

**Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien**

**Universitätsklinik für Pferde
Klinische Abteilung für Pferdechirurgie
(LeiterIn: Univ.Prof. Dr. Florian Jenner)
Research Group Oncology
(LeiterIn: PD. Dr. Sabine Brandt)**

Vorkommen des bovinen Papillomvirus Typ 13 (BPV13) in equinen Sarkoiden

**Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades**

**Magistra medicinae veterinariae
der Veterinärmedizinischen Universität Wien**

**vorgelegt von
Ann-Kristin Kamjunke**

Wien, Juli 2020

Betreuerin

Dipl.-Ing. Dr. habil. Sabine Brandt

Klinik für Pferde, Pferdechirurgie, Forschungsgruppe Onkologie

Gutachterin

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

Klinik für Pferde, Pferdechirurgie, Forschungsgruppe Onkologie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Bovine Papillomviren: Einteilung, Klassifikation und Aufbau	2
1.3	Sarkoidformen und Einteilung	7
1.4	Übertragung und Infektion	10
1.5	Diagnostik	16
1.6	Therapie	18
1.7	Prävention	23
1.8	Fragestellung und klinische Relevanz der Diplomarbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.2	Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration	26
2.3	PCR auf equines Beta-Aktin	31
2.4	BPV 13-Primerdesign und Herstellung einer synthetische Positivkontrolle	33
2.5	BPV13-PCR	35
2.6	Re-PCR und DNS Extraktion	36
2.7	Sequenzierung der DNA	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Die Bestimmung der DNS Konzentrationen führte zum Ausscheiden von neun DNS-Isolaten	38
3.2	β -Aktin-PCR testete in 99 Fällen positive	38
3.3	BPV13-PCR	38
4	Diskussion	44

5	Zusammenfassung	48
6	Summary	50
7	Danksagung	52
8	Abkürzungsverzeichnis	53
9	Literatur	55
10	Abbildungsverzeichnis	63
11	Tabellenverzeichnis	64

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Das equine Sarkoid ist ein gutartiger, lokal aggressiver fibroblastischer Hauttumor bei Pferden, Eseln, Zebras und Mulis (Chambers et al., 2003a; Olson and Cook, 1951). Es ist der häufigste Hauttumor bei Pferden weltweit, etwa 50% der Tumoren beim Pferd sind equine Sarkoide. Besonders häufig kommen sie im Kopfbereich, Inguinalbereich, Gliedmaßen und Thorax vor (Scott, 2003). Bisher wurden das bovine Papillomvirus (BPV) 1 und 2 in equinen Sarkoiden nachgewiesen und als Auslöser identifiziert (Chambers et al., 2003a). Beim Pferd unterscheidet man sechs verschiedenen Typen von equinen Sarkoiden: Das okkulte, verruköse, noduläre, fibroblastische und malevolente Sarkoid. Außerdem gibt es gemischte Sarkoide aus mehreren der oben genannten Formen (Knottenbelt, 2005). Die Übertragung erfolgt vermutlich von Rind oder Pferd zu Pferd, aber wahrscheinlich auch über Vektoren, wie Putzzeug oder Insekten (Fliegen). Ein prädisponierender Faktor scheint die Genetik der einzelnen Pferde zu sein, bestimmte Rassen und spezielle MHC (engl.:major histocompatibility complex) Typen sind häufiger betroffen (Angelos et al., 1991; Lazary et al., 1985; Meredith et al., 1986; Staiger et al., 2016). Ebenfalls spielen das Alter und das Geschlecht eine Rolle, so sind junge männliche Pferde häufiger betroffen (Chambers et al., 2003a).

Des Weiteren kommen Sarkoide häufig an Stellen einer alten Verletzung bzw. narbigen Veränderungen vor, da dort das Virus durch die Verletzung die Möglichkeit hat, in die Haut einzudringen (Knottenbelt, 2005).

Lunardi et al. konnte im Jahr 2013 in sechs equinen Sarkoid Proben von zwei Pferden in Brasilien, mittels PCR ein neues Delta-BPV (BPV13) nachweisen (Lunardi et al., 2013b).

Diese Entdeckung weist darauf hin, dass auch BPV13 an der Entstehung von Sarkoiden beteiligt sein könnte.

1.2 Bovine Papillomviren: Einteilung, Klassifikation und Aufbau

Bovine Papillomviren sind unbehüllte DNS-Viren, die eine ikosaedrische Form aufweisen und eine zirkuläre, doppelsträngige DNS besitzen. Sie gehören zur Familie der Papillomaviridae. Auf Grund ihrer Biologie und Genetik können die bislang identifizierten bovinen Papillomaviridae in unterschiedliche Gruppen wie etwa Deltapapillomaviridae, Epsilonpapillomaviridae, oder Xipapillomaviridae eingeteilt werden (Nasir and Campo, 2008).

Deltapapillomaviridae werden auch als Fibropapillomaviridae bezeichnet, da sie sowohl das Epithel, als auch die Unterhaut infizieren und zu gutartigen Fibropapillomen führen (Abb.1). Zu ihnen gehören BPV1, BPV2, BPV13 und BPV14 (Nasir & Campo, 2008).



Abb. 1: Bovine Papillome Durch BPV1-induzierte, gutartige Fibropapillome ("Kuhwarzen") bei einem jungen Rind in der Nähe von Neapel. Nach Aufnahme des Fotos wurden die Warzen von Forschungspartner Prof. Giuseppe Borzacchiello entfernt und an die Vetmeduni Wien weitergeleitet. Aus ihnen wurden im Anschluss BPV1-Virionen isoliert (S. Brandt: persönliche Mitteilung).

Xipapillomaviridae infizieren hingegen nur die Epithelzellen der Haut und führen damit zu echten Papillomen. BPV 3, 4, 6, 9 und 10 können zu dieser Gruppe gezählt werden.

Epsilonpapillomaviridae können sowohl echte Papillome, also auch Fibropapillome verursachen. BPV 5 und 8 gehören in diese Gruppe (Nasir and Campo, 2008).

BPV7 kann nach phylogenetischen Analysen keiner der drei Gruppen zugeordnet werden.

Wie bei allen bovinen und sonstigen Papillomviren kann das Genom von BPV1 in zwei Regionen unterteilt werden: Die so genannte frühe Region (=engl.: early region E) und die späte Region (= engl.: late region L). Die E-Region enthält offene Leserahmen für E5, E6, E7, welche für die Transformation zuständig sind, sowie für E1, E2 und E4, die wiederum für Replikation und Transkription des Virus notwendig sind (Chambers et al., 2003a).

Die L-Region enthält die Kapsidproteine des Virus - L1 und L2. Diese werden im Kern von differenzierten Keratinozyten exprimiert und bilden durch Interaktion mit viralen Genomen neue infektiöse Viruspartikel (Virionen), die in abgestorbenen Hautschuppen in die Umgebung gelangen. In diesen Schuppen können Virionen lange Zeit persistieren, ohne ihre Infektiosität einzubüßen. Das virale Kapsid von BPV1 setzt sich aus 72 L1-Pentameren zusammen sowie etwa zwölf L2-Monomeren, die geringfügig aus der Kapsel herausragen. Entsprechend sind die L1-Pentamere (Kapsomere) deutlich immunogener als L2. L1 ermöglicht gemeinsam mit L2 die Anheftung des Virus an Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Nach erfolgter Endozytose der Virionen in die Wirtszelle sorgt L2 für den Transport des viralen Genoms in den Zellkern (Nasir and Campo, 2008).

Zwischen der E- und L-Region befindet sich ein DNS-Abschnitt, der nicht transkribiert wird, die so genannte "lange Kontrollregion" (Engl.: Long Control Region; LCR). In diesem Abschnitt befinden sich zum Beispiel Promotoren für die Transkription, Enhancer (= DNS-Sequenzen, die das Ablesen des Gens verstärken) und Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren (Chambers et al., 2003a).

Im Folgenden werden die drei BPV1-Onkoproteine E5, E6 und E7 kurz erklärt (aufgrund der hohen Homologie zwischen BPV1, BPV2 und BPV13 wird davon ausgegangen, dass die hier beschriebenen Eigenschaften auch für BPV2 und BPV13 gelten):

Das kurze hydrophobe BPV1 Protein **E5** ist im Golgi-Apparat und in den Membranen der Zellkompartimente lokalisiert. Es ist das „major“ - das Haupt-Onkoprotein von BPV1 (Chambers et al., 2003a). Es aktiviert in teilenden Zellen den „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR) und bindet an 16k-Untereinheiten der H-ATPase der Vakuolen. Ersteres bewirkt eine intrazelluläre Signalkaskade, die zu einem Wachstumssignal führt (DiMaio, 2010). Die Bindung an die 16k-Untereinheiten bewirkt einerseits, dass die Gap-Verbindungen herabreguliert werden, wodurch die Zelle von den Nachbarzellen isoliert wird, andererseits kommt es zu einer Alkalisierung der Endosomen und des Golgi-Apparats, wodurch das MHC I-Molekül nicht an der Zelloberfläche präsentiert wird (Schapiro et al., 2000, Goldstein et al. 1991, Ashrafi et al., 2002; Marchetti et al.; 2002). Durch das MHC-Molekül werden normalerweise Antigene dem Immunsystem präsentiert; ohne diese Präsentation kann das Immunsystem die infizierten Zellen nicht als solche erkennen. Somit ist der Mechanismus der MHC-Inhibition ein effektiver Weg, das Immunsystem zu umgehen (Marchetti et al., 2009). Durch die oben erwähnte Isolation der Zelle fehlt außerdem die Kontrolle der Nachbarzellen und die transformierte Zelle kann sich ungehindert teilen. E5 wird beim Rind sowohl im Zytoplasma von basalen (wenig differenzierten Zellen), als auch superfiziellen Keratinozyten (gut ausdifferenzierte Zellen) exprimiert. Dies legt den Schluss nahe, dass E5 sowohl zu Beginn der Infektion, als auch im späteren Infektionszyklus benötigt wird (Nasir and Campo, 2008). Auch in Sarkoiden liegen immer E5-Transkription und Expression vor (Yuan et al., 2011).

E6 besitzt zwei hoch konservierte Zinkfinger-Domänen und kommt in der Zellmembran und im Zellkern vor. Es bindet an den Clathrin-Adaptorkomplex AP-1, welcher für die Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung notwendig ist und als Transkriptionsaktivator fungiert, indem er an das Kalzium-bindende Protein ERC-55/E6BP und an den Transkriptionskoaktivator CBP/p300 bindet (Zimmerman et al.; 2000). Dies führt zu einer Inhibition sowohl von CBP/p300, als auch von p53. Letzteres Ereignis zieht wiederum nach sich, dass zwei wichtige Funktionen von p53 - nämlich Induktion von Apoptose und Zellzyklus-Arretierung - nicht mehr stattfinden können. Das Ergebnis ist ungebremste Hyperproliferation, ein typisches Merkmal von Sarkoiden (Mittal and Banks,

2017; Nasir and Brandt, 2013). E6 bindet auch an das fokale Adhäsionsprotein Paxillin und vereitelt die Interaktion von Paxillin mit anderen fokalen Adhäsionsproteinen, wie etwa Vinculin oder Adhäsionskinasen. Diese Aktivität von E6 ist mitverantwortlich dafür, dass BPV1-infizierte Zellen auch dann weiter proliferieren können, wenn sie nicht mehr im Zellverband verankert sind (Anoikis-Resistenz) (Campo, 2006).

Das BPV1 E7-Protein ist noch nicht vollständig untersucht, aber man weiß, dass es mit den beiden anderen Onkoproteinen kooperiert und den zelltransformierenden Effekt verstärkt. Dies wurde auch dadurch bewiesen, dass E7-deletierte BPV1-Viren eine deutlich geringere transformierende Aktivität aufweisen, als Wildtyp-Viren. Der Grund dafür ist noch unklar, da dem BPV1 E7 eine für Transformation wichtige Region - die Retinoblastomprotein (pRB)-Bindungsstelle mit dem Sequenzmotiv LXCXE - fehlt. Allerdings ist bekannt, dass BPV1 an p600 bindet, was zur Anoikis-Resistenz von Sarkoidzellen beiträgt. Außerdem ist E7 nachweislich in der Lage, Matrixmetalloproteinasen - in erster Linie MMP1 - zu aktivieren, was wiederum die Herauslösung infizierter Zellen aus dem Zellverband im Sinne einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) fördert - ein Schlüsselereignis, das infiltratives Tumorwachstum ermöglicht (Campo, 2006; Corteggio et al., 2013; Corteggio et al., 2011).

In den Jahren 2008 und 2010 wurden von Claus et al. und Lunardi et al. vier neue BPV-Typen in Warzen von Rindern in Brasilien nachgewiesen. Es handelt sich um BPV/BR-UEL2 bis BPV/BR-UEL5. BPV/BR-UEL 4 wurde als **BPV13** bezeichnet (Lunardi et al., 2013b)

Im Jahr 2013 testete Michele Lunardi sechs Sarkoidläsionen an unterschiedlichen Stellen von zwei Pferden auf den neuen BPV-Typ 13. Die Sarkoidläsionen wurden histopathologisch als Sarkoide bestätigt, es handelte sich um verruköse und fibroblastische Sarkoide.

Eine direkte Sequenzierung der PCR Produkte ergab eine 99 % Übereinstimmung mit der Sequenz von BPV13, welches zuvor in Kühen nachgewiesen wurde. BPV13 kann also in Sarkoiden von brasilianischen Pferden nachgewiesen werden (Lunardi et al., 2013b).

BPV13 ist prinzipiell wie alle anderen BPV-Typen aufgebaut. Sein Genom ist 7961 bp lang und besitzt sechs frühe Proteine (E1, E2, E4, E5, E6 und E7) und zwei späte Proteine (L1 und L2). Acht offene Leserahmen konnten demnach identifiziert werden (Lunardi et al., 2013a; Lunardi et al., 2013b). Unterschiede bestehen im E7, hier fehlt wie bei BPV1 und BPV2 die pRB-Bindungsdomäne LXCXE (Mittal and Banks, 2017). E1 enthält die ATP-Bindungsstelle (GPPNTGKS). E4 liegt im E2-Gen, verwendet aber einen anderen Leserahmen (Lunardi et al., 2013a). Ein Unterschied zu BPV1 und 2 besteht darin, dass BPV13 keine E1-Erkennungsstelle (E1BS) zwischen zwei E2-Bindungsstellen besitzt. E1BS ist normalerweise für die Aktivierung der Replikation zuständig. Stattdessen konnten neun typische E2-Bindungsstellen identifiziert werden (Lunardi et al., 2013a). Genau 85,4 % des L1 Leserahmens von BPV1 und 88,8% des L1 Leserahmens von BPV2 stimmen mit jenem von BPV13 überein. Das Kriterium für einen neuen Papillomvirustyp ist, dass sich 10% des L1 Leserahmens vom nächst bekannten Papillomvirustyp unterscheiden. Diese Voraussetzung ist hier also gegeben (de Villiers et al., 2004). Die E5-Leserahmen von BPV1, 2 und 13 sind hingegen nahezu ident (Lunardi et al., 2013a).

Im Gegensatz zu humanen karzinogenen Papillomviren fehlt den Fibropapillome auslösenden Papillomviren der Paarhufer also die pRB-Domäne in E7. Narechania et al. (Narechania et al., 2004) beschreiben, dass der Nachweis des E5-Leserahmens und die Abwesenheit der pRB als Voraussetzung für das Auslösen von Fibropapillomen angesehen werden kann. Diese Voraussetzung ist auch für BPV13 gegeben, weshalb von einer Induktion von Fibropapillomen ausgegangen werden kann (Lunardi et al., 2013a).

