

HISTOPATHOLOGISCHE UND IMMUNHISTOLOGISCHE SOWIE ZYTOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOGENESE UND THERAPIE EQUINER SARKOIDE

INGA VON FELBERT



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



schönheit verbindet
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
und

dem Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für Infektionsmedizin, Greifswald – Insel Riems

Betreuer: Prof. Dr. Jens Peter Teifke

**Histopathologische und immunhistologische
sowie zytologische und molekularbiologische Untersuchungen
zur Pathogenese und Therapie equiner Sarkoide**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

eingereicht von

Inga Gabriele Christa von Felbert

Tierärztin aus Bonn

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Jens Peter Teifke

Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

Tag der Disputation: 06.02.2009

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

von Felbert, I., W. Dreschel und J. P. Teifke, 2005. Regression eines infraorbitalen equinen Sarkoids nach Behandlung mit einem Präparat aus *Sanguinaria canadensis* - Ein Fallbericht, *Prakt. Tierarzt* 86: 330-334.

von Felbert I., T. Vahlenkamp, A. Karger, J. P. Teifke, 23. April 2006.
Immunhistologische und molekulare Untersuchungen zur Expression des Tumorsuppressorproteins PTEN in equinen Sarkoiden, 49. Tagung der Fachgruppe Pathologie der DVG, Berlin.

von Felbert I., C. Maresch, W. Herbst, H. Müller, J. P. Teifke, 08.-09. März 2008.
Durch BPV-1 induzierte Fibrosarkome beim Hamster – ein Tiermodell für das equine Sarkoid? 51. Tagung der Fachgruppe Pathologie der DVG, Fulda.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Das equine Sarkoid	2
2.1.1 Makroskopisches Erscheinungsbild	2
2.1.2 Histopathologie	3
2.2 Ätiologie.....	5
2.2.1 Physikalische Noxen	5
2.2.2 Genetische Faktoren.....	5
2.2.3 Virusinfektionen	5
2.3 Papillomviren	7
2.3.1 Das bovine Papillomvirus Typ 1.....	9
2.4 Pathogenese des equinen Sarkoids.....	11
2.5 Therapie des equinen Sarkoids.....	13
2.5.1 Chirurgische Therapiemethoden	13
2.5.2 Immunmodulation.....	14
2.5.3 Strahlentherapie	16
2.5.4 Chemotherapie	16
2.5.5 Hyperthermiebehandlung.....	18
2.5.6 Homöopathie.....	18
2.5.7 Phytotherapie	18
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Material	21
3.1.1 Untersuchungsmaterial.....	21
3.1.2 Seren und Antiseren.....	21
3.1.3 Zelllinien	22
3.1.4 Bakterienstamm	22
3.1.5 Enzyme	22
3.1.6 Chemikalien, Arzneimittel und Kits	23
3.1.7 Geräte.....	24

3.1.8	Verbrauchsmaterial	24
3.1.9	Versuchstiere.....	25
3.1.10	Stammlösungen und Puffer	25
3.1.10.1	Histologie.....	25
3.1.10.2	Zellkultur	28
3.1.10.3	PCR.....	29
3.1.10.4	Sequenzierung	30
3.1.10.5	Southern Blot.....	30
3.1.10.6	Western Blot.....	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Histopathologische Untersuchung.....	32
3.2.1.1	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	32
3.2.1.2	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	33
3.2.2	Immunhistologische und immunzytologische Untersuchungen.....	33
3.2.3	In-situ-Hybridisierung (ISH).....	35
3.2.4	Untersuchungen an primären Zelllinien	37
3.2.4.1	Anlegen primärer Zelllinien.....	37
3.2.4.2	Kultivierung von Zellen.....	37
3.2.4.3	Kryokonservierung von Zellen	38
3.2.4.4	Karyogramm zur Bestimmung des Chromosomensatzes	38
3.2.4.5	Giemsa-Färbung	39
3.2.4.6	Auswertung der Metaphasechromosomen.....	39
3.2.5	Molekularbiologische Techniken.....	39
3.2.5.1	Vorbereitung des Untersuchungsmaterials für PCR und RT-PCR	39
3.2.5.2	Oligonukleotide (Primer) für die PCR.....	40
3.2.5.3	DNA-Amplifikation.....	41
3.2.5.4	RT-PCR	43
3.2.5.5	DNA-Sequenzierung.....	43
3.2.5.6	Southern Blot.....	45
3.2.5.7	Western Blot.....	48
3.2.6	Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität.....	50
3.2.7	CFSE-Proliferationsassay.....	51
3.2.8	Hamstermodell	52
4	Ergebnisse	54
4.1	Histopathologische Klassifikation der equinen Sarkoide.....	54
4.2	Immunhistologische Charakterisierung der equinen Sarkoide.....	54

4.3	Nachweis von BPV in equinen Sarkoiden.....	55
4.3.1	PCR.....	55
4.3.2	Sequenzierung.....	55
4.3.3	In-situ-Hybridisierung (ISH).....	56
4.3.4	Immunhistologie	56
4.4	Zellproliferation und Zellzyklussteuerung in equinen Sarkoiden.....	58
4.5	Etablierung von primären Zelllinien	61
4.5.1	Nachweis von BPV in primären Zelllinien	62
4.5.2	Zytopenetische Charakterisierung primärer Zelllinien.....	64
4.5.3	Immunzytologische Charakterisierung primärer Zelllinien	67
4.5.4	Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität	68
4.5.4.1	Aktiver Immunmodulator (AIM) 1.....	68
4.5.4.2	Aktiver Immunmodulator (AIM) 2.....	70
4.5.4.3	Aktiver Immunmodulator (AIM) 3.....	71
4.5.4.4	Aktiver Immunmodulator (AIM) 4.....	73
4.5.4.5	Aktiver Immunmodulator (AIM) 5.....	74
4.5.4.6	Cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP).....	75
4.5.4.7	Immodin	77
4.5.4.8	Foscarnet-Natrium.....	78
4.5.4.9	Sanguinarin.....	80
4.5.5	CFSE-Proliferationsassay	81
4.5.5.1	Aktiver Immunmodulator (AIM) 2.....	81
4.5.5.2	Aktiver Immunmodulator (AIM) 3.....	81
4.5.5.3	Aktiver Immunmodulator (AIM) 5.....	81
4.5.5.4	Aktiver Immunmodulator (AIM) Kombination 3 + 5	81
4.5.5.5	Cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP).....	81
4.5.5.6	Immodin	81
4.6	Hamstermodell.....	85
4.6.1	Nachweis von BPV in Hamstertumoren	88
4.6.2	Immunhistologische Charakterisierung der Hamstertumoren.....	89
4.6.3	Wirksamkeitsstudie.....	90
4.6.3.1	XXTerra™	90
4.6.3.2	Cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP).....	92
4.6.3.3	Triapten®	94
4.6.3.4	Elasan®	94
4.7	Kasuistische Beschreibung von drei equinen Sarkoiden und deren Therapie mit XXTerra™	95

5	Diskussion	98
6	Zusammenfassung.....	116
7	Summary	118
8	Literaturverzeichnis.....	120
9	Anhang	133
9.1	BPV-1-Sequenz, aus dem equinen Sarkoid E 84/04.....	133
9.2	PTEN-cDNA-Sequenz, Pferd, aus dem equinen Sarkoid E 58/05	135
9.3	Abkürzungsverzeichnis	135
10	Danksagung.....	138

1 Einleitung

Equine Sarkoide sind lokal invasiv wachsende mesenchymale Hauttumoren der Equiden, die mit einer ausgeprägten epithelialen Hyperplasie einhergehen können (Jackson, 1936; Olson und Cook, 1951). Es gilt heute als gesichert, dass neben einer genetischen Disposition des Einzeltieres und einer mechanischen Vorschädigung der Haut vor allem eine Infektion mit den bovinen Papillomviren der Typen 1 und 2 die Tumorentstehung auslöst. Equine Sarkoide stellen mit 70-90 % den häufigsten Hauttumor dieser Spezies dar (Marti et al., 1993; Teifke, 1994). Sie besitzen eine ausgeprägte Rezidivierungsneigung (Jackson, 1936). Aufgrund dieser gibt es bislang trotz verschiedener Ansätze keine erfolversprechende Therapie für diesen Tumor.

Papillomviren sind in der Regel speziesspezifisch, so dass die natürliche Infektion von Equiden sowie die experimentelle Infektion von Hamstern mit bovinen Papillomviren eine Besonderheit darstellen. In diesen Fällen kommt es nicht zu einer produktiven Infektion mit Bildung von Viruspartikeln (Olson und Cook, 1951; Cheville, 1966; Robl und Olson, 1968; Ragland et al., 1969).

Weiterhin sind Papillomviren während ihrer Replikation abhängig von den verschiedenen Keratinisierungsstadien der Epithelzellen (zur Hausen, 1996; Stubenrauch und Laimins, 1999). Daher ist es bislang nicht ohne weiteres möglich, diese Viren mittels Zellkultur zu vermehren.

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels histopathologischer, immunhistologischer, zytologischer und molekularbiologischer Methoden den Fragen nachzugehen, ob sich das Wachstumsverhalten kultivierter BPV-infizierter equiner Sarkoidzellen von dem nicht infizierter Fibroblasten unterscheidet, ob in equinen Sarkoidzellen das komplette Genom von BPV enthalten ist, und ob durch BPV induzierte Hamstertumoren morphologisch dem equinen Sarkoid gleichzusetzen sind. Anhand von In-vitro- und In-vivo-Modellsystemen sollen verschiedene Testsubstanzen auf ihre antineoplastischen Eigenschaften überprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Das equine Sarkoid

Equine Sarkoide wurden erstmalig in Südafrika beschrieben (Jackson, 1936). Seither klassifiziert man auf diese Weise fibrosarkomähnliche, einzeln oder multipel auftretende Hauttumoren bei Pferden, die lokal invasiv wachsen, aber im Gegensatz zum Fibrosarkom nicht metastasieren (Jackson, 1936; Olson und Cook, 1951). Sarkoide machen in Deutschland ca. 30 % aller equinen Tumoren und 70 % aller Hauttumoren des Pferdes aus und stellen damit den häufigsten Hauttumor dieser Tierart dar (Teifke, 1994). Abweichend davon wird in der Schweiz der Anteil der equinen Sarkoide an den Hauttumoren mit 90 % beziffert (Marti et al., 1993). Die Prävalenz dieses Tumors in der gesamten Pferdepopulation liegt zwischen 0,4 % und 2 % (Dubath, 1986; Angelos et al., 1988; Marti et al., 1993). Equine Sarkoide sind auch bei Eseln (Reid et al., 1994), Maultieren (Jackson, 1936) und Zebras beschrieben worden (Löhr et al., 2005; Nel et al., 2006).

Equine Sarkoide treten häufig an schwach behaarten Lokalisationen dünner Haut auf, wie Augen, Ohren, Nüstern, Achseln, Gurtlage, Präputium, Euter und distalen Gliedmaßenenden bei Tieren jeglicher Farbe, Rasse sowie bei jedem Geschlecht und Alter. Das Risiko, ein Sarkoid zu entwickeln, wächst mit steigendem Alter und erreicht seinen Höhepunkt mit 15 Jahren (Mohammed et al., 1992). Diese statistische Untersuchung der Patienten des Cornell Veterinary Hospital weist weiterhin bei Quarter Horses auf einen beinahe zweifach erhöhten Prozentsatz (1,22 %) an Pferden mit Sarkoiden im Vergleich zu Vollblütern (0,7 %) hin. Hingegen entwickeln andere Warmblutrassen mit einem Anteil von 0,15 % deutlich seltener Sarkoide.

2.1.1 Makroskopisches Erscheinungsbild

Makroskopisch weisen Sarkoide erhebliche morphologische Variationen auf. Es werden ein verruköser Typ, ein fibroblastischer Typ und ein Mischtyp aus beiden unterschieden (Ragland et al., 1970). Verruköse Sarkoide zeigen ein warzenähnliches bis

blumenkohlartiges Wachstum mit einer ausgeprägten Hyperkeratose. Im Gegensatz dazu sind fibroblastische Sarkoide derbe fleischige, gut abgrenzbare bindegewebige Tumoren mit schwach hyperkeratotischem, häufig ulzeriertem Epithel. Sie überragen im Anfangsstadium die Haut nur wenig. Knottenbelt et al. (1995) ergänzten diese Einteilung durch drei weitere Typen. Sie unterscheiden das okkulte Sarkoid, das noduläre Sarkoid und das sogenannte malevolente Sarkoid. Der okkulte Typ beschreibt flache, häufig haarlose Sarkoide mit oder ohne Hyperkeratose. Noduläre Sarkoide sind solide subkutan oder intrakutan wachsende Tumoren. Bei der als malevolent bezeichneten Form brechen die equinen Sarkoide in die lokalen Lymphgefäße ein und verlegen diese. Dadurch kommt es im tributären Gebiet zu strangartigen Verdickungen, die makroskopisch einer Lymphangitis gleichen. Je nach Größe, Lokalisation und Typ können equine Sarkoide zu starken Beeinträchtigungen und Nutzungseinschränken und somit möglicherweise auch zu einer erheblichen Wertminderung des Pferdes führen. Equine Sarkoide sind differentialdiagnostisch von anderen Hautumoren, wie Papillomen, Fibromen oder Plattenepithelkarzinomen abzugrenzen. Daneben können eosinophile Granulome, Keloide, überschießendes Granulationsgewebe und Parasitosen, wie Habronematidose oder Onchozerkose, ein ähnliches makroskopisches Erscheinungsbild aufweisen und müssen deshalb histopathologisch abgegrenzt werden.

2.1.2 Histopathologie

Histopathologisch zeichnen sich Sarkoide durch eine starke dermale Proliferation von spindelförmig elongierten, mesenchymalen fibroblastenähnlichen Zellen aus, die sich in langen, fischzugähnlichen Strängen oder Wirbeln anordnen. Die Zellkerne sind häufig mäßig pleomorph, längsoval oder unregelmäßig geformt, groß und relativ euchromatinreich. Die Zellgrenzen sind undeutlich. Im Bereich des dermoepidermalen Überganges können sich die Tumorzellen staketenzaunähnlich senkrecht zur Basalmembran hin anordnen und das für equine Sarkoide als typisch erachtete „picket fence“ bilden (Ragland et al., 1970). Mitosen sind nur selten vorhanden. Die Epidermis, wenn nicht ulzeriert, stellt sich oft hyper- und parakeratotisch dar, mit charakteristischen Reteleisten, die bis tief in die mesenchymale Komponente des Tumors ziehen können (Abb. 1). In fibroblastischen oder nodulären Sarkoiden kann die Epidermis aber auch normal ausgebildet oder sogar druckatrophisch sein, vor allem

wenn sie nicht in direktem Kontakt zu den proliferierenden mesenchymalen Tumorzellen steht. Bei okkulten Sarkoiden ist nur die erhöhte Dichte der dermalen Fibroblasten zwischen den in der Anzahl reduzierten Haarbälgen und Schweißdrüsen auffällig. Die Tumorzellen zeigen meist nicht die für Sarkoide typische Anordnung in Wirbeln. Auch Reteleisten, „picket-fence“ oder eine Ulzeration der Epidermis können bei diesem Typ fehlen (Marti et al., 1993; Martens et al., 2000).

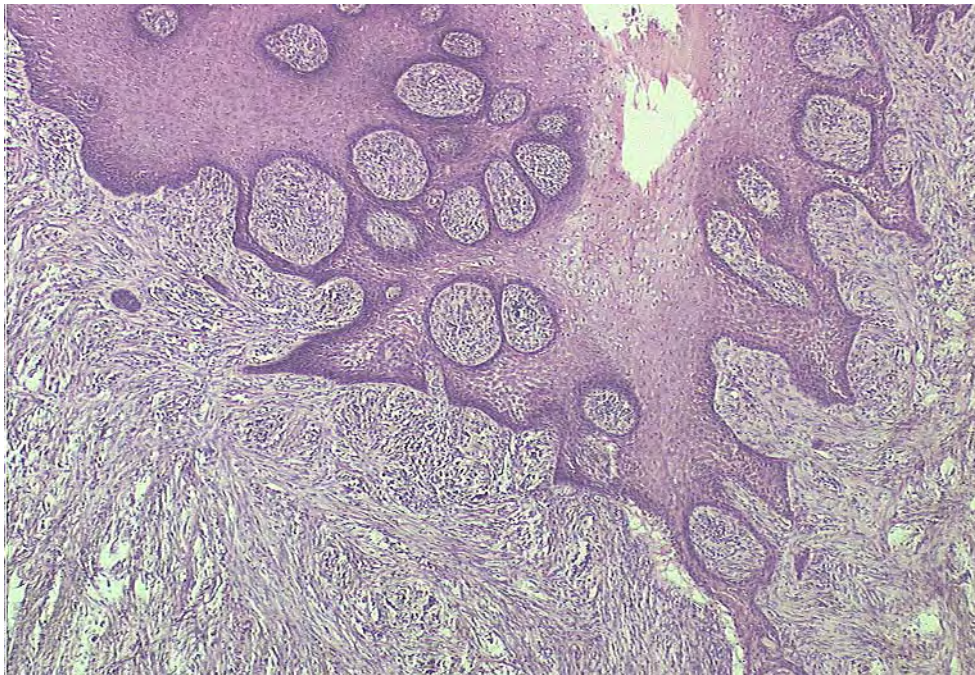


Abb. 1 Equines Sarkoid, Mischtyp, Pferd.

Mesenchymale Tumorzellen in kräftigen fischzugartigen Bündeln bei ausgeprägter unregelmäßiger epithelialer Hyperplasie mit zahlreichen Reteleisten und Hyperkeratose. HE, 25x.

Eine immunhistologische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 in den fibroblastoiden Tumorzellen weist auf eine nur geringgradige Proliferationsaktivität hin, die sich vor allem in den oberflächlichen Bereichen des Tumors in der Nähe des dermoepidermalen Überganges abspielt. Keratin 16, ein Marker für epidermale Hyperproliferation, lässt sich in den meisten Sarkoiden in der Epidermis nachweisen. Allerdings reagieren auch Sarkoide ohne epidermale Hyperplasie positiv mit für dieses Intermediärfilament spezifischen Antikörpern (Martens et al., 2000).

2.2 Ätiologie

2.2.1 Physikalische Noxen

Equine Sarkoide sind pathogenetisch als Resultat eines multifaktoriellen Prozesses zu verstehen.

Eine Schädigung der Haut durch vorangegangene Traumatisierung begünstigt die Entwicklung dieser Tumoren, so dass Sarkoide oft in Hautbereichen mit starker mechanischer Reizung wie Gurt- und Geschirrlage oder in der Nähe von Narbengewebe diagnostiziert werden können. Bei Wallachen stellt die Kastrationsnarbe eine Prädilektionsstelle dar, wodurch das gehäufte Auftreten bei kastrierten Pferden zu erklären ist (Mohammed et al., 1992).

2.2.2 Genetische Faktoren

Die Häufung von Sarkoiden bei Pferden bestimmter Rassen, wie Quarter Horses oder englischen Vollblütern, lässt eine genetische Disposition vermuten. Verschiedene Untersuchungen beweisen sowohl bei Vollblütern als auch bei schwedischen Warm- und Halbblütern eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorkommen einzelner MHC Haplotypen (MHC-II Haplotyp W3, MHC-I Haplotyp B1, MHC-II Haplotyp W13) und dem Risiko, ein equines Sarkoid zu entwickeln (Meredith et al., 1986; Broström et al., 1988; Gerber, 1989). Weiterführende Studien weisen eine gesteigerte Neigung zu Rezidiven nach chirurgischer Exstirpation bei Pferden mit MHC-II Haplotyp W13 nach. Bei Pferden mit MHC-I Haplotyp A5 wird vermehrt ein frühes Auftreten beobachtet (Broström, 1995).

2.2.3 Virusinfektionen

Bereits bei der Erstbeschreibung vermutet Jackson (1936) aufgrund des Erscheinungsbildes und des Auftretens in Verbindung mit Kontakt zur Reitausrüstung einen durch Viren übertragbaren Tumor. Die histologische Ähnlichkeit von equinen Sarkoiden mit Fibropapillomen des Rindes deutet auf bovine Papillomviren (BPV) als mögliche Ursache hin, so dass verschiedene Arbeitsgruppen einen möglichen Zusammenhang untersuchen. In den 50er-Jahren des vergangenen Jahrhunderts werden

Pferde erstmals experimentell intradermal mit BPV inokuliert und auf diese Weise proliferative Läsionen hervorgerufen, die histopathologisch mit natürlich auftretenden Sarkoiden vergleichbar sind. Allerdings zeigen diese experimentell induzierten Tumoren im Gegensatz zu den natürlichen Sarkoiden Spontanregression nach spätestens einem Jahr. Durch subkutane Transplantation von Sarkoidgewebe und dem durch Zentrifugation gewonnenen zellfreien Überstand lassen sich ebenfalls equine Sarkoide induzieren (Olson und Cook, 1951; Ragland et al., 1969). Mit Hilfe der Southern-Blot-Methode gelingt der Nachweis des episomalen BPV-Genoms (Amtmann et al., 1980). In nahezu 100 % der equinen Sarkoide lässt sich mittels PCR die DNA von bovinen Papillomviren nachweisen. Diese kann mittels In-situ-Hybridisierung in den Zellkernen der fibroblastoiden Tumorzellen, vor allem am dermoepidermalen Übergang, im Gegensatz zum Fibropapillom des Rindes aber niemals in den epithelialen Zellen, visualisiert werden (Teifke, 1994). Ein immunhistologischer Nachweis von papillomaviralem Antigen oder von Virionen ist nicht möglich (Pfister, 1984).

In den von equinen Sarkoiden abgeleiteten Zelllinien MC-1 und T-77-4, die aus einem immunsupprimierten Araberfohlen nach Inokulation mit MC-1 Zellen erhalten wurde, lassen sich retrovirale Strukturen und eine Reverse-Transkriptase-Aktivität nachweisen (England et al., 1973; Fatemi-Nainie et al., 1982, 1984; Cheevers et al., 1982). Das nachgewiesene Virus erweist sich in weiteren Studien jedoch als replikationsdefizient und nicht onkogen. Aufgrund von Homologien des in MC-1 gefundenen Virusgenoms mit normaler DNA von Pferden verschiedener Rassen, ist anzunehmen, dass es sich bei dem beschriebenen Virus um ein endogenes Retrovirus handelt. Die zuvor nachgewiesenen onkogenen Eigenschaften des Virus lassen sich auf im Inokulat noch enthaltene transformierte MC-1-Zellen zurückführen. Es wird daher nicht davon ausgegangen, dass das Retrovirus Einfluss auf die Entstehung equiner Sarkoide hat (Cheevers et al., 1986).

In anderen Zelllinien, die aus equinem Sarkoidgewebe stammen, lässt sich BPV-DNA nachweisen (Nixon et al., 2005; Yuan et al., 2008).

Von equinen Sarkoiden sind equine Papillome zu unterscheiden, die vor allem bei ein bis drei Jahre alten Pferden auftreten. Hier lassen sich in den Zellkernen der epithelialen Zellen mittels Immunhistologie gruppenspezifische papillomavirale Strukturproteine nachweisen (Hamada et al., 1990). Auch elektronenmikroskopisch lassen sich die 55 bis

60 nm großen Papillomviren nachweisen. Fairley und Haines (1992) belegen immunhistologisch und elektronenmikroskopisch die Beteiligung von Papillomviren an aurikulären Plaques des Pferdes. Mittels PCR lässt sich spezifisch equine papillomvirale DNA in 20 von 38 equinen Papillomen und in einem von zehn Sarkoiden amplifizieren, wohingegen insgesamt neun aurikuläre Plaques negativ reagieren (Postey et al., 2007).

2.3 Papillomviren

Papillomviren gehören zur Familie der *Papillomaviridae*. Es sind mit 55 bis 60 nm kleine unbehüllte Viren mit ikosaedrischer Symmetrie, die aufgrund ihres Epitheliotropismus in der Lage sind, benigne Tumoren der Epidermis und der Schleimhaut in verschiedenen Tierarten und auch beim Menschen hervorzurufen (Abb. 2).

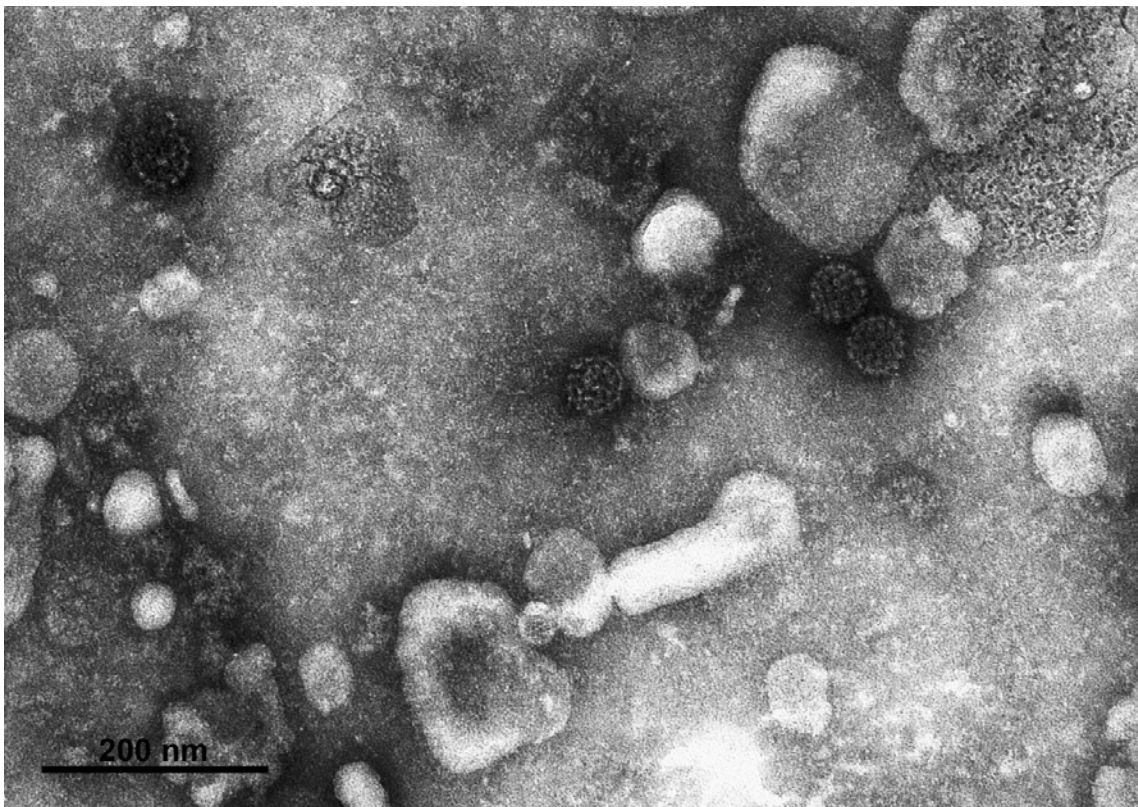


Abb. 2 **Ultrastrukturelle Darstellung von bovinen Papillomviren Typ 1 aus einem Rinderpapillom.** (Präparation: Dr. W. Herbst). Diese Virussuspension diente zur experimentellen Infektion von Hamstern, wie im Kapitel 3.2.8 beschrieben. Negativkontrast, pH 6,0, Phosphorwolframsäure. Bar = 200 nm (Aufnahme: Dr. habil. H. Granzow).

In der Regel bilden sich diese Tumoren zurück, ohne zu schweren Beeinträchtigungen des Patienten zu führen. Jedoch kann es vor allem bei humanen Papillomviren (HPV) zu einer Erregerpersistenz und in der Folge zu einer malignen Entartung kommen, wie das Beispiel des Zervixkarzinoms des Menschen zeigt. Es können Hochrisikopapillomviren, wie die HPV-Typen 16, 18 oder 31 in Zervixbiopsien und in Zelllinien, die von Zervixkarzinomen stammen, unterschieden werden (Boshart et al., 1984; Hoepfner und Löning, 1986, Bosch und Munoz, 2002). Auch Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus kann eine Infektion mit verschiedenen HPV vorausgehen (Syrjänen, 2002).

Alle Papillomviren besitzen einen einheitlichen Genomaufbau. Es handelt sich dabei um ein ca. 8 Kilobasenpaare (kbp) großes doppelsträngiges zirkuläres DNA-Molekül. Das Genom gliedert sich in drei Abschnitte, die E-Region („early-region“), in der die frühen Proteine E1-E8 kodiert sind, die L-Region („late-region“), die für die Strukturproteine L1 und L2 kodiert sowie eine „noncoding region“ (NCR) oder auch „long control region“ (LCR), die Promotoren sowie die Bindungsstellen für einzelne Proteine enthält und für Replikation und Transkription des Genomes notwendig ist. Die offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF) sind überlappend auf einem DNA-Strang angeordnet. Der Replikationszyklus der Papillomviren ist eng mit der Differenzierung der Epithelzellen verbunden. Das Virus infiziert in der Regel die Basalzellen und persistiert episomal in der Zelle. In den suprabasalen Schichten des Epithels exprimiert es seine frühen Gene und repliziert seine DNA im Stratum spinosum und Stratum granulosum. Die Expression der Strukturproteine und die Zusammensetzung der Viren finden im Stratum corneum statt. Die Virionen werden mit den abschilfernden Hornzellen freigesetzt. Es ist daher nicht ohne weiteres möglich, Papillomviren auf Zellen anzuzüchten (zur Hausen, 1996; Stubenrauch und Laimins, 1999). Ein weiteres Charakteristikum der Papillomviren ist ihre strikte Speziespezifität. Papillomviren infizieren natürlicherweise und ebenso unter experimentellen Bedingungen nur ihren eigentlichen Wirt, so dass bislang keine Tiermodelle für die Pathogeneseforschung humaner Papillomviren etabliert sind. Die einzige bekannte speziesübergreifende Ausnahme sind BPV-1 und 2, die natürlicherweise Pferde sowie experimentell Hamster (Cheville, 1966; Robl und Olson, 1968) infizieren können. Zurzeit sind 19 verschiedene bovine Papillomviren bekannt (Ogawa et al., 2004). Die sechs häufigsten werden in drei Gruppen unterteilt (de Villiers et al., 2004). BPV-1 und 2 verursachen Fibropapillome

des Rindes (Müller, 1991). Sie werden deshalb auch als Fibropapillomviren bezeichnet und in der Gruppe der Delta-Papillomviren zusammengefasst. Die epitheliotropen BPV-3, -4 und -6 werden in die Klasse der Xi-Papillomviren eingruppiert. BPV-5 ist in der Lage, sowohl Fibropapillome als auch die rein epithelialen Papillome hervorzurufen (Bloch et al., 1994). Daher wird es als bislang einziger Vertreter der 3. Klasse, den Epsilon-Papillomviren zugewiesen (de Villiers et al., 2004).

2.3.1 Das bovine Papillomvirus Typ 1

BPV-1 besitzt wie alle Papillomviren ein unbehülltes ikosaedrisches Kapsid mit 55-60 nm Durchmesser. Das Genom ist 7945 bp groß.

Die frühen Genprodukte E5, E6 und E7 stellen die Onkoproteine des BPV-1 dar. Das aus 44 Aminosäuren (AS) bestehende **E5** ist das kleinste virale Onkoprotein (Schlegel et al., 1986). Es ist in der Lage, alleine immortalisierte murine Zellen oder humane Fibroblasten zu transformieren (Yang et al., 1985; Schlegel et al., 1986; Bergman et al., 1988; Goldstein et al., 1994). Das E5 ist ein Transmembranprotein, das sich am Golgiapparat und am endoplasmatischen Retikulum nachweisen lässt (Burkhardt et al., 1989). Es besteht aus einem aminoterminalen hydrophoben Abschnitt und einem karboxyterminalen hydrophilen Ende, welches in das Lumen des Golgiapparates hineinragt (Schlegel et al., 1986; Burkhardt et al., 1987, 1989; Horwitz et al., 1988). In transformierten Zellen liegt es als Mono-, Di- und Tetramer vor, wobei Dimere überwiegen (Burkhardt et al., 1987; Horwitz et al., 1988; Sparkowski et al., 1996; Adduci und Schlegel, 1999). Cysteine an Position 37 und 39 stabilisieren die Oligomere, Mutationen in diesen Positionen verhindern die Oligomerbildung. Diese Mutanten sind dann nicht mehr in der Lage, Zellen zu transformieren (Horwitz et al., 1988). Die Transformation wird vor allem durch eine Interaktion des E5 mit dem Platelet-Derived-Growth-Factor- β -Rezeptor (PDGF-Rezeptor) hervorgerufen (Petti und DiMaio, 1992; DiMaio und Mattoon, 2001). Nach einer Rezeptorbindung kommt es zu einer Phosphorylierung und Aktivierung. Über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) wird Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP3) phosphoryliert. Es folgt mittels phosphoinositidabhängiger Kinase (PDK-1) eine Phosphorylierung von AKT. Das gebildete PhosphoAKT (pAKT) kann verschiedene Stoffwechselprozesse in der Zelle aktivieren, die bei Zellproliferation oder Neovaskularisierung von Gewebe eine Rolle

spielen (Bellacosa et al., 2005). Durch eine verminderte MHC-1-Expression, die auf eine Interaktion mit E5 zurückzuführen ist, ist es den transformierten Zellen möglich, sich der Immunantwort zu entziehen. Diese Herabregelung von MHC-1 wird auch in bovinen Papillomen beobachtet (Ashrafi et al., 2002; Marchetti et al., 2002; Araibi et al., 2004).

