

Aus dem Department Pferde und Kleintiere  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Pferde  
(Leiterin: Univ. Prof. Dr. Florian Jenner)

## **Nachweis von EcPV1 bis EcPV8 mittels PCR in Hufkrebsgewebe**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von  
Hannah Quatember

Wien, am 3.9.2020

Betreuer/in:

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

Dr. Veronika Apprich

Klinische Abteilung für Pferdechirurgie, Universitätsklinik für Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter/in:

Brandt Sabine, Dipl.-Ing in Dr. nat. techn. Priv.-Doz

Universitätsklinik für Pferde, Klinische Abteilung für Pferdechirurgie

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines gesamten Studiums und dem Anfertigen meiner Diplomarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. med. vet. Sabine Sykora und Dr. med. vet. Veronika Apprich, die meine Diplomarbeit betreut, mich immer bestmöglich unterstützt haben und jederzeit für Fragen und Antworten erreichbar waren.

Ich bedanke mich auch bei Dipl.-Ing. Dr. Priv.-Doz. Sabine Brandt und Dr. Christoph Jindra, die während meiner Arbeit im Labor immer für Fragen zur Verfügung standen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Zwillingsschwester, Lotte. Sie war während meines Studiums meine stärkste Stütze. Seit ich denken kann ist Sie in sowohl guten als auch schlechten Zeiten ohne Wenn und Aber immer für mich da.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben, immer hinter mir stehen und mich zu jeder Zeit motivierten.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Literaturübersicht .....	2
2.1. Anatomischer und histologischer Aufbau des Hufes .....	2
2.2. Keratinisierung .....	7
2.3. Hornqualität und Hornwachstum.....	8
3. Hufkrebs .....	10
3.1. Klinisches Bild .....	10
3.2. Diagnostik.....	11
3.3. Pathohistologie .....	12
3.4. Ätiologie .....	13
3.5. Therapie und Prognose .....	15
4. Papillomviren (PV) .....	18
4.1. Humane Papillomviren (HPV) .....	21
4.2. Bovine Papillomviren (BPV) .....	22
4.3. Equine Papillomviren .....	24
5. Nachweis von Papillomviren mittels PCR.....	29
5.1. Prinzip der Gelelektrophorese .....	30
6. Material und Methode .....	31
6.1. Probenmaterial.....	31
6.2. DNS- Extraktion.....	33
6.3. PCR (Polymerase- Kettenreaktion, polymerase chain reaction) .....	33
6.3.1. $\beta$ -actin PCR.....	33
6.3.2. EcPV- PCR .....	35
6.4. Gelelektrophorese .....	38
6.4.1. Herstellung Agarosegel.....	38
6.4.2. Auftragen der PCR- Produkte.....	38
6.4.3. Durchführung der horizontalen Gelelektrophorese .....	39
7. Ergebnisse .....	40

7.1.	Messung der DNS-Konzentration .....	40
7.2.	Ergebnisse EcPV-PCR .....	42
7.2.1.	EcPV1- E1 .....	42
7.2.2.	EcPV2- E1 .....	43
7.2.3.	EcPV3- E6 .....	44
7.2.4.	EcPV4-E6 .....	44
7.2.5.	EcPV5- E6 .....	45
7.2.6.	EcPV6- E6 .....	45
7.2.7.	EcPV7- E6 .....	47
7.2.8.	EcPV8 .....	47
8.	Zusammenfassung.....	53
9.	Summary .....	54
10.	Abkürzungsverzeichnis .....	55
11.	Literaturverzeichnis .....	57
13.	Abbildungsverzeichnis .....	65
14.	Tabellenverzeichnis .....	66

## 1. Einleitung

Hufkrebs ist eine chronisch entzündliche Störung der Hornbildung mit Wucherung des Papillarkörpers und ausbleibender Keratinisierung (RIGERT et al. 2009, MISHRA et al. 1998). Die Ursache ist bislang noch unbekannt. Es wurden bereits einige Hypothesen bezüglich der Ätiologie von Hufkrebs aufgestellt. Einerseits wurden exogene Faktoren, eine Rasseprädisposition, der Beschlag oder ein immunologisches Geschehen vermutet, andererseits wurde auch auf Mikroorganismen, wie Pilze und Bakterien sowie auf infektiöse Partikel, wie Viren, getestet. Bisher konnte jedoch noch keine konstant nachweisbare Ursache entdeckt werden (BRANDT et al. 2011, DIETZ 2005, JONGBLOETS et al. 2005, MINAMI et al. 1991, REDDING und O'GRADY 2012, SYKORA und BRANDT 2014, APPRICH et al. 2020). Durch die ungeklärte Ätiologie ist es schwierig, eine adäquate Therapie zu finden. Aktuell werden mehrere unterschiedliche Therapieansätze mit guten Erfolgen beschrieben. Jedoch kommt es sehr oft zu Rezidiven (JONGBLOETS et al. 2005, OOSTERLINCK et al. 2011, APPRICH und LICKA 2013). Histologisch konnten im Hufkrebsgewebe Koilozyten nachgewiesen (APPRICH et al. 2017) werden. In der Humanmedizin ist eine Koilozytose pathognomon für Papillomvirus-infektionen (KRAWCZYK et al. 2008), welche beim Mensch ursächlich für harmlose Warzen bis hin zu malignen Gewebsveränderungen sind (BURD und DEAN 2016). Auch in der Veterinärmedizin können Papillomviren ähnliche Krankheitsbilder auslösen, wie beispielsweise das Canine Papillomvirus (CPV1) als Verursacher der oralen Papillome beim Hund oder das feline Papillomvirus (FdPV1), welches mit hoher Wahrscheinlichkeit für sessile Läsionen bei der Katze verantwortlich ist (ACKERMANN 2013). Das beim Pferd vorkommende equine Sarkoid wird ebenfalls durch Papillomviren, bovines Papillomvirus Typ 1 und Typ 2 (BPV1 und BPV2), verursacht. Das Krankheitsbild weist morphologisch einige Parallelen zu den Hufkrebsveränderungen auf (NASIR und REID 1999, CHAMBERS et al. 2003). Ein ursprünglich angenommener Zusammenhang zwischen BPV1, BPV2 und Hufkrebs konnte jedoch nicht bestätigt werden (APPRICH et al. 2020). Aufgrund der Ähnlichkeiten kommen dennoch andere Papillomviren als Ursache für Hufkrebs in Frage, nämlich die equinen Papillomviren. Aktuell gibt es noch keine Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Hufkrebs und equinen Papillomviren (EcPVs). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit histologisch bestätigtes Hufkrebsgewebe von Pferden, die an der Veterinärmedizinischen Universität Wien vorstellig wurden, auf EcPV1- EcPV8 untersucht. Die Hypothese lautet, dass equine Papillomviren ursächlich an der Entstehung von Hufkrebs beteiligt sind.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Anatomischer und histologischer Aufbau des Hufes

Das Zehenendorgan wird beim Pferd als Huf (*Ungula*) bezeichnet. Die Hornkapsel (*Capsula unguiae*) ist der äußerste Bestandteil des Hufes. In der Hufkapsel befinden sich die knöchernen Strukturen, die als Stützteile fungieren. Zudem umgibt die Hufkapsel die beiden Hufknorpel (*Cartilago unguiae medialis und lateralis*), synoviale Strukturen und alle innerhalb liegenden Sehnen und Bänder (KÖNIG und LIEBICH 2005, GEYER 2008).

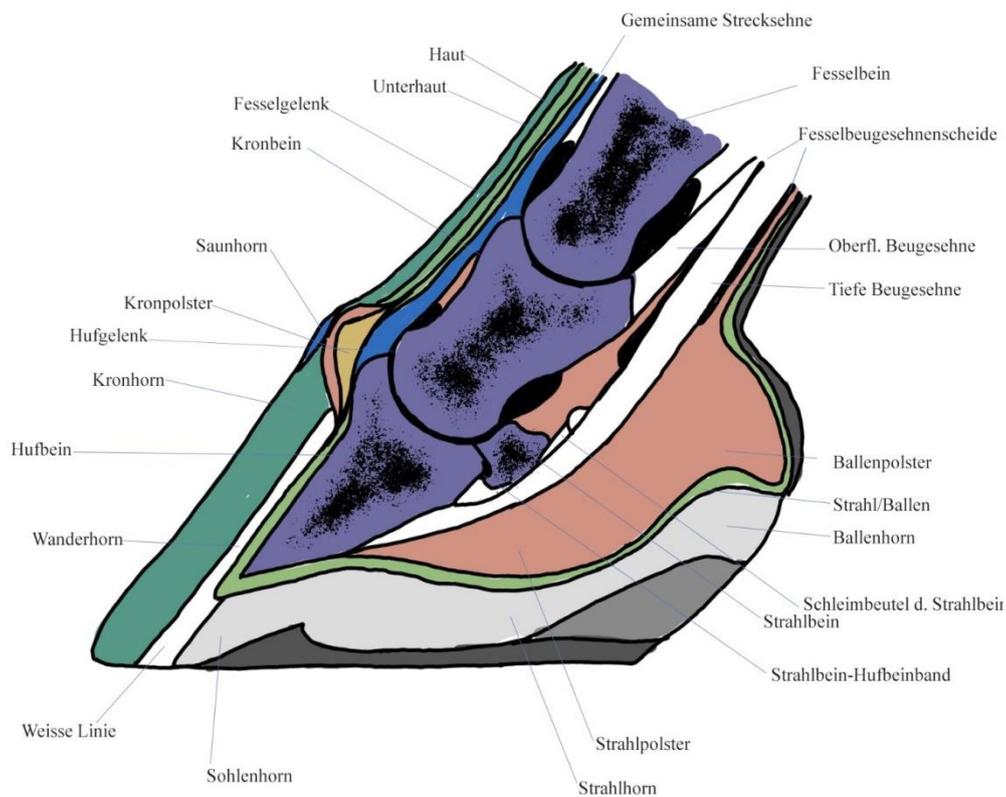


Abb. 1: schematische Darstellung des Hufes (modifiziert nach POLLITT 1999)

Die arterielle Versorgung des Hufes erfolgt hauptsächlich über zwei Arterien, die *Arteria (A.) digitalis palmaris/ plantaris lateralis* und die *A. digitalis palmaris/ plantaris medialis*. Sie nehmen ihren Ursprung in der Hauptmittelfußarterie. An der Hinterextremität erfolgt die Blutversorgung zusätzlich über die *Arteriae (Aa.) digitales plantares communis II et III*. Die *Aa. digitales palmares/ plantares lateralis* und *medialis* entlassen im Bereich des Kronbeines Äste zum Ballen und zusätzlich jeweils eine Arterie zur Krone. Im weiteren Verlauf entlassen sie weitere Äste zum Strahl und zur Wandlerhaut der Dorsal-, Seiten- und Trachtenwand.

Anschließend treten die Arterien über das *Foramen soleare* in den Hufbeinkanal ein, anastomosieren und bilden den *Arcus terminalis*. Von diesem ziehen mehrere Gefäße in Richtung Hufbeinwand und weitere nach distal durch die Sohlenrandlöcher, wo sie sich zur *A. marginis solearis* verbinden (GEYER 2008, BUDRAS und KÖNIG 2005a).

Die venösen Gefäße verlaufen grundsätzlich parallel zu den Arterien. Die Gefäße bilden ein venöses Netzwerk in der Huflederhaut, wodurch die *V. marginis solearis* gebildet wird. Diese hat eine enge Verbindung zum venösen *Arcus terminalis*. Zudem liegt ein weiteres Venengeflecht auf der Hufknorpelinnenseite. Der Blutabfluss erfolgt über die *Venae (Vv.) coronales*, *Vena (V.) tori digitalis* und die *V. marginis solearis*. Sie münden in die *Vv. digitales palmares/ plantares medialis* und *lateralis* oder in den *Arcus terminalis* (GEYER 2008, BUDRAS und KÖNIG 2005a).

Die nervale Versorgung des Hufs der Vordergliedmaße erfolgt über *Nervi (Nn.) digitales palmares medialis* und *lateralis*. Der Nervus (*N.*) *digitalis palmaris lateralis* führt sensible Fasern des *N. ulnaris* und des *N. medianus*. Der *N. digitalis palmaris medialis* führt hingegen nur sensible Fasern des *N. medianus*. Im weiteren Verlauf innervieren diese beiden Zehennerven über separate Äste die dorsomediale Seite der Fessel und bis zum Kronrand, die dorsomediale Aussackung der Kron- und Hufgelenkskapsel. Anschließend ziehen die Zehennerven weiter nach distal und geben jeweils einen Ast zum Ballenpolster ab. Weiter distal entlassen sie jeweils weitere Äste für die sensible Versorgung der Kron- und Hufgelenkskapsel, des Hufgelenks, des Strahlbeins, der *Bursa podotrochlearis* und der Lederhaut im Trachten- und medialen Seitenwandbereich. Der dorsale Anteil des Hufes wird über den *Ramus dorsalis* des *N. digitalis palmaris medialis* und *lateralis* versorgt. Dieser Ast verläuft bis zum Saum-, Kron- und Wandsegment (SALOMON 2008, NICKEL et al. 2004).

Die Beckengliedmaße wird über die *Nn. digitales plantares medialis* und *lateralis* versorgt. Diese beiden Zehennerven nehmen ihren Ursprung und ihre sensiblen Fasern aus dem *N. tibialis*. Die Versorgung des dorsalen Anteils der Fessel wird auch an der Hintergliedmaße vom *R. dorsalis* des *N. digitalis plantaris medialis* bzw. *lateralis* übernommen. Die Aufteilung der Zehennerven ist ident mit jener an der Schultergliedmaße. Auch die Innervation der dorsalen Abschnitte wird wie an der Vordergliedmaße vom *Ramus dorsalis* übernommen. Zusätzlich sind für die Innervation des dorsalen Abschnitts des Hufes die *Nn. digitales dorsales medialis* und *lateralis*, die aus dem *N. fibularis* stammen, zuständig (SALOMON 2008, NICKEL et al. 2004).

Die Haut weist in mehreren Abschnitten des Hufes Charakteristika auf und wird daher in folgende fünf Segmente unterteilt: Saumsegment (*Limbus*), Kronsegment (*Corona*), Wandsegment (*Paries*), Sohlensegment (*Solea*) und Ballensegment (*Torus digitalis*).

Das wenige Millimeter dicke Saumsegment befindet sich gleich distal der behaarten Haut und ist somit der am weitesten proximal liegende Abschnitt. Der *Limbus* bildet weiches Röhrenhorn als Überzugsschicht. Anschließend folgt das Kronsegment. Dieses bildet das härteste Horn und nimmt zugleich den größten Teil der Hornwand ein. Auch in diesem Abschnitt wird Röhrenhorn gebildet. Das distal folgende Wandsegment besitzt als einziges Segment einen blättchenförmigen Papillarkörper und keine Subkutis. Diese Lederhautblättchen stehen dadurch in enger Verbindung mit den Hornblättchen, wodurch sie eine wichtige Rolle für die Aufhängung des Hufbeines spielen. Der nächstfolgende und distalste Hufabschnitt ist das Sohlensegment. Diesem fehlt, ähnlich wie dem Wandsegment, die Subkutis und bildet hartes Röhrenhorn. Es ist durch seine konkave Wölbung charakterisiert. Nur der äußere Rand des Sohlensegmentes steht bei der Fußung in direktem Kontakt mit dem Boden. Weiter palmar/ plantar liegt das Ballensegment. Dieses ist durch eine dicke Subkutis, auch Ballenpolster genannt, und weiches, elastisches Horn gekennzeichnet. Weiters zählt auch der Strahl (*Cuneus*) zu diesem Segment. Dieser besteht aus zwei Strahlschenkeln (*Crus cunei laterale und mediale*), welche sich dorsal zur Strahlspitze verbinden und palmar/ plantar in den Ballen übergehen. In der Mitte befindet sich die mittlere Strahlfurche (*Sulcus cunealis centralis*) und jeweils eine seitliche Strahlfurche medial und lateral (*Sulcus paracunealis medialis und lateralis*). Der Strahl übernimmt die Aufgabe des „Stoßdämpfers“. Er hat einen W-förmigen Querschnitt, der unter Belastung deutlich abflacht. Durch seine Elastizität kann der Strahl während der Schwebephase wieder seine ursprüngliche Form annehmen. Im Bereich des Strahls ist die Subkutis deutlich verdickt, wodurch die federnde Wirkung nochmals verstärkt wird. Dieser Bereich wird als Strahlpolster bezeichnet und geht fließend in den Ballenpolster über. Weiters werden in der Literatur in der Subkutis lokalisierte Strahlrüsen beschrieben. Deren genaue Aufgabe ist nicht ganz geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass sie für den Feuchtigkeitshaushalt des Strahlhorns bedeutsam sind (BOLLIGER und GEYER 1992, GEYER 2008, BUDRAS und KÖNIG 2005a). Das Horn des Saum-, Kron- und Wandsegments formt gemeinsam die Hufwand. Der Kronrand (*Margo coronalis*) ist der Übergang zur behaarten Haut und somit die proximale Begrenzung der Hornwand. Die distale Begrenzung wird als Tragrand (*Margo solearis*) bezeichnet. Dieser wird aus Kron- und Wandhorn gebildet und nimmt die Hauptlast bei der Fußung auf. Das Saumhorn besteht aus weichem, mürbem Röhrenhorn und wird als Deck-

oder Glasurschicht (*Stratum externum*), die sich dachziegelartig und grau darstellt, bezeichnet. Es ist der oberflächlichste Teil und reicht meist nicht bis zum Tragrand. Das Saumhorn fungiert als Feuchtigkeitsspender für das Kronhorn, das dadurch seine Feuchtigkeit und Elastizität erhält. Der Interzellularkit des Saumhorns hat einen hohen Lipidgehalt, wodurch die Feuchtigkeit im Horn gehalten werden kann und ihm eine versiegelnde Funktion zugesprochen wird. Den größten und tragfähigsten Abschnitt bildet das Kronhorn, welches als Schutzschicht fungiert und als *Stratum medium* bezeichnet wird. Im Seitenwandbereich nimmt es im palmaren bzw. plantaren Verlauf immer weiter ab. Es wird direkt im Anschluss an das Saumhorn im Bereich des Kronwulstes produziert. An der dorsalen Zehenwand erreicht es eine Dicke von 10 mm. Nach palmar bzw. plantar nimmt die Dicke ab, sodass sie im Trachtenbereich nur mehr zwischen 6-8 mm misst. Das Wandhorn (*Stratum internum*) soll für einen engen Kontakt mit den innen liegenden Abschnitten und der Sohle sorgen und bildet die innerste Schicht der Hornwand. Die weiße Linie, auch als (*Zona alba*) bezeichnet, bildet die Verbindung zwischen Kronhorn und Sohlenhorn. Zugleich stellt sie die distale Verlängerung des Wandsegments vom distalen Hufbeinende bis zum Tragrand dar. Sie besteht aus hartem Blättchenhorn und weichem Terminalhorn und hat physiologisch eine Breite von zirka 3 mm (BOLLIGER und GEYER 1992, GEYER 2008, BUDRAS und KÖNIG 2005a).

Alle oben genannten Segmente, außer das Wand- und Sohlensegment, werden ähnlich wie die behaarte Haut, von der Unterhaut (*Subcutis*) und der obersten Hautschicht (*Cutis*) gebildet. Diese wiederum besteht aus der Lederhaut (*Corium* oder *Dermis*) und der nur aus Epithelzellen bestehenden Oberhaut (*Epidermis*). Diese Hautschichten weisen in jedem Segment gewisse Charakteristika auf. Eine *Subcutis* befindet sich nur an Stellen, wo eine Polsterung nötig ist. Beispielsweise am Übergang zwischen behaarter und stark verhornter Haut im Bereich des Saum- und Kronsegmentes, wodurch der sogenannte Kronwulst gebildet wird. Zudem bewirken die Subkutispolster des Ballens und des Strahls die Ausdehnung der hinteren Hufpartien. In den Bereichen, wo die *Subcutis* fehlt, besteht eine feste Verbindung zwischen Periost des Hufbeins bzw. Perichondrium des Hufknorpels und dem *Corium*. Sowohl die *Subcutis* als auch das *Corium* bestehen aus Bindegewebe und sind gut vaskularisiert und innerviert. Das *Corium* wird aus dem oberflächlich liegenden *Stratum papillare* und dem darunter liegenden *Stratum reticulare* gebildet. Die Oberfläche der Lederhaut wird durch Zotten, die in allen Segmenten vorhanden sind, erheblich vergrößert. Im Wandsegment erfolgt die Oberflächenvergrößerung in Form von Blättchen. Diese werden auch als Primärblättchen bezeichnet und teilen sich zur weiteren Vergrößerung der Oberfläche

in Sekundärblättchen auf. Die Papillen der Lederhaut bilden den sogenannten Papillarkörper, der für mechanische Stabilität und die Ernährung der *Epidermis* sorgt. Die *Epidermis* weist einen starken Verhornungsgrad auf. Sie ist im Gegensatz zu den bereits genannten Hautschichten gefäßlos. Die Nerven reichen nur bis in die Basalschichten, wodurch der Hornschuh unempfindlich ist. Bei ihrem Aufbau unterscheidet man entsprechend der Ausprägung der Lederhaut zwischen Röhren- und Blättchenhorn. Die tiefsten Schichten der *Epidermis* sind das *Stratum basale* und das *Stratum spinosum*. Diese beiden Schichten werden gemeinsam auch als *Stratum germinativum* bezeichnet. Bei hartem Horn besteht ein direkter Übergang vom *Stratum spinosum* in das *Stratum corneum*. Im Gegensatz dazu liegt bei weichem Horn das *Stratum granulosum* zwischen den beiden vorher genannten Schichten (BOLLIGER und GEYER 1992, BUDRAS und KÖNIG 2005a, GEYER 2008).