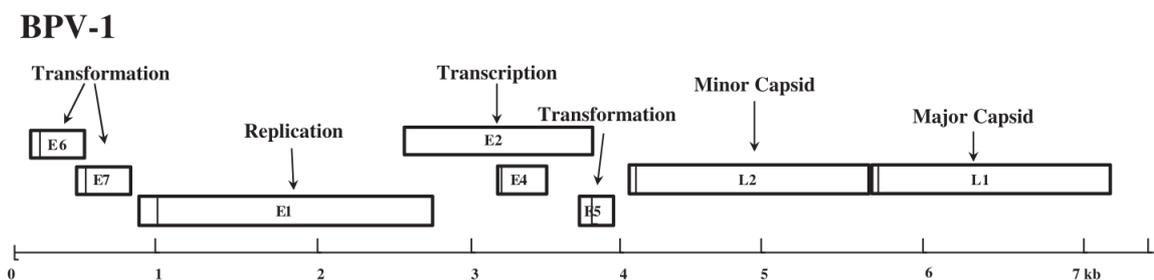


Abb. 2: Aufbau des BPV1-Genoms (aus Nasir und Campo, 2008)

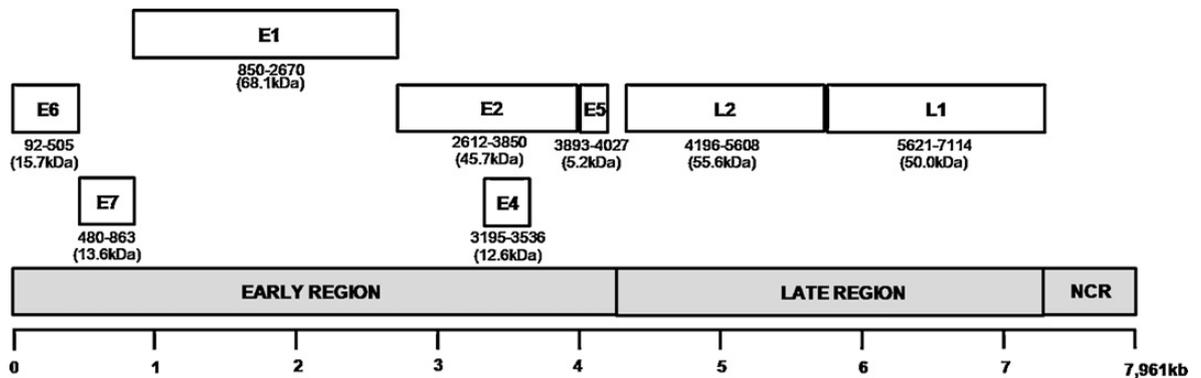


Abb. 3: Aufbau des BPV13-Genoms (aus Lunardi et al.; 2013a)

1.3 Sarkoidformen und Einteilung

Prinzipiell kann wie oben erwähnt zwischen sechs Sarkoidformen unterschieden werden:

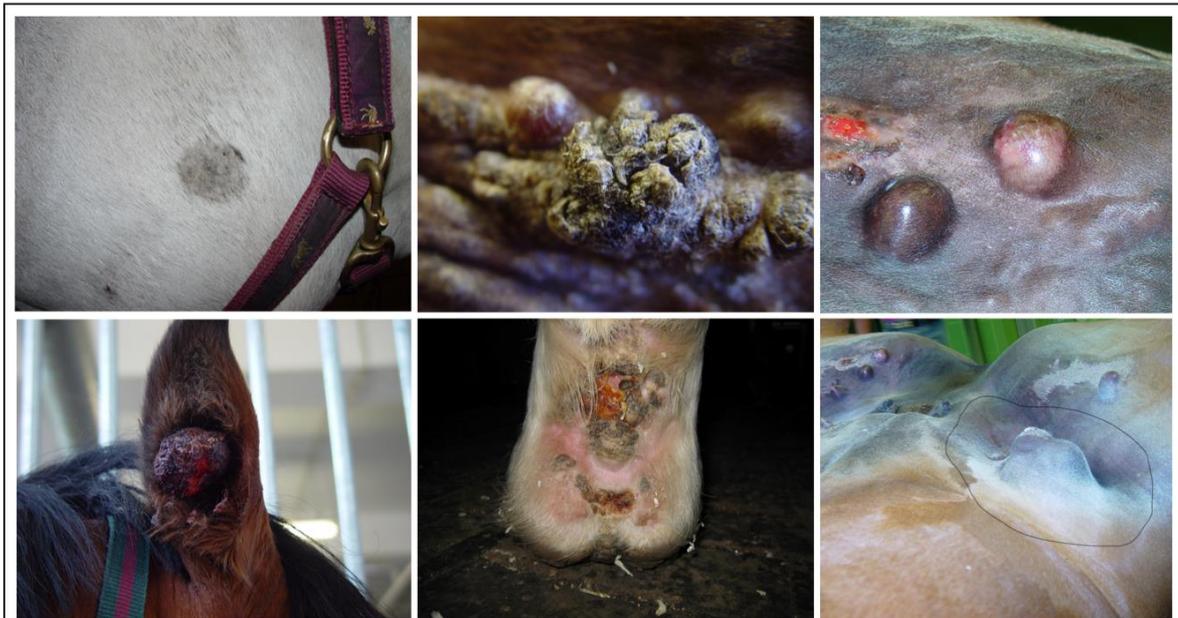


Abb. 4: Die sechs klinischen Sarkoidformen. Von links nach rechts: A: okkultes, B: verruköses, C: noduläres, D: fibroblastisches, E: gemischtes und F: malevolentes (siehe Markierung) Sarkoid

Das **okkulte Sarkoid** stellt sich optisch oft als haarlose, graue, schuppige, ev. hyperkeratotische Stelle dar. Oft weist das betroffene Areal eine rundliche Form auf (Abb. 4A). Es kommt bevorzugt an Stellen mit wenig Behaarung wie zum Beispiel Nüstern, Innenseite der Oberschenkel, Augenbereich und Maul vor. Es hat ein langsames Wachstum, kann sich aber bei entsprechendem Stimulus (wie zum Beispiel einer Verletzung) in das aggressive fibroblastische Sarkoid umwandeln (Hainisch and Brandt, 2015; Knottenbelt, 2005).

Histologisch beschreiben Martens et al. in ihrer Arbeit im Jahr 2000 eine milde Hyperkeratose der Epidermis in fünf von zehn okkulten Sarkoiden, in zwei aus fünf konnte außerdem eine Hyperplasie der Epidermis nachgewiesen werden. In der Dermis konnte bei 10/10 okkulten Sarkoiden eine Zunahme der Fibroblastendichte beschrieben werden (Martens et al., 2000).

Prinzipiell ist das equine Sarkoid histologisch immer ein Spindelzelltumor. Dies gilt für alle Sarkoidarten (Hainisch, Brandt; 2014).

Das **verruköse Sarkoid** ähnelt einer Warze und besitzt eine haarlose, raue, unregelmäßige, zerklüftete, eventuell schuppige Oberfläche. Es ist oft klar abgrenzbar, kann aber auch als flächige Veränderung vorkommen (Abb. 4B) (Hainisch and Brandt, 2015; Knottenbelt, 2009). Es kommt bevorzugt an Ohren, Achseln, Euter oder Präputium vor. Auch diese Sarkoidform wächst langsam, kann aber bei Stimuli (zum Beispiel eine Verletzung) in die aggressive fibroblastische Form übergehen.

Histologisch konnten Martens et al. in allen Fällen eine Hyperkeratose der Epidermis und in den meisten Fällen (8 und 9 aus 10) eine „Zapfennetz“ und eine palisadenartige Vorwölbung am Übergang der Verbindung ("junction") der Epidermis mit der Dermis (Stachelzellschicht) beschreiben. In der Dermis konnten in allen Fällen eine Verdichtung der Fibroblasten und in den meisten Fällen eine typische Windung (strudel- oder wirbelartig) der Fibroblastenanordnung und zystische Haarfollikel gefunden werden (Martens et al., 2000; Scott and Miller, 2003).

Unter palisadenartig versteht man, dass sich die in der Dermis liegenden Fibroblasten und Kollagenfasern im 90-Grad Winkel zueinander anordnen. Die Anordnung der Fibroblasten

am epidermal-dermalen Übergang in Palisadenform ist ein typisches, histologisches Kennzeichen für equine Sarkoide (Scott and Miller, 2003).

Das **noduläre Sarkoid** kommt als kugelig, unter einer intakten Epidermis liegender Tumor vor. Es kommt in gestielter oder der Haut fest aufsitzender Form vor und kann verschieblich oder unverschieblich sein. Entsprechend kann zwischen Typ A und B unterschieden werden. Bei Typ A kann klinisch keine Verbindung der Umfangsvermehrung zur Haut festgestellt werden. Die Haut kann frei darüber verschoben werden (Abb.4C). Bei Typ B besteht eine Verbindung zur Dermis. Die Masse kann nicht unter der Haut bewegt werden. Die Haut über dem Sarkoid kann haarlos und dünner als normal sein, sie kann ulzerieren, wodurch das Sarkoid in die fibroblastische Form übergeht.

Histologisch kommt es oft zu einer dünneren Epidermis, es kann aber auch zu einer palisadenartigen Vorwölbung an der Verbindung der Epidermis zur Unterhaut und zu einer milden Hyperkeratose der Epidermis kommen. Meist fehlen aber die Veränderungen an der Epidermis (Hainisch and Brandt, 2015; Scott and Miller, 2003). Die Dermis weist immer eine Verdichtung der Fibroblasten auf und typische Windungen in der Fibroblastenanordnung (Martens et al., 2000).

Das **fibroblastische Sarkoid** hingegen besitzt eine ulzerierende Oberfläche, aus der oft Exsudat austritt (Abb. 4D) . Es kann aus jeder anderen Sarkoidform durch Stimuli (meist Verletzungen, auch chirurgischer Art) hervorgehen und ist aggressiv wachsend. Es hat einen invasiven Charakter, die Abgrenzung zum gesunden Gewebe ist oft schwierig. Prinzipiell können fibroblastische Sarkoide in jeder Körperregion vorkommen, oft aber am Unterbauch und den Augen. Auch aus Verletzungen an den Beinen können sie hervorgehen (Hainisch and Brandt, 2015; Knottenbelt, 2009). Es kann bei fibroblastischen Sarkoiden zwischen Typ 1 (Abb. 4D) und Typ 2 unterschieden werden. Typ 1 wird wiederum in 1a und b unterteilt. 1a hat einen dünnen Stiel, der keine breite Verbindung zur Haut hat. Der Stiel ist oberflächlich mit der Haut verbunden und geht nicht in die Tiefe. 1b besitzt hingegen einen breiten Stiel, der sich in die Tiefe der Haut erstreckt. Der tiefe Anteil ist oft sehr invasiv und kann viel größer sein, als der oberflächlich sichtbare.

Typ 2 hat keinen Stiel, sondern eine breite, invasiv wachsende Basis, oft geht diese Form aus anderen Sarkoidformen oder Verletzungen hervor (Knottenbelt, 2005).

Histologisch kann in der Epidermis häufig eine Hyperkeratose, Hyperplasie, Ulzerationen an der Oberfläche und eine Vorwölbung der Verbindung zur Dermis beobachtet werden. Die Dermis weist histologisch eine Verdichtung der Fibroblasten und eine typische Windung (scherengitter- oder fischgrätenartig) der Fibroblastenanordnung auf (Martens et al., 2000; Scott, 2003).

Das **malevolente Sarkoid** ist die seltenste und auch aggressivste Sarkoidform. Es ist invasiv und schnell wachsend, oft geht es aus dem fibroblastischen oder nodulären Sarkoid hervor. Es wächst unter der gesunden Haut radiär und kann die lokalen Lymphgefäße infiltrieren, es kommt dann zu derben, knotigen Strängen entlang der Gefäße und der regionalen Lymphbahnen. Die knotigen Stränge sind zur Haut nicht verschieblich. Bevorzugte Stellen sind die Achselregion, Hals, Kopf und Oberschenkel (Abb. 4F) (Hainisch and Brandt, 2015; Knottenbelt, 2009).

Das **gemischte** Sarkoid besteht aus mehreren der oben genannten Formen (Abb. 4E). Es kann aus jeder der 5 anderen Sarkoidformen entstehen, zum Beispiel nach einer erfolglosen Behandlung. Bevorzugte Stellen sind: Gesicht, Achselregion, Bauch, Schenkelinnenseite.

1.4 Übertragung und Infektion

Schon im Jahr 1936 vermutete Jackson eine virale Ursache für die Entstehung von equinen Sarkoiden. Zu diesem Schluss kam er, indem er sich die Ausbreitungsmuster in Pferdeherden ansah (Jackson, 1936).

Um diese Vermutung zu bestätigen wurden später von verschiedenen Wissenschaftlern Übertragungsversuche durchgeführt, in denen zum Beispiel gesunde Pferdemit Sarkoidextrakt injiziert wurden. Dies versuchten auch Olson und Cook 1951 und stellten dabei fest, dass eine Übertragung nur dann erfolgreich ist, wenn die Haut vorher verletzt wurde (Olson and Cook, 1951). Auch Ragland und Spencer unternahmen Versuche, in

denen sie gesunden sarkoidfreien Pferden aus Kuhwarzen extrahiertes BPV injizierten, mit dem Ergebnis, dass diese Pferde sarkoidähnliche Läsionen entwickelten, die jedoch im Gegensatz zu natürlichen Sarkoiden eine spontane Remission zeigten. (Ragland und Spencer, 1969)

Der Beweis, dass BPV zur Ausbildung von equinen Sarkoiden führt, war also gegeben.

Martens et al wiesen mittels PCR, einer Methode mit hoher Sensitivität, bei 88 % der Sarkoidabklatschproben und bei 93% der Sarkoidgeschabsel DNS von BPV1 nach.

Insgesamt wurden in ihrem Versuch 92 Sarkoide untersucht (Martens et al., 2001).

Ähnliche Untersuchungen wurden auch von Bloch et al; 1994, Carr et al; 2001 und Otten et al. 1993 durchgeführt, die Nachweisrate von BPV 1 und 2 schwankte zwischen 73% (bei Bloch) und 96-100% (Bloch et al., 1994; Carr et al., 2001; Otten et al., 1993). Gründe für diese Schwankungsbreite können mit der Unterschiedlichen Aufbereitung der Proben (Formalinbehandlung) und mit unterschiedlichen Methoden zur Probengewinnung erklärt werden (Chambers et al., 2003a).

In allen oben genannten Versuchen wurden auch Proben von Pferden ohne Sarkoide getestet, hier konnte BPV nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte kein bovines Papillomvirus in equinen Papillomen, oder anderen Hauttumoren des Pferdes nachgewiesen werden (Carr et al., 2001).

Andererseits wurde auch berichtet, dass eine latente Infektion von Pferden möglich ist, die virale DNS in bzw. auf normalem Epithel nachgewiesen werden kann, ohne dass das Tier klinische Symptome zeigt. Durch einen Stimulus, wie zum Beispiel eine Verletzung könne es dann zur Aktivierung des BPV kommen und zur Ausbildung von Sarkoiden (Bogaert et al., 2008).

Bogaert testete in ihrer Arbeit Hautschuppen von gesunden Pferden, von Pferden, die mit „Sarkoidpferden“ gemeinsam gehalten wurden, von Pferden, die mit Kühen mit Warzen zusammengehalten wurden, und von Pferden mit Sarkoiden. Sie konnte an der Haut von Sarkoidpferden und Pferden, die mit Kühen gemeinsam gehalten wurden, zu 73% DNS von BPV nachweisen, zu 50% bei Pferden, die in Kontakt mit Sarkoidpferden lebten und zu 30% an der Haut von gesunden Pferden (Kontrollgruppe). Im peripheren Blut konnte keine BPV DNA nachgewiesen werden (Bogaert et al., 2008). Das Vorliegen von BPV

DNS in oder auf der Haut gesunder Pferde konnte jedoch bislang von anderen Gruppen nicht bestätigt werden (Pratscher et al., 2019).

Pratscher et al. (2019) konnten zeigen, dass, das E5-Genom mittels PCR in der Haut von gesunden Pferden nicht nachweisbar ist, in Sarkoiden war E5 hingegen in 130 von 130 getesteten Proben nachweisbar, und bei Hautveränderungen, die keine Sarkoide waren, in 13 von 70 getesteten Proben. Daraus lässt sich schließen, dass die Zeitspanne zwischen Infektion und Ausbildung von Sarkoiden vermutlich kurz ist, anders als zum Beispiel beim equinen Plattenepithelkarzinom, bei dem die Infektion durch das equine Papillomvirus 2 in jungen Jahren erfolgt, die tumorösen Hautveränderungen aber erst Jahre danach sichtbar werden (Pratscher et al. 2019).

Yuan et al. (Yuan et al., 2007) konnten BPV1 E1, E2 und E5 zum Teil in entzündlich veränderter Haut von Pferden nachweisen, was gut zu den von Pratscher et al. 2019 publizierten Daten passt, die ebenfalls BPV1/2 E5 in 13 Fällen von Dermatitis detektierten (Pratscher et al., 2019).

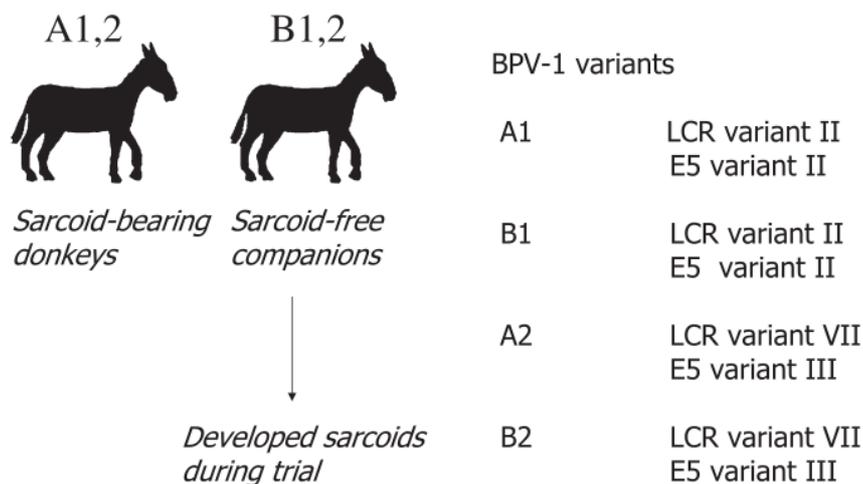


Abb. 5: Eselversuch (aus Nasir und Campo 2008)

Um die Übertragung von BPV von einem Equiden auf den anderen weiter zu untersuchen, haben Nasir und Campo folgenden Versuch durchgeführt: Zwei Esel mit Sarkoiden wurden

jeweils mit einem gesunden Esel in einer Box gehalten (Abb.5). Beide Esel ohne Sarkoide haben nach wenigen Monaten Sarkoide entwickelt. Die Sarkoide wurden anschließend auf die Anwesenheit von BPV1-Varianten getestet, das Ergebnis zeigte, dass die virale Sequenz bei den jeweiligen Paaren die gleiche war, aber zwischen den Paaren eine unterschiedliche. Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich der zu Beginn des Versuchs sarkoidfreie Esel bei seinem entsprechenden Partner angesteckt hat (Nasir und Campo, 2008).

