPLEX UND SINGLEPLEX ASSAY

Duplex Assay				Singleplex Assay			
qPCR-Template			BPV1 CT (Fam)	BPV2 CT (Hex)	Plasmid Verdünnungen (1:4)	BPV1 CT	BPV2 CT
BPV 1	+	BPV2					
10.000	+	0	24,73	No CT			
1 000	+	1	28,54	No CT	10 ⁶	16,72	16,08
100	+	10	31,88	No CT	N1	19,5	18,59
10	+	100	37,67	31,16	N2	32,46	20,69
1	+	1000	No CT	27,39	N3	34,85	23
0	+	10.000	No CT	23,71	N4	31,25	25,01
0	+	0	No CT	No CT	N5	35,71	27,56

CT: "Cycle Threshold"

5.2. Digitale PCR (dPCR) der Standards

Aus der Gesamt-Tropfenanzahl (25.000 ± 236) ergaben sich anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals für BPV1-3 μ l, BPV1-1 μ l, BPV2-3 μ l und BPV2-1 μ l jeweils positiv gewertete Tropfen (3.960 ± 119 , 1.771 ± 89 , 9.735 ± 195 , 3.869 ± 116). (Abb. 1, 4)

Für BPV1, gemessen im FAM-Kanal, ergab dies eine durchschnittliche Kopienanzahl pro μ l Probe von 2.761 ± 329 und für BPV2, gemessen im 5'-Modifikation 2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein – Kanal (VIC-Kanal), 7.132 ± 8 Kopien pro μ l Probe. (Tab. 5)

Im Vergleich zu den angenommenen Konzentrationen fielen die tatsächlich ermittelten deutlich geringer aus, wodurch die Konzentrationen der Verdünnungsreihen neu berechnet wurden. (Tab. 6)

TABELLE 5: ERGEBNISSE DPCR

SampleName	Total Number Of Droplets	BPV1			BPV2		
		copies/ μ l	copies/ μ l sample	RelativeUncertainty	copies/ μ l	copies/ μ l sample	RelativeUncertainty
BPV1 3 μ l	25195	291,8	2432	3%	0		inf
BPV1 1 μ l	25349	123,6	3090	5%	0		inf
BPV2 3 μ l	24710	0		inf	854,8	7123	2%
BPV2 1 μ l	25107	0		inf	285,6	7140	3%
			copies/ μ l sample			copies/ μ l sample	
		MW	2761		MW	7132	
		SD	329		SD	8	

Tabelle 5 zeigt das Originalergebnis, das auch relative Unsicherheiten in % sowie arithmetische Mittel und Standardabweichungen für die Kopienanzahlen pro μ l angibt.

TABELLE 6: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER ERWARTENDEN VS. TATSÄCHLICHEN KONZENTRATION

Verdünnungsstufen (1:4)	Konzentrationen laut Photometrie (Kopien/ μ l)	Gemessene BPV1-Kopien/ μ l	Gemessene BPV2-Kopien/ μ l
N1	250.000	44.176	28.528
N2	62.500	11.044	7.132
N3	15.625	2.761	1.783
N4	3.906	690,25	445,75

ABBILDUNG 1: INTENSITÄT DER FLUORESZENZ IM FAM-KANAL FÜR BPV1

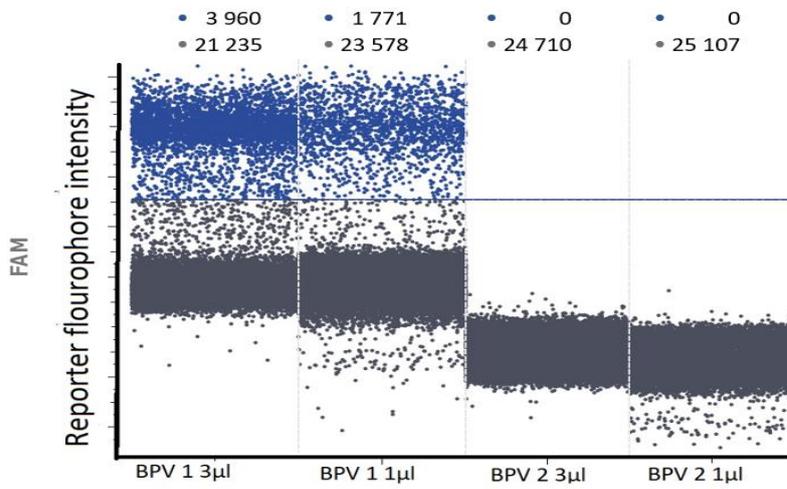


Abbildung 1 stellt die gemessene Fluoreszenzstärke im FAM- Kanal grafisch dar. Der FAM Kanal wurde für den Nachweis von BPV1 verwendet und lieferte keine falsch positiven Ergebnisse. • Anzahl der positiv gewerteten Tropfen / • Anzahl der negativ gewerteten Tropfen

ABBILDUNG 2 TRÖPFCHENKRISTALLE (BPV1 3µl)

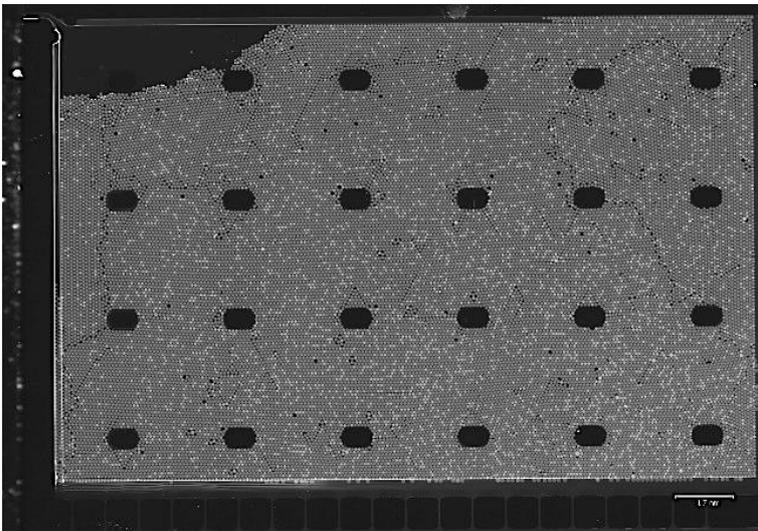


Abbildung 2 zeigt eine Aufnahme des Chips mit den Tröpfchenkristallen für die Probe BPV1 3µl. Die hellen Tropfen enthalten die amplifizierten Targets und werden vom System ausgezählt.

ABBILDUNG 3: TRÖPCHENKRISTALLE (BPV1 1 μ L)

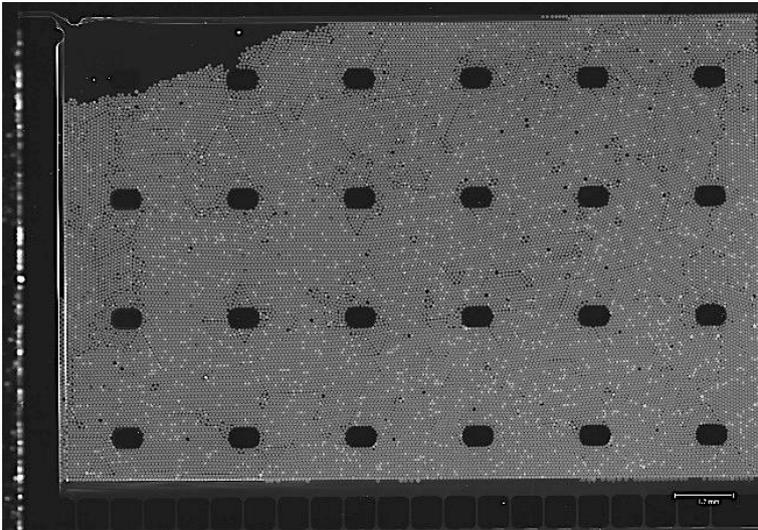


Abbildung 3 zeigt eine Aufnahme des Chips auf dem die Probe BPV1 1 μ L aufgetragen wurde. Die hellen Tropfen enthalten die amplifizierten Targets und sind im Vergleich zur Abbildung 2 in geringerer Anzahl vorhanden.

ABBILDUNG 4: INTENSITÄT DER FLUORESCENZ IM VIC KANAL FÜR BPV2

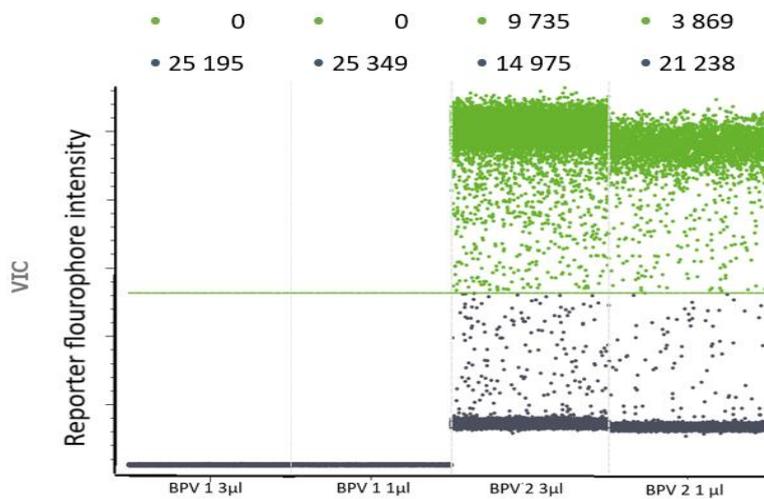


Abbildung 4 stellt die gemessene Fluoreszenzstärke im VIC- Kanal grafisch dar. Der VIC Kanal wurde für den Nachweis von BPV2 verwendet und lieferte keine falsch positiven Ergebnisse. • Anzahl der positiv gewerteten Tropfen / • Anzahl der negativ gewerteten Tropfen.

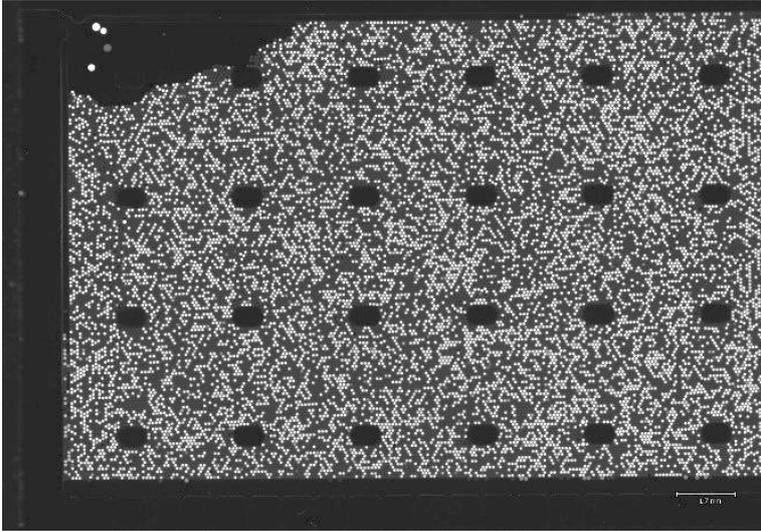
ABBILDUNG 5: KRISTALLTRÖPFCHEN (BPV2 3 μ L)

Abbildung 5 zeigt eine Aufnahme des Chips mit den Tröpfchenkristallen auf dem die Probe BPV2 3 μ l aufgetragen wurde. Die hellen Tropfen enthalten die amplifizierten Targets.

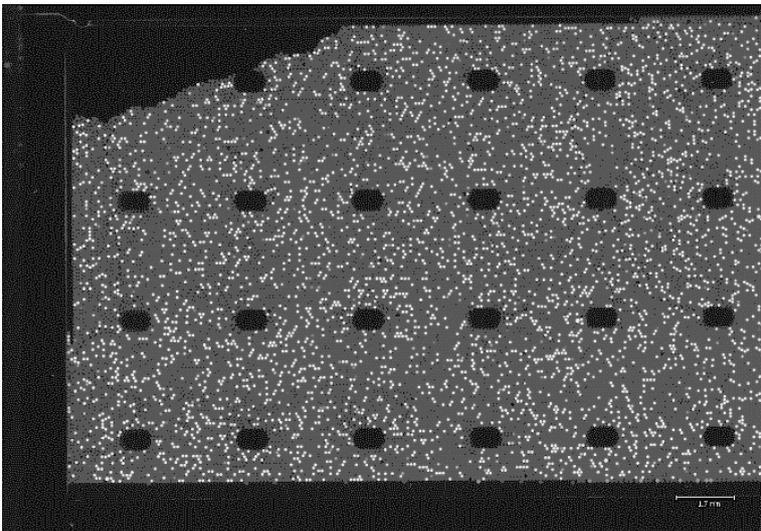
ABBILDUNG 6: KRISTALLTRÖPFCHEN (BPV2 1 μ L)

Abbildung 6 zeigt eine Aufnahme des Chips auf dem die Probe BPV2 1 μ l aufgetragen wurde. Die hellen Tropfen enthalten die amplifizierten Targets und sind im Vergleich zur Abbildung 5 in geringerer Anzahl vorhanden.

5.3. Qualitative PCR und Quantitative PCR der Proben

Die Positivkontrollen für BPV1 und BPV2 bei der qualitativen PCR wiesen im direkten Vergleich mit der DNS-Leiter die erwartete Länge entsprechend der eingesetzten Primerpaare auf. Es wurden jene Proben als positiv gewertet, bei welchen eine eindeutige Bande auf gleicher Höhe wie die Positivkontrollen unter UV- Licht sichtbar war.

Von den ursprünglichen 67 Pferden konnte nur mehr bei insgesamt 51 Pferden BPV1 und/oder BPV2 detektiert werden. Bei 16 Proben konnte keine virale DNS detektiert werden, weshalb diese von weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. (Tab. 1) Von der neuen Gesamtanzahl der Proben ($n = 51$) konnte bei 47 Proben das Vorhandensein von BPV1-DNS und bei 4 Proben BPV2-DNS nachgewiesen werden. Drei der vier BPV2-positiven Proben entstammten Pferden mit hochgradiger Sarkoiderkrankung. Bei zwei der vier Proben wurde in Verbindung mit einer geringgradigen bzw. hochgradigen Erkrankung eine Doppelinfection nachgewiesen.

Der für diese Studie entwickelte qPCR Assay war in der Lage, in nur einem Durchgang einen zeitgleichen Nachweis von BPV1- und BPV2-DNS durchzuführen. Die Werte für R^2 und die Effizienz wurden durch die qPCR von Verdünnungsreihen der BPV1/2-Standards generiert. So wurden folgende Werte für die Amplifikation von BPV1 DNS festgestellt: $R^2 = 0,99$ und Effizienz = $0,75$. Die Amplifikation von BPV 2 DNS wies ein $R^2 = 0,99$ und eine Effizienz = $0,74$ auf.