Das Hufhorn setzt sich zum größten Teil aus Röhrenhorn und Zwischenröhrenhorn zusammen. Ausschließlich im Bereich des Wandsegments wird Blättchenhorn gebildet. Das Röhrenhorn wird vom *Stratum germinativum* über den Zotten der Lederhaut gebildet und lässt sich in zwei Teile gliedern: Rinde (*Cortex*) und Markraum (*Medulla*). Der *Cortex* ist die tragfähigste Schicht des Horns. Durch die variierende Zellform und Anordnung um den Markraum unterscheidet man drei Röhrentypen. Beim Röhrentyp I befinden sich rundliche, abgeplattete Zellen mit ovalem Querschnitt um den Markraum. Dieser Typ befindet sich im Saumhorn und in der Außen- und Mittelzone des Kronhorns. Röhrentyp II ist charakterisiert durch spindelförmige Zellen, die parallel zur Längsachse des Markraumes angeordnet sind. Bei Röhrentyp III ist der Markraum ebenfalls von spindelförmigen Zellen zirkulär umgeben. Röhrentyp II befindet sich in der Innenzone des Kronhorns. Röhrentyp III ist im Sohlen-, Strahl- und Ballhorn lokalisiert. Beim Zwischenröhrenhorn, das von der *Epidermis* zwischen den Zotten gebildet wird, findet man weniger abgeplattete Zellen (BOLLIGER UND GEYER 1992, GEYER 2008).

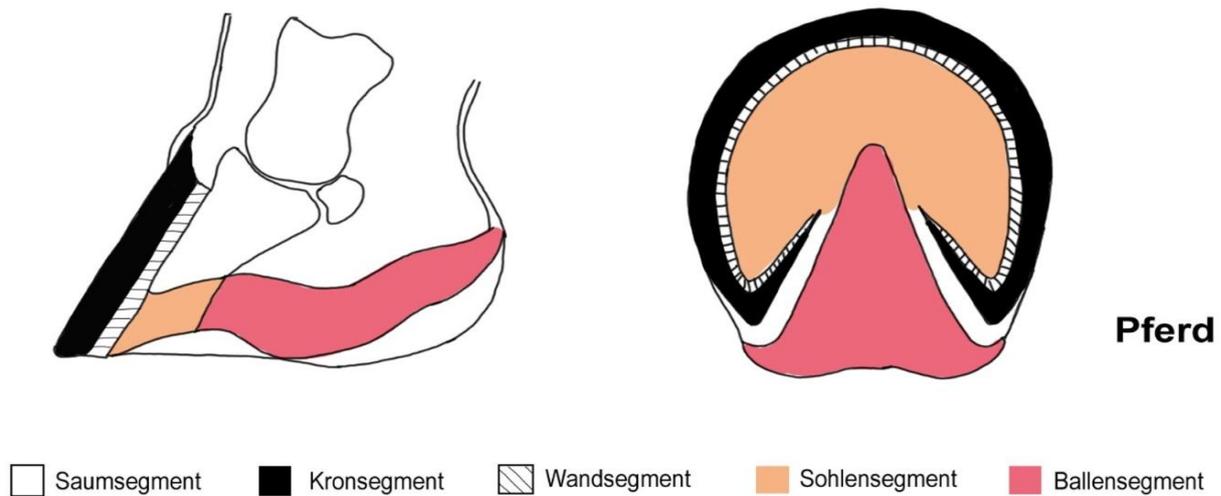


Abb. 2: schematische Darstellung der Hufsegmente (modifiziert nach BUDRAS et al. 2005b)

## 2.2. Keratinisierung

Die Keratinisierung beginnt bereits im *Stratum basale* und nimmt im *Stratum spinosum* weiter seinen Lauf. Durch Zellteilung werden die Basalzellen weiter zu Keratinozyten und in weiterer Folge an der Oberfläche zu Korneozyten ausdifferenziert. Im *Stratum basale* und im *Stratum spinosum* werden sogenannte Tonofilamente eingelagert. Sie sind die Vorgänger der Keratinfibrillen des *Stratum corneum*, die für die Stabilität innerhalb der Korneozyten sorgen. Die Zellkerne der oberflächlich liegenden Schichten degenerieren und stellen sich in den Korneozyten als schmale, pyknotische Kerne dar. Für die äußere Festigkeit zwischen den Zellen der tieferen Hautschichten sorgen sogenannte Desmosomen. Diese werden im *Stratum germinativum* gebildet. Die Zellen des *Stratum spinosum* produzieren Interzellularkitt (membrane coating material) und geben diesen anschließend in den Interzellularspalt ab. Dieser soll eine stabile Verbindung zwischen den Hornzellen der oberflächlicheren Hautschichten gewährleisten. Durch das Absterben der Epithelzellen kommt es zur Verhornung (Apoptose). Die verhornten Zellen sind somit bereits tot. Sie bleiben von einigen Monaten bis zu einem Jahr weiter an der Hornwand bis sie letztendlich an der Oberfläche abgerieben werden (BOLLIGER und GEYER 1992, GEYER 2008, BUDRAS et al. 2005b).

### 2.3. Hornqualität und Hornwachstum

Die Hornqualität und das Hornwachstum werden durch mehrere unterschiedliche Parameter beeinflusst. Auch die Ernährung spielt eine wesentliche Rolle bei der Hornqualität. Beispielsweise wurde in einer Studie von COENEN u. SPITZLEI (1996) ein Zusammenhang von Zink mit der Hornzusammensetzung und -festigkeit festgestellt. Es wurde ein niedriger Zinkgehalt im Kron- und Sohlenhorn bei Pferden mit schlechter Hufqualität beobachtet. Gleichzeitig wurde auch ein niedriger Zinkgehalt in den Haaren und im Blut festgestellt, was diesem Spurenelement eine Bedeutung bezüglich der Hornqualität zuspricht. Jedoch als primärer Faktor für schlechte Hornqualität wird eine niedrige Zinkkonzentration nicht gesehen, da die Konzentration in den Rationen der Pferde mit guter und schlechter Hornqualität ähnlich war. Durch die Supplementierung von Zink kann die Zinkkonzentration im Hufhorn erhöht werden, jedoch ist noch zu untersuchen, ob dadurch auch die Hornfestigkeit erhöht werden kann. Weiters steht die Hornhärte mit dem Cysteingehalt in Zusammenhang. Diese Aminosäure wird bei der Keratogenese in den aushärtenden Zellverband eingebaut. Es besteht die Vermutung, dass derartige Abläufe bei schlechter Hornqualität gestört sind. Wie sinnvoll die Beifütterung von Aminosäuren ist, muss noch untersucht werden, da der Cystein- und Methioninanteil an den Gesamtaminosäuren bei schlechter Hornqualität nicht vermindert ist (COENEN u. SPITZLEI 1996). Eine weitere Studie bei Lipizzanern zeigte den positiven Effekt von Biotinsupplementierung auf die Hornqualität. Bei einer täglichen Biotindosis von 20 mg konnte nach neun Monaten eine deutliche Verbesserung der Hornqualität beobachtet werden. Auffällig war, dass die weiße Linie härter wurde, das Kronhorn wurde stabiler und die Spaltenbildung nahm deutlich ab. Die Wachstumsrate des Hufhorns wurde durch die Biotingabe nicht beeinflusst (JOSSECK et al. 1995). Eine Studie von PATAN (2001) gab einen Hinweis darauf, dass auch eine genetische Komponente bei der Hufqualität von Bedeutung sein könnte. Sie wies nach, dass das äußere Kronhorn bei Przewalskipferden härter ist als das von Warmblutpferden. Zudem ist das Wasseraufnahmevermögen des gesamten Kronhorns bei Przewalskipferden niedriger. Generell sind beim Kronhorn der Przewalskipferde die Hornröhrchen kleiner und sie stehen dichter beieinander als bei Warmblütern. Auch das Rinden-Mark-Verhältnis ist im Vergleich geringer (PATAN 2001). Die Keratinbildung und die Produktion des Interzellularkitts werden durch eine genetische Komponente beeinflusst (GEYER 2008). Es wurde auch beobachtet, dass die Hornqualität mit zunehmendem Hornwachstum abnimmt. Exogene Faktoren, wie Hufpflege und Beschlag, spielen dabei eine wesentliche Rolle (GEYER 2008). Der Feuchtigkeitshaushalt wird zum größten Teil über die Lederhaut

reguliert und auch durch äußere Faktoren beeinflusst. Die bereits erwähnten Strahlrösen tragen nur einen geringen Beitrag zur Feuchtigkeit des Strahlhorns bei (BOLLIGER und GEYER 1992).

Das Hornwachstum verläuft in proximodistaler Richtung. Es wird vermutet, dass das Hornwachstum stark mit der Durchblutung der Lederhaut zusammenhängt. Die Geschwindigkeit des Hornwachstums kann jedoch nicht in exakten Zahlen angegeben werden, da sie bei jedem Individuum sehr variabel ist. Bei jüngeren Pferden wurde zudem ein schnelleres Hornwachstum beobachtet. Faktoren wie beispielsweise das Alter, der Beschlag, die Jahreszeit oder die Rasse spielen eine Rolle (BUTLER und HINTZ 1977). Bei Przewalskipferden wurde der Einfluss der Jahreszeit auf die Hornproduktion und auf den Hornabrieb untersucht. Beides, sowohl die Produktion als auch der Abrieb, sind im Sommer signifikant höher als im Winter. Es wird vermutet, dass die Umgebungstemperatur, die Tageslichtlänge, die Bewegungsaktivität und das variierende Nahrungsangebot dabei eine Rolle spielen. Der Abrieb steht zudem auch mit der Bodenbeschaffenheit, der Hornqualität, der Bewegungsaktivität und dem eigenen Körpergewicht in Zusammenhang (PATAN 2001). Zudem wurde auch bei Pferden mit einem höheren Bewegungspensum ein stärkeres Hornwachstum beschrieben. Die höhere Wachstumsrate ist auf die stärkere Durchblutung der Huflederhaut zurückzuführen (WINTZER 1986). Die Ernährung hat nicht nur, wie bereits angesprochen, Einfluss auf die Hornqualität, sondern auch auf die Hornbildung. So wurde in einer Studie von BUTLER und HINTZ (1977) einer Gruppe von Ponys im Alter von acht Monaten eine Diät mit und eine ohne Gelatine zum einen kontrolliert und zum anderen *ad libidum* gefüttert. Bei der *ad libidum*-Fütterung wurde ein höheres Hufwachstum als bei limitierter Fütterung beobachtet. Die Supplementierung von Gelatine wirkt sich nur geringgradig positiv auf das Hufwachstum und die Hufqualität aus. Auch das Geschlecht hat weder auf die Hornqualität noch auf das Hornwachstum einen signifikanten Einfluss (BUTLER und HINTZ 1977). Das Hornwachstum variiert bei jedem Individuum in jedem Segment. Das Wachstum des Kronhorns im Hufwandbereich bei Warmblütern beträgt zirka 8-12 cm pro Jahr und im Bereich der Sohle und des Strahls rund 5-6 cm pro Jahr (BOLLIGER und GEYER 1992, BUDARS und KÖNIG 2005a, GEYER 2008, BUTLER und HINTZ 1977).

### 3. Hufkrebs

Hufkrebs wird auch als *Pododermatitis chronica verrucosa sive migrans* bezeichnet. Es handelt sich um eine chronische Entzündung der Huflederhaut (Pododermatitis), die durch Veränderungen der Lederhaut des Papillarkörpers, Parakeratose und fehlende Epithelisierung und Verhornung charakterisiert ist. Hufkrebs ist jedoch keine „echte“ Neoplasie. Die Veränderungen des Papillarkörpers stellen sich optisch nur krebsartig dar (DIETZ 2005, FÜRST und LISCHER 2012).

#### 3.1. Klinisches Bild

Hufkrebs beginnt in der Regel im Bereich des Strahles. Bei einem längeren Krankheitsverlauf können die Veränderungen auf die Sohle, die Eckstreben und die Hufwand übergreifen (O'GRADY und MADISON 2004). So können vier Hufkrebstypen, nämlich Strahl-, Wand-, Eckstreben- und Sohlenkrebs, unterschieden werden (DIETZ 2005). Bei typischem Hufkrebsgewebe stellt sich der Papillarkörper blumenkohl- bzw. federbaumartig dar. Die Verhornung der epidermalen Schichten in diesen Bereichen ist mangelhaft oder fehlt zur Gänze, da die Epithelzellen in diesen Bereichen degenerieren und zerfallen. Dadurch bilden sich grau-weißlich-käsige Beläge auf den veränderten Bereichen. Die defekte Epidermisschicht verliert ihre Barriere- und Schutzfunktion, wodurch das darunter liegende Gewebe bei geringer Manipulation zu bluten beginnt (APPRICH et al. 2017, O'GRADY und MADISON 2004).

Weiters ist beim frischen Schnitt über das veränderte Gewebe sofort ein charakteristischer, kariöser Geruch wahrnehmbar (O'GRADY und MADISON 2004, DIETZ 2005). Weitere Anzeichen für Hufkrebs können eine Rötung im Kronrandbereich, Palpationsdolenz und Haarwachstum in alle Richtungen sein. In seltenen Fällen kann auch das Horn an den Kastanien betroffen sein (FÜRST und LISCHER 2012). Bei Wandkrebs kommt es häufig zu einer Verformung im Trachtenbereich. Bei einem Zusammenhangsverlust mit der Wandlederhaut wölben sich die Trachtenwände konkav nach außen. Wenn dabei größere Wandabschnitte involviert sind, kann es zur Lockerung des Aufhängeapparates des Hufbeines und folglich zu einer Rotation des Hufbeines kommen (DIETZ 2005). Vor allem zu Beginn der Erkrankung zeigen die meisten Pferde keine Lahmheit. Erst bei fortgeschrittenen Fällen können unterschiedliche Lahmheitsgrade beobachtet werden. Der

Grad der Lahmheit ist von der Instabilität der Hufkapsel abhängig (O'GRADY und MADISON 2004).

Manche Autoren beschreiben, dass die Beckengliedmaße häufiger betroffen ist (MINAMI et al. 1991, REEVES et al. 1989, FÜRST und LISCHER 2012, MISHRA et al. 1998, DIETZ 2005, AZZOLINI et al. 2019). OOSTERLINCK et al. (2011), RIGERT et al. (2009) und APPRICH und LICKA (2013) konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Auftreten von Hufkrebs an der Vorder- oder Hinterextremität nachweisen. Zudem wird auch beschrieben, dass häufiger mehrere Hufe zeitgleich betroffen sind (RIGERT et al. 2009, O'GRADY und MADISON 2004, APPRICH und LICKA 2013).

### 3.2. Diagnostik

Die Diagnose kann bereits durch das typische klinische Bild gestellt werden. Um die Ausdehnung der Hufkrebsveränderungen abschätzen zu können, werden die veränderten Bereiche sondiert. Das gänzliche Ausmaß kann jedoch erst nach Abtragen des losen, zerfallenen Horns festgestellt werden (DIETZ 2005).

Zur Bestätigung der Diagnose kann eine histologische Untersuchung des veränderten Gewebes durchgeführt werden. Dabei soll sowohl gesundes als auch verändertes Gewebe entnommen werden, um einen Vergleich zu haben und den Übergang beurteilen zu können. Bei bakteriologischen Untersuchungen wurden hauptsächlich Umweltkeime wie *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium necrophorum* und *Treponema sp.* nachgewiesen (REDDING und O'GRADY 2012, DIETZ 2005, RIGERT et al. 2009, SYKORA und BRANDT 2014).

Eine Differentialdiagnose und gleichzeitig häufige Fehldiagnose im Frühstadium der Erkrankung ist Strahlfäule (O'GRADY und MADISON 2004). Hufkrebs und Strahlfäule kann jedoch durch die Lokalisation der Veränderungen und deren Ausbreitung unterschieden werden. Strahlfäule beschränkt sich auf den Strahlkörper und die laterale und mediale Strahlfurche. Hufkrebs hingegen kann sich in fortschreitenden Stadien auf das benachbarte Gewebe ausbreiten. Zudem ist für Hufkrebs eine Proliferation des Gewebes typisch. Im Gegensatz dazu geht Strahlfäule mit einem Gewebeverlust einher. Auch die von Strahlfäule betroffenen Strahlfurchen sind tiefer. Die weißen Beläge, der kariöse Geruch und die hohe Blutungsneigung bei Hufkrebs ist ein weiteres Unterscheidungsmerkmal. Das veränderte

Gewebe bei Strahlfäule stellt sich im Gegensatz dazu schwarz dar und hat einen fauligen Geruch (O'GRADY und MADISON 2004, REDDING und O'GRADY 2012, DIETZ 2005, BAXTER et al. 2011). In fortgeschrittenen Stadien ist eine Differenzierung leichter. Die vorher falsch diagnostizierte Strahlfäule und der dadurch verzögerte Beginn einer adäquaten Behandlung wirken sich negativ auf den Krankheitsverlauf aus (OOSTERLINCK et al. 2011).

### 3.3. Pathohistologie

Im Hufkrebsgewebe wirkt das *Stratum spinosum* verbreitert und weist Degenerationsanzeichen und eine deutliche Vakuolenbildung auf. Das *Stratum corneum* fehlt vollständig. Die Epithelzellen degenerieren und zerfallen, woraufhin die schmierige, käsige Schicht auf der Lederhaut entsteht (DIETZ 2005). Diese defekte Epidermisschicht liegt der Lederhaut direkt auf, bietet aber keinen adäquaten Schutz mehr vor Infektionen. Der Funktionsverlust dieser Schicht ist auch die Erklärung für die erhöhte Blutungsneigung und das erhöhte Infektionsrisiko. Eine weitere pathohistologische Veränderung, die im Hufkrebsgewebe zu finden ist, ist die Koilozytose (APPRICH et al. 2017). Diese Veränderung ist auch in der Humanmedizin schon länger bekannt und wird in Zusammenhang mit Papillomvirusinfektionen beschrieben (KRAWCZYK et al. 2008). Koilozyten oder *ballooning keratinocytes* sind Keratinozyten, welche durch ein um den Zellkern gelegenes, scharf begrenztes optisch leeres Feld gekennzeichnet sind. Diese Zellen können weitere Veränderungen, wie eine Vergrößerung oder Schrumpfung (Pyknose) des Zellkerns, eine Doppel- oder Mehrkernigkeit oder ein vergrößertes und verstärkt anfärbbares (hyperchromatisch) Chromatin aufweisen (KOSS und DURFEE 1959). Auch in Hufkrebsgewebe wurden *ballooning keratinocytes* beschrieben (APPRICH et al. 2017). In dieser Studie von APPRICH et al. (2017) wurden neben den Koilozyten auch Lakunen, Riesenzellen im *Stratum germinativum*, sowie Blutungen und Entzündungszeichen als Hauptveränderungen bei Hufkrebs genannt. Lakunen sind als flüssigkeitsgefüllte Hohlräume mit eosinophilem Inhalt definiert. Riesenzellen werden als vergrößerte Keratinozyten mit intaktem Zytoplasma und Zellkern beschrieben (APPRICH et al. 2017).

NAGAMINE et al. (2005) beschreiben das Hufkrebsgewebe als hyperkeratotisch und hyperplastisch. APPRICH et al. (2017) bewiesen in einer neueren Studie, dass es sich um keine Hyperplasie, sondern eine Hypertrophie des Epithels handelt. Mit Hilfe zweier Marker, Ki67 und Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), wurde die proliferative Aktivität

gemessen. Ki67 ist ein Protein, das eng mit der Zellproliferation verbunden ist. Es wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose) exprimiert und kann somit in sich teilenden Zellen immer nachgewiesen werden. Sobald die Zellen in die Ruhephase, die G0-Phase des Zyklus, eintreten, wird das Ki67-Protein abgebaut und ist nicht mehr nachweisbar. Diese Tatsache macht das Ki67-Protein zu einem perfekten Marker für die Zellteilung und verleiht ihm eine sehr hohe Sensitivität (SCHOLZEN und GERDES 2000). Es wird erfolgreich in der Tumordiagnostik und in Studien, die sich mit Zellteilung beschäftigen, eingesetzt. Das PCNA-Protein ist ebenfalls ein Proliferationsmarker, der aber auch auf DNS-Schäden und die damit verbundenen Reparaturmechanismen hinweist. Das PCNA-Protein spielt eine zentrale Rolle bei der Entscheidung zwischen Leben und Tod einer Zelle. Die Expressionsmenge beider Marker wurde sowohl in gesundem Gewebe als auch im Hufkrebsgewebe gemessen und verglichen. Es wurden leichte Abweichungen in den unterschiedlichen Hautschichten festgestellt. Die Menge an PCNA-positiven Epithelzellen im *Stratum basale* des Hufkrebsgewebes war signifikant höher als im gesunden Gewebe. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich im *Stratum germinativum*. Im gesunden Gewebe konnte eine höhere Expression von Ki67-positiven Zellen nachgewiesen werden als im Hufkrebsgewebe. Da das Ki67-Protein, wie oben beschrieben, der relevantere Marker für die Zellproliferation ist, kann man aus diesem Ergebnis schließen, dass bei Hufkrebs keine erhöhte proliferative Aktivität des Papillarkörpers vorliegt. Die erhöhte PCNA-Expression unterstreicht lediglich die Dysregulation in der Keratinozytendifferenzierung als wesentlichen Punkt in der Entstehung von Hufkrebs (APPRICH et al. 2017, STRZALKA und ZIEMIENOWICZ 2011).