Der genaue Mechanismus, mit dem Pferde bovine Papillomviren auf andere Artgenossen übertragen, ist nach wie vor nicht vollständig geklärt.

Die DNS von BPV kann zwar in Sarkoiden seit jeher nachgewiesen werden, vollständige Viruspartikel konnten jedoch die längste Zeit in Sarkoiden nicht nachgewiesen werden, was zu der Vermutung führte, dass es zu keiner produktiven Virusvermehrung im Sarkoid kommt (Amtmann et al., 1980; Chambers et al., 2003a; Nasir und Reid, 2006). Stattdessen schien die DNS in episomaler Form in dermalen Fibroblasten zu residieren (Amtmann et al., 1980; Chambers et al., 2003a; Nasir und Reid, 2006).

Andererseits konnten Brandt et al. 2008 mittels Immunocapture PCR Virionen-artige Strukturen in Sarkoiden nachweisen. Dieser Nachweis legt die Vermutung nahe, dass auch beim Pferd neue Virionen gebildet werden (Brandt et al., 2008).

Von BPV-Infektionen bei Rindern weiß man, dass die Produktion von Virionen an den Differenzierungsgrad der Zellen gebunden ist. So werden die frühen Proteine in tieferen, weniger gut differenzierten Schichten der Basalmembran exprimiert und die Expression der späten Proteine beschränkt sich auf die gut differenzierten, oberflächlichen Hautschichten (Nasir and Campo, 2008). Auf Basis dieses Wissens geht man davon aus, dass L1 Proteine beim Pferd, sofern welche gebildet werden, ebenfalls in der Epidermis nachzuweisen sind.

Außerdem ist davon auszugehen, dass für die Infektion eine kleine Verletzung notwendig ist, da die primäre Infektion an der Basalmembran erfolgt.

In einem weiteren Versuch testeten Brandt et al. 2011 daher mikrosezierte Epidermis von acht Sarkoiden auf BPV Infektion, um festzustellen ob diese produktiv ist. Hierfür wurden zunächst mittels PCR mikrosezierte Sarkoid-Epidermis und -Dermis auf BPV DNS untersucht. In allen Proben konnte diese festgestellt werden. Anschließend wurde mit Immunfluoreszenz und Immunhistochemie in der Epidermis nach E5 und L1 Proteinen gesucht. E5 konnte in der Epidermis aller getesteten Sarkoide nachgewiesen werden, L1 bei einem Fall in der verhornenden Schicht der Epidermis. BPV1-Infektionen scheinen also auch beim Pferd in einigen Fällen produktiv zu sein (Brandt et al., 2011).

Alleine der Kontakt mit BPV scheint allerdings nicht auszureichen, um eine Infektion und anschließend Sarkoide auszubilden. Anders lässt sich nicht erklären, warum nicht alle Tiere einer Herde, die mit infizierten Tieren zusammenleben, Sarkoide ausbilden. Es scheint naheliegend, dass die meisten Pferde die Infektion auf Basis eines funktionierenden Immunsystems abwehren können, wie es auch im Humanbereich bei humaner Papillomvirus (HPV)-Infektion der Fall ist (Brandt, 2016).

Weiters scheint es eine genetische Prädisposition für die Entwicklung von Sarkoiden zu geben. So berichteten Angelos et al., dass Quarter Horses zwei Mal so oft an Sarkoiden erkranken, wie Traber. Auch Appaloosa und Araber scheinen häufiger von Sarkoiden betroffen zu sein, als andere Pferderassen (Angelos et al., 1991; Bergvall, 2013).

Außerdem scheint es einen Zusammenhang zwischen bestimmten Allelen des equinen MHC und der Ausbildung von Sarkoiden zu geben. So kommt es bei Trabern mit dem MHC Klasse II Haplotyp W3 und dem MHC Klasse I Haplotyp B1 öfters zur Ausbildung von Sarkoiden (Meredith et al., 1986).

Broström et al. konnten 1988 außerdem beweisen, dass Pferde der Rasse schwedisches Halbblut mit MHC Klasse II Haplotyp W13 zu Sarkoidbildung prädisponiert sind.

Auch soll es einen Zusammenhang zwischen dem Wiederauftreten von Sarkoiden nach chirurgischer Entfernung und dem W13 Haplotyp, sowie zwischen dem frühen Auftreten von Sarkoiden und dem A5 Haplotyp geben (Broström et al., 1988).

Auch scheinen junge, männliche Pferde häufiger von Sarkoiden betroffen zu sein (Scott and Miller, 2003). Pratscher et al. beschreiben, dass die von Sarkoiden betroffenen Pferden

in ihrer Studie im Mittel 8,5 Jahre alt waren. Die Altersgruppe von 6-10 Jahren machte 2/3 der Sarkoidpatienten aus. Insgesamt wurden 130 Pferde mit diagnostizierten Sarkoiden getestet, eine Geschlechtsprävalenz wurde jedoch nicht festgestellt (Pratscher et al., 2019).

Für die Übertragung von BPV von einem Tier auf das andere konnten mögliche Vektoren ausfindig gemacht werden. Finlay et al. konnte in ihrer Arbeit BPV1-DNS in Fliegen, die sich in der Nähe von Sarkoiden aufgehalten hatten, nachweisen. Sequenzanalysen der LCR von BPVI ergaben, dass die Sequenzen in Fliegen genau jene waren, die normal in BPVI-induzierten Sarkoiden nachgewiesen werden können (Finlay et al., 2009).

Diese Arbeit unterstützt die Vermutung, dass Fliegen als Vektoren eine Rolle bei der Übertragung von BPV spielen könnten. Auch Kemp-Symonds konnte BPV1-DNS in Fliegen nachweisen, die an typischen Stellen saßen, an denen Sarkoide häufig vorkommen, wie zum Beispiel an Wunden, oder im Kopf/Augenbereich (Kemp-Symonds, 2000).

Auch ist die Übertragung durch die Benützung des gleichen Putzzeugs, derselben Ausrüstung etc. für Pferde ohne Sarkoide und Pferden mit Sarkoiden eine mögliche Übertragungsquelle (Abel-Reichwald et al., 2016; Chambers et al., 2003a).

Ist bereits eine Infektion mit BPV erfolgt, spielt das Immunsystem, vor allem bei der Persistenz bzw. selten vorkommenden spontanen Regression von Sarkoiden eine Rolle.

Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, führt das E5 Onkoprotein zu einer Herabregulierung des MHC Klasse I, wodurch Antigene nicht mehr an der Zelloberfläche präsentiert werden können, dadurch erkennen die zytotoxischen T Zellen die infizierte Zelle nicht. Dieser Mechanismus stellt also einen effektiven Weg der Immunumgehung dar (Marchetti et al., 2009). Darunter versteht man spezifische Mechanismen, mit denen Pathogene eine Reaktion des Immunsystems verhindern. Das Immunsystem erkennt die veränderten Zellen nicht und somit kann der Tumor bestehen (persistent) bleiben.

1.5 Diagnostik

Wie bei allen Tumorerkrankungen kann eine sichere Diagnose durch histopathologische Tumoruntersuchung erfolgen. Hierfür muss mit einer Teilbiopsie oder einer Exzisionsbiopsie (gesamter Tumor wird entfernt) Tumorgewebe entnommen werden. Da eine Biopsie (vor allem Teilbiopsie) eine invasive Maßnahme ist, die das Tumorwachstum anregen kann, bzw. dazu führen kann, dass ein langsam wachsender Tumor in eine aggressivere Form übergeht, nehmen viele Tierärzte Abstand zu dieser Methode (Haspelslagh et al., 2016). Eine Exzisionsbiopsie ist außerdem nicht immer möglich und vom Besitzer erwünscht, weshalb die Diagnose equines Sarkoid oft eine Blickdiagnose ist. Dabei werden vor allem das Aussehen und die Lokalisation der Läsion in Betracht gezogen.

In ihrer Arbeit im Jahr 2018 haben Koch et al. die Sensitivität und Spezifität dieser Blickdiagnosen bestimmt (Koch et al., 2018a). Hierfür mussten praktische Tierärzte und Studenten Sarkoide auf Fotos erkennen, zusätzlich bekamen sie Information über:

- Alter, Rasse, Geschlecht
- die Lokalisation der Läsion
- Progression der Läsion
- Präsenz von anderen Hautläsionen
- Vorbehandlung und das Ansprechen darauf

Die Erfolgsrate lag bei 82%, die Sensitivität lag bei 83,3% und die Spezifität bei 79,6%. In der Testpopulation lag eine 66% Prävalenz von Sarkoiden vor.

Um diese Werte zu verbessern, wurde von Haspelslagh et al. 2018 ein diagnostisches Tool entworfen, um die Diagnostik zu erleichtern:

		Score if positive	Case score
1. Age			
<1 year old		-4	0
2-7 years old		2	2
7-17 years old		1	0
18 years or older		0	0
Weighted subscore (weighting coefficient = 2)			4
2. History			
No information	(Also: slow continuous growth)	1	0
Recurrence	After therapy that was (at least temporarily) successful in reducing the lesion	3	0
Growth behaviour	Rapid growth (spurts) observed	2	2
	Growth triggered by wounding	2	0
	Changes in morphology over time	4	4
Weighted subscore (weighting coefficient = 1)			6
3. Number of lesions			
Solitary	No other lesions described/found	1	1
Multiple	2-10 lesions with similar (ES-typical) morphology	2	0
	>10 lesions with similar (ES-typical) morphology	3	0
Weighted subscore (weighting coefficient = 2)			2
4. Localisation			
Typical localisation of ES	Periocular or auricular	2	0
Atypical localisation	Lip or cheek	1	0
	Neck: atlas/parotid region, jugular groove, lower neck	1	0
	Chest, axilla, antebrachium, shoulder	2	0
	Girth and ventrum near midline	2	0
	Inguinal region and inside of the thigh, fold of the knee	3	0
	Prepuce or teats/scrotum (but not shaft of the penis or glans)	3	0
	Fetlock or pastern	1	0
	Back, saddle region, perineum, muco-cutaneous junctions, penile shaft, glans or clitoris, tail or crest of the neck, . . .	-2	-2
Weighted subscore (weighting coefficient = 2)			-4
5. Lesion morphology			
Occult	Flat ('thin-skinned'), circular, hairless lesion with hyperkeratotic surface and small (2 mm) granules	2	0
Verrucose	Wart-like, raised hairless cutaneous mass with variable hyperkeratosis	2	0
Nodular	Spherical, firm subcutaneous or cutaneous mass	1	1
Fibroblastic	Fleshy (pedunculated or sessile) proliferation with an ulcerated surface	1	0
Mixed	More than one morphological type (occult, verrucose, nodular, fibroblastic) is present, without one type clearly predominating	3	0
Atypical ulcerated	Predominantly destructive/ulcerative process <u>or</u> chronic wound healing by second intention with finely granulated surface	-2	0
Weighted score (weighting coefficient = 2)			2
Total weighted score			10
Biopsy recommended → 5 > total score < 15			
likely ES → total score = or > 15			
likely non-ES → total score = or < 5			

Abb. 6: Diagnostisches Tool von Haspeslagh et al. (aus Haspeslagh et al. 2018)

Umso höher die zum Schluss erreichte Punktezahl ist, desto wahrscheinlicher handelt es sich um ein equines Sarkoid. Bei einer Punktezahl zwischen 15 und fünf wird eine Biopsie empfohlen, bei unter fünf Punkten ist ein equines Sarkoid unwahrscheinlich.

Haspeslagh stellte fest, dass die Erfolgsrate einer richtigen Diagnose mit dem Tool bei praktischen Tierärzten von 82% auf 83 % und bei den Anfängern von 79,2% auf 85,7% gestiegen war.

Des weiteren kann eine Diagnostik mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) erfolgen. Diese Methode besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität. Hierzu wird mittels spezifischer Primer ein viraler Genabschnitt nachgewiesen. Dazu müssen Haare mit deren Wurzel oder Krusten/ Schuppen von Sarkoiden eingeschendet werden, aus denen DNS isoliert und einer virusspezifischen PCR unterzogen wird.

Empfehlenswert ist bei einer Biopsie, die PCR-Diagnostik mit der Histologie zu kombinieren, da der histologische Befund oft Spielraum für Differentialdiagnosen lässt. Die in der Histologie zu erwartenden Befunden wurden in dieser Arbeit bereits bei den Sarkoidformen angeführt.

Wichtige mögliche Differentialdiagnosen zum equinen Sarkoid wären: Das Melanom, Hypergranulationsgewebe, gerade an der distalen Extremität des Pferdes, das Plattenepithelkarzinom (hier wären die Prädilektionsstellen vor allem das dritte Augenlid und der Penis), eosinophile Granulome und das Melanozytom (Knottenbelt, 2009).

1.6 Therapie

Für die Therapie des equinen Sarkoids ist keine einheitliche Strategie beschrieben. Wichtig ist aber, jedes Sarkoid zu behandeln und zwar möglichst aggressiv. Ziel ist es, Rezidive zu vermeiden. Im Laufe der Jahre haben sich verschiedene Therapieformen als mehr oder weniger erfolgreich erwiesen. Nach Knottenbelt 2019 gibt es rund 40 verschiedene Behandlungsmöglichkeiten, die sich in sieben Kategorien gliedern lassen (Knottenbelt, 2019):

- Chirurgie
- Chemotherapie
- Immuntherapie
- Genterapie
- Radiotherapie
- Fotodynamik und Phytotherapie
- andere Therapieformen

Zur Auswahl der richtigen Therapie sollten nach Knottenbelt (2019) folgende Punkte berücksichtigt werden:

1. Sarkoid-Typ
 2. Sarkoid-Lokalisation
 3. Sarkoid-Ausdehnung/Verteilung, multiple oder einzelne Sarkoide
 4. Zeitraum, seit dem das Sarkoid besteht
-

5. Vorbehandlungen
6. Prognose
7. Logistik der Behandlung
8. Wert des Pferdes
9. Kosten der Behandlung
10. Dauer der Behandlung
11. Kooperationsbereitschaft des Besitzers
12. Kooperationsbereitschaft des Pferds

Aus: Knottenbelt; The equine Sarcoïd. Why are there so many treatment options; 2019

Prinzipiell sind einzelne, gut abgrenzbare Sarkoïde an gut zugänglichen Stellen mit viel loser/lockerer Haut besser zu behandeln, als multiple, nicht gut abgrenzbare Sarkoïde an Stellen mit wenig lockerer Haut, wie zum Beispiel am Auge, oder an distalen Extremitäten. Im Folgenden werde ich kurz auf die aus meiner Sicht wirksamsten und am häufigsten angewandten Behandlungsmethoden eingehen.

1. Chirurgische Entfernung des Sarkoïds:

Hierbei muss zwischen der Entfernung mit dem Skalpell, der Elektrochirurgie, Laserchirurgie, der Kryochirurgie und der Ligatur unterschieden werden (Knottenbelt, 2019).

Bei der traditionellen scharfen Entfernung mit dem Skalpell ist es wichtig, die chirurgischen Prinzipien der Tumorchirurgie einzuhalten. Diese besagen, dass der Tumor zur Gänze und in seiner Vollständigkeit entfernt werden muss, eine Verteilung der Zellen im Operationsbereich muss unbedingt verhindert werden, zudem sollten die Ränder der Operationswunde keine Tumorzellen mehr enthalten. Dafür sollte der Schnitttrand 1-2 cm vom sichtbaren Rand des Tumors entfernt sein. Werden diese Prinzipien nicht eingehalten, kommt es mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einem Tumorrezessiv (Knottenbelt, 2019).

Je nach Stelle, Abgrenzbarkeit und Art des Sarkoïds kann es aber unter Umständen sehr schwierig bis unmöglich sein, diese Prinzipien vollständig einzuhalten. Bei schlecht

abgrenzbaren Sarkoiden ist zum Beispiel ein tumorzellfreier Wundrand kaum möglich (Knottenbelt, 2019).

Ann Martens wies in ihrer Arbeit in 33% der Schnittränder chirurgisch entfernter Sarkoide mit einem Rand von 1,6 cm BPV DNS mittels PCR nach (Martens et al., 2001).

Des Weiteren, konnte Brandt et al. 2008 in intakter Haut von Pferden mit Sarkoiden BPV DNA nachweisen (Brandt et al. 2008). Eine Entfernung des gesamten Tumors ist somit, quasi unmöglich, da eine Abgrenzung zum gesunden Gewebe schwierig ist.