Die LHB-Amplifikation zeigte im Vergleich eine deutlich höhere Effizienz von $0,96$ bei einem R^2 Wert von $0,99$.

Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn ein CT generiert werden konnte und in der grafischen Darstellung „linear“ und „logarithmisch“ der Kurvenverlauf jenem der Standards entsprach. Somit konnten mögliche signalgebende Artefakte eruiert und als falsch positiv gewertet werden.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die effizienzkorrigierten CT-Werte mit Hilfe der LHB-Werte in Kopien pro Zelle umgerechnet. Im Zuge dieser Bemessungsgrundlage konnte bei der Probe „RON“ mit $698,03$ Kopien/Zelle die meiste BPV1-DNS nachgewiesen werden.

Für BPV2 stellte die Probe „FIN“ mit 59,4 Kopien pro Zelle den höchsten Wert dar. Jene Probe führte gemeinsam mit der Probe ELL zu den einzigen Ergebnissen, die nicht jenen der qualitativen PCR entsprachen. In beiden Fällen konnte mittels qPCR eine geringe Menge an BPV1-DNS nachgewiesen werden, was mittels qualitativer PCR nicht gelang. Somit konnten bei der qPCR insgesamt 3 Doppelinfektionen detektiert werden.

Die Ergebnisse der qualitativen sind gemeinsam mit denen der quantitativen PCR in Tabelle 7 angeführt.

TABELLE 7: ERGEBNISSE QUANTITATIVER & QUALITATIVER PCR DER EQUIDEN PROBEN

Nr.	ID	Kurzbeschreibung der Erkrankung	qualitative PCR		Virale DNS-Kopien/Zelle	
			BPV1	BPV2	BPV1	BPV2
GERINGGRADIGE ERKRANKUNG						
1.	CRW	Singuläres verruköses Sarkoid	J	N	na	na
2.	DAV	Kleines noduläres Sarkoid inmitten eines okkulten	J	J	na	na
3.	DER	Singuläres okkultes Sarkoid	J	N	0,68	0
4.	FED	Ein noduläres und ein okkultes Sarkoid	J	N	na	na
5.	FRI	Okkultes bis verruköses Sarkoid	J	N	1,60	0
6.	FUL	Singuläres noduläres Sarkoid	J	N	na	na
7.	HOS	Okkultes Sarkoid	J	N	0,7	0
8.	KAR	Kleines noduläres Sarkoid	J	N	na	na
9.	LOR	Kleines verruköses Sarkoid	J	N	na	na
10.	MTC	Okkulte Sarkoide	J	N	na	na
11.	SXL	Singuläres okkultes Sarkoid	J	N	na	na
12.	SFL	Kleines singuläres fibroblastisches Sarkoid	J	N	na	na
13.	SUN	Zwei verruköse Sarkoide	J	N	na	na
14.	USA	Okkult-verruköses Sarkoid	J	N	na	na
MITTELGRADIGE ERKRANKUNG						
1.	AVE	Einige noduläre Sarkoide	J	N	na	na
2.	LAI	Einige verruköse Sarkoide	J	N	na	na
3.	SLH	Einige verruköse Sarkoide	J	N	na	na

HOCHGRADIGE ERKRANKUNG						
1.	AMO	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
2.	ANC	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
3.	AND	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
4.	ARI	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	1,04	0
5.	ATH	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
6.	COM	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
7.	CRS	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
8.	EIN	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
9.	ELL	Multiple Sarkoide progressiven Typs + malevolent	N	J	0,01	0,44
10.	EVS	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
11.	FLX	Multiple Sarkoide progressiven Typs	N	N	na	na
12.	FIN	Multiple Sarkoide progressiven Typs	N	J	2,22	59,4
13.	GLO	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	14,91	0
14.	GOL	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
15.	BEG	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
16.	LSV	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
17.	LAT	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
18.	LEO	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
19.	LLY	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
20.	LIV	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
21.	MAN	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
22.	MAU	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	J	1,10	2,3
23.	MAX	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
24.	RAS	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
25.	RON	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	698,03	0
26.	ROS	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
27.	SAM	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
28.	SKY	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
29.	SHA	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
30.	SAL	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na

31.	SYM	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
32.	WIN	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na
33.	ZAC	Multiple Sarkoide progressiven Typs	J	N	na	na

J: ja; N: Nein; na: nicht analysiert

5.4. Qualitative und Quantitative PCR der bovinen Proben

Mit qualitativer PCR wurden BPV1 in Warzen von 10 und BPV2 in Warzen von 6 Kühen nachgewiesen. Acht Proben wurden nicht mittels Standard-PCR analysiert, da sie jeweils vom selben Tier stammten.

Die Auswertungskriterien für die qPCR waren äquivalent zu denen der equiden Proben. (vgl. 5.3 Qualitative PCR und Quantitative PCR-Proben)

Bei der qPCR wurden 23 Proben positiv auf BPV1 getestet. Der niedrigste CT-Wert, nämlich 6,2, wurde für die Probe "Cow 26" erhalten. Die grafische Darstellung zeigt einen parallelen Kurvenverlauf der BPV1 positiven Proben zu denen der BPV1 Standards. (Abb. 7- 10, 15- 18)

Aufgrund der Verwendung von nur je einem Standard für BPV1 und BPV2 wurde die Effizienz durch Analyse der Rohdaten mit Hilfe des Internetprogramms <http://118.190.66.83/miner/> ermittelt. Die generierten Werte für die Effizienz der zwei Durchgänge und für LHB (Effizienz: 0,71; 0,73; LHB: 0,99) wurden für die Berechnung der Kopien pro Zelle verwendet.

Passend zu dem geringen CT-Wert von 6,2 wurden bei "Cow 26" rund 11.913 Kopien pro Kuhwarzenzelle gemessen. Die Werte der bovinen Proben sind in direktem Vergleich zu den Ergebnissen der qualitativen PCR in Tabelle 8 dargestellt.

Für BPV2 konnten zwar Fluoreszenzsignale gemessen werden, jedoch entsprach keines der Kurvenverläufe in der grafischen Darstellung jenen der Standard-Kurven, weshalb die ermittelten CT-Werte als Artefakte gewertet wurden und somit bei keiner der Proben ein eindeutiger Nachweis von BPV2 gelang. (Abb. 11- 14, 19- 22)

Entsprechend zeigt Tabelle 8 keine quantitativen Ergebnisse für BPV2-DNS.

TABELLE 8: ERGEBNISSE QUALITATIVER UND QUANTITATIVER PCR DER BOVINEN PROBEN

ID	Nr. und Ursprung der Warze	Qualitative PCR		BPV1-DNS-Kopien pro Zelle
		BPV1	BPV2	
Cow 1	195 Euter	na	J	774,48
Cow 2	712 Euter	J	N	0,67
Cow 3	153 Euter	J	N	20,51
Cow 4	664 Kopf	na	J	7,20
Cow 5	773 Kopf	na	J	10.377,09
Cow 6	826 Kopf	na	J	2.630,73
Cow 7	664 Euter	na	na	0,26
Cow 8	237 Euter	J	N	0,37
Cow 9	296 Euter	J	N	1.601,05
Cow 10	843 Schulter	J	N	0
Cow 11	101 Euter	J	N	14,97
Cow 13	826 Euter	na	na	3.435,82
Cow 14	734 Euter	J	N	3,10
Cow 15	175 Euter	J	N	1.506,48
Cow 16	954 Euter	na	na	1.038,50
Cow 17	870 Hals	J	N	241,02
Cow 18	296 Kopf	na	na	2.320,88
Cow 19	237 Schwanz	na	na	3.170,11
Cow 20	689 Euter	N	J	2.173,41
Cow 21	954 Bauch	na	na	2.024,21
Cow 22	843 Hals	na	na	1.689,87
Cow 23	90 Hals	N	J	1.372,69
Cow 24	90 Bauch	na	na	6 420,29
Cow 26	298 Bauch	J	N	11 913

J: ja; N: Nein; na: nicht analysiert

ABBILDUNG 7: FAM KANAL STANDARD (BPV1) LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 1-13)

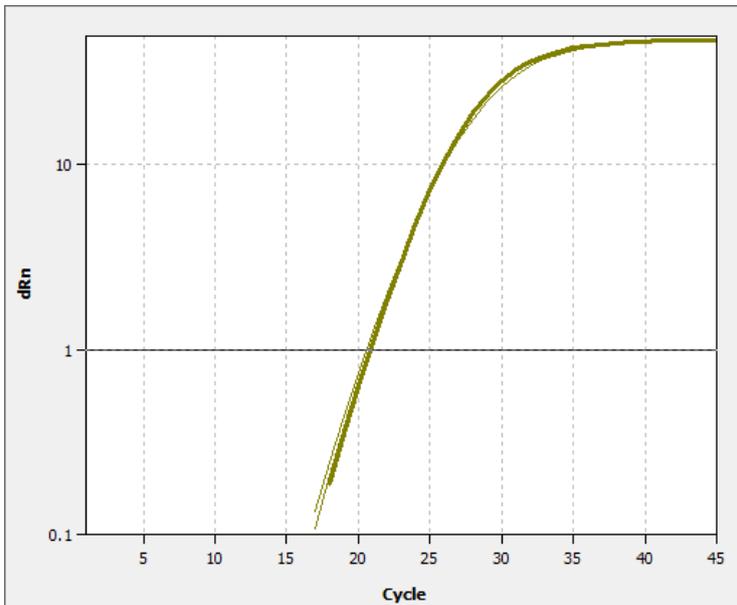


Abbildung 7 zeigt die logarithmische Darstellung des gemessenen Fluoreszenzsignals im Verlauf der Zyklen für die BPV1 Standards bei der Analyse von Kuh 1- 13. Cycle: Anzahl der durchgeführten Zyklen / dRn: Stärke des Fluoreszenzsignals

ABBILDUNG 8: FAM KANAL STANDARD + PROBEN LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 1-13)

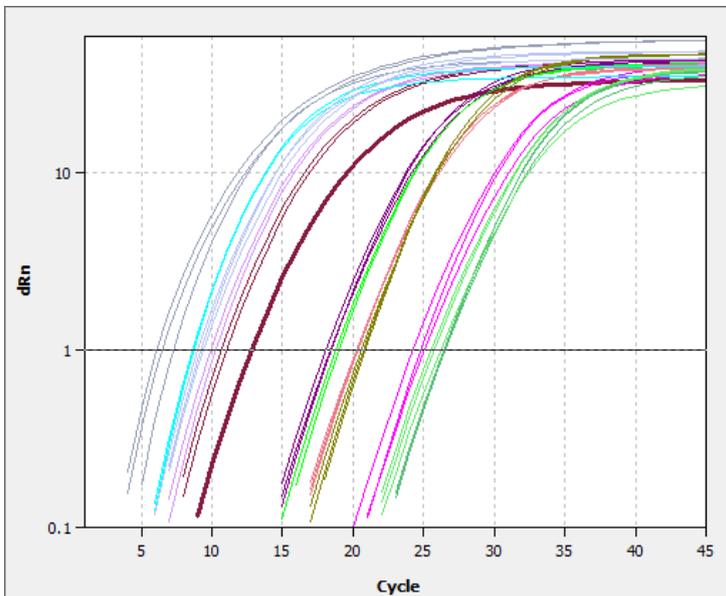


Abbildung 8 zeigt die logarithmische Darstellung des für die Proben Kuh 1- 13 und BPV1 Standard gemessenen Fluoreszenzsignals im Verlauf der Zyklen. BPV1 Standard: Olivgrüne Darstellung (Abb. 8)

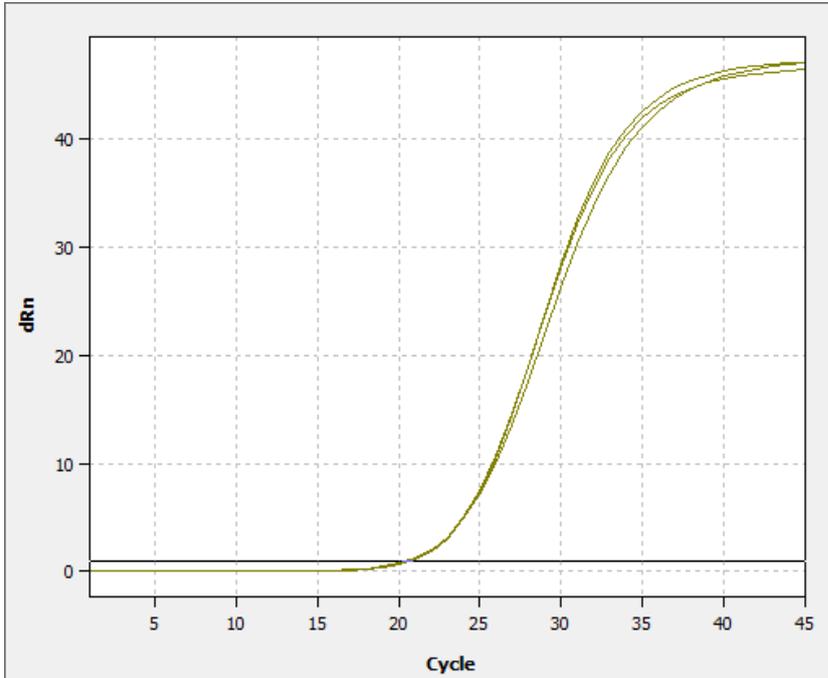
ABBILDUNG 9: FAM KANAL STANDARD (BPV1) LINEARE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 1-13)

Abbildung 9 zeigt die Stärke des Fluoreszenzsignals im Verlauf der Zyklen des BPV1 Standards in linearer Darstellung.