### 3.4. Ätiologie

Die exakte Ursache für die Entstehung von Hufkrebs ist bislang noch unbekannt. Es gibt unterschiedliche Ansätze bezüglich des Auslösers, wobei ein multifaktorielles Geschehen vermutet wird. Exogene Faktoren werden oft mit Hufkrebs als begünstigende Faktoren in Zusammenhang gebracht. Dies sind unter anderen übermäßige Feuchtigkeit, mangelnde Hygiene, unzureichende Hufpflege und zu enge Hufeisen, die den Hufmechanismus einschränken (DIETZ 2005, MINAMI et al. 1991). Auch der Rasse wird immer wieder eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Einige Studien beschreiben, dass bei Kaltblütern Hufkrebs deutlich öfter beobachtet wird als bei anderen Rassen (REEDING und O'GRADY 2012, DIETZ 2005, FÜRST und LISCHER 2012). Esel, Maulesel und Maultiere sind dagegen von Hufkrebs selten betroffen (DIETZ 2005). Außerdem wurde beschrieben, dass Füchse häufiger

erkranken als Braune oder Rappen (DIETZ 2005). Jedoch können alle Pferde, unabhängig von Rasse, Geschlecht oder Haltung von Hufkrebs betroffen sein (BAXTER et al. 2011, OOSTERLINCK et al. 2011, O'GRADY und MADISON 2004, AZZOLINI et al. 2019).

In mehreren Studien wurde bereits auf Bakterien, Pilze und Viren als Auslöser für Hufkrebs getestet (BRANDT et al. 2011, NAGAMINE et al. 2005, SYKORA und BRANDT 2014, OOSTERLINCK et al. 2011, APPRICH et al. 2020). Die unter 3.3. beschriebenen histologischen Veränderungen bei Hufkrebs weisen Ähnlichkeiten mit den Veränderungen bei Papillomvirusinfektionen in der Humanmedizin auf (APPRICH et al. 2017). Diese Tatsache lässt Papillomviren als mögliche ursächliche Komponente erscheinen. Zudem hat Hufkrebs auch einige Ähnlichkeiten mit dem equinen Sarkoid, wie Hyperkeratose, Akanthose und eine hohe Rezidivrate (BRANDT et al. 2011). Das equine Sarkoid wird bekanntlich vom BPV1 und BPV2 verursacht (CHAMBERS et al. 2003). BRANDT et al. (2011) konnten in 24 von 24 Hufkrebsproben, jedoch auch in zwölf von 13 Proben von gesunder Haut und in zehn von elf Blutproben dieser Hufkrebspatienten BPV1 und BPV2 nachweisen. In einer neueren Studie von APPRICH et al. (2020) konnte dieser Zusammenhang zwischen Hufkrebs und bovinen Papillomviren nicht bestätigt werden.

Als ein weiterer möglicher Auslöser wurden Treponemen *species (sp.)* in Betracht gezogen. Treponemen stehen bei anderen Tierarten mit chronischen, proliferativen Dermatiden, wie beispielsweise der *Dermatitis digitalis* bei Milchkühen und kontagiöser oviner digitaler Dermatitis bei Schafen, in Verbindung. Das klinische Bild dieser Erkrankungen ähnelt dem von Hufkrebs. Mehrere Autoren testeten Hufkrebsgewebe auf Spirochäten als bakteriellen Auslöser (NAGAMINE et al. 2005, SYKORA und BRANDT 2014). SYKORA und BRANDT (2014) wiesen in einer Studie *Treponema sp.* sowohl in Hufkrebsgewebe als auch in gesundem Gewebe mittels PCR nach. Eine Beteiligung von Treponemen an der Entstehung von Hufkrebs kann dadurch nicht ausgeschlossen werden, da Treponemen ebenso als Sekundärinfektion einen Beitrag zum Krankheitsverlauf leisten könnten (SYKORA und BRANDT 2014). In weiteren Studien wurde eine Mischung aus grampositiven und gramnegativen Bakterien an der Epitheloberfläche von Hufkrebsgewebe nachgewiesen. Dabei wurden Fusobakterium und Bakterioides als Beispiele genannt. Bei diesen Bakterientypen handelt es sich um ubiquitär vorkommende Erreger. Durch das geschädigte Epithel und die fehlende Verhornung können diese Erreger zu Sekundärinfektion führen (NAGAMINE et al. 2005, RIGERT et al. 2009, DIETZ 2005).

Eine weitere Theorie basiert auf einem immunologischen Geschehen. In einem Fallbericht wurde ein dreijähriges New Forest Pony, das auf allen vier Extremitäten an Hufkrebs erkrankt war, durch die Gabe von Glukokortikoiden (Prednisolon 1 mg/kg sid) innerhalb von acht Wochen geheilt (JONGBLOETS et al. 2005). Auch in einem Fallbericht von AZZOLINI et al. (2019) wurde ein an Hufkrebs erkranktes Pferd mit Prednisolon und Purple Mush behandelt. Purple Mush ist ein natürliches Produkt bestehend aus *Croton lechleri*, *Gentiana quinquefolia*, *Mahonia aquafolium*, *Tabebuia impetiginosa*, *Scutellaria lateriflora*, *Hydrastis canadensis* und Ethanol. Auch in diesem Fall war das Pferd innerhalb von zehn Wochen lahmfrei und der Strahl hatte wieder eine physiologische Form (AZZOLINI et al. 2019).

### 3.5. Therapie und Prognose

Da die Ursache für Hufkrebs bisher noch nicht bekannt ist, ist es schwierig, eine adäquate Therapie zu finden. Die meisten Therapien sind zeit- und kostenintensiv und garantieren keine sichere Heilung.

Es gibt mehrere Therapieansätze, die auf einer konservativen oder chirurgischen Komponente basieren (RIGERT et al. 2009, OOSTERLINK et al. 2011, DIETZ 2005). Bei der konservativen Therapie werden die Beläge und das unterminierte Horn gänzlich abgetragen bis wieder eine feste Verbindung zwischen Horn und Lederhaut besteht (DIETZ 2005, RIGERT et al. 2009). Anschließend werden topisch austrocknende, adstringierende, antibiotische oder desinfizierende Puder oder Salben verwendet (RIGERT et al. 2009, SHERMAN et al. 1996, DIETZ 2005, OOSTERLINCK et al. 2011, O'GRADY und MADISON 2004, BAXTER et al. 2011). Oft werden systemisch nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) und Antibiotika zusätzlich verabreicht, um die Infektionsgefahr zu minimieren (SHERMAN et al. 1996, OOSTERLINCK et al. 2011, RIGERT et al. 2009). Es gibt eine Vielzahl verschiedener Mischungen, die bei der topischen Behandlung von Hufkrebs angewendet werden. RIGERT et al. (2009) verwenden die Giessner Mischung. Die Giessner Mischung besteht aus *Jodoformium*, *Acidu tannicum*, Zinkoxid und Metronidazol. DIETZ et al. (2005) beschreiben die Anwendung des Müllerschen Hufkrebspulvers, das *Jodoformium*, *Acidum tannicum*, Zinkoxid und Marfanil-Protalbin beinhaltet. MINAMI et al. (1991) verwendeten in ihrem Fallbericht Holzteer und Chitosan, ein natürliches Polymer. BAXTER et al. (2011) erwähnt die Anwendung von Chloramphenicol, Metronidazol und eine Mischung aus Ketokonazol, Rifampin und DMSO. Das Auftragen von

10% -igen Benzoylperoxid in Aceton stellt eine weitere Behandlungsmöglichkeit dar (RIGERT et al. 2009, BAXTER et al. 2011). Das Prinzip dieser weniger aggressiven Methode ist, dass das *Stratum germinativum* beim Debridement belassen wird und somit schneller wieder Horn gebildet werden kann (RIGERT et al. 2009, DIETZ 2005). Bei einem konservativen Therapieversuch ist die Behandlung über einen langen Zeitraum nötig, um einen dauerhaft positiven Effekt zu erzielen (RIGERT et al. 2009).

Bei der chirurgischen Methode werden zuerst die betroffenen Hufe gründlich ausgeschnitten. Die weißlich-käsigen Beläge und das schmierige Strahlhorn werden entfernt. Anschließend wird der Huf gereinigt und desinfiziert. Das Debridement erfolgt unter Leitungsanästhesie und Esmarch'scher Stauungsligatur. Dazu wird ein Stauschlauch unterhalb des Fesselkopfes angebracht. Das Prinzip der chirurgischen Methode beruht auf der Entfernung des gesamten *Stratum germinativum* der zerfallenen Epidermis und einiger Millimeter des umliegenden gesunden Gewebes. Das soll dazu führen, dass neues Epithel seitlich einwächst und so, verglichen mit der konservativen Therapie, eine größere Chance einer normalen Verhornung entsteht (RIGERT et al. 2009, DIETZ 2005).

Weiters sind für einen guten Heilungsverlauf sehr gute Hygiene, saubere Hufverbände, regelmäßige Verbandswechsel und ein trockener Untergrund Voraussetzung (RIGERT et al. 2009). Neben den genannten Maßnahmen wird auch ein angepasstes Schrittprogramm empfohlen. Durch die Bewegung wird die Durchblutung angeregt und die Heilung gefördert (RIGERT et al. 2009, DIETZ 2005).

Einen positiven Effekt zeigte auch die Verwendung von Kryotherapie. Kryotherapie wirkt vasokonstriktorisch und soll einen vergleichbaren Effekt wie die oben beschriebenen Adstringentien haben. Auch hier wird vor der Behandlung ein Debridement durchgeführt. Für die Durchführung wurde eine Sonde für zirka eine Minute in flüssigen Stickstoff (-196 °C) getaucht. Diese wurde anschließend mehrmals hintereinander auf die veränderten Hufareale gehalten. Nach jeder Behandlung konnte ein Rückgang des Hufkrebsgewebes festgestellt werden. 35 Tage nach der ersten Behandlung sah der Strahlbereich beinahe wieder physiologisch aus (MISHRA et al. 1998). Eine andere Variante der Kryotherapie stellt die Verwendung eines Eissprays dar. Auch hier wird vorher das veränderte Gewebe abgetragen. Anschließend wird der Eisspray auf die veränderten Bereiche gesprüht bis das Gewebe hart wird. Nach dem Auftauen wird dieser Vorgang wiederholt (REEDING und O'GRADY 2012).

Ein aktueller Therapieansatz der Veterinärmedizinischen Universität Wien ist die topische Behandlung mit dem Zytostatikum Cisplatin (APPRICH und LICKA 2013). Cisplatin kommt seit den 1980er Jahren in der Humanmedizin bei unterschiedlichen Krebsarten (BROWN et al. 2019) und in der Veterinärmedizin vor allem bei der Behandlung des Equinen Sarkoids zum Einsatz (TAMZALI et al. 2012, STEWART et al. 2006). In einer Studie von APPRICH und LICKA (2013) wurde die Wirksamkeit von Cisplatin bei Hufkrebspatienten untersucht. Zehn Pferde nahmen an dieser Studie teil, wobei an 19 Hufen eine standardisierte Cisplatinbehandlung durchgeführt wurde. Zu Beginn der Studie wurden die Hufe ausgeschnitten, gesäubert und in desinfizierende Hufverbände gestellt. Unter Lokalanästhesie und Esmarch'scher Stauungsligatur wurde das Hufkrebsgewebe entfernt und anschließend ein Druckverband angelegt. Als sich gesundes Granulationsgewebe gebildet hatte, wurde mit der topischen Cisplatintherapie begonnen. Am Ende der Studie wurden die Hospitalisierungsdauer und die Rezidivrate bei den einzelnen Patienten beschrieben. Hier lag die durchschnittliche Hospitalisierungsdauer bei 32,1 Tagen und nur eines aus zehn Pferden entwickelte 13 Monate nach der Entlassung ein Rezidiv (APPRICH und LICKA 2013).

Bei der Hufkrebstherapie wird von einer hohen Rezidivrate berichtet. OOSTERLINCK et al. (2011) beschreiben, dass die Rezidive in den meisten Fällen innerhalb der ersten zwölf Monaten nach der durchgeführten Therapie auftreten. Laut O'GRADY und MADISON (2004) bekam nach der Durchführung eines Debridement, wobei das *Stratum germinativum* belassen wurde, eines von 45 Pferden ein Rezidiv. In einer Studie von APPRICH und LICKA (2013) wurde bei zehn Pferden eine Cisplatinbehandlung durchgeführt. Eines dieser Pferde bekam 13 Monate nach der Entlassung ein Rezidiv. Auch JONGBLOETS et al. (2005) beschreiben mit etwa 45 % eine relativ hohe Rezidivrate bei Therapieversuchen mit radikalem Debridement und topischer Therapie.

Die Prognose für Hufkrebs ist im Allgemeinen vorsichtig bis günstig. Es kommt auf die Anzahl der betroffenen Extremitäten und das Ausmaß der Veränderungen an. Zudem sind eine frühe Entdeckung, eine rasche Einleitung der Therapie, eine trockene und saubere Umgebung und gute Hufpflege ausschlaggebend für eine erfolgreiche Therapie (OOSTERLINCK et al. 2011, RIGERT et al. 2009, REEVES et al. 1989). Auch wenn nach vier bis sechs Wochen keine Anzeichen von Hufkrebs mehr sichtbar sind, ist ein Rezidiv nie auszuschließen (DIETZ 2005). REEDING und O'GRADY (2012) stellen hingegen eine vorsichtige bis ungünstige Prognose aufgrund der unbekanntenen Ursache, der aggressiven Therapieversuche und der relativ hohen Rezidivrate.

#### 4. Papillomviren (PV)

Papillomviren gehören neben den Polyomaviren zur Gruppe der *Papovaviridae*. Sie zählen zu den unbehüllten, doppelsträngigen DNS-Viren mit ikosaedraler Form ( $T=7d$ ). Das Kapsid setzt sich aus 72 Pentameren zusammen, wobei ein Pentamer aus fünf L1-Molekülen und zwölf monomeren L2-Proteinen besteht. Die DNS der Papillomviren ist zirkulär aufgebaut und besitzt eine Länge von zirka 8000bp. ACKERMANN (2013) beschreibt eine Genomlänge von 6700bp bis 8200bp, die je nach Spezies variiert. Der Durchmesser der Viren beträgt 52-55nm. Das Genom von Papillomviren ist nicht segmentiert. Das ist ein Charakteristikum von doppelsträngigen DNS-Viren. Das Genom wird in drei Abschnitte gegliedert: E-Region (E= early), L-Region (L= late) und einen nicht-kodierenden Abschnitt. Die frühen Gene, *early genes*, E1- E8 werden auch als funktionelle Gene bezeichnet. E1 und E7 steuern die Replikation und E2 ist für die virale Transkription zuständig. Das E5-Gen wird von den meisten PV-Typen exprimiert. E6 regt die Zellteilung an. Der zweite Abschnitt kodiert für die späten Gene, *late genes*, L1 und L2. Sie sind für die Kapsidbildung verantwortlich und werden hauptsächlich in der äußersten Schicht der Epidermis gebildet. Die Aufgabe von L2 ist hierbei noch nicht ganz geklärt. Die nicht kodierende Region, *non-coding region (NCR)*, wird auch *long control region (LCR)* oder *upstream regulatory region (URR)* genannt. Sie ist zwischen den beiden Genen L1 und E6 lokalisiert und spielt in der Virusreplikation und Virustranskription eine Rolle. Die wichtigsten offenen Leserahmen (ORFs) sind E1, E2, L2 und L1. Darunter versteht man einen Leserahmen, der aus Triplets besteht, mit einem Start-Codon (AUG) beginnt und mit einer aus drei Stop-Codon-Varianten endet. Ein Triplet repräsentiert eine Aminosäuresequenz. Sie sind im Genom in allen bisher entschlüsselten Papillomviren vorhanden. Alle Gene befinden sich auf einem Strang, was bedeutet, dass die Transkription nur in eine Richtung laufen kann. Papillomviren sind epitheliotrop. Sie dringen passiv über Mikroläsionen in der Haut oder Schleimhaut ein und infizieren die basalen Keratinozyten. Es wird vermutet, dass in anderen Zelltypen die zellulären Voraussetzungen für die Teilung nicht gegeben sind. Hier sind BPVs eine Ausnahme, da sie neben den Keratinozyten auch die Fibroblasten der Dermis infizieren. In den basalen Keratinozyten kommt es zur Expression der frühen, funktionellen Proteine (E-Proteine). Die späten Proteine, auch Strukturproteine genannt, sind wie bereits erwähnt für die Kapsidbildung zuständig und werden erst in den ausdifferenzierten Keratinozyten exprimiert. In diesen erfolgt auch die Ausbildung und Freisetzung der Viren (ACKERMANN 2013, CAMPO 2010, DOERFLER 1996, LANGE et al. 2010, NASIR und BRANDT 2013, NASIR und CAMPO 2008,

RECTOR und VAN RANST 2013, SCASE et al. 2010, SELTON und LONG 2014, SIEBER et al. 2018, TOBLER et al. 2016, CAMPO 2006, De Villiers et al. 2004).

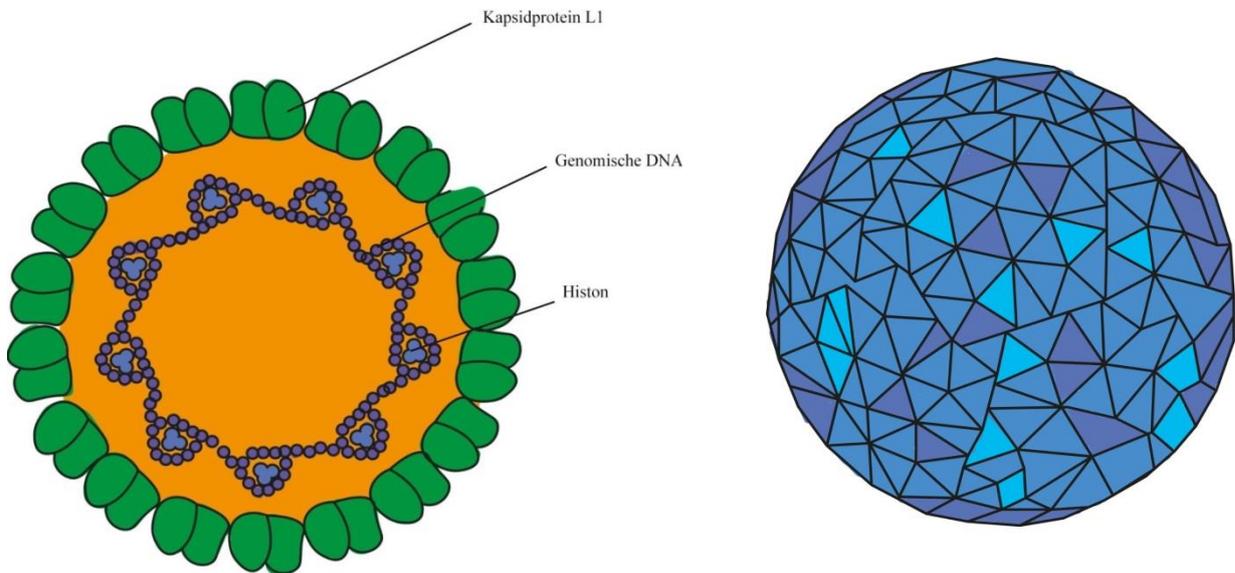


Abb. 3: schematische Darstellung des Aufbaus eines Papillomvirion (modifiziert nach ACKERMANN 2013)

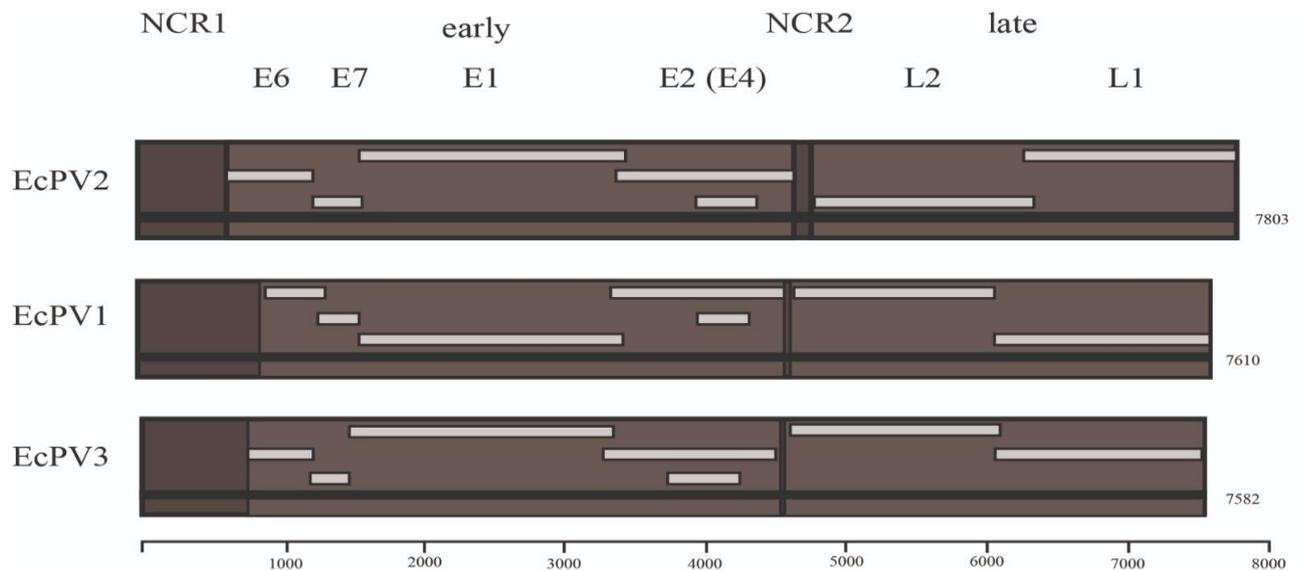


Abb. 4: schematische, lineare Darstellung des Genoms der equinen Papillomviren Typ 1, Typ 2, Typ 3, deren offenen Leserahmen (ORFs) und der non-coding regions (NCRs). Zu den ORFs gehören: E1 und E7 zur Replikationssteuerung, E2 für zur viralen Transkription, E6 für die Zellteilung und L1 und L2 für die Kapsidbildung (modifiziert nach LANGE et al. 2011).