Aufgrund dessen ist eine Kombination der chirurgischen Entfernung mit anderen Methoden empfehlenswert.

Eine andere chirurgische Methode ist die Entfernung des Sarkoids mittels Elektrochirurgie, diese Methode hat eine 87,8%ige Erfolgsrate in der von Haspeslagh et al. von 2008-2013 durchgeführten Studie (Haspeslagh et al., 2016).

Compston et al. führte eine Studie über die Behandlung von Sarkoiden mittels Laserchirurgie durch, 99 Pferde wurden ein oder mehrere Sarkoide mittels Laser entfernt, 83% hatten kein Sarkoid-Rezidiv. In Kombination mit Iridium-Behandlung lag der Erfolg bei 81-100%, bei einer Kombination mit Cisplatin bei 87%-100%.

Von den 17 Pferden mit Rezidiven bekamen die meisten diese im ersten halben Jahr nach der Operation (Compston et al., 2016).

Der Laser arbeitet mit einer Wellenlänge, die nur von Flüssigkeiten absorbiert wird.

Dadurch kommt es zu einer Koagulation von kleinen Blutgefäßen und Lymphgefäßen, wodurch eine Verteilung der Tumorzellen durch das Lymphsystem verhindert wird (Compston et al., 2016; Fürst et al., 2009).

Eine schon seit Jahren mit teilweise gutem Erfolg praktizierte Methode ist die Ligatur eines Sarkoids. Diese Methode ist für Sarkoide geeignet, die einen Stiel haben bzw. bei denen sich ein Stiel durch die Ligatur schaffen lässt (Knottenbelt, 2019). Dies sind oft noduläre oder fibroblastische Sarkoide. Durch die Ligatur wird die Blutzufuhr zum Tumor abgeschnürt, wodurch das Gewebe nicht mehr durchblutet wird und abstirbt (Knottenbelt; 2019). Das Ligaturmaterial kann elastisch oder unelastisch sein, meist wird Nahtmaterial, Elastratorringe, oder die Lycraligatur verwendet. Die Lycraligatur eignet sich vor allem für

größere Tumoren, die nicht mit den Elastratorringen behandelt werden können (Öffnung der Ringe kann auf maximal 4 cm gedehnt werden) (Hainisch, 2014). Da man auch bei dieser Methode nicht sicher sein kann, dass alle zurückgebliebenen Zellen BPV-frei sind, wird die Kombination mit einer anderen Methode wie Kryotherapie oder Chemotherapie empfohlen (Knottenbelt, 2019).

Die Kryochirurgie ist die letzte chirurgische Methode, die in dieser Arbeit besprochen wird. Dabei wird der Tumor schnell auf mindestens -20 °C abgekühlt, das umliegende Gewebe muss dabei geschützt werden. Anschließend erfolgt ein langsamer Anstieg der Temperatur im Gewebe auf Raumtemperatur, wodurch es zur Bildung großer Eiskristalle kommt und die äußere Zellmembran zerplatzt. Außerdem kommt es zur Thrombenbildung in den Blutgefäßen, wodurch die Blutversorgung unterbrochen wird. Die Folge ist eine Nekrose des Tumorgewebes (Fürst et al., 2009). Auch diese Methode kann in Kombination mit anderen Methoden durchgeführt werden.

2. Chemotherapie:

Diese kann sowohl systemisch, als auch topisch, in Form von Salben oder intraläsional erfolgen. Die systemische Applikation wird selten angewandt, ist aber eine Behandlungsoption bei Pferden mit multiplen, weit verteilten Sarkoiden, die anders kaum mehr zu behandeln sind (Knottenbelt, 2019).

Oft hingegen werden Chemotherapeutika in Salbenform lokal angewendet. Knottenbelt beschreibt in seiner Arbeit von 2019 die Anwendung von 5-Fluorouracil. Dieses Chemotherapeutikum ist vor allem bei oberflächlichen verrukösen oder okkulten Sarkoiden Erfolg versprechend.

Die Liverpoolsalbe, auch AW 5 genannt, wurde an der Universität in Liverpool entwickelt. Sie besteht aus einer Kombination von 5-Fluorouracil, Thiouracil und verschiedenen Schwermetallen. Es wird von einer Erfolgsrate zwischen 75 und 80% berichtet (Knottenbelt, 2019; Fürst et al., 2009)

Kontraindiziert ist sie am Auge und in Regionen des Gesichts, in der Nerven und andere wichtige Strukturen verlaufen, da sie zu einer heftigen Entzündungsreaktion führt, die diese Strukturen wiederum schädigen könnte (Knottenbelt; 2019).

Für die intraläsionale Chemotherapie wird meist Cisplatin verwendet. Finlay et al. konnte 2012 zeigen, dass Fibroblasten, welche durch BPV verändert sind, sensitiver auf Cisplatin ansprechen, als gesunde. Cisplatin kann als Lösung direkt in das Sarkoid injiziert werden, oder auch als Suspension mit sterilem Sesamöl verwendet werden, dies verlängert die Halbwertszeit von Cisplatin auf 10 Tage (Fürst et al., 2009).

Eine weitere gute Möglichkeit der Cisplatin-Applikation sind Cisplatinbeads, diese werden meist bei der chirurgischen Entfernung des Sarkoids ins Wundbett gelegt. Die Beads haben gegenüber einer normalen Cisplatininjektion den Vorteil, dass sie ihren Wirkstoff über lange Zeit abgeben.

Hewes und Sullins führten eine Studie zur Verwendung von Cisplatinbeads bei Hauttumoren beim Pferd durch. Elf von 13 mit Cisplatinbeads-behandelten Pferde hatten in den darauffolgenden Jahren kein Sarkoidrezidiv (Hewes and Sullins, 2006).

Bei allen chemotherapeutischen Behandlungen sind meist mehrere Behandlungen im Abstand mehrerer Wochen notwendig.

Gewissermaßen eine Sonderform der Chemotherapie ist die Behandlung mit Acyclovir, einem Virostatikum, welches beim Menschen für die Therapie von Herpes Simplex eingesetzt wird. Acyclovir wird in Salbenform auf die tumorösen Stellen aufgetragen. Stadler et al. testeten die Wirksamkeit von 5% Acyclovirsalbe bei 22 von Sarkoiden betroffenen Pferden. 100% der behandelten Sarkoide zeigten eine positive Veränderung durch die Behandlung mit Acyclovir, eine komplette Regression konnte in 68% der Fälle erreicht werden. Bei 5 Pferden wurde zuvor eine chirurgische Entfernung von Tumorteilen vorgenommen (Stadler et al., 2011).

2017 hingegen konnten Haspeslagh et al. in einer Doppelblindstudie keinen nennenswerten Effekt der Acyclovirsalbe gegenüber Placebo bei Sarkoiden feststellen (Haspeslagh et al.; 2017).

3. Immuntherapie:

Hierzu zählen die Immunmodulation mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG), Impfungen und die autologe Transplantation.

Der BCG-Impfstoff besteht aus inaktivem *Mycobacterium bovis*, bzw. neuere Impfstoffe nur noch aus wirksamen Zellwandantigenen (Fürst et al., 2009). Der BCG-Impfstoff wird direkt in den Tumor injiziert und steigert die zelluläre Immunantwort, wodurch der Tumor eliminiert werden soll (Fürst et al., 2009). Vanselow et al. verzeichneten in ihrer Studie von 1988 bei 59% der behandelten Sarkoide eine komplette Regression (Vanselow et al., 1988). Andere Studien wie die von Klein et al. verzeichneten einen 100%igen Erfolg in Kombination mit Kryotherapie und einen 70%igen Erfolg bei der reinen Anwendung von BCG-Zellwandantigenen (Klein et al., 1986; Knottenbelt, 2019).

Ashrafi et al. konnten einen möglichen Erfolg bei der Behandlung von Eseln, die Sarkoide aufwiesen, mit chimärischen virusartigen Partikeln verzeichnen. Jene Esel in der geimpften Gruppe zeigten zumindest eine Tendenz zu Regression der Sarkoide im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Ashrafi et al., 2008).

Bei der Autotransplantation wird dem Patienten Tumormaterial entnommen, die Zellen im flüssigen Stickstoff inaktiviert und dem Pferd am Hals unter die Haut transplantiert. Espy verzeichnete mit dieser Methode bei 12 von 15 Pferden eine vollständige Regression des Sarkoids (Espy, 2008). Die Komplikationsrate wird von einigen Tierärzten allerdings als hoch beschreiben (Knottenbelt, 2019).

Rothacker et al. beschreiben eine 46%ige Komplikationsrate, klinische Regression konnte in 68% der Tumoren beobachtet werden, in 93% hat sich die Größe der Sarkoide verkleinert (Rothacker et al., 2015).

1.7 Prävention

BPV1 und 2 sind wesentlich an der Entwicklung von equinen Sarkoiden beteiligt. Wie in dieser Arbeit schon beschrieben, wird davon ausgegangen, dass eine Übertragung von Rind zu Pferd, aber auch von Pferd zu Pferd auch durch Vektoren möglich ist. Außerdem konnten in Sarkoiden auch BPV-Virionen nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass diese über Wochen hinweg infektiös sein können (Hainisch and Brandt, 2015).

Eine wichtige präventive Maßnahme ist daher, für jedes Pferd eigene Ausrüstung, wie zum Beispiel Putzzeug, Satteldecken, Vorderzeug etc. zu haben und zu verwenden. Dies gilt natürlich insbesondere für Pferde, die von Sarkoiden betroffen sind.

Es ist auch zu empfehlen, Pferde mit Sarkoiden nicht mit gesunden Pferden zusammen zu halten, soweit dies möglich ist. Eine Alternative wäre, erkrankte Pferde nur mit älteren Pferden auf die Koppel zu stellen, da diese ein geringeres Risiko haben, Sarkoide zu bekommen. Gesunde Pferde sollten nicht in die Box von Sarkoidpferden gestellt werden (Hainisch und Brandt, 2015).

Weitere wichtige Vektoren sind, neben den Ausrüstungsgegenständen, womöglich stechende Insekten. Deshalb ist es wichtig, einen guten Insektenschutz zu betreiben, d.h. die Pferde in der Insektenzeit mit Fliegenspray einzusprühen, Fliegen bzw. Ekzemerdecken und Fliegenhauben zu verwenden. Wenn möglich sollte man Pferde in der Dämmerung und in den Abendstunden, in der die Insekten besonders viel unterwegs sind, in den Stallungen belassen.

An einer zuverlässigen Schutzimpfung gegen BPV1 und 2 wird momentan geforscht. Hainisch et al. stellten BPV1-artige Partikel (VLP) aus L1 Protein her und impften je vier Pferde mit 50 µl, 100 µl und 150 µl dieser VLPs. Eine Kontrollgruppe von drei Pferden wurde mit dem reinen Adjuvans des Impfstoffes geimpft. Die Pferde erhielten den Impfstoff an den Tagen 0, 28 und 168. Zwei Wochen nach der 3. Impfung konnte bei allen geimpften Pferden ein Antikörpertiter von >1600 Plaque-bildenden Einheiten nachgewiesen werden. Acht von zehn Pferden konnten diesen Titer auch noch ein Jahr nach der letzten Impfung aufweisen (Hainisch et al., 2012). In weiteren Schritten konnte gezeigt werden, dass gegen diese VLPs gerichtete Antikörper auch BPV2 neutralisieren (Shafti-Keramat et al., 2009), der Impfstoff Pferde hoch effizient vor experimenteller Infektion mit BPV1 und 2 schützt (Hainisch et al., 2016), und dieser Schutz auch lange anhaltend ist (Harnacker et al., 2017). Derzeit wird an der Zulassung des Impfstoffs durch die EMA gearbeitet.

1.8 Fragestellung und klinische Relevanz der Diplomarbeit

Lunardi et al. konnten 2013 wie in dieser Arbeit schon erwähnt, in equinen Sarkoiden von zwei brasilianischen Pferden einen neuen BPV-Typ (BPV13) nachweisen.

In dieser Arbeit soll die Frage geklärt werden, ob sich BPV13 auch in Sarkoiden bei in Österreich lebenden Pferde nachweisen lässt.

Die klinische Relevanz dieser Forschung ergibt sich daraus, dass BPV13, sollte es nachgewiesen werden, in die zukünftige Diagnostik und Therapie, vor allem aber auch als Schutzimpfungs-komponente mit einbezogen werden muss.

Gegen BPV1/2-gerichtete prophylaktische, aber auch immuntherapeutische Vakzinen werden in Zukunft einen immer größeren Stellenwert einnehmen, weshalb es unerlässlich ist, zu überprüfen, ob der in Brasilien entdeckte BPV-Typ 13 auch in Mitteleuropa am Beispiel Österreich vorkommt.

2 Material und Methoden

2.1 Material:

Für diese Arbeit wurden ursprünglich 155 DNS-Isolate aus nachweislich BPV1/2-positiven diagnostizierten Sarkoiden bzw. vermuteten Sarkoiden aus dem Archiv der RGO (Research Group Oncology; Veterinärmedizinische Universität Wien) verwendet. Die Tumorproben selbst entstammten Pferden, die an der Vetmeduni Pferdeklinik oder beim Haustierarzt mit Hauttumoren vorstellig geworden waren. Die DNS-Isolate wurden bei -20 °C aufbewahrt. Die DNS-Isolate waren teilweise bis zu zehn Jahre alt und in der Vergangenheit zum Teil auch wiederholt aufgetaut und eingefroren worden. Aus diesem Grund wurden alle DNS-Isolate zunächst einer doppelten Qualitätskontrolle unterzogen: Diese bestand zunächst daraus, die DNS-Konzentrationen photometrisch nachzumessen. In einem zweiten Schritt wurde die PCR-Kompatibilität der einzelnen DNS-Isolate ermittelt.

2.2 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration

Mittels NanoDrop One Spektralphotometer (ThermoScientific™, Wien, Österreich) wurden die jeweiligen DNS-Konzentrationen bestimmt. DNS-Isolate mit einer zu geringen (< 9 ng/μl), bzw. nicht messbaren Konzentration wurden ausgeschieden (n =9).

In einem nächsten Schritt wurde eine Tabelle zu den verbleibenden 146 Proben nebst aller verfügbarer Informationen zu Namen des Pferdes, Farbe, Alter, Rasse, Geschlecht, Art des Sarkoids und Art der entnommenen Probe generiert. Diese Informationen wurden großteils dem TIS (Tierinformationssystem) der Veterinärmedizinischen Universität Wien oder Aufzeichnungen des RGO entnommen. Zu den von Haustierärzten eingesandten Proben gab es oft keinerlei weitere Information (Tabelle 1).