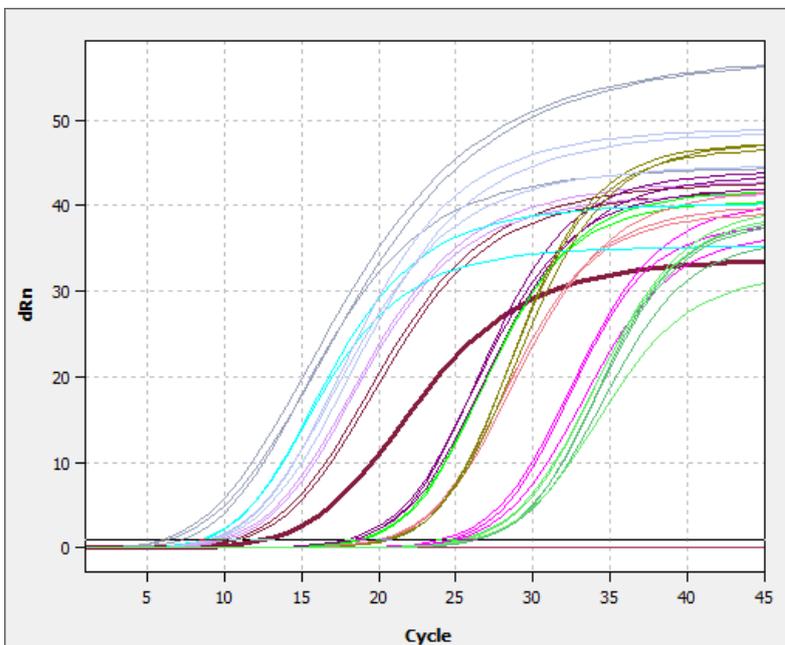
ABBILDUNG 10: FAM KANAL STANDARD + PROBEN LINEARE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 1-13)

Abbildung 10 zeigt die gemessene Fluoreszenzstärke der Proben Kuh 1-13 und BPV1 Standards in linearer Darstellung.

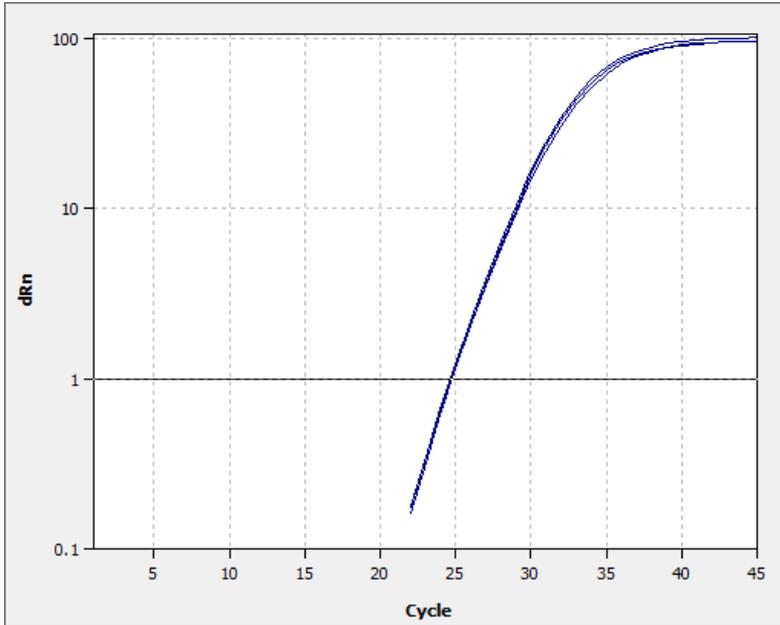
ABBILDUNG 11: HEX KANAL STANDARD (BPV2) LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 1-13)

Abbildung 11 zeigt die Stärke des Fluoreszenzsignals des BPV2 Standards im HEX- Kanal. Die grafische Darstellungsform ist logarithmisch.

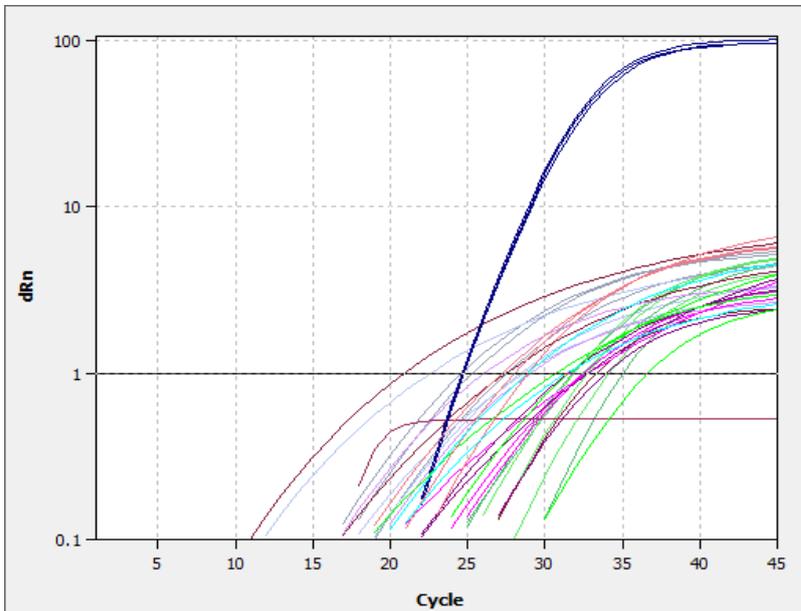
ABBILDUNG 12: HEX KANAL STANDARD (BPV2) LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 1- 13)

Abbildung 12 zeigt die Fluoreszenzsignale der Proben Kuh 1- 13 im Vergleich zu den BPV 2 Standards (dunkelblau). Die grafische Darstellungsform ist logarithmisch.

ABBILDUNG 13: HEX KANAL STANDARD + PROBEN LINEARE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 1-13)

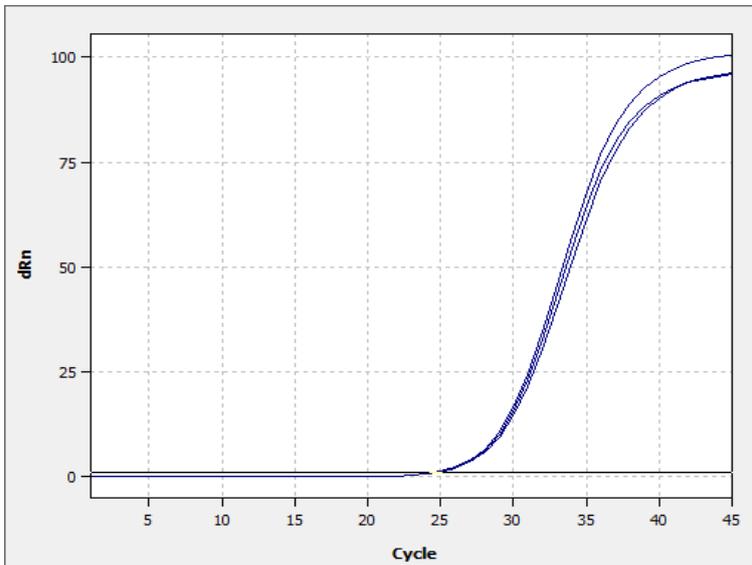


Abbildung 13 zeigt die Stärke des Fluoreszenzsignals des BPV2 Standards im HEX- Kanal. Die grafische Darstellungsform ist linear.

ABBILDUNG 14: HEX KANAL STANDARD + PROBEN LINEARE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 1-13)

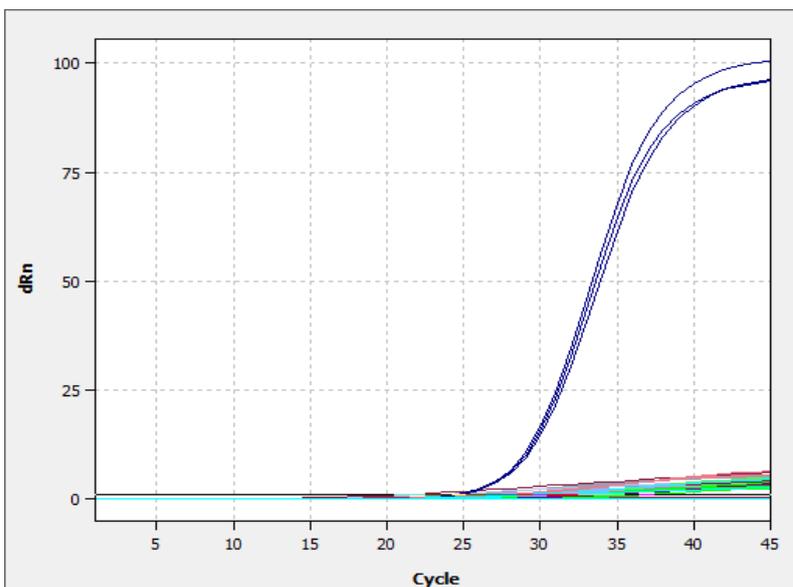


Abbildung 14 zeigt die Fluoreszenzsignale der Proben Kuh 1- 13 im Vergleich zu den BPV 2 Standards (dunkelblau). Die grafische Darstellungsform ist linear und zeigt im Gegensatz zu Abb. 13 eindeutig keinen ähnlichen Kurvenverlauf der Proben zu den Standards.

ABBILDUNG 15: FAM KANAL STANDARD (BPV1) LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 14-26)

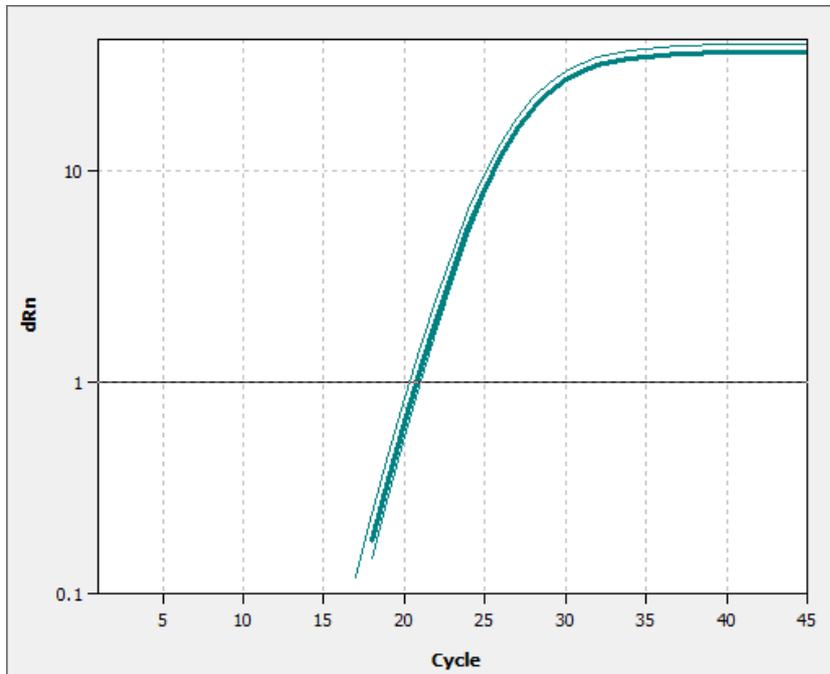


Abbildung 15 zeigt den logarithmischen Kurvenverlauf des Fluoreszenzsignals des BPV1 Standards im FAM Kanal.

ABBILDUNG 16: FAM KANAL STANDARD + PROBEN LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 14-26)

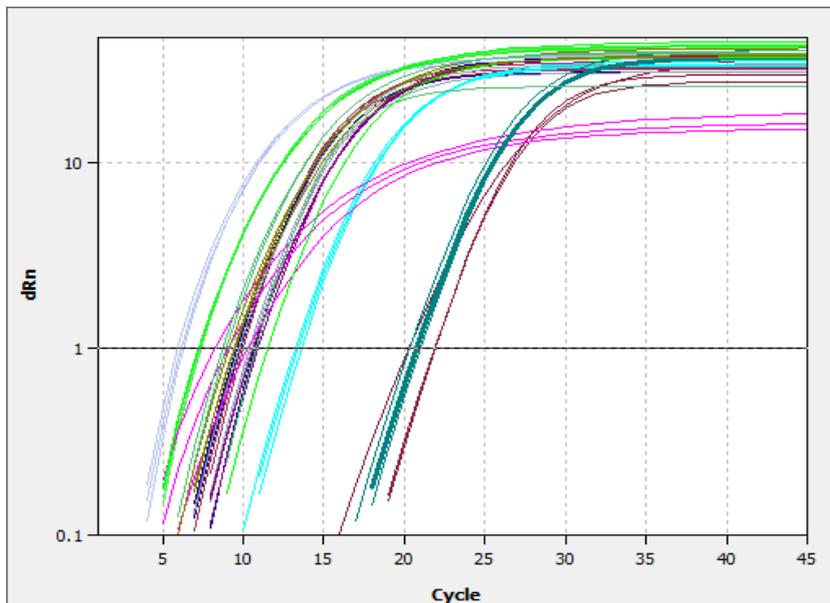


Abbildung 16 zeigt den logarithmischen Kurvenverlauf der Fluoreszenzsignale der Proben Kuh 14-26 und des BPV1 Standards (smaragdgrün) gemessen im FAM Kanal.

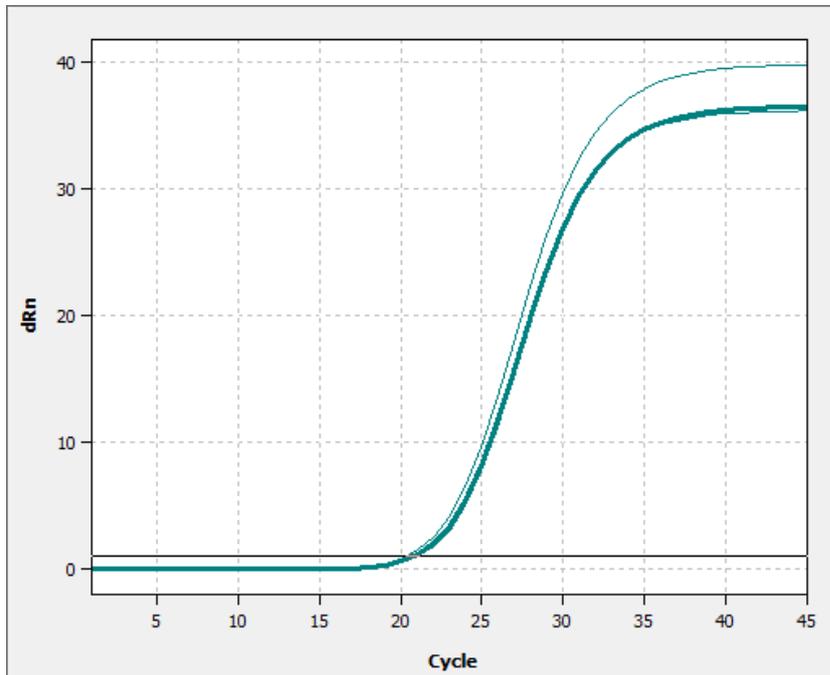
ABBILDUNG 17: FAM KANAL STANDARDS (BPV1) LINEARE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 14- 26)

Abbildung 17 zeigt den linearen Kurvenverlauf des Fluoreszenzsignals des BPV1 Standards im FAM Kanal.