Das **E6** von BPV-1 ist ein 137 AS-großes Protein mit zwei Zinkfingerstrukturen (Cole und Danos, 1987; Rapp und Chen, 1998). E6 kann alleine Mauszellen transformieren. Es interagiert ähnlich wie E6 von HPV mit verschiedenen zellulären Proteinen. Anders als HPV E6 führt BPV-1 E6 nicht zu einer direkten Inhibierung des Tumorsuppressorproteins p53. Über eine Bindung an den Transkriptionskoaktivator CBP/p300 ist BPV-1 E6 aber dennoch in der Lage, indirekt eine Expression von p53 zu verhindern (Zimmermann et al., 1999; 2000). Trotzdem lässt sich eine Expression von p53 mittels Immunhistologie und Western Blot in kultivierten Sarkoidzellen zeigen. Jedoch können nach Aktivierung durch zehnminütige UV-Bestrahlungen keine mRNA-Transkripte des Protoonkogenes mdm2 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu kommt es in equinen Nierenzellen nach UV-Bestrahlung zu einer Aktivierung von mdm2 durch p53 (Nixon et al., 2005). Die auf diese Weise nach BPV-Infektion belegte Inaktivierung von p53 ist möglicherweise auf eine Bindung an E6 zurückzuführen. Weiterhin bindet E6 an das fokale Adhäsionsprotein Paxillin und verhindert seine Interaktion mit verschiedenen anderen fokalen Adhäsionsproteinen. Die Unterdrückung dieser fokalen Adhäsionsproteine ist für „*anchorage-independent growth*“ verantwortlich. Daraus ergibt sich ein für Tumorzellen typisches Wachstumsmuster, bei dem sich kein geordneter Monolayer ausbildet und es zum ungeordneten Übereinanderwachsen der Zellen kommt. Zusätzlich wird das Aktinnetzwerk der infizierten Zellen unterbrochen (Tong und Howley, 1997). Die Zelle benötigt das Aktinfasernetzwerk für Motilität, Teilung und zur Ausbildung von Zell-zu-Zell-Kontakten (Ridley, 1995). Es ist anzunehmen, dass die Unterdrückung von Paxillin die Transformation der Tumorzellen erleichtern kann.

BPV-1 **E7** ist ohne Beteiligung von E5 und E6 nicht in der Lage, Zellen zu transformieren. Allerdings verstärkt es die Transformationseigenschaften von E5 und E6 um das Vier- bis Zehnfache (Bohl et al., 2001). Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt, jedoch scheint eine Interaktion mit p600, einem 600 Kilodalton (kDa) großen

zellulären Protein, entscheidend für die Zelltransformation zu sein (DeMasi et al., 2005). HPV E7 inaktiviert den Tumorsuppressor Retinoblastom (Rb) und führt damit zu einer gesteigerten Zellproliferation (Dyson et al., 1989; Berezutskaya und Bagchi, 1997). BPV-1 E7 ist hingegen in der Lage, auch in Rb-negativen Zellen, also auf einem Rb-unabhängigen Wege die Zellproliferation zu fördern. In BPV-1 E7 exprimierenden Zellen ist der c-Myc-Spiegel erhöht. Nachfolgend wird p27/KIP herabreguliert. Hingegen werden die Zyklin A- und Zyklin E-abhängige Kinase (CDK, cyclin-dependent kinase) vermehrt exprimiert. Da eine Aktivierung von c-Myc zu einem Übertritt der Zelle in die S-Phase führt, ist es möglich, dass E7 auf diesem Wege die Proliferationssteigerung bei infizierten Zellen bewirken kann. Eine umgekehrte Reaktionsfolge wird ebenso diskutiert, also dass E7 p27/KIP unterdrückt und es dadurch zu einer gesteigerten Aktivität von c-Myc kommen kann (Fan und Chen, 2003).

2.4 Pathogenese des equinen Sarkoids

Es gilt heute als gesichert, dass BPV-1 und 2 entscheidend für die Entstehung equiner Sarkoide sind. Dennoch ist es nie gelungen, papillomavirale Partikel in equinen Sarkoiden nachzuweisen, so dass das Kochsche Postulat nach wie vor nicht erfüllt ist oder dass equine Sarkoide eine Ausnahme dieser Forderung darstellen. Die Infektion von Pferden ist nicht produktiv. Mittels RT-PCR und Western Blot kann jedoch die Expression verschiedener viraler Gene gezeigt werden. Virale Transkripte von E2, E5, E6, E7 und L1 können jeweils in 90 %, 80 %, 45 %, 60 % bzw. 50 % von 20 untersuchten equinen Sarkoiden nachgewiesen werden (Nasir und Reid, 1999). Abweichend davon berichten andere Arbeitsgruppen von einer E5-Expression in 100 % bzw. 85 % der equinen Sarkoide (Carr et al., 2001; Chambers et al., 2003) und einer E6-Expression in 72 % der untersuchten Fälle (Nixon et al., 2005). Es sind sieben sarkoidspezifische Nukleotidabweichungen im ORF des BPV-1 E5 bekannt, von denen drei, Swiss II, Swiss III und Swiss IV, zu Abweichungen in der AS-Sequenz führen (Chambers et al., 2003). Bei zehn equinen Sarkoiden sind im ORF von E2 insgesamt neun bei allen untersuchten Tumoren identische Sequenzvariationen festgestellt worden. Diese führen zu fünf Abweichungen in der AS-Sequenz. In der Nukleotidsequenz der LCR können bei 35 equinen Sarkoiden insgesamt fünf verschiedene Nukleotidvariationen nachgewiesen werden (Nasir et al., 2007). Bei durch BPV-2

induzierten Sarkoiden sind bislang keine Sequenzvariationen bekannt. Die Bedeutung dieser Abweichungen für die Pathogenese equiner Sarkoide ist noch unklar (Chambers et al., 2003). BPV-1-DNA sowie mRNA von E1, E2 und E5 lassen sich auch in verschiedenen Fällen equiner Dermatitis nachweisen, beispielsweise bei eosinophilen Granulomen, ulzerativer Dermatitis mit Bildung von Granulationsgewebe und bei eosinophiler perivaskulärer Dermatitis. Jedoch gibt es momentan noch keine Hinweise dafür, dass BPV-1 die Entwicklung solcher Dermatitis bei Pferden beeinflussen kann oder dass eine Dermatitis sich zu einem Sarkoid entwickeln könnte (Yuan et al., 2007).

Zellzyklusanalysen in equinen Sarkoiden zeigen keine vermehrte Expression der Zellzyklusregulatoren Zyklin A, p27/KIP oder CDK-2 im Vergleich zu normaler Haut. Auch die Zellproliferation, die anhand der Expression von Ki67 untersucht werden kann, ist nicht gesteigert. Daher muss man schließen, dass die Proliferation im Tumor nicht auf einen entarteten Zellzyklus zurückzuführen ist. Vielmehr ist zu vermuten, dass die Ursache in einem gestörten Apoptosegeschehen liegt (Nixon et al., 2005). Untersuchungen auf Mutationen des Tumorsuppressorproteines p53 ergeben bei Pferden und bei Eseln keine Veränderungen im Genom (Bucher et al., 1996; Nasir et al., 1999). Bislang liegen noch keine Daten über die Expression weiterer Tumorsuppressorproteine, wie beispielsweise von „**Phosphatase-and-Tensin-homologue deleted on chromosome 10**“ (PTEN) in equinen Sarkoiden vor.

Bei PTEN handelt es sich um ein Gen, das auf dem humanen Chromosom 10q23.3 lokalisiert ist. Es besteht insgesamt aus neun Exons und kodiert für ein 403 AS-großes Protein (Dahia, 2000). PTEN wurde nahezu zeitgleich von insgesamt drei unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben, so dass es auch unter der Bezeichnung „mutated in multiple advanced cancers“ (MMAC1) (Steck et al., 1997) oder „transforming growth factor- β -regulated and epithelial-cell-enriched phosphatase“ (TEP1) (Li und Sun, 1997) bekannt ist. Die Proteinsequenz von PTEN weist Homologien zu der katalytischen Domäne der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) auf und wird daher als Mitglied der PTP-Superfamilie gezählt (Steck et al., 1997). Inaktivierung durch Mutationen oder Deletionen von PTEN werden bei bis zu 60 % der Tumoren des Menschen beschrieben (Ali et al., 1999), beispielsweise bei Endometrium- und Prostatakarzinomen (Peiffer et al., 1995; Risinger et al., 1997; Montironi et al., 2004) sowie bei Glioblastomen (Rasheed et al., 1999) und Melanomen (Wu et al.,

2003). Physiologisch wirkt PTEN inhibierend auf Zellwachstum, -migration und -adhäsion. Es dephosphoryliert PIP3 und antagonisiert damit direkt die PI3K (Dahia, 2000), die durch eine Interaktion des Onkoproteines E5 mit dem PDGF-Rezeptor in BPV-infizierten Zellen aktiviert ist.

2.5 Therapie des equinen Sarkoids

Trotz zahlreicher Ansätze zur Behandlung equiner Sarkoide gibt es bis heute keine erfolgversprechende Therapie. Die ausgeprägte Rezidivierungsneigung und die für eine Therapie häufig ungünstigen Lokalisationen der Tumoren limitieren in vielen Fällen den Behandlungserfolg.

2.5.1 Chirurgische Therapiemethoden

Lange Zeit war die **chirurgische Resektion** die Therapie der Wahl. Jedoch zeigen etwa 50 % aller operierten Pferde im Lauf der postoperativen drei Jahre ein Rezidiv. Häufig entwickelt es sich schon innerhalb der ersten sechs Monate *post operationem* (Ragland et al.; 1970). Pferde, die unter Vollnarkose im Liegen operiert werden, weisen dabei nur eine Rezidivrate von 20 % auf, was hauptsächlich auf eine gründlichere Resektion und bessere Wundversorgung zurückzuführen ist (Piscopo, 1999).

Eine weitere Möglichkeit der chirurgischen Behandlung ist die **Kryotherapie**. Hier wird das Gewebe in zwei bis drei Gefrier-Tau-Zyklen mit flüssigem Stickstoff auf wenigstens -20 °C tiefgefroren. Die Gefriertemperatur und -tiefe sollten während der Operation mit Hilfe von Thermometernadeln kontrolliert werden. Das behandelte Gewebe wird durch die Bildung von Eiskristallen nekrotisch (Marti et al., 1993). Die durchschnittliche Heilungszeit liegt bei 2,4 Monaten (Steiner, 1988). Komplikationen, wie eine dauerhafte Fazialisparalyse, septische Arthritis oder der Verlust des oberen Augenlides, treten vor allem bei einer unbeabsichtigten Schädigung des benachbarten Gewebes auf (Lane, 1977; Fretz und Barber, 1980). Bei multiplen oder großen Sarkoiden (>3 cm Durchmesser) ist es unmöglich, das Sarkoidgewebe während nur einer Sitzung vollständig zu entfernen, so dass der Patient unter Umständen mehrmals anästhesiert werden muss (Marti et al., 1993).

Bei der Laserchirurgie wird das Sarkoidgewebe mit einem **CO₂-Laser** gleichzeitig reseziert und an den Wundrändern verdampft (Carstanjen et al., 1997). Durch diese

Technik ist die Wunde nach der Operation trocken. Eine Schwellung oder Schmerzhaftigkeit treten im Gegensatz zur Kryochirurgie in der Regel nicht auf. Jedoch kann es in seltenen Fällen zu überschießendem Narbengewebe oder zu Leukotrichie kommen (Carstanjen et al., 1997). Ein Wundverschluss ist nicht unbedingt nötig. Die Angaben über die Rezidivierungsraten variieren je nach Untersuchung von 81 % rezidivfreien Patienten (Diehl et al., 1987) über 62 % (Carstanjen et al., 1997) bis hin zu nur 21,1 % Patienten, die mit alleiniger Laserbehandlung rezidivfrei bleiben (Brandt et al., 1996).

2.5.2 Immunmodulation

Bei **Bacille-Calmette-Guérin** (BCG) handelt es sich um attenuierte Mykobakterienstämme, die ursprünglich zur Vakzinierung gegen Tuberkulose gedacht waren. Es werden lebende und inaktivierte Bakterien und Zellwandextrakte mit unterschiedlichen Adjuvantien verwendet. Die intratumorale Injektion von BCG führt zu einer Immunmodulation und zu einer Nekrose der Sarkoidzellen, nicht jedoch des umliegenden Gewebes. Die Mykobakterienantigene stimulieren die körpereigenen Lymphozyten, was wiederum eine Aktivierung der natürlichen Killerzellen bewirken kann. Der genaue Wirkmechanismus ist ungeklärt (Vanselow et al., 1988).

Die Erfolgsraten sind sehr unterschiedlich und scheinen stark von der Lokalisation des Tumors abhängig zu sein. Periokuläre Sarkoide weisen bei dieser Therapie die beste Heilungstendenz von bis zu 100 % auf, während im Bereich der Gliedmaßen lokalisierte Tumoren deutlich schlechter auf die Therapie ansprechen. Hier liegt die Rezidivrate bei 80 % (Murphy et al., 1979; Lavach et al., 1985; Owen und Jagger, 1987). Nach der Therapie kann es zu schweren lokalen Entzündungen mit Lymphangitis (Klein et al., 1986) und septischer Arthritis (Owen und Jagger, 1987), zu Fieber und zum anaphylaktischen Schock kommen (Vanselow et al., 1988). Durch die Verwendung von Mykobakterien-Zellwandextrakten ist das Risiko des anaphylaktischen Schockes deutlich reduziert (Winston et al., 1979).

Anschließend an eine chirurgische Exstirpation lässt sich, wenn die Tumorbasis in der Haut verbleibt, aus dem Tumormaterial eine **autologe Vakzine** herstellen. Es werden mindestens 10 g Tumorgewebe nach der von Avrameas und Terncynck (1967) beschriebenen Methode polymerisiert und dem Pferd mehrmalig injiziert. Eine

deutliche Verlängerung des rezidivfreien Intervalles durch diese Therapie ist bei 21 Pferden beschrieben (Kinnunen, 1999). Nach der Immunisierung beginnt die Wunde von den Rändern aus zu epithelisieren. Ungefähr zeitgleich mit der Epithelisierung verschwinden die histopathologischen Merkmale des equinen Sarkoids, wie Reteleisten oder die Wirbelformationen der Fibroblasten. Die letzten fibroblastoiden Tumorzellen finden sich an der dermoepidermalen Grenze. Nur zu Beginn der Therapie ist das Gewebe mit neutrophilen Granulozyten infiltriert. Histologisch und ultrastrukturell finden sich keine Anzeichen von Nekrose oder Apoptose (Hallamaa, 2005).

Chimäre Virus-ähnliche Partikel (CVLP) können zur spezifischen Immuntherapie verwendet werden. Die Chimäre besteht aus dem C-terminal verkürzten Strukturprotein L1 und Teilen des Onkoproteines E7. Eine vorläufige Studie, in der zwölf Pferde mit equinen Sarkoiden immunisiert wurden, zeigt einen Rückgang bei einem oder mehreren Tumoren von insgesamt acht Pferden. Jedoch kam es zeitgleich sowohl zu Rezidivierungen als auch zum gesteigerten Wachstum oder zur Neubildung von Tumoren (Mattil-Fritz, 2002; Mattil-Fritz et al., 2008).

Injektionen des **Paramunitätsmodulators Baypamun®** unter den Tumor und in die Umgebung des Tumors führen zu keinem Heilungsvorsprung gegenüber der mit Placebo behandelten Gruppe. Die Größenreduktion des Tumors um 50 % in drei bzw. fünf von zehn Fällen wird auf Spontanregression zurückgeführt (Studer et al., 1997). Die in Baypamun® enthaltenen attenuierten Parapoxviren sprechen das unspezifische Immunsystem an. Es kommt zu einer vermehrten Freisetzung von T-Zellen sowie einer gesteigerten Bildung und Freisetzung von Zytokinen. Therapeutische Erfolge durch Immunmodulation mit solchen Orfviren können sowohl bei Virusinfektionen als auch bei Tumoren im Rahmen einer adjuvanten Therapie herbeigeführt werden (Mayr et al., 1997; Mayr, 2003; Weber et al., 2003).

In einer Pilotstudie wurden unterschiedliche Sarkoidtypen für 32 Wochen dreimal wöchentlich mit einer 5%igen Imiquimodsalbe behandelt. Bei **Imiquimod** handelt es sich um einen Immunmodulator mit bekannten antiviralen und antitumoralen Eigenschaften. Eine Größenreduktion der Tumoren wird bei zwölf von fünfzehn Sarkoiden und eine vollständige Remission bei neun von fünfzehn Sarkoiden beschrieben (Nogueira et al., 2006).

Bei **Immodin** handelt es sich um ein Blutleukozytenfiltrat, das aus einem niedermolekularen Gemisch biologisch aktiver Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 10 kDa besteht (Pekárek, 1996). Durch Immodin kommt es zu einer Stimulation der T-Zellen. Bei Menschen mit malignem Melanom kann durch die adjuvante Therapie mit Immodin eine höhere Überlebensrate als bei den Patienten in der Vergleichsgruppe erzielt werden (Vasickova et al., 1988).

2.5.3 Strahlentherapie

Mit der Strahlentherapie werden v.a. chirurgisch schlecht zugängliche Tumoren, beispielsweise an Auge und Ohr behandelt. Hier sind permanente Implantate, wie Radon-222 und Gold-198 von entfernbaren Implantaten wie **Radium-226**, **Kobalt-60** und **Iridium-192** zu unterscheiden. Während der Behandlung muss das Pferd in entsprechend geschützten Räumen gehalten werden. Durch die kontinuierliche Strahlenabgabe bildet sich das Tumorgewebe zurück. Für die Iridium-192-Therapie werden Erfolgsquoten von bis zu 100 % beschrieben (Marti et al., 1993; Knottenbelt und Kelly, 2000; Byam-Cook et al., 2006). Jedoch ist die Größe des Tumors ein limitierender Faktor. Nachteilig sind hierbei vor allem die hohen Behandlungskosten (Mattil-Fritz, 2002).

2.5.4 Chemotherapie

Equine Sarkoide können chemotherapeutisch mit **5-Fluorouracil** und **Cisplatin** behandelt werden. Es stehen Emulsionen und Salben auf Sesam-, Mandel- oder Rosmarinölbasis zur Verfügung. Es wird eine partielle Remission von 81 der 101 behandelten equinen Sarkoide bei intraläsionaler Behandlung mit Implantaten (Turrel et al., 1985) und eine vollständige Remission von 23 der 31 behandelten equinen Sarkoide bei intratumoraler Applikation einer Cisplatin-Emulsion beschrieben (Simhofer und Kleiter, 2000). Bei letzterer konnte jedoch auch ein Tumorwachstum bei zwei Pferden beobachtet werden. Stewart et al. (2006) zeigen eine vollständige Remission mit nachfolgender dreijähriger Rezidivfreiheit bei 61,5 % der Patienten. Die Heilungschancen für Pferde mit einem einzelnen Sarkoid (60 %) entsprechen in etwa denen bei Pferden mit multiplen Sarkoiden (66,6 %). Jedoch haben Sarkoide, die größer sind als 13,5 cm³ eine signifikant schlechtere Prognose. Knottenbelt und Kelly

(2000) beschreiben die Behandlung von periorbitalen equinen Sarkoiden mit intratumoraler Cisplatin-Injektion und zwei verschiedenen topischen Fluorouraciltherapeutika. Mittels Cisplatin-Injektion wird eine Tumorregression in 33 % der Fälle herbeigeführt. Allerdings treten hier vor allem Schwierigkeiten bei den Wiederholungsbehandlungen auf, da aufgrund des bereits nekrotischen Tumorgewebes eine korrekte Platzierung des Therapeutikums nicht mehr garantiert werden kann. Die topische Fluorouraciltherapie führt in 35 % bzw. 66 % der Fälle zu einer Remission des Tumors. Jedoch ist gerade bei equinen Sarkoiden am Augenlid bei der topischen Anwendung von Chemotherapeutika Vorsicht geboten.

Die vollständige Remission mit nachfolgender 18-monatiger Rezidivfreiheit ist bei fünf Tumoren von elf beobachteten Pferden nach Behandlung mit **Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate** (D609) in Kombination mit dem Kaliumsalz der Laurinsäure (KC12) mit und ohne Zusatz von rekombinantem humanen TNF- α bekannt (Otten et al., 1994)

Cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP) ist als L-Prolin-Analogon schon lange bekannt. Es ist in der Lage, die Synthese sowie die extrazelluläre Anlagerung von Kollagen zu hemmen (Rosenbloom und Prockop, 1971; Uitto und Prockop, 1977). Weiterhin hemmt es Proliferation, Adhäsion und Migration von Fibroblasten, Epithelzellen und Tumorzellen (Lewko et al., 1981; Tan et al., 1983; Yoo et al., 1997, Müller et al., 2006). Das ist unter anderem auf eine proteolytische Fragmentierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) zurückzuführen. Während sich bei unbehandelten Zellen FAK immunhistologisch vor allem im Bereich von „focal adhesions“ nachweisen lässt, ist bei mit CHP behandelten Zellen ein Verlust der „focal adhesions“ sowie eine diffuse Verteilung von FAK zu erkennen. Das führt zu einem Adhärenzverlust und schließlich zur Apoptose (Müller et al., 2006).

CHP ist weiterhin bekannt dafür, dass es eine Fehlfaltung von Kollagen herbeiführen kann (Uitto et al., 1975). Dieses fehlgefaltete Kollagen lagert sich wiederum im endoplasmatischen Retikulum (ER) an und löst Apoptose aus (Kaufman, 1999). Mit Pankreaskarzinomzellen kann nach CHP-Behandlung ein Zusammenhang zwischen Proliferationshemmung und Apoptose mit FAK und ER-Stress bestätigt werden (Müller et al., 2006).

Foscarnet-Natrium oder Phosphonoameisensäure ist ein Pyrophosphat analogon. Als solches ist es in der Lage, die Pyrophosphatbindungsstelle von DNA-Polymerasen zu

blockieren. Auf diese Weise kommt es zu einer Hemmung des Enzymes. Die höhere Empfindlichkeit der viralen Polymerasen führt zu einer selektiven Hemmung (Oberg, 1989). Eine antivirale Wirkung bei Herpesvirusinfektionen ist *in vitro* und in verschiedenen klinischen Studien belegt (Helgstrand et al., 1978; Bernstein et al., 1997; Gross und Braun, 2006). Bei HPV-infizierten Zellen kann durch Foscarnet-Natrium die Proliferation gehemmt werden (Andrei et al., 1998).

2.5.5 Hyperthermiebehandlung

Durch Hyperthermie wird das Sarkoidgewebe mit Röntgenstrahlung von 2 MHz für 30 s auf 50 °C erhitzt. Die Behandlung muss in Intervallen von ein bis mehreren Wochen wiederholt werden. Eine erfolgreiche Behandlung mit anschließender rezidivfreier Zeit von 7-12 Monaten ist in drei Fällen belegt (Hoffmann et al., 1983).

2.5.6 Homöopathie

Equine Sarkoide können homöopathisch mit *Arsenicum album*, *Silicea*, *Graphites*, *Thuja* oder *Tarantula cubensis* mit unterschiedlichem Erfolg therapiert werden (Wolter, 1987).

2.5.7 Phytotherapie

Pflanzlich können equine Sarkoide mit XXTerra™, einer Paste auf der Basis von *Sanguinaria canadensis*, dem kanadischen Blutwurz, therapiert werden. Die erfolgreiche Anwendung ist im Einzelfall beschrieben (von Felbert et al., 2005), dennoch liegen keine wissenschaftlich abgesicherten Daten über die Wirkungsweise vor. Die Paste wird in mehrtägigen Intervallen auf den Tumor aufgetragen. Nach anfänglicher Entzündung und Ulzeration kommt es zu einem Gewebsuntergang und zu einer Demarkation des Tumorgewebes. Der kanadische Blutwurz gehört genau wie das in Europa heimische Schöllkraut, *Chelidonium majus*, zur Familie der *Papaveraceae*. Die antitumoralen Eigenschaften der in beiden Pflanzen enthaltenen Alkaloide Sanguinarin und des Strukturhomologes Chelerythrin sind bekannt (Mitscher et al., 1978). Der Heilungserfolg bei equinen Sarkoiden lässt sich daher vermutlich auf eines dieser Alkaloide zurückführen.

Sanguinarin gehört zur Familie der Benzophenantridinalkaloide. Aufgrund seiner antimikrobiellen, antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften findet es vor allem in der Zahnmedizin schon seit längerer Zeit Anwendung (Kuftinec et al., 1990; Laster et al., 1990; Firatli et al., 1994; Godowski et al., 1995). Auch werden Sanguinarin antivirale Eigenschaften zugeschrieben (Colombo et al., 1996). Eine In-vitro-Behandlung von verschiedenen Zelllinien mit Sanguinarin führt zu einer Inhibition der durch TNF- α induzierten NF- κ B-Aktivierung (Chaturvedi et al., 1997). Die Strukturanaloga Chelerythrin und Berberin haben dagegen keinen Einfluss auf NF- κ B. Da eine Senkung der NF- κ B-Aktivität in eukaryoten Zellen mit einer Apoptoseinduktion einhergeht (Krishnamoorthy et al., 1999), ist NF- κ B vermehrt in den Fokus der onkologischen Forschung gerückt (Neumann et al., 1997). Humane Plattenepithelkarzinomzellen (A431) reagieren auf eine Sanguinarinbehandlung mit einer dosisabhängigen Vitalitätseinbuße. Zum Vergleich behandelte normale epidermale Keratinozyten des Menschen (NHEK) zeigen erst bei höherer Dosis und im geringeren Maße eine Vitalitätsabnahme. Untersuchungen der behandelten Zellen mit Annexin V führen bei A431-Zellen zu einer Apoptose und erst bei höherer Sanguinarindosierung zur Nekrose, wohingegen NHEK-Zellen ausschließlich mit Nekrose reagieren (Ahmad et al., 2000). Bei durch HPV-16 immortalisierten humanen Endozervikalzellen, die resistent gegen Cisplatin, Actinomycin D, Doxorubicin, Etoposid, Paclitaxel, 5-Fluorouracil, Staurosporin, Hitzeschock oder UV-Strahlung sind, ruft eine Sanguinarinbehandlung eine vergleichbare Vitalität und Überlebensrate wie bei nicht resistenten HPV-16 immortalisierten Endozervikalzellen hervor (Ding et al., 2002). Die Behandlung von immortalisierten humanen Keratinozyten belegt die Apoptoseinduktion über den Caspaseweg mittels einer Modulation von Proteinen der Bcl-2-Familie. Es kommt zu einer dosisabhängigen vermehrten Expression der proapoptotischen Proteine Bax, Bak und Bid, wohingegen das antiapoptotische Protein Bcl-2 vermindert exprimiert wird. Nachfolgend ergibt sich eine dosisabhängige vermehrte Expression von Zytocrom C, Apaf-1, sowie eine Aktivierung der Caspasen 9, 3, 7 und 8 (Adhami et al., 2003). In einer weiteren Studie untersuchten Adhami et al. (2004) die Auswirkungen der Sanguinarinbehandlung auf den Zellzyklus von androgenempfindlichen und androgenresistenten humanen Prostatakarzinomzellen. Die Studie zeigt eine dosisabhängige Abnahme der Expression von Zyklin D1, D2 und E

sowie einer Abnahme von CDK 2, 4 und 6. Weiterhin kommt es zu einer Induktion der Zyklin-Kinase-Inhibitoren p21/WAF und p27/KIP. Dadurch häufen sich die behandelten Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus an, und es kommt zu einem Zellzyklusarrest.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen wurde Tumorgewebe, das als equines Sarkoid diagnostiziert wurde, aus folgenden Kliniken und Tierärztlichen Praxen zur Verfügung gestellt:

Tab. 1 Herkunft des Untersuchungsmaterials in der Zeit von 2004 bis 2007 (n=31)

Herkunft	n
Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie, FU Berlin	11
Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza	6
Tierklinik Hochmoor, Gescher-Hochmoor	4
Tierklinik Demmin	4
Tierklinik Schwerin	2
Tierklinik Wahlstedt	1
Tierklinik Vorbohle, Schloß-Holte Stukenbrock	1
Tierärztliche Klinik für Pferde, Telgte	1
Tierärztin T. Benninger, Kassel	1

3.1.2 Seren und Antiseren

Als primäre und sekundäre Antikörper fanden die in Tabellen 2 und 3 aufgeführten monoklonalen Antikörper (mAK) und Hyperimmunseren (HIS) Verwendung. Normalserum von gesunden Ziegen wurde durch Spontangerinnung von Frischblut bei Raumtemperatur über Nacht und anschließende Zentrifugation für 10 min bei 3000 Umdrehungen pro Minute (UpM) gewonnen und bei -20 °C aufbewahrt.

Tab. 2 Als primäre Antikörper verwendete monoklonale Antikörper und Hyperimmunseren

Primärer Antikörper	Hersteller
Vimentin, mAK	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Zytokeratin-Cocktail (Zytokeratin 1-8, 10, 13, 14, 15, 16 und 19), mAK	LINARIS, Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen
BPV-1 E5, HIS	Dr. Richard Schlegel (Georgetown University, WA, USA)
BPV-1 L1, HIS	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
IBDV, HIS	Dr. Egbert Mundt (FLI)
PTEN/MMAC1, HIS	Acris Antibody GmbH, Hiddenhausen
pAKT (Ser 473), HIS	Cell Signaling Technology®, Inc., Beverly, MA, USA
Ki67, mAK	dianova GmbH, Hamburg
Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA), mAK	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg

Tab. 3 Als sekundäre Antikörper verwendete Seren

Sekundäre Antikörper	Hersteller
Biotinyliertes Ziegen-Anti-Maus-Serum	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotinyliertes Ziegen-Anti-Kaninchen-Serum	Vector, Burlingame, CA, USA
Anti-Kaninchen-Antikörper POD	dianova GmbH, Hamburg

3.1.3 Zelllinien

ZBV958	Adulte Pferdehaut Riems, APH-R (Zellbank, FLI)
ZBV146	Pferdehaut Riems, PH-R (Zellbank, FLI)

3.1.4 Bakterienstamm

JM109	Promega, Madison, WI, USA
-------	---------------------------

3.1.5 Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
---------------------------	---------------------------

Pronase	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
RNasin [®] RNase Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
Taq-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, WI, USA

3.1.6 Chemikalien, Arzneimittel und Kits

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-staining reagent (AEC)	DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
aktiver Immunmodulator (AIM)	RIEMSER Arzneimittel AG, Greifswald - Insel Riems
Ampicillin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, WI, USA
CFSE	Axxora Deutschland GmbH
CHP	RIEMSER Arzneimittel AG, Greifswald - Insel Riems
DNA-Längenstandard „1kbp-ladder“	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
dNTPs	Promega, Madison, WI, USA
Digoxigenin (DIG)-markierte dNTPs	Roche, Mannheim
Elasan [®] -Körperlotion	RIEMSER Arzneimittel AG, Greifswald - Insel Riems
Eukitt [®]	Inge Hecht, Kiel
Foscarnet-Natrium	RIEMSER Arzneimittel AG, Greifswald - Insel Riems
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Immodin	SevaPharma, Prag, Tschechien
KaryoMax [®]	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

LB Agar	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
LB Broth Base	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Magermilchpulver	Lasana, Everswinkel
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PGEM [®] -T-Easy-Vector System	Promega, Madison, WI, USA
QIAamp [®] DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
SOC Medium liquid	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
Triapten [®] Antiviralcreme	RIEMSER Arzneimittel AG, Greifswald - Insel Riems
Tris	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
XTRA-Blue [™] Plus	Qbiogene, Montreal, Canada
XXTerra [™]	Larson Laboratories Inc., USA

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Merck, Serva oder Roth bezogen.

3.1.7 Geräte

Es sind nur die über die Laborgrundausrüstung hinausgehenden Geräte aufgeführt.