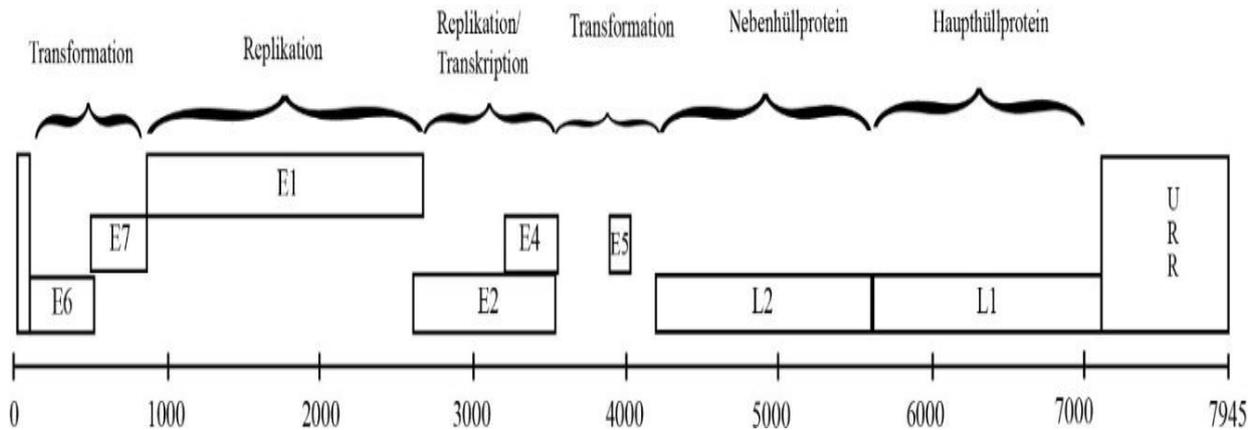


Abb. 5: schematische Darstellung des Genoms eines bovinen Papillomvirus, dessen offenen Leserahmen (ORFs) und der upstream regulatory region (URR) (modifiziert nach NASIR und CAMPO 2008)

Beim Menschen sind mittlerweile an die 250 Papillomvirustypen bekannt. Zu den am besten erforschten Typen zählen das humane Papillomvirus Typ 16 und Typ 18 (HPV16 und 18), welche unter anderem für Gebärmutterhalskrebs beim Mensch verantwortlich sind. Auch beim Tier sind aktuell bereits 112 Papillomvirustypen bekannt. Davon wurden die meisten bei Säugetieren entdeckt. Jedoch konnten auch bei Reptilien und Vögeln speziesspezifische Papillomviren nachgewiesen werden (RECTOR und VAN RANST 2013). Am häufigsten kommt es zur Bildung von gutartigen, warzenähnlichen Wucherungen (Papillomen), jedoch gibt es auch beim Tier sogenannte „high risk“ Typen, welche an der Entstehung maligner Neoplasien beteiligt sind (SYKORA et al. 2017). Der Übertragungsweg ist noch nicht gänzlich geklärt. Eine Übertragung hoch infektiöser Hautschuppen durch direkten Kontakt, wie zum Beispiel infiziertes Equipment, Geräte oder Liege- und Kratzstellen sollte auf jeden Fall vermieden werden (ACKERMANN 2013, RECTOR und VAN RANST 2013). Papillomviren sind streng wirts- und gewebespezifisch. BPV1 und BPV2, als Auslöser des equinen Sarkoids, stellen dabei eine Ausnahme dar (CHAMBERS et al. 2003).

In der unten beigefügten Tabelle (Tab. 1) sind Vertreter der Familie der Papillomviren und ihr Krankheitsbild aufgelistet. Hier sind Beispiele für mehrere Spezies erwähnt, die in der Veterinärmedizin relevant sind.

Tab. 1: ausgewählte Papillomviren mit veterinärmedizinischer Relevanz  
(aus ACKERMANN 2013)

<b>Papillomvirus</b>	<b>Spezies</b>	<b>Krankheitsbild</b>
BPV1, BPV 2	Rind	kutanes Fibropapillom
BPV1, BPV 2	Pferd	equines Sarkoid
BPV3	Rind	Fibropapillome im GIT
BPV4	Rind	squamöse Papillome im GIT
BPV5	Rind	Zitzenpapillom
EcPV 1	Pferd	kleine Warzen (Lippen, Nüstern)
EcPV2	Pferd	Genitales Plattenepithelkarzinom
EcPV3	Pferd	aurale Plaques
CPV1	Hund	orale Papillome
FdPV1	Katze	sessile Läsionen (nicht gestielt)
humane PV	Mensch	> 100 Typen

#### 4.1. Humane Papillomviren (HPV)

Zum jetzigen Zeitpunkt sind 200 verschiedene HPV-Typen vollständig sequenziert, 40 davon infizieren vorrangig die Genitalschleimhaut. Sie werden in folgende fünf Gruppen eingeteilt: Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu-, und Nu-HPV. HPV sind auslösende Faktoren von sowohl gutartigen, kutanen Warzen, juveniler respiratorischer Papillomatose, als auch von invasiven Karzinomen, low- grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) und high- grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). Die beiden Letzteren gelten als Vorstufen von Krebs. Sie dringen über Mikroläsionen in die Haut ein und infizieren die basalen Kerationozyten von Haut oder Schleimhaut. Besonderes Augenmerk legte die Forschung auf die Gruppe der Alpha-HPV, da diese sowohl in der Schleimhaut als auch in der Kutis eine Vielzahl an Pathologien hervorrufen können. Einzelne HPV-Typen dieser Gruppe werden abhängig von ihrem onkogenen Potential nochmal in high-risk HPV und low-risk HPV unterteilt. HPV6 und HPV11 gehören beispielsweise zu den low-risk HPV und sind Auslöser der Genitalwarzen (*Condylomata acuminata*). HPV16 und HPV18 sind Beispiele für high-risk HPV und ursächlich für HSIL und Gebärmutterhalskrebs. Aktuell sind zwölf high-risk HPV bekannt. Nicht alle Menschen, die sich mit high-risk HPVs infizieren, entwickeln Krebs (BURD und DEAN 2016, KRAWCZYK et al. 2008). HPV16 und 18 sind wohl die meist untersuchten HPV, auch weil sie die weltweit häufigste sexuell übertragbare Krankheit beim

Mensch verursachen. 80 % aller Frauen infizieren sich im Laufe ihres Lebens mit HPV. Menschen mit vererbter Immundefizienz, Autoimmunerkrankungen, Organ- oder Knochenmarkstransplantationen oder humanen Immundefizienzvirus- Infektionen (HIV) sind anfälliger für Infektionen mit HPV. 1970 wurde erstmals der Zusammenhang zwischen HPV und Gebärmutterhalskrebs beschrieben. Heute weiß man, dass 100 % aller Gebärmutterhalstumoren durch eine HPV-Infektion verursacht werden. Karzinome der Vulva und der Vagina werden durchschnittlich zu 51,2 % und Karzinome des Penis im Schnitt zu 63,1 % mit HPV in Verbindung gebracht (BURD und DEAN 2016, KRAWCZYK et al. 2008, PETERSEN und KLEIN 2008). Im Karzinomgewebe aller Organe, außer Herz und Niere, konnten HPV in unterschiedlichen Prozentzahlen nachgewiesen werden. Hier einige Beispiele: in der Blase 16,2 %, im Ösophagus 34,1 %, im Kolon 70,1 % oder im Endometrium 16,9 %. Bei diesen Zahlen wurden die Ergebnisse mehrere Studien herangezogen und der Mittelwert der Ergebnisse ermittelt (PETERSEN und KLEIN 2008). Plattenepithelkarzinome im Bereich des Kopf- Hals- Bereichs stehen zu 15- 25 % mit HPV in Zusammenhang (MOLLENHAUER et al. 2014). HPV induzierte Tumoren in dieser Region haben eine bessere Prognose. Das Genom von HPV besteht wie alle Papillomviren aus drei Abschnitten: *non-coding region*, *early region* und *late region*. Die *early region* besteht aus den ORFs E1, E2, E4, E5, E6 und E7 und ist für die Virusreplikation und die Onkogenese verantwortlich. Die *late region* setzt sich aus L1 und L2 zusammen und kodiert für die Strukturproteine des viralen Kapsid (BURD 2003).

#### 4.2. Bovine Papillomviren (BPV)

Bovine Papillomviren sind als Auslöser des equinen Sarkoids beim Pferd schon länger bekannt. Es handelt sich um onkogene DNS-Viren, die bei Rindern hyperplastische, gutartige Läsionen in der Haut und Schleimhaut verursachen. Spontane Remissionen können auftreten, jedoch kann es bei immunsupprimierten Tieren zur Ausbildung maligner Tumoren kommen. Auch kanzerogene Co-Faktoren können dabei eine Rolle spielen. Der meist erforschte Co-Faktor ist die Farnart *Pteridium aquilinum* (CAMPO et al. 1992). Das Zusammenspiel von Immunsuppression, die kanzerogene Wirkung von *Pteridium aquilinum* und BPV hatte Tumoren in der Harnblase und im Gastrointestinaltrakt zur Folge (BORZACCHIELLO und ROPERTO 2008).

Bis 2008 waren zehn BPVs Typen bekannt. Jeder dieser BPV-Typen konnte mit histopathologischen Haut- und Schleimhautveränderungen in Verbindung gebracht werden (BORZACCHIELLO und ROPERTO 2008, NASIR und CAMPO 2008). HATAMA et al. (2011) entdeckten mittels PCR in kutanen Warzen bei Rindern einen neuen BPV-Typ, BPV11. Ein Jahr später detektierten ZHU et al. (2012) in einem epithelialen Papillom auf der Zunge eines Rindes ein weiteres neues Papillomvirus, BPV12. Bovine Papillomviren werden in drei Gruppen eingeteilt: Delta-, Xi- und Epsilonpapillomviren. Die Gruppe der Deltapapillomviren infiziert Epithel und die Dermis, wodurch sie Fibropapillome verursachen. Dieser Gruppe werden BPV1 und BPV2 zugeordnet. Sie sind ursächlich für Fibropapillome im Bereich der Zitzen und des Penis beim Rind. Dieses Krankheitsbild wird häufiger bei Jungtieren beobachtet. Zudem ist BPV2 an der Papillombildung in der Harnblase und im Gastrointestinaltrakt beteiligt (BERNARD et al. 2010, ZHU et al. 2012, BORZACCHIELLO und ROPERTO 2008). Papillomviren sind in der Regel streng speziesspezifisch. Jedoch BPV1 und BPV2 stellen, als Auslöser des equinen Sarkoids, eine Ausnahme dar (CHAMBERS et al. 2003). Beim equinen Sarkoid handelt es sich um einen gutartigen Tumor, der meist im Kopfbereich oder an der Körperunterseite lokalisiert ist und stark zu Rezidiven neigt. Histologisch gesehen handelt es sich um einen Spindelzelltumor. Bei BPV-Infektionen beim Pferd befindet sich das Virus nicht nur im Tumor selbst, sondern in jeder Zelle der gesamten Hautoberfläche. Das ist wichtig für die chirurgische Tumorentfernung, da bei jedem Trauma eine Wundheilung stattfindet, wobei sich Zellen vermehrt teilen. Wenn diese Zellen BPV-infiziert sind, wird die Virus-DNS an die neuen Zellen weitergegeben. Aufgrund dieser Tatsache sollte bei einem Sarkoidverdacht die Umfangsvermehrung vollständig entfernt werden um das Risiko von Rezidiven zu senken (HAINISCH und BRANDT 2014).

Vertreter der Xipapillomviren sind BPV3, BPV4, BPV6, BPV9, BPV10, BPV11 und BPV12. Sie sind epitheliotrop und verursachen epitheliale Papillome. BPV4 führt im Inneren zu epithelialen Papillomen im Bereich zwischen Maul und Pansen. BPV6, BPV9 und BPV10 sind ursächlich für epitheliale Papillome an den Zitzen und im Euterbereich. Zu den Epsilonpapillomviren gehören BPV5 und BPV8. Sie infizieren sowohl das Epithel als auch die Dermis und lösen so Fibropapillome und epitheliale Papillome aus. Für BPV5 Infektionen sind reiskorngroße Fibropapillome im Euterbereich charakteristisch. BPV7 wurde bisher keiner der genannten Gruppen zugeordnet. Es wurde in einem Abstrich von gesunder Haut nachgewiesen (ZHU et al. 2012, BORZACCHIELLO und ROPERTO 2008, NASIR und CAMPO 2008, HATAMA et al. 2008).

### 4.3. Equine Papillomviren

Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Genome von neun Papillomvirustypen (EcPV1-EcPV9) vollständig entschlüsselt (LI et al. 2019). Bis 2010 war nur ein Papillomvirustyp, nämlich EcPV1 bei Equiden bekannt (GHIM et al. 2004).

EcPV1 gehört zu den Zetapapillomviren (DE VILLIERS et al. 2004) und ist ursächlich für die klassische Papillomatose. Diese äußert sich typischerweise durch keratinisierte Warzen im Nüstern- und Lippenbereich. Durch Reiben an den Vorderbeinen kann es aber auch hier zur Ausbildung von Warzen kommen. Die Ansteckungsrate ist sehr hoch. Generell erkranken aber nur Pferde unter drei Jahren, am häufigsten betroffen sind Pferde unter einem Jahr. Innerhalb von drei Monaten kommt es meistens zur spontanen Remission, weshalb eine Therapie nicht von Nöten ist. EcPV1 wurde vereinzelt auch in aural plaques nachgewiesen (ZAKIA et al. 2019).

EcPV2 wird der Gattung der Dyoiotapapillomviren zugeordnet (BERNARD et al. 2010). Es wird im Zusammenhang mit der genitalen Papillomatose und genitalen Plattenepithelkarzinomen (PEKs) beschrieben (SCASE et al. 2010, SYKORA et al. 2012, SYKORA et al. 2017). Als Prädilektionsstellen werden mukokutane Übergänge genannt, weshalb beim männlichen Tier vorrangig die *Glans penis* und beim weiblichen Tier Vulva und Klitoris betroffen sind. Polygenetische Analysen haben ergeben, dass EcPV2 Ähnlichkeiten mit den Alpha-Papillomviren hat (SCASE et al. 2010). Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind die aus der Humanmedizin stammenden HPV-16 und HPV-18. Sie gehören zu den sogenannten high-risk Papillomviren (PETERSEN und KLEIN 2008). SCASE et al. (2010) konnten EcPV2 durch in situ-Hybridisierung in einem equinen, genitalen Plattenepithelkarzinom detektieren und in Folge extrahieren und sequenzieren. Mittels spezifischer Primer konnte EcPV2 in mehreren Studien nicht nur in genitalen PEKs sondern auch in Papillomen, Plaques und Karzinoma in situ sowie in hoher Konzentration im Smegma nachgewiesen werden (SCASE et al. 2010, KNIGHT et al. 2013, SYKORA et al. 2012, BOGAERT et al. 2012, LANGE et al. 2012, SCHELLENBACHER et al. 2015). SYKORA et al. (2012) konnten mittels RT-PCR mRNA nachweisen, was für das Vorhandensein lebender Viren spricht. Zudem waren nur 2% von 193 Augen- und Genitalabstrichen sowie Milch- und Samenproben tumorgesunder Pferde auf EcPV2 positiv. Dieses Ergebnis festigt die Vermutung, dass EcPV2 an der Entstehung von genitalen PEKs sowie deren Vorstufen ursächlich beteiligt ist (SCASE et al. 2010, KNIGHT et al. 2013,

SYKORA et al. 2012, BOGAERT et al. 2012, LANGE et al. 2012, SCHELLENBACHER et al. 2015).

In einem Fallbericht wurden bei einem 9-jährigen Wallach zirka 100 Papillome am distalen Penis beschrieben. Histologisch konnte eine Koilozytose festgestellt werden, was auf eine Beteiligung von Papillomviren hinweist. Durch PCR, Immunhistochemie und in situ Hybridisierung konnte EcPV2 im veränderten Gewebe nachgewiesen werden. 16 Monate später war keine Verbesserung des klinischen Bildes zu erkennen. Daraufhin wurde erneut positiv auf EcPV2 getestet. Dieses wiederholt positive Ergebnis zeigte erstmals, dass Pferde persistent infiziert bleiben können (KNIGHT et al. 2013).

Auch BOGAERT et al. (2012) versuchten EcPV2-DNS in equinen genitalen PEKs, intraepithelialen Neoplasien des Penis und penilen Papillomen mittels PCR nachzuweisen. Zudem testeten sie gesunde Genitalschleimhaut zum Nachweis latenter EcPV2-Infektionen. Außerdem wurden die genetische Variabilität innerhalb von EcPV2 und die phylogenetische Verbindung zu anderen Papillomviren untersucht. EcPV2-DNS konnte bis auf eine Ausnahme in allen penilen Läsionen nachgewiesen werden. Zudem zeigte diese Studie nicht nur die Beteiligung von EcPV2 an den genitalen PEKs, sondern auch an analen Läsionen, Lymphknoten- und Kontaktmetastasen. Bei gesunden Pferden konnte nur in 10 % der Penistupfer und in keinem vulvovaginalen Tupfer EcPV2-DNS gefunden werden. Latente EcPV2-Infektionen wurden auch in normaler Schleimhaut bei männlichen Tieren nachgewiesen (BOGAERT et al. 2012). Auch LANGE et al. (2012) fanden ausschließlich in penilen Papillomen, in situ oder invasiven PEKs EcPV2-DNS, nicht jedoch in Proben von Pferden mit Balanoposthitis, mit Melanomen, mit einer follikulären Zyste und mit einer Amyloidose. Diese Befunde bestätigen die Hypothese vorangegangener Studien, dass EcPV2 ursächlich für penile Neoplasien sein soll (LANGE et al. 2012). SCHELLENBACHER et al. (2015) untermauern mit ihrer Studie die Hypothese, dass EcPV2 mit hoher Wahrscheinlichkeit der Auslöser für genitale PEKs ist. Es wurden EcPV2 neutralisierende Antikörper-Titer durch einen EcPV2 Neutralisationstest bestimmt. Zudem wurde eine EcPV2 L1-virus-like-particle Impfung hergestellt und ihre prophylaktische Wirkung in vivo getestet. Bei allen sechs Pferden mit genitalen PEKs wurden Antikörpertiter festgestellt. Nur drei von 20 tumorfreien Pferden waren seropositiv. Zwei dieser seropositiven Pferde wurden über Jahre gemeinsam mit einem Pferd mit diagnostiziertem PEK gehalten. Diese Tatsache lässt eine direkte EcPV2-Übertragung vermuten. Die Impfung erzielte bei Hasen und Mäusen sehr hohe Ak-Titer. Die passive Übertragung von EcPV2-virus-like-

particle über Immunsere von Hasen schützte Mäuse vor experimenteller vaginaler EcPV2-Infektion (SCHELLENBACHER et al. 2015).