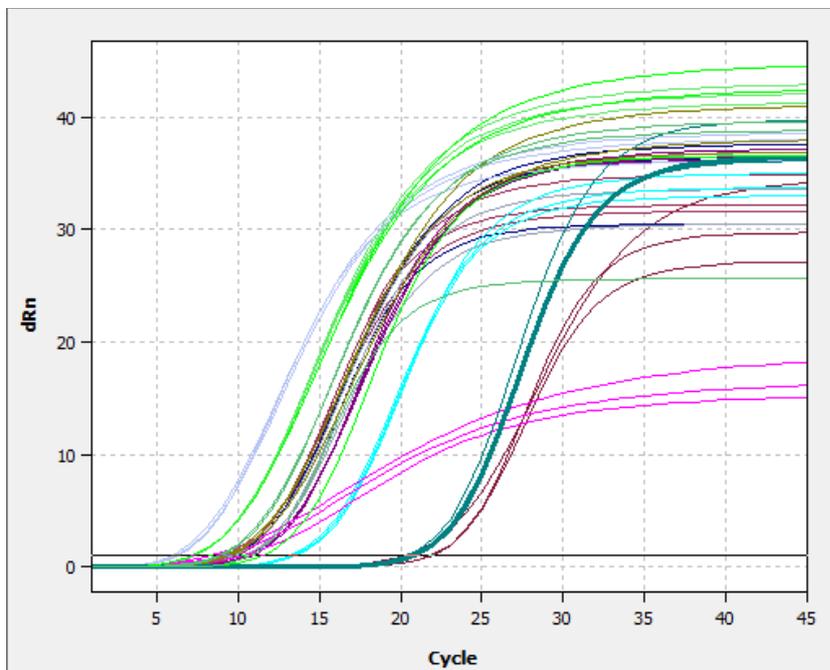
ABBILDUNG 18: FAM KANAL STANDARD + PROBEN LINEARE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 14-26)

Abbildung 18 zeigt den linearen Kurvenverlauf der Fluoreszenzsignale der Proben Kuh 14- 26 und des BPV1 Standards (smaragdgrün) gemessen im FAM Kanal.

ABBILDUNG 19: HEX KANAL STANDARDS (BPV2) LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 14-26)

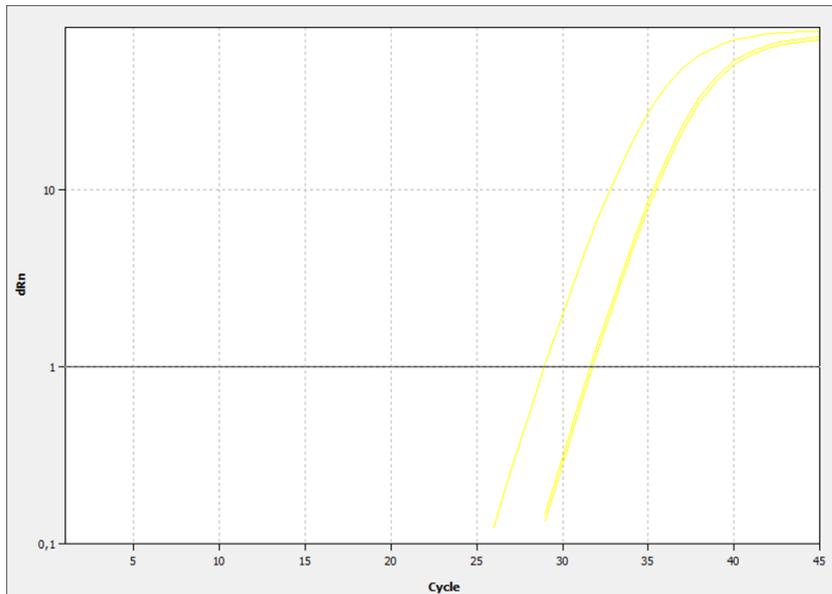


Abbildung 19 zeigt den logarithmischen Kurvenverlauf des Fluoreszenzsignals des BPV2 Standards im HEX Kanal.

ABBILDUNG 20: HEX KANAL (BPV2) STANDARDS + PROBEN LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 14-26)

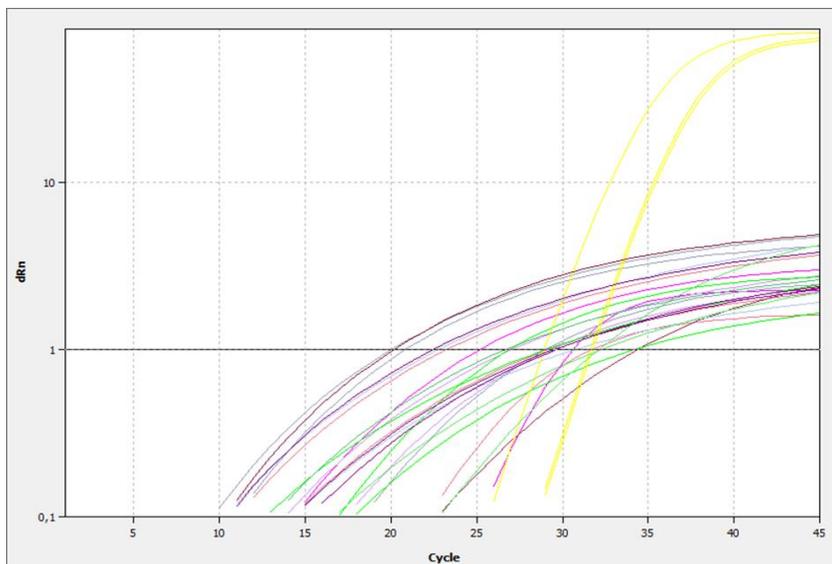


Abbildung 20 zeigt die Stärken der Fluoreszenzsignale der Proben und BPV 2 Standards (gelb) im Hex Kanal in logarithmischer Darstellungsform.

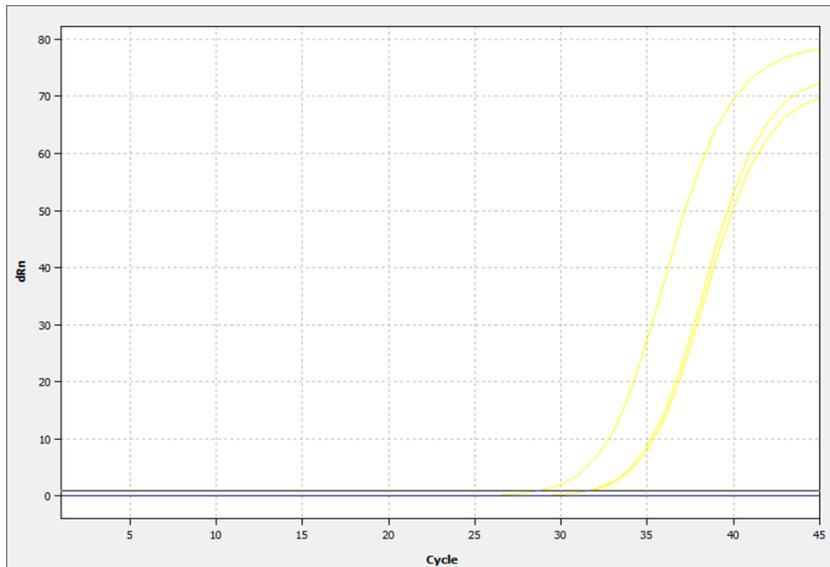
ABBILDUNG 21: HEX KANAL STANDARD (BPV2) LINEARE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 14-26)

Abbildung 21 zeigt die lineare grafische Darstellung des Fluoreszenzsignals der BPV 2 Standards gemessen im Hex Kanal.

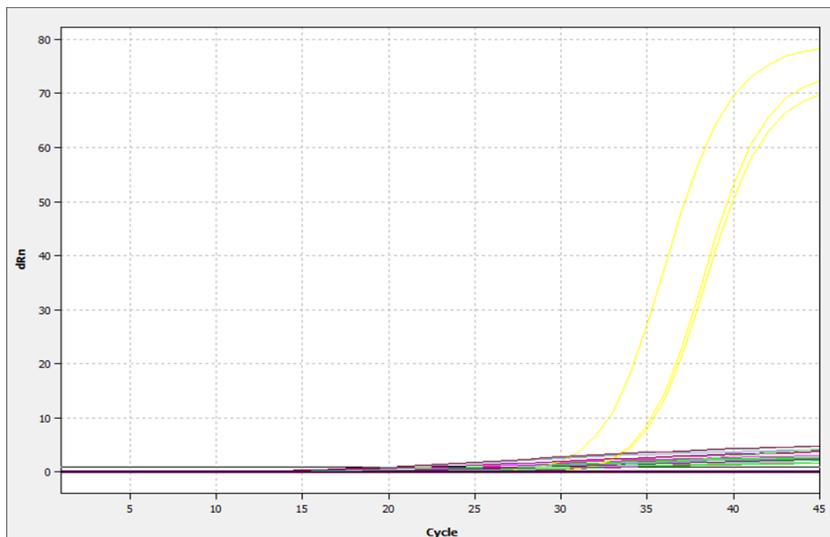
ABBILDUNG 22: HEX KANAL (BPV2) STANDARDS+ PROBEN LINEARE DARSTELLUNG (DURCHGANG KUH 14-26)

Abbildung 22 zeigt die gemessenen Fluoreszenzsignale der Proben Kuh 14- 16 und der BPV2 Standards (gelb) im Hex Kanal. Die Darstellungsform ist linear. Keine der Proben weist ein BPV2 positives Signal auf.

6. DISKUSSION

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Doppelinfektionen bei an Sarkoiden erkrankten Equiden im europäischen Raum möglich sind. Obwohl das zeitgleiche Vorkommen von BPV1 und BPV2 in jenen Hauttumoren bereits in anderen Studien in Form von Zufallsergebnissen beschrieben wurden, so stellt diese Studie nicht nur den erstmaligen Nachweis von Koinfektionen in Mitteleuropa dar, sondern auch den ersten gezielten Nachweis im Kontext der Schwere der Erkrankung. (152, 234)

Der Grund für die geringe Forschung in diesem Bereich könnte in der regional unterschiedlichen viralen Ursache für Sarkoide liegen (BPV1 versus BPV2), wodurch ein global standardisiertes Testverfahren bisher nicht etabliert werden konnte. Insbesondere lassen sich in vorangegangenen Forschungen verschiedene Methoden in der Amplifikation von PV-DNS beobachten. Zumeist wurden Primer verwendet, die zwar theoretisch in der Lage waren, BPV1 und BPV2 zu amplifizieren, jedoch faktisch nur den jeweils vorherrschenden Typ in der Probe detektierten. (150, 157) Alternativ wurden auch Konsens-PCR-Primer verwendet, die eine Bestimmung des amplifizierten PV-Typs erst durch Sequenzierung zugelassen haben. (235) Keine der eben erwähnten Methoden würde sich zur eindeutigen Detektion von Doppelinfektionen eignen, da mit vermehrt falsch negativen Ergebnissen zu rechnen wäre. Grund für die schlechte Spezifität wäre etwa das Ungleichgewicht in der Verteilung der Virusmenge beider Typen. Regionsabhängig ist entweder BPV1 oder BPV2 vorherrschend und würde das zeitgleiche Vorhandensein der geringeren Viruslast des anderen Typen verschleiern. (234) Die Verwendung von typspezifischen Primern für BPV1 und BPV2 garantierte in dieser Arbeit einen Nachweis auch von geringen Mengen von PV-DNS. Die Nukleotid-Sequenz der designten Primer unterschied sich von denen einer Forschergruppe aus Neuseeland, die 2021 erstmals gezielt spezifische Primer für den Nachweis von BPV-DNS in einer großen Probenanzahl einsetzten. (234) Unter Berücksichtigung der geografischen Mutationsvarianten der BPVs könnten mit weiteren Forschungen eventuell universell einsetzbare typspezifische BPV-Primer hergestellt werden, was zu einem global standardisierten einsetzbaren Testverfahren für Sarkoide und der damit verbundenen besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf internationaler Ebene führen könnte.

Durch unsere Vorgehensweise bei der Auswahl der Sarkoidproben können wir keine Rückschlüsse auf etwaige Prädispositionen der Sarkoidausbildung in Bezug auf Alter, Geschlecht

oder Rasse ziehen. Der Ausschluss von den 17 Proben, bei welcher keine DNS mehr bei der qualitativen PCR detektiert werden konnte, ist vermutlich auf das Alter bzw. auf das mehrfache Auftauen, Verwenden und Einfrieren der Proben zurückzuführen, da bei der Auswahl keine Rücksicht auf das Datum der Entnahme und die mehrfache Verwendung der Proben genommen wurde. Da es sich bei dieser Arbeit vorwiegend um Grundlagenforschung handelt, ist die Verwendung von älteren Proben in unseren Augen vertretbar. Zur genauen Erfassung der aktuellen epidemiologischen Lage in Bezug auf Doppelinfektionen in Mitteleuropa sollten aufgrund der steigenden Zahlen der grenzüberschreitenden Transporte von Pferden durch Turniere, Verkäufe o.ä., frische Proben mit genauerer Vorgeschichte zur Analyse herangezogen werden.

Die Validierung der quantitativen PCR bzw. der typspezifischen Primer wurde auf Basis von Standard-Verdünnungsreihen von BPV1- und 2-Plasmid-DNS durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass dieses Testverfahren eine hohe Sensitivität bietet. Es wurden keine falsch positiven Werte erhalten, was die Funktionalität der BPV-typspezifischen Primer bestätigt. Die Spezifität der Primer konnte äußerst zuverlässig mittels des Duplex-Assays ermittelt werden und die Authentizität der Ergebnisse wurde durch die inkludierten Positiv-, Negativ- und Wasserkontrollen zusätzlich verifiziert.

Das Screening der Sarkoidproben mittels quantitativer PCR lieferte der Epidemiologie des mitteleuropäischen Raums entsprechend überwiegend BPV1-positive Ergebnisse. Die drei der insgesamt vier BPV2-positiven Proben waren der Kategorie „hochgradige Erkrankung“ zugeordnet. Ein alleiniges Vorkommen von BPV2-positiven Proben konnte nur bei der qualitativen PCR festgestellt werden. Jene Ergebnisse wurden jedoch durch die quantitative PCR nicht bestätigt, da bei den Proben ELL und FIN auch BPV1 in geringen Mengen nachweisbar war. Dies legt die Vermutung nahe, dass die quantitative PCR eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der qualitativen PCR zumindest in Bezug auf BPV1 aufweist. Der Verdacht wird dadurch erhärtet, dass bei der quantitativen PCR der Standards (siehe Tabelle 4) für BPV1 ein messbares Signal ab 10 Kopien/ μ l und für BPV2 ab 100 Kopien/ μ l generiert werden konnte. Das Ergebnis ist unter Berücksichtigung der höheren Effizienz für den BPV2- Assay (Eff = 0,75) als für BPV1 (Eff = 0,73) überraschend. Ein möglicher Grund für die um den Faktor 10 differierende Empfindlichkeit der beiden Typen könnte in der fehlerhaften Annahme der Konzentrationen liegen, die später durch die digitale PCR korrigiert wurden. Auch könnte dieser Unterschied das Resultat der Durchführung jener quantitativen PCR durch die ungeübte Hand der Autorin dieser Arbeit sein. Ein weiterer Grund könnte der biologische Proben-Hintergrund sein.