Thermomixer Comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Kamera am Axioskop	Canon, Krefeld
Küvetten	Biorad, Hercules, CA, USA
Microtom SM 2000 R	Microm, Walldorf
UV Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagen, La Jolla, CA, USA
PTC-150 PCR Thermocycler	MJ Research, Waltham, MA, USA

3.1.8 Verbrauchsmaterial

Zentrifugationsröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

Nylonmembran (Hybond-N ⁺)	Amersham-Pharmacia,
Nitrocellulosemembran	Buckhamshire, UK
Objektträger (SuperFrost [®] plus)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger (SuperFrost [®])	Menzel-Gläser, Braunschweig
Zellkulturflaschen T 75	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen T 25	Sarstedt, Nümbrecht
Mehrkammerzellkulturschalen	Corning Inc., Corning, NY, USA
2 ml Cryo, Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
5 ml Rundbodenröhrchen	BD Falcon, San Jose, CA, USA

3.1.9 Versuchstiere

Hamster	Harlan Winkelmann GmbH, Borchen
---------	------------------------------------

3.1.10 Stammlösungen und Puffer

3.1.10.1 Histologie

4 % Neutral gepuffertes Formalin (pH 7,3)

4 g	NaH ₂ PO ₄
6,5 g	Na ₂ HPO ₄
900 ml	Aqua dest.
100 ml	Formaldehyd 37 %

20 · Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,3

29,25 g	Na ₂ HPO ₄
160 g	NaCl
4 g	KCl
4,9 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	Aqua dest.

4 % Neutral gepuffertes Paraformaldehyd (p 7,3)

40 g Paraformaldehyd

1000 ml 1 x PBS

bei 70 °C unter Rühren lösen.

50 · Denhardts Lösung

1 g Polyvinylpyrrolidon (PVP)

1 g bovines Serum Albumin (BSA)

1 g Ficoll 400

ad 100 ml Aqua dest.

50 · Dextransulfat

10 g Dextransulfat

ad 20 ml Aqua dest.

Eosin/Phloxin

20 ml Eosin (1 %)

2 ml Phloxin (1 %)

156 ml Ethanol

0,8 ml Eisessig

Hämalaun (nach Mayer)

1 g Hämatoxylin

1 l Aqua dest.

200 mg NaJO₃

50 g Kaliumalaun

schütteln bis blauviolette Lösung entsteht

50 g Chloralhydrat

1 g Zitronensäure

Farbumschlag zu Rotviolett

Tris-EDTA (TE)-Puffer, pH 8,0

1,2 g Tris
20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1000 ml Aqua dest.

Heringsperma-DNA (10 mg/ml)

250 mg Heringsperma-DNA
25 ml TE-Puffer (pH 8,0)

400 · Levamisol

96 mg Levamisol
1 ml Aqua dest.

lösen, in 100 µl Aliquots bei -20°C lagern.

2 · Puffer I (für In-situ-Hybridisierung)

200 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
60 ml 5 M NaCl
ad 1000 ml Aqua dest.

Puffer III

25 ml 1 M Tris-HCl (pH 9,5)
5 ml 5 M NaCl
12,5 ml 1 M MgCl₂
ad 250 ml Aqua dest.

20 · SSC (standard saline citrate)

175,32 g NaCl
88,23 g tri-Natriumzitat
in 600 ml Aqua dest. lösen
mit HCl auf pH 7,0 einstellen
ad 1000 ml Aqua dest.

10 · Tris-buffered saline (TBS), pH 7,6

60,57 g Tris-HCl
80,0 g NaCl
in 500 ml Aqua dest. lösen,
mit HCl auf pH 7,65 einstellen

10 mM Zitratpuffer (pH 6,0)

2,1 g Zitrat-Monohydrat
900 ml Aqua dest.
mit ca. 25 ml 2 M NaOH auf pH 6,0 einstellen
ad 1000 ml Aqua dest.

3.1.10.2 Zellkultur*Alsevers Trypsin Versen (ATV)*

8 g NaCl
0,4 g KCl
1 g Dextrose
0,58 g NaHCO₃
0,2 g EDTA
0,5 g Trypsin
ad 1000 ml Aqua dest.

Zellkulturmedium ZB 5

MEM Eagle in Hanksalzen und MEM Eagle in Earlsalzen im Verhältnis 1:1

10 ml/l nichtessentielle Aminosäuren
120 mg/l Natriumpyruvat
10 % fetales Kälberserum (FKS)
2 ml/l Penicillin-Streptomycin

Zellkulturmedium ZB 5C

MEM Eagle in Hanksalzen und MEM Eagle in Earlsalzen im Verhältnis 1:1

10 ml/l nichtessentielle Aminosäuren
120 mg/l Natriumpyruvat
2 ml/l Penicillin-Streptomycin

Kaliumchlorid-Lösung, 75 mM

560 mg KCl
ad 100 ml Aqua dest.

Osmolalität auf 150 mOsmol/kg einstellen

Natriumphosphatpuffer, pH 6,4

Stammlösung A

1,248 g NaH_2PO_4 (0,2 M)
ad 100 ml Aqua dest.

Stammlösung B

1,132 g Na_2HPO_4 (0,2 M)
ad 100 ml Aqua dest.

36,7 ml Lösung A
13,3 ml Lösung B
ad 100 ml Aqua dest.

3.1.10.3 PCR

0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,0

186,12 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
700 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,3
ca. 50 ml 10 M NaOH, pH auf 8,0 einstellen
ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren

10 · Tris-Borat-EDTA (TBE)-Elektrophoresepuffer, pH 8,0

108,0 g Tris
55,0 g Borsäure
40,0 ml 0,5 M EDTA
ad 1000 ml Aqua dest.

3.1.10.4 Sequenzierung*LB-Agar*

6,4 g LB-Agar
200,0 ml Aqua dest.
Autoklavieren
0,8 ml XTRA-Blue™ Plus
0,2 ml Ampicillin (100 µg/ml)

LB-Broth

4,0 g LB-Broth
200,0 ml Aqua dest.
Autoklavieren
0,2 ml Ampicillin (100 µg/ml)

3.1.10.5 Southern Blot*Hirt Lysispuffer*

300 µl Natriumlaurylsulfat (SDS)
1 ml 0,5 M EDTA, pH 7,5
ad 500 ml Aqua dest.

Transferlösung

43,83 g NaCl (1,5 M)
10,0 g NaOH (0,5 M)
ad 500 ml Aqua dest.
Autoklavieren

Puffer I (Maleinpuffer)

11,61 g Maleinsäure (100 mM)
8,77 g NaCl (150 mM)
in 700,0 ml Aqua dest. lösen
mit NaOH Plätzchen pH auf 7,5 einstellen
ad 1000,0 ml Aqua dest.
Autoklavieren

Detektionspuffer

25 ml 1 M Tris-HCl (pH 9,5)
5 ml 5 M NaCl
ad 250 ml Aqua dest.

3.1.10.6 Western Blot*PAGE-Probenpuffer*

1,51 g Tris
20 ml Glyzerin
in 35 ml Aqua dest. lösen, pH 6,7 einstellen
4 g SDS
2 mg Bromphenolblau
ad 100 ml Aqua dest.

5 · PAGE-Laufpuffer

15,1 g Tris
94 g Glyzerin
5 g SDS
ad 1000 ml Aqua dest.

Trenngel, 10 %

3,3 ml 30 % Acrylamidgemisch
2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
100 µl 10 % SDS

100 µl	10 % Ammoniumpersulfat
4 µl	Tetramethylethyldiamin (TEMED)
4 ml	Aqua dest.

Sammelgel

670 µl	30 % Acrylamidgemisch
500 µl	1,0 M Tris (pH 6,8)
40 µl	10 % SDS
40 µl	10 % Ammoniumpersulfat
4 µl	TEMED

10 · Waschpuffer

8,8 g	NaCl
12,1 g	Tris

ad 1000 ml Aqua dest. auf pH 7,5 einstellen

3.2 Methoden

3.2.1 Histopathologische Untersuchung

Grundlage für die Untersuchungen waren 30 chirurgisch resezierte Hauttumoren von Pferden. Diese wurden mit der Verdachtsdiagnose „equines Sarkoid“ in der Zeit von 2004 bis 2007 als Frischgewebe an das Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Labor für Pathologie, gesandt. Anhand Hämalaun-Eosin-gefärbter Paraffinschnitte wurden diese Tumoren histopathologisch klassifiziert und bestätigte equine Sarkoide zur Etablierung primärer Zellkulturen verwendet. Darüber hinaus wurden für vergleichende Analysen zehn in Paraffin eingebettete equine Sarkoide einbezogen, die in der Zeit von 1990 bis 1991 am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität als Sarkoide diagnostiziert worden waren (Teifke, 1993).

3.2.1.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für die histopathologische Klassifizierung der Tumoren wurde das Gewebe für 24 h in 4 % neutral gepuffertem Formalin fixiert. Es schloss sich über weitere 24 h eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %) an.

n-Propanol, Roti[®]-Histol) und die Einbettung in Paraffin-Paraplast[®] an. Mittels Rotationsmikrotom wurden Schnitte von 2 µm Dicke angefertigt, im Streckbad bei 40 °C geglättet, auf SuperFrost[®] oder SuperFrost[®] Plus Objektträger aufgezogen und für 2 h bei 40 °C luftgetrocknet.

3.2.1.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Als Übersichtsfärbung fand die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) nach folgendem Protokoll Verwendung.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und n-Propanol für je 2 x 5 min
2. Rehydrieren der Schnitte in absteigender Ethanolreihe (96 %, 80 %, 70 %, 50 %) für je 3 min
3. Spülen in Aqua dest. für 3 min
4. Färben in Hämalaun nach Mayer für 13 min
5. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
6. Färben in Eosin/Phloxin für 2 min
7. Kurzes Spülen in Aqua dest.
8. Kurzes Entwässern in 70 %, 80 %, 90 % n-Propanol
9. Spülen in n-Propanol für 2 x 1 min
10. Inkubieren in Xylol für 2 x 5 min
11. Eindecken mit Corbit-Balsam (Eukitt[®])

3.2.2 Immunhistologische und immunzytologische Untersuchungen

Der Nachweis von Antigenen im Paraffinschnitt wurde mit der ABC-Methode in Anlehnung an das Standardprotokoll von Hsu et al. (1981) durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden hierfür auf SuperFrost[®] Plus Objektträger aufgezogen.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und n-Propanol für je 2 x 5 min
2. Eintauchen in Ethanol 96 % für 3 min
3. Blockieren der endogenen Peroxidasen in 90 % Methanol und 3 % Wasserstoffperoxid für 10 min
4. Rehydrieren in absteigender Ethanolreihe (96 %, 80 %, 70 %, 50 %) für je 3 min
5. Spülen in Aqua dest. für 3 min
6. Antigendemaskierung, entsprechend Tabelle 4
7. Spülen in TBS für 3 x 3 min

8. Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit unverdünntem Ziegennormalserum für 30 min
9. Absaugen des Ziegennormalserums
10. Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 min, Verdünnungen in TBS entsprechend Tabelle 4
11. Spülen in TBS für 3 x 3 min
12. Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper für 30 min, Verdünnungen in TBS entsprechend Tabelle 5
13. Spülen in TBS für 3 x 3 min
14. Inkubation mit dem ABC-Komplex für 30 min. Hierzu wurden die beiden Komponenten Avidin DH und biotinylierte Meerrettichperoxidase 30 min vor Gebrauch nach Herstellerangaben in TBS angesetzt.
15. Spülen in TBS für 3 x 3 min
16. Inkubation mit AEC unter Sichtkontrolle bis zur Signalentwicklung
17. Färben mit Hämalaun nach Mayer für 2 min
18. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
19. Eindecken (wässrig) mit Aquatex[®]

Die zur Antigendemaskierung am Paraffinschnitt erforderlichen Methoden und Anwendungsverdünnungen sind aus Tabelle 4 ersichtlich. Die Anwendungsverdünnungen der sekundären Antikörper sind Tabelle 5 zu entnehmen. Für die Immunzytologie wurden zunächst Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Nachdem der Monolayer die gewünschte Dichte erreicht hatte, wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd für 30 min fixiert, anschließend getrocknet und die Deckgläschen mit Eukitt[®] auf Objektträger geklebt. Endogene Peroxidasen wurden bei Zellkulturen mit 0,5 % Wasserstoffperoxid während 30 min inaktiviert. Die Antigendemaskierung wurde immer mit Pronase durchgeführt.

Tab. 4 Methoden zur Antigendemaskierung und Anwendungsverdünnungen der primären Antikörper

Antigen	Herkunft	Antigendemaskierung	Verdünnung
Vimentin	Maus	Zitratpuffer/Mikrowelle ¹	1:40
Zytokeratine	Maus	Pronase	Unverdünnt
S 100	Kaninchen	Pronase	1:300
GFAP	Kaninchen	Pronase	1:300
NSE	Maus	Zitratpuffer/Mikrowelle	1:100
Desmin	Maus	Zitratpuffer/Mikrowelle	1:50
BPV-1 E5	Kaninchen	Zitratpuffer/Mikrowelle	1:50
BPV L1	Kaninchen	Zitratpuffer/Mikrowelle	1:1000
PTEN/MMAC1	Kaninchen	Zitratpuffer/Autoklav ²	1:20
pAKT (Ser473)	Kaninchen	Zitratpuffer/Autoklav	1:50
PCNA	Maus	Zitratpuffer/Autoklav	1:100
Ki67	Maus	Zitratpuffer/Autoklav	1:500
IBDV	Kaninchen	Zitratpuffer/Autoklav	1:1000

¹ Zitratpuffer pH 6,0; Mikrowelle; 700 W, 10 min

² Zitratpuffer pH 6,0; Autoklavieren; 120 °C; 2,7 bar; 20 min

Tab. 5 Anwendungsverdünnungen der sekundären Antikörper

Spezies	Antikörperherkunft	Verdünnung
Anti-Maus	Ziege	1:100
Anti-Kaninchen	Ziege	1:100

3.2.3 In-situ-Hybridisierung (ISH)

Der Nachweis von BPV-1-DNA wurde sowohl exemplarisch an formalinfixierten equinen Sarkoiden als auch an primären Zellkulturen mittels nichtradioaktiver ISH durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein durch BPV-1 hervorgerufenes Fibropapillom des Rindes. Die Zelllinie 958 diente als Negativkontrolle. Paraffinschnitte wurden hierfür auf SuperFrost[®] Plus Objektträger aufgezogen.

DIG-markierte doppelsträngige DNA-Sonden wurden unter Verwendung der Oligonukleotidpaare E1, E2 und E5 nach dem unter Punkt 3.2.5.3 beschriebenen Protokoll mittels PCR synthetisiert. Zu diesem Zweck wurden, wie in der Literatur beschrieben, DIG-markierte dNTPs verwendet (Emanuel, 1991).

Die Inkubationen wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte wie unter Punkt 3.2.1.2 beschrieben.
2. Es schloss sich eine Proteolyse an (Proteinase K-Konzentration für Paraffinschnitte: 10 µg/ml, 30 min, 37 °C; Zellkulturen: 0,5 µg/ml, 30 min, 37 °C).
3. Die Proteolyse wurde mittels zweimaligem Spülen in Aqua dest. beendet, die Schnitte für 5 min in 96 % Ethanol überführt und anschließend luftgetrocknet.
4. Zur Hybridisierung wurden etwa 50 µl Hybridisierungspuffer pro Gewebeschnitt aufgetragen. Der Puffer bestand aus 2,5 µl Heringsperma-DNA (10 mg/ml), 1,0 µl der jeweiligen DNA-Sonde (ca. 25 ng/µl), die zusammen mit 3,5 µl Formamid zunächst bei 96 °C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis schockgekühlt wurden. Hinzu kamen 21,5 µl Formamid, 10,0 µl 20x SSC, 1,0 µl Denhardts Lösung, 5,0 µl 50 % Dextransulfat und 5,5 µl Aqua dest. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 40 °C in einer feuchten Kammer.
5. Die doppelsträngige DNA musste zuvor denaturiert werden. Hierzu wurden die Objektträger mit dem aufgetragenen Hybridisierungspuffer in einer Metallschale für 6 min in 98 °C heißes Wasser und anschließend auf Eis gestellt.
6. Zur Entfernung ungebundener und unspezifisch hybridisierter Sonden wurden die Schnitte zweimal für 10 min mit zunehmender Stringenz gewaschen (zuerst 2 x SSC, danach 0,1 x SSC).
7. Zum immunologischen Nachweis der Hybride erfolgte zunächst eine Inkubation für 30 min in Äquilibrierungspuffer (5 % NSS und 0,3 % Triton X 100 in Puffer I). Anschließend wurden die Objektträger für 2 h mit dem „Schaf-anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat“ in der Verdünnung 1:100 inkubiert.
8. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für 15 min in Puffer I gespült und anschließend mit Puffer III äquilibriert. Es schloss sich die Farbreaktion an. Dafür wurden 4,5 µl NBT, 3,5 µl X-Phosphat und 2,5 µl Levamisol (96 mg/ml) mit 1000 µl Puffer III vermischt und auf die Objektträger aufgetragen. Die Farbentwicklung war bei bovinen Fibropapillomen meist nach 15 min, bei equinen Sarkoiden, Hamstertumoren und Zellkulturen jedoch erst nach 12- bis 16-stündiger Inkubation abgeschlossen. Die Reaktion wurde durch Spülen in Aqua dest. und anschließender Inkubation für 10 min in TE-Puffer (pH 8,0) beendet. Die Präparate wurden 30 s mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt, unter fließendem Wasser gebläut und mit Aquatex[®] eingedeckt.

3.2.4 Untersuchungen an primären Zelllinien

3.2.4.1 Anlegen primärer Zelllinien

Es wurden 30 durch chirurgische Resektion gewonnene equine Sarkoide von groben Verunreinigungen befreit und zur Desinfektion der Oberfläche 30 s in 0,16 % Peressigsäure getaucht. Aus den mesenchymalen Anteilen der Tumoren wurde jeweils eine ca. 1 x 1 x 1 cm große Gewebeprobe steril entnommen, die in unterschiedlichem Ausmaß auch Anteile des dermoepidermalen Überganges enthielt. Die Probe wurde möglichst fein zerkleinert und die ca. 1-2 mm großen Tumorexplantate an den Boden einer 25 ml-Zellkulturflasche angedrückt. Anschließend wurden 10 ml Zellkulturmedium ZB 5 zugefügt und die Tumorexplantate in einem befeuchteten Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C) inkubiert. Zusätzlich wurden Gewebeproben für Histologie und Bakteriologie genommen (die bakteriologische Untersuchung wurde von U. Polster im Labor für Bakteriologie am Institut für Infektionsmedizin, FLI Insel Riems, durchgeführt). Weiterhin erfolgte eine Kryokonservierung bei -70 °C für eine Nukleinsäureextraktion.

Nach 72 h wurden die Zellkulturflaschen auf das Auswachsen von ersten Zellen aus den Explantaten untersucht. Je nach Stärke der Zellproliferation wurde ein- bis zweimal pro Woche die Hälfte des Zellkulturmediums ersetzt.

Nachdem sich um einzelne Explantate teils konfluierende Monolayer mit einem Radius von ca. 1,5 cm gebildet hatten, wurden die Zellen erstmalig passagiert. Dafür wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Flasche einmal mit 2 ml Alsevers Trypsin Versen (ATV) gespült. Anschließend wurde auf den Zellen 0,2 ml ATV als dünner Film verteilt. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde die Zellkulturflasche kurz aufgeklopft, 1,8 ml Medium zugefügt und geschwenkt, um die Zellen zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden anschließend mit dem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.2.4.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wuchsen in ZB 5 Kulturmedium in einem befeuchteten Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C). Zweimal wöchentlich wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 95 % wie zuvor beschrieben passagiert.

Kryokonservierte Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut und in einer Zellkulturflasche mit rund 10 ml Kulturmedium versetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 h, um das verbliebene DMSO zu entfernen.

3.2.4.3 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung der Zellen wurde der Monolayer bei einer Konfluenz von ca. 90 % mit ATV abgelöst und in Kulturmedium überführt. Um Trypsinreste aus dem Medium zu entfernen, wurden die Zellen 10 min bei 800 UpM zentrifugiert. Für das Einfriermedium wurde das Kulturmedium mit 10 % DMSO versetzt. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und wie nachfolgend beschrieben eingefroren. Zunächst wurden die 1 ml-Aliquots in Cryo-Einfrier Röhrchen in einem Qualifreeze Cryo-Einfriergerät (Nalgene), das mit 250 ml Isopropanol gefüllt war, für 24 h bei -70 °C eingefroren. Das Einfriergerät gewährleistete ein langsames und schonendes Abkühlen der Zellen um -1 °C/min. Hierauf folgte die Konservierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

3.2.4.4 Karyogramm zur Bestimmung des Chromosomensatzes

Für die Bestimmung des Chromosomensatzes der Zellen und für die Herstellung eines Karyogrammes wurden Metaphasechromosomen benötigt. Dafür wurden die Zellen aus zwei 25 ml-Zellkulturflaschen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase bei ca. 75 % Konfluenz, ca. 48 h nach der letzten Passage, geerntet.

1. Mit 10 mg/ml des Spindelgiftes Colcemid (KaryoMax[®]) wurden die Zellen während einer 150 min Inkubation bei 37 °C in der Metaphase der Mitose arretiert. Durch kurzes vorsichtiges Aufklopfen der Flasche konnten die mitotischen Zellen aus dem Zellrasen gelöst und mit dem Zellkulturüberstand in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt werden.
2. Der Zellrasen wurde kurz mit 2 ml ATV gewaschen, anschließend mit 0,5 ml ATV überschichtet und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die gelösten Zellen in serumfreiem Medium (ZB 5C) resuspendiert und ebenfalls in das Zentrifugationsröhrchen überführt.
3. Die Zellen wurden mit 1200 UpM für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, anschließend der Überstand abgenommen und die Zellen durch vorsichtiges Klopfen resuspendiert.

4. 4 ml auf 37 °C vorgewärmtes hypotones 75 mM Kaliumchlorid (KCl) wurden zugegeben und die Zellen für 15 min bei 37 °C zur osmotischen Quellung im Wasserbad inkubiert.
5. Im Anschluss wurde 1 ml eisgekühltes Fixans (Methanol-Eisessiggemisch, 3:1) zugegeben, die Suspension durch einmaliges Schwenken vorsichtig gemischt und bei 1000 UpM für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde fast vollständig abgenommen und die Zellen im verbleibenden Rest durch vorsichtiges Klopfen resuspendiert.
6. Nach Zugabe von 5 ml Fixans wurden die Zellen bei 1000 UpM für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde fast vollständig abgenommen und die Zellen im verbleibenden Rest durch vorsichtiges Klopfen resuspendiert. Es folgte eine zweimalige Wiederholung dieses Schrittes.
7. Schließlich wurden die fixierten und resuspendierten Zellen in 500 µl Fixans aufgenommen und die Chromosomenpräparation („Spreitung“) wie folgt vorgenommen: 10 µl der Probe wurden langsam aus ca. 50 cm Höhe auf vorgekühlte Objektträger aufgetropft und die Objektträger luftgetrocknet.

3.2.4.5 Giemsa-Färbung

Für die Färbung wurde 1 ml verdünnte Giemsa-Lösung (1:10 in Natrium-Phosphatpuffer, pH 6,4) für 10 min auf die Spreitung gegeben, mit Leitungswasser und danach mit Aqua dest. abgespült. Die getrockneten Präparate wurden für 5 min in Xylol getaucht und mit Eukitt[®] eingedeckt.

3.2.4.6 Auswertung der Metaphasechromosomen

Die Auszählung der Metaphasechromosomen erfolgte mit dem Programm Photo Impact, Version 5.0. Die anschließende Bearbeitung wurde mit Photoshop C2, Version 8.0.1 durchgeführt.

3.2.5 Molekularbiologische Techniken

3.2.5.1 Vorbereitung des Untersuchungsmaterials für PCR und RT-PCR

Probenmaterial wurde mit dem „QIAamp[®] DNA Mini Kit“ aufgearbeitet. Für die Aufarbeitung von **Frischgewebe** fand das „Tissue Protocol“ des Herstellers mit geringen Modifikationen Anwendung. Das Gewebe wurde mit einem Lysispuffer und

Proteinase K über Nacht bei 56 °C auf einem Thermomixer verdaut. Abweichend von den Herstellerangaben wurde das Volumen der Proteinase-K-Lösung auf 40 µl verdoppelt. Die Lösung wurde in eine Säule überführt. Anschließend wurde mittels eines Zentrifugationsschrittes die DNA an eine Silica-Gel-Membran gebunden. Nach zwei Waschschrritten und kurzer Inkubation wurde die DNA durch Zentrifugieren mit 30 µl sterilem zweifach destillierten Wasser (SDW) eluiert. Für die Aufarbeitung von formalinfixiertem, in **Paraffin eingebetteten Gewebe** wurden zwei 20 µm dicke Schnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert und im Anschluss zweimal mit 100 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die DNA wie beschrieben extrahiert.

Zellen wurden in der Zellkulturflasche als Monolayer zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber gelöst und in 200 µl PBS aufgenommen. Danach wurde gemäß den Herstellerangaben das „Blood and Body Fluid Spin Protocol“ nach dem oben beschriebenen Prinzip durchgeführt.

Bei einer Konfluenz von ca. 75 % wurden 50 µl **Zellkulturüberstand** abgenommen und zur Denaturierung der Proteine bei 95 °C für 10 min erhitzt und danach auf Eis gestellt.

RNA aus Frischgewebe wurde unter Verwendung des „RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues“ aus dem RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben präpariert. Sarkoidgewebe wurde mit einem „Rotor-Homogenisator“ in einem Guanidinium-Isothiozyanat-Puffer zerkleinert und zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand durch Zentrifugation an eine Silica-Gel-Membran gebunden und nach drei Waschschrritten mit 30 µl SDW, das mit Diethylpyrocarbonat versetzt war (DEPC-SDW), eluiert.

3.2.5.2 Oligonukleotide (Primer) für die PCR

Für die PCR zum Nachweis von BPV-1-DNA wurden drei publizierte Primerpaare verwendet, die in den offenen Leserahmen von BPV-1 E5, E6 und E7 lokalisiert sind. Alle übrigen Primer wurden anhand einer BPV-1-DNA-Sequenz ermittelt (Chen et al., 1982). Zur Amplifikation von Abschnitten des Tumorsuppressorgenes PTEN wurden Primer gewählt, die auf der murinen cDNA-Sequenz beruhen (Steck et al., 1997).

Es wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide eine Länge von 18-22 Basen aufwiesen. Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden gleichlang gewählt. Die Primer beinhalteten nach Möglichkeit keine Komplementärstrukturen oder Palindrome am

3'-Ende, um die Bildung von „Primer-Dimer“ gering zu halten. Der GC-Gehalt betrug 50 %. Zur Errechnung der Schmelztemperatur wurde die Wallace-Regel verwendet (Wallace et al., 1979). Dazu wurde die Anzahl der Basen Adenin (A) und Thymin (T) bzw. Guanin (G) und Cytosin (C) bestimmt. Der A+T-Wert wurde mit 2, der G+C-Wert mit 4 multipliziert. Die Summe der Produkte ergab die Schmelztemperatur in °C. Die Annealingtemperatur der ausgewählten Oligonukleotide lag 6 °C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgeführt.

3.2.5.3 DNA-Amplifikation

Ein PCR-Ansatz von 25 µl enthielt 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1 % Triton[®]X-100, je 200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 0,2 µM der beiden Oligonukleotide, 3,5 mM MgCl₂, 0,6 U Taq-DNA-Polymerase, 1 µl des vorbereiteten Probenmaterials und SDW. Nach einer initialen Denaturierung (95 °C/5 min), wurden 30 Zyklen durchgeführt mit Denaturierung (95 °C/30 s), Anlagerung (jeweilige Annealingtemperatur/30 s) und Verlängerung (72 °C/30 s). Es schloss sich eine finale Verlängerungsphase (72 °C/10 min) an. Die DNA, die aus einem bovinen Fibropapillom extrahiert wurde, diente als Positivkontrolle für die BPV-1-PCR. Ein Reaktionsansatz ohne DNA wurde als Kontaminationskontrolle mitgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1,5 % Agarosegel visualisiert.

Tab. 6 Lokalisation, Sequenz und Annealingtemperaturen der Oligonukleotide für die PCR

Oligonukleotid	Lokalisation im Genom	Basensequenz (5' → 3')	Annealingtemperatur
E6 ⁺ E6 ⁻	91-110 482-501	ATG GAC CTG AAA CCT TTT GC TGG GTA TTT GGA CCT TGA AC	55°C
E7 ⁺ E7 ⁻	483-500 740-757	TTC AAG GTC CAA ATA CCC GCG TAA GAA CAC GGT TAG CT	55°C
E1-1+ E1-1-	711-730 1208-1227	TGA CTG TCT GCT GTG GAA AC GCG TAA GAA CAC GGT TAG CT	54°C
E1-2+ E1-2-	1165-1184 1658-1677	GAC GGA AAT CAG GAG CAA AG AGA ATA GAG CTG CGC TGA GT	54°C
E1-3+ E1-3-	1580-1599 2161-2180	AAC AGT CCG GAA TCT GAT GG GTT GCA GAG CAT AGA CTT GC	54°C
E1-E2+ E1-E2-	2141-2160 2611-2630	TAT TGG CCC TCC AAA CAC AG AAA CGT TCG CAT GCT GTC TC	54°C
E2+ E2-	2551-2570 3069-3088	TTG TAA GGT TAT GGG GGC GT TGC AGT AGT AGA GCC CAG TT	54°C
E4-1+ E4-1-	3015-3034 3420-3439	TTT GTA CAT GCG CAC AGA GG TGG AGG AAG AGC GGA GAA TA	54°C
E4-2+ E4-2-	3389-3408 3781-3800	CCT ACA ATT TTC CTG CAG GC TCC AGG AGG TAG TGG TAC AT	54°C
E5 ⁺ E5 ⁻	3759-3782 3981-4002	CAA AGG CAA GAC TTT CTG AAA CAT AGA CCT GTA CAG GAG CAC TCA A	63°C
L1+ L1-	3981-4000 4581-4600	TTG AGT GCT CCT GTA CAG GT GAA CAG CAT CAG GAG TGA CT	54°C
L1-2+ L1-2-	4543-4562 5051-5070	GTG TAT GAG GAC ACT GTG CT ACG TCC ACT AGG TCC CTT AA	54°C
L1-L2+ L1-L2-	5031-5050 5623-5642	TGA AGC AGA ACC AGC TGT GC AGA TAC AGC TTC TGG CCT TG	54°C
L2+ L2-	5532-5551 6081-6100	CAG CAG TAA CTA CAC CTT GC AAT ATT CCC CTT CAG CAG GG	54°C
L2-2+ L2-2-	6024-6043 6631-6650	CAG GAA ACA AAC AGG CCT AG GTT CCA TCT GAG GCT ACA CT	54°C
L2-3+ L2-3-	6599-6612 7173-7192	GGG ACA ATA CAC GTG GTA CT CAA CTG ACA CAG CAC ATT GC	54°C
NCR1+ NCR1-	6910-6929 7419-7438	GAA GAC CCT TAT GCA GGG TT AAG CGT GTC GCT TTC GCT TT	54°C
NCR2+ NCR2-	7342-7361 7634-7653	ATC AAT GGG ACG CGT GCA AA AGC CCC AAA CCT ATA TCG GT	54°C
NCR3+ E6A-	7569-7588 280-299	TTT TGG AGG ATT AGA CGG GG ACT GGA ACA CCT TGC CAA AG	54°C
PTEN+ PTEN-		GGC TAG CAG TTC AAC TTC TG CTG TTG CCA CAA GTG CAA AG	54°C

1 Teifke, 1993

2 Nasir und Reid, 1999

3.2.5.4 RT-PCR

Die cDNA-Synthese wurde in 12 μl Ansätzen durchgeführt. Hierzu wurden 2 μl der extrahierten RNA mit 0,4 μM Rückwärtsprimer versetzt, mit DEPC-SDW auf 9,5 μl aufgefüllt und für 5 min auf 65 °C erhitzt. Danach wurde der Ansatz in Schritten von 1 °C/10 s bis auf 20 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden 1,5 μl 5 x RT-Puffer (31,25 mM Tris-HCl [pH 8,3]; 31,25 mM KCl; 6,25 mM MgCl_2 , 312,5 μM Spermidin, 6,25 mM DTT), je 240 μM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 U RNasin[®] und 2,5 U AMV Reverse Transkriptase zugefügt, der Ansatz gemischt und zentrifugiert. Es schloss sich eine Inkubation von 60 min bei 42 °C an. Eine Erhitzung für 5 min auf 95 °C und anschließendes Kühlen auf Eis führten eine Inaktivierung der Reaktion herbei.

Abweichend von dem unter Punkt 3.2.5.3 beschriebenen Reaktionsansatz wurde für die RT-PCR der Rückwärtsprimer auf 0,08 μM reduziert.