Table 1: Probentabelle

Proben							
№	Name	G	A	Rasse	Farbe	Diagnose	Läsionale DNS aus
BPV1/2 E5 DNS-positive Pferde (n= 146)							
Pferde mit diagnostizierten equinen Sarkoiden (ES; n = 60)							
1	Bogar	w	20	Nonius	Rappe	multiple ES Präputium	Schuppen
2	Whizzkid	w	11	Hannoveraner	Brauner	ES Präputium	Gewebe
3	Vivian	s	8	ÖWB		ES Ohr	Schuppen
4	Einstein	w	9	Westfale	Brauner	multiple ES Präputium	Gewebe
5	Buddha	s	3	Quarter Horse	Fuchs	multiple ES	Schuppen
6	Pedro	w				ES	Schuppen
7	Filou	w	8	Connemara		ES Abszess Samenstränge	Abstrich
8	C'au d'Or	w	15	Tschech. WB	Fuchs	noduläre, okkulte ES	Gewebe
9	Legacy	w	12	WB	Fuchs	fibroblastisches ES Präputium	Schuppen
10	Clio Morana	s	11	Araber	Fuchs	noduläres ES	Gewebe
11	Ikarus	w	12	WB	Schimmel	ES Präputium	Gewebe
12	Little Lady	s	11	ÖWB	Brauner	noduläres ES	Gewebe
13	Robbi	w	16	Welsh Pony		ES Femoralregion	Gewebe
14	N.N.(Petra)	w	11	WB		fibroblastisches ES	Schuppen
15	Walker	w	5	ÖWB	Fuchs	ES	Gewebe
16	Windsor	s	8	Hannoveraner	Rappe	multiple ES	Gewebe
17	Symphony	s	6	ÖWB	Brauner	ES	Gewebe
18	Pamina's F.	s	8	Deutsch. WB	Fuchs	ES Gurtlage	Gewebe
19	Calderon	w	12	Holsteiner	Brauner	noduläres ES Präputium	Schuppen
20	Jessi	s		Pony	Falbe	ES	Schuppen
21	Frisco	w	10	WB	Rappe	okkulte, verruköse ES	Schuppen
22	Fulminant	w	13	WB		ES Präputium	Gewebe
23	Legolas	w	6	WB		ES	Schuppen
24	Baby Schl.	w	5	Vollblut		Hypergranulationsgewebe	Gewebe
25	Eric	w	27	KWPN		multiple ES	Gewebe
26	Sorrel P. B.	w		Quarter	Fuchs	ES linkes Auge	Gewebe
27	Röskur	w	9	Isländer	Schecke	ES	Schuppen
28	Xena	s				ES	Schuppen
29	Atena	s	13	ÖWB	Rappe	multiple ES	Gewebe

30	Karino	h	20	Trakehner		ES	Gewebe
31	Goldfire	w	4	WB		ES	Schuppen
32	Novista	s				ES	Gewebe
33	Allegra	s	10	Lipizzaner	Schimmel	multiple ES	Gewebe
34	Whisper	w	3	WB	Fuchs	ES Achselregion	Schuppen
35	Maurice	w	7	WB	Rappe	multiple ES	Schuppen
36	Grane	s	17	Vollblut		ES Wunde	Gewebe
37	Dailey R	s	7	Traber	Brauner	ES Präputium	Gewebe
38	Arwen	s				ES	Schuppen
39	Art	w				ES	Schuppen
40	Fedora	s		WB		Noduläre, okkulte ES	Schuppen
41	Rasputin	w	4	Cob	Schecke	fibroblastisches ES Ohr	Gewebe
42	Livia	s	10	Freiberger	Brauner	multiple ES	Gewebe
43	Rebel	w	6	Holsteiner	braun	ES, Dermatitis (Bein)	Gewebe
44	Andi	w	6	Isländer	Fuchs	multiple ES	Gewebe
45	Bar Kalypso	w	5	Araber		ES Präputium	Gewebe
46	Dakota Qui	w	7	Traber	Brauner	fibroblastisches ES	Schuppen
47	Elli	s	12	Haflinger		multiple ES	Gewebe
48	Farah	s		Noriker	Rappe	fibroblastisches ES	Gewebe
49	Flicka	s	19	Haflinger		fibroblastisches ES	Gewebe
50	Gloria	s	16	Haflinger		fibroblastische ES	Gewebe
51	Latino	w	7	WB	Brauner	fibroblastisches ES Ohr	Gewebe
52	Leo	w	19	Hannoveraner	Brauner	multiple ES	Gewebe
53	Manitou	w	4	Paint	Schecke	periokuläre ES	Schuppen
54	Noriker 7	s	7	Noriker		fibroblastisches ES	Schuppen
55	Ragtime	s				ES	Schuppen
56	Rondo	w	14	WB	Brauner	ES	Gewebe
57	Selma Alma	s	14	Haflinger		noduläre ES	Schuppen
58	Tomba	w	8	Ungar. WB	Falbe	noduläres ES Präputium	Gewebe
59	Weltenb.	w		WB	Schimmel	okkultes ES, Kopf	Schuppen
60	Yallah's U.	s	16	Araber		ES linkes Oberlid	Gewebe
Pferde mit vermuteten Sarkoiden (n = 86)							
61	Rinze v. B.	w	8	Friese	Rappe	verruköses ES	Schuppen
62	Templ	w	3			Läsionen Achselregion	Gewebe
63	Sigtyr v. S.	w		Isländer		Hautläsion	Schuppen
64	Farak	w				Hautläsion	Schuppen

65	California	s		WB	Schimmel	Hautläsionen	Schuppen
66	Aaron	w	12	Haflinger		Läsion rechter Oberarm	Gewebe
67	Tahoe	w				Hautknoten	Gewebe
68	Pauli	w	8	Pony		ES	Schuppen
69	Dancing D.	w	5	Oldenburger	Rappe	ES	Krusten
70	Kosak	w				Augenproblem	Abstrich
71	Farnese	s	2	WB	Schimmel	Hautläsion	Schuppen
72	Lady Sav.	s	10	WB	Fuchs	Hautläsion	Gewebe
73	Little S. C.	s	13	Paint	Schecke	Hautläsion	Abstrich
74	Rocky	w	13	Welsh Pony		Hautläsion Penis	Gewebe
75	Layla	s	5	Araber	Schimmel	Hautläsion	Gewebe
76	Rick	s	6	Quarter Horse	Fuchs	Hautläsion	Gewebe
77	Blessi	w	25	Isländer		Hautläsion	Schuppen
78	Fuchs1	w	4		Fuchs	Hautläsion Augenwinkel	Gewebe
79	Ray Jack	w	11	Quarter Horse		Läsion Inguinalregion	Schuppen
80	Lupidor	w				Hautläsion	Schuppen
81	Cofold	w				Hautläsion	Schuppen
82	Admiral	w	5	Traber	Brauner	Hautläsion	Schuppen
83	Lady Jack	s				Hautläsion	Schuppen
84	Sunfire	w	20	ÖWB	Fuchs	Hautläsion	Schuppen
85	Lascar	w	14		Brauner	Hautläsion	Gewebe
86	Carwen	s	6	Welsh Cob	Rappe	Hautläsion	Gewebe
87	Nico	w	8	Paint	Schecke	Hautläsion Bauch	Schuppen
88	Egon	w				Hautläsion	Schuppen
89	Sexy Lotta	s		WB	Schimmel	okkulte Hautläsion Ohr	Gewebe
90	Monte Cristo	w	11	Sächs. WB	Fuchs	Hautläsion	Schuppen
91	Wiener W.	w			Brauner	Hautläsion	Gewebe
92	Landor	w				Hautläsion	Schuppen
93	Andfari	w	4	Isländer	Rappe	Hautläsion	Gewebe
94	ÖWB	s	3	WB	Rappe	Hautläsion	Gewebe
95	Grane	s	17	Engl. VB		Läsion Fesselregion	Schuppen
96	Cäsar	w				Hautläsion	Schuppen
97	Twix	w		ÖWB	Brauner	Hautläsion	Schuppen
98	Argus	w	12	WB	Brauner	Hautläsionen	Gewebe
99	Lord	w	14	WB		Läsion Präputium	FNAB
100	P. Tadoo	s	13	WB	Fuchs	Hautläsion Penis	Gewebe

101	Amoroso	w	16	Ungar. WB	Fuchs	Hautläsion	Gewebe
102	Fabio Vulkan	w		Noriker	Rappe	Läsionen Präputium	Gewebe
103	Max	w				Hyperkeratose Ohr	Schuppen
104	Odezendi	s	11	WB	Fuchs	Papillomatöse Lesion Ohr	Schuppen
105	Geronimo	w				Hautläsion	Schuppen
106	Kata	s				Hautläsion	Schuppen
107	Twist Jarna	s				Hautläsion	Schuppen
108	Paul	w				Hautläsion	Schuppen
109	Amy	s				Hautläsion	Schuppen
110	JWK					Hautläsion	Schuppen
111	Optimal	w				Hautläsion	Schuppen
112	Steady					Hautläsion	Schuppen
113	Perla 4	s				Hautläsion	Schuppen
114	Aida	s				Hautläsion	Schuppen
115	Pandora	s				Hautläsion	Schuppen
116	Lessi	s				Hautläsion	Schuppen
117	Jaap	w				Hautläsion	Schuppen
118	Lady Schu	s				Hautläsion	Schuppen
119	Pauli	w				Hautläsion	Schuppen
120	Stereo Love					Hautläsion	Schuppen
121	Sunshine					Hautläsion	Schuppen
122	Brunfaxi	w				Hautläsion	Schuppen
123	Ovör	w				Hautläsion	Schuppen
124	Cohibah					Hautläsion	Schuppen
125	Sean Paul	w				Hautläsion	Schuppen
126	AYA					Hautläsion	Schuppen
127	Hengst	h				Hautläsion	Schuppen
128	Zacky					Hautläsion	Schuppen
129	Sandy	s				Hautläsion	Schuppen
130	Chaska	s				Hautläsion	Schuppen
131	Schwarzer	w				Hautläsion	Schuppen
132	Lucile	s				Hautläsion	Schuppen
133	Dakota	s				Hautläsion	Schuppen
134	RYA II					Hautläsion	Schuppen
135	KRM 87					Hautläsion	Schuppen
136	Derano	w				Hautläsion	Schuppen

137	Saliero	w				Hautläsion	Schuppen
138	Leon	w				Hautläsion	Schuppen
139	Hakkon	w				Hautläsion	Schuppen
140	Pit-si					Hautläsion	Schuppen
141	Prinz	w				Hautläsion	Schuppen
142	Hoshi					Hautläsion	Schuppen
143	Hara	s				Hautläsion	Schuppen
144	Eso 49					Hautläsion	Schuppen
145	Hero	w				Hautläsion	Schuppen
146	Palf	w				Hautläsion	Schuppen

ES: Equines Sarkoid/equine Sarkoide; G: Geschlecht; A: Alter; w: Wallach; s: Stute; h: Hengst; WB: Warmblut; ÖWB: Österreichisches Warmblut; VB: Vollblut

2.3 PCR auf equines Beta-Aktin

Im Anschluss wurden die verbliebenen Proben (94,2%) einer Beta-(β -)Aktin-PCR unterzogen. Das β -Aktin-Gen kodiert für ein zwischen den Spezies äußerst konserviertes zytoskelettales Strukturprotein und wird entsprechend als so genanntes "House-keeping gene" angesehen, also als Gen, das in allen Zellen vorhanden ist. Ist ein Abschnitt dieses Gens aus einem DNS-Isolat amplifizierbar, kann daraus geschlossen werden, dass letzteres PCR-kompatibel ist.

Der PCR-Mastermix setzte sich pro 20 µl Reaktion wie folgt zusammen:

11,8 µl H₂O (steril)

4 µl 5 x PCR Puffer HF (ThermoScientific™)

0,6 µl DMSO (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich)

0,4 µl dNTPs (10mM; ThermoScientific™)

0,5 µl 5'β-Aktin-Primer (100pmol/µl; Eurofins, Wien, Österreich)

0,5 µl 3'β-Aktin Primer (100pmol/µl; Eurofins)

0,2 µl Phusion Hotstart Polymerase (ThermoScientific™)

19 µl pro 0,2 µl-PCR-Röhrchen (Biozym, Wien, Österreich)

Diesen 19 µl Reaktionsgemisch wurde dann vor Reaktionsstart je 1 µl Proben-DNS zugesetzt (bzw. steriles Wasser als ntc).

Folgende Primer wurden gemäß Brandt et al., 2008, verwendet:

3' β-Aktin-Primer: 5'-TACA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG -3'

5' β-Aktin-Primer: 5'-CGT CRT ACT CCT GCT TGC TGA TCC -3'

Pro PCR-Durchgang wurden zwölf DNS-Isolate und zwei DNS-freie Kontrollen (steriles Wasser statt DNS als Wasserprobe = "no template control"; NTC) untersucht.

Für die PCR wurde der Thermocycler Life Eco (Biozym) verwendet, folgendes Programm wurde gefahren:

95°C für 5 min

dann

45 Zyklen à jeweils 95°C für 15 sec; 61°C für 30 sec; 72°C für 30 sec

dann

72 C für 5 min

danach 15°C bis die Proben aus dem Gerät genommen wurden.

Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt, hierfür wurde ein 1,5%iges TAE-Agarosegel vorbereitet.

Dafür wurden 2,25 g Agarose (Biozym) in 150 ml TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) Puffer gelöst, indem die Flüssigkeit in der Mikrowelle erhitzt wurde, bis sie eine klare Konsistenz hatte.

Anschließend wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. In einer Gießkammer (Biozym), die mit zwei Kämmen à jeweils 14 Zähnen versehen war, konnte das Gel aushärten. Anschließend wurde das Gel in eine Laufkammer (Biozym) transferiert und mit 1x TAE-Puffer bedeckt.

Danach wurden 13x 4 µl 6 x DNS "Loading dye" (Ladefarbstoff; ThermoScientific™) auf Parafilm aufgetropft sowie einmal 5 µl einer 100bp-DNS-Leiter als Molekulargewichtsmarker (DNS-Größenreferenz; ThermoScientific™).

Zu den Farbstoff-Tröpfchen wurden je 16µl Amplifikationsprodukt hinzugefügt. Dann wurden diese 20 µl-Mischungen sowie die DNS-Leiter in die Geltaschen transferiert.

An die Laufkammer wurde im Anschluss eine Spannung von 130V angelegt, was bewirkte, dass die DNS in Richtung Kathode wanderte und eine Auftrennung nach Molekülmasse erfolgte. Nach ca. 30 min wurde jedes Gel unter UV Licht mittels FluorChem 3 Imaging System (Biozym, Österreich) ausgewertet und fotografiert.

In einem nächsten Schritt wurden alle PCR-kompatiblen DNS-Isolate auf Anwesenheit von BPV13 DNS untersucht.

2.4 BPV 13-Primerdesign und Herstellung einer synthetischen Positivkontrolle:

Um die Validität der BPV13-PCR Daten absichern zu können, wurde zunächst eine BPV13- Positivkontrolle entworfen. Hierfür wurde die Sequenz des BPV13 E5 (inklusive benachbarte Sequenzabschnitte) via Gendatenbank (GenBank®, NIH, USA) ermittelt (Genbank ID: JQ798171). Dieser BPV13-DNS-Abschnitt wurde im Anschluss mittels "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

mit entsprechenden DNS-Sequenzen von BPV1 und BPV2 - den nächsten genetischen Verwandten von BPV13 - verglichen. Auf Basis dieses Vergleichs wurden dann zwei BPV13-spezifische Primer zur Amplifikation einer 771 bp-Region entworfen, die das E5-Gen enthält, i.e. 5'BPV13-3682E5 und 3'BPV13-4452E5 (gelbe Markierung):

```

3661 ccatagacac cgctacgaga actgcaccac cacttggtt actgtggctg acaacgggtgc 5'BPV13-3682E5
3721 tgaagacaa ggacaggccc agatcctgat cacctttgga tctccaggtc aaaggcaaga 25mer/59°C
3781 ctttctgaaa catgtaccac tacctcctgg aatgaacatt tccggcttca cagccagctt
3841 ggacttttaa tcaactgccat ttggtgttct tcatatcttg acttggcata ctatgccgaa
3901 tctatggttt ctattgttct tgggactagt tgctgcaatg caactgctgc tgttactgtt E5 ORF
3961 tctgctgctg ttttcttgg tgtattggga tcattttgac tgctcctgta caggctctgcc
4021 tttttaatgc atcaactgggt acttgcacta ttgttacttc tgtgtggatt tgatttgttt 771 bp
4081 actattctgt atgaagtgtt tctgtttttg attgtattgt tgtttgtaca tttttacta
4141 gaatttgtat tccccctgct cagatttttt atgggtataaa gctgcagcaa taaacatgag
4201 tgcacgaaaa agagttaggc gtgcaaatgt gtatgacctg tacaggactt gcaagcaagc
4261 gggcacatgt ccaccagatg tgatacccaa agtagaaggg gacactatag cagataaaat
4321 tttaaaattg ggcgggcttg caatttattt agggggactg ggaattggaa catggtctac
4381 aggaagagtg gctgcagggt gatcaccaag gtatgtacca ttaaggacat cagggtccac 3'BPV13-4452E5
4441 tagcagtcta gctctgcag gatcaagagc tggagctgct gcaggtaactc gaagcagcat 24mer/59°C

```

Abb. 7: Ermittlung des BPV13 DNS-Abschnitts, der das E5-Gen beinhaltet, und Primer Design

Die gelb markierten Bereiche stellen die ausgesuchten Primersequenzen dar. In blauer Schrift ist das E5-Gen dargestellt. Für die Positivkontrolle wurden die Basenpaare zwischen den Primersequenzen gekürzt. Folgende trunkeierte BPV13-Sequenz wurde als Basis für die Positivkontrolle entworfen und von Eurofins synthetisiert:

Synthetische DNS Sequenz, 335 Nukleotide (nt) (BPV13, JQ798171 Pos. 3671-3830 und 4291-4465):

```

cgctacgaga actgcaccac cacttggtt actgtggctg acaacgggtgc tgaagacaa ggacaggccc agatcctgat
cacctttgga tctccaggtc aaaggcaaga ctttctgaaa catgtaccac tacctcctgg aatgaacatt tccggcttca Δ
agtagaaggg gacactatag cagataaaat tttaaaattg ggcgggcttg caatttattt agggggactg ggaattggaa
catggtctac aggaagagtg gctgcagggt gatcaccaag gtatgtacca ttaaggacat cagggtccac tagcagtcta
gctctgcag gatca

```

Abb. 8: BPV13-Positivkontrolle

Die BPV13-E5-Primersequenzen sind auch in dieser Grafik gelb markiert und lassen ein PCR-Produkt mit einer Größe von 311 bp erwarten. Δ gibt die Deletion (Positionen 3831-4290) an.

2.5 BPV13-PCR

Pro Durchgang wurden zehn DNS-Proben, eine Negativkontrolle (DNS von Haut eines Pferds ohne Sarkoid), die Positivkontrolle (20 ng; siehe 2.3) und eine NTC (steriles Wasser) getestet.

PCR-Mastermix pro 20 µl Ansatz und Probe:

11,8 µl H₂O (steril)

4 µl 5 x HF-Buffer (ThermoScientific™)

0,6 µl DMSO (Sigma-Aldrich)

0,4 µl dNTPs (10mM; ThermoScientific™)

1 µl 5' BPV13 - 3682 E5 Primer (100pmol/µl; Eurofins)

1µl 3' BPV13 - 4452 E5 Primer (100pmol/µl; Eurofins)

0,2 µl Phusion Hot Start Polymerase (ThermoScientific™)

Der Mastermix wurde für 15 (13 +2; zum Ausgleich von Pipetten-Ungenauigkeit und da Mischung schäumte) Reaktionen hergestellt und à 19 µl/PCR-Röhrchen aufgeteilt. Dann wurden je 1 µl Proben- bzw. Kontroll-DNS bzw. steriles Wasser für die NTC Kontrolle hinzugegeben.