Für die Plasmide war dies steriles Wasser, für BPV-DNS in Sarkoiden/Kuhwarzen jedoch equine bzw. bovine DNS. Aus diesem Grund lassen sich die mit Plasmiden erzielten Detektionsgrenzen nicht ohne weiteres auf natürliches Probenmaterial umlegen. Auch das verwendete PCR-System kann erheblichen Einfluss auf die jeweilige Sensitivität haben. Während die qualitative PCR mit dem Phusion Hot Start-System durchgeführt wurde, wurden zur Durchführung der quantitativen PCR Reagenzien von Solis BioDyne verwendet. Letztere könnten durchaus für die höhere Sensitivität des Tests verantwortlich sein. Diese Möglichkeit wird auch dadurch unterfüttert, dass qualitative BPV1 PCRs, die mit einem optimierten Taq-Polymerase-System durchgeführt wurden, eine Detektionsgrenze von < 1 BPV1-DNS-Kopie erzielten (168, 171) und quantitative PCR-Methoden wiederum überlegen waren. (236)

Weiters wird anhand des Wertes für die Effizienz deutlich, dass der quantitative PCR Assay noch weiterer Entwicklung bedarf, um unter dem Aspekt der allgemeinen Standards der heutigen Forschung verwertbare Ergebnisse liefern zu können bzw. um sich als standardisierte Testmethode für Sarkoide durchzusetzen.

Wie bereits erwähnt wurde ein Großteil der Koinfektionen in der Kategorie „schwere Erkrankung“ detektiert. Im Kontext der Gesamtanzahl ($n = 33$) aller dieser Kategorie angehörigen Proben ergibt dies eine administrative Prävalenz von 9,09 %. Da nicht alle Sarkoidproben mittels quantitativer PCR analysiert wurden, ist der Wert der wahren Prävalenz nicht eindeutig ermittelbar. Es ist aber aufgrund der oben bewiesenen erhöhten Empfindlichkeit des Testverfahrens denkbar, dass weitere Doppelinfektionen nachgewiesen werden könnten.

Im Kontext der Ausbildung von Sarkoiden betrachtet lassen die in dieser Arbeit nachgewiesenen Doppelinfektionen die Schlussfolgerung zu, dass sowohl BPV1 als auch BPV2 an der Entwicklung jener Hauttumoren beteiligt sind. Jedoch ist diese Aussage nicht pauschal anwendbar. Bei genauer Betrachtung der Anzahl der Kopien pro Zelle und der jeweiligen Verteilung auf die BPV-Typen erscheint es z.B. im Fall von ELL unwahrscheinlich, dass 0,01 Kopien von BPV1 DNS pro Zelle maßgeblich an der Entwicklung von Sarkoiden beteiligt sind. In diesem Fall erscheint es wahrscheinlicher, dass der kopienmäßig dominant vorkommende BPV-Typ die Pathologie verursacht und der zusätzliche BPV-Typ eine geringere ätiologische Rolle spielt.

Die Möglichkeit, dass beide BPV-Typen an der Entwicklung von Sarkoiden beteiligt sind, ist bei den Proben MAU und FIN aufgrund der deutlich höheren Viruslast wahrscheinlicher als bei

der Probe ELL. Obwohl in diesen beiden Proben ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den in dieser Arbeit generierten Kopienanzahlen von BPV1 und BPV2 besteht, so ist eine gemeinsame Beteiligung am Krankheitsprozess aufgrund der erhaltenen Daten nicht auszuschließen. Außerdem muss klar sein, dass die für ein kleines Tumoraliquot ermittelten Kopienanzahlen nicht auf den gesamten Tumor umlegbar sind. Bei einer Doppelinfection ist gut vorstellbar, dass in einzelnen Tumorkompartimenten BPV1-, oder aber BPV2-DNS überwiegt. Auf der anderen Seite hat die Gruppe von Prof. Lubna Nasir gezeigt, dass möglicherweise pferdespezifische Mutationen vor allem im BPV1-E5-Gen eine Form der Anpassung an den equinen Wirt darstellen und mit vermehrter Transkription einhergehen. (160) Sofern eine ähnliche Anpassung bei BPV2 zumindest in Nord- und Mitteleuropa - dem Verbreitungsgebiet von BPV1 - nicht stattgefunden hat, hätte BPV1 möglicherweise einen biologischen Vorteil gegenüber BPV2 im Pferd.

Ein Teil der Pferde, von denen die Proben entnommen wurden, nahmen zu einem späteren Zeitpunkt an der Studie „*Influenza virus vector iNS1 expressing bovine papillomavirus 1 (BPV1) antigens efficiently induces tumour regression in equine sarcoid patients*“ (230) teil. Dies inkludierte auch die Probe DAV, die einzige Doppelinfection aus der Kategorie „geringgradige Erkrankung“. Das Krankheitsbild von DAV zeigte nach Verabreichung des in der Studie von 2021 verwendeten modifizierten Influenzavirus eine komplette Remission der Sarkoide. Das Ergebnis der qualitativ bestätigten Doppelinfection in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Studie, die vereinfacht gesagt eine Immunantwort gegen die Infektion hervorrief und damit eine Remission der Sarkoide induzierte, könnte hinweisend auf eine potenzielle Wirksamkeit bei BPV1 und BPV2 Infektionen sein. Dem entgegengesetzt stellt die Probe FIN einen gewissen Widerspruch zu dieser Theorie dar. Das Pferd, von dem die Probe entnommen wurde, sprach auf die Immuntherapie nicht an und zeigte nach 6 Monaten eine Progression der Sarkoide. Ausgehend von der erhöhten BPV2-DNS-Last in diesem Fall, würde es gegen einen therapeutischen Effekt in der Behandlung von BPV2 induzierten Sarkoiden sprechen. Sofern sich die Methode des spezifischen Nachweises des BPV-Typs etabliert, ist in Zukunft mit weiteren Informationen bezüglich des Wirkspektrums der innovativen Vakzine zu rechnen. (230)

Der misslungene Nachweis von BPV2 DNS in den Kuhwarzen durch quantitative PCR resultierte möglicherweise aus der Verwendung von anderen Primern als bei der qualitativen PCR. Auch besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dem Auslöser der Kuhwarzen um eine rinder-spezifische BPV-Variante handelt, die nicht 100% ident mit den verwendeten Primern dieser

Arbeit ist. Die unvollständige Durchführung der qualitativen PCR erschwert die Vergleichbarkeit mit den quantitativen PCR-Ergebnissen und lässt zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Aussagen zu.

Zusammengefasst lässt sich bezugnehmend auf die Assoziation zwischen Doppelinfection und schwerem Krankheitsverlauf sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit einen ersten Hinweis auf ein möglicherweise gehäuftes Auftreten von BPV1 und BPV2 bei schweren Krankheitsverläufen liefert. Die Anzahl der Proben war allerdings zu klein, um einen pauschal anwendbaren Grundsatz zu definieren. Unsere Ergebnisse deuten dennoch darauf hin, dass eine Koinfektion eventuell ein erhöhtes Risiko in der Ausbildung eines schweren Krankheitsverlaufes mit sich bringen könnte.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Equine Sarkoide sind die häufigsten Hauttumoren bei Pferden und werden durch eine Infektion mit BPV1 und/oder BPV2 ausgelöst. Vorangegangene Studien haben eine geografische Prävalenz in Bezug auf den vorherrschenden BPV-Typ gezeigt. Der Verlauf der Erkrankung ist variabel und reicht von einzelnen kleinen schuppigen Bereichen bis hin zu großflächigen Hautveränderungen mit progressivem Charakter. Auch wenn die Ätiologie der Sarkoide bereits bekannt ist, so sind wichtige Faktoren für die Entwicklung einer effektiven Therapie und Prophylaxe, wie z.B. die Übertragung der Viren, Lebenszyklus etc., bis heute teils ungeklärt. Die bisherige Forschung befasste sich aufgrund der großen genetischen Ähnlichkeit von BPV1 und BPV2 bislang nur mit dem Nachweis von einem der beiden Typen. Die dabei verwendeten Methoden lassen die Vermutung zu, dass das zeitgleiche Vorkommen des anderen BPV-Typs verschleiert wurde. Eine zeitgleiche Infektion mit BPV1 und BPV2 wurde zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit nur einmal als Zufallsergebnis beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war einerseits ein geeignetes Testverfahren für den spezifischen Nachweis der beiden Typen zu generieren und andererseits, bei erfolgreicher Detektion von Doppelinfektionen, jene im Kontext des Krankheitsverlaufes auf Kausalitätszusammenhänge zu analysieren.

Dafür wurden von 67 Pferden Proben von Sarkoidgewebe ausgewählt und zu drei Schweregrade des Krankheitsverlaufes (geringgradig, mittelgradig, hochgradig) zugeordnet. Jede Probe wurde unter dem Einsatz von BPV-typspezifischen Primern mittels qualitativer PCR getestet. Neun Sarkoidproben wurden anschließend mittels quantitativer PCR analysiert. Zur Validierung des Testsystems wurde eine zusätzliche quantitative PCR der Plasmid-Standards und eine digitale PCR zur Ermittlung der genauen Konzentration dieser Standards durchgeführt. Bei der quantitativen PCR wurden zur Berechnung der BPV-DNS Kopien pro Zelle zeitgleich auf equines LHB getestet.

Die Proben der Kühe aus Bristol wurden bereits zuvor mittels qualitativer PCR getestet und in dieser Arbeit nur mit quantitativer PCR auf das Vorhandensein von BPV 1/2 DNS untersucht.

Bei den Kühen konnte nur BPV1 DNS mittels quantitativer PCR nachgewiesen werden. Für BPV2 konnten zwar Signale generiert werden, jedoch zeigten sie bei der grafischen Analyse keine Ähnlichkeit zum Verlauf der Standards.

Bei den Sarkoidproben konnten mittels qualitativer PCR insgesamt zwei Doppelinfektionen nachgewiesen werden, die den Kategorien "geringgradige -" bzw. "hochgradige Erkrankung" zugeordnet werden konnten. Zwei weitere Proben wiesen eine BPV2-Infektion auf. Mittels quantitativer PCR wurde das simultane Vorhandensein von BPV1- und BPV2-DNS bei den zwei Proben bestätigt und lieferte zusätzlich den Nachweis auf zwei weitere Doppelinfektionen, die mittels qualitativer PCR nicht erkannt wurden. Insgesamt konnten mit der quantitativen PCR vier Koinfektionen detektiert werden, wobei drei davon mit einem schweren Krankheitsverlauf korrelierten. Somit lieferte diese Studie erstmalig den Nachweis für einen möglicherweise prognostischen Parameter in Bezug auf den Krankheitsverlauf. Die ermittelte unterschiedliche Verteilung der Viruslast lässt eine Vielzahl von Vermutungen zur Beteiligung der einzelnen Virustypen am Krankheitsprozess zu und könnte ein vielversprechendes zukünftiges Forschungsgebiet sein.

8. SUMMARY

The equine sarcoid is the most common skin tumor in horses and is induced by infection with BPV1 and/or BPV2. Previous studies have shown that there is a geographical prevalence in relation to the dominant BPV-type. The course of the disease is variable and ranges from single small scaly areas to extensive skin changes with progressive character. Although the etiology of sarcoids is already known, important information needed for the development of effective therapeutics and prophylactic vaccines, such as the transmission of the viruses, their exact life cycle in horses, etc., are still lacking. Due to the high genetic similarity of BPV1 and BPV2, the current research has only focused on the detection of one of the two types. The methods used so far allow the assumption, that the simultaneous occurrence of the other BPV type has remained concealed. At the time of writing, a simultaneous infection of sarcoid-affected horses with BPV1 and BPV2 has only been described once as a random result.

The aim of this work was on the one hand to generate a highly sensitive PCR-based procedure for the specific and simultaneous quantitative detection of BPV1 and BPV2, and on the other hand, in the case of successful detection of double infections, to analyze these in relation to severity of sarcoid disease.

For this purpose, samples of sarcoid tissue from 67 horses were selected and assigned to three severity levels of disease progression (low-grade, intermediate-grade, high-grade). Each sample was tested by qualitative PCR using BPV type-specific primers. Nine sarcoid samples were subsequently analyzed by quantitative PCR. Additional quantitative PCR of the plasmid standards and digital PCR to determine the exact concentration of these standards were performed to validate the test system. In quantitative PCR, equine LHB was tested simultaneously to calculate BPV DNA copies per cell.

The samples from the Bristol cows were previously tested by qualitative BPV1/2 PCR and thus only analyzed by quantitative PCR for the presence of BPV 1/2 DNA in this work.

Only BPV1 DNA could be detected in the bovine warts by quantitative PCR. For BPV2, signals were obtained but didn't yield a clearly positive result, as revealed by curve analyses.