Wie beim Menschen fördert mangelnde Hygiene die Entwicklung von genitalen PEKs, da sich im Smegma eine hohe Konzentration an viraler DNS nachweisen lässt. Dies scheint auch der Grund dafür zu sein, dass deutlich mehr Wallache als Hengste an genitalen Tumoren erkranken, da Hengste durch das häufigere Ausschachten zu einer gewissen Selbstreinigung beitragen (SYKORA et al. 2017). Bei okulären PEKs und ihren Vorstufen kann zwar histologisch eine Koilozytose beobachtet werden, jedoch ist es bislang nicht gelungen, Papillomviren nachzuweisen. Deshalb kann eine UV-Beteiligung hier nicht ausgeschlossen werden (NASIR und BRANDT 2013, DRAZEK et al. 2015, SYKORA et al. 2017).

EcPV3, EcPV4, EcPV5 und EcPV6 werden als Ursache für aural plaques genannt. Aural plaques sind benigne, verruköse Beläge bis warzenartige Zubildungen an der Innenseite der Ohrmuschel, welche ein- oder beidseitig auftreten können. Die Größe der Zubildungen beträgt durchschnittlich zwischen ein und zwei Zentimeter. Betroffen sind Pferde unabhängig von Alter, Geschlecht oder Rasse. Histologisch stellt sich das veränderte Gewebe durch eine verdickte Epidermis, sowie hyperkeratotisch und hypomelanotisch dar. Eine spontane Regression wurde bei aural plaques noch nie beschrieben. Betroffene Pferde fallen durch plötzliche Kopfscheue und erhöhte Sensibilität im Ohrenbereich auf (ZAKIA et al. 2016). Aural plaques wurden in mehreren Studien auf unterschiedliche EcPV-Typen als Auslöser getestet. ZAKIA et al. (2019) versuchten mittels PCR in 103 aural plaque-Proben die Papillomvirustypen EcPV3 bis EcPV6 nachzuweisen. In 93 dieser Proben (90,3 %) konnte EcPV-DNS nachgewiesen werden. Die genaue prozentuelle Verteilung sah folgendermaßen aus: EcPV3 wurde in 36,89 %, EcPV4 82,52 %, EcPV5 0,97 % und EcPV6 10,68 % der Proben nachgewiesen. Auffällig war, dass EcPV3 und EcPV4 in 35 von 103 Proben, entspricht 33,98 %, gemeinsam nachweisbar waren (ZAKIA et al. 2019). ZAKIA et al. (2016) versuchten in einer Studie die Effizienz von 5 %-igem Imiquimod als Therapieoption zu überprüfen. Sie verglichen die Nachweisbarkeit von Papillomviren mittels PCR vor und nach der Behandlung. Während vor der Behandlung in allen aural plaques EcPV (EcPV3 in 29 % der Ohren, EcPV4 in 100 % und EcPV6 in 50 %) nachgewiesen werden konnten, zeigte 90 Tage nach der letzten Imiquimodapplikation keines der Pferde mehr Anzeichen von aural plaques. Mittels PCR wurde nur mehr in zwei Proben EcPV4 und in drei Proben EcPV6 nachgewiesen. Das bedeutet eine 71,4 % Beseitigung von EcPV durch die

Behandlung mit Imiquimod (ZAKIA et al. 2016). Weitere Therapieveruche, die sich jedoch nicht durchgesetzt haben, waren das Abtragen der Veränderungen, Cisplatinelektrochemotherapie und die orale Anwendung von Ivermectin und *Sanguinaria canadensis* (kanadische Blutwurz) in Zinkchlorid (ZAKIA et al. 2016). Die Cisplatinchemotherapie basiert auf dem Prinzip, dass durch elektrische Impulse die Permeabilität der Zellmembran für hydrophile Medikamente, wie beispielsweise Cisplatin, passierbar gemacht wird. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration des Medikaments hat einen signifikant positiven therapeutischen Effekt. Bisher gibt es nur wenige Berichte zu dieser Therapiemethode (TAMZALI et al. 2011). Bei der oralen Gabe von Ivermectin wurde ein positiver Verlauf beobachtet. Es handelt sich jedoch nur um einen Fallbericht (ASLAN und ORUÇ 2010).

EcPV7 konnte ebenfalls in penilen Umfangsvermehrungen nachgewiesen werden. Die Sequenz von EcPV7 stimmt zu 71 % mit der von EcPV6 und zu 70 % mit der von EcPV3 überein. Gemeinsam werden diese drei Virustypen der Gruppe der Dyorhopapillomviren zugeordnet (TORRES und KOCH 2013, ZAKIA et al. 2019).

EcPV8 wurde von LINDER et al. (2018) erstmals beschrieben. Biopsien wurden von drei Pferden mit generalisierter Papillomatose genommen. Die Papillome befanden sich im Bereich der Achsel, der Inguinalgegend, der proximalen Extremitäten, im ventralen und lateralen Nackenbereich und im Bereich von Thorax und Abdomen. Die Papillome waren ventral teilweise konfluent. Das Gesicht, die Ohren, die distalen Extremitäten und der Genitalbereich waren weniger betroffen. Diese zirka tausend Papillome stellten sich hyperkeratotisch und abgeflacht dar. Die Größe der plaqueartigen Papillome variierte zwischen 0,5-1,5 cm im Durchmesser. Sie waren weder schmerzhaft, noch wurde Juckreiz beobachtet. Histologisch war eine epidermale Dysplasie aller Epithelschichten, eine Koilozytose im *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum*, reduziertes bis fehlendes Keratohyalin in koilozytotischen Bereichen, eine deutliche Hyperkeratose und in der Größe variierende Korneozyten auffällig. Bei zwei Pferden wurde eine Hypergammaglobulinämie festgestellt. Beim ersten vorgestellten Fall wurden als Therapiemaßnahme mehrere Papillome manuell zerdrückt, um eine Immunantwort auszulösen. Die Papillome begannen sich nach einem Jahr zurückzubilden. Beim zweiten Fall wurde zusätzlich eine dreimalige intraläsionale Therapie mit humanem Interferon *alpha-2b* durchgeführt. Die Papillome schrumpften oder bildeten sich gänzlich zurück. Am ganzen Körper wurde ein 50 %-iger Rückgang der Papillome beobachtet. Jedoch nach weiteren sechs Monaten blieb das Bild unverändert. Im

dritten Fall wurde eine generalisierter Papillomatose mit abwechselnd wachsenden und wieder schrumpfenden Papillomen beschrieben. Ein weiteres Follow-up war leider nicht möglich. Die genommenen Proben wurden histologisch, immunhistochemisch und mittels PCR untersucht. Dadurch konnte ein neues PV, EcPV8, entdeckt werden (LINDER et al. 2018).

2019 wurde EcPV9 im Samen eines Hengstes mit einer Penisläsion entdeckt. Dieser neue EcPV-Typ stimmt in der Nukleotidabfolge zu 69,35 % mit EcPV2, zu 59,25 % mit EcPV4 und zu 58,00 % mit EcPV5 überein. Es konnten die klassischen ORFs für PVs, E1, E2, E4, E6, E7, L1 und L2, nachgewiesen werden. EcPV9 wurde somit der Gruppe der Dyoiotapapillomaviren zugeordnet (LI et al. 2019). Zum Zeitpunkt dieser Studie war die Entdeckung von EcPV9 noch nicht publiziert, weshalb es in die Studie nicht mit aufgenommen wurde.

## 5. Nachweis von Papillomviren mittels PCR

Zum direkten Nachweis von Viren wird die Immunfluoreszenz, die Elektronenmikroskopie oder der Nachweis von Nukleinsäuren mittels PCR verwendet. Bei der Immunfluoreszenz wird das gesuchte Antigen mittel fluoreszierendem Antikörper markiert und ist somit im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht nur den Nachweis des Virus. Dafür muss es in ausreichender Konzentration vorliegen. Eine genaue Klassifizierung anhand des Virionaufbaus ist nicht möglich. Mittels virusspezifischer Antikörper, die mit Goldpartikel gekennzeichnet sind, kann der Virustyp bestimmt werden.

Bei der PCR wird mittels spezifischer Primer gezielt nach einem Virustyp gesucht (TOBLER et al. 2016). Einer der Vorteile der PCR ist, dass auch ein Nachweis geringer Viruskonzentrationen möglich ist, da es im Rahmen der PCR zu einer Vervielfältigung der Virus-DNS kommt (PORSTMANN 1996). In der Virusdiagnostik wird die PCR als eine spezifische Amplifikation von Nukleinsäuren definiert. Dieses Verfahren wurde von dem Nobelpreisträger Kary Mullis 1983 entdeckt und anschließend als wertvolle Diagnostikmethode etabliert (TOBLER et al. 2016).

Folgende Reagenzien werden für die PCR benötigt: destilliertes Wasser und eine auf die Polymerase abgestimmte Pufferlösung sind nötig, um eine optimale Reaktionsumgebung zu schaffen. Didesoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sind die Bausteine der DNS (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin, Uracil, Phosphat und 2-Desoxyribose) und werden für den Aufbau des Komplementärstranges benötigt. Da die meisten verwendeten Primer relativ kurz sind, müssen sie sequenzspezifisch sein, um an dem zu replizierenden DNS-Abschnitt (Template) andocken zu können. Meistens werden die Primer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Erst zum Schluss wird die temperaturempfindliche Polymerase zugegeben und mittels spezifischen Temperaturprogramms aktiviert. Die Taq-Polymerase z.B. wird aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* hergestellt. Durch ihre Stabilität bei 95 °C denaturiert sie nicht sofort und ist somit für die PCR-Diagnostik sehr praktikabel (RASSOW et al. 2012).

Der Vervielfältigungsprozess im Thermozykler erfolgt in drei Schritten bei unterschiedlichen Temperaturen. Der erste Schritt ist die Denaturierung. Dabei wird die DNS in zwei Einzelstränge aufgespalten. Der zweite Schritt ist das Annealing. Bei diesem Schritt lagern sich die Primer an die Einzelstränge an. Jeder Primer hat eine bestimmte Annealing-Temperatur, bei welcher die Bindungsgenauigkeit an die Zielsequenz am höchsten ist. Liegt die Temperatur darunter, können viele unspezifische Banden entstehen. Liegt die Temperatur

darüber, kann es passieren, dass kein Produkt entsteht (Wiley Information Services GmbH. [www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr\\_einfuehrung/einfuehrung.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr\\_einfuehrung/annealing.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/einfuehrung.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/annealing.vscml.html), Zugriff am 27.2.2020). Der letzte Schritt ist die Elongation. Das ist die Phase, in der der Komplementärstrang durch die Polymerase synthetisiert wird. Diese Schritte werden über 30-50 Zyklen und unterschiedlichen Reaktionszeiten durchlaufen (PORSTMANN 1996, TOBLER et al. 2016).

### 5.1. Prinzip der Gelelektrophorese

*„Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung geladener Teilchen, z.B. von DNA-Fragmenten, nach ihrer Ladung und Größe“* (RASSOW et al. 2012).

Für das Gel wird Agarosepulver in einem Tris-Acetat EDTA Puffer (TAE Puffer) erhitzt und mit einem DNS-bindenden Farbstoff versetzt. Dieser besitzt die Eigenschaft UV-Licht zu absorbieren, wodurch die PCR-Produkte als Banden sichtbar werden (RASSOW et al. 2012). Abhängig von der Größe der erwarteten DNS-Stränge wird die Konzentration des Gels gewählt. Das Gel hat durch die Größe der Poren die Funktion eines Siebes. Je kürzer die nachzuweisenden DNS-Stränge sind, desto höher muss die Konzentration des Agarosegels sein (RASSOW et al. 2012).

Durch die Elektrophorese werden Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe getrennt und mit DNS-Strängen bekannter Größe verglichen (Standard). Negativ geladene DNS-Teile wandern in einem elektrischen Feld vom negativ geladenen (Kathode) zum positiv geladenen Pol (Anode). Die angewandte Spannung beträgt zirka 110 bis 130 Volt. Je langsamer die Gelelektrophorese durchlaufen wird, desto geringer ist die Hitzebildung und desto besser stellen sich die Banden dar. Während des Prozesses kann man eine chemische Reaktion, die sich durch Bläschenbildung äußert, an den beiden Polen beobachten. An der Kathode bilden sich Wasserstoffgas und Base und an der Anode Säure und Sauerstoffbläschen (MARTIN 1996, RASSOW et al. 2012).

## 6. Material und Methode

### 6.1. Probenmaterial

Für diese Studie wurden Proben von 18 an Hufkrebs erkrankten Pferden verwendet, die an der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien aufgrund dieser Erkrankung behandelt wurden. Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen der Studie von APPRICH et al. (2013). Die Pferde mussten die Kriterien eines klinisch und histologisch bestätigten Hufkrebses an zumindest einem Huf erfüllen. Das Hufkrebsgewebe wurde nach gründlicher Reinigung und Desinfektion der Hufe ausschließlich aufgrund klinischer Notwendigkeit unter Lokalanästhesie und in Sedierung im Zuge der routinemäßig durchgeführten Hufoperation entnommen. Die Proben stammten aus den tiefen Regionen des Strahls, um sicherzustellen, dass die Region des dermo-epithelialen Übergangs enthalten war. Dies wurde im Anschluss auch noch histologisch bestätigt. Zusätzlich wurden analog dazu Proben von vier klinisch und histologisch bestätigt hufgesunden Pferden, die aus anderen Gründen als Hufkrebs euthanasiert worden waren, als Negativkontrollen entnommen. Die Gewebsentnahme und -untersuchung erfolgte mit schriftlichem Einverständnis der BesitzerIn, welches bei Aufnahme der Pferde an der Klinik gegeben worden war.

Unmittelbar nach der Entnahme wurde ein Teil der Proben (Hufkrebs- und Kontrollgewebe) nativ bei -20 °C gelagert, der andere Teil wurde formalin-fixiert. Bereits im Rahmen einer früheren Studie (APPRICH et al. 2020) wurden Schnitte der formalin-fixierten Proben für ein histologisches Screening mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Anhand der Ergebnisse dieser histologischen Untersuchungen wurde jeweils eine native Gewebsprobe pro Pferd des am stärksten betroffenen Hufs zur DNS-Extraktion ausgewählt. Nur von einem an Hufkrebs erkrankten Pferd wurden insgesamt vier Proben von zwei sehr stark betroffenen Hufen weiter untersucht, um festzustellen, ob die PCR innerhalb einer Hufkrebsläsion beziehungsweise an unterschiedlichen Hufen eines Pferdes konsistente Ergebnisse liefert.

Tab. 2: Probenübersicht inklusive Patientendaten (Alter, Rasse, betroffene Extremitäten), VE= Vorderextremität, HE= Hinterextremität

Patientennr.	Probennr.	Alter	Geschlecht	Rasse	Anzahl VE	Anzahl HE
1	1240	9	Wallach	Warmblut	0	1
2	1280	13	Wallach	Warmblut	2	0
3	1532	15	Wallach	Pinto	2	2
4	1624	13	Wallach	Warmblut	0	2

5	1353	15	Stute	Noriker	2	1
6	1282	15	Stute	Warmblut	2	2
7	1265	12	Stute	Traber	2	0
8	1259	16	Wallach	Warmblut	1	2
9	1247	16	Wallach	Warmblut	1	0
10	1226	16	Stute	Haflinger	1	0
11	1201	24	Stute	Traber	2	0
12	1195	18	Wallach	Warmblut	2	1
13	1055-1	16	Stute	Traber	1	0
14	1095	11	Wallach	Noriker	1	0
15	1006	15	Wallach	Warmblut	2	2
16	CHE HIRE	7	Wallach	Warmblut	0	1
17	RON VR	20	Wallach	Traber	2	1
18	RON VR 2					
19	RON VL					
20	RON VL 2					
21	TAL STR 2	18	Stute	Traber	1	0

Tab. 3: Probenübersicht der Negativkontrollen  
VE= Vorderextremität, HE= Hinterextremität

Patientennr.	Probennr.	Alter	Geschlecht	Rasse	Anzahl VE	Anzahl HE
G	2100	6	Wallach	Lusitano		1
H	2102	17	Wallach	Warmblut		1
I	2105	4	Stute	Quater Horse	1	
J	2112	6	Stute	Warmblut	1	

## 6.2. DNS- Extraktion

Die nativen Proben wurden entsprechend aufgetaut und die DNS- Extraktion erfolgte mittels DNeasy Blood & Tissue Kit® (Quiagen, Hilden, Deutschland). Es wurden zirka 3 mm<sup>3</sup> (etwa 25 mg) große Stücke des Hufkrebsgewebes entnommen, mit 20 µl Proteinase K und 180 µl ATL Puffer versetzt und bei 55 °C über Nacht verdaut. Die gelöste DNS wurde mittels Kit gereinigt und in 150 µl Pufferlösung eluiert. Anschließend wurde die Quantität der extrahierten DNS mittels Nanophotometrie (Nano Drop®) gemessen und die Qualität mittels PCR auf equines β-actin überprüft. Danach wurde die Konzentration jeder einzelnen Probe mehrmals gemessen und der Mittelwert berechnet (siehe Tab. 9). Die Konzentrationen lagen in einem Bereich von 3,1 bis 332,78 ng/µl.

## 6.3. PCR (Polymerase- Kettenreaktion, polymerase chain reaction)

Mittels Polymerase Chain Reaktion (PCR) wurden alle 21 Proben mit spezifischen Primerpaaren (siehe Tab. 5) auf das Vorhandensein von equinem β- actin (EBA) und EcPV1 bis EcPV8 untersucht. Die Durchführung erfolgte im GeneTouch Thermal Cycler (Biozym Scientific GmbH). Bei jeder PCR wurde eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle sowie Aqua destillata als no template control (ntc) mit getestet.

### 6.3.1. β-actin PCR

Um die Qualität der extrahierten DNS zu überprüfen, wurden alle Proben auf equines β-actin (EBA) getestet. β-actin ist ein sogenanntes Housekeeping Gen, welches in den meisten Geweben in großer Menge exprimiert wird. Für die PCR wurde als Polymerase eine Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die folgenden Primer wurden eingesetzt 5' β-actin 476 5' TCACCCACACTGTGCCCATCTACG 3' und 3' β-actin 1090 5' CGTCRTACTCCTGCTTGCTGATCC 3' (BRANDT et al. 2008). Der Mastermix enthielt 12,8 µl *Aqua destillata*, 4 µl 1 x Phusion High- Fidelity (HF) Puffer (Thermo Fisher Scientific), 0,6 µl 3 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 0,4 µl dNTP Mix 10 mM (Thermo Fisher Scientific), je 0,5 µl des 5'- und 3'-Primers, 0,2 µl Phusion HF DNA Polymerase und 1 µl der jeweiligen Probe (Template). Pro Reaktion betrug das Gesamtvolumen 20 µl, welche in 0,2 ml Soft Tubes (Fa. Biozym) pipettiert wurde.

Tab. 4: Mastermix für die  $\beta$ -actin- PCRs

12,8 $\mu$ l Aqua dest.
4 $\mu$ l Phusion HF Puffer
0,6 $\mu$ l DMSO
0,4 $\mu$ l dNTP Mix
0,5 $\mu$ l 3'- $\beta$ actin Primer
0,5 $\mu$ l 5'- $\beta$ actin Primer
0,2 $\mu$ l Phusion HF DNA Polymerase
19 $\mu$ l Mastermix gesamt
+1 $\mu$ l Probe (Template)

Das Temperaturprotokoll der  $\beta$ -actin PCR erfolgte folgendermaßen: 5 min bei 95 °C, 45 Zyklen bei 95 °C für 15 sec., 61 °C für 30 sec. und 72 °C für 30 sec. Abschließend 72 °C für 5 min. Danach erfolgte eine Kühlung auf 10 °C (Tab. 5)

Tab. 5: Temperaturprogramm für die  $\beta$ -actin- PCRs

Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	5'	
95 °C	15''	45x
61 °C	30''	
72 °C	30''	
72 °C	5'	
10 °C	$\infty$	

## 6.3.2. EcPV- PCR

Zum Nachweis der viralen Genome wurden spezifische Primer für EcPV1- EcPV8 verwendet.