Für die PCR im Thermocycler Life Eco (Biozym) wurde folgendes Programm verwendet:

98 °C für 2 Minuten

98 °C für 15 Sekunden	} 45 x
69 °C für 30 Sekunden	
72°C für 30 Sekunden	

72°C für 5 Minuten

15 °C für unendlich

Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte wie beschrieben (2.3) auf 2%ige Agarosegele aufgetragen, elektrophoretisch bei 130 V aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

2.6 Re-PCR und DNS Extraktion

Von zwei erhaltenen Amplifikationsprodukten, die sich als dünne Banden in erwarteter Höhe (771 bp) manifestierten, wurde eine Re-PCR unter analogen Bedingungen durchgeführt, um mehr Produkt für anschließendes Sequenzieren zu erhalten.

Hierfür wurden diese dünnen, unter UV Licht sichtbaren Banden zunächst mittels Skalpell fein ausgeschnitten. Mittels GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoScientific™) wurde die DNS dann aus den ausgeschnittenen Gelstückchen extrahiert.

Dabei wurden nach Anleitung des Herstellers folgende Schritte durchgeführt:

1. Gewicht des jeweils ausgeschnittenen Gel-Stücks wurde bestimmt.
 2. 1:1 zum Gewicht wurde "Binding Buffer" hinzugegeben.
 3. Die Mischung wurde für ca. 10 min bei 50 - 60°C inkubiert.
 4. Nachdem keine Stückchen mehr in der Flüssigkeit zu sehen waren, wurde die gesamte Flüssigkeit auf eine GeneJet Säule aufgetragen und diese 1 min bei 13.000 UpM (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert.
 5. dann wurden 100 µl "Binding-Buffer" hinzugegeben, für eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Durchfluss im Auffangröhrchen weggeleert.
 6. Dann wurden 700 µl Waschpuffer hinzugeben und für 1 min wieder zentrifugiert.
 7. Das Auffangröhrchen wurde wieder ausgeleert und die leere GeneJet-Säule für eine Minute zentrifugiert.
 8. Schließlich wurde die GeneJet-Säule in ein 1,5 µl-Eppendorf-Röhrchen gesteckt, 50 µl "Elution-Buffer" hinzugefügt und für eine Minute zentrifugiert, um die gewonnene DNS in das Eppendorf-Röhrchen zu eluieren.
-

Mit der so extrahierten DNS (1 μ l) wurde eine PCR, die Re-PCR, wie in Punkt 2.5 beschrieben durchgeführt.

2.7 Sequenzierung der DNA

Die Re-PCR-Produkte von 2.6 wurden wieder unter UV- Licht ausgeschnitten und die DNS auf die gleiche Weise wie unter 2.6 beschrieben, extrahiert.

Anschließend wurde die so gewonnene DNS zur bidirektionalen Sequenzierung an Eurofins gesendet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Bestimmung der DNS Konzentrationen führte zum Ausscheiden von neun DNS-Isolaten

Insgesamt wurde die DNS-Konzentration in 155 Proben photometrisch bestimmt, die akzeptablen Messwerte lagen zwischen 15.162 und 0,9 ng/μl. Proben mit einer Konzentration geringer als 0.9 ng/μl wurden ausgeschieden. Dies entsprach lediglich 9 Proben. Die verbleibenden 146 Proben mit einer Konzentration über 0.9 ng/μl wurden anschließend einer equines-β-Aktin (EBA)-PCR unterzogen.

3.2 β-Aktin-PCR testete in 99 Fällen positive

Von den 146 DNS-Isolaten testeten 99 (68%) positiv für EBA (Produktgröße im Bereich von 624 bp). Dabei handelte es sich tendenziell um Isolate, die nicht häufig eingefroren und wieder aufgetaut worden waren (persönliche Information durch S. Brandt). Diese 99 DNS-Isolate wurden im nächsten Schritt mittels BPV13 E5-PCR analysiert.

3.3 BPV13-PCR

Neunundneunzig auf EBA positiv getestete Proben wurden mittels PCR auf Anwesenheit von BPV-13 E5 getestet. In keiner der 99 Proben (100%) konnte BPV13 E5 nachgewiesen werden (Tab. 2). Dieses Ergebnis erhielt dadurch Bestätigung, dass die bei allen Reaktionen inkludierten Kontrollen ein entsprechendes Resultat lieferten, nämlich ein Produkt in erwarteter Größe bei der Positivkontrolle (311 bp) und keine Produkte bei der negativen Kontrolle und der Wasserprobe (ntc; siehe dazu auch Gelfoto 1 als Beispiel).

Die Proben "Windsor" und "Fulminant" zeigten eine Bande im Bereich von 770 bp (Abb. 9). Da Banden mit einer Größe von 771 bp entsprechend der verwendeten Primer erwartet wurden, wurden diese Produkte nach Re-Amplifikation bidirektional sequenziert, um ihre Identität zu überprüfen.

Anschließende Sequenzvergleiche mittels BLAST zeigten jedoch, dass es sich nicht um DNS von BPV13 E5 handelte. Die restlichen getesteten Proben zeigten keine Banden im Bereich der berechneten Größe.

Table 2: Ergebnisse

Nº	Name	Diagnose	Proben: läsionale DNS von	EBA PCR	BPV13 PCR	[DNS] ng/µl
BPV1/2 E5 DNS-positiv (n= 99)						
Pferde mit diagnostizierten equinen Sarkoiden (ES; n = 38)						
6	Pedro	ES	Schuppen	+	-	524,15
12	Little Lady	noduläres ES	Gewebe	+	-	315,40
13	Robbi	ES rechte Femoralregion	Gewebe	+	-	243,45
15	Walker	ES	Gewebe	+	-	185,75
16	Windsor	multiple ES	Gewebe	+	-	167,15
17	Symphony	ES	Gewebe	+	-	159,40
18	Pamina's Feeling	ES Gurtlage	Gewebe	+	-	148,15
21	Frisco	okkultes, verruköses ES	Schuppen	+	-	106,40
22	Fulminant	ES Präputium	Gewebe	+	-	86,40
23	Legolas	ES	Schuppen	+	-	83,70
24	Baby Schlumpf	ES/Hypergranulationsgewebe	Gewebe	+	-	80,70
25	Eric	multiple ES	Gewebe	+	-	79,35
27	Röskur vom Stefanihof	ES	Schuppen	+	-	60,15
28	Xena	ES	Schuppen	+	-	60,10
29	Atena	multiple ES	Gewebe Ohr	+	-	49,75
30	Karino	ES	Gewebe	+	-	48,50
31	Goldfire	ES	Schuppen	+	-	38,80
33	Allegra	multiple ES	Gewebe	+	-	32,55
34	Whisper	ES Achselregion	Schuppen	+	-	27,05
35	Maurice	multiple ES	Schuppen	+	-	25,30

36	Grane	ES Wunde	Gewebe	+	-	23,75
37	Dailey R	ES rechte Seite Präputium	Gewebe	+	-	19,90
38	Arwen	ES	Schuppen	+	-	13,30
39	Art	ES	Schuppen	+	-	12,10
40	Fedora	noduläre, okkulte ES	Schuppen	+	-	8,05
42	Livia	multiple ES	Gewebe	+	-	142,60
43	Rebel	multiple ES, Dermatitis Beine	Gewebe	+	-	15162,00
44	Andi	multiple ES	Gewebe	+	-	351,45
45	Bar Kalypso	ES Präputium	Gewebe	+	-	156,20
47	Elli	multiple ES	Gewebe	+	-	190,65
50	Gloria	multiple, fibroblastische ES	Gewebe	+	-	313,80
51	Latino	fibroblastisches ES Ohr	Gewebe	+	-	621,70
52	Leo	multiple ES	Gewebe Knie	+	-	218,60
53	Manitou	periokuläres ES	Schuppen	+	-	9,85
55	Ragtime	ES	Schuppen	+	-	41,40
56	Rondo	ES	Gewebe	+	-	49,80
59	Weltenbummler	okkulte ES Kopf, Nacken	Schuppen	+	-	3141,6
60	Yallah's Universe	ES linkes Oberlid	Gewebe	+	-	316,25
Pferde mit vermuteten ES (n = 61)						
61	Rinze van Bokkum	verruköse Hautläsion	Schuppen	+	-	6023,70
65	California	Hautläsion	Schuppen	+	-	762,95
66	Aaron	Läsion linker Oberarm	Gewebe	+	-	309,25
67	Tahoe	Hautknoten	Gewebe	+	-	172,55
68	Pauli	ES	Schuppen	+	-	163,75
69	Dancing Diamond	ES	Krusten	+	-	162,10
71	Farnese	Hautläsion	Schuppen	+	-	129,00
72	Lady Savannah	Hautläsion	Gewebe	+	-	114,45
73	Little Squaw Cheyenne	ES	Abstrich	+	-	107,55
74	Rocky	UV am Schlauch	Gewebe	+	-	100,45
75	Layla	Hautläsion	Gewebe	+	-	97,10
76	Rick	Hautläsion	Gewebe	+	-	69,90
77	Blessi	Hautläsion	Schuppen	+	-	65,10
78	Fuchsl	Hautläsion Auge	Gewebe	+	-	62,10
79	Ray, Ray Jac	Läsion rechte Inguinalregion	Schuppen	+	-	54,95
80	Lupidor	Hautläsion	Schuppen	+	-	42,60
81	Cofold	Hautläsion	Schuppen	+	-	42,10

83	Lady Jack	Hautläsion	Schuppen	+	-	40,30
84	Sunfire	Hautläsion	Schuppen	+	-	37,30
85	Lascar	Hautläsion	Gewebe	+	-	35,40
86	Carwen	Hautläsion	Gewebe	+	-	34,45
87	Nico	Hautläsion Bauch	Schuppen	+	-	33,05
88	Egon	Hautläsion	Schuppen	+	-	31,65
89	Sexy Lotta	okkulte Hautläsion Ohr	Gewebe	+	-	30,10
90	Monte Cristo	Hautläsion	Gewebe	+	-	29,70
91	Wiener Walzer	Hautläsion	Gewebe	+	-	28,15
92	Landor	Hautläsion	Schuppen	+	-	22,00
93	Andfari	Hautläsion	Gewebe	+	-	21,45
94	ÖWB	Hautläsion	Gewebe	+	-	21,15
95	Grane	Tumor lateral Fesselgelenk	Schuppen	+	-	20,10
96	Cäsar	Hautläsion	Schuppen	+	-	19,55
97	Twix	Hautläsion	Schuppen	+	-	18,70
98	Argus	Hautläsion	Gewebe	+	-	12,70
99	Lord	Hyperplasie Präputium	FNAB	+	-	6,65
100	P. Tatioo	Hautläsion Penis	Gewebe	+	-	5,85
101	Amoroso	Hautläsion	Gewebe	+	-	147,65
103	Max	Hyperkeratose Ohr	Schuppen	+	-	207,40
104	Odezendi	papillomatöse Läsionen Auge	Schuppen	+	-	102,35
105	Geronimo	Hautläsion	Schuppen	+	-	20,25
108	Paul	Hautläsion	Schuppen	+	-	80,85
109	Amy	Hautläsion	Schuppen	+	-	8,00
114	Aida	Hautläsion	Schuppen	+	-	6,10
117	Jaap	Hautläsion	Schuppen	+	-	71,10
118	Lady Schu	Hautläsion	Schuppen	+	-	4,15
121	Sunshine	Hautläsion	Schuppen	+	-	43,20
123	Ovör	Hautläsion	Schuppen	+	-	5,60
124	Cohibah	Hautläsion	Schuppen	+	-	21,85
125	Sean Paul	Hautläsion	Schuppen	+	-	2,55
127	Hengst ecpv	Hautläsion	Schuppen	+	-	17,65
132	Lucile	Hautläsion	Schuppen	+	-	322,10
133	Dakota	Hautläsion	Schuppen	+	-	63,80
136	Derano	Hautläsion	Schuppen	+	-	2,80
137	Saliero	Hautläsion	Schuppen	+	-	7,02

138	Leon	Hautläsion	Schuppen	+	-	2,45
139	Hakkon	Hautläsion	Schuppen	+	-	5,10
140	Pit-si	Hautläsion	Schuppen	+	-	6,07
141	Prinz	Hautläsion	Schuppen	+	-	1,30
142	Hoshi	Hautläsion	Schuppen	+	-	0,90
143	Hara	Hautläsion	Schuppen	+	-	152,00
144	Eso	Hautläsion	Schuppen	+	-	96,65
146	Palf	Hautläsion	Schuppen	+	-	316,95

Die folgenden Abbildungen (Abb. 9, 10) zeigen zwei Beispiele für die Auswertung der BPV13-PCR mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. Im ersten Bild ist das Ergebnis für die Proben eins bis zehn sichtbar. Probe fünf und neun zeigten, wie bereits oben beschrieben, eine Bande im Bereich von 770 bp (771 bp wurden erwartet), die jedoch nicht BPV13 entsprach. Das zweite Bild zeigt das Ergebnis von Proben 41 bis 50 (Abb. 10). Die Nummern der Bildbeschriftung entsprechen der Probennummer in den Tabellen 1 und 2, + steht für die Positivkontrolle, - für die Negativkontrolle und ntc für die Wasserprobe. L entspricht der DNS-Leiter.

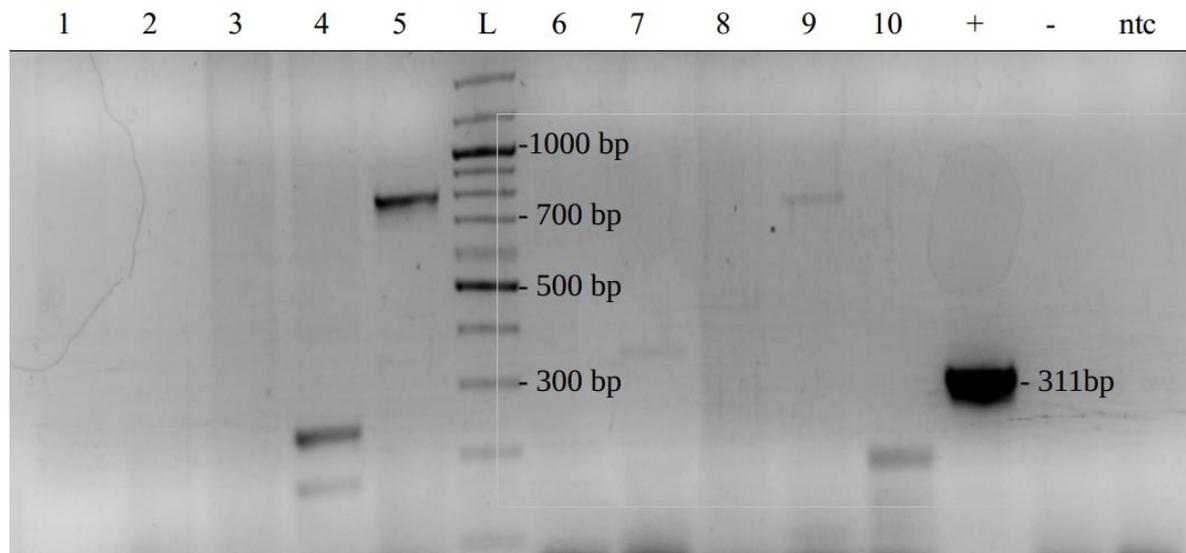


Abb. 9: Gelfoto 1

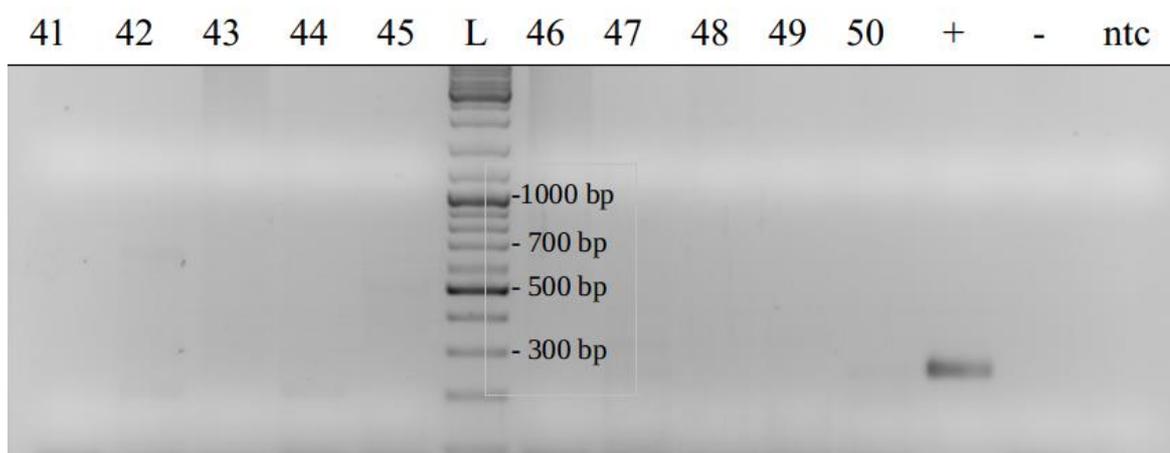


Abb. 10: Gelfoto 2

4 Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war, BPV 13 in DNS-Proben equiner Sarkoide von in Österreich lebenden Pferden nachzuweisen, und damit möglicherweise einen neuen BPV-Typ als Auslöser dieses Hauttumors in Österreich zu finden.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist das equine Sarkoid der häufigste Hauttumor bei Pferden, wodurch sich eine hohe Relevanz für diese Fragestellung ergibt, da neue Virustypen in prophylaktische und therapeutische Maßnahmen mit einbezogen werden müssen. Bisher konnten BPV1 und BPV2 als Verursacher equiner Sarkoide weltweit identifiziert werden, wobei je nach geographischer Lokalisation das Vorkommen von BPV1 und BPV2 variiert (Bloch et al., 1994; Carr et al., 2001; Otten et al., 1993). So kommt BPV1 vor allem in Sarkoiden in Mittel- und Nordeuropa, aber auch im Osten der USA vor, BPV2 hingegen häufig in Südeuropa und im Westen der USA (Carr et al., 2001). Weiters konnte festgestellt werden, dass sich die Sequenz des BPV1/2-E5 Gens aus Sarkoiden von jener aus Rinderwarzen durch einige Punktmutationen unterscheiden kann (Chambers et al., 2003b; Nasir und Reid, 2006; Nasir et al., 2007). Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass es pferdespezifische BPV1/2-Varianten gibt (Nasir und Brandt, 2013). Neuere Studien konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. In der Schweiz wurden vermutete "Pferde-BPV1-Varianten" auch in Kühen nachgewiesen. Entsprechend geht man inzwischen davon aus, dass die gefundenen Varianten eher orts- als artspezifisch sind (Koch et al., 2018)