In sarcoids, a total of two double infections were detected by qualitative PCR and could be assigned to the categories "mild disease" and "severe disease". Two further samples tested

exclusively BPV2-positive by this method. Quantitative PCR confirmed the simultaneous presence of BPV1 and BPV2 DNS in the two samples mentioned above and also provided evidence of two additional double infections that were not detectable by qualitative PCR. In total, four coinfections were detected by quantitative PCR, with 3/4 coinciding with severe disease. This is the first study providing evidence of BPV1/2 coinfection possibly constituting a prognostic parameter in sarcoid disease. The different distribution of respective viral DNA loads in coinfecting sarcoids gives rise to a variety of speculations regarding the involvement of the individual BPV types in disease development and progression. Hence, further research should be conducted in this field.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU.....	Five-fluorouracil
BCG.....	Bacillus Calmette Guerin Vakzin
BPV.....	Bovine Papillomviren
BRD4.....	Bromodomain containing Protein 4
CIN.....	Cervikale intraepitheliale Neoplasie
CT.....	Cycle Threshold
deINS.....	Influenzaviren mit deletiertem C terminalen Teil des nicht StrukturGens 1
DNS.....	Desoxyribonucleinsäure
dPCR.....	digitale PCR
E.....	early gene / Protein of the early gene
hrHPV.....	hochriskantes Humanes Papillomvirus, high risk HPV
IC/PCR.....	Immunocapture- PCR
IFN.....	infektionsinduzierte Interferon
iNS1.....	partielle NS1-Deletion
L.....	late gene / Protein of the late gene
LCR.....	Long control region
lrHPV.....	low risk HPV
MAP.....	Mitogen- aktivierten- Proteinkinase
MHC 1.....	major histocompatibility complex class 1
ntc.....	no-template control
PCR.....	Polymerase chain reaction
PDGF β	Platelet Derived Growth Factor β
PV.....	Papillomviren
qPCR.....	quantitativer PCR
RGO.....	Research Group Oncology
ROPV.....	rabbit oral papilloma Virus
VIC-Kanal.....	5`-Modifikation 2`-Chloro-7`-phenyl1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein – Kanal
VLPs.....	Virus- like- particles

10. LITERATURVERZEICHNIS

Literatur

1. Shope RE, Hurst EW. INFECTIOUS PAPILLOMATOSIS OF RABBITS : WITH A NOTE ON THE HISTO-PATHOLOGY. *J Exp Med* 1933; 58(5):607–24. doi: 10.1084/jem.58.5.607.
2. Nih/niid/ocicb/bcbb. PaVE: The Papillomavirus Episteme; 2023 [Stand: 19.01.2023]. Verfügbar unter: <https://pave.niaid.nih.gov/about>.
3. Campo MS. Papillomavirus and disease in humans and animals. *Vet Comp Oncol* 2003; 1(1):3–14. doi: 10.1046/j.1476-5829.2003.00001.x.
4. zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology* 2009; 392(1):1–10. doi: 10.1016/j.virol.2009.06.001.
5. Smith KT, Patel KR, Campo MS. Papillomavirus research: a growth area. *Microbiol Sci* 1984; 1(1):5–8.
6. Broström H, Bredberg-Rådén U, England J, Obel N, Perlmann P. Cell-mediated immunity in horses with sarcoid tumors against sarcoid cells in vitro. *Am J Vet Res* 1979; 40(12):1701–6.
7. Torrontegui BO, Reid S. Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Veterinary Education* 1994; 6(2):85–8. doi: 10.1111/j.2042-3292.1994.tb01098.x.
8. 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.
9. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 2002; 21(18):4754–62. doi: 10.1093/emboj/cdf494.
10. Doorbar J, Medcalf E, Napthine S. Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo. *Virology* 1996; 218(1):114–26. doi: 10.1006/viro.1996.0171.
11. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248(4951):76–9. doi: 10.1126/science.2157286.
12. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243(4893):934–7. doi: 10.1126/science.2537532.
13. Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K, Bubb V et al. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. *Nature* 1991; 352(6333):347–9. doi: 10.1038/352347a0.
14. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20(54):7874–87. doi: 10.1038/sj.onc.1204869.

15. Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20(54):7888–98. doi: 10.1038/sj.onc.1204860.
16. Venuti A, Campo M. The E5 protein of papillomaviruses. In: McCance DJ, Hrsg. *Human papilloma viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2002. S. 143–64 (Perspectives in Medical Virology; v. 8).
17. O'Brien PM, Saveria Campo M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res* 2002; 88(1-2):103–17. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00123-5.
18. Campo MS, O'Neil BW, Grindlay GJ, Curtis F, Knowles G, Chandrachud L. A peptide encoding a B-cell epitope from the N-terminus of the capsid protein L2 of bovine papillomavirus-4 prevents disease. *Virology* 1997; 234(2):261–6. Verfügbar unter: <https://pub-med.ncbi.nlm.nih.gov/9268157/>.
19. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(9):5810–22. doi: 10.1074/jbc.274.9.5810.
20. McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* 1999; 261(2):271–9. doi: 10.1006/viro.1999.9825.
21. Patterson NA, Smith JL, Ozburn MA. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J Virol* 2005; 79(11):6838–47. doi: 10.1128/JVI.79.11.6838-6847.2005.
22. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 2003; 77(24):13125–35. doi: 10.1128/JVI.77.24.13125-13135.2003.
23. Peh WL, Middleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K et al. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol* 2002; 76(20):10401–16. doi: 10.1128/jvi.76.20.10401-10416.2002.
24. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathogens* 2009; 5(2):e1000318. doi: 10.1371/journal.ppat.1000318.
25. Parish JL, Bean AM, Park RB, Androphy EJ. ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Molecular Cell* 2006; 24(6):867–76. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.005.
26. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011; 414(2):153–63. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.019.
27. 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.

28. Kim K, Lambert PF. E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication. *Virology* 2002; 293(1):10–4. doi: 10.1006/viro.2001.1305.
29. Angeletti PC, Kim K, Fernandes FJ, Lambert PF. Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 2002; 76(7):3350–8. doi: 10.1128/JVI.76.7.3350-3358.2002.
30. Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M et al. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 2012; 86(6):3276–83. doi: 10.1128/JVI.06450-11.
31. McBride AA, Oliveira JG, McPhillips MG. Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle* 2006; 5(14):1499–502. doi: 10.4161/cc.5.14.3094.
32. van Tine BA, Dao LD, Wu S-Y, Sonbuchner TM, Lin BY, Zou N et al. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(12):4030–5. doi: 10.1073/pnas.0306848101.
33. Dao LD, Duffy A, van Tine BA, Wu S-Y, Chiang C-M, Broker TR et al. Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin binding protein E2 through mitosis while in association with the spindle apparatus. *J Virol* 2006; 80(10):4792–800. doi: 10.1128/JVI.80.10.4792-4800.2006.
34. Parish JL, Rosa J, Wang X, Lahti JM, Doxsey SJ, Androphy EJ. The DNA helicase ChR1 is required for sister chromatid cohesion in mammalian cells. *Journal of Cell Science* 2006; 119(Pt 23):4857–65. doi: 10.1242/jcs.03262.
35. Rosenberger S, De-Castro Arce J, Langbein L, Steenbergen RDM, Rösl F. Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107(15):7006–11. doi: 10.1073/pnas.1002620107.
36. Valencia C, Bonilla-Delgado J, Oktaba K, Ocadiz-Delgado R, Gariglio P, Covarrubias L. Human papillomavirus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re-epithelization and epidermal growth. *J Invest Dermatol* 2008; 128(12):2894–903. doi: 10.1038/jid.2008.156.
37. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110(5):525–41. doi: 10.1042/CS20050369.
38. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in Microbiology* 2011; 19(1):33–9. doi: 10.1016/j.tim.2010.10.002.
39. Banerjee NS, Wang H-K, Broker TR, Chow LT. Human papillomavirus (HPV) E7 induces prolonged G2 following S phase reentry in differentiated human keratinocytes. *J Biol Chem* 2011; 286(17):15473–82. doi: 10.1074/jbc.M110.197574.
40. Wang H-K, Duffy AA, Broker TR, Chow LT. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes & Development* 2009; 23(2):181–94. doi: 10.1101/gad.1735109.
41. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011; 414(2):153–63. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.019.

42. Krawczyk E, Supryniewicz FA, Sudarshan SR, Schlegel R. Membrane orientation of the human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *J Virol* 2010; 84(4):1696–703. doi: 10.1128/JVI.01968-09.
43. Krawczyk E, Supryniewicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J et al. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol* 2008; 173(3):682–8. doi: 10.2353/ajpath.2008.080280.
44. Supryniewicz FA, Krawczyk E, Hebert JD, Sudarshan SR, Simic V, Kamonjoh CM et al. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification. *J Virol* 2010; 84(20):10619–29. doi: 10.1128/JVI.00831-10.
45. Thomsen P, van Deurs B, Norrild B, Kayser L. The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. *Oncogene* 2000; 19(52):6023–32. doi: 10.1038/sj.onc.1204010.
46. Genther SM, Sterling S, Duensing S, Münger K, Sattler C, Lambert PF. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 2003; 77(5):2832–42. doi: 10.1128/jvi.77.5.2832-2842.2003.
47. Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 2003; 77(5):2819–31. doi: 10.1128/JVI.77.5.2819-2831.2003.
48. Pim D. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992; 7(1):27.
49. Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* 1993; 67(8):4521–32. doi: 10.1128/JVI.67.8.4521-4532.1993.
50. Yu J-H, Lin BY, Deng W, Broker TR, Chow LT. Mitogen-activated protein kinases activate the nuclear localization sequence of human papillomavirus type 11 E1 DNA helicase to promote efficient nuclear import. *J Virol* 2007; 81(10):5066–78. doi: 10.1128/JVI.02480-06.
51. Deng W, Lin BY, Jin G, Wheeler CG, Ma T, Harper JW et al. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* 2004; 78(24):13954–65. doi: 10.1128/JVI.78.24.13954-13965.2004.
52. Moody CA, Fradet-Turcotte A, Archambault J, Laimins LA. Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104(49):19541–6. doi: 10.1073/pnas.0707947104.
53. Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T et al. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* 1997; 238(1):40–52. doi: 10.1006/viro.1997.8768.
54. McIntosh PB, Martin SR, Jackson DJ, Khan J, Isaacson ER, Calder L et al. Structural analysis reveals an amyloid form of the human papillomavirus type 16 E1–E4 protein and provides a molecular basis for its accumulation. *J Virol* 2008; 82(16):8196–203. doi: 10.1128/JVI.00509-08.
55. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991; 352(6338):824–7. doi: 10.1038/352824a0.

56. Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P et al. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* 2004; 78(2):821-33. doi: 10.1128/JVI.78.2.821-833.2004.
57. Gulliksen A, Keegan H, Martin C, O'Leary J, Solli LA, Falang IM et al. Towards a "Sample-In, Answer-Out" Point-of-Care Platform for Nucleic Acid Extraction and Amplification: Using an HPV E6/E7 mRNA Model System. *Journal of Oncology* 2012; 2012:905024. doi: 10.1155/2012/905024.
58. Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA. Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 2005; 79(11):6732-40. doi: 10.1128/JVI.79.11.6732-6740.2005.
59. Wilson R, Ryan GB, Knight GL, Laimins LA, Roberts S. The full-length E1E4 protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. *Virology* 2007; 362(2):453-60. doi: 10.1016/j.virol.2007.01.005.
60. Nakahara T, Peh WL, Doorbar J, Lee D, Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E1-circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol* 2005; 79(20):13150-65. doi: 10.1128/JVI.79.20.13150-13165.2005.
61. Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X, Doorbar J. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol* 2004; 78(4):2142-51. doi: 10.1128/JVI.78.4.2142-2151.2004.
62. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 2013; 445(1-2):80-98. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.008.
63. Ozbun MA, Meyers C. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology* 1998; 248(2):218-30. doi: 10.1006/viro.1998.9285.
64. Johansson C, Somberg M, Li X, Backström Winquist E, Fay J, Ryan F et al. HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation. *EMBO J* 2012; 31(14):3212-27. doi: 10.1038/emboj.2012.147.
65. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32 Suppl 1:S7-15. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.006.
66. Milligan SG, Veerapraditsin T, Ahamet B, Mole S, Graham SV. Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells. *Virology* 2007; 360(1):172-81. doi: 10.1016/j.virol.2006.10.012.
67. Holmgren SC, Patterson NA, Ozbun MA, Lambert PF. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol* 2005; 79(7):3938-48. doi: 10.1128/JVI.79.7.3938-3948.2005.
68. Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 1998; 72(1):142-50. doi: 10.1128/JVI.72.1.142-150.1998.

69. Buck CB, Thompson CD, Pang Y-YS, Lowy DR, Schiller JT. Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* 2005; 79(5):2839–46. doi: 10.1128/JVI.79.5.2839-2846.2005.
70. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 2003; 77(8):4818–26. doi: 10.1128/JVI.77.8.4818-4826.2003.
71. Brown DR, Kitchin D, Qadadri B, Neptune N, Batteiger T, Ermel A. The human papillomavirus type 11 E1–E4 protein is a transglutaminase 3 substrate and induces abnormalities of the cornified cell envelope. *Virology* 2006; 345(1):290–8. doi: 10.1016/j.virol.2005.09.048.
72. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 2003; 22(8):1225–37. doi: 10.1038/sj.onc.1206170.
73. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *The Journal of Pathology* 2007; 212(4):356–67. doi: 10.1002/path.2192.
74. Isaacson Wechsler E, Wang Q, Roberts I, Pagliarulo E, Jackson D, Untersperger C et al. Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates E6/E7 deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression. *J Virol* 2012; 86(11):6358–64. doi: 10.1128/JVI.07069-11.
75. Sykora S, Brandt S. Papillomavirus infection and squamous cell carcinoma in horses. *Vet J* 2017; 223:48–54. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.05.007.
76. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology* 2015; 25 Suppl 1(S1):2–23. doi: 10.1002/rmv.1822.
77. Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2509–14. doi: 10.1128/JCM.41.6.2509-2514.2003.
78. Koning MNC de, Struijk L, Bavinck JNB, Kleter B, Schegget J ter, Quint WGV et al. Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *Journal of General Virology* 2007; 88(Pt 5):1489–95. doi: 10.1099/vir.0.82732-0.
79. Koning MNC de, Quint KD, Bruggink SC, Gussekloo J, Bouwes Bavinck JN, Feltkamp MCW et al. High prevalence of cutaneous warts in elementary school children and the ubiquitous presence of wart-associated human papillomavirus on clinically normal skin. *Br J Dermatol* 2015; 172(1):196–201. doi: 10.1111/bjd.13216.
80. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, Villiers E-M de. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401(1):70–9. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002.
81. Villiers E-M de, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1):17–27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033.
82. Egawa K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 2003; 207(3):251–4. doi: 10.1159/000073085.

83. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses* 2015; 7(7):3863–90. doi: 10.3390/v7072802.
84. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; 109(26):10516–21. doi: 10.1073/pnas.1202684109.
85. Quint KD, Genders RE, Koning MNC de, Borgogna C, Gariglio M, Bouwes Bavinck JN et al. Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *The Journal of Pathology* 2015; 235(2):342–54. doi: 10.1002/path.4425.
86. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res* 2017; 231:119–27. doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.017.
87. Steinberg BM, Auburn KJ, Brandsma JL, Taichman LB. Tissue site-specific enhancer function of the upstream regulatory region of human papillomavirus type 11 in cultured keratinocytes. *J Virol* 1989; 63(2):957–60. doi: 10.1128/JVI.63.2.957-960.1989.
88. Ottinger M, Smith JA, Schweiger M-R, Robbins D, Powell MLC, You J et al. Cell-type specific transcriptional activities among different papillomavirus long control regions and their regulation by E2. *Virology* 2009; 395(2):161–71. doi: 10.1016/j.virol.2009.09.027.
89. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106(48):20458–63. doi: 10.1073/pnas.0908502106.
90. Carifi M, Napolitano D, Morandi M, Dall'Olio D. Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives. *Ther Clin Risk Manag* 2015; 11:731–8. doi: 10.2147/TCRM.S81825.
91. Herfs M, Vargas SO, Yamamoto Y, Howitt BE, Nucci MR, Hornick JL et al. A novel blueprint for 'top down' differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. *The Journal of Pathology* 2013; 229(3):460–8. doi: 10.1002/path.4110.
92. Bodily JM, Hennigan C, Wrobel GA, Rodriguez CM. Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle. *Virology* 2013; 443(1):11–9. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.033.
93. Spink KM, Laimins LA. Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J Virol* 2005; 79(8):4918–26. doi: 10.1128/JVI.79.8.4918-4926.2005.
94. Majewski S, Jablonska S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1997; 36(5 Pt 1):659-85; quiz 686-8. doi: 10.1016/S0190-9622(97)80315-5.
95. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJF, Vaccarella S et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366(9490):991–8. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67069-9.