3.2.5.5 DNA-Sequenzierung

3.2.5.5.1 Ligation

Zur Ligation der PCR-Produkte wurde das „pGEM[®]-T-Easy-Vector-System“ verwendet. Die Zusammensetzung des über Nacht bei 4 °C inkubierten Ligationsansatzes ist aus Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab. 7 Zusammensetzung des Ligationsansatzes

2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	2,5 μl
pGEM [®] -T Easy Vector	0,5 μl
T4 DNA Ligase	0,5 μl (3 U/ μl)
PCR-Produkt	1,0 μl
SDW	0,5 μl
	5,0 μl

3.2.5.5.2 Transformation

Nach 12 h wurden kompetente *Escherichia coli* (JM109 Zellen) mit 1 bis 100 ng der ligierten Plasmid-DNA transformiert. Hierzu wurden 2,5 μl des Ligationsansatzes vorsichtig in 25 μl frisch aufgetaute JM109-Zellen eingerührt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 50 s einem Temperaturschock in einem 42 °C

Wasserbad unterzogen und unmittelbar danach für weitere 2 min auf Eis gekühlt. Nachdem 475 µl SOC-Medium zugesetzt worden waren, inkubierte die Transformationsreaktion für 90 min bei 37 °C auf dem Thermomixer bei 300 UpM. Danach wurden 50-100 µl des Reaktionsansatzes auf einer LB-Agarplatte mit Hilfe eines Drigalskispatels verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Beim pGEM[®]-T-Easy-Vector-System ist eine blau/weiß-Selektion der Kolonien möglich, da Kolonien ohne Insert an ihrer blauen Färbung zu erkennen sind. Weiße Kolonien mit Insert wurden mit einem Zahnstocher angepickt und hiermit je 2,5 ml LB-Medium beimpft. Es schloss sich eine Inkubation über Nacht bei 37 °C in einem Bakterieneschüttler an.

3.2.5.5.3 Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Nach 16 h Inkubation wurde 1 ml der Kulturflüssigkeit abgenommen, in einer Tischzentrifuge 30 s bei 13000 UpM zentrifugiert und die Bakterien pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Plasmid-DNA wurde dann mit dem „GFX Micro Plasmid Prep Kit“ gemäß den Herstellerangaben durch alkalische Lyse aufgearbeitet und mit 30 µl SDW eluiert. Durch Behandlung mit der Restriktionsendonuklease EcoRI für 2 h bei 37 °C wurde das Insert aus dem Vektor gespalten, anschließend elektrophoretisch getrennt und in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1,5 % Agarosegel visualisiert. So konnte die korrekte Größe des Inserts überprüft werden. Die Zusammensetzung des Spaltansatzes ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tab. 8 Zusammensetzung des Spaltansatzes

Plasmid-DNA	2,0 µl
Puffer H, 10x	2,0 µl
EcoRI	0,4 µl (12 U/µl)
SDW	15,6 µl
	20,0 µl

3.2.5.5.4 Sequenzierungsreaktion

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach dem von Sanger et al. (1977) beschriebenen Prinzip der Strangabbruchmethode mit Fluorochrom-markierten Oligonukleotidprimern, deren Sequenz homolog zu der des verwendeten Vektors war. Die DNA-Synthese erfolgte in vier Parallelansätzen, die neben den normalen Desoxynukleotiden jeweils ein

Didesoxynukleotid in geringerer Molarität enthielten, dessen zufälliger Einbau an der Position der entsprechenden Base während der DNA-Synthese zum Abbruch der Kettenreaktion führte. Anschließend wurde die DNA auf ein Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Anhand des Bandenmusters der unterschiedlich großen Fluorochrom-markierten Fragmente konnte die DNA-Sequenz abgelesen werden (Elektrophorese und Auswertung wurden von G. Strebelow am Institut für Virusdiagnostik, FLI Insel Riems durchgeführt).

Für die automatische Sequenzierung wurde zunächst ein „Master Mix“ angesetzt. Je 2,25 µl hiervon wurden mit 0,75 µl des A-, C-, G- oder T-Reagens des „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-Deaza-dGTP“ versetzt und mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Die Zusammensetzung des „Master Mix“ ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tab. 9 Zusammensetzung des „Master Mix“ für die Sequenzierungsreaktion

Plasmid-DNA	50-100 ng
Fluorochrom-markierter Primer	2 pM
DMSO	0,35 µl
SDW	ad 10,5 µl

Im Thermocycler wurde die DNA für 2 min bei 95 °C denaturiert und anschließend während 15 Zyklen mit Denaturierung (95 °C/15 s), Anlagerung (SP 6-Primer: 42 °C, T7-Primer: 48 °C/15 s) und Verlängerung (70 °C/30 s) synthetisiert. Es schlossen sich 15 Zyklen an (95 °C/30 s, 70 °C/30 s). Nach Programmende wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl des formamidhaltigen Ladepuffers gestoppt.

3.2.5.6 Southern Blot

3.2.5.6.1 DNA-Extraktion nach Hirt

Virale DNA wurde aus den Zellen mit der Methode nach Hirt (1967) extrahiert. Durch den SDS-Gehalt im Hirt-Lysispuffer konnte zelluläre DNA mittels Zentrifugation separiert und selektiv die virale DNA aufgearbeitet werden. Als Ausgangsmaterial wurden ca. 10^7 Zellen aus einer dicht bewachsenen 75 ml-Zellkulturflasche verwendet. Das Vorhandensein von BPV-DNA in den Zellen war zuvor mittels PCR überprüft

worden. Als Negativkontrolle wurden normale equine Fibroblasten aufgearbeitet. Die Inkubationsschritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur.

1. Absaugen des Zellkulturmediums, zweimaliges Spülen des Monolayers mit PBS
2. Zugabe von 15 ml Hirt Lysispuffer für 20 min
3. Abschaben und anschließende Überführung des Lysates in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen
4. Zugabe von 3,75 ml 5 M NaCl
5. Inkubieren über Nacht bei 4 °C
6. Zentrifugation bei 11000 UpM für 45 min bei 4°C
7. Überführen des Überstandes in ein neues Zentrifugationsröhrchen
8. Zugabe von 50 µl RNase A (20 mg/ml)
9. Inkubieren für 1 h bei 37 °C
10. Zugabe von Phenol (pH 7,5-8,0) im Verhältnis 1:1, gründliches Mischen
11. Inkubieren für 5 min auf Eis
12. Zentrifugieren bei 4000 UpM für 10 min bei 4°C
13. Überführen der wässrigen Phase in ein neues Zentrifugationsröhrchen
14. Die Schritte 10-13 wurden jeweils einmal mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) und einem Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) wiederholt.
15. Zugabe von 1,5 ml 3 M Natriumazetat und 45 ml eisgekühltem Ethanol (96 %)
16. Fällung der DNA über Nacht bei -20 °C
17. Zentrifugieren bei 10000 UpM für 30 min bei 4°C
18. Waschen des Pellets mit eisgekühltem Ethanol (70 %)
19. Zentrifugieren bei 10000 UpM für 10 min bei 4°C
20. Resuspendieren der DNA mit 400 µl SDW und Überführen in ein 1,5 ml Zentrifugationsröhrchen
21. Zugabe von 0,4 µl 3 M Natriumazetat und 1000 µl eisgekühltem Ethanol (96 %)
22. Fällung der DNA über Nacht bei -20°C
23. Zentrifugieren bei 13000 UpM für 30 min bei 4 °C
24. Waschen des Pellets mit eisgekühltem Ethanol (70 %)
25. Zentrifugieren bei 13000 UpM für 10 min bei 4 °C
26. Resuspendieren der DNA in 50 µl SDW

Für den Southern Blot wurde die extrahierte episomale und zirkuläre DNA durch EcoRI für 2 h bei 37 °C gespalten und linearisiert. Die Zusammensetzung des Spaltansatzes ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tab. 10 Zusammensetzung des Spaltansatzes für den Southern Blot

DNA	10 µl (ca. 2000 µg/ml)
Puffer H	4 µl
EcoRI	8 µl (12 U/µl)
SDW	18 µl
	40 µl

3.2.5.6.2 Membrantransfer

Die DNA wurde auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und während einer 120 min dauernden Elektrophorese getrennt. Danach wurde durch 2 x 15 min Inkubation des Gels in alkalischer Transferlösung die DNA denaturiert. Die Nylonmembran und das Filterpapier wurden in der Transferlösung äquilibriert. Anschließend wurde der Blot wie folgt aufgebaut:

1. Plastikunterlage (20 x 20 cm)
2. 4 x Filterpapier 3 mm (8 x 10 cm)
3. Agarosegel, Slots nach oben (6 x 9,5 cm)
4. Plastikfolie mit einem Loch (6 x 9,5 cm) und Parafilm zur Abdichtung der Filterpapierränder
5. Nylonmembran (6 x 9,5 cm)
6. 2 x Filterpapier 3 mm (8 x 10 cm)
7. 2 x Filterpapier 3 mm (8 x 10 cm), trocken
8. Papierhandtücherstapel 5 – 7 cm hoch (9 x 11 cm)
9. Plastikdeckel (8 x 10 cm)
10. Gewicht (500 g)

Jede Schicht des Blots wurde mit einem Glasstab geglättet, um Luftblasen zu verhindern. Durch den Parafilm wurde ein Kurzschluss zwischen den Filterpapierlagen verhindert. Der Transfer fand über Nacht statt. Die Membran wurde im Anschluss mit 2 x SSC-Puffer gewaschen (2 x 15 min). Danach wurden die DNA durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert und die Membran luftgetrocknet.

3.2.5.6.3 Prähybridisierung, Hybridisierung, Antikörperbindungs- und Chemilumineszenz-Reaktion

Die Prähybridisierung zur Absättigung unspezifischer DNA-Bindungsstellen wurde 1 h bei 46 °C in DIG-Easy-Hyb-Prähybridisierungslösung durchgeführt. Es schloss sich eine Hybridisierung mit 2 ml Hybridisierungslösung über Nacht an. Die verwendete Hybridisierungslösung bestand aus einer Mischung der drei DIG-markierten Sonden E2, L2 und NCR (Sondenkonzentration ungefähr 500 ng/ml), die im Verhältnis 1:50 mit der Prähybridisierungslösung gemischt wurden. Die DIG-markierten DNA-Sonden wurden unter Verwendung der Oligonukleotidpaare E2, L2 und NCR2 nach dem unter Punkt 3.2.3 beschriebenen Protokoll hergestellt. Nach Gebrauch wurden die Sonden bei -20 °C gelagert und mehrfach verwendet. Im Anschluß an die Hybridisierung wurde die Membran zunächst bei 40 °C in 2 x SSC + 0,1 % SDS (2 x 10 min) und dann bei 50 °C in 0,2 x SSC + 0,1 % SDS stringent gewaschen.

Zur Äquilibrierung wurde nach den Waschschritten die Membran in Maleinpuffer für 10 min inkubiert. Nachfolgend wurde Maleinpuffer mit Blockierungslösung im Verhältnis 1:10 versetzt und die Membran zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen für 30 min in der Hälfte des angesetzten Puffers belassen. Der restliche Puffer wurde verwendet, um das Schaf-Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat 1:5000 zu verdünnen. In dieser Antikörperlösung inkubierte die Membran nachfolgend für 60 min. In zwei Waschschritten (je 15 min) mit Maleinpuffer wurden ungebundene Antikörper entfernt. Nach 5 min Äquilibrierung im Detektionspuffer schloss sich die Chemilumineszenz-Reaktion an. Dafür wurde die Membran in Plastikfolie gelegt und 2 bis 3 Tropfen SB-CSPD Lösung aufgetropft. Es wurde darauf geachtet, dass alle Luftblasen entfernt wurden. Die Reaktion fand bei 37 °C für 10 min statt.

Anschließend wurde die Membran in eine neue Folie gelegt und in einer Kassette auf einen Film aufgelegt, für 3 h belichtet und entwickelt.

3.2.5.7 Western Blot

3.2.5.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Gewinnung von Proteinen wurden ca. stecknadelkopfgröße Gewebeproben in 100 µl PAGE-Probenpuffer bzw. Zellen (ca. 10⁶) in 1 ml PAGE-Probenpuffer aufgenommen und mittels Ultraschallbehandlung für 2 min aufgeschlossen. Es wurden

20 µl pro Gelspur auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proben anschließend in einer Gelapparatur in SDS-Elektrophoresepuffer für 45 min bei 200 Volt aufgetrennt bis der Bromphenolblaumarker das Gel vollständig durchlaufen hatte.

3.2.5.7.2 Membrantransfer

Die Proteine wurden in einer „Semidry-Western-Blot-Apparatur“ für 2 h bei 18 Volt auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zuvor wurden Filterpapier und Nitrozellulosemembran in Transferpuffer eingeweicht. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

1. 4 x Filterpapier 3 mm (8 x 10 cm)
2. Polyacrylamidgel
3. Nitrozellulosemembran
4. 4 x Filterpapier 3 mm (8 x 10 cm)

Die einzelnen Lagen wurden mit einem Glasstab geglättet und so die Luftblasen entfernt.

3.2.5.7.3 Inkubation mit dem Antikörper und Chemilumineszenz-Reaktion

1. Blockieren der unspezifischen Bindungen mit 5%iger Magermilch über Nacht
2. Spülen mit Waschpuffer (3 x 15 min)
3. Inkubieren mit dem Primärantikörper für 60 min, Verdünnung in Magermilch entsprechend Tabelle 11
4. Spülen mit Waschpuffer (3 x 15 min)
5. Inkubieren mit dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper, Verdünnung in Magermilch entsprechend Tabelle 11
6. Spülen mit Waschpuffer (3 x 15 min)
7. Chemilumineszenz-Reaktion mit „SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate“ (10 min), dafür wurde das Reagens zuvor nach Herstellerangaben gemischt.
8. Zur Belichtung wurde die Membran auf einen Film aufgelegt (15 s).
9. Filmentwicklung

Die für den Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper und die Anwendungsverdünnung sind aus Tabelle 11 ersichtlich.

Tab. 11 Anwendungsverdünnungen der primären und sekundären Antikörper

Antigen	Antikörperherkunft	Verdünnung
PTEN/MMAC1	Kaninchen	1:100
Anti-Kaninchen POD	Ziege	1:20000

3.2.6 Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität

Um die Auswirkung verschiedener Testsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von Sarkoidzellen und normalen Fibroblasten zu analysieren, wurde die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität mittels „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“, dem sogenannten „MTS-Proliferationassay“ bestimmt. Hierzu wurde eine wässrige Lösung, bestehend aus MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-5-(carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] und PES (Phenazin Ethosulfat) als Elektronendonator auf Zellen gegeben. Die mitochondrialen Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen reduzieren mit Hilfe von NADH und NADPH das MTS zu wasserlöslichem Formazan. Die Menge des gelösten Formazans verhält sich proportional zur Zahl der stoffwechselaktiven Zellen und kann kolorimetrisch bei einem Absorptionsmaximum von 490 (\pm 40) nm gemessen werden. Für diesen Test wurden nach Ermittlung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer) 5000 Zellen pro Loch („well“) in einer 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. 24 h später wurde das Medium durch 100 μ l Medium mit Substrat in den entsprechenden Konzentrationen (Tab. 12) ersetzt und die Zellproliferation nach jeweils 1 h, 24 h, 48 h, 72 h und nach 96 h ermittelt. Dazu wurde die optische Dichte (Absorption) bei 492 nm in einem 96-Loch-Zellkulturplatten-Lesegerät festgestellt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden pro Verdünnungsstufe und pro Zeitwert fünf verschiedene Werte ermittelt und daraus Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Standardabweichung wurde mittels t-Test nach Student ermittelt und die Signifikanzschwelle nach Bonferroni adjustiert (die statistische Analyse wurde von Herrn Dr. G. Franke, RIEMSER Arzneimittel AG durchgeführt). In 3 Löchern pro Platte wurde Medium ohne Zellen gemessen, um die Hintergrundabsorption zu bestimmen. Diese wurde von den anderen Werten subtrahiert. Mit Ausnahme von AIM (aktiver Immunmodulator), lagen die Substrate als Trockensubstanz vor. CHP und Foscarnet-Natrium wurden in Aqua dest. gelöst, Immodin in beigefügtem *Aqua ad injectabilia*. Sanguinarin wurde in ZB 5-Medium gelöst. Bei AIM 1-5 handelte es sich bereits um Zellkulturüberstände mit fünf

verschiedenen geernteten und anschließend inaktivierten attenuierten Pockenviren mit einem Titer von ca. 10^7 Viruspartikeln (VP)/ml. Aufgrund der geringen Substratmenge wurden die Untersuchungen mit Immodin nur in drei Löchern je Konzentration untersucht. Auf eine statistische Auswertung wurde daher in diesem Fall verzichtet.

Tab. 12 Für den „MTS-Proliferationsassay“ verwendete Substrate und Anwendungsverdünnungen

Substrat	Konzentration
AIM 1-5	Viruspartikel: $1,25 \times 10^6$ /ml, $6,25 \times 10^5$ /ml, $3,13 \times 10^5$ /ml, $1,56 \times 10^5$ /ml
CHP	200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12,5 μ g/ml, 6,25 μ g/ml, 3,13 μ g/ml, 1,56 μ g/ml, 0,78 μ g/ml, 0,39 μ g/ml
Immodin	66 %, 33 %, 16,5 %, 8,25 %
Foscarnet-Natrium	32 mM, 16 mM, 8 mM, 4 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM
Sanguinarin	35 μ M, 32,5 μ M, 30 μ M, 27,5 μ M, 25 μ M, 22,5 μ M, 20 μ M, 17,5 μ M, 15 μ M, 12,5 μ M, 10 μ M

3.2.7 CFSE-Proliferationsassay

Um die Auswirkung der Testsubstanzen auf die Proliferation der Zellen zu untersuchen, und um Proliferation mit der Stoffwechselaktivität zu vergleichen, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Die Markierung mit 5/6-Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidyl-Ester (CFSE) wurde in serumfreiem Medium (ZB 5C) durchgeführt. CFSE wird intrazellulär gebunden und bei jeder Zellteilung in gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben (Lyons und Parish, 1994). Dadurch kommt es mit jeder Zellteilung zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dafür mussten die Zellen einer 75 ml-Zellkulturflasche nachdem sie mit ATV abgelöst worden waren, in 10 ml serumfreiem Medium aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt werden. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 800 UpM für 5 min an. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml ZB 5C vorsichtig resuspendiert. Dieser Vorgang wiederholte sich noch zweimal. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer in ZB 5C auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und 2 μ l CFSE/ml zugegeben. Die Lösung wurde durch Schwenken vorsichtig gemischt und bei 37 °C für 10 min inkubiert. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wurde der Ansatz nochmals vorsichtig geschwenkt. Durch Zugabe von 9 ml serumhaltigen Mediums wurde die Reaktion abgestoppt. Nachfolgend

wurden 10^5 Zellen pro Loch in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät, bzw. im Falle der normalen Fibroblasten 2×10^5 Zellen pro Loch, die verschiedenen Testsubstanzen in entsprechenden Konzentrationen zugegeben, die Zellkulturplatte mit Parafilm® abgedichtet und bei 37 °C inkubiert. Für den CFSE-Proliferationsassay wurde Immodin in ZB 5 gelöst. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden pro Verdünnungsstufe die Zellen von je einem Loch mit ATV abgenommen, bei 800 UpM für 10 min pelletiert, vorsichtig in 500 µl PBS resuspendiert und in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde im Durchflusszytometer (FACS) gemessen und im Histogramm-Plot dargestellt (Proliferationsassay und Auswertung wurden in Zusammenarbeit mit Dr. U. Blohm am Institut für Infektionsmedizin, FLI Insel Riems durchgeführt).

3.2.8 Hamstermodell

Zur Zucht von acht Tage alten Hamstern für einen Infektionsversuch wurden zwei Hamster dauerhaft paarweise in Typ III-Makrolonkäfigen gehalten. Die Männchen verblieben auch während der gesamten Trächtigkeit und der Aufzucht bei den Weibchen. Die Jungtiere wurden am 18. Tag abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von maximal sechs Tieren gehalten. Sowohl den infizierten Tieren als auch den Zuchttieren stand „ssniff® HA Alleinfuttermittel für Hamster“ und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Als Inokulum diente eine von Herrn Dr. W. Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellte BPV-1-Suspension. Zur Herstellung dieser BPV-1-Suspension wurden Rinderpapillome oberflächlich von Verunreinigungen befreit, mehrfach mit antibiotika- und antimykotikaversetztem PBS (Penicillin, Streptomycin, Gentamycin, Enrofloxacin, Amphotericin) gespült und schließlich mit PBS homogenisiert. Der Überstand wurde mittels Zentrifugation geklärt und anschließend sterilfiltriert. Im elektronenmikroskopischen Bild konnte die Konzentration auf ca. 10^6 Viruspartikel/ml geschätzt werden. Die Infektion erfolgte am 7. Lebenstag der Jungtiere. Hierzu wurden im Nackenbereich subkutan 150 µl der BPV-1-Suspension injiziert. Da Hamster sehr empfindlich auf Störungen reagieren und die Elterntiere dazu neigen, bei jeglichen Irritationen ihre Nachzucht zu fressen, wurde auf eine klinische Untersuchung der Jungtiere an den Folgetagen der Infektion verzichtet. Nach dem Absetzen wurden die Tiere im Abstand von zwei Wochen im Hinblick auf die Entwicklung von Tumoren

klinisch untersucht. Zucht und Infektion von Jungtieren fand während der Dauer von acht Monaten statt. Am Ende des Beobachtungszeitraumes, d. h. 13 Monate nach der ersten Infektion, standen insgesamt 77 infizierte Hamster zur Verfügung.

Insgesamt zwölf Hamster mit Tumoren wurden für einen Orientierungsversuch zur Überprüfung der Wirksamkeit von drei verschiedenen Substanzen verwendet. Die einzelnen Gruppen bestanden aus jeweils drei Hamstern. Zur Behandlung wurden XXTerraTM, CHP und die Foscarnet-Natrium-haltige Triapten[®] Antiviralcreme ausgewählt. XXTerraTM wurde nach Herstellerangaben an vier aufeinander folgenden Tagen messerrückendick auf die Tumoren der Hamster von Gruppe I aufgetragen. Jedem Behandlungsintervall folgten drei behandlungsfreie Tage. Es wurden insgesamt drei Behandlungsintervalle durchgeführt. Den Hamstern in Gruppe II wurde täglich 72 µg CHP in Leitungswasser gelöst per os verabreicht. Die Behandlung wurde 21 Tage durchgeführt. Die Hamstertumoren der Gruppe III wurden dreimal täglich mit Triapten[®] Antiviralcreme behandelt. Auch hier wurde die Behandlung über den Zeitraum von drei Wochen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Gruppe dreimal täglich mit einem Placebo behandelt. Hierfür fand Elasan[®]-Körperlotion Anwendung. Es erfolgte jeden Tag eine klinische Untersuchung der Hamster. Zur Vermessung der Tumoren zu Versuchsbeginn und einmal pro Woche sowie zur Fotodokumentation wurden die Hamster mit Isofluran kurzzeitig narkotisiert

Am Ende jeder Behandlungswoche wurde ein Tier pro Gruppe entnommen, mittels CO₂-Inhalation getötet und anschließend seziiert. Nach der makroskopischen Untersuchung des Tumors und des Tierkörpers wurden für die histopathologische Begutachtung Gewebeproben von Tumor, Lunge, Herz, Leber, Milz, Nieren und Darm in Formalin fixiert und wie unter den Punkten 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Das gleiche Probenspektrum wurde für eine bakteriologische Untersuchung entnommen. Zusätzlich erfolgte eine Kryokonservierung von Tumormaterial bei -70° C für eine Nukleinsäureextraktion.

4 Ergebnisse

4.1 Histopathologische Klassifikation der equinen Sarkoide

Mit dem Ziel, primäre Zelllinien von equinen Sarkoiden zu etablieren und ein In-vitro-Modell zur Untersuchung proliferationshemmender Substanzen zu entwickeln, wurden in der Zeit von 2002 bis 2007 insgesamt 31 Tumoren mit der Verdachtsdiagnose „Equines Sarkoid“ histopathologisch untersucht und nach Ragland et al. (1970) klassifiziert. Bei 30 Tumoren konnte die klinische Verdachtsdiagnose histopathologisch bestätigt werden. Equine Sarkoide sind durch eine Proliferation fibroblastenähnlicher spindelförmiger Tumorzellen gekennzeichnet, die in wechselnden Anteilen mit Akanthose, Hyper- und Parakeratose, aber auch mit großflächiger Ulzeration einhergehen kann. Weil bei einem equinen Sarkoid noch zusätzlich eine ausgeprägte diffuse eosinophile Dermatitis unklarer Ätiologie vorlag, wurden die hiervon angelegten Zellen nicht weiter verwendet. Die Verteilung der Tumoren auf die verschiedenen histologischen Typen ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13 Histopathologische Klassifikation der equinen Sarkoide, von denen Primärkulturen angelegt wurden (n = 29)

Sarkoidtyp	Anzahl
Fibroblastischer Typ	19
Verruköser Typ	3
Gemischter Typ	7

4.2 Immunhistologische Charakterisierung der equinen Sarkoide

Insgesamt fünf Tumoren wurden immunhistologisch näher charakterisiert. Die epitheliale Komponente des Tumors zeigte sich in allen Fällen positiv für die **Zytokeratine 1-8, 10, 13, 14, 15, 16** und **19**. Die mesenchymalen Tumorzellen reagierten dahingegen nur zu einem geringen Anteil mit dem Antikörper gegen **Vimentin**. Zahlreiche Tumorzellen mit kräftigen intrazytoplasmatischen Signalen waren im Bereich des dermoepidermalen Überganges, vor allem in unmittelbarer Nähe der Reteleisten vorhanden, während in der Tiefe des Tumors nur noch einzelne Zellen positiv reagierten (Abb. 3).

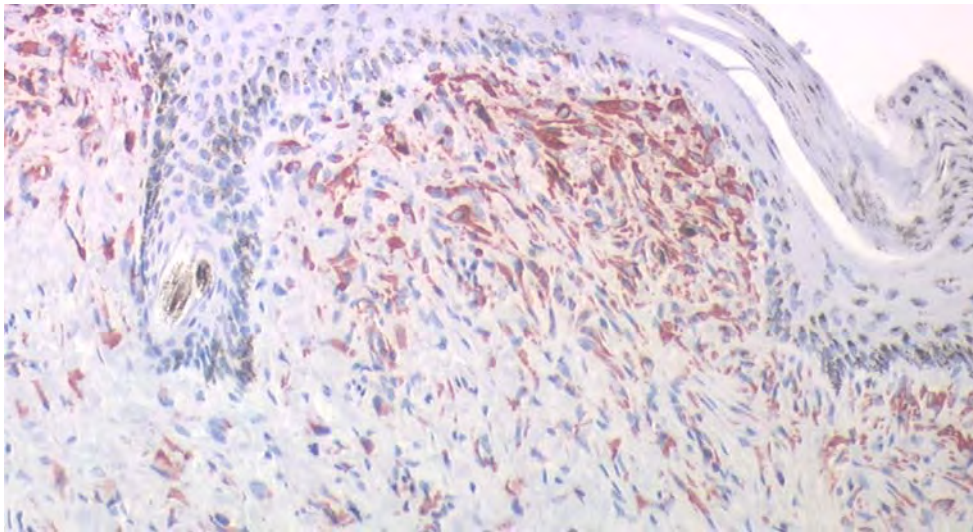


Abb. 3 **Equines Sarkoid, fibroblastischer Typ, Pferd. Immunhistologische Darstellung von Vimentin.**

Kräftiges intrazytoplasmatisches Signal in den fibroblastenähnlichen Tumorzellen im Bereich des dermoepidermalen Überganges mit abnehmender Anzahl positiver Zellen in der Tiefe des Tumors. 200x.

4.3 Nachweis von BPV in equinen Sarkoiden

Zur Absicherung der histopathologischen und ätiologischen Diagnose wurden die Sarkoide auf das Vorliegen von BPV-DNA untersucht. Hierzu kamen PCR mit nachfolgender Sequenzierung der Amplifikate und ISH zur Anwendung.

4.3.1 PCR

Mittels PCR und nachfolgender Restriktionsendonukleasespaltung konnte ein E5-Genfragment von BPV-1 in allen 29 equinen Sarkoiden nachgewiesen werden. Darüber hinaus war es möglich exemplarisch mittels 18 zusätzlicher neu etablierter Oligonukleotidpaare das komplette Genom von BPV-1 in dem fibroblastischen Sarkoid E 84/04 nachzuweisen. Für alle Primerpaare zeigten alle Amplifikationsprodukte nach Agarosegelelektrophorese die erwarteten Größen (Abb. 4).

4.3.2 Sequenzierung

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurden die 19 erhaltenen PCR-Produkte sequenziert, geordnet und mittels Datenbankanalyse (GenBank) als BPV-1 identifiziert. Die erhaltene Sequenz war 7942 bp lang und ist im Anhang dargestellt. Sie ist zu 98 % mit einer publizierten BPV-1 Sequenz identisch (Chen et al., 1982).



Abb. 4 PCR-Amplifikationsprodukte, equines Sarkoid E 84/04, in Reihenfolge ihrer Lokalisation im BPV-Genom aufgetragen.

M: Marker, 100 bp-Leiter; **1:** E6+/E6- (411 bp); **2:** E7+/E7- (275 bp); **3:** E1-1+/E1-1- (517 bp); **4:** E1-2+/E1-2- (513 bp); **5:** E1-3+/E1-3- (601 bp); **6:** E1-E2+/E1-E2- (490 bp); **7:** E2+/E2- (538 bp); **8:** E4-1+/E4-1- (425 bp); **9:** E4-2+/E4-2- (412 bp); **10:** E5+/E5- (244 bp); **11:** L1+/L1- (620 bp); **12:** L1-2+/L1-2- (528 bp); **13:** L1-L2+/L1-L2- (611 bp); **14:** L2+/L2- (569 bp); **15:** L2-2+/L2-2- (627 bp); **16:** L2-3+/L2-3- (592 bp); **17:** NCR1+/NCR1- (529 bp); **18:** NCR2+/NCR2- (312 bp); **19:** NCR3+/E6A- (676 bp).

4.3.3 In-situ-Hybridisierung (ISH)

Für die ISH wurden Sonden aus den offenen Leserahmen von E1, E2 und E5 verwendet. Als Positivkontrolle dienten Schnitte eines durch BPV-1 induzierten bovinen Fibropapillomes, in denen BPV-1-DNA in epithelialen und mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden konnte. Jede Sonde führte in gleichem Maße in Sarkoidgewebe zum Nachweis von BPV-1-DNA in den Zellkernen der mesenchymalen Tumorzellen, vor allem im Bereich des dermoepidermalen Überganges (Abb. 5). Es war jedoch nicht möglich, BPV-DNA im Epithel der equinen Sarkoide nachzuweisen. Bei einem durch BPV-2 verursachten Fibropapillom des Rindes war es zwar möglich, mit der E5-Sonde Hybridisierungssignale zu erhalten, nicht jedoch mit den für E1 und E2 spezifischen Sonden.

4.3.4 Immunhistologie

Mit einem polyklonalen Antiserum sollte immunhistologisch die Expression von **BPV-1 E5** am Paraffinschnitt untersucht werden. Als Positivkontrolle diente ein bovines

Fibropapillom, dessen Epithelzellen ein kräftiges zytoplasmatisches Signal zeigten (Abb. 6). Bei den untersuchten equinen Sarkoiden konnte in keinem Fall ein für das E5-Protein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Vielmehr fand sich eine unspezifische Reaktion in allen epithelialen und mesenchymalen Sarkoidzellen.

Der immunhistologische Nachweis von gruppenspezifischem **Papillomvirusantigen** war in den equinen Sarkoiden nicht möglich. Das als Positivkontrolle mitgeführte bovine Papillom zeigte hingegen ein kräftiges intrazytoplasmatisches Signal in der suprabasalen Schicht, aber auch in den Koilozyten und verhornten Epithelzellen.

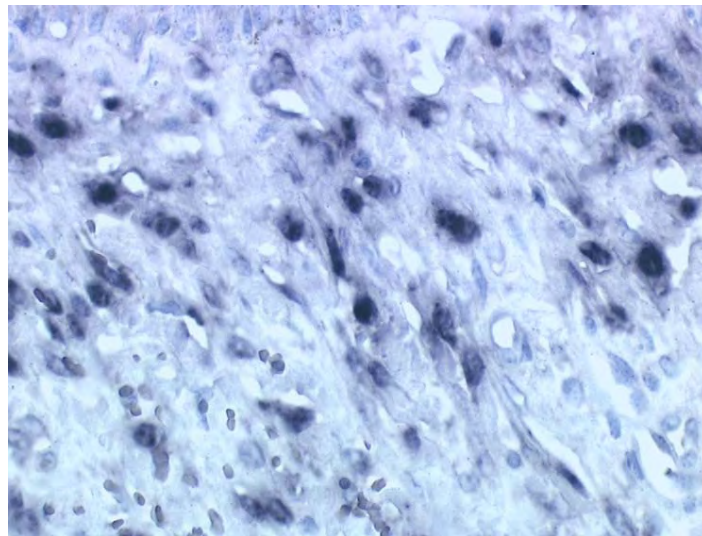


Abb. 5 **Equines Sarkoid, fibroblastischer Typ, Pferd. ISH.**

Kräftiges intranukleäres Hybridisierungssignal in den fibroblastenähnlichen Tumorzellen mit einer Sonde spezifisch für das E5-Gen von BPV-1. 400x.