Neue Forschungsergebnisse, wie jene von Lunardi et al. 2013 oder Ogawa et al. 2004, deuten darauf hin, dass noch weitere Papillomviren existieren, die equine Sarkoide auslösen könnten. So konnten Ogawa und Kollegen (2004) und Antonsson und Hansson (2002) elf neue BPV-Typen in Warzen von Rindern in Japan und Schweden nachweisen. Lunardi et al. wiederum entdeckten in Kuhwarzen BPV13 und konnten darüber hinaus

dieses Deltapapillomavirus auch in equinen Sarkoiden von zwei brasilianischen Pferden mittels PCR nachweisen.

Dies legt den Schluss nahe, dass BPV13 in Brasilien neben BPV1 und 2 in equinen Sarkoiden vorkommt. Allerdings konnte BPV13 bislang nur in Form viraler DNS in brasilianischen Sarkoiden nachgewiesen werden. Der Beweis, dass BPV13 ursächlich an der Entstehung von Sarkoiden beteiligt sein kann, fehlt jedoch noch. Hierfür sind weitere experimentelle Studien, wie etwa der Nachweis von E5, E6 und E7 mRNS, was auf virale Aktivität hindeuten würde, notwendig.

Genanalysen zeigen, dass das BPV13-Genom eine 91%ige Homologie zum BPV2- und eine 87%ige Homologie zum BPV1-Genom aufweist. Weiters wurden auf DNA- und Proteinebene sämtliche funktionellen Motive nachgewiesen, die auch bei BPV1 und BPV2 vorhanden sind sowie das Fehlen der p105RB-Bindungsdomäne LXCXE, so dass alle Voraussetzungen für die Induktion von Sarkoiden gegeben zu sein scheinen (Lunardi et al., 2013; Narechania et al., 2004). Entsprechend kann von einem ätiologischen Zusammenhang zwischen BPV13 und dem Ausbilden von equinen Sarkoiden durchaus ausgegangen werden kann.

Für den Nachweis von BPV13 wurden in dieser Arbeit 155 archivierte DNS-Isolate aus Sarkoiden bzw. vermuteten Sarkoiden verwendet, bei denen BPV1 und/oder BPV2 DNA mittels PCR in der Vergangenheit detektiert worden war.

Von den 155 DNS-Isolaten mussten 56 Proben aufgrund nicht zufriedenstellender Qualität ausgeschlossen werden.

Von den 99 β -Aktin-positiven DNA-Isolaten testete keine einzige positiv auf BPV13 DNS. Dieses Ergebnis ist aus mehreren Gründen verlässlich: (i) Ein unspezifisches Binden der Primer konnte nahezu ausgeschlossen werden, da hoch spezifische Primersequenzen gewählt wurden (siehe Material und Methoden). (ii) Das PCR-Protokoll basierte auf einer etablierten Methode mit nachweislich hoher Sensitivität (Brandt et al., 2008). (iii) Es wurde jeweils nur eine kleine Probenanzahl/PCR getestet ($n = 10$), um das Kontaminationsrisiko gering zu halten. (iv) Zur Absicherung der Ergebnisse wurden bei jedem PCR-Durchgang eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle und eine Wasserprobe inkludiert, die stets erwartete Ergebnisse lieferten, i.e. ein Produkt korrekter Größe für die Positivkontrolle (synthetische DNS) und keinerlei Produkte bei der Negativkontrolle und

der Wasserprobe. (v) Zwei dünne Banden, die in etwa der erwarteten Amplikongröße entsprachen, wurden reamplifiziert und anschließend bidirektional sequenziert, wodurch dieses falsch positive Ergebnis ausgeschlossen werden konnte.

Bei beiden falsch positiven Ergebnissen handelt es sich um ein unspezifisches Binden der Primer an bakterielle DNS, wodurch zufällig eine Bande in der erwarteten Höhe entstand. Erklärbar ist dies dadurch, dass equine Sarkoide oft sekundär mit Bakterien infiziert sind und die DNS dieser bei der DNS Extraktion mitgereinigt wurde.

Auch wenn in dieser Arbeit nur eine Stichprobe von 99 Proben getestet wurde, legt das Ergebnis den Schluss nahe, dass BPV13 höchstens selten in Sarkoiden österreichischer Pferde vorkommt.

Da die untersuchten Proben von Pferden verschiedener Rasse und Herkunft und unterschiedlichsten Alters und Geschlechts stammten, die innerhalb eines sehr langen Zeitraums (2007- 2019) gesammelt wurden, ist die Stichprobe als repräsentativ anzusehen. Zudem wurden nicht nur bestätigte Sarkoide getestet, sondern auch sarkoidähnliche Veränderungen, die für eine BPV13 Infektion in Frage kommen könnten.

BPV 1, 2 und 13 sind genetisch eng miteinander verwandt. Für BPV1 und BPV2 wurde bereits gezeigt, dass diese Typen je nach geographischer Lage in unterschiedlicher Häufigkeit in Sarkoiden vorkommen (Carr et al., 2001). Außerdem wurden auch genetische Varianten von BPV1 in Sarkoiden nachgewiesen, die unterschiedlichen geographischen Regionen zugeordnet werden konnten (Chambers et al., 2003b; Koch et al., 2018; Trewby et al., 2014). Auch in Wien wurden BPV1-Varianten in Sarkoiden identifiziert, die vorwiegend den so genannten, schon von Chambers et al. (2003b) definierten "schweizerischen" Varianten entsprachen (persönliche Information von S. Brandt; Trewby et al., 2014). Zumal BPV13 in Süditalien in Boviden gefunden wurde (Roperto et al., 2018) und mit dem ebenfalls in dieser Region vorherrschenden BPV2 genetisch näher verwandt ist (> 91%), als mit dem z.B. in Mittel- und Nordeuropa dominierenden BPV1 (> 87%), könnte BPV13 als "südlicher" Delta-BPV-Typ angesehen werden. Zumal es sich bei bovinen Papillomviren um sehr "alte" Viren handelt, ist vorstellbar, dass BPV1, 2 und 13 aus einem Urtyp hervorgegangen sind und sich in ihren

bovinen (und equinen) Wirten in den verschiedenen Weltregionen genetisch unabhängig zu unterschiedlichen BPV-Typen weiterentwickelt haben (Gottschling et al., 2007).

Das Ergebnis dieser Diplomarbeit unterstützt diese Theorie, allerdings ist noch weitere Forschung notwendig, um letztere abzusichern. So wäre es interessant, equine Sarkoidpatienten auch aus anderen Europäischen Ländern auf BPV13 zu testen, um abschätzen zu können, welche europäische bzw. weltweite Bedeutung BPV13 im Zusammenhang mit equinen Sarkoiden hat.

Darüber hinaus ist zu hoffen, dass in Brasilien und anderen Südamerikanischen Staaten eine größere Anzahl an Pferden mit bestätigten Sarkoiden auf BPV13 getestet wird, um einen Eindruck zu bekommen, zu welchem Anteil BPV13 an der Sarkoidentstehung in dieser Weltregion beteiligt ist.

Sollte sich herausstellen, dass BPV13 nur in Brasilien nachweisbar ist, wäre es empfehlenswert Pferde in anderen Ländern über Jahre hinweg regelmäßig auf BPV13 zu testen, um eine Einschleppung des Virus in die jeweilige Pferdepopulation rechtzeitig zu erkennen. Der Schwerpunkt dieser Testungen sollte vor allem auf Pferden liegen, die Kontakt mit aus Brasilien importierten Rindern oder Pferden hatten.

Im Fall, dass BPV13 im Großteil der brasilianischen Pferde und/oder auch in anderen Ländern nachgewiesen werden kann, ist es notwendig zu überprüfen, ob mit dem von Hainisch et al. (2012) entwickelten Impfstoff gegen BPV1 eine Kreuzimmunität gegen BPV13 gegeben ist. Sollte dies nicht der Fall sein, so wäre es sinnvoll, BPV13-artige Partikel aus L1 Proteinen herzustellen, wie es Hainisch et al. (2012) für BPV1 beschrieben hat, und daraus eine BPV13-Schutzimpfung herzustellen.

5 Zusammenfassung

Das equine Sarkoid ist der häufigste gutartige Hauttumor bei Pferden. Es handelt sich um einen fibroblastischen Tumor, welcher lokal aggressiv wächst. Bisher wurde das bovine Papillomvirus 1 und 2 als auslösendes Agens identifiziert. Lunardi et al. konnte allerdings 2013 in sechs equinen Sarkoidproben von zwei brasilianischen Pferden einen neuen Delta Papillomvirustyp, nämlich BPV 13, nachweisen und charakterisieren.

Diese Arbeit befasst sich mit der Frage, ob BPV 13 auch in equinen Sarkoiden österreichischer Pferde vorkommt. Diese Frage ist von höchster Relevanz, da neue Virustypen in Sarkoiddiagnostik und -therapie mit einbezogen werden müssen.

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden 155 DNS-Isolate aus nachweislich BPV1/2-positiven diagnostizierten Sarkoiden (n = 60) bzw. vermuteten Sarkoiden (n = 86) aus dem Archiv des RGO (Research Group Oncology; Veterinärmedizinische Universität Wien) verwendet.

Zunächst wurden alle Isolate photometrisch überprüft und auf das "house keeping"-Gen β -Aktin getestet, Proben mit nicht messbarer DNA Konzentration und nicht nachweisbarem β -Aktin wurden aussortiert.

Neunundneunzig DNS-Isolate wurden letztendlich mittels PCR auf BPV13 getestet.

Von den 99 Proben zeigten nur zwei Banden im Bereich von 770 bp. Da beim Nachweis von BPV13 ein 771 bp-Amplifikationsprodukt erwartet wurde, wurden diese beiden PCR-Produkte nach Re-Amplifikation bidirektional sequenziert und anschließend wurde ein Sequenzvergleich mittels BLAST vorgenommen. Dieser zeigte jedoch, dass es sich nicht um DNS von BPV13 handelt.

Das Ergebnis dieser Diplomarbeit legt den Schluss nahe, dass BPV13 im Großteil der österreichischen Pferde, mit Sarkoiden bzw. sarkoidähnlichen Veränderungen, nicht vorkommt. Es unterstützt die Theorie, dass es sich bei BPV13 um eine geographische Variante von BPV2 und BPV2 handeln könnte. Papillomviren sind sehr „alte“ Viren, so dass es möglich ist, dass sich BPV 1, 2 und 13 aus einem gemeinsamen Urtyp entwickelt

haben und in den verschiedenen Weltregionen genetisch unabhängig zu unterschiedlichen BPV-Typen weiterentwickelt haben (Gottschling et al., 2007).

Das Ergebniss ist trotz der moderaten Stichprobengröße als repräsentativ anzusehen, da die untersuchten Proben von Pferden verschiedener Rasse und Herkunft und unterschiedlichen Alters und Geschlechts stammten, die innerhalb eines sehr langen Zeitraums (2007- 2019) gesammelt wurden.

6 Summery

The equine sarcoid (ES) is the most common benign skin tumor in horses. It is a fibroblastic, locally aggressive tumor. So far, only the bovine papillomavirus types 1 and 2 (BPV1, BPV2) have been recognized as causal agents of ES. However, Lunardi et al. recently detected a new Delta-papillomavirus termed BPV13 in six samples derived from equine sarcoids of two Brazilian horses and identified this type as being closely related to BPV1 and BPV2.

Hence the scientific question of this study was to assess whether BPV13 would also occur in equine sarcoids of Austrian horses. This question was relevant because potentially new causative agents of sarcoids need to be in ES diagnostics and therapeutics.

A total of 155 confirmedly BPV1/2-positive DNA extracts derived from ES and suspected ES were retrieved from the archive of the RGO (Research Group Oncology; University Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine) and first subjected to quality control. The latter consisted of spectrophotometric assessment of DNA concentrations and amplification of the house keeping gene β -actin using PCR.

Nineteen β -actin-positive DNA-isolates were ultimately PCR-screened for BPV13 using highly type-specific primers for amplification of a 771 bp product.

PCR yielded amplification products approximately corresponding to this anticipated size in 2/99 cases. These amplicons were re-amplified, then sequenced bidirectionally.

Subsequent sequence alignments using BLAST could not identify these products as corresponding to BPV13.

The result of this thesis suggests that BPV 13 does not occur in the majority of sarcoid-affected Austrian horses. It supports the theory that BPV 13 may represent a geographic variant of BPV1 and BPV2. *Papillomaviridae* are very „old“ viruses, so that there is the possibility that BPV 1, 2 and 13 stem from one ancestral BPV and have evolved independently to different BPV types according to their respective geographical distribution (Gottschling et al., 2007).

Obtained data can be regarded as representative despite the moderate sample size because the examined samples were collected from horses of different gender, age, breed and origin within a long time period (2007-2019).

7 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meines Studiums und insbesondere bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Als erstes möchte ich hier meine Betreuerin Frau Dipl.-Ing. Dr. Sabine Brandt erwähnen, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mich zu jeder Zeit mit ihrem Fachwissen unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gebührt selbstverständlich dem gesamten Team des RGO (Research Group Oncology; Veterinärmedizinische Universität Wien), welches mir während meiner praktischen Arbeit immer helfend zur Seite stand.