96. Petry KU, Luyten A, Justus A, Iftner A, Strehlke S, Schulze-Rath R et al. Prevalence of low-risk HPV types and genital warts in women born 1988/89 or 1983/84 -results of WOLVES, a population-based epidemiological study in Wolfsburg, Germany. *BMC Infectious Diseases* 2012; 12(1):367. doi: 10.1186/1471-2334-12-367.
97. McKEE PH, WILKINSON JD, BLACK MM, WHIMSTER IW. Carcinoma (epithelioma) cuniculatum: a clinico-pathological study of nineteen cases and review of the literature. *Histopathology* 1981; 5(4):425–36. doi: 10.1111/j.1365-2559.1981.tb01803.x.
98. Chuang TY. Condylomata acuminata (genital warts). An epidemiologic view. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1987; 16(2 Pt 1):376–84. doi: 10.1016/S0190-9622(87)70053-X.
99. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology* 2015; 25 Suppl 1(S1):2–23. doi: 10.1002/rmv.1822.
100. Martel C de, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology* 2012; 13(6):607–15. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7.
101. Chaturvedi AK. Beyond cervical cancer: burden of other HPV-related cancers among men and women. *J Adolesc Health* 2010; 46(4 Suppl):S20-6. doi: 10.1016/j.jadohealth.2010.01.016.
102. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, deVries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. *Preventive Medicine* 2011; 53:S12-S21. doi: 10.1016/j.ypmed.2011.08.017.
103. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *New England Journal of Medicine* 2006; 354(25):2645–54. doi: 10.1056/NEJMoa053284.
104. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29(32):4294–301. doi: 10.1200/JCO.2011.36.4596.
105. Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer* 2008; 113(10 Suppl):3036–46. doi: 10.1002/cncr.23764.
106. Koshiol JE, Schroeder JC, Jamieson DJ, Marshall SW, Duerr A, Heilig CM et al. Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. *International Journal of Cancer* 2006; 119(7):1623–9. Verfügbar unter: <https://online-library.wiley.com/doi/10.1002/ijc.22015>.
107. Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TKH, Wong YF, Smith DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2005; 158(1):27–34. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2004.08.021.
108. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz MvK. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* 2002; 21(3):419–26. doi: 10.1038/sj.onc.1205104.

109. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 1995; 69(5):2989–97. doi: 10.1128/JVI.69.5.2989-2997.1995.
110. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(5):1654–8. doi: 10.1073/pnas.92.5.1654.
111. Pett MR, Alazawi WOF, Roberts I, Dowen S, Smith DI, Stanley MA et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* 2004; 64(4):1359–68. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3214.
112. Häfner N, Driesch C, Gajda M, Jansen L, Kirchmayr R, Runnebaum IB et al. Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene* 2008; 27(11):1610–7. doi: 10.1038/sj.onc.1210791.
113. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, Knebel Doeberitz M von. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* 2004; 10(9):3059–63. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0565.
114. Westra WH. The Morphologic Profile of HPV-Related Head and Neck Squamous Carcinoma: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Clinical Management. *Head and Neck Pathology* 2012; 6(S1):48–54. doi: 10.1007/s12105-012-0371-6.
115. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer* 2006; 118(12):3030–44. doi: 10.1002/ijc.21731.
116. Markowitz. Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2007; 56(RR-2):1.
117. Joura EA, Giuliano AR, Iversen O-E, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J et al. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *New England Journal of Medicine* 2015; 372(8):711–23. doi: 10.1056/NEJMoa1405044.
118. Lockett R, Feldman S. Impact of 2-, 4- and 9-valent HPV vaccines on morbidity and mortality from cervical cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2016; 12(6):1332–42. doi: 10.1080/21645515.2015.1108500.
119. Wang R, Pan W, Jin L, Huang W, Li Y, Di Wu et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Letters* 2020; 471:88–102. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.039.
120. Falco F de, Cutarelli A, Gentile I, Cerino P, Uleri V, Catoi AF et al. Bovine Delta Papillomavirus E5 Oncoprotein Interacts With TRIM25 and Hampers Antiviral Innate Immune Response Mediated by RIG-I-Like Receptors. *Front Immunol* 2021; 12:658762. doi: 10.3389/fimmu.2021.658762.
121. Bertagnolli AC, Bezerra AVA, Santos RN, Cavalli LS, Varela APM, Reis EM et al. Clinicopathological characteristics and papillomavirus types in cutaneous warts in bovine. *Braz J Microbiol* 2020; 51(1):395–401. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31388938/>.

122. van Doorslaer K, Tan Q, Xirasagar S, Bandaru S, Gopalan V, Mohamoud Y et al. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Research* 2013; 41(Database issue):D571-8. doi: 10.1093/nar/gks984.
123. campo. Association of Bovine Papillomavirus Type 2 and Bracken Fern With Bladder Cancer in Cattle. *Cancer Res* 1992; 52.
124. Roperto S, Russo V, Ozkul A, Sepici-Dincel A, Maiolino P, Borzacchiello G et al. Bovine papillomavirus type 2 infects the urinary bladder of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and plays a crucial role in bubaline urothelial carcinogenesis. *Journal of General Virology* 2013; 94(Pt 2):403–8. doi: 10.1099/vir.0.047662-0.
125. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology* 2013; 445(1-2):99–114. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.006.
126. Surti T, Klein O, Aschheim K, DiMaio D, Smith SO. Structural models of the bovine papillomavirus E5 protein. *Proteins* 1998; 33(4):601–12.
127. Pennie WD, Grindlay GJ, Cairney M, Campo MS. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. *Virology* 1993; 193(2):614–20. doi: 10.1006/viro.1993.1169.
128. Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology* 1989; 170(1):334–9. doi: 10.1016/0042-6822(89)90391-7.
129. Burnett S, Jareborg N, DiMaio D. Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(12):5665–9. doi: 10.1073/pnas.89.12.5665.
130. DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 2001; 20(54):7866–73. doi: 10.1038/sj.onc.1204915.
131. Borzacchiello G, Russo V, Gentile F, Roperto F, Venuti A, Nitsch L et al. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor beta receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene* 2006; 25(8):1251–60. doi: 10.1038/sj.onc.1209152.
132. Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res* 2006; 120(1-2):208–11. doi: 10.1016/j.virus-res.2006.02.005.
133. Marchetti B, Gault EA, Cortese MS, Yuan Z, Ellis SA, Nasir L et al. Bovine papillomavirus type 1 oncoprotein E5 inhibits equine MHC class I and interacts with equine MHC I heavy chain. *Journal of General Virology* 2009; 90(Pt 12):2865–70. doi: 10.1099/vir.0.014746-0.
134. Jarrett. *The natural history of bovine papilloma-virus infections* 1985; vol 5.
135. Borzacchiello G, Roperto F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res* 2008; 39(5):45. doi: 10.1051/vetres:2008022.

136. Pfister H, Linz U, Gissmann L, Huchthausen B, Hoffmann D, zur Hausen H. Partial characterization of a new type of bovine papilloma viruses. *Virology* 1979; 96(1):1–8. doi: 10.1016/0042-6822(79)90166-1.
137. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 2002; 89(2):249–61. doi: 10.1016/S0168-1702(02)00193-4.
138. Borzacchiello G, Roperto F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res* 2008; 39(5):45. doi: 10.1051/vetres:2008022.
139. Olson C, Pamukcu AM, Brobst DF. Papilloma-like virus from bovine urinary bladder tumors. *Cancer Res* 1965; 25(6):840–9.
140. Borzacchiello G, Iovane G, Marcante ML, Poggiali F, Roperto F, Roperto S et al. Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *Journal of General Virology* 2003; 84(Pt 11):2921–6. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14573796/>.
141. Campo MS. Bovine papillomavirus and cancer. *The Veterinary Journal* 1997; 154(3):175–88. doi: 10.1016/S1090-0233(97)80019-6.
142. Wosiacki SR, Barreiro MAB, Alfieri AF, Alfieri AA. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J Virol Methods* 2005; 126(1-2):215–9. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.01.021.
143. Borzacchiello G, Russo V, Spoleto C, Roperto S, Balcos L, Rizzo C et al. Bovine papillomavirus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle. *Cancer Letters* 2007; 250(1):82–91. doi: 10.1016/j.canlet.2006.09.022.
144. Lunardi M, Alcântara BK de, Otonel RAA, Rodrigues WB, Alfieri AF, Alfieri AA. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. *J Clin Microbiol* 2013; 51(7):2167–71. doi: 10.1128/JCM.00371-13.
145. Montpellier, J., Badens, P., Dieuzeide, R. Tumeurs schwanniennes cutanées du mulet. *Revue de Médecine Vétérinaire, Toulouse* 1937; (89):216–24.
146. Olson C, Cook RH. Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951; 77(2):281–4. doi: 10.3181/00379727-77-18750.
147. Ragland. Attempts to relate bovine papilloma virus to the cause of equine sarcoid, equidae inoculated intradermally with bovine papilloma virus. *Am J Vet Res* 1969; 30:743.
148. Voss. Transmission of equine sarcoid. *Am J Vet Res* 1969; 30:183.
149. Otten N, Tschärner C von, Lazary S, ANTCZAK DF, Gerber H. DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. *Archives of Virology* 1993; 132(1-2):121–31. doi: 10.1007/BF01309847.
150. Bloch N, Breen M, SPRADBROW PB. Genomic sequences of bovine papillomaviruses in formalin-fixed sarcoids from Australian horses revealed by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1994; 41(1-2):163–72. doi: 10.1016/0378-1135(94)90145-7.

151. Reid SW, Smith KT, Jarrett WF. Detection, cloning and characterisation of papillomaviral DNA present in sarcoid tumours of *Equus asinus*. *Vet Rec* 1994; 135(18):430–2. doi: 10.1136/vr.135.18.430.
152. 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. *Am J Vet Res* 2001; 62(5):741–4. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.741.
153. Martens A, Moor A de, Ducatelle R. PCR detection of bovine papilloma virus DNA in superficial swabs and scrapings from equine sarcoids. *Vet J* 2001; 161(3):280–6. doi: 10.1053/tvjl.2000.0524.
154. Nasir L, Reid S. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Res* 1999; 61(2):171–5. doi: 10.1016/S0168-1702(99)00022-2.
155. Carr EA, Théon AP, Madewell BR, Hitchcock ME, Schlegel R, Schiller JT. Expression of a transforming gene (E5) of bovine papillomavirus in sarcoids obtained from horses. *Am J Vet Res* 2001; 62(8):1212–7. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1212.
156. Nixon C, Chambers G, Ellsmore V, Campo MS, Burr P, Argyle DJ et al. Expression of cell cycle associated proteins cyclin A, CDK-2, p27kip1 and p53 in equine sarcoids. *Cancer Letters* 2005; 221(2):237–45. doi: 10.1016/j.canlet.2004.08.039.
157. 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.
158. Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SWJ, Love S, Campo MS et al. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *Journal of General Virology* 2003; 84(Pt 5):1055–62. doi: 10.1099/vir.0.18947-0.
159. 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.
160. Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid S, 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.
161. Nasir L, Gault E, Morgan IM, Chambers G, Ellsmore V, 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.
162. 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.
163. Trewby H, Ayele G, Borzacchiello G, Brandt S, Campo MS, Del Fava C et al. Analysis of the long control region of bovine papillomavirus type 1 associated with sarcoids in equine hosts indicates multiple cross-species transmission events and phylogeographical structure. *Journal of General Virology* 2014; 95(Pt 12):2748–56. doi: 10.1099/vir.0.066589-0.

164. RAGLAND WL, KEOWN GH, Gorham JR. An epizootic of equine sarcoid. *Nature* 1966; 210(5043):1399. doi: 10.1038/2101399a0.
165. 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.
166. Nasir L, Campo MS. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet Dermatol* 2008; 19(5):243–54. doi: 10.1111/j.1365-3164.2008.00683.x.
167. 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. *Journal of General Virology* 2011; 92(Pt 10):2437–45. doi: 10.1099/vir.0.033670-0.
168. Brandt S, Haralambus 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.
169. Finlay M, Yuan Z, Burden F, Trawford A, Morgan IM, Campo MS et al. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus Res* 2009; 144(1-2):315–7. doi: 10.1016/j.virus-res.2009.04.015.
170. Kemp-Symonds, J.G., 2000. The detection and sequencing of bovine papillomavirus type 1 and 2 DNA from *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae) face flies infesting sarcoid-affected horses. MSc Thesis, London, UK; 2000.
171. Brandt S, Haralambus R, Schoster A, Kirnbauer R, Stanek C. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 6):1390–5. doi: 10.1099/vir.0.83568-0.
172. Intact BPV-1 virion is required for experimental tumour induction in foals and causes viraemia; 2010.
173. 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.
174. Yuan Z, Gault EA, Campo MS, Nasir L. Different contribution of bovine papillomavirus type 1 oncoproteins to the transformation of equine fibroblasts. *Journal of General Virology* 2011; 92(Pt 4):773–83. doi: 10.1099/vir.0.028191-0.
175. Yuan Z, Gault EA, Campo MS, Nasir L. p38 mitogen-activated protein kinase is crucial for bovine papillomavirus type-1 transformation of equine fibroblasts. *Journal of General Virology* 2011; 92(Pt 8):1778–86. doi: 10.1099/vir.0.031526-0.
176. Finlay M, Yuan Z, Morgan IM, Campo MS, Nasir L. Equine sarcoids: Bovine Papillomavirus type 1 transformed fibroblasts are sensitive to cisplatin and UVB induced apoptosis and show aberrant expression of p53. *Vet Res* 2012; 43(1):81. doi: 10.1186/1297-9716-43-81.