Die Sequenz und Referenz wurden in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6: alle für die PCRs verwendeten Primer, AT= Anlagerungstemperatur der Primer

Ziel des Primers	Primer-Name	Sequenz	AT	Länge des PCR-Produkts
Equines $\beta$ - actin	5' $\beta$ -actin 476	5' TCACCCACACTGTGCCCATCTACG 3'	72°C	615bp
	3' $\beta$ -actin 1090	5' CGTCRTACTCCTGCTTGCTGATCC 3'		
EcPV1 E1	5'Ec1 E1 754	5' CTC ATG GTT TCT GCA GCA AGA GG 3'	57°C	673bp
	3'Ec1 E1 1424	5' CAG AAG CAT AAG CAG CAC AGT GC 3'		
EPV2 E1	5'Ec2 E1 1120	5' CTA GCA CTG TTC CAG CAG CAG C 3'	59 °C	549 bp
	3'Ec2 E1 1668	5' GGT CAT GTG AGC ATA GTC ACA GTG C 3'		
EcPV3 E6	5'Ec3 E6 7442	5' CTGTTGAAGCTCGCTACTGAGTCAC 3'	59 °C	708 bp
	3'Ec3 E6 567	5' GTCAGAACTCGATAAGGACATCTGTGG 3'	60 °C	
EcPV4 E6	5'Ec4 E6 7443	5' CCAAGTTGCTGCAAGATTCTGCACAG 3'	60 °C	573 bp

	3'Ec4 E6 461	5' GGATCCCTCGTCGTTGCGAACC 3'		
EcPV5 E6	5'Ec5 E6 7312	5' CACCACTCCTGCTTCCCAGAGC 3'	60 °C	692 bp
	3'Ec5 E6 484	5' GAGGTGAGCAGTGACGAAGAG 3'	59 °C	
EcPV6 E6	5'Ec6 E6 7357	5' GCTAGTACTACCCAATGCTACCATTGG 3'	60 °C	781 bp
	3'Ec6 E6 586	5' GCTTTGCTCTTCTTCCGTTTCACTGC 3'		
EcPV7 E6	5'Ec7 E6 7460	5' GAACCTGGAAAGCAGGCTCTGATAG 3'	59 °C	711 bp
	3'Ec7 E6 551	5' GGTGTCGCTGTTGTCCTCTACAC 3'		
EcPV8	5'Ec8 E6 162	5' CTACGCCTGTTGCAGAAGTTGTAGC 3'		642 bp
	3'Ec8 E7 803	5' CTCCAGCTGAATAAACCTGGCACT 3'		

Als Polymerase wurde eine GoTaq® DNA Polymerase (Promega) verwendet. Diese hat den Vorteil gegenüber der Taq Polymerase, dass sie nicht durch einen Heißstart aktiviert werden muss, sondern direkt dem Reaktionsgemisch beigefügt werden kann. Der Mastermix (Tab. 7) enthielt 34 µl *Aqua destillata*, 10 µl 5x Colorless GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 1 µl dNTP Mix 10 mM (Thermo Fisher Scientific), 1 µl der jeweiligen 5'- und 3'-Primer (EcPV1-EcPV8) 1:10 verdünnt mit *Aqua destillata*, 1 µl GoTaq® DNA Polymerase (Promega) und 2 µl der jeweiligen DNS-Probe (Template). Pro Reaktion betrug das Gesamtvolumen 50 µl. Verwendet wurden wieder 0,2 ml Soft Tubes (Fa. Biozym).

Tab. 7: Mastermix für die EcPV- PCRs

34 $\mu$ l Aqua dest.
10 $\mu$ l 5x Colorless GoTaq Reaction Buffer
1 $\mu$ l dNTP Mix
1 $\mu$ l 5'- Primer EcPV Verdünnung 1:10
1 $\mu$ l 3'- Primer EcPV Verdünnung 1:10
1 $\mu$ l GoTaq DNA Polymerase
48 $\mu$ l Mastermix gesamt
+ 2 $\mu$ l Probe (Template)

Alle PCRs wurden mit einem Touch-Down-Programm bei 58 °C durchgeführt. Nach zweiminütiger Aktivierung der Polymerase bei 92 °C erfolgten sieben Touch-Down- Zyklen. Jeder dieser Zyklen begann mit 92 °C für 20sec. Es folgten 30 sec. bei 67 °C mit einer Temperaturreduktion nach jedem Zyklus um 1,5 °C. Anschließend folgte die Elongationsphase für 45 sec. bei 72 °C. Danach kamen 40 Standard-Zyklen (92 °C für 20 sec., 58 °C für 30 sec., 72 °C für 45 sec.). Abschließend erfolgte eine finale Elongationsphase bei 72 °C für 3 min. Danach eine Kühlung auf 10 °C (Tab. 8).

Tab. 8: Temperaturprogramm für die EcPV-PCRs

Temperatur	Dauer	Zyklen
92 °C	2'	
92 °C	20''	7x
67-58 °C	30''	
72 °C	45''	
92 °C	20''	40x
58 °C	30''	
72 °C	45''	

72 °C	3‘	
10 °C	∞	

## 6.4. Gelelektrophorese

### 6.4.1. Herstellung Agarosegel

Zur Herstellung eines 1,5 % Tris/Acetat-Agarosegels wurden 1,8 g Agarose (Biozym) mit 150 ml 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer in einem hitzestabilen Gefäß gemischt und für zirka drei Minuten in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Zur Visualisierung des PCR-Produkts wurde dem etwas abgekühlten Gel unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen 6 µl Ethidiumbromid (EtBr) zugefügt. In der Gelkammer wurden ein herausnehmbarer UV-transparenter Gelträger und zwei Kämmen mit jeweils 14 Zähnen platziert, wodurch zwei gleiche Gelhälften zum Auftragen zur Verfügung standen. Das flüssige Agarosegel wurde möglichst blasenfrei in die Gelkammer eingegossen und musste für mindestens 20 Minuten aushärten. Danach wurden die Kämmen vorsichtig aus dem Gelblock gezogen. Die entstandenen Kammern hatten jeweils ein Fassungsvermögen von 29 µl. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x TAE Pufferlösung gefüllt und 25 µl Ethidiumbromid wurden zur Verbesserung der Darstellung der Banden zugefügt. Der Puffer wurde in regelmäßigen Abständen erneuert. Danach wurde das Gel mit dem Gelträger in der Elektrophoresekammer mittig platziert, sodass es vom Puffer vollständig bedeckt war.

### 6.4.2. Auftragen der PCR- Produkte

Auf einem mit Paraffinpapier überzogenen Rack wurden für jedes PCR Produkt 4 µl einer 6x DNA Gel Loading Dye (LD) (Thermo Fisher Scientific) sowie zwei Standards zu je 5 µl mittels Pipette aufgetragen. Bei dem Standard handelte es sich um eine GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), welche Referenzbanden in 100 Basenpaarschritten bis zu 1000 bp anzeigt. Die verwendete LD ist mit zwei Farbstoffen versetzt, sodass die erfolgte Auftrennung gut zu beobachten ist. Anschließend wurde 16 µl des PCR-Produktes mit der LD vermischt, woraus sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Diese 20 µl wurden in die Kammern des Agarosegels pipettiert und unmittelbar danach die Gelelektrophorese gestartet.

### 6.4.3. Durchführung der horizontalen Gelelektrophorese

Die Elektrodenkabel wurden auf den Elektroden der Elektrophoresekammer befestigt und mit dem Stromgerät verbunden. Die Laufrichtung erfolgte von der Kathode zur Anode. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von zirka 140 Volt durchgeführt. Nach ausreichender Auftrennung wurde das Gel mit dem Gelträger im FluorChem FC3 (Protein Simple) platziert und es erfolgte die Visualisierung unter UV-Licht. Durch das UV-Licht stellen sich die aufgetrennten DNS-Fragmente im Gel als Banden dar.

## 7. Ergebnisse

Es wurden 21 Proben von 18 Pferden, die an der Veterinärmedizinischen Universität mit der Diagnose Hufkrebs vorgestellt wurden, untersucht. 61,11 % (11/18) der Pferde waren Wallache und 38,89 % (7/18) Stuten. Das durchschnittliche Alter betrug 14,94 Jahre (7-24 Jahre). Die Rasseverteilung sah wie folgt aus. Es waren 50,00 % (9/18) der Proben von Warmblütern, 27,77 % (5/18) von Trabern, 11,11 % (2/18) von Norikern, 5,55 % (1/18) von Pintos und 5,55 % (1/18) von Haflingern (Tab. 2).

Bei sieben Pferden (38,89 %) war ein Huf, bei vier Pferden (22,22 %) zwei Hufe, bei vier Pferden (22,22 %) drei Hufe und bei drei Pferden (16,67 %) alle vier Hufe betroffen. Gesamt waren 24 Vorderhufe (61,54 %) und 15 Hinterhufe (38,46 %) betroffen.

### 7.1. Messung der DNS-Konzentration

Nach der DNS- Extraktion wurde die Qualität der DNS mittels  $\beta$ -actin PCR und Messung der DNS Konzentration beurteilt.

Alle 21 Proben wurden positiv auf equines  $\beta$ -actin getestet.

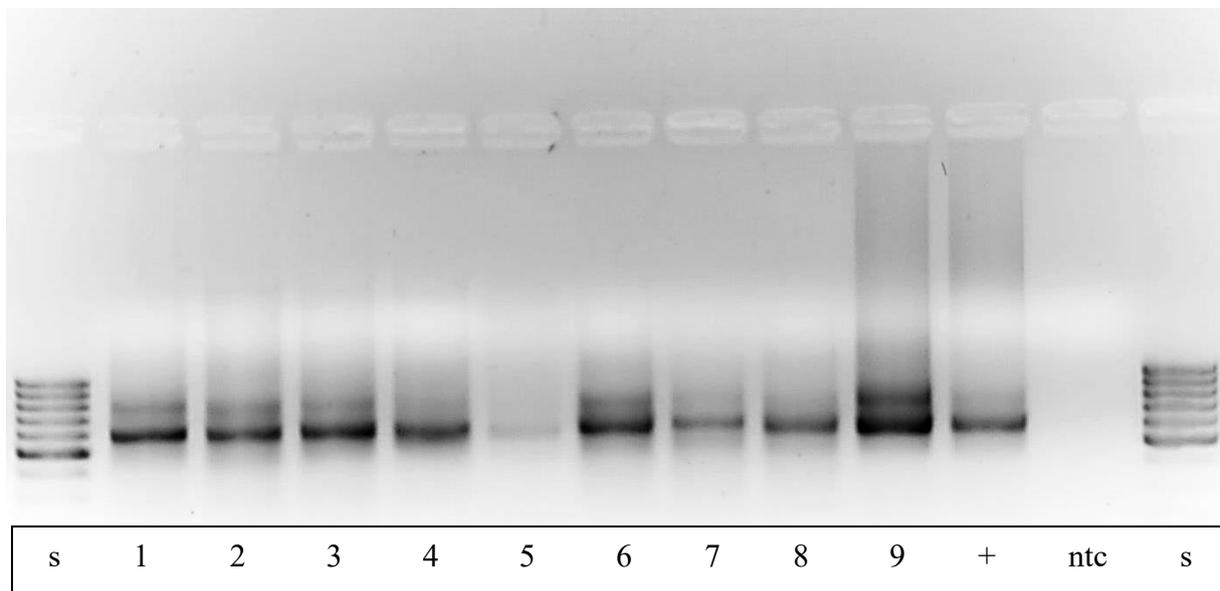


Abb. 6: Beispiel einer  $\beta$ -actin PCR: s = Standard, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). 1-9 laufende Nummern der Proben. + = positiv Kontrolle, ntc = no template control. Alle Proben und die Positivkontrolle zeigen eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe von 615 bp und sind somit positiv auf equines  $\beta$ -actin

Anschließend wurde die Konzentration jeder einzelnen Probe mittels Nano Drop dreimal gemessen und der Mittelwert berechnet. Die Konzentrationen lagen in einem Bereich von 3,1-332,78 ng/ $\mu$ l. 61,9 % (13/21) der Proben hatten eine höhere Konzentration als 40 ng/ $\mu$ l (Tab. 9).

Tab. 9: Ergebnisse der DNS- Konzentrationsmessungen mittels Nanophotometrie, MW= Mittelwert ,Werte in [ng/ $\mu$ l]

Patientennr.	Probennr.	$\beta$ - actin	1.Messung	2.Messung	3.Messung	MW
1	1240	+	325,02	341,05	331,85	332,64
2	1280	+	107,1	109,4	108	108,17
3	1532	+	3,1	3,65	3,1	3,28
4	1624	+	137,35	145,05	146,3	142,9
5	1353	+	5,3	4,95		5,125
6	1282	+	16,15	16,7		16,425
7	1265	+	108,25	107,9		108,075
8	1259	+	59,85	56,6	57,35	57,93
9	1247	+	30,45	31,7		31,075
10	1226	+	52,2	52,2		52,2
11	1201	+	27,75	27,45		27,6
12	1195	+	60,45	59,55		60
13	1055-1	+	167,1	170,15	168,25	168,5
14	1095	+	4,75	4,9		4,825
15	1006	+	68,25	67,25		67,75
16	CHE HIRE	+	24,55	24,35		24,45
17	RON VR	+	11,55	11,45		11,5
18	RON VR 2	+	157,95	157,6		157,775
19	RON VL	+	166,1	156,4	154,05	158,85

20	RON VL 2	+	62,3	62,55		62,425
21	TAL STR 2	+	330,1	328,15	329,85	329,36
G	2100		71,25	70,75		71
H	2102		18,45	17,7		18,075
I	2105		61,75	61,7		61,725
J	2112		56,1	57,1		56,6

## 7.2. Ergebnisse EcPV-PCR

### 7.2.1. EcPV1- E1

Die Proben 7, 12, 19 und 20 zeigten schwache Banden auf der erwarteten Höhe von 673 bp, wobei 19 und 20 von einem Pferd stammten. Die restlichen Proben waren negativ.

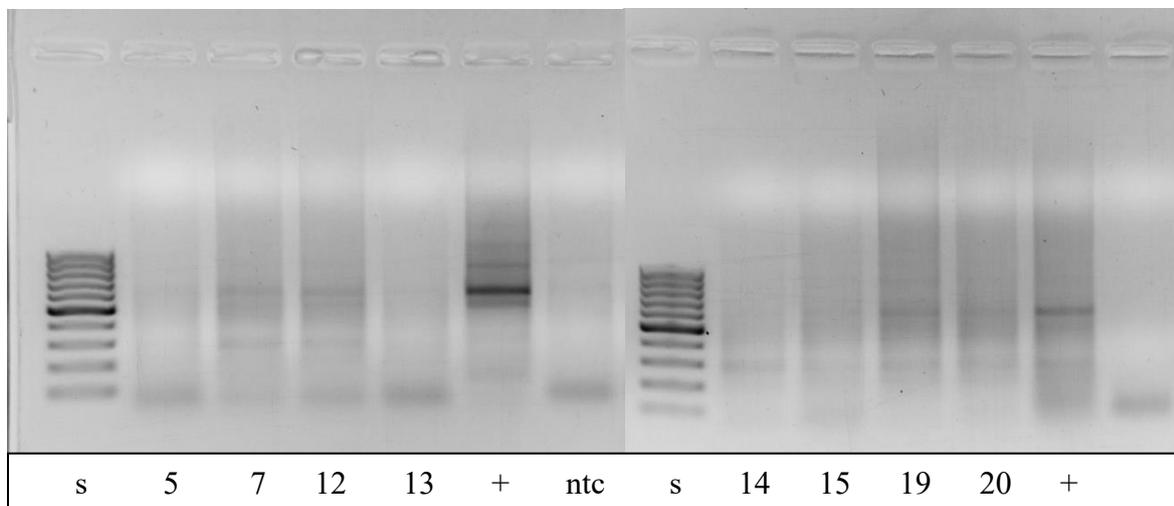


Abb. 7: Beispiel zweier EcPV1- E1 PCRs. Die Proben 7 und 12 sowie 19 und 20, welche von einem Pferd stammten, zeigten schwache Banden auf Höhe von 673 bp. Alle anderen Proben waren negativ.

s = Standard, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Zahlen: laufende Nummern der Proben. + = positiv Kontrolle, ntc = no template control.

## 7.2.2. EcPV2- E1

Weder in den Hufkrebsproben noch in den Negativkontrollen konnte EcPV2-DNS nachgewiesen werden. Die beiden Positivkontrollen zeigen deutliche Banden auf der erwarteten Höhe von 549 bp. Die ntc war negativ.

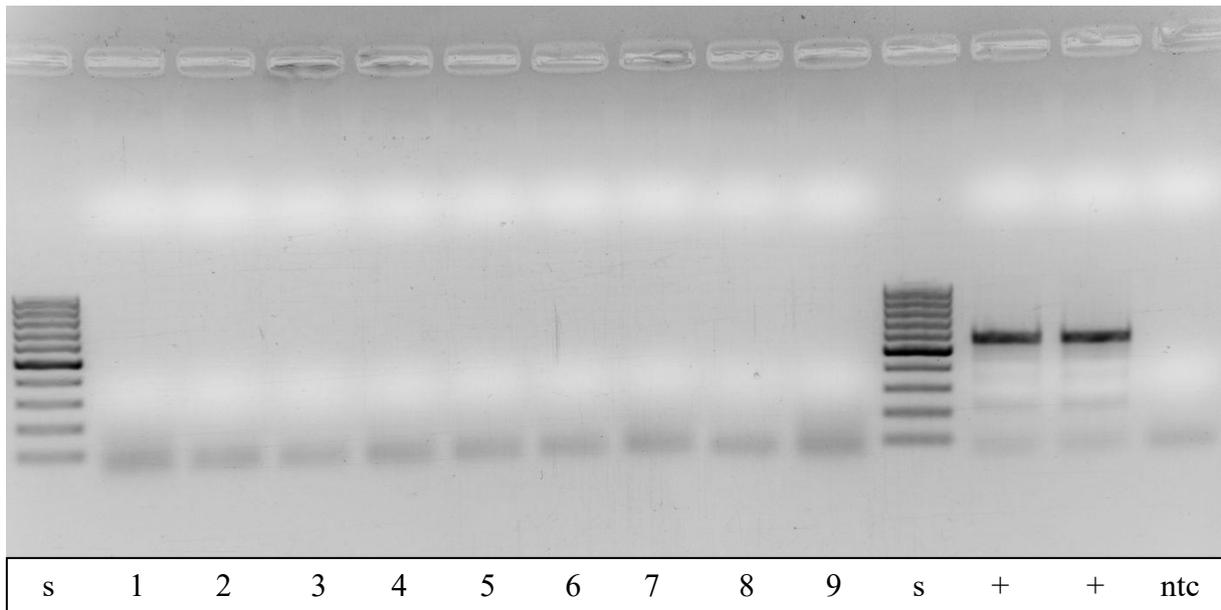


Abb. 8: Beispiel einer EcPV2- E1 PCR: Alle Proben und ntc sind negativ. Die beiden Positivkontrollen zeigen deutliche Banden auf einer Höhe von 549bp.

s = Standard, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). 1-9 laufende Nummern der Proben. + = positiv Kontrolle, ntc = no template control.

## 7.2.3. EcPV3- E6

In keiner der Proben konnte EcPV3-DNS nachgewiesen werden.

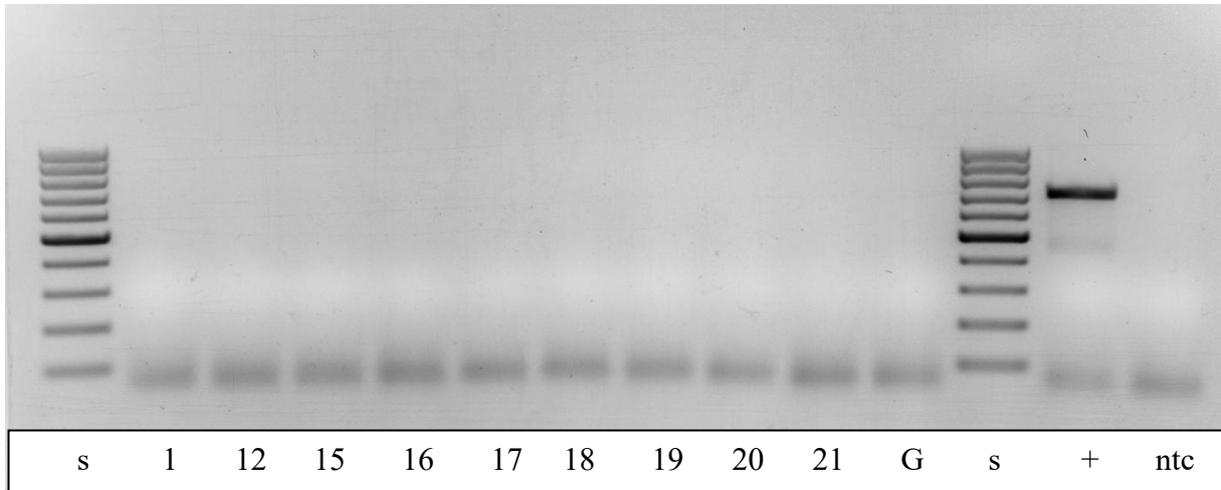


Abb. 9: Beispiel einer EcPV3-E6 PCR: Alle Proben, die Kontrolle G sowie ntc sind negativ, Die Positivkontrolle zeigt eine deutliche Bande auf Höhe von 708 bp.

s = Standard, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). 1-9 laufende Nummern der Proben. G= Kontrollprobe G, += positiv Kontrolle, ntc = no template control.

## 7.2.4. EcPV4-E6

Es konnte in keiner der Proben EcPV4-DNS nachgewiesen werden.