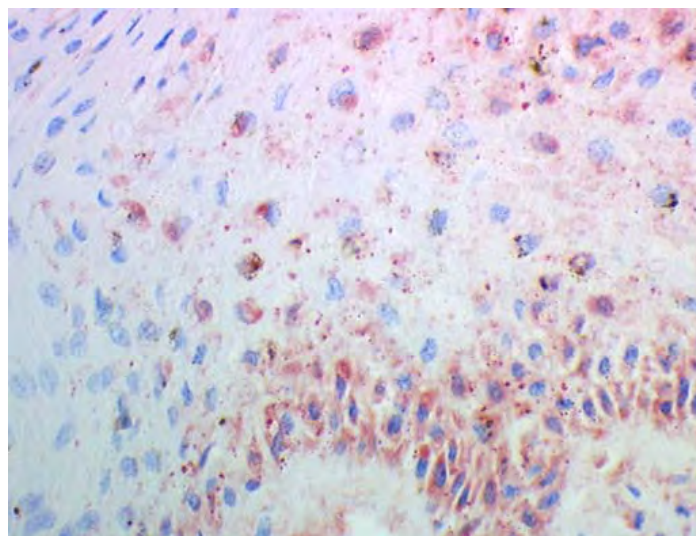


Abb. 6 **Bovines Papillom, Rind. Immunhistologische Darstellung von BPV-1 E5.**

Kräftige intrazytoplasmatische Signale im gesamten Epithel, vor allem in suprabasalen Keratinozyten, sprechen für die Expression des Onkoproteins E5. 400x.

4.4 Zellproliferation und Zellzyklussteuerung in equinen Sarkoiden

Antikörper gegen **PCNA** und **Ki67** fanden Anwendung zum Nachweis proliferierender Zellen. Beide Antikörper markierten die Kerne von teilungsaktiven Tumorzellen, besonders in epithelnahen Schichten. Allerdings gab es erhebliche quantitative Unterschiede. Während zahlreiche Zellen positiv für PCNA waren (Abb. 7A), zeigten nur vereinzelte Zellen ein positives Signal nach Inkubation mit dem Ki67-Antikörper. So ergab die Quantifizierung PCNA-positiver Zellen in einem Sarkoid vom Mischtyp ca. 67 %, während nur 2 % der Tumorzellen für Ki67 positiv reagierten (Abb. 7B).

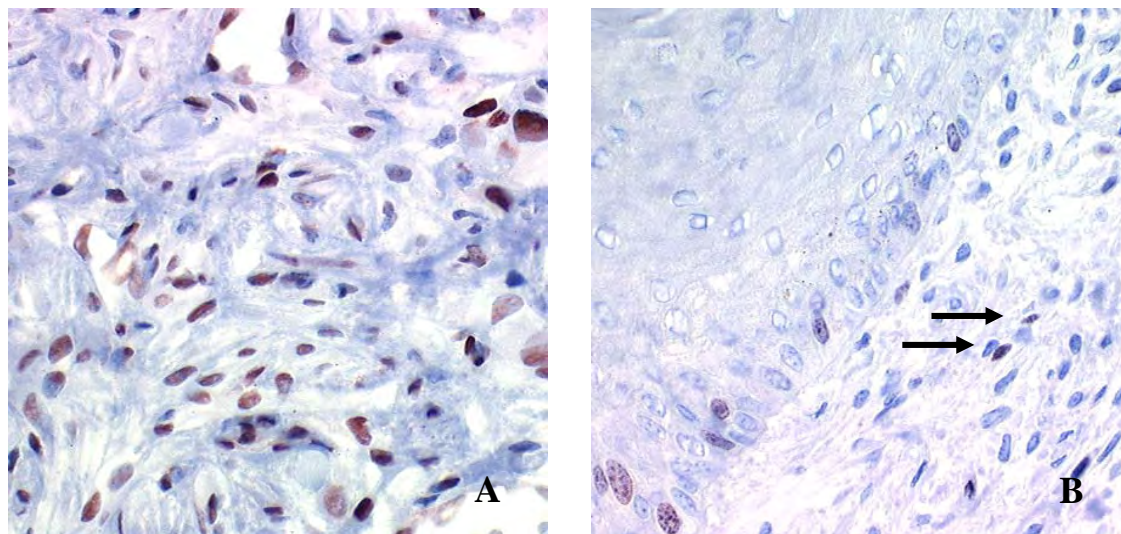


Abb. 7 Equines Sarkoid, gemischter Typ, Pferd. Immunhistologische Darstellung proliferierender Zellen.

A: Kräftiges intranukleäres Signal für PCNA in zahlreichen Tumorzellen (67 %). 400x

B: Intranukleäres Signal für Ki67 in 2 % der fibroblastenähnlichen Tumorzellen (Pfeile) sowie einiger basaler Keratinozyten. 400x

Um der Frage nachzugehen, ob in equinen Sarkoiden das Tumorsuppressorprotein **PTEN** exprimiert wird, fand ein polyklonaler Antikörper gegen humanes PTEN Anwendung. Nierengewebe vom Pferd diente als Positivkontrolle (Dickerson et al., 2005). Bei einer Verdünnung von 1:20 war in den Podozyten der Niere sowie in Endothelzellen ein kräftiges intrazytoplasmatisches Signal nachweisbar (Abb. 8A). Daher wurden die weiteren Untersuchungen mit dieser Verdünnungsstufe durchgeführt. Als Negativkontrolle diente normale Pferdehaut (Abb. 8B).

Um einen besseren Erhalt der Hautgewebeproben nach Antigendemaskierung sicherzustellen, wurde als schonendere Vorbehandlung das feuchte Autoklavieren der Mikrowellenbestrahlung vorgezogen. In equinen Sarkoiden konnte auf diese Weise in den spindelförmigen Tumorzellen intrazytoplasmatisch PTEN in unterschiedlichem

Ausmaß (bis zu 68 % der Zellen positiv) nachgewiesen werden (Abb. 9A). In einigen mitotischen Zellen fand sich ebenfalls PTEN (Abb. 9B).

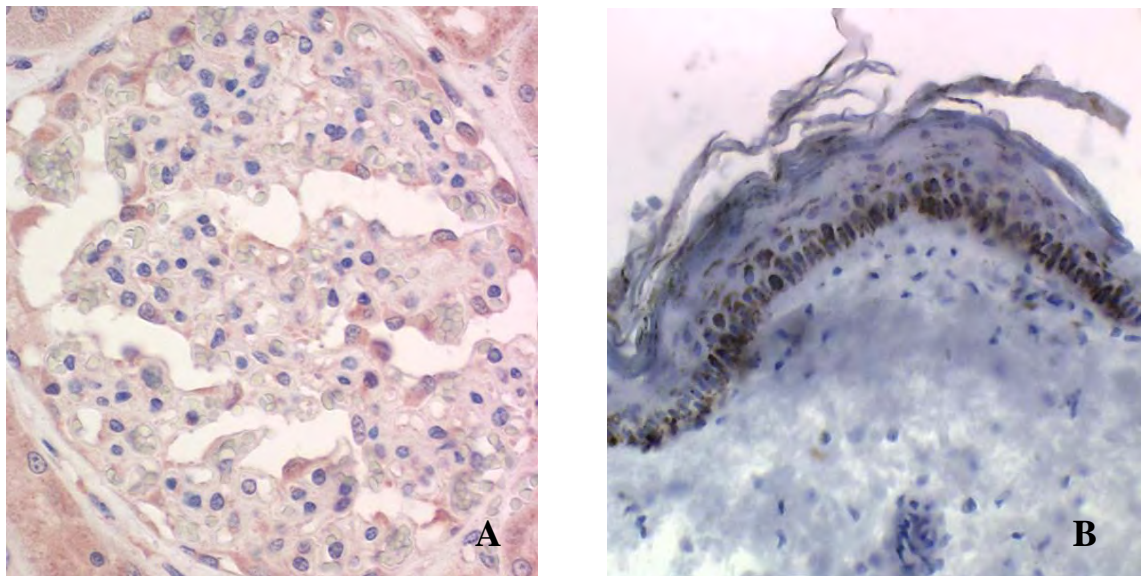


Abb. 8 **Immunhistologische Darstellung von PTEN. Kontrollen.**

A: Niere, Pferd. Nachweis von PTEN in Podozyten und Endothelzellen diente als Positivkontrolle. 400x. **B:** Stark pigmentierte Normalhaut, Pferd. Kein PTEN-Signal in Epidermis oder Dermis. 200x.

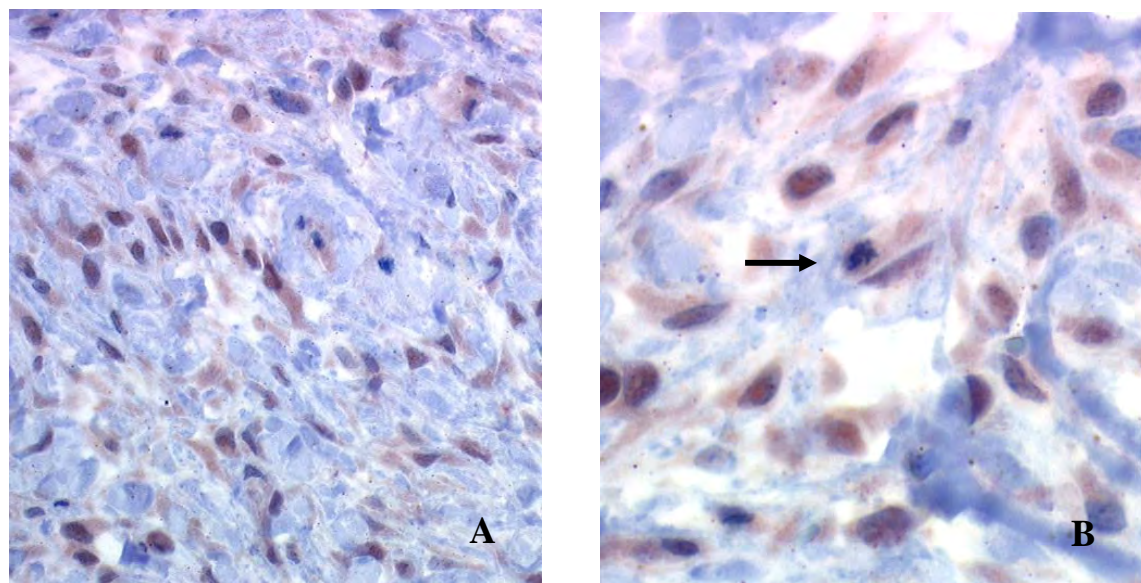


Abb. 9 **Equines Sarkoid, gemischter Typ, Pferd. Immunhistologische Darstellung von PTEN.**

A: Intrazytoplasmatisches Signal in zahlreichen Tumorzellen. 400x. **B:** Nachweis von PTEN in mitotischen Tumorzellen (Pfeil). 800x.

Durch Western Blot wurde überprüft, ob der Antikörper gegen humanes PTEN auch equines PTEN spezifisch bindet. Es konnte sowohl ausgehend von Frischgewebe normaler Pferdehaut als auch eines equinen Sarkoids ein Protein extrahiert werden, das

in einer Größe von ungefähr 47 kDa mit dem Antikörper reagierte (Abb. 10). Weiterhin wurde aus zehn Sarkoiden und aus unveränderter Pferdehaut mRNA extrahiert. Es gelang durch RT-PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die von der murinen cDNA-Sequenz von PTEN abgeleitet worden waren, in neun Sarkoiden sowie in der unveränderten Pferdehaut Transkripte von PTEN nachzuweisen. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Niere, *Mus musculus*) mit 563 bp, zeigte sich das Amplifikat equiner Sarkoide im Gelbild geringfügig kleiner und auch schwächer in der Intensität (Abb. 11). Das PCR-Produkt wurde sequenziert und mit der murinen cDNA-Sequenz von PTEN verglichen (Steck et al., 1997). Die ermittelte Sequenz von 205 bp stimmte zu 95 % mit PTEN der Maus überein. Sie ist im Anhang dargestellt.

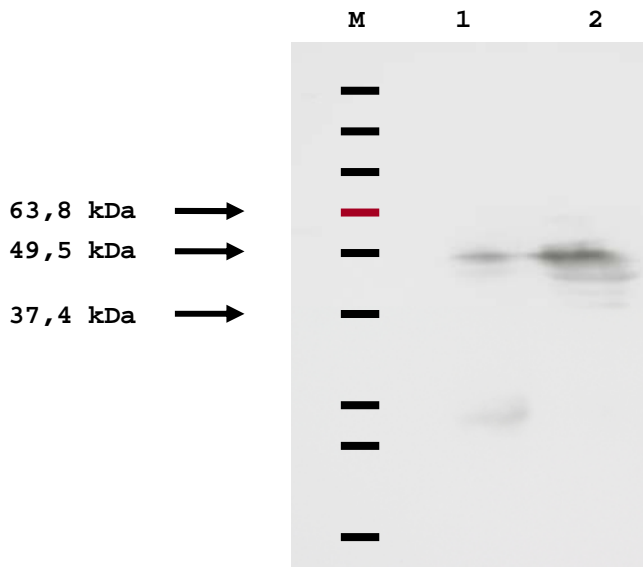


Abb. 10 Nachweis von PTEN mittels Western-Blot-Reaktion aus Pferdegewebe.

M: Marker; 1: Lysat eines equinen Sarkoides; 2: Lysat von Normalhaut.

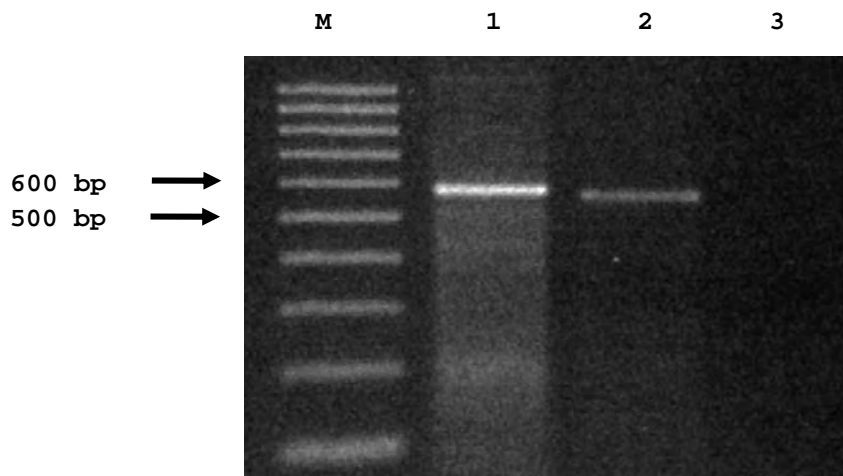


Abb. 11 RT-PCR-Amplifikationsprodukte, Primerpaar PTEN+/PTEN-.

M: Marker, 100 bp-Leiter; 1: Niere, Maus; 2: equines Sarkoid, Pferd; 3: Wasserprobe

Als Folge einer Aktivierung von PTEN kann die Phosphorylierung des Signalüberträgers AKT zu **pAKT** unterdrückt werden. Deshalb wurden im gleichen Versuchsansatz equine Sarkoide auch auf pAKT immunhistologisch untersucht. Hierbei fand sich pAKT im Zytoplasma zahlreicher (64 %) spindelförmiger Tumorzellen (Abb. 12A). Die Verwendung eines irrelevanten polyklonalen Antikörpers anti-**IBDV** ergab weder im Tumorgewebe noch bei Normalhaut unspezifische Reaktionen (Abb. 12B).

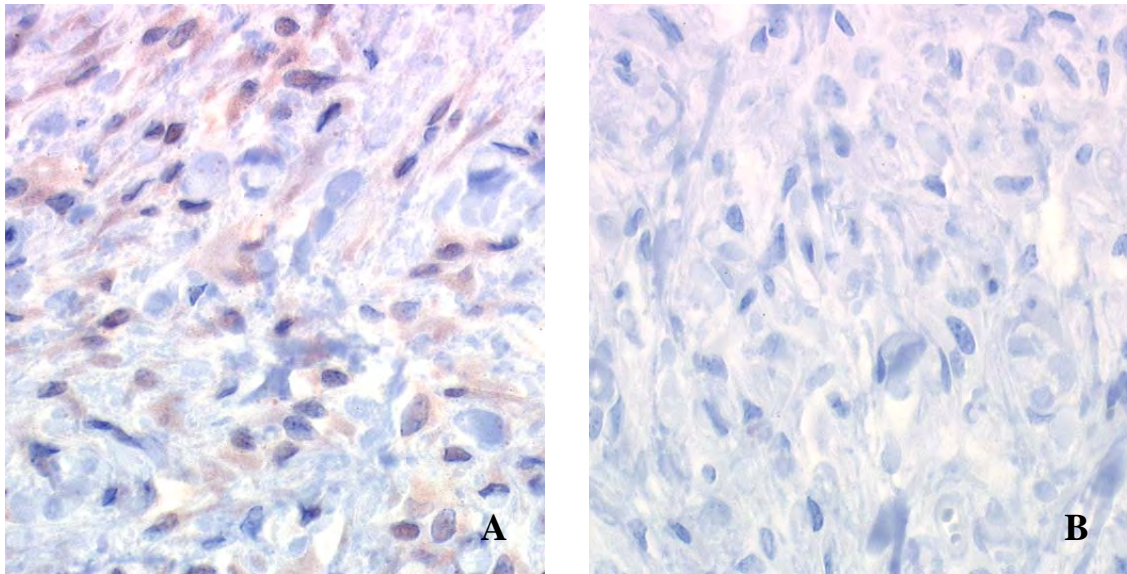


Abb. 12 **Equines Sarkoid, gemischter Typ, Pferd. Immunhistologische Darstellung von pAKT.**

A: Intrazytoplasmatische Signale spezifisch für pAKT-Expression in den fibroblastenähnlichen Tumorzellen. 400x. **B:** Kontrolle: keine Signale bei Verwendung eines irrelevanten Antikörpers (anti-IBDV, 1:1000). 400x.

4.5 Etablierung von primären Zelllinien

Aus insgesamt 29 Tumoren, die als equine Sarkoide diagnostiziert worden waren, wurden primäre Zelllinien angelegt. Mit Ausnahme von zwei Tumoren wiesen alle Sarkoide in unterschiedlichen Verhältnissen eine Besiedlung mit Streptokokken und Staphylokokken auf, wobei in acht Fällen trotz vorhergehender Desinfektion und Verwendung von antibiotikahaltigem Zellkulturmedium das Auswachsen von Zellen auf Grund der starken Keimbelastung des Ausgangsgewebes unmöglich war. Aber auch Mikrokokken und *Proteus* spp. konnten nachgewiesen werden. Aus insgesamt sechzehn Tumoren wuchsen Zellen aus, die eine für ausdifferenzierte Fibroblasten charakteristische Morphologie zeigten. Sie wuchsen geordnet in einem Monolayer in gleichmäßigen Windrädchen-ähnlichen (storiformen) Wirbeln. In diesen Zellen und

deren Zellkulturüberständen konnte mittels PCR keine BPV-1-DNA nachgewiesen werden.

4.5.1 Nachweis von BPV in primären Zelllinien

Insgesamt fünf Zelllinien konnten angelegt werden, die sich in der BPV-PCR positiv verhielten. Es handelte sich hierbei im Einzelnen um die Ansätze ZBV891, 132/04, 29/05, 136/05 und 131/06. Drei Zelllinien stammten aus equinen Sarkoiden vom verrukösen Typ, eine stammte aus einem equinen Sarkoid vom gemischten Typ und eine aus einem equinen Sarkoid vom fibroblastischen Typ. Alle auswachsenden Zellen wiesen eine ähnliche Morphologie auf. Die Zellen waren um den zentral gelegenen Zellkern herum plumper und zu den Enden hin fadenförmig ausgezogen. Auffällig war ihr für Tumorzellen typisches Wachstum, denn sie bildeten keinen Monolayer aus, sondern wuchsen stattdessen unter Missachtung von Zell-zu-Zell-Kontakten ungeordnet übereinander („criss-cross“) oder bildeten bis zu 2 mm große Zellhaufen („foci“) aus (Abb. 13A). Nach Passagieren im Verhältnis 1:2 und erneuter Aussaat erreichten die Zellen nach 72 h bis 96 h eine vollständige Konfluenz. Während der 18. bis 20. Passage änderten sich das morphologische Erscheinungsbild sowie das Wachstumsverhalten der Sarkoidzellen. Sie wurden zunehmend spindelförmig, „criss-cross“-Muster und „foci“ wurden weniger, bis die Zellen ausdifferenzierten Fibroblasten glichen (Abb. 13B). Um die 20. Passage ließ sich in den Zellen keine BPV-1-DNA mehr nachweisen.

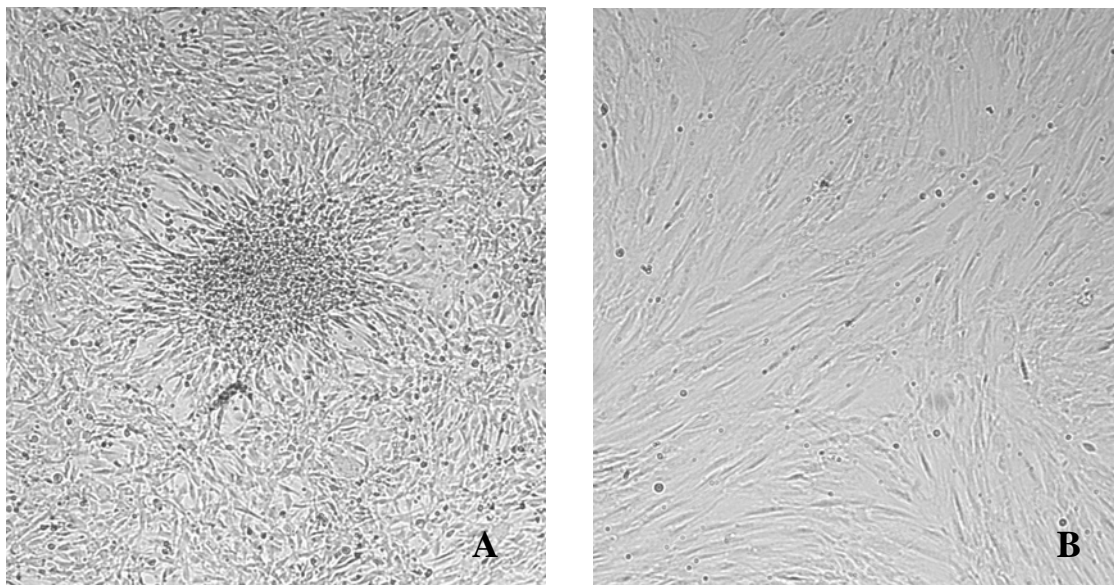


Abb. 13 **Equine Sarkoidzellen, Zelllinie 132/04.**

A: BPV-1-DNA-positiv, 8. Passage mit charakteristischem „focus“ und „criss-cross“. **B:** BPV-1-DNA-negativ, 22. Passage. 200x

Eine Ausnahme stellte die Zelllinie 131/06 dar. Bei dieser Zelllinie blieb das „criss-cross“-Wachstum weit über die 30. Passage erhalten. Noch in der 35. Passage war es möglich, BPV-1-DNA mittels PCR nachzuweisen. Die Zellen proliferierten jedoch ab der 35. Passage deutlich langsamer. Nach einer Teilung im Verhältnis von 1:2 wurde ein geschlossener Monolayer erst wieder nach sieben Tagen erreicht.

Die Zellen wurden kryokonserviert. Nach dem Auftauen fiel der BPV-1-DNA-Nachweis mittels PCR schwächer aus (Abb. 14). Nach einjähriger Lagerung bei -196 °C ließ sich in den neu ausgesäten Tumorzellen keine BPV-1-DNA mehr nachweisen. „Criss-cross“-Muster waren hier zwar vorhanden, aber deutlich vermindert.

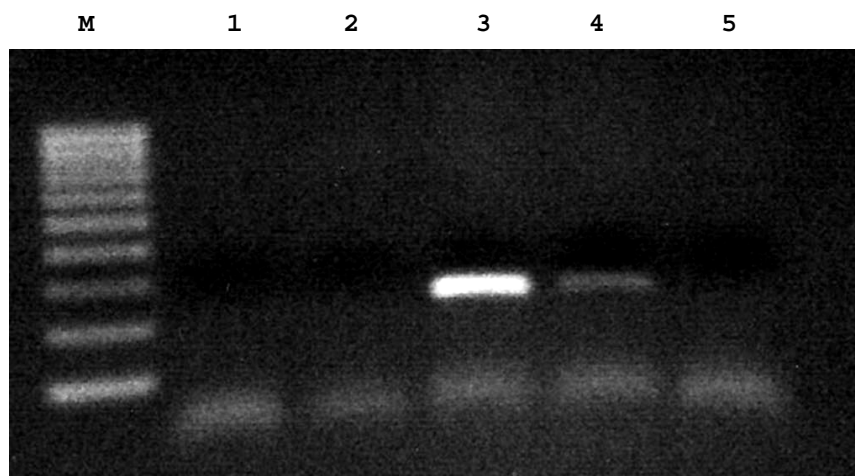


Abb. 14 **PCR-Amplifikationsprodukte, Zellkulturüberstände equiner Zelllinien, Primerpaar E5+/E5-.**

M: Marker, 100 bp-Leiter; **1:** Wasserprobe; **2:** Zelllinie 131/04; **3:** Zelllinie 29/05, 17. Passage; **4:** kryokonservierte Zelllinie 132/04, 13. Passage; **5:** Zelllinie 132/04, 21. Passage.

Die durch PCR nachgewiesene BPV-1-DNA konnte mittels ISH in den Zellkernen lokalisiert werden (Abb. 15A). In equinen Fibroblasten war es dagegen nicht möglich, BPV-1-DNA nachzuweisen.

Der anschließend durchgeführte Southern Blot zeigte unter Verwendung von Sonden, die für das Gen E2, das Gen L2 und die NCR von BPV-1 spezifisch waren, nach Linearisierung der aus den Sarkoidzellen extrahierten DNA eine Bande in der Größe von ca. 8 kbp (Abb. 15B).

Es war nicht möglich, die Expression des BPV Onkoproteines **E5** in den Primärkulturen nachzuweisen. Ähnlich wie am Paraffinschnitt kam es sowohl bei Sarkoidzellen als auch bei normalen Fibroblasten zu unspezifischen Bindungen.

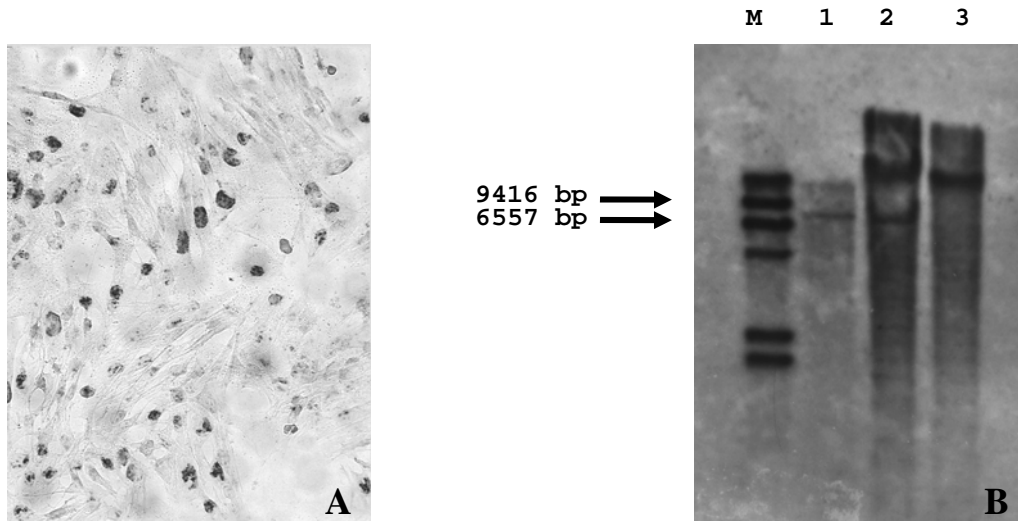


Abb. 15 **Equine Sarkoidzellen, Nachweis von BPV-1-DNA.**

A: ISH, kräftiges intranukleäres Hybridisierungssignal in den Sarkoidzellen, Zelllinie ZBV891, BPV-1-E5-spezifische Sonde. 400x. **B:** Southern Blot, **1:** bovines Papillom, **2:** Zelllinie 132/04, **3:** Zelllinie 131/04.

4.5.2 Zytogenetische Charakterisierung primärer Zelllinien

Zur weiteren Charakterisierung der Zelllinien wurden die Metaphasechromosomen präpariert. Ziel dieser Untersuchung war es, die Tumorzellen auf Abweichungen in Chromosomenzahl und im Karyogramm bei steigender Passagezahl zu prüfen. Bei der Zelllinie **136/05** konnten bereits nach der 3. Passage Aberrationen festgestellt werden. Im Vergleich zu einem normalen Karyogramm des Pferdes fehlten zwei metazentrische Chromosomen. Dagegen lagen zwei zusätzliche akro- bzw. submetazentrische Chromosomen vor. Weiterhin war bemerkenswert, dass insgesamt vier Chromosomen sich derart verändert hatten, dass sich ihnen keine Gegenstücke mehr zuordnen ließen. Die Stammlinie lag bei 64 Chromosomen (Abb. 16).

In der 16. Passage war der Chromosomensatz deutlich reduziert. Die Stammlinie lag dann bei 60 Chromosomen, zeigte aber eine Tendenz zu einer weiteren Reduktion des Chromosomensatzes. Im Karyogramm sind insgesamt acht einzelne Chromosomen zu sehen (Abb. 17).

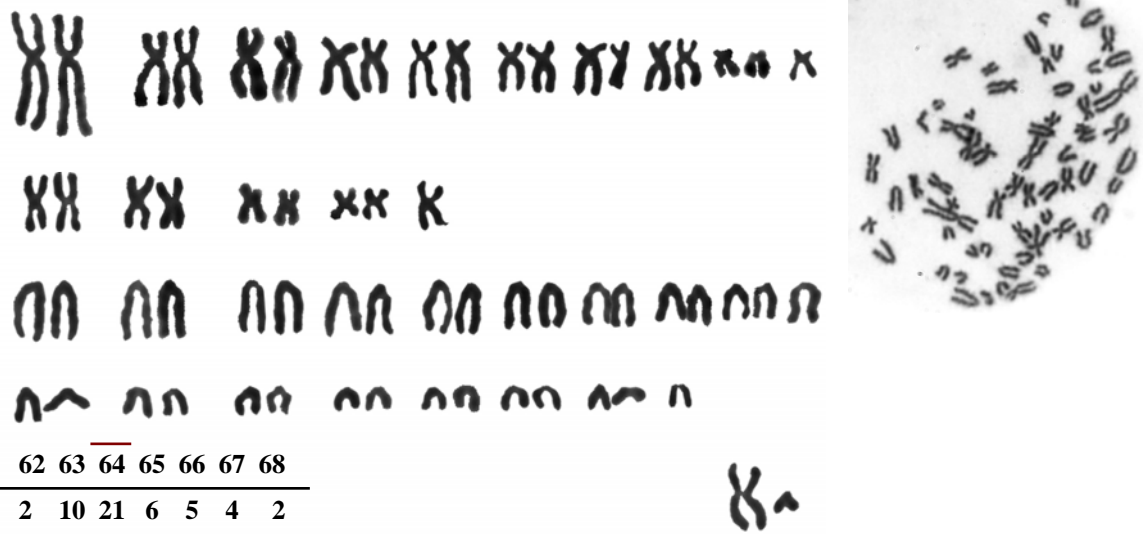


Abb. 16 Karyogramm, equine Sarkoidzellen, Zelllinie 136/05.
3. Passage mit Stammlinie, 2n=64.



Abb. 17 Karyogramm, equine Sarkoidzellen, Zelllinie 136/05.
16. Passage mit Stammlinie, 2n=64.

Die Zelllinie **131/06** wurde in der 6. und 17. Passage zytogenetisch untersucht. In der 6. Passage zeigten die ausgezählten Mitosen bereits eine deutliche Reduktion des Chromosomensatzes. Die Stammlinie hatte 60 Chromosomen. Das in Abbildung 18 dargestellte Karyogramm zeigt 65 Chromosomen mit einer Verschiebung von den meta- zu den akrozentrischen Chromosomen. Weiterhin liegt ein Chromosom dreifach vor. Zwei weitere Chromosomen sind derart verändert, dass sich keine Gegenstücke mehr finden lassen.