177. 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.
178. Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RAA, Alcântara BK de, Rodrigues WB, Miranda AB de et al. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet Microbiol* 2013; 162(1):207–13. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.030.
179. Jindra C, Kamjunke A-K, Jones S, Brandt S. Screening for bovine papillomavirus type 13 (BPV13) in a European population of sarcoid-bearing equids. *Equine Vet J* 2021; 54(4):662–9. doi: 10.1111/evj.13501.
180. MOHAMMED HO, REBHUN WC, ANTCZAK DF. Factors associated with the risk of developing sarcoid tumours in horses. *Equine Vet J* 1992; 24(3):165–8. doi: 10.1111/j.2042-3306.1992.tb02808.x.
181. Goodrich. Equine sarcoids. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1998; 14:607.
182. Studer. The therapy of equine sarcoid with a non-specific immunostimulator-the epidemiology and spontaneous regression of sarcoids. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1997; 139:385.
183. Studer S, Gerber V, STRAUB R, Brehm W, Gaillard C, Lüth A et al. Erhebung der Prävalenz von Erbkrankheiten bei dreijährigen Schweizer Warmblutpferden. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2007; 149(4):161–71. doi: 10.1024/0036-7281.149.4.161.
184. Jackson. The incidence and pathology of tumours of domesticated animals in South Africa. *Onderstepoort. J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 1936; 6.
185. Erk. A study of Kitab al-Hail wal-Baitar, written in the second half of the ninth century by Muhammed Ibn ahi Hizam. *Hist Vet* 1976; 1:101.
186. Knottenbelt DC. A Suggested Clinical Classification for the Equine Sarcoid. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2005; 4(4):278–95. doi: 10.1053/j.ctep.2005.10.008.
187. Knottenbelt D, Edwards S, Daniel E. Diagnosis and treatment of the equine sarcoid. *In pract.* 1995; 17(3):123–9. doi: 10.1136/inpract.17.3.123.
188. Cochrane; 1996.
189. Haspelslagh 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.
190. Gysens L, Martens A, Haspelslagh M. Cross-sectional comparison of superficial swab and fine-needle aspiration: Improving the diagnostic workup of horses with sarcoids. *Vet J* 2022; 289:105916. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023322001319>.
191. RAGLAND WL, KEOWN GH, SPENCER GR. Equine Sarcoid. *Equine Vet J* 1970; 2(1):2–11. doi: 10.1111/j.2042-3306.1970.tb04145.x.

192. PASCOE RR, SUMMERS PM. Clinical survey of tumours and tumour-like lesions in horses in south east Queensland. *Equine Vet J* 1981; 13(4):235–9. doi: 10.1111/j.2042-3306.1981.tb03504.x.
193. Howarth. Sarcoids: the story so far. *Veterinary Annual* 1990; 30:145.
194. Knottenbelt. Neoplastic conditions 2009:377.
195. 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.
196. 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.
197. Abel-Reichwald H, Hainisch EK, Zahalka S, Corteggio A, Borzacchiello G, Massa B et al. Epidemiologic analysis of a sarcoid outbreak involving 12 of 111 donkeys in Northern Italy. *Vet Microbiol* 2016; 196:85–92. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.10.021.
198. Hainisch, E.K., Brandt, S., 2015. Equine Sarcoids, in: Robinson, N.E., Sprayberry, K.A. (Ed.), *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine*, 7 ed. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, p. Chapter 99.
199. Nasir, L., Reid, S.W.J., 2006. Bovine papillomaviruses and equine sarcoids, in: Campo, M.S. (Ed.), *Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond*, 1 ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 389-397. In: Campo, M.S. (Ed.), *Papillomavirus Research: From Natural*.
200. Hollis AR. Management of equine sarcoids. *Vet J* 2022:105926. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023322001411>.
201. 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.
202. Martens A, Moor A de, Demeulemeester J, Peelman L. Polymerase chain reaction analysis of the surgical margins of equine sarcoids for bovine papilloma virus DNA. *Vet Surg* 2001; 30(5):460–7. doi: 10.1053/jvet.2001.25874.
203. Genetzky. Equine sarcoids, causes, diagnosis, and treatment. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1983; 5(suppl):S416.
204. Haspesslagh M, Vlaminck LEM, Martens AM. Treatment of sarcoids in equids: 230 cases (2008-2013). *J Am Vet Med Assoc* 2016; 249(3):311–8. doi: 10.2460/javma.249.3.311.
205. Knottenbelt DC, Kelly DF. The diagnosis and treatment of periorbital sarcoid in the horse: 445 cases from 1974 to 1999. *Veterinary Ophthalmology* 2000; 3(2-3):169–91. doi: 10.1046/j.1463-5224.2000.00119.x.
206. Hewes CA, Sullins KE. Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 cases (2000-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229(10):1617–22. doi: 10.2460/javma.229.10.1617.
207. Compston PC, Turner T, Wylie CE, Payne RJ. Laser surgery as a treatment for histologically confirmed sarcoids in the horse. *Equine Vet J* 2016; 48(4):451–6. doi: 10.1111/evj.12456.

208. Carstanjen. Carbon dioxide laser as a surgical instrument for sarcoid therapy—a retrospective study on 60 cases. *Can Vet J* 1997; 38:773.
209. McCauley CT, Hawkins JF, Adams SB, Fessler JF. Use of a carbon dioxide laser for surgical management of cutaneous masses in horses: 32 cases (1993-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220(8):1192–7. doi: 10.2460/javma.2002.220.1192.
210. Kemp-Symonds, J.G., Nixon, J.V.M., 2008. Carbon Dioxide Laser Surgery as a Treatment for Equine Sarcoid: Outcome and Complications in 24 Patients, in: BEVA (Ed.), Annual BEVA Congress, Liverpool, UK.
211. Hollis AR. Management of equine sarcoids. *Vet J* 2022:105926. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023322001411>.
212. Lane JG. The treatment of equine sarcoids by cryosurgery. *Equine Vet J* 1977; 9(3):127–33. doi: 10.1111/j.2042-3306.1977.tb04003.x.
213. Fretz PB, Barber SM. Prospective analysis cryosurgery as the sole treatment for equine sarcoids. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1980; 10(4):847–59. doi: 10.1016/S0195-5616(80)50085-9.
214. Martens A, Moor A de, Demeulemeester J, Peelman L. Polymerase chain reaction analysis of the surgical margins of equine sarcoids for bovine papilloma virus DNA. *Vet Surg* 2001; 30(5):460–7. doi: 10.1053/jvet.2001.25874.
215. Knottenbelt DC, Watson AH, Hotchkiss JW, Chopra S, Higgins AJ. A pilot study on the use of ultra-deformable liposomes containing bleomycin in the treatment of equine sarcoid. *Equine Vet Educ* 2020; 32(5):258–63. doi: 10.1111/eve.12950.
216. Nogueira SAF, Torres SMF, Malone ED, Diaz SF, Jessen C, Gilbert S. Efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of equine sarcoids: a pilot study. *Vet Dermatol* 2006; 17(4):259–65. doi: 10.1111/j.1365-3164.2006.00526.x.
217. Pettersson CM, Broström H, Humblot P, Bergvall KE. Topical treatment of equine sarcoids with imiquimod 5% cream or *Sanguinaria canadensis* and zinc chloride - an open prospective study. *Vet Dermatol* 2020; 31(6):471-e126. doi: 10.1111/vde.12900.
218. Tamzali. Use of combination of tazarotene cream and imiquimod 5% cream in the treatment of equine sarcoids: a 20 case retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; 28:709.
219. Théon AP, Wilson WD, Magdesian KG, Pusterla N, Snyder JR, Galuppo LD. Long-term outcome associated with intratumoral chemotherapy with cisplatin for cutaneous tumors in equidae: 573 cases (1995-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230(10):1506–13. doi: 10.2460/javma.230.10.1506.
220. Hewes, C.A., Sullins, K.E., 2009. Review of the treatment of equine cutaneous neoplasia. In: Proceedings of the American Association of Equine Practitioners, Las Vegas, Nevada, USA 55, 386-393; 2009.

221. Calmette A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med* 1931; 24(11):1481–90.
222. Misdorp W, Klein WR, Ruitenberg EJ, Hart G, Jong WH de, Steerenberg PA. Clinico-pathological aspects of immunotherapy by intralesional injection of BCG cell walls or live BCG in bovine ocular squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 1985; 20(3):223–30. doi: 10.1007/BF00205581.
223. DAVIES M. Bacillus Calmette-Guérin as an anti-tumor agent. The interaction with cells of the mammalian immune system. *Biochim Biophys Acta* 1982; 651(2-3):143–74. doi: 10.1016/0304-419X(82)90010-5.
224. LAVACH JD, SULLINS KE, ROBERTS SM, SEVERIN GA, WHEELER C, LUEKER DC. BCG treatment of periocular sarcoid. *Equine Vet J* 1985; 17(6):445–8. doi: 10.1111/j.2042-3306.1985.tb02552.x.
225. Owen RA, Jagger DW. Clinical observations on the use of BCG cell wall fraction for treatment of periocular and other equine sarcoids. *Vet Rec* 1987; 120(23):548–52. doi: 10.1136/vr.120.23.548.
226. VANSELOW BA, ABETZ I, Jackson AR. BCG emulsion immunotherapy of equine sarcoid. *Equine Vet J* 1988; 20(6):444–7. doi: 10.1111/j.2042-3306.1988.tb01571.x.
227. McConaghy FF, Davis RE, Reppas GP, Rawlinson R J, McClintock SA, Hutchins DR et al. Management of equine sarcoids: 1975-93. *New Zealand Veterinary Journal* 1994; 42(5):180–4. doi: 10.1080/00480169.1994.35816.
228. Hollis AR, Berlato D. Initial experience with high dose rate brachytherapy of periorbital sarcoids in the horse. *Equine Vet Educ* 2018; 30(8):444–9. doi: 10.1111/eve.12782.
229. Hollis AR. Radiotherapy for the treatment of periocular tumours in the horse. *Equine Vet Educ* 2019; 31(12):647–52. doi: 10.1111/eve.12817.
230. 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.
231. García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 1998; 252(2):324–30. doi: 10.1006/viro.1998.9508.
232. Egorov A, Brandt S, Sereinig S, Romanova J, Ferko B, Katinger D et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J Virol* 1998; 72(8):6437–41. doi: 10.1128/JVI.72.8.6437-6441.1998.
233. JA Richt. Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 333:177.
234. Munday JS, Orbell G, Fairley RA, Hardcastle M, Vaatstra B. Evidence from a Series of 104 Equine Sarcoids Suggests That Most Sarcoids in New Zealand Are Caused by Bovine Papillomavirus Type 2, although Both BPV1 and BPV2 DNA Are Detectable in around 10% of Sarcoids. *Animals (Basel)* 2021; 11(11). doi: 10.3390/ani11113093.

235. Szczerba-Turek. Genetic evaluation of bovine papillomavirus types detected in equine sarcoids in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2019; 22:25.
236. Haralampus 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.

11. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Sarkoideinteilung nach Schweregrad	29
Tabelle 2: Typ spezifische BPV1 und BPV2 Primer	31
Tabelle 3: Pipettierschema für den Duplex Assay	34
Tabelle 4: Ergebnisse Standards i Duplex und Singleplex Assay	37
Tabelle 5: Ergebnisse dPCR	38
Tabelle 6:Vergleichende Darstellung der erwartenden vs.tatsächlichen Konzentration	38
Tabelle 7: Ergebnisse quantitativer & Qualitativer PCR der Equiden Proben.....	43
Tabelle 8: Ergebnisse Qualitativer und Quantitativer PCR der Bovinen Proben	46

12. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: FAM Kanal BPV1.....	39
Abbildung 2 Crystal Image BPV1 3µl	39
Abbildung 3 Crystal Image BPV1 1µl	40
Abbildung 4: VIC Kanal BPV2.....	40
Abbildung 5: Crystal Image BPV2 3µl	41
Abbildung 6: Crystal Image BPV2 1µl	41
Abbildung 7: Fam Kanal Standard (BPV1) Logarithmische Darstellung (Durchgang Kuh 1-13)	47
Abbildung 8: Fam Kanal Standard + Proben logarithmische Darstellung (Durchgang Kuh 1-13)	47
Abbildung 9: FAM Kanal Standard (BPV1) lineare Darstellung (Durchgang Kuh 1-13)	48
Abbildung 10: FAM Kanal Standard + Proben Lineare Darstellung (Durchgang Kuh 1-13)	48
Abbildung 11: Hex Kanal Standard (BPV2) Logarithmische Darstellung (Durchgang Kuh 1-13).....	49
Abbildung 12: Hex Kanal Standard (BPV2) lineare Darstellung (Durchgang Kuh 1- 13)	49
Abbildung 13: Hex Kanal Standard + Proben logarithmische Darstellung (Durchgang Kuh 1-13).....	50
Abbildung 14: Hex Kanal Standard + Proben lineare Darstellung (Durchgang Kuh 1-13).....	50
Abbildung 15: FAM Kanal Standard (BPV1) logarithmische Darstellung (Durchgang Kuh 14- 26)	51
Abbildung 16: FAM Kanal Standards+ Proben Logarithmische Darstellung (Durchgang Kuh 14-26)..	51
Abbildung 17: FAM Kanal Standards (BPV1) lineare Darstellung (Durchgang Kuh 14- 26)	52
Abbildung 18: Fam Kanal Standards + Proben lineare Darstellung (Durchgang Kuh 14-26)	52
Abbildung 19: HEX Kanal Standards (BPV2) logarithmische Darstellung (Durchgang Kuh 14-26).....	52
Abbildung 20: HEX Kanal Standards + Proben logarithmische Darstellung (Durchgang Kuh 14-26)	53
Abbildung 21: HEX Kanal Standard (BPV2) lineare Darstellung (Durchgang Kuh 14-26)	54
Abbildung 22: HEX Kanal Standards+ Proben lineare Darstellung (Durchgang Kuh 14-26).....	54

13. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während des Verfassens dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Besonders hervorheben möchte ich dabei die Mitglieder des RGO Teams, Sabine Brandt, Christoph Jindra, und Edmund Hainisch, sowie Martin Hofer vom VetCORE, die mir immer mit Rat und Tat und in den schwierigsten Situationen mit einer Kombination aus Schokolade und Kaffee zur Seite standen. Auch möchte ich den inoffiziellen Mitarbeitern, um genauer zu sein den beiden Hunden Rumo und George des Teams meine Dankbarkeit aussprechen, die mit ihren liebenswürdigen Charakteren mich über die emotionalen Höhen und Tiefen bei der Erstellung dieser Arbeit begleitet haben.

Das Erreichen dieses letzten Abschnittes des Studiums wäre mir ohne die wundervollen Menschen in meinem Leben nicht möglich gewesen. Alexandra Schützinger und Beate Pflugseder waren mir immer eine große Unterstützung in der Verwirklichung meiner Träume und Ziele, unabhängig davon, wie unerreichbar sie erschienen. Ich bin stolz, sie als meine Familie bezeichnen zu können, und hoffe, dass ich ihre Erwartungen an meine berufliche Zukunft erfüllen werde.