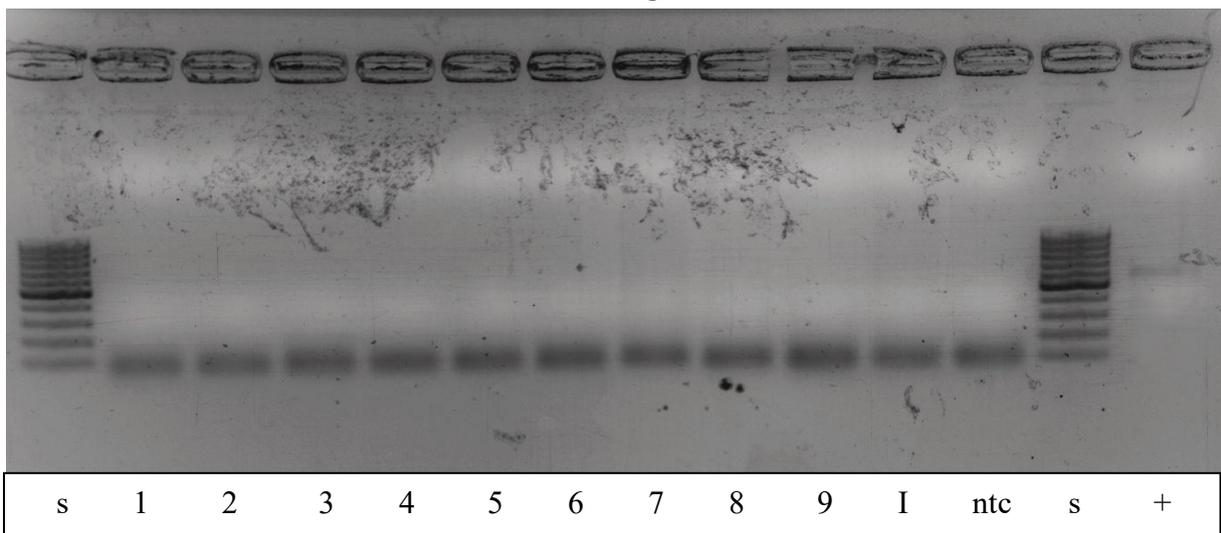


Abb. 10: Beispiel einer EcPV4- E6 PCR: Proben und Kontrollen sind negativ. Die Positivkontrolle zeigt eine schwächere, aber doch deutliche Bande bei 573 bp.

s = Standard, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). 1-9 laufende Nummern der Proben. I= Kontrollprobe I, += positiv Kontrolle, ntc = no template control.

## 7.2.5. EcPV5- E6

Es konnte in keiner Probe EcPV5- DNS nachgewiesen werden. In Probe 19 waren, wie in der Positivkontrolle, Banden auf Höhe von zirka 420 und 350 bp zu sehen, jedoch keine Bande auf der Höhe von 692 bp.

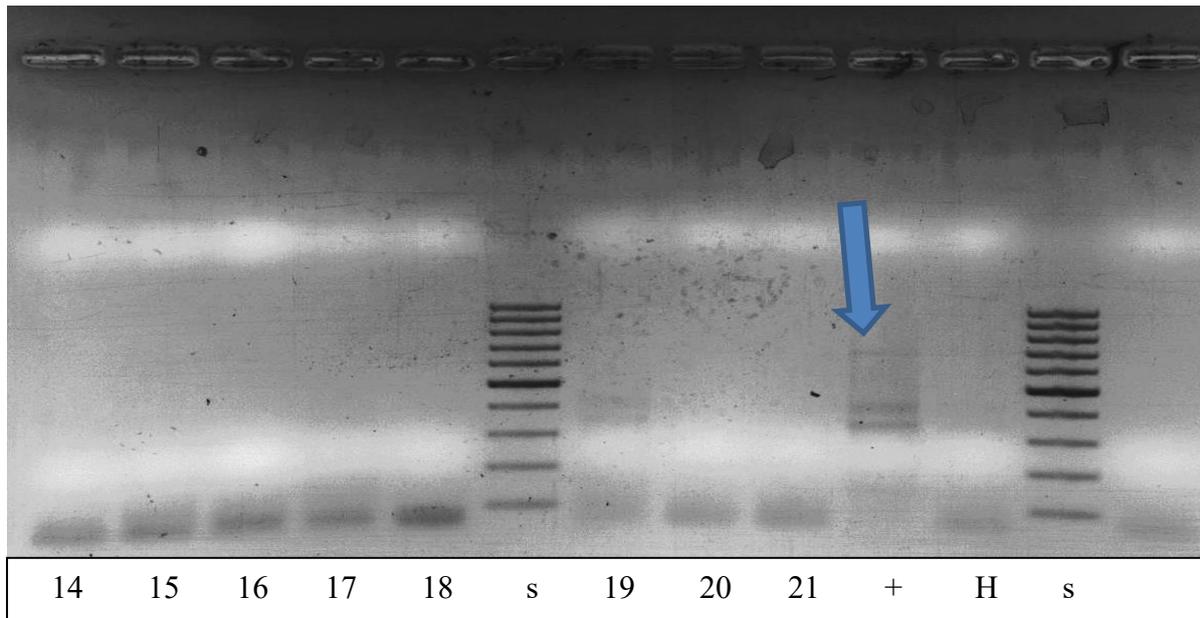


Abb. 11: Beispiel einer EcPV5- E6 PCR: s = Standard, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). + = EcPV2- Kontrolle, ntc = no template control. Alle Proben waren negativ. Die EcPV2 Kontrolle zeigte eine schwache Bande.

## 7.2.6. EcPV6- E6

Keine der Proben zeigte eine Bande auf der erwarteten Höhe von 781 bp. Probe 15 und 19 wiesen lediglich eine Bande bei ungefähr 950 bp auf, welche aber auch in der Negativkontrolle H zu sehen war.

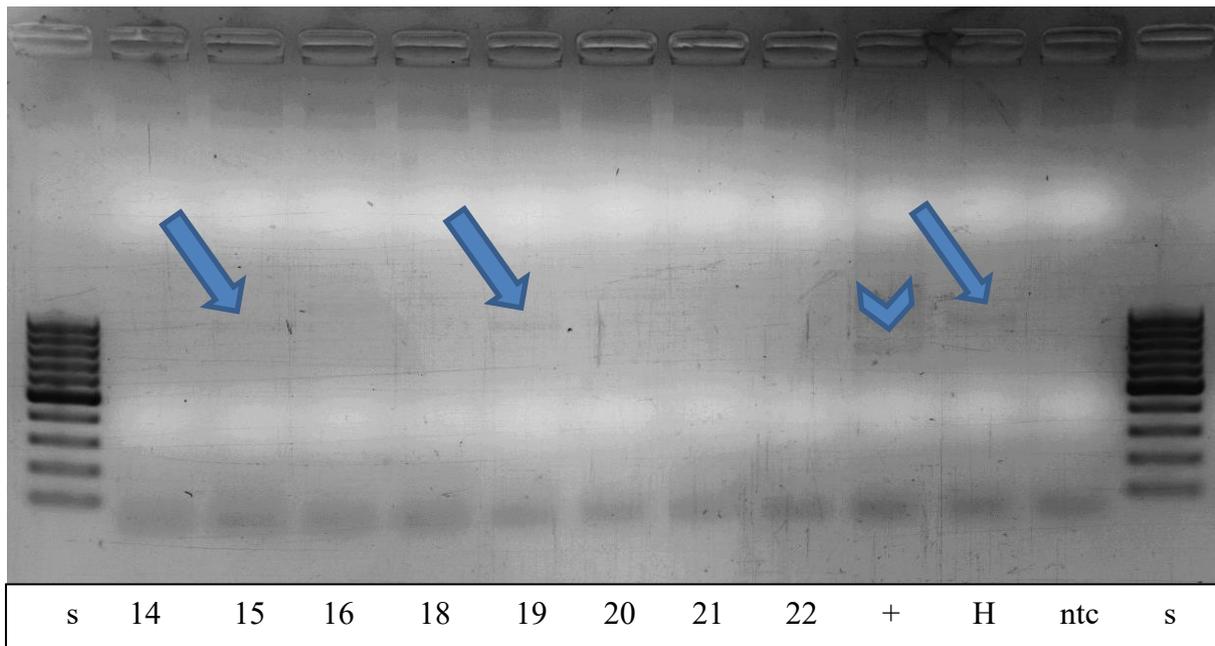


Abb. 12: Beispiel einer EcPV6- E6 PCR: Alle Proben und ntc sind EcPV6 negativ. Die Positivkontrolle (kurzer Pfeil) zeigen eine Bande bei 781bp. Eine Bande bei zirka 950 bp (langer Pfeil) konnte in den Proben 15 und 19 aber auch in der Negativkontrolle gefunden werden.

s = Standard, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). 14-16,18-22: laufende Nummern der Proben. + = positiv Kontrolle, H= Negativkontrolle, ntc = no template control.

## 7.2.7. EcPV7- E6

Nur Probe 19 zeigte eine schwache Bande auf der erwarteten Höhe von 711 bp (Abbildung 13, Pfeil), die übrigen Proben waren negativ.

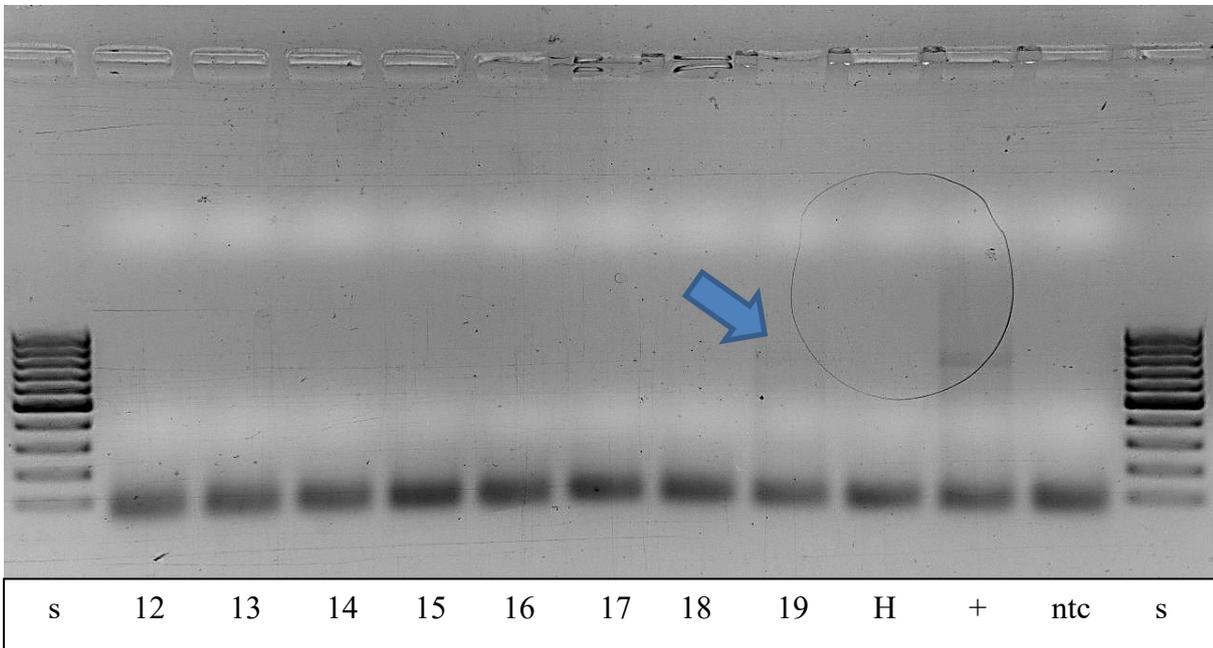


Abb. 13: Beispiel einer EcPV7-E6 PCR: Nur Probe 19 zeigt eine Bande auf Höhe von 711 bp (Pfeil), die restlichen Proben und Kontrollen waren negativ.

s = Standard, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). 12-19 laufende Nummern der Proben. H= Kontrollprobe H, + = positiv Kontrolle, ntc = no template control.

## 7.2.8. EcPV8

Die Probe 19 zeigte eine sehr schwache Bande im Bereich von 652 bp. Die restlichen Proben waren negativ.



11	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	-	-	-	-	+	+	+
20	+	+	-	-	-	-	-	-	-
21	+	+	-	-	-	-	-	-	-
physiol. Haut	+				-	-	+	+	-

## 8. Diskussion

Hufkrebs ist eine chronisch entzündliche Störung der Hornbildung mit Wucherung des Papillarkörpers und ausbleibender Keratinisierung (RIGERT et al. 2009, MISHRA et al. 1998).

Die exakte Ursache für die Entstehung von Hufkrebs ist bislang noch unbekannt.

Ursprünglich wurde Hufkrebs hauptsächlich bei schweren Rassen beschrieben, da diese eine schlechtere Hornqualität aufweisen sollen (REEDING und O'GRADY 2012, DIETZ 2005, FÜRST und LISCHER 2012). BAXTER et al. (2011), OOSTERLINCK et al. (2011), AZZOLINI et al. (2019) und APPRICH und LICKA (2013) fanden in ihren Studien eine breitgefächerte Rasseverteilung, weshalb davon ausgegangen wird, dass alle Rassen potentiell an Hufkrebs erkranken können. Auch die 18 Patienten dieser Studie zeigen mit 50 % Warmblütern, 27,8 % Trabern, 11,1 % Norikern, 5,6 % Pintos und 5,6 % Haflingern eine breitere Rasseverteilung. O'GRADY und MADISON (2004) konnten kein gehäuftes Auftreten von Hufkrebs bei einem Geschlecht nachweisen. Auch OOSTERLINCK et al. (2011) und APPRICH und LICKA (2013) beschreiben in ihren Studien ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis. In der vorliegenden Studie wurden 61,11 % Wallachen und 38,89 % Stuten untersucht. Aufgrund der geringen Anzahl an Pferden ist dieses Ergebnis aber vorsichtig zu bewerten. Bezüglich einer möglichen Gliedmaßenprädisposition gibt es in der Literatur unterschiedliche Meinungen. MINAMI et al. 1991, REEVES et al. 1989, FÜRST und LISCHER 2012, MISHRA et al. 1998, DIETZ 2005 und AZZOLINI et al. 2019 beschreiben, dass die Beckengliedmaße häufiger betroffen ist. Andere Autoren äußerten die Vermutung, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Häufigkeit des Auftretens von Hufkrebs an der Vorder- oder Hinterextremität besteht (OOSTERLINCK et al. 2011, RIGERT et al. 2009). In der vorliegenden Studie waren 61,5 % der erkrankten Extremitäten Vorderbeine. Auch dieses Ergebnis muss aufgrund der geringen Anzahl an Pferden vorsichtig bewertet werden.

Außerdem wird in der Literatur beschrieben, dass häufig mehrere Hufe zugleich betroffen sind (RIGERT et al. 2009, O'GRADY und MADISON 2004, OOSTERLINCK et al. 2011). In dieser Studie sind mit 61,11 % bei mehr als der Hälfte der Probanden mehrere Hufe zeitgleich erkrankt. Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten anderer Studien.

Da das histologische Bild des Hufkrebsgewebes einige Parallelen zum equinen Sarkoid aufweist, wie zum Beispiel Hyperkeratose, Akanthose und eine hohe Rezidivrate (BRANDT

et al. 2011, APPRICH et al. 2017), wurde ein Zusammenhang zwischen BPV1, BPV2 und Hufkrebs vermutet (CHAMBERS et al. 2013). Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden APPRICH et al. (2020).

Die Vermutung, dass Hufkrebs von Papillomviren ausgelöst werden könnte, basiert unter anderem auf der histologisch nachgewiesenen Koilozytose. Die Koilozytose ist allgemein für Papillomvirusinfektionen charakteristisch und weist somit im Hufkrebsgewebe auf eine mögliche Beteiligung von Papillomviren hin (APPRICH et al. 2017, KRAWCZYK et al. 2008).

In sämtlichen Veränderungen, welche von equinen Papillomviren ausgelöst werden, können ebenfalls Koilozyten nachgewiesen werden. Bis dato sind neun Typen von equinen Papillomviren bekannt. Einige davon sind bereits eindeutig mit gewissen Erkrankungen assoziiert, jedoch kann eine Beteiligung am Hufkrebs nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde in dieser Studie erstmals versucht, einen Zusammenhang zwischen Hufkrebs und Equinen Papillomviren nachzuweisen.

Untersucht wurden EcPV1 bis EcPV8, Das neuste Papillomvirus, EcPV9, wurde in dieser Studie nicht getestet, da dieses erst nach Abschluss der praktischen Arbeit publiziert wurde. Theoretisch könnte EcPV9 eine Rolle in der Entstehung von Hufkrebs sein. Jedoch ähnelt EcPV9 stark EcPV2, welches nachgewiesenermaßen mit genitalen PEKs assoziiert wird (SCASE et al. 2010, SYKORA et al. 2012 LINDER et al. 2019). Zur Klärung dieser Fragestellung bedarf es weiterer Untersuchungen.

EcPV1 gilt als Ursache der klassischen Papillomatose (GHIM et al. 2004). Dieser EcPV-Typ war in der vorliegenden Studie in vier Hufkrebsproben nachweisbar. Dabei handelte es sich um Pferde, die älter als drei Jahre waren. Warum diese Proben positiv waren, kann nur spekuliert werden. Da EcPV1 jedoch nicht in allen Hufkrebsproben nachweisbar war, kommt es als Auslöser dieser Erkrankung mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in Frage.

EcPV2 war in keiner Probe nachweisbar. Durch die Affinität zu muko-kutanen Übergängen, insbesondere im Genitalbereich (SCASE et al. 2010, SYKORA et al. 2012, SYKORA et al. 2017), war dieses Ergebnis nicht überraschend.

EcPV3, EcPV4, EcPV5 und EcPV6 wurden aus aural plaques an der Innenseite der Ohrmuschel isoliert (ZAKIA et al. 2016, ZAKIA et al. 2019). In der Studie von ZAKIA et al. (2019) konnte EcPV3 in 36,89 %, EcPV4 in 82,52 %, EcPV5 in 0,97 % und EcPV6 in

10,68 % der Proben nachgewiesen werden. Da EcPV5, EcPV6 und auch EcPV3 eher in geringer Prozentzahl in aural plaques nachweisbar sind, stellte sich die Frage ob diese EcPV-Typen nicht auch für andere Krankheitsgeschehen, wie Hufkrebs, ursächlich sein könnten. In dieser Studie konnte keiner dieser EcPV-Typen konstant in den Hufkrebsproben nachgewiesen werden.

EcPV7 wird bis dato mit keiner speziellen Erkrankung assoziiert, jedoch wurde es erstmals in penilen Umfangsvermehrungen nachgewiesen (TORRES und KOCH 2013, ZAKIA et al. 2019), Auch EcPV7 konnte in dieser Studie in keiner der Hufkrebsproben nachgewiesen werden.

EcPV8 wurde erstmals bei Pferden mit generalisierter Papillomatose isoliert (LINDER et al. 2018) und steht, ähnlich wie EcPV7, mit keiner Krankheit in direktem Zusammenhang. Aufgrund der Verteilung der Papillome am ganzen Körper wäre es möglich gewesen, dass EcPV8 an der Entstehung von Hufkrebs beteiligt ist. Jedoch auch EcPV8 konnte in den Hufkrebsproben nicht konstant nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass EcPV1 bis EcPV8 nicht oder nur vereinzelt in den Hufkrebsproben nachgewiesen werden konnte. Warum einzelne Proben positiv waren, bedarf weiterer Studien. Jedoch kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass die untersuchten EcPV Typen ursächlich für die Entstehung von Hufkrebs sind. Die Hypothese dieser Studie konnte deshalb nicht bestätigt werden.

Da histologisch im Hufkrebsgewebe Koilozyten zu finden sind, kann eine Beteiligung von Papillomviren nicht ausgeschlossen werden. Bis dato unbekannt oder auch bereits bekannte weitere equine oder bovine Papillomvirustypen könnten im Zusammenhang mit Hufkrebs stehen und sollten in weiteren Studien untersucht werden.

## 8. Zusammenfassung

Hufkrebs (*Pododermatitis chronica verrucosa sive migrans*) wird als eine chronische Entzündung der Huflederhaut definiert. Diese Erkrankung geht mit Proliferation und Veränderungen des Papillarkörpers, Parakeratose und fehlender Epithelisierung und Verhornung einher. Bis jetzt ist der Auslöser von Hufkrebs noch nicht bekannt. Mehrere Faktoren, wie mangelnde Hygiene, schlechte Aufstallung, ein immunologisches Geschehen oder Bakterien wurden vermutet. Aufgrund der histologisch bestätigten Koilozytose im Hufkrebsgewebe wurden auch Papillomviren als mögliche Ursache in Betracht gezogen. Eine Beteiligung von BPV1 und BPV2 konnte neueren Studien zufolge nicht nachgewiesen werden. Deshalb lautete die Hypothese dieser Studie, dass equine Papillomviren ursächlich für die Entstehung von Hufkrebs sind. 21 Hufkrebsproben wurden mittels PCR auf EcPV1-EcPV8 getestet. Keiner der bisher bekannten EcPV-Typen konnte konstant in den getesteten Hufkrebsproben nachgewiesen werden. Daraus kann man schließen, dass EcPV1-EcPV8 wahrscheinlich nicht ursächlich für die Entstehung von Hufkrebs sind.