In der 17. Passage war der Chromosomensatz auf 59 vermindert und zeigte auch hier eine Tendenz zur weiteren Reduktion. Auch hier hatte eine deutliche Verschiebung stattgefunden. In dem abgebildeten Karyogramm sind 62 Chromosomen zu sehen. Es fehlen sechs metazentrische Chromosomen, hingegen liegen sechs zusätzliche akrozentrische Chromosomen vor. Insgesamt sechs Chromosomen kann kein Partner mehr zugeordnet werden. Zwei Chromosomen sind dreifach vorhanden (Abb. 19).

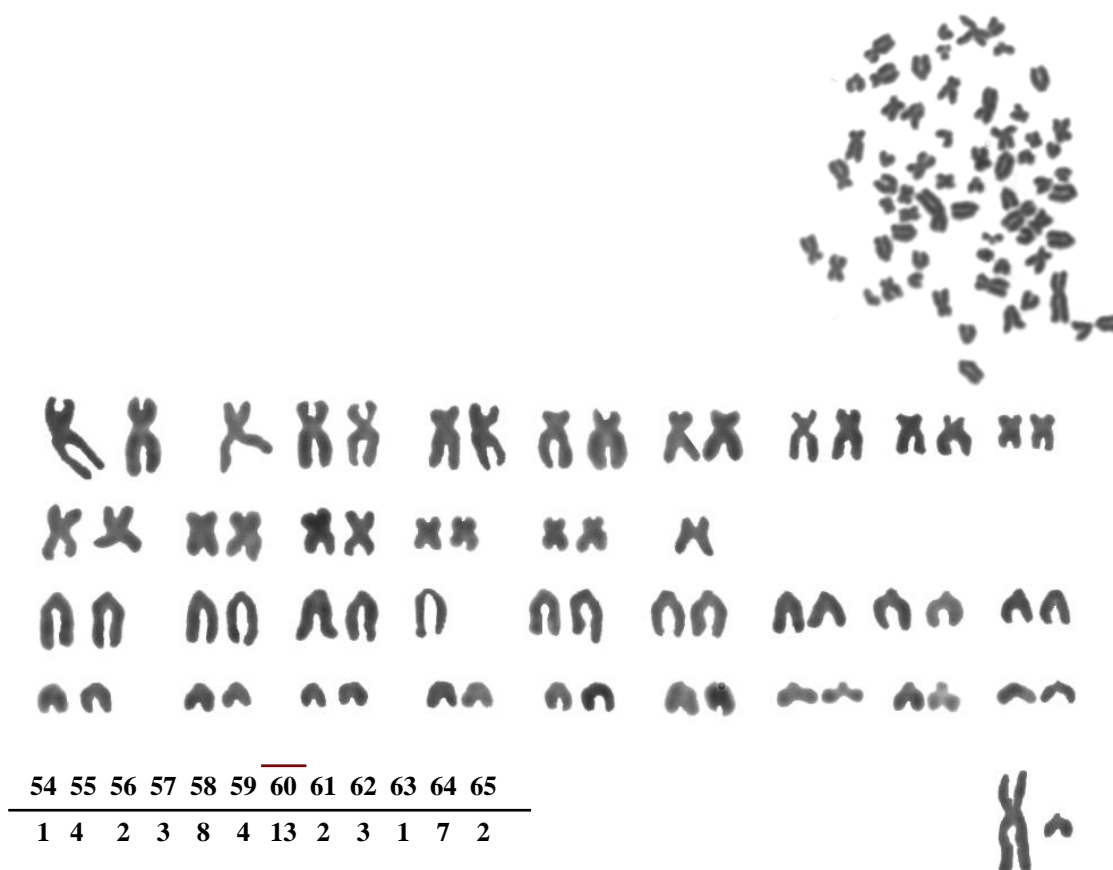


Abb. 18 Karyogramm, equine Sarkoidzellen, Zelllinie 131/06.
6. Passage mit Stammlinie, $2n=65$

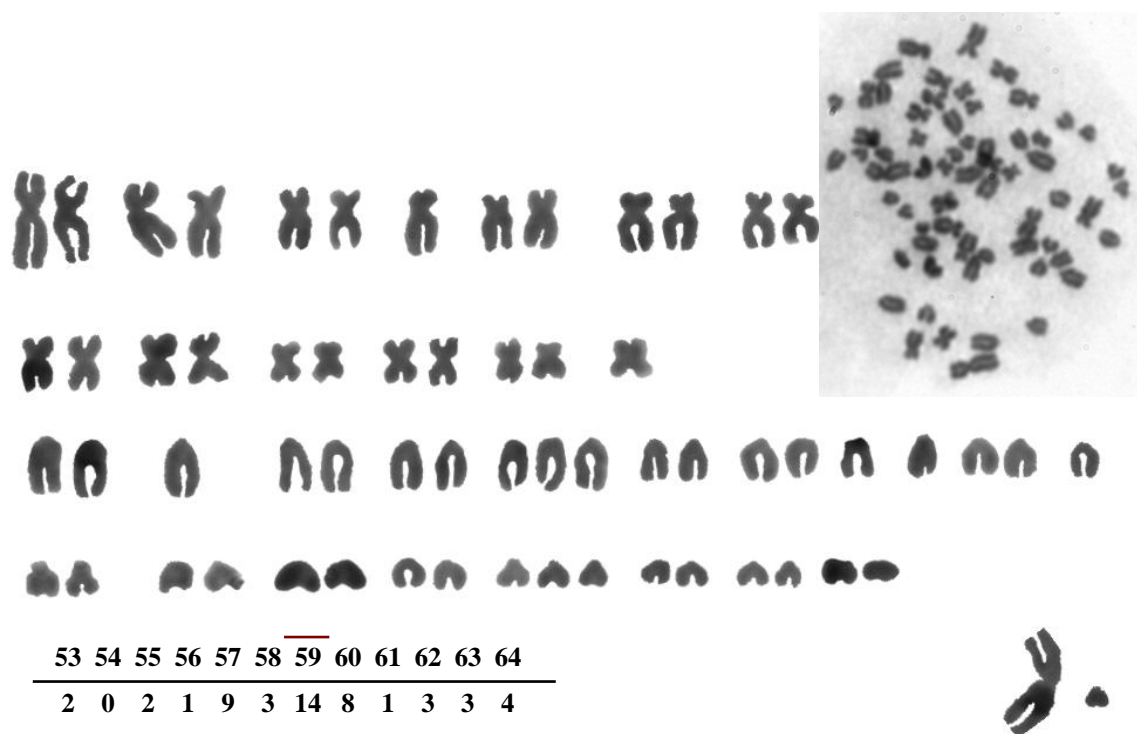


Abb. 19 Karyogramm, equine Sarkoidzellen, Zelllinie 131/06.
17. Passage mit Stammlinie, $2n=62$.

4.5.3 Immunzytologische Charakterisierung primärer Zelllinien

Die Zelllinien wurden immunzytologisch auf die Expression von **Vimentin**, **Zytokeratin**, **GFAP**, **S 100**, **NSE** und **Desmin** untersucht. Einzelne Sarkoidzellen zeigten ein schwaches intrazytoplasmatisches Signal für Vimentin (Abb. 20A). In der Sarkoidzelllinie 131/06 konnte kein Vimentin dargestellt werden. Im Gegensatz dazu reagierten in der normalen equinen Fibroblastenkultur alle Zellen stark positiv für Vimentin (Abb. 20B). Es ließ sich in keiner Sarkoidzelllinie Zytokeratin, GFAP, S 100, NSE oder Desmin nachweisen.

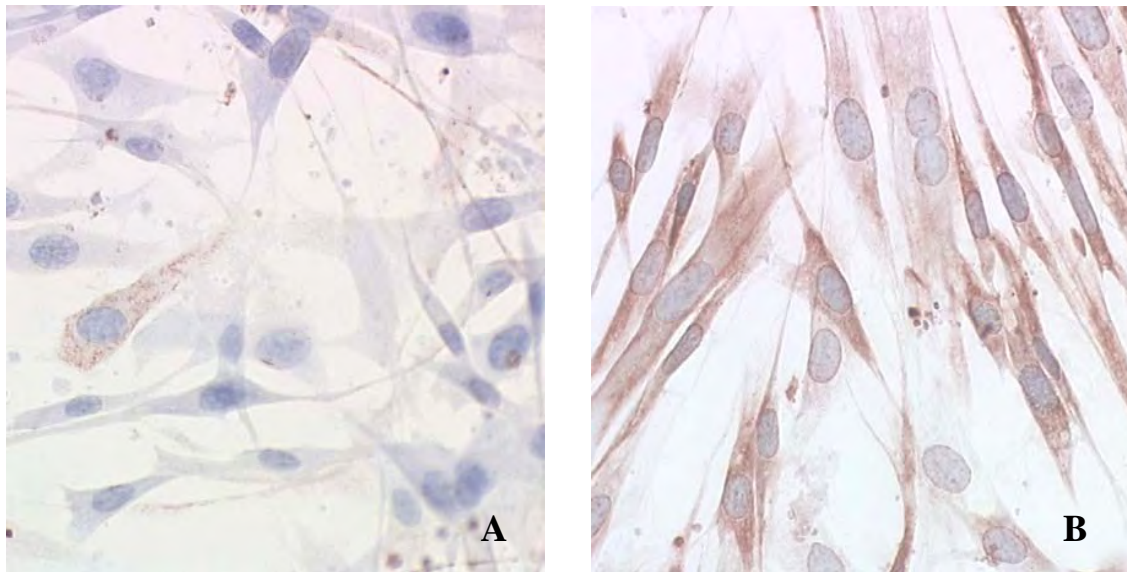


Abb. 20 **Equine Zelllinien, Immunzytologischer Nachweis von Vimentin.**

A: Schwache intrazytoplasmatische Signale in der Sarkoidzelllinie 132/04 **B:** Kräftige intrazytoplasmatische Signale in normalen equinen Fibroblasten (Zelllinie 958).

4.5.4 Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität

Um Aussagen über die stoffwechselbeeinflussenden Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen treffen zu können, wurde die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen untersucht. Wegen der besseren Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse zusammenfassend in Tabelle 14 dargestellt.

4.5.4.1 Aktiver Immunmodulator (AIM) 1

Durch Inkubation mit AIM 1 wurde bei der **Sarkoidzelllinie 136/05** nach 72 h eine signifikante Steigerung der Stoffwechselaktivität um das 1,28-fache ($p < 0,05$) bewirkt (Abb. 21). Im Unterschied dazu wurde eine Hemmung der Stoffwechselaktivität bei der **Sarkoidzelllinie 131/06** beobachtet. Bereits nach 1 h Inkubation wurde bei der höchsten Konzentration ($1,25 \times 10^6$ VP/ml) eine signifikante Stoffwechselreduktion auf das 0,4-fache gemessen ($p < 0,05$). Während 96 h Inkubation blieb diese Stoffwechselreduktion erhalten und war am Ende verglichen mit Normalmedium auf das 0,7-fache vermindert ($p < 0,05$) (Abb. 22).

Bei den **normalen Fibroblasten** der Zellkultur 958 bewirkte AIM 1 in höchster Dosierung ($1,25 \times 10^6$ VP/ml) keine Veränderung. In geringerer Dosierung ($6,25 \times 10^5$, $3,13 \times 10^5$ VP/ml, $1,56 \times 10^5$ VP/ml) wurde jedoch die Stoffwechselaktivität im

Vergleich zu den mit Normalmedium behandelten Zellen signifikant auf das bis zu 0,85-fache gesenkt ($p < 0,05$) (Abb. 23).

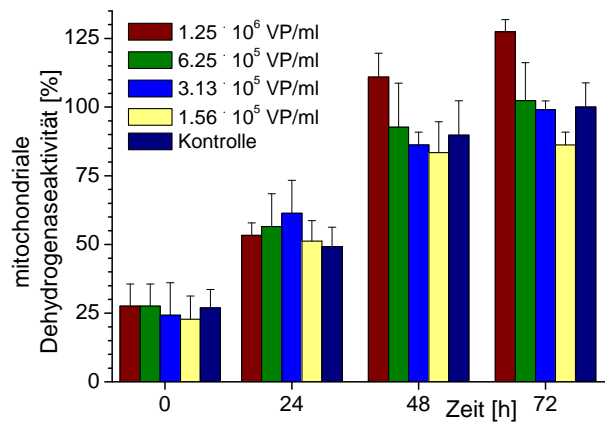


Abb. 21 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 136/05 nach Inkubation mit AIM 1.

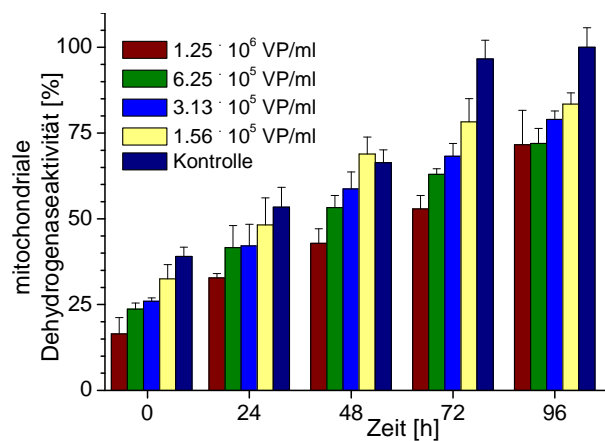


Abb. 22 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 131/06 nach Inkubation mit AIM 1.

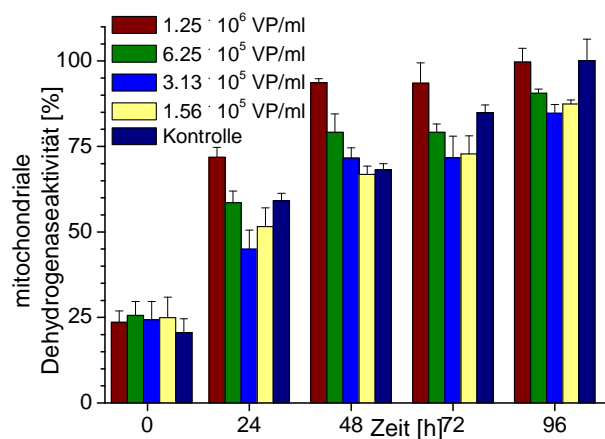


Abb. 23 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 958 nach Inkubation mit AIM 1.

4.5.4.2 Aktiver Immunmodulator (AIM) 2

AIM 2 rief bei allen untersuchten Zelltypen eine vergleichbare stoffwechselhemmende Reaktion hervor. Diese war bei der Zelllinie 131/06 stärker ausgeprägt als bei der Zelllinie 136/05 und bei der Zelllinie 958. Bei der **Zelllinie 136/05** war nach 96 h Inkubation mit höchster Konzentration ($1,25 \times 10^6$ VP/ml) die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität im Vergleich zum Normalmedium auf das 0,7-fache signifikant reduziert ($p < 0,05$) (Abb. 24).

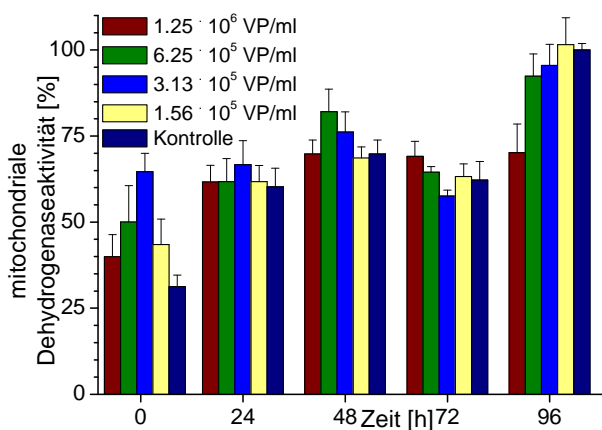


Abb. 24 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 136/05 nach Inkubation mit AIM 2.

Bei der **Zelllinie 131/06** war eine Stoffwechselreduktion bereits nach 72 h zu erkennen. Nach 96 h zeigten die Zellen eine signifikante Reduktion auf das 0,47-fache ($p < 0,05$). Auch die Inkubation mit den Konzentrationen $6,25 \times 10^5$ VP/ml und $3,13 \times 10^5$ VP/ml bewirkte eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Stoffwechselaktivität (Abb. 25). **Normale equine Fibroblasten (958)** reagierten auf die Behandlung mit AIM 2 ($1,25 \times 10^6$ VP/ml) nach 96 h mit einer signifikanten Reduktion der Stoffwechselaktivität auf das 0,68-fache ($p < 0,05$). Auch in geringerer Dosierung ($6,25 \times 10^5$ VP/ml, $3,13 \times 10^5$ VP/ml) war die Reduktion der Stoffwechselaktivität signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 26).

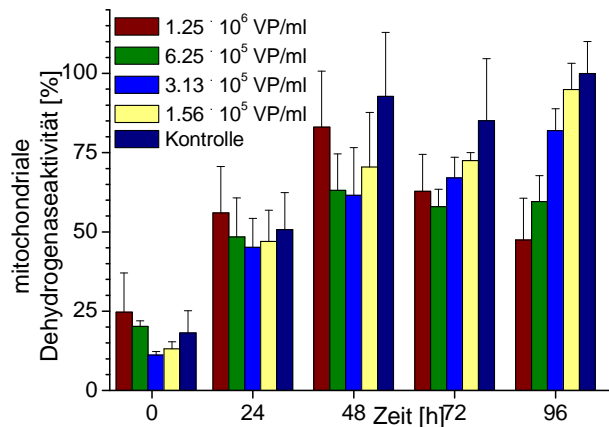


Abb. 25 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 131/06 nach Inkubation mit AIM 2.

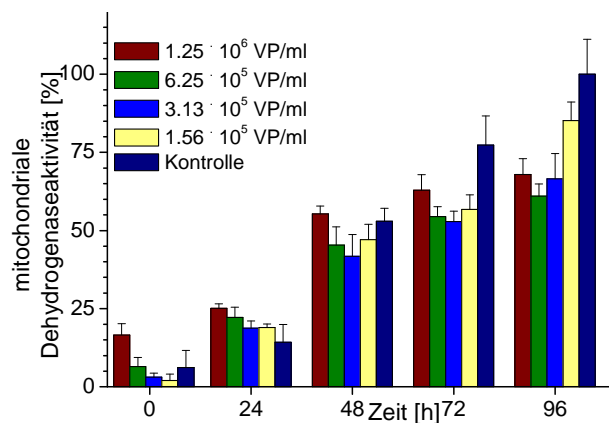


Abb. 26 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 958 nach Inkubation mit AIM 2.

4.5.4.3 Aktiver Immunmodulator (AIM) 3

Bei der **Zelllinie 136/05** konnte AIM 3 in höchster Konzentration ($1,25 \times 10^6$ VP/ml) nach 96 h Inkubation eine geringfügige, jedoch signifikante ($p < 0,05$) Steigerung der Stoffwechselaktivität bewirken (1,08-fach) (Abb. 27). Im Gegensatz dazu führte AIM 3 ($1,25 \times 10^6$ VP/ml) bei der **Zelllinie 131/06** nach 96-stündiger Inkubation zu einer signifikanten Stoffwechselreduktion auf das 0,49-fache ($p < 0,05$) (Abb. 28). Die Aktivität der **Zelllinie 958** wurde durch die Inkubation mit AIM 3 signifikant um das 1,17-fache gesteigert ($p < 0,05$) (Abb. 29).

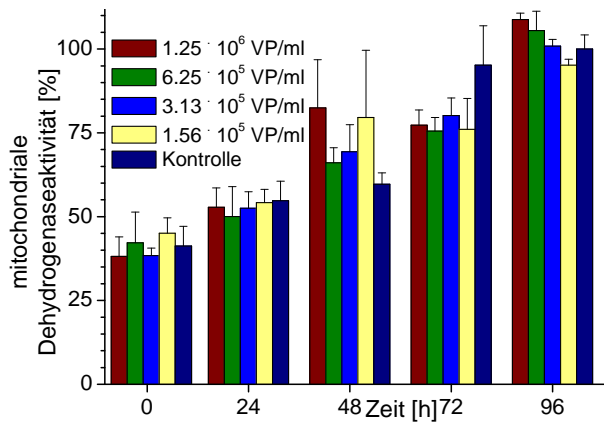


Abb. 27 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 136/05 nach Inkubation mit AIM 3.

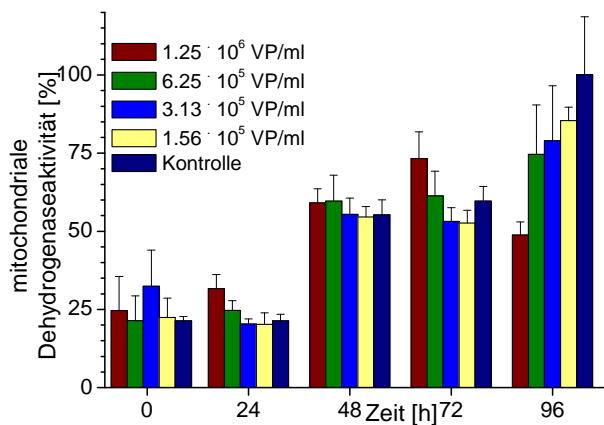


Abb. 28 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 131/06 nach Inkubation mit AIM 3.

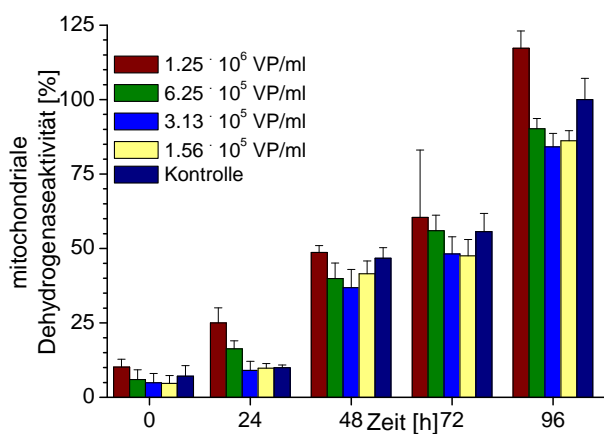


Abb. 29 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 958 nach Inkubation mit AIM 3.

4.5.4.4 Aktiver Immunmodulator (AIM) 4

AIM 4 rief bei der **Zelllinie 136/05** nach 96 h Inkubation ($1,25 \times 10^6$ VP/ml) eine geringgradige Steigerung der Stoffwechselaktivität hervor (Abb. 30). Die Veränderung war jedoch nicht signifikant. Bei der **Zelllinie 131/05** war die Stoffwechselaktivität nach 96 h bei höchster Konzentration ($1,25 \times 10^6$ VP/ml) auf das 0,9-fache reduziert (Abb. 31). Die Veränderung war nicht signifikant. Ähnlich wie bei der Zelllinie 136/05 rief AIM 4 bei **normalen Fibroblasten der Linie 958** nach 96 h bei höchster Konzentration eine geringgradige Stoffwechselsteigerung um das 1,14-fache hervor (Abb. 32). Die Stoffwechselsteigerung war jedoch nur nach 24, 48 und 72 h signifikant ($p < 0,05$).

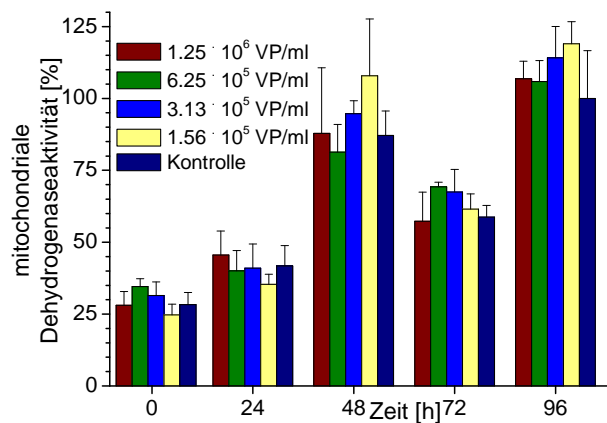


Abb. 30 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 136/05 nach Inkubation mit AIM 4.

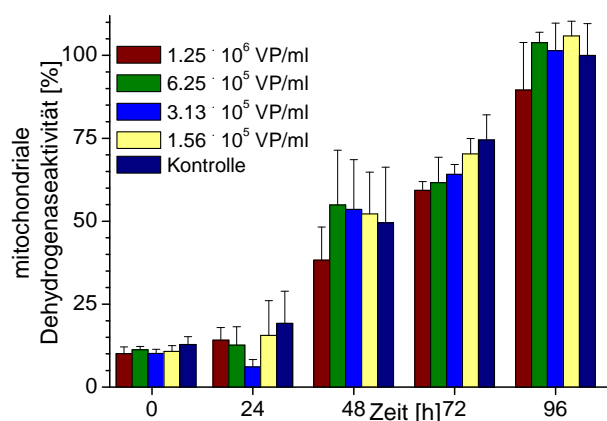


Abb. 31 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 131/06 nach Inkubation mit AIM 4.

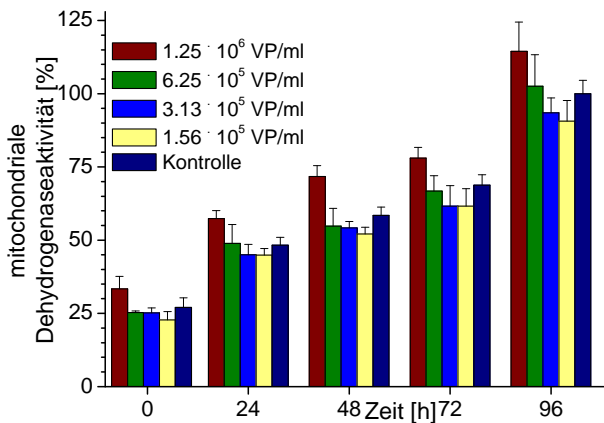


Abb. 32 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 958 nach Inkubation mit AIM 4.

4.5.4.5 Aktiver Immunmodulator (AIM) 5

Durch Inkubation mit AIM 5 konnte die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der **Zelllinie 136/05** nicht beeinflusst werden (Abb. 33). Die Stoffwechselaktivität der **Zelllinie 131/06** konnte durch AIM 5 geringgradig um das 1,15-fache gesteigert werden ($p < 0,05$) (Abb. 34). Die **Zelllinie 958**, die mit AIM 5 $1,25 \times 10^6$ VP/ml behandelt worden waren, verhielten sich genauso wie die mit Normalmedium behandelten Zellen (Abb. 35). In geringerer Dosierung war jedoch eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität auf das 0,8-fache feststellbar ($p < 0,05$).

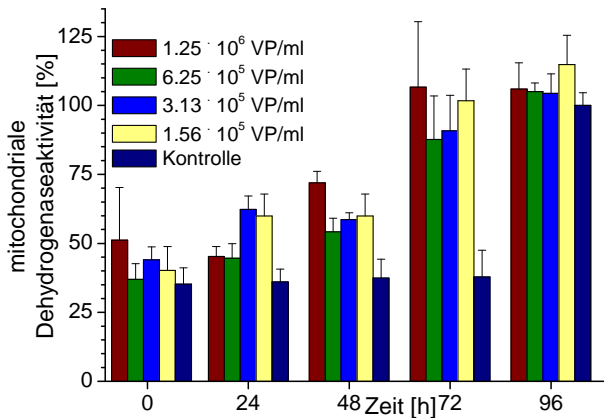


Abb. 33 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 136/05 nach Inkubation mit AIM 5.

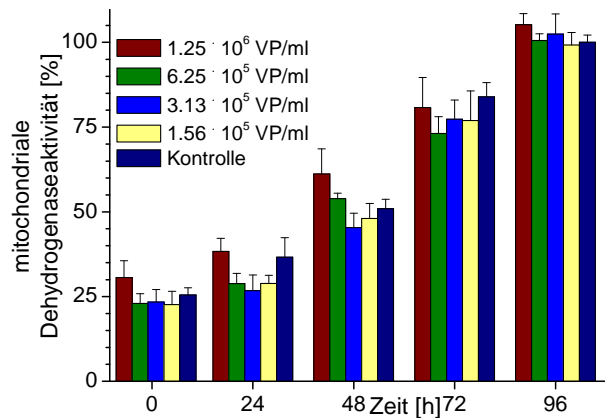


Abb. 34 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 131/06 nach Inkubation mit AIM 5.

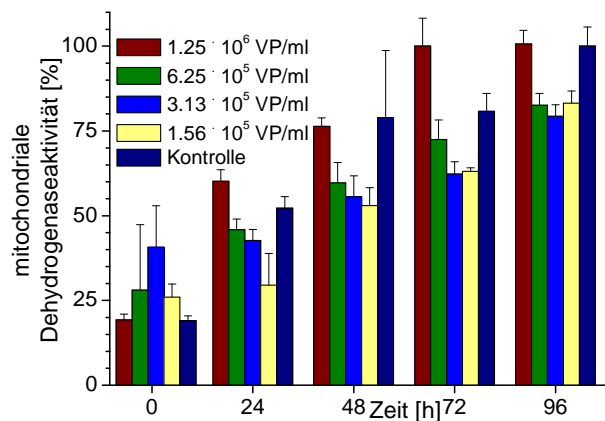


Abb. 35 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 958 nach Inkubation mit AIM 5.

4.5.4.6 Cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP)

Die **Zelllinie 958** reagierte am schwächsten auf eine Inkubation mit CHP. Nach 72 h (200 µg/ml) war im Vergleich zu den mit Normalmedium kultivierten Fibroblasten eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität auf das 0,67-fache festzustellen ($p < 0,005$), nach 96 h auf das 0,75-fache. Auch bei der nächst höheren Verdünnungsstufe (100 µg/ml) war nach 72 h eine signifikante Reduktion auf das 0,7-fache ($p < 0,005$) und nach 96 h auf das 0,89-fache zu messen (Abb. 36). Letztere war jedoch nicht signifikant.

Die **Zelllinie 136/05** zeigte mit CHP (200 µg/ml) bereits nach 48 h eine signifikante Stoffwechselreduktion im Vergleich zu den mit Normalmedium inkubierten Zellen auf das 0,8-fache ($p < 0,005$). Nach 72 und nach 96 h war jeweils eine signifikante Reduktion auf das 0,7-fache festzustellen ($p < 0,005$). Beim nächsten

Verdünnungsschritt (100 µg/ml) war die Stoffwechselaktivität nach 72 h sowie nach 96 h auf das 0,78-fache bzw. auf das 0,84-fache vermindert ($p < 0,005$) (Abb. 37).

Am empfindlichsten hat die **Zelllinie 131/06** auf die Inkubation mit CHP reagiert. Eine Inkubation mit 200 µg/ml rief im Vergleich zu den mit Normalmedium kultivierten Sarkoidzellen nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität auf das jeweils 0,7-, 0,71-, 0,5- und das 0,62-fache hervor ($p < 0,005$). Bei der nächsten Verdünnungsstufe (100 µg/ml) war die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase auf das jeweils 0,75-, 0,76-, 0,64- und das 0,62-fache vermindert (Abb. 38). Die Veränderung war nach 24 und nach 72 h signifikant ($p < 0,005$).

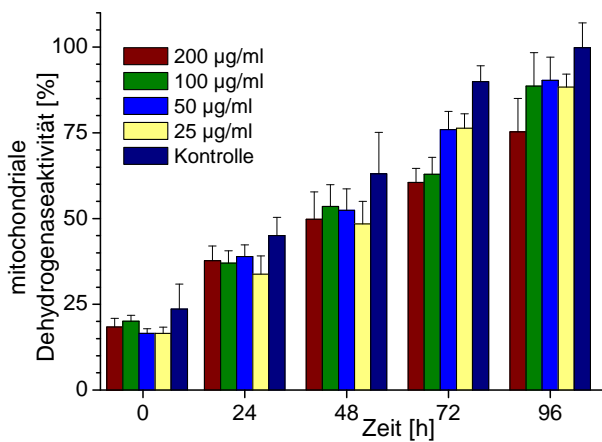


Abb. 36 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 958 nach Inkubation mit CHP.

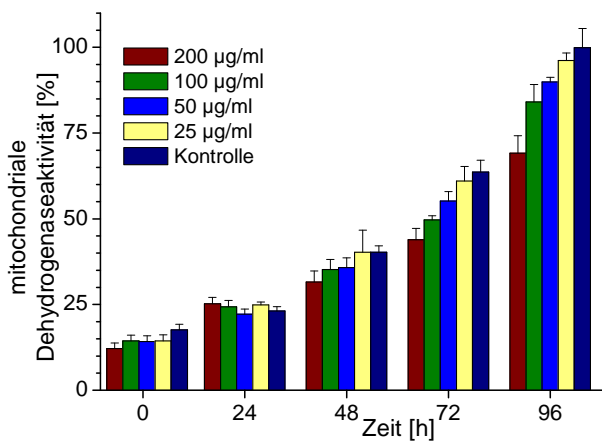


Abb. 37 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 136/05 mit CHP.