Zu guter Letzt möchte ich mich selbstverständlich bei meinen Eltern bedanken, die immer für mich da sind, mich unterstützen und mir dieses Studium erst ermöglicht haben.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Alter
Abb.	Abbildung
AP.	Adaptorkomplex
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPV	bovines Papillomvirus
CBP	creb binding Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	frühe Region
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EMT	epithelialen-mesenchymalen Transition
ERC-55	endoplasmic reticulum calcium-binding protein of 55kD
G	Geschlecht
h	Hengst
H-ATPase	Adenosintriphosphatasen
kD	Kilodalton
L	späte Region
LCR	lange Kontroll Region
MHC	Major Histocompatibility Complex
ng	Nanogramm

NTC	non template control
ml	Milliliter
MMP	Matrix – Metalloproteinasen
p	Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
pRB	Retinoblastomprotein
s	Stute
sec	Sekunde(n)
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
UV	ultraviolett
UpM	Umdrehungen pro Minute
w	Wallach
WB	Warmblut
µl	Mikroliter
ÖWB	österreichisches Warmblut
°C	Grad Celsius

9 Literatur

- Abel-Reichwald, H., Hainisch, E.K., Zahalka, S., Corteggio, A., Borzacchiello, G., Massa, B., Merlone, L., Nasir, L., Burden, F., Brandt, S., 2016. Epidemiologic analysis of a sarcoid outbreak involving 12 of 111 donkeys in Northern Italy. *Vet Microbiol* 196, 85-92.
- Amtmann, E., Muller, H., Sauer, G., 1980. Equine connective tissue tumors contain unintegrated bovine papilloma virus DNA. *J Virol* 35, 962-964.
- Angelos, J.A., Marti, E., Lazary, S., Carmichael, L.E., 1991. Characterization of BPV-like DNA in equine sarcoids. *Arch Virol* 119, 95-109.
- Antonsson, A., Hansson, B.G., 2002. Healthy Skin of Many Animal Species Harbors Papillomaviruses Which Are Closely Related to Their Human Counterparts. *Journal of Virology*, Vol. 76, Nr. 24, 12537–12542.
- Ashrafi, G.H., Piuko, K., Burden, F., Yuan, Z., Gault, E.A., Muller, M., Trawford, A., Reid, S.W., Nasir, L., Campo, M.S., 2008. Vaccination of sarcoid-bearing donkeys with chimeric virus-like particles of bovine papillomavirus type 1. *J Gen Virol* 89, 148-157.
- Ashrafi, G.H., Tsirimonaki, E., Marchetti, B., O'Brien, P.M., Sibbet, G.J., Andrew, L., Campo, M.S., 2002. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Nature Publishing Group* 21, 248-259.
- Bergvall, K.E., 2013. Sarcoids. *Vet Clin North Am Equine Pract* 29, 657-671.
- Bloch, N., Breen, M., Spradbrow, P.B., 1994. Genomic sequences of bovine papillomaviruses in formalin-fixed sarcoids from Australian horses revealed by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 41, 163-172.
- Bogaert, L., Martens, A., Van Poucke, M., Ducatelle, R., De Cock, H., Dewulf, J., De Baere, C., Peelman, L., Gasthuys, F., 2008. High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. *Vet Microbiol* 129, 58-68.
- Brandt, S., 2016. Immune response to bovine papillomavirus type 1 in equine sarcoid. *Vet J* 216, 107-108.
-

- Brandt, S., Haralambus, R., Schoster, A., Kirnbauer, R. and Stanek, C., 2008. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. *J. Gen. Virol.* 89, 1390-1395.
- Brandt, S., Haralambus, R., Shafti-Keramat, S., Steinborn, R., Stanek, C., Kirnbauer, R., 2008. A subset of equine sarcoids harbours BPV-1 DNA in a complex with L1 major capsid protein. *Virology* 375, 433-441.
- Brandt, S., Tober, R., Corteggio, A., Burger, S., Sabitzer, S., Walter, I., Kainzbauer, C., Steinborn, R., Nasir, L., Borzacchiello, G., 2011. BPV-1 infection is not confined to the dermis but also involves the epidermis of equine sarcoids. *Vet Microbiol* 150, 35-40.
- Broström, H., Fahlbrink, E., Dubath, M.L., Lazary, S., 1988. Association between equine leucocyte antigens (ELA) and equine sarcoid tumors in the population of Swedish halfbreds and some of their families. *Vet Immunol Immunopathol* 19, 215-223.
- Campo, M.S., 2006. Bovine papillomavirus: old system, new lessons?, in: Campo, M.S. (Ed.), *Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond*, 1 ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 373-387.
- Carr, E.A., Theon, A.P., Madewell, B.R., Griffey, S.M., Hitchcock, M.E., 2001. Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and nonneoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States. *Am J Vet Res* 62, 741-744.
- Chambers, G., Ellsmore, V.A., O'Brien, P.M., Reid, S.W., Love, S., Campo, M.S., Nasir, L., 2003a. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J Gen Virol* 84, 1055-1062.
- Chambers, G., Ellsmore, V.A., O'Brien, P.M., Reid, S.W., Love, S., Campo, M.S., Nasir, L., 2003b. Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids. *Virus Res* 96, 141-145.
- Claus, M.P., Michele Lunardi, M., Alfieri, A.F., Ferracin, L.M., Fungaro M.H.P., Alfieri, A.A., 2008. Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Veterinary Microbiology* 132, 396-401.
- Compston, P.C., Turner, T., Wylie, C.E., Payne, R.J., 2016. Laser surgery as a treatment for histologically confirmed sarcoids in the horse. *Equine Vet J* 48, 451-456.
-

- Corteggio, A., Altamura, G., Roperto, F., Borzacchiello, G., 2013. Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? *Infect Agent Cancer* 8, 1.
- Corteggio, A., Di Geronimo, O., Roperto, S., Roperto, F., Borzacchiello, G., 2011. Bovine papillomavirus E7 oncoprotein binds to p600 in naturally occurring equine sarcoids. *J Gen Virol* 92, 378-382.
- De Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- DiMaio, D., 2010. Papillomavirus E5 Proteins, in: Garcea, R.L., DiMaio, D. (Ed.), *The papillomaviruses, 2010 | 1st ed. Softcover of orig. ed. 2007 ed. Springer-Verlag New York Inc., New York, USA, pp. 175-196.*
- Espy, B.M.K., 2008. How to Treat Equine Sarcoids by Autologous Implantation. *AAEP Proceedings* 54, 68-73.
- Finlay, M., Yuan, Z., Burden, F., Trawford, A., Morgan, I.M., Campo, M.S., Nasir, L., 2009. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus Res* 144, 315-317.
- Finlay M., Yuan Z.Q., Morgan I.M., Campo M.S., Nasir L., 2012. Equine sarcoids: Bovine Papillomavirus type 1 transformed fibroblasts are sensitive to cisplatin and UVB induced apoptosis and show aberrant expression of p53. *Veterinary Research* 43, 1-8.
- Fürst, A., Martens, A., Bogaert, L., 2009. Das Equine Sarkoid. *Continuing Veterinary Education - Pferd* 1, 1-32.
- Goldstein, D.J., Flnbowt, M.E., Andresson, T.H., McLeant, P.H., Smltht, K., Bubb, V., Schlegel, R., 1991. Bovine papillomavirus ES oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H⁺ -A TPases. *Nature* Vol 352, 347-349.
- Gottschling, M., Stamatakis, A., Nindl, I., Stockfleth, E., Alonso, A., Bravo, I.G., 2007. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Mol Biol Evol* 24, 1242-1258.
- Hainisch, E.K., 2014. Das Sarkoid als häufigster Hauttumor bei Pferden und Pferdeartigen. *Pferdespiegel* 17, 75-83.
- Hainisch, E.K., Abel-Reichwald, H., Shafti-Keramat, S. Pratscher, B., Corteggio, A., Borzacchiello, G., Wetzig, M., Jindra, C., Tichy, A., Kirnbauer, R., Brandt, S., 2016.
-

- Potential of a BPV1 L1 VLP vaccine to prevent BPV1 or BPV2 induced pseudo-sarcoid formation and safety and immunogenicity of EcPV2 L1 VLPs in the horse. *J Gen Virol*. 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.
- Hainisch, E.K., Brandt, S., Shafti-Keramat, S., Van den Hoven, R., Kirnbauer, R., 2012. Safety and immunogenicity of BPV-1 L1 virus-like particles in a dose-escalation vaccination trial in horses. *Equine Vet J* 44, 107-111.
- Harnacker, J., Hainisch, E.K., Shafti-Keramat, S., Kirnbauer, R., Brandt, S., 2017. Type-specific L1 virus-like particle-mediated protection of horses from experimental bovine papillomavirus 1 induced pseudo-sarcoid formation is long-lasting. *J Gen Virol* 98, 1329-1333.
- Haspesslagh, M., Vlaminck, L.E., Martens, A.M., 2016. Treatment of sarcoids in equids: 230 cases (2008-2013). *J Am Vet Med Assoc* 249, 311-318.
- Haspesslagh, M., Garcia, M.J., Vlaminck, L.E.M., Martens, A.M., 2017. Topical use of 5% acyclovir cream for the treatment of occult and verrucous equine sarcoids: a double-blinded placebo-controlled study. *BMC Veterinary Research* 13, 1-6.
- Haspesslagh M., Gerber V., Knottenbelt D.C., Schüpbach G., Martens A., Koch C., 2018. 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. *The Veterinary Journal* 240. 14–18.
- Hewes, C.A., Sullins, K.E., 2006. Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 cases (2000-2004). *J Am Vet Med Assoc* 229, 1617-1622.
- Jackson, C., 1936. The incidence and pathology of tumours of domesticated animals in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal. Ind.* 6, 378-385.
- 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. Royal Veterinary College, London, UK.
- Klein, W.R., Bras, G.E., Misdorp, W., Steerenberg, P.A., de Jong, W.H., Tiesjema, R.H., Kersjes, A.W., Ruitenbergh, E.J., 1986. Equine sarcoid: BCG immunotherapy compared to
-

- cryosurgery in a prospective randomised clinical trial. *Cancer Immunol Immunother* 21, 133-140.
- Knottenbelt, D.C., 2005. A suggested clinical classification for the equine sarcoid. *Clinical Techniques in Equine Practice* 4, 278-295.
- Knottenbelt, D.C., 2009. Sarcoid, in: Knottenbelt, D.C. (Ed.), *Pascoe's principles and practice of equine dermatology*. Saunders Elsevier, London, UK, pp. 387-407.
- Knottenbelt, D.C., 2019. The Equine Sarcoid: Why Are There so Many Treatment Options? *Vet Clin North Am Equine Pract* 35, 243-262.
- Koch, C., Martens, A., Hainisch, E.K., Schupbach, G., Gerber, V., Haspeslagh, M., 2018. The clinical diagnosis of equine sarcoids - Part 1: Assessment of sensitivity and specificity using a multicentre case-based online examination. *Vet J* 242, 77-82.a
- Koch, C., Ramsauer, A.S., Drogemuller, M., Ackermann, M., Gerber, V., Tobler, K., 2018. Genomic comparison of bovine papillomavirus 1 isolates from bovine, equine and asinine lesional tissue samples. *Virus Res* 244, 6-12.b
- Lazary, S., Gerber, H., Glatt, P.A., Straub, R., 1985. Equine leucocyte antigens in sarcoid-affected horses. *Equine Vet J* 17, 283-286.
- Lunardi, M., Claus, M.P., Alfieri, A.A., Fungaro, M.H.P., Alfieri, A.F., 2010. Phylogenetic position of an uncharacterized Brazilian strain of bovine papillomavirus in the genus Xipapillomavirus based on sequencing of the L1 open reading frame. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 4, 745-749.
- Lunardi, M., Alfieri, A.A., Otonel, R.A., de Alcantara, B.K., Rodrigues, W.B., de Miranda, A.B., Alfieri, A.F., 2013a. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet Microbiol* 162, 207-213.
- Lunardi, M., de Alcantara, B.K., Otonel, R.A., Rodrigues, W.B., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2013b. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. *J Clin Microbiol* 51, 2167-2171.
- Marchetti, B., Ashrafi, G.H., Tsirimonaki, E., O'Brien, M.P., Campo, M.S., 2002. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. *Nature Publishing Group* 21, 7808 – 7816.
-

- Marchetti, B., Gault, E.A., Cortese, M.S., Yuan, Z., Ellis, S.A., Nasir, L., Campo, M.S., 2009. Bovine papillomavirus type 1 oncoprotein E5 inhibits equine MHC class I and interacts with equine MHC I heavy chain. *J Gen Virol* 90, 2865-2870.
- Martens, A., De Moor, A., Demeulemeester, J., Ducatelle, R., 2000. Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. *Res Vet Sci* 69, 295-300.
- Martens, A., De Moor, A., Ducatelle, R., 2001. PCR detection of bovine papilloma virus DNA in superficial swabs and scrapings from equine sarcoids. *Vet J* 161, 280-286.
- Meredith, D., Elser, A.H., Wolf, B., Soma, L.R., Donawick, W.J., Lazary, S., 1986. Equine leukocyte antigens: relationships with sarcoid tumors and laminitis in two pure breeds. *Immunogenetics* 23, 221-225.
- Mittal, S., Banks, L., 2017. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res* 772, 23-35.
- Narechania, A., Terai, M., Chen, Z., DeSalle, R., Burk, R.D., 2004. Lack of the canonical pRB-binding domain in the E7 ORF of artiodactyl papillomaviruses is associated with the development of fibropapillomas. *J Gen Virol* 85, 1243-1250.
- Nasir, L., Brandt, S., 2013. Papillomavirus associated diseases of the horse. *Vet Microbiol* 167, 159-167.
- Nasir, L., Campo, M.S., 2008. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet Dermatol* 19, 243-254.
- 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.
- Nasir, L., Gault, E., Morgan, I.M., Chambers, G., Ellsmore, V., Campo, M.S., 2007. 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* 364, 355 – 361.
- Olson, C., Jr., Cook, R.H., 1951. Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. *Proc Soc Exp Biol Med* 77, 281-284.
- Otten, N., von Tscherner, C., Lazary, S., Antczak, D.F., Gerber, H., 1993. DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. *Arch Virol* 132, 121-131.
-

Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I., Shirasawa, H., 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *Journal of General Virology* 85, 2191–2197.

Pratscher, B., Hainisch, E.K., Sykora, S., Brandt, S., Jindra, C., 2019. No evidence of bovine papillomavirus type 1 or 2 infection in healthy equids. *Equine Vet J* 51, 612-616.

Ragland W.L., Spencer, G.R., 1969. Attempts to relate bovine papilloma virus to the cause of equine sarcoid: equidae inoculated intradermally with bovine papilloma virus. *Am J Vet Res.*, 30 (5), 743-52.

Roperto, S., Russo, V., Corrado, F., De Falco, F., Munday, J.S., Roperto, F., 2018. Oral fibropapillomatosis and epidermal hyperplasia of the lip in newborn lambs associated with bovine Deltapapillomavirus. *Sci Rep* 8, 13310.

Rothacker, C.C., Boyle, A.G., Levine, D.G., 2015. Autologous vaccination for the treatment of equine sarcoids: 18 cases (2009-2014). *Can Vet J* 56, 709-714.

Schapiro, F., Sparkowski, J., Adduci, A., Supryniewicz, F., Schlegel, R., Grinstein, S., 2000. Golgi Alkalinization by the Papillomavirus E5 Oncoprotein. *The Journal of Cell Biology*, Volume 148, Number 2, 305–315.

Scott, D.W., Miller, W.H.J., 2003. Sarcoid, in: Scott, D.W., Miller, W. H. Jr . (Ed.), *Equine Dermatology*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, pp. 719-731.

Shafti-Keramat, S., Schellenbacher, C., Handisurya, A., Christensen, N., Reininger, B., Brandt, S., Kirnbauer, R., 2009. Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes. *Virology* 393, 1-6.

Stadler, S., Kainzbauer, C., Haralambus, R., Brehm, W., Hainisch, E., Brandt, S., 2011. Successful treatment of equine sarcoids by topical aciclovir application. *Vet Rec* 168, 187.

Staiger, E.A., Tseng, C.T., Miller, D., Cassano, J.M., Nasir, L., Garrick, D., Brooks, S.A., Antczak, D.F., 2016. Host genetic influence on papillomavirus-induced tumors in the horse. *Int J Cancer* 139, 784-792.

Trewby, H., Ayele, G., Borzacchiello, G., Brandt, S., Campo, M.S., Del Fava, C., Marais, J., Leonardi, L., Vanselow, B., Biek, R., Nasir, L., 2014. 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. *J Gen Virol* 95, 2748-2756.

Vanselow, B.A., Abetz, I., Jackson, A.R., 1988. BCG emulsion immunotherapy of equine sarcoid. *Equine Vet J* 20, 444-447.

Yuan, Z., Gault, E.A., Campo, M.S., Nasir, L., 2011. Different contribution of bovine papillomavirus type 1 oncoproteins to the transformation of equine fibroblasts. *J Gen Virol* 92, 773-783.

Yuan, Z., Philbey, A.W., Gault, E.A., Campo, M.S., Nasir, L., 2007. Detection of bovine papillomavirus type 1 genomes and viral gene expression in equine inflammatory skin conditions. *Virus Res* 124, 245-249.

Zimmermann, H., Koh, C.H., Degenkolbe, R., O'Connor, M.J., Müller, A., Steger, G., Chen, J.J., Lui, Y., Androphy, E., Bernard, H.U., 2000. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *Journal of General Virology* 81, 2617–2623.

10 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Bovine Papillome Durch BPV1-induzierte, gutartige Fibropapillome ("Kuhwarzen") bei einem jungen Rind in der Nähe von Neapel. Nach Aufnahme des Fotos wurden die Warzen von Forschungspartner Prof. Giuseppe Borzacchiello entfernt und an die Vetmeduni Wien weitergeleitet. Aus ihnen wurden im Anschluss BPV1-Virionen isoliert (S. Brandt: persönliche Mitteilung).	2
Abb. 2: Aufbau des BPV1-Genoms (aus Nasir und Campo, 2008).....	6
Abb. 3: Aufbau des BPV13-Genoms (aus Lunardi et al.; 2013a).....	7
Abb. 4: Die sechs klinischen Sarkoidformen. A: okkultes, B: verruköses, C: noduläres, D: fibroblastisches, E: gemischtes und F: malevolentes (siehe Markierung) Sarkoid	7
Abb. 5: Eselversuch (aus Nasir und Campo 2008)	12
Abb. 6: Diagnostisches Tool von Haspeslagh et al. (aus Haspeslagh et al. 2018)	17
Abb. 7: Ermittlung des BPV13 DNS-Abschnitts, der das E5-Gen beinhaltet, und Primer Design.....	34
Abb. 8: BPV13-Positivkontrolle	34
Abb. 9: Gelfoto 1	42
Abb. 10: Gelfoto 2	43

11 Tabellenverzeichnis

Table 1: Probentabelle	27
Table 2: Ergebnisse	39