## 9. Summary

Canker (*Pododermatitis chronica verrucosa sive migrans*) is defined as a chronic inflammatory disease of the corium. This disease is associated with extensive proliferation and pathological alterations of the dermal papillary body, parakeratosis and the absent of epithelialisation and cornification. Up to now the cause of equine canker is unknown. Factors as poor hygiene, unhygienic stabling, an immunological reason and bacteria were assumed. Based on the histological confirmed koilocytosis in canker tissue papillomaviruses were suspected as a highly possible cause. An involvement of BPV1 and BPV2 in the pathogenesis of canker could not be shown in recent studies. Therefore the hypothesis of this study is that one of the currently known and fully decoded EcPVs could be a causative reason for the development of equine canker. 21 canker samples were screened for EcPV1-EcPV8 by the use of PCR. None of the suspected EcPV types could be detected constantly in the canker samples. In conclusion, it is most likely that EcPV1-EcPV8 are not the causative reason for the development of equine canker.

## 10. Abkürzungsverzeichnis

A./ Aa.	Arterie/ Arterien
Ak	Antikörper
ATL	animal tissue lysis
Bp	Basenpaare
BPV	Bovines Papillomvirus
CPV	Canines Papillomvirus
DANN	deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
EBA	equines Beta- actin
EcPV	Equines Papillomvirus
et al.	et aliae/ alia
EtBr	Ethidiumbromid
FdPV	Felines Papillomvirus
GIT	Gastrointestinaltrakt
HE	Hinterextremität
HF	high fidelity
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humanes Papillomvirus
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesions
Kg	Kilogramm
LCR	long control region
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesions
Mg	Milligramm
Mm	Millimeter
MW	Mittelwert
N./ Nn.	Nerv/ Nerven
Ng	Nanogramm
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
ntc	non template controll

ORF	open reading frame
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PEK	Plattenepithelkarzinom
PN	Probennummer
PV	Papillomvirus
R.	Ramus
RT- PCR	real time polymerase chain reaction
sid	semel in die/ einmal täglich
sp.	Spezies
spp.	Subspezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
URR	upstream regulatory region
V./ Vv.	Vene/ Venen
VE	Vorderextremität
µl	Mikroliter

## 11. Literaturverzeichnis

- Ackermann M. Hrsg.** 2013. Virus- Handbuch für Veterinärmediziner. Erste Auflage. Bern, Stuttgart, Wien: Haupt Verlag.
- Apprich V, Licka T.** 2013. Equine hoof canker: a clinical trial of topical cisplatin chemotherapy. *Veterinary Record*, 172 (9): 238. DOI: 10.1136/vr.101359.
- Apprich V, Licka T, Zipfl N, Gabriel C.** 2016. Presence and degree of morphological alternations in equine hoof canker tissues in relation to the presence of bovine papillomaviral DNA. *Equine Veterinary Journal*, 48 (50): 26.
- Apprich V, Licka T, Zipfl N, Tichy A, Gabriel C.** 2017. Equine Hoof Canker: Cell Proliferation and Morphology. *Veterinary Pathology*, 54 (4): 661- 668. DOI: 10.1177/0300985817695515.
- Apprich V, Licka T, Freiler S, Gabriel C.** 2020. Equine hoof canker: Bovine papillomavirus infection is not associated with impaired keratinocyte differentiation. *Veterinary Pathology*, 57 (4): 525-534. DOI: 10.1177/0300985820921820.
- Aslan Ö, Oruc E.** 2010. Is It Possible to Treat Equine Papillomatosis with Ivermectin Given Orally?. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (6): 1065- 1068. DOI: 10.9775/kvfd.2010.1884.
- Azzolini EFOT, Bastos SF, Barros RM.** 2019. Chronic equine proliferative pododermatitis: case report. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 6 (4): e160249. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.160249>.
- Bakker O, Timmer DC.** 2004. Housekeeping Genes: A Gold Standard?. In: Wittwer C, Hahn M, Kaul K, Editor. *Rapid Cycle Real-Time PCR- Methods and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Baumgärtner W, Hrsg.** 2007. *Pathohistologie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke Verlag
- Baxter GM, Stashak TS, Belknap JK, Parks A.** 2011. The Foot. In: Baxter GM, Editor. *Adams & Stashak's Lameness in Horses*. Sixth Edition. West Sussex: Wiley-Blackwell Verlag.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H Zur, de Villiers EM.** 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. Elsevier Inc, 401 (1): 70- 79. DOI: 10.1016/j.virol.2010.02.002.

**Bolliger C, Geyer H.** 1992. Zur Morphologie und Histochemie des Pferdehufes. Pferdeheilkunde, 8 (5): 269- 286.

**Bogaert L, Willemsen A, Vanderstraeten E, Bracho MA, De Baere C, Bravo IG, Martens A.** 2012. EcPV2 DNA in equine genital squamous cell carcinomas and normal genital mucosa. Veterinary Microbiology 158: 33-41. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.02.005

**Bogaert L, Martens A, Depoorter P, Gasthuys F.** 2008. Equine sarcoids - Part 3: association with bovine papillomavirus. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 78: 131-137

**Borzacchiello G, Roberto F.** 2008. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. Veterinary Research: 39 (5): 45- 63. DOI: 10.1051/vetres: 2008022.

**Brandt S, Haralambus R, Schoster A, Kirnbauer R, Stanek.** 2008. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. Journal of General Virology, 89: 1390- 1395. DOI: 10.1099/vir.0.83568-0.

**Brandt S, Schoster A, Tober R, Kainzbauer C, Burgstaller JP, Haralambus R, Steinborn R, Hinterhofer C, Stanek C.** 2011. Consistent detection of bovine papillomavirus in lesions, intact skin and peripheral blood mononuclear cells of horses affected by hoof canker. Equine Veterinary Journal, 43 (2): 202- 209.

**Brown A, Kumar S, Tchounwou PB.** 2019. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. J Cancer Sci Ther, 11 (4): 101- 106.

**Budras KD, König HE.** 2005a. Huf (Ungula) des Pferdes. In: König HE, Liebich HG, Hrsg. Anatomie der Haussäugetiere Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Dritte Auflage. Stuttgart: Schattauer GmbH.

**Budras KD, Mülling C, Reese S.** 2005b. Zehenendorgan (Organum digitale). In: König HE, Liebich HG, Hrsg. Anatomie der Haussäugetiere Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Dritte Auflage. Stuttgart: Schattauer GmbH.

**Burd EM.** 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clinical Microbiology Reviews, 16 (1): 1- 17. DOI: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003.

**Burd EM, Dean CL.** 2016. Human papillomavirus. Microbiology Spectrum, 4 (4): 1- 17. DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0001-2015.

**Butler KD Jr, Hintz HF.** 1977. Effect of level of feed intake and gelatin supplementation on growth and quality of hoofs of ponies. *Journal of animal science*, 44 (2): 257- 261.

**Campo MS, Jarrett WF, Barron R, O'Neil BW, Smith KT.** 1992 Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Research*, 52: 6898- 6904

**Campo M.S.** 2006. Introduction. In: *Papillomavirus Research from Natural History to Vaccines and Beyond*, Ed: M.S. Campo, Caister Academic Press, Norfolk.

**Campo MS, Roden RBS.** 2010. MINIREVIEW Papillomavirus Prophylactic Vaccines: Established Successes, New Approaches. *Journal of Virology*, 84 (3): 1214- 1220. DOI: 10.1128/JVI.01927-09.

**Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SWJ, Love S, Campo MS, Nasir L.** 2003. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J Gen Virol*, 84 (5): 1055-1062. DOI: 10.1099/vir.0.18947-0.

**Coenen M, Spizlei S.** 1996. Zur Zusammensetzung des Hufhorns in Abhängigkeit von Alter, Rasse und Hufhornqualität. *Pferdeheilkunde*, 12 (3): 279- 283.

**De Villiers E, Fauquet C, Broker TR, Bernard H, Zur Hausen H.** 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17- 27.

**Dietz O.** 2005. Hufkrebs. In: Dietz O, Huskamp B. Hrsg. *Handbuch Pferdepraxis*. Dritte Auflage. Stuttgart: Enke- Verlag, 980- 982.

**Doerfler W.** 1996. *Viren Krankheitserreger und Trojanisches Pferd*. Erste Auflage. Berlin Heidelberg: Springer- Verlag.

**Drazek M, Lew M, Lew S, Szarek J, Balicki I, Della Salda L.** 2015. Equine ocular squamous cell carcinoma: a case report. *Veterinari Medicina*, 60 (7): 379- 386. DOI: 10.17221/8386-VETMED.

**Fürst AE, Lischer CJ.** 2012. Foot. In: Auer JA, Stick JA, Hrsg. *Equine Surgery*. Fourth Edition. St. Louis: Saunders Elsevier.

**Geyer H.** 2008. Äußere Haut, Integumentum commune. In: Salomon FV, Geyer H, Gille U, Hrsg. *Anatomie für die Tiermedizin*. Zweite Auflage. Stuttgart: Enke Verlag.

**Ghim S, Rector A, Delius H, Sundberg JP, Jenson AB, Van Ranst M.** 2004. Equine papillomavirus typ 1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV-1 L1 major capsid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324: 1108-1115.

**Hainisch E, Brandt S.** 2014. Das Sarkoid als häufigster Hauttumor bei Pferden und Pferdeartigen. *Enke Verlag Pferdespiegel*, 2: 75-83

**Hatama S, Ishihara R, Ueda Y, Kanno T, Uchida I.** 2011. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Archives of Virology*, 156 (7): 1281-1285. DOI: 10.1007/s00705-011-09707.

**Hatama S, Nobumoto K, Kanno T.** 2008. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology*, 89: 158- 163. DOI 10.1099/vir.0.83334-0.

**Josseck H, Zenker W, Geyer H.** 1995. Hoof horn abnormalities in Lipizzaner horses and the effect of dietary biotin on macroscopic aspects of hoof horn quality. *Equine vet. J*, 27 (3): 175-182.

**Krawczyk E, Supryniewicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R.** 2008. Koilocytosis- A Cooperative Interaction between the Human Papillomavirus E5 and E6 Oncoproteins. *The American Journal of Pathology*, 173 (3): 682- 688. DOI: 10.2353/ajpath.2008.080280.

**Knight CG, Dunowska M, Munday JS, Peters-Kennedy J, Rosa BV.** 2013. Comparison of the levels of *Equus caballus* papillomavirus type 2 (EcPV-2) DNA in equine squamous cell carcinomas and non-cancerous tissues using quantitative PCR. *Veterinary Microbiology*, 166: 257- 262.

**Koss, LG, Durfee GR.** 1956. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 63 (6): 1245- 1261. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1956.tb32134.x.

**Lange CE, Tobler K, Ackermann M, Favrota C.** 2011. Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. *Veterinary Microbiology*, 149: 85- 90. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.019.

**Lange CE, Vetsch E, Ackermann M, Favrot C, Tobler K.** 2013. Four novel papillomavirus sequences support a broad diversity among equine papillomaviruses. *Journal of general virology*, 94 (6): 1365- 1372.

**Li C-X, Chang W-S, Mitsakos K, Rodger J, Holmes EC, Hudson BJ.** 2019. Identification of a Novel Equine Papillomavirus in Semen from a Thoroughbred Stallion with a Penile Lesion. *Viruses*, 11 (8): 713. DOI: 10.3390/v11080713.

**Linder KE, Bizikova P, Luff J, Zhou D, Yuan H, Breuhaus B, Nelson E, Mackay R.** 2018. Generalized papillomatosis in three horses associated with a novel equine papillomavirus (EcPV8). *Veterinary Dermatology* 29: 72- e30. DOI: 10.1111/vde.12481.

**Martin R,** 1996. *Elektrophorese von Nucleinsäuren*. Erste Auflage. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

**Minami S, Okamoto Y, Umemura T, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Matsuhashi A.** 1991. A Case of Canker in a Draft Horse. *Japanese Journal of Equine Science*, 2: 65- 70. DOI: 10.1294/jes1990.2.65.

**Mishra PN, Bose VSC, Rao AT, Panda SK.** 1998. Cryotherapy for canker in a horse. *Veterinary Record*, 142: 284.

**Mollenhauer M, Assmann G, Zengel P, Guntinas-Lichius O, Ihrler S.** 2014. HPV-assozierte oropharyngeale Karzinome- Aktueller Stand und Verhältnis zum Karzinom unbekannter Herkunft. *Pathologie*, 35: 127- 142. DOI 10.1007/s00292-013-1852-4.

**Nagamine CM, Castro F, Buchanan B, Schumacher J, Craig LE.** 2005. Proliferative pododermatitis (canker) with intralesional spirochetes in three horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17: 269- 271.

**Nasir L, Campo MS.** 2008. Bovine papillomaviruses: Their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary Dermatology*, 19: 243- 254.

**Nasir L, Brandt S.** 2013. Papillomavirus associated diseases of the horse. *Veterinary microbiology*, 167: 159- 167.

**Nasir L, Reid SWJ.** 1999. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Res*, 61: 171- 175.

- Nickel R, Schummer A, Seiferle E.** 2004. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 4 Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Vierte Auflage. Stuttgart: Parey Verlag.
- O'Grady SE, Madison JB.** 2004. How to treat equine canker. Proceedings of the American Association of Equine Practitioners, 50: 202- 205.
- Oosterlinck M, Deneut K, Dumoulin M, Gasthuys F, Pille F.** 2011. Retrospective study on 30 horses with chronic proliferative pododermatitis (canker). Equine Veterinary Education, 23 (9): 466- 471. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2010.00213.x.
- Patan B.** 2001. Saisonaler Einfluß auf Hornbildungsrate, Hornabrieb und Hornqualität in der Hufwand von Przewalskipferden (*Equus ferus przewalskii*) [Dissertation]. Berlin: Freie Universität Berlin
- Petersen I, Klein F.** 2008. HPV bei nichtgynäkologischen Tumoren. Pathologie, 29: 118- 122. DOI: 10.1007/s00292-008-1051-x.
- Pollitt C.** 1999. Farbatlas Huf- Anatomie und Klinik. Hannover: Schlütersche GmbH & Co. KG.
- Porstmann T,** Hrsg. 1996. Virusdiagnostik. Erste Auflage. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R.** 2012. Biochemie. Dritte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Redding WR, O'Grady SE.** 2012. Nonseptic Diseases Associated with the Hoof Complex- Keratoma, White Line Disease, Canker and Neoplasia. Vet. Clin. Equine, 28: 407- 421.
- Reeves MJ, Yovich JV, Turner AS.** 1989. Miscancellous Conditions of the Equine Foot. Veterinary Clinics of North America Equine Practice, 5 (1): 221- 237.
- Rigert S, Geyer H, Kummer M.** 2009. Die chirurgische Behandlung von Strahlkrebs an allen vier Gliedmassen bei einem Warmblutwallach. Schweizer Archive für Tierheilkunde, 151 (4): 171- 176. DOI: 10.1024/0036-7281.151.4.171.
- Salomon FV.** 2008. Nervensystem, Systema nervosum. In: Salomon FV, Geyer H, Gille U, Hrsg. Anatomie für die Tiermedizin. Zweite Auflage. Stuttgart: Enke Verlag.

- Scase T, Brandt S, Kainzbauer C, Sykora S, Bijmolt S, Hughes K, Sharpe S, Foote A.** 2010. Equus caballus papillomavirus-2 (EcPV-2): An infectious cause for equine genital cancer?. *Equine Veterinary Journal*, 42 (8): 738- 745.
- Scholzen T, Gerdes J.** 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182 (3): 311- 322.
- Sellon DC, Long MT.** 2014. *Equine Infectious Diseases. Zweite Auflage.* Missouri: Saunders Elsevier.
- Sherman K, Ginn PE, Brown M.** 1996. Recurrent Canker in a Shire Mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 16 (8): 322- 323.
- Sieber P, Platzer M, Schuster S.** 2018. The Definition of Open Reading Frame Revisited. *Trends in Genetics*, 34 (3): 167- 170.
- Stewart AA, Rush B, Davis E.** 2006. The efficacy of intratumoural 5-fluorouracil for the treatment of equine sarcoids. *Australian Veterinary Journal*, 84 (3): 101- 106.
- Strzalka W, Ziemienowicz A.** 2011. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*, 107: 1127-1140.  
DOI: 10.1093/aob/mcq243.
- Sykora S, Brandt S.** 2015. Occurrence of *Treponema* DNA in equine hoof canker and normal hoof tissue. *Equine Veterinary Journal*, 47: 627- 630. DOI: 10.1111/evj.12327.
- Sykora S, Jindra C, Hofer M, Steinborn R, Brandt S.** 2017. Equine Papillomavirus Type 2: An Equine Equivalent to Human Papillomavirus 16?. *Vet J*, 225: 3-8.  
DOI: 10.1016/j.tvjl.2017.04.014.
- Sykora S, Samek L, Schönthaler K, Palm F, Borzacchiello G, Aurich C, Brandt S.** 2012. EcPV-2 is transcriptionally active in equine SCC but only rarely detectable in swabs and semen from healthy horses. *Veterinary Microbiology*, 158 (1-2): 194- 198.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.006>.
- Tamzali Y, Borde L, Rols MP, Golzio M, Lyazrhi F, Teissie J.** 2012. Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study. *Equine Veterinary Journal*, 44: 214-220.

**Théon AP, Pascoe JR, Carlson GP, Krag DN.** 1993. Intratumoral chemotherapy with cisplatin in oily emulsion in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 202 (2): 261-267.

**Tobler K, Ackermann M, Fraefel C.** 2016. *Allgemeine Virologie*. Erste Auflage. Bern: Haupt Verlag.

**Torres SM, Koch SN.** 2013. Papillomavirus-associated diseases. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 29 (3): 643- 655. DOI: 10.1016/j.cveq.2013.08.003.

**Wiley Information Services GmbH.**

[www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr\\_einfuehrung/einfuehrung.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr\\_einfuehrung/annealing.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/einfuehrung.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/annealing.vscml.html), Zugriff am 27.2.2020 um 12:49.

**Wintzer HJ.** 1986. Der Einfluß einer Vitamin-H-Substitution auf Wachstum und Beschaffenheit des Hufhorns. *Tierärztliche Praxis*, 14: 495- 500.

**Zakia LS, Herman M, Basso RM, Hernandez JM, Araujo Jr JP, Borges AS, Oliveira-Filho JP.** 2019. Equine papillomavirus detection in aural plaques by qPCR. *Braz J Vet Pathol*, 12 (1): 1- 4. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v12i1p1-4.

**Zakia LS, Olivo G, Basso RM, Mira J, Herman M, Araujo Jr JP, Borges AS, Oliveira-Filho JP.** 2016. Imiquimod treatment for *Equus caballus* papillomavirus infection in equine aural plaques. *Veterinary Dermatology* 27: 175- e44.

**Zeeck A., Grond S., Papastavrou I., Zeeck S. C.** 2014. *Chemie für Mediziner*. 8. Auflage. München: Elsevier GmbH.

**Zhu W, Dong J, Shimizu E, Hatama S, Kadota K, Goto Y, Haga T.** 2012. Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Archives of Virology*, 157: 85- 91.

### 13. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung des Hufes.....	2
Abbildung 2: schematische Darstellung der Hufsegmente .....	7
Abbildung 3: schematische Darstellung des Aufbaus eines Papillomvirion..	19
Abbildung 4: schematische, lineare Darstellung des Genoms der equinen Papillomviren Typ 1, Typ 2, Typ 3, deren offenen Leserahmen (ORFs) und der non-coding regions (NCRs).....	19
Abbildung 5: schematische Darstellung des Genoms eines bovinen Papillomvirus, dessen offenen Leserahmen (ORFs) und der upstream regulatory region (URR).....	20
Abbildung 6: Beispiel einer $\beta$ -actin PCR .....	40
Abbildung 7: Beispiel zweier EcPV1- E1 PCR .....	42
Abbildung 8: Beispiel einer EcPV2- E1 PCR .....	43
Abbildung 9: Beispiel einer EcPV3- E6 PCR.....	44
Abbildung 10: Beispiel einer EcPV4- E6 PCR .....	44
Abbildung 11: Beispiel einer EcPV5- E6 PCR .....	45
Abbildung 12: Beispiel einer EcPV6- E6 PCR .....	46
Abbildung 13: Beispiel einer EcPV7-E6 PCR .....	47
Abbildung 14: Beispiel einer EcPV8- PCR .....	48

## 14. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ausgewählte Papillomviren mit veterinärmedizinischer Relevanz ....	21
Tabelle 2: Probenübersicht inklusive Patientendaten .....	31f.
Tabelle 3: Probenübersicht der Negativkontrollen .....	32
Tabelle 4: Mastermix für die $\beta$ -actin- PCRs .....	34
Tabelle 5: Temperaturprogramm für die $\beta$ -actin- PCRs .....	34
Tabelle 6: alle für die PCRs verwendeten Primer.....	35f.
Tabelle 7: Mastermix für die EcPV- PCRs .....	37
Tabelle 8: Temperaturprogramm für die EcPV- PCRs .....	37f.
Tabelle 9: Ergebnisse der DNS- Konzentrationsmessungen mittels Nanophotometrie .....	41f.
Tabelle 10: Übersicht aller PCR- Ergebnisse .....	48f.