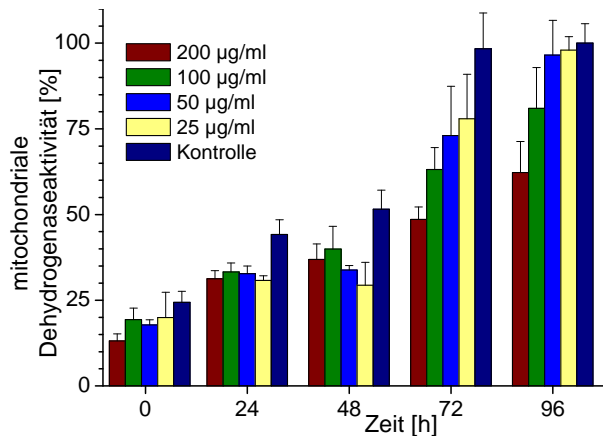


Abb. 38 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 131/05 nach Inkubation mit CHP.

4.5.4.7 Immodin

Immodin (66 % Lösung) führte bei den **Sarkoidzellen 131/06** nach 1 h Inkubation im Vergleich zu den mit Normalmedium inkubierten Zellen zu einer Steigerung der Stoffwechselaktivität auf das 3-fache. Nach 24 h, 48 h und 72 h sank die Stoffwechselaktivität unter das 0,75-fache ab. In 33%iger Konzentration bewirkte Immodin ebenfalls nach bereits 1 h eine Steigerung der Stoffwechselaktivität um das 1,5-fache. Nach 24 bis 72 h war die Stoffwechselaktivität immer noch um das bis zu 1,25-fache vermehrt (Abb. 39).

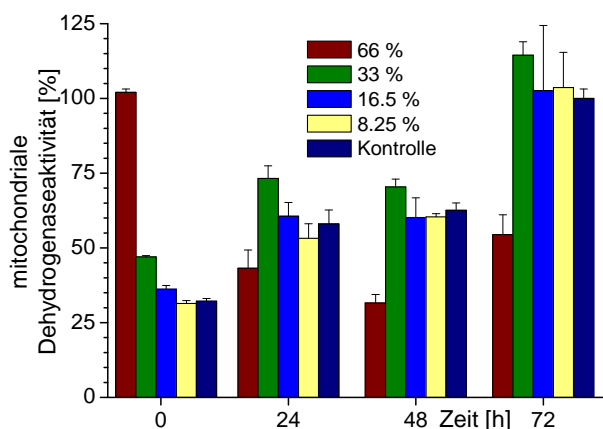


Abb. 39 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 131/06 nach Inkubation mit Immodin.

Bei den **normalen Fibroblasten (958)** führte Immodin zu einer vergleichbaren Reaktion. Maximal konzentriert (66 %) kam es nach 1 h zu einem kurzfristigen Anstieg der Stoffwechselaktivität um das 1,6-fache, nach 72 h war die Stoffwechselaktivität auf

das 0,6-fache reduziert. Bei geringerer Verdünnung (33 %) kam es nach 72 h zu einer Steigerung um das 1,1-fache. (Abb. 40).

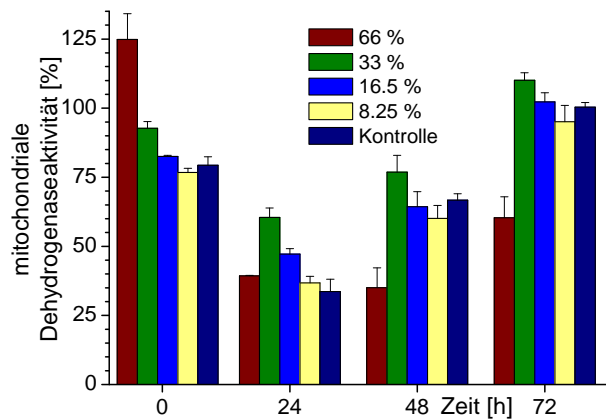


Abb. 40 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Zelllinie 958 nach Inkubation mit Immodin.

4.5.4.8 Foscarnet-Natrium

Durch Inkubation der Sarkoidzellen und der normalen Fibroblasten mit Foscarnet-Natrium in verschiedenen Konzentrationen konnte keine signifikante Beeinflussung der Stoffwechselaktivität bewirkt werden.

Tab. 14 Unterschiedliche Auswirkungen der einzelnen Substanzen auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der verschiedenen Zelllinien am Ende der Inkubationszeit

Substanz	Konzentration	Stoffwechselaktivität			Signifikanz		
		131/06	136/05	958	131/06	136/05	958
AIM 1	1,25 x 10 ⁶ VP/ml	↓	↑	↔	+	+	-
	6,25 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↔	↓	+	-	+
	3,13 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↓	↓	+	-	+
	1,56 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↓	↓	+	+	+
AIM 2	1,25 x 10 ⁶ VP/ml	↓	↓	↓	+	+	+
	6,25 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↓	↓	+	-	+
	3,13 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↓	↓	+	-	+
	1,56 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↔	↓	-	-	-
AIM 3	1,25 x 10 ⁶ VP/ml	↓	↑	↑	+	+	+
	6,25 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↑	↓	-	-	-
	3,13 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↔	↓	-	-	+
	1,56 x 10 ⁵ VP/ml	↓	↓	↓	-	-	+
AIM 4	1,25 x 10 ⁶ VP/ml	↓	↑	↑	-	-	-
	6,25 x 10 ⁵ VP/ml	↔	↑	↔	-	-	-
	3,13 x 10 ⁵ VP/ml	↔	↑	↓	-	-	-
	1,56 x 10 ⁵ VP/ml	↑	↑	↓	-	-	-
AIM 5	1,25 x 10 ⁶ VP/ml	↑	↑	↔	+	-	-
	6,25 x 10 ⁵ VP/ml	↔	↑	↓	-	-	+
	3,13 x 10 ⁵ VP/ml	↔	↑	↓	-	-	+
	1,56 x 10 ⁵ VP/ml	↔	↑	↓	-	-	+
CHP	200 µg/ml	↓	↓	↓	+	+	+
	100 µg/ml	↓	↓	↓	-	+	-
	50 µg/ml	↓	↓	↓	-	+	-
	25 µg/ml	↓	↓	↓	-	-	-
	12,5 µg/ml	↓	↓	↓	-	-	-
	6,25 µg/ml	↓	↓	↓	-	-	-
	3,13 µg/ml	↓	↔	↓	-	-	-
	1,56 µg/ml	↑	↑	↑	-	-	-
	0,78 µg/ml	↓	↔	↓	-	-	-
	0,39 µg/ml	↓	↔	↔	+	-	-
Foscarnet	32 mM	↓	n.d.	↓	-	n.d.	-
	16 mM	↑	n.d.	↑	-	n.d.	-
	8 mM	↔	n.d.	↑	-	n.d.	-
	4 mM	↔	n.d.	↑	-	n.d.	-
	2 mM	↓	n.d.	↔	-	n.d.	-
	1 mM	↔	n.d.	↔	-	n.d.	-
	0,5 mM	↓	n.d.	↑	-	n.d.	-
Immodin	66 %	↓	n.d.	↓	n.d.	n.d.	n.d.
	33 %	↑	n.d.	↑	n.d.	n.d.	n.d.
	16,5 %	↔	n.d.	↔	n.d.	n.d.	n.d.
	8,25 %	↔	n.d.	↓	n.d.	n.d.	n.d.

Stoffwechselaktivität: ↓ = herabgesetzt; ↑ = erhöht; ↔ = gleichbleibend; Signifikanz: + = signifikante Veränderung; - = nicht signifikante Veränderung; n.d. = nicht durchgeführt

4.5.4.9 Sanguinarin

Aufgrund der starken Zytotoxizität von Sanguinarin konnte der Einfluss auf die Stoffwechselaktivität nur nach 24 h und nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Nach 24 h reagierten **normale Fibroblasten (958)** zunächst mit einer Steigerung der Stoffwechselaktivität. Bei einer Konzentration von 15 und 17,5 μM Sanguinarin war die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase im Vergleich zu den Kontrollzellen um das 2-fache gesteigert. Die Veränderungen waren jedoch nicht signifikant. Die Aktivität sank langsam wieder und ab einer Konzentration von 27,5 μM war die Stoffwechselaktivität geringer als die der Kontrollzellen ($p < 0,0051$). Im Vergleich dazu war der Anstieg der Stoffwechselaktivität bei der **Sarkoidzelllinie 136/05** schwächer ausgeprägt. Bei einer Sanguinarinkonzentration von 15, 17,5 und 20 μM war die Enzymaktivität um das 1,3- bis 1,4-fache signifikant gesteigert ($p < 0,0051$). Ab einer Konzentration von 25 μM sank die Stoffwechselaktivität unterhalb die der Kontrollzellen ($p < 0,0051$). Die **Zelllinie 131/06** reagierte am empfindlichsten auf Sanguinarin. Nur bei einer Konzentration von 10 und 15 μM stieg die enzymatische Aktivität geringgradig um das 1,19- bzw. 1,16-fache ($p < 0,0051$). Ab einer Konzentration von 17,5 μM lag die Stoffwechselaktivität unterhalb der Aktivität der Kontrollzellen ($p < 0,0051$) (Abb. 41).

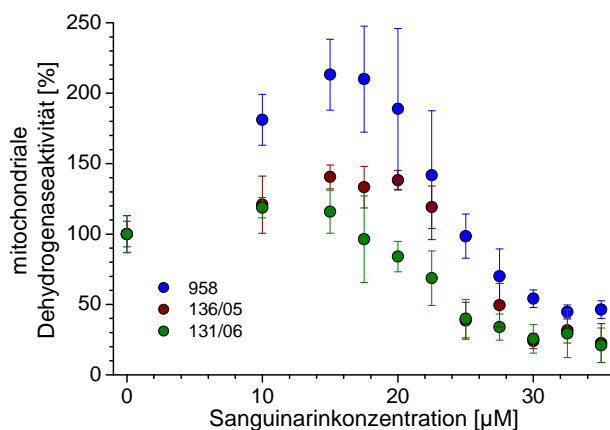


Abb. 41 **Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der verwendeten Zelllinien 24 h nach Inkubation mit Sanguinarin.**

4.5.5 CFSE-Proliferationsassay

Im Folgenden wurden ausgewählte Substanzen mittels CFSE-Proliferationsassay überprüft.

4.5.5.1 Aktiver Immunmodulator (AIM) 2

Die normalen Fibroblasten wurden nach 72 h geringgradig gehemmt.

4.5.5.2 Aktiver Immunmodulator (AIM) 3

Die **Sarkoidzelllinie 131/06** wurde durch Inkubation mit AIM 3 in den Konzentrationen $1,25 \times 10^6$ VP/ml, $6,25 \times 10^5$ VP/ml, $3,13 \times 10^5$ VP/ml und $1,56 \times 10^5$ VP/ml nach 48 und 72 h in ihrer Proliferation geringgradig titrationsabhängig gehemmt. Die **normalen Fibroblasten (958)** wurden nicht beeinflusst (Abb. 42).

4.5.5.3 Aktiver Immunmodulator (AIM) 5

Bei der **Zelllinie 131/06** konnte 48 h nach Inkubation mit AIM 5 ($1,25 \times 10^6$ VP/ml, $6,25 \times 10^5$ VP/ml) eine geringgradige Proliferationshemmung beobachtet werden. Die **normalen Fibroblasten (958)** wurden nicht beeinflusst (Abb. 43).

4.5.5.4 Aktiver Immunmodulator (AIM) Kombination 3 + 5

AIM 3 + AIM 5 riefen kombiniert in den Konzentrationen $1,25 \times 10^6$ VP/ml, $6,25 \times 10^5$ VP/ml und $3,13 \times 10^5$ VP/ml bei der **Zelllinie 131/06** stärker als die Einzelpräparate nach initialer Proliferationssteigerung eine Proliferationshemmung nach 48 h und 72 h hervor. Die Proliferation **normaler Fibroblasten (958)** wurde durch das Kombinationspräparat geringgradig gesteigert (Abb. 44).

4.5.5.5 Cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP)

Eine Inkubation mit CHP rief bei der **Sarkoidzelllinie 131/06** nach 72 h eine konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung hervor. Die **normalen Fibroblasten (958)** wurden durch CHP nicht beeinflusst.

4.5.5.6 Immodin

Die **Sarkoidzelllinie 131/06** zeigte nach 72 h Inkubation mit Immodin-haltigem Medium eine konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung. Im Gegensatz dazu reagierten die **normalen Fibroblasten (958)** nach 72 h mit einer Proliferationshemmung.

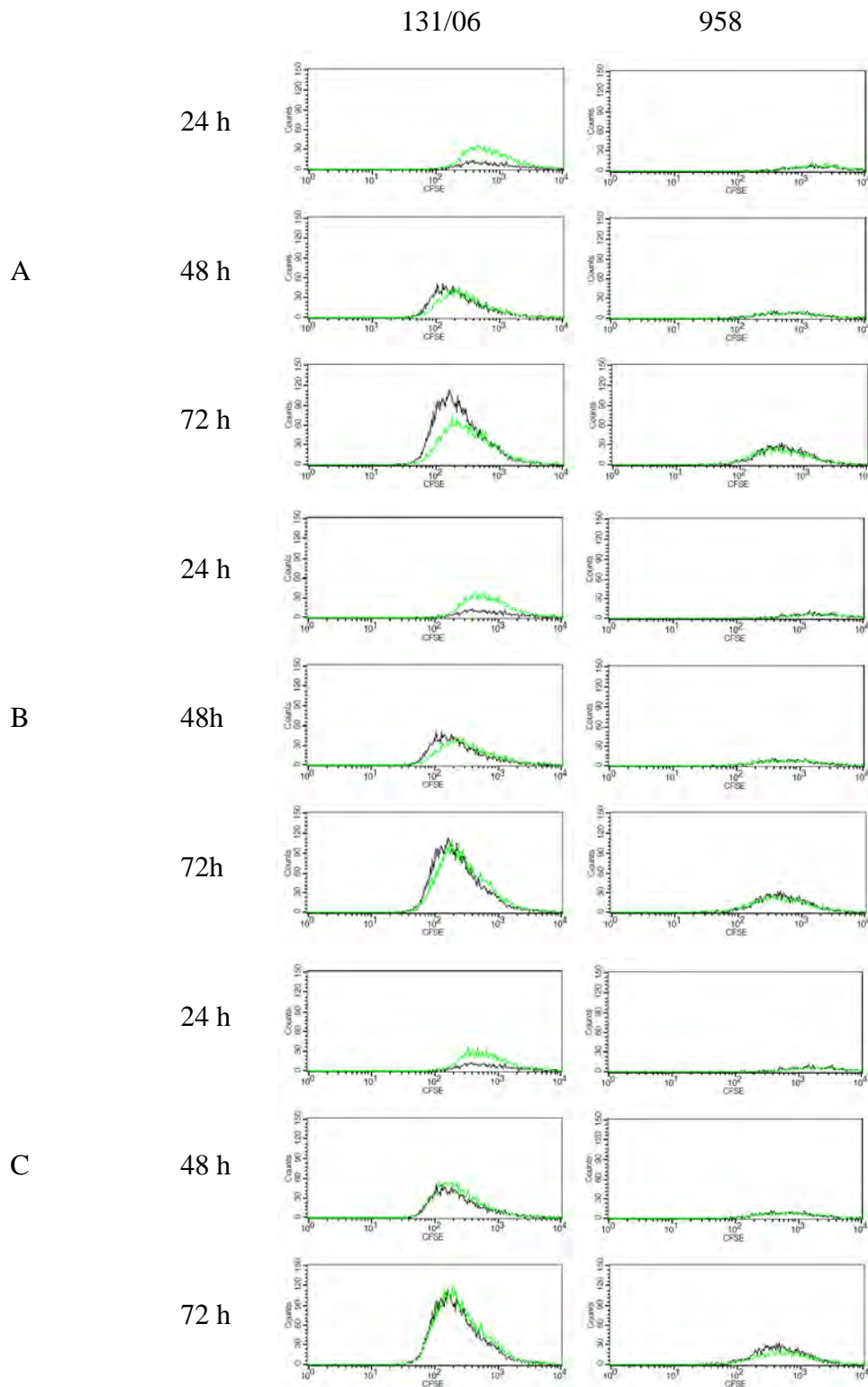


Abb. 42 **Analyse der Zellproliferation mittels CFSE-Assay.**

Einfluss von AIM 3 auf die Zelllinie 131/06 und normale Fibroblasten (958) im Vergleich zum Normalmedium. **A:** $1,25 \times 10^6$ VP/ml; **B:** $6,25 \times 10^5$ VP/ml; **C:** $3,13 \times 10^5$ VP/ml.

— Normalmedium — AIM 3

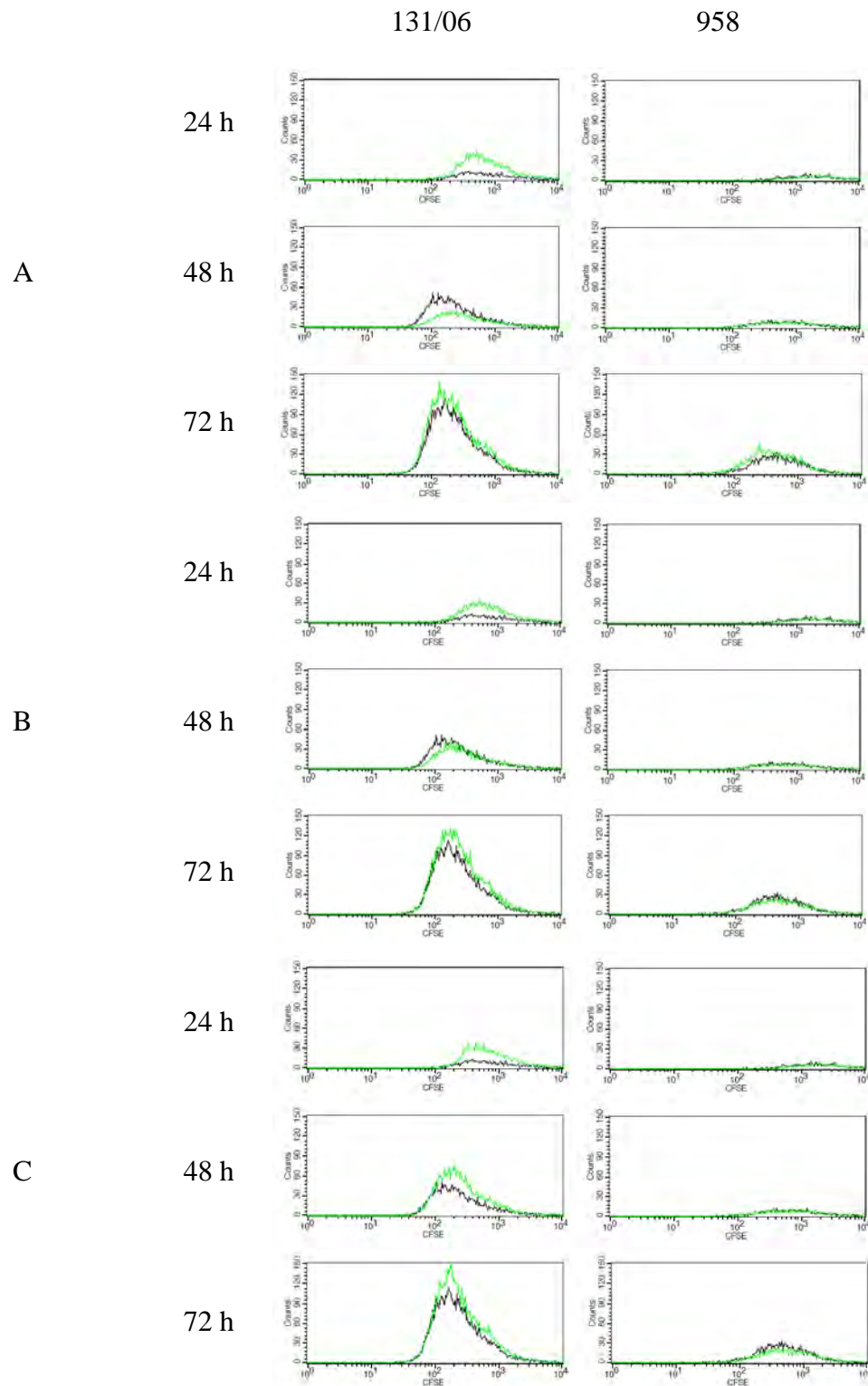


Abb. 43 Analyse der Zellproliferation mittels CFSE-Assay.

Einfluss von AIM 5 auf die Zelllinie 131/06 und normale Fibroblasten (958) im Vergleich zum Normalmedium. **A:** $1,25 \times 10^6$ VP/ml; **B:** $6,25 \times 10^5$ VP/ml; **C:** $3,13 \times 10^5$ VP/ml.

— Normalmedium — AIM 5

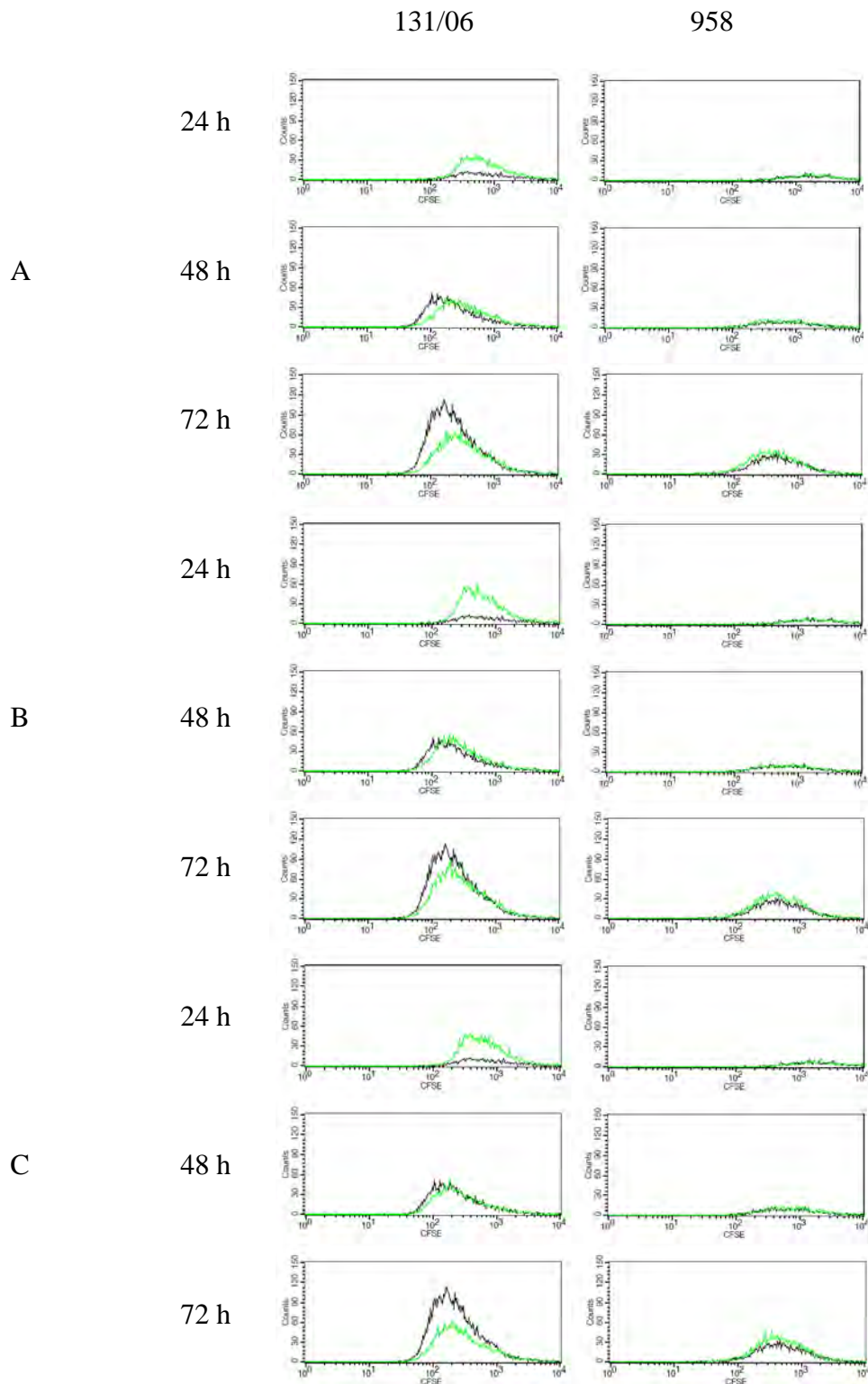


Abb. 44 **Analyse der Zellproliferation mittels CFSE-Assay.**

Einfluss von AIM 3+5 auf die Zelllinie 131/06 und normale Fibroblasten (958) im Vergleich zum Normalmedium. **A:** $1,25 \times 10^6$ VP/ml; **B:** $6,25 \times 10^5$ VP/ml; **C:** $3,13 \times 10^5$ VP/ml.

— Normalmedium — AIM 3+5

4.6 Hamstermodell

Am Ende der Beobachtungszeit, d. h. dreizehn Monate nachdem die ersten Tiere inokuliert worden waren, hatten sich bei insgesamt 27 Hamstern ein bis drei Hauttumoren mit unterschiedlichem Erscheinungsbild im Bereich der Inokulationsstelle ausgebildet. Bei 14 Hamstern glichen die Tumoren makroskopisch equinen Sarkoiden vom fibroblastischen Typ, die im Folgenden als „fibroblastische“ Tumoren bezeichnet werden. Es handelte sich um gut abgrenzbare, verschiebliche Tumoren mit glatter, größtenteils unbehaarter Oberfläche und einem Durchmesser von bis zu 4 cm (Abb. 45A). Bei vier dieser Hamster ulzerierten die Tumoren, was die vorzeitige Euthanasie von zwei Tieren notwendig machte. Die anderen 13 Hamster zeigten eine flächige, lederähnliche Verdickung der Haut, die an einigen Stellen das normale Hautniveau um 1-2 mm überragte und an die okkulte Form des equinen Sarkoids erinnerte (Abb. 45B). Die veränderten Areale dieser „okkulten“ Tumoren waren lediglich in der Peripherie normal behaart. Eine Abgrenzung zum gesunden Gewebe war nur schwer möglich. Einer dieser Hamster entwickelte innerhalb von drei Wochen zusätzlich zu dem Tumor vom okkulten Typ einen zweiten Tumor vom fibroblastischen Typ, der bereits in der dritten Woche ulzerierte.

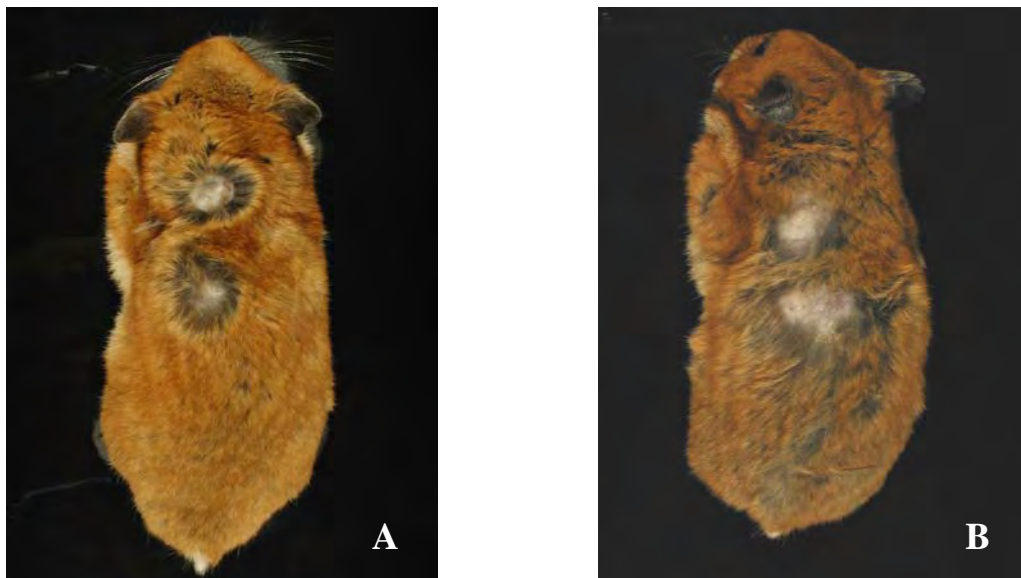


Abb. 45 **BPV-1-induzierte Tumoren beim Hamster.**

A: Tumoren vom fibroblastischen Typ, Hamster VI; **B:** Tumoren vom okkulten Typ, Hamster IX.

Während der gesamten Beobachtungszeit war das Verhalten der infizierten Hamster (mit und ohne Tumoren) verglichen mit dem der nicht infizierten Hamster unauffällig. Die Entstehungszeit der Tumoren bei den einzelnen Hamstern war unterschiedlich und

lag zwischen sieben und zehn Monaten. Bei 36 Hamstern war innerhalb des Beobachtungszeitraumes kein Tumorwachstum zu verzeichnen.

Für eine orientierende Wirksamkeitsstudie von drei Testsubstanzen und einem Placebo wurden zwölf Hamster ausgewählt und in vier Gruppen à drei Hamster aufgeteilt (Tab. 15).

Tab. 15 Hamster für die Wirksamkeitsstudie (Status zu Beginn der Behandlung)

Testsubstanz	Hamster	Tumorgröße in cm	Tumortyp	Ulzeration
XXTerra™	Hamster I	4,5 x 3,5 x 1,5	Fibroblastisch	+
		0,5 x 0,3 x 0,2	Fibroblastisch	-
	Hamster II	1,4 x 1,2 x 0,4	Fibroblastisch	-
CHP	Hamster III	1,3 x 1,4 x 0,8	Fibroblastisch	-
	Hamster IV	3,6 x 2,6 x 1,1	Fibroblastisch	+
	Hamster V	2 x 1,4 x 0,5	Fibroblastisch	+
Triapten®	Hamster VI	1,2 x 1,2 x 0,7	Fibroblastisch	-
	Hamster VII	2,2 x 1,4	Okkult	-
	Hamster VIII	1,6 x 2,3	Okkult	-
		1,45 x 1,8	Okkult	-
Elasan®	Hamster IX	1,5 x 1,8	Okkult	-
	Hamster X	1,1 x 0,8	Okkult	-
	Hamster XI	1,5 x 1,0	Okkult	-
	Hamster XII	1,2 x 1,3	Okkult	-

Am Ende jeder Behandlungswoche wurde jeweils ein Tier pro Gruppe entnommen und obduziert. Die Sektion ergab neben den offensichtlichen Tumoren keine zusätzlichen pathologischen Befunde. Die histopathologische Untersuchung ergab bei Hamster IV, V und XII eine geringgradige Epithelhyperplasie, bei Hamster V war zusätzlich eine Ausbildung von kurzen Reteleisten erkennbar (Abb. 46A). Bei den anderen Tieren wies das Epithel über den dermalen Tumoren, wenn es nicht ulzeriert war, keine Unterschiede zu normaler Epidermis auf. Subepithelial waren die für equine Sarkoide charakteristischen spindelförmig elongierten und schlecht voneinander abgrenzbaren mesenchymalen Tumorzellen zu erkennen, die sich bei den Tumoren vom fibroblastischen Typ in großen Wirbeln und fischzugähnlichen Strängen in einer kollagenreichen Matrix anordneten, aber nur in wenigen Bereichen bis an das Epithel

heranreichten (Abb. 46B). Die Neoplasien waren von keiner Kapsel umgeben und wuchsen herdförmig infiltrativ in die benachbarte Dermis und tiefere Subkutis ein. Die Kerne der dichtgepackten Zellen waren pleomorph. Sie waren rundlich bis längsoval abgeflacht und bis zu 40 µm im Durchmesser groß. In einigen Tumoren fanden sich geringgradige perivaskuläre Infiltrate aus Lymphozyten und Plasmazellen sowie im Falle stärkerer Ulzerationen herdförmig zahlreiche neutrophile Granulozyten.

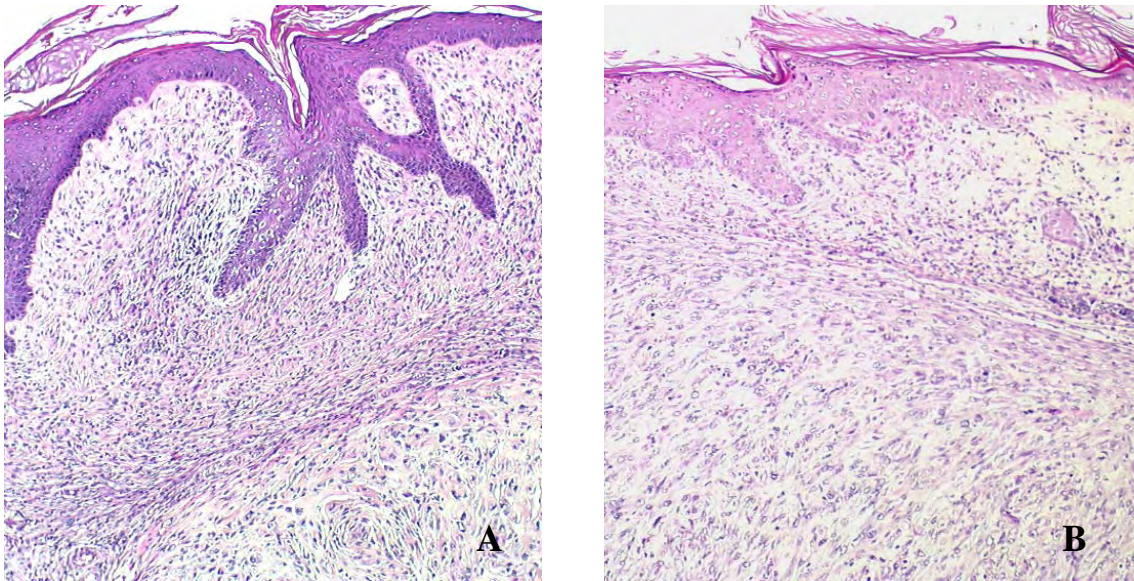


Abb. 46 **BPV-1-induzierter Tumor, fibroblastischer Typ, Hamster.**

A: Mesenchymale Tumorzellen in fischzugartigen Bündeln und Wirbeln bei geringgradiger Epithelhyperplasie und Ausbildung von Reteleisten; **B:** Häufig gibt es keinen Kontakt zwischen dermalen und epidermalen Tumorkomponenten. HE, 25x

Im Vergleich zum equinen Sarkoid waren die Tumoren vom fibroblastischen Typ des Hamsters insgesamt unruhiger und zellreicher. Bei einem Hamster fanden sich zahlreiche mehrkernige Tumorriesenzellen (Abb. 47A). Ähnlich wie bei equinen Sarkoiden war in allen Tumoren die Mitosezahl gering (0-1/40x Gesichtsfeld). Bei den Tumoren vom okkulten Typ waren die Tumorzellen fischzugähnlich als ca. 4-5 mm breiter subepithelialer Saum angeordnet. Das histologische Bild erinnerte an equine Sarkoide vom verrukösen Typ (Abb. 47B). Auch hier war nur stellenweise ein enger Kontakt der Tumorzellen zum Epithel zu erkennen. Die für equine Sarkoide charakteristische „Picket Fence“-Struktur war bei den Tumoren der Hamster nicht zu beobachten.

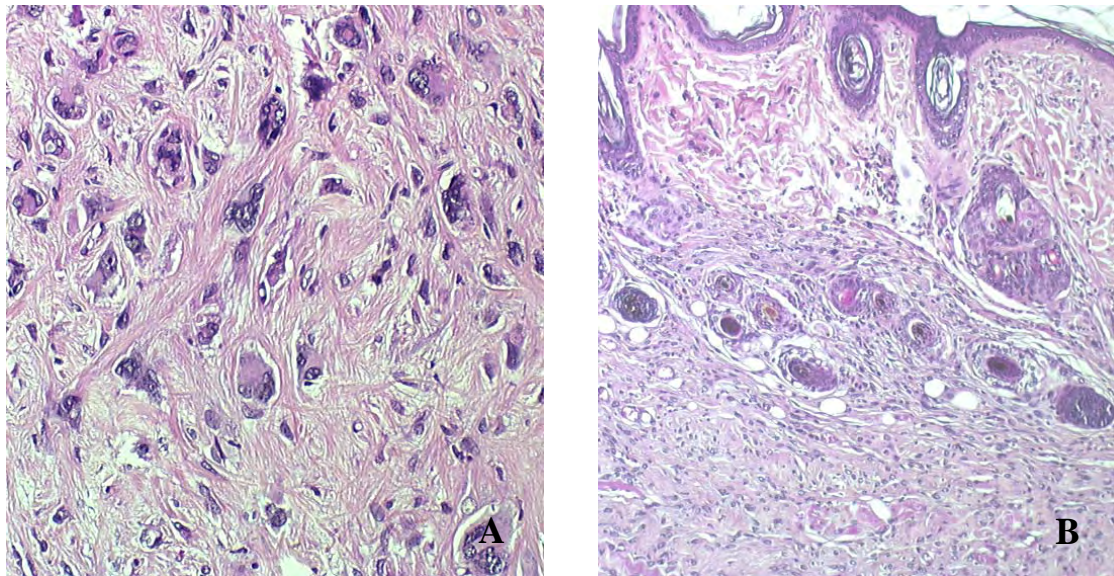


Abb. 47 **BPV-1-induzierte Tumoren, Hamster.**

A: Unruhiges Zellbild mit zahlreichen in eine kollagenreiche Matrix eingebetteten mehrkernigen Riesenzellen bei einem Tumor vom fibroblastischen Typ, 400x. **B:** Mesenchymale Tumorzellen in fischzugähnlichen Strängen ohne Kontakt zur Epidermis und ohne Epithelhyperplasie bei einem Tumor vom okkulten Typ. HE, 25x.

4.6.1 Nachweis von BPV in Hamstertumoren

Aus frischem Tumorgewebe von 13 Hamstern wurde unmittelbar nach der Sektion DNA extrahiert und anschließend mittels BPV-spezifischer PCR untersucht. In neun Tumoren war auf diese Weise DNA von BPV-1 nachweisbar. Insgesamt vier okkulte Tumoren verhielten sich negativ. Bei diesen wurde die DNA-Extraktion aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe, in dem Tumorzellen histopathologisch bestätigt worden waren, wiederholt. Ein Nachweis von BPV-1-DNA war dennoch nicht möglich. In den neun positiven Tumoren ließ sich die BPV-1-DNA in den Zellkernen der Tumorzellen mittels ISH darstellen. Hier gab es erhebliche quantitative Unterschiede. Die zwei okkulten Tumoren reagierten stark positiv mit einem kräftigen intranukleären Signal, ebenso wie die kollagenarmen Tumoren vom fibroblastischen Typ (Abb. 48A), während bei den kollagenfaserreichen Tumoren mit sehr dichter Zellpopulation das Signal nur geringgradig ausgeprägt war. Hier zeigten nur vereinzelte Zellkerne eine schwache Färbung. Deutliche Signale gab es hingegen in solchen Fällen, wo es zu einem Kontakt zwischen epithelialer und mesenchymaler Tumorkomponente im Bereich des dermoepidermalen Überganges kam (Abb. 48B). Aufgrund der intranukleären Lokalisation der Hybridisierungssignale war eine

eindeutige Abgrenzung zu dem intrazytoplasmatisch lokalisierten braunen Melaninpigment möglich.

Mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Hauptonkoprotein E5 von BPV konnte immunhistologisch kein spezifisches Signal erhalten werden.

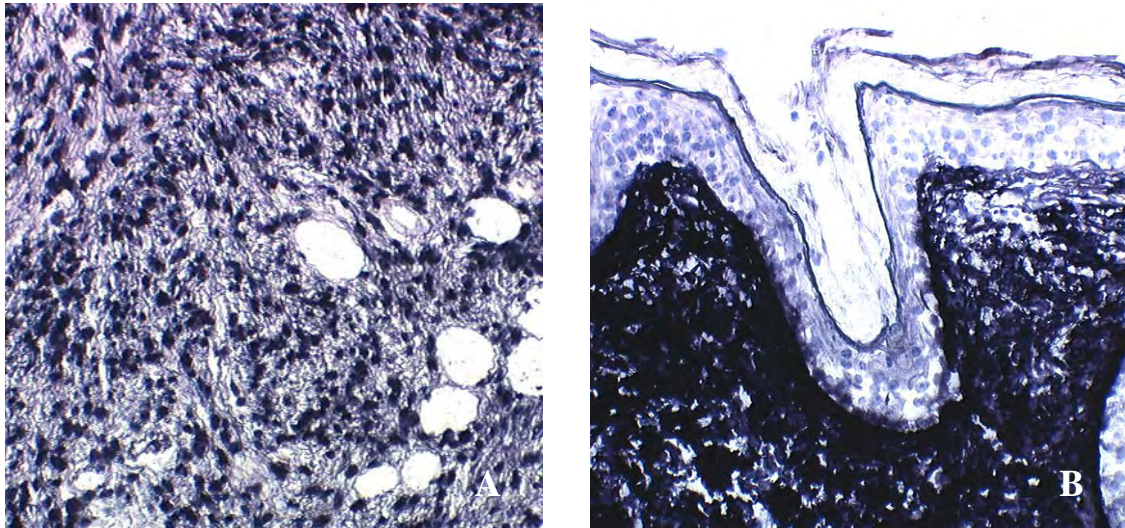


Abb. 48 **BPV-1-induzierte Tumoren, fibroblastischer Typ, Hamster, BPV-1-spezifische ISH.**

A: Intranukleäres Hybridisierungssignal in den fibroblastenähnlichen Tumorzellen, 200x.

B: Starkes Hybridisierungssignal im Bereich des dermoepidermalen Überganges, nicht jedoch in den Epithelzellen, 25x.

4.6.2 Immunhistologische Charakterisierung der Hamstertumoren

Exemplarisch wurden insgesamt fünf Tumoren (drei fibroblastische, zwei okkulte Tumoren) immunhistologisch untersucht. Das Epithel war in allen Fällen positiv für die **Zytokeratine 1-8, 10, 13, 14, 15, 16 und 19** (Abb. 49A). Die fibroblastenähnlichen Tumorzellen reagierten allerdings zum Großteil negativ für **Vimentin**. Während es in vier untersuchten Tumoren einzelne Areale gab, die stark positiv reagierten, zeigte ein Tumor vom fibroblastischen Typ nur einzelne positive Zellen. Die Vimentin-positiven Zellen fanden sich subepithelial und in der Tiefe des Tumorgewebes (Abb. 49B).

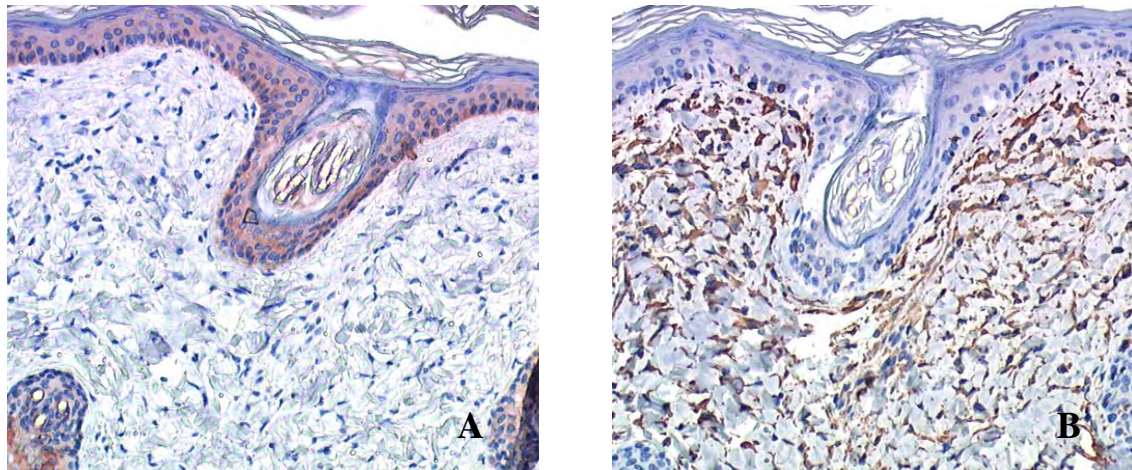


Abb. 49 **BPV-1-induzierter Tumor, fibroblastischer Typ, Hamster, Immunhistologie.**

A: Kräftige zytoplasmatische Signale spezifisch für Zytokeratin im Epithel; **B:** Kräftige Signale für Vimentin in den mesenchymalen Tumorzellen. 25x.

4.6.3 Wirksamkeitsstudie

4.6.3.1 XXTerra™

Die mit XXTerra™ behandelten Tiere zeigten häufig nach der Applikation eine starke Unruhe, die durch Kratzen, Buddeln und Rennen im Kreis gekennzeichnet war.

Hamster I musste aufgrund der Tumorgroße und der fortgeschrittenen Ulzeration bereits am Tag 5 euthanasiert werden. Der Tumor war von fester Konsistenz. Von den bei der Erstuntersuchung befundeten drei Tumoren waren zu Beginn der Behandlung zwei zu einem 4,5 x 3,5 x 1,5 cm großen grobknotig gelappten Tumor konfluiert. Histologisch war unterhalb der teils ulzerierten Epidermis eine herdförmige mittelgradige lymphohistiozytäre Infiltration zu sehen. Der 3. Tumor lag medial dazu, war 0,5 x 0,3 x 0,2 cm groß und verschieblich. **Hamster II** entwickelte an Tag 7 eine orange-rötliche schorfige Tumoroberfläche (Abb. 50A). Zeitgleich reagierte der Hamster empfindlich auf eine Palpation. Die Sektion des Hamsters erfolgte an Tag 15. Der Tumor hatte am Sektionstag eine Größe von 1,5 x 1,7 x 0,6 cm, war gut abgrenzbar und verschieblich. Die Schnittfläche des Tumors war homogen weiß und von faseriger Struktur. Histopathologisch war in der Tumorperipherie eine subepitheliale Koagulationsnekrose zu sehen. Weiter nach außen lag eine Ulzeration vor, unter der das nekrotische Tumorgewebe in Lagen verdichtet und zusammengesintert war (Abb. 50B).

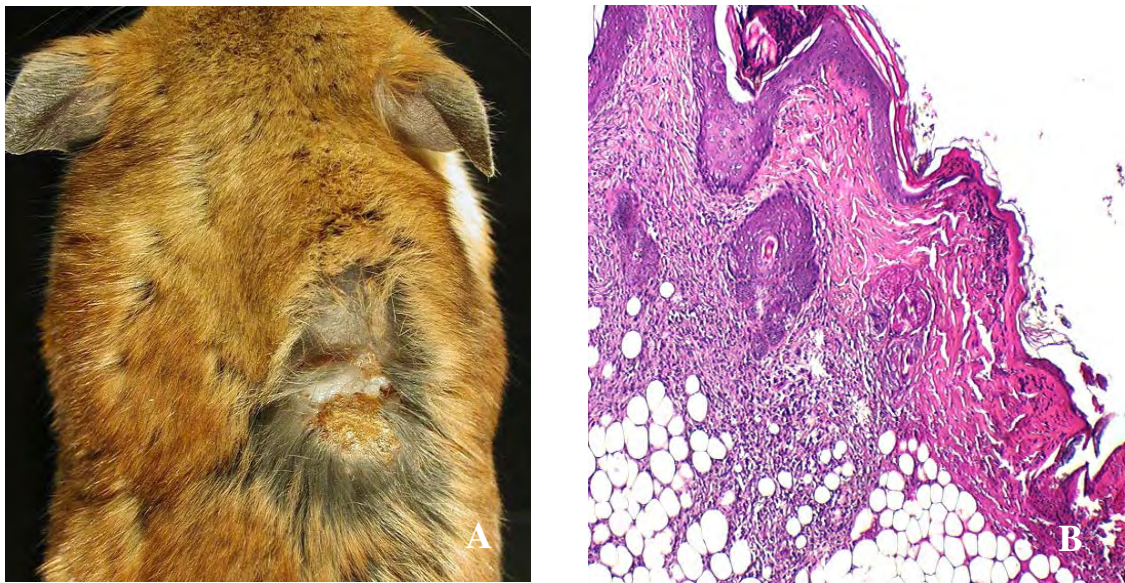


Abb. 50 **BPV-1-induzierter Tumor, Hamster II, 15. Behandlungstag mit XXTerra™**.

A: Gut abgrenzbarer und verschieblicher Tumor mit orange-rötlicher schorfiger Tumoroberfläche;
B: Mesenchymale Tumorzellen, in der Peripherie mit subepithelialer Nekrose und Ulzeration. HE, 25x.

Hamster III wurde insgesamt drei Behandlungsintervallen unterzogen. Ebenfalls an Tag 7 verfärbte sich die Oberfläche schwarz-braun. Die Sektion erfolgte an Tag 22. Zum Zeitpunkt der Sektion war der Tumor verschieblich, von fester Konsistenz und mit trockener Oberfläche (Abb. 51A). Der Tumor hatte eine Größe von 1,5 x 1,2 x 1,2 cm. Auf der Schnittfläche des Tumors war an der Tumoroberfläche ein 0,5 cm dicker schwarzer scharf begrenzter Saum von sehr harter Konsistenz zu erkennen. Darunter befand sich eine feste weißliche Schicht von faseriger Struktur (Abb. 51B).

Histopathologisch war der Tumor aus vier Schichten aufgebaut. An der Oberfläche fand sich auf einer Breite von ca. 0,5 cm hypereosinophiles nekrotisches und zusammengesintertes Material mit ausgeprägter Karyorrhexis. Die Lage darunter war durch ausgedehnte Massennekrosen mit zahlreichen Kerntrümmern gekennzeichnet. Es folgte ein Wall, der aus zahlreichen mononukleären Entzündungszellen, vor allem Plasmazellen bestand. Im Anschluss an das Entzündungszellinfiltrat folgte das Tumorgewebe (Abb. 52).

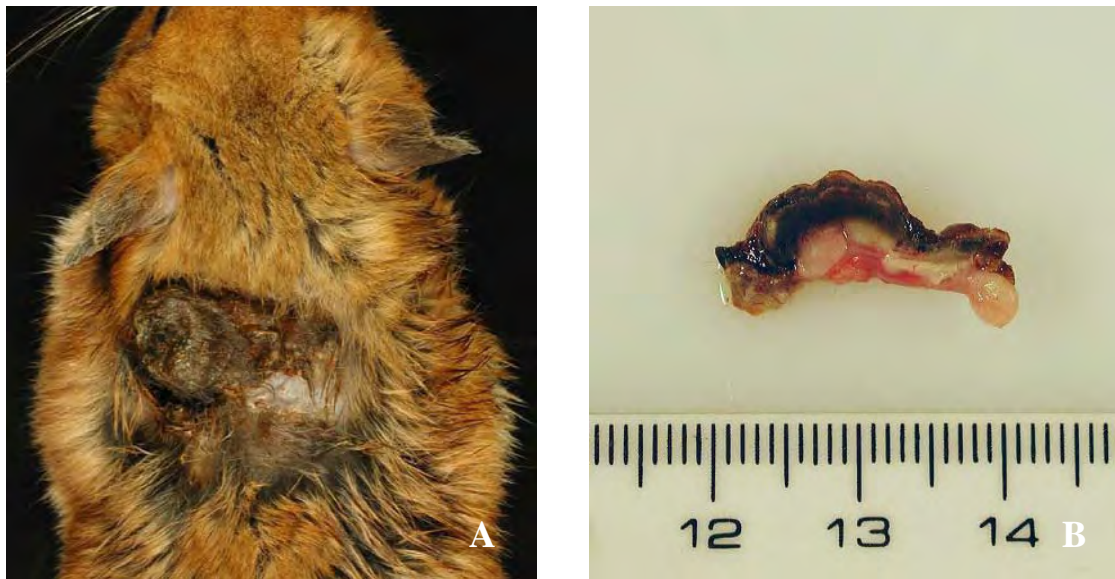


Abb. 51 **BPV-1-induzierter Tumor, Hamster III, 22. Behandlungstag mit XXTerra™.**

A: Gut abgrenzbarer und verschieblicher Tumor von fester Konsistenz mit schwarz-brauner Oberfläche; **B:** Schnittfläche des Tumors mit scharf begrenztem schwarzen Saum von harter Konsistenz mit darunterliegender weißlicher fester Schicht von faseriger Struktur.

4.6.3.2 Cis-4-Hydroxy-L-Prolin (CHP)

Hamster IV wies zum Zeitpunkt der Sektion am 8. Behandlungstag mit CHP einen ulzerierten Tumor von 3,6 x 2,6 x 1,1 cm auf. Er war verschieblich, gut abgrenzbar und von fester Konsistenz. Die Ulzeration auf einer Fläche von 1,8 x 1,1 cm war nicht in die Tiefe ziehend. Die weißliche Schnittfläche zeigte eine faserige Struktur.

Der Tumor von **Hamster V** wuchs während der zweiwöchigen Behandlungszeit auf eine Größe von 2 x 1,4 x 0,5 cm. Die anfänglich geringgradige Ulzeration hatte sich auf eine Fläche von 1,8 x 0,4 cm ausgedehnt, zog jedoch nicht in die Tiefe. Der Tumor war makroskopisch grobknotig gelappt. Er war verschieblich und gut abgrenzbar. Die Schnittfläche des Tumors war einheitlich weiß und von faseriger Struktur.

Bei **Hamster VI** entwickelte sich am 9. Behandlungstag zusätzlich zum Ursprungstumor (1,3 x 1,2 x 0,7 cm) ein zweiter nodulärer Tumor in der Flanke, der am 22. Tag eine Größe von 0,5 x 0,4 x 0,3 cm hatte (Abb. 45A). Beide Tumoren waren verschieblich, von fester Konsistenz und glatter unbehaarter Oberfläche. Die Schnittfläche war einheitlich weiß und von faseriger Struktur.

Bei keinem der untersuchten Tumoren waren makroskopisch oder histopathologisch Reaktionen auf die Behandlung zu erkennen.

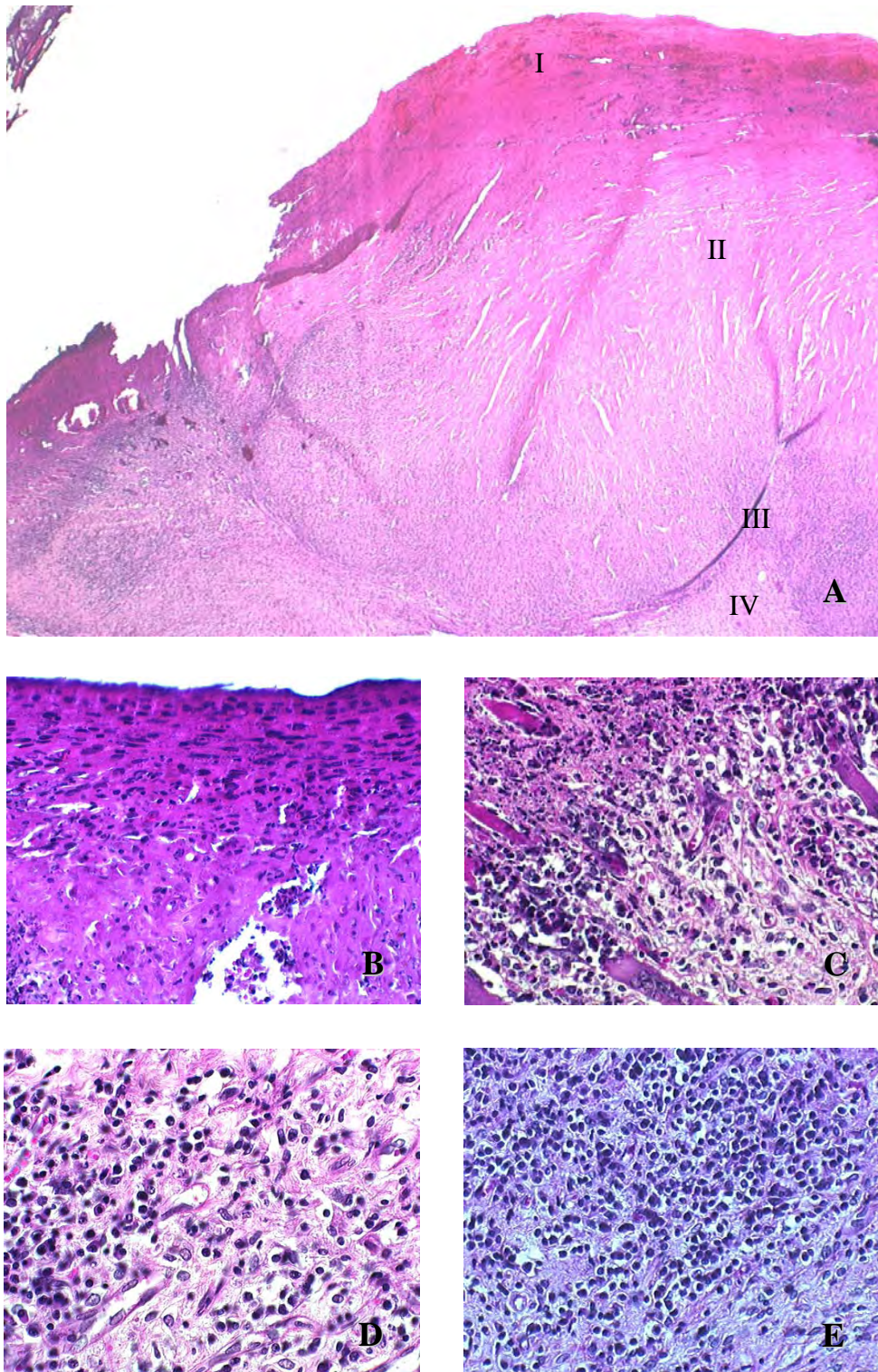


Abb. 52 **BPV-1-induzierter Tumor** aus Abb. 51.

A: Der behandelte Tumor ist aus vier Schichten aufgebaut; **B:** Schicht I, Hypereosinophiles koagulationsnekrotisches und zusammengesintertes Material mit Karyorrhexis; **C:** Übergang von Schicht II zu Schicht III, nekrotisches Gewebe mit darunterliegendem Lymphozytenwall; **D:** Schicht III, zahlreiche Lymphozyten mit Gefäßeinsprossung; **E:** Übergang von Schicht III zu Schicht IV, intaktes Tumorgewebe abgegrenzt durch den Lymphozytenwall. HE, 100x

4.6.3.3 Triapten®

Hamster VII zeigte, ebenso wie **Hamster IX**, ab dem 5. Behandlungstag im Bereich des Tumors ein trockenes weißliches und schuppiges Hautbild. Mitunter kam es zu starkem Juckreiz nach dem Auftragen der Salbe. Am Sektionstag (8. Behandlungstag) waren die Ausmaße des okkulten, 2-3 mm dicken Tumors von Hamster VII unverändert. Die Hautveränderung von **Hamster VIII** hatte am Sektionstag (15. Behandlungstag) eine Größe von 2 x 2,2 x 0,2 cm. Bei Hamster IX hatte sich die Größe der Tumoren auf 1,3 x 2,2 cm und 1,5 x 1,9 cm verändert (Abb. 45B).

4.6.3.4 Elasan®

Die Tumoren der **Hamster X, XI** und **XII** zeigten durch die Behandlung mit dem als Placebo verwendeten „Elasan®“ makroskopisch und histologisch keinerlei Reaktionen. Hamster XII entwickelte während der dreiwöchigen Behandlung einen zweiten Tumor, der im Gegensatz zum ersten Tumor dem fibroblastischen Typ entsprach (Abb. 53A). Dieser Tumor wurde nicht behandelt. Er war am Tag der Sektion 1,7 x 1,5 x 0,6 cm groß und ulzeriert. Auch histopathologisch unterschied sich der zweite Tumor vom ersten und wurde als undifferenziertes Sarkom klassifiziert (Abb. 53B). Trotz des schnellen Wachstums des zweiten Tumors war die Mitosezahl gering (< 1/40x Gesichtsfeld).

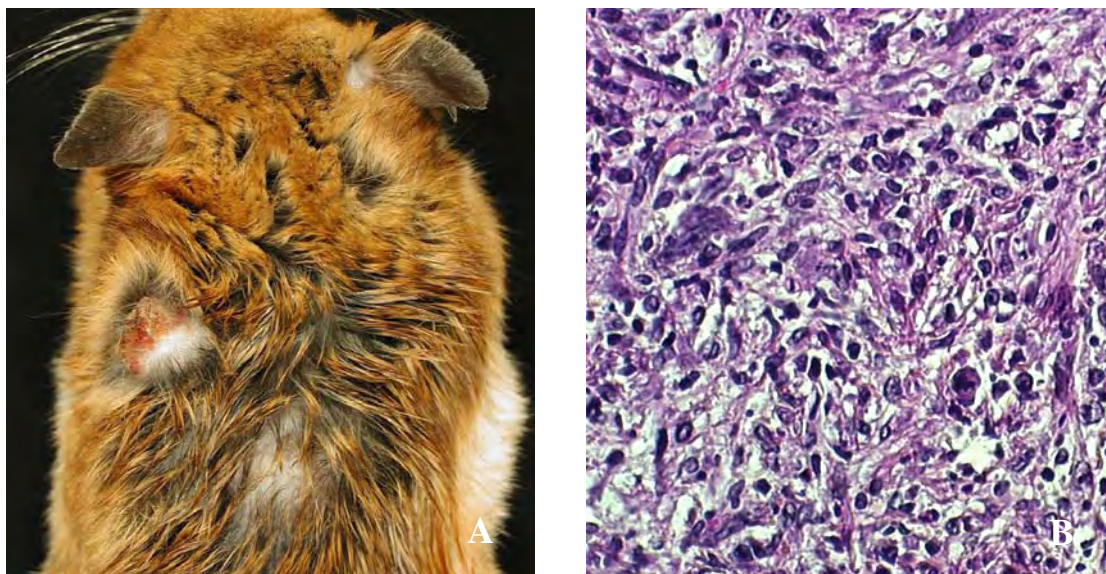


Abb. 53 **BPV-1-induzierte Tumoren, Hamster XII, 22. Behandlungstag mit Elasan®**

A: Zusätzlich zu einem flachen Tumor vom okkulten Typ hat sich ein großflächig ulzerierter Tumor vom fibroblastischen Typ entwickelt; **B:** Undifferenziertes Sarkom mit dichtgepackten ungeordneten spindelförmigen Tumorzellen und Pleomorphie der Kerne. HE, 400x.

4.7 Kasuistische Beschreibung von drei equinen Sarkoiden und deren Therapie mit XXTerra™

Fall I: Eine sechs Jahre alte Mecklenburger Stute mit mehrfach rezidiertem infraorbitalem equinem Sarkoid wurde im Oktober 2002 in der Tierklinik Schwerin (Dr. Ricker, TÄ Dreschel) zur chirurgischen Resektion des Tumors vorgestellt. Der ulzerierte Tumor hatte bei der Erstvorstellung einen Durchmesser von 3 cm (Abb. 54A) und konnte am stehenden Pferd chirurgisch entfernt werden. Histopathologisch erwies sich die Neoplasie als fibroblastisches, teils ulzeriertes equines Sarkoid. Durch PCR und ISH konnte DNA von BPV-1 in den Kernen der mesenchymalen Tumorzellen nachgewiesen werden.



Abb. 54 **Equines Sarkoid, fibroblastischer Typ.**

A: Großflächig ulzerierter infraorbitaler Tumor, Zustand vor der Operation. B: Depigmentiertes haarloses Narbengewebe mehrere Wochen nach Behandlung mit XXTerra™

Nach einigen Wochen kam es zur Rezidivierung und der Tumor musste erneut reseziert werden. Im Mai 2003 traten massive Wundheilungsstörungen mit Rezidivierung und Infiltration in das Oberlid auf. Im darauf folgenden Monat wurde das Sarkoid nochmals, jedoch unter Vollnarkose entfernt und die umgebende Haut großflächig mobilisiert, um eine Wunddeckung zu gewährleisten. Der Tumor im Oberlid erwies sich aufgrund der ungünstigen Lokalisation als inoperabel. Wegen erneuter Rezidivierung und schlechter Prognose wurde XXTerra™ als „ultima ratio“ zur Therapie gewählt und die Salbe nach Herstellerangaben angewendet. Zunächst entwickelte sich eine Hyperämie mit zunehmender Ulzeration des Tumorgewebes. Anschließend kam es zu einer

Demarkation und Nekrose mit Bildung von depigmentiertem haarlosen Narbengewebe. Vier Monate nach Therapiebeginn hatten sich die Tumoren vollständig zurückgebildet und die Wundflächen waren vernarbt (Abb. 54B). Das Pferd ist bislang rezidivfrei.

Fall II: Ein acht Jahre alter Kaltblutwallach mit mehrfach rezidierten equinen Sarkoiden am Ohr wurde ebenfalls mit XXTerra™ behandelt (Abb. 55A). Chirurgische Resektion des Tumors, BCG-Therapie und autologe Vakzine waren als Behandlungsversuche bereits vorangegangen. Unter XXTerra™-Therapie kam es auch hier zunächst zu einer Ulzeration und nach ca. drei Wochen zu einer großflächigen Ablösung von nekrotischen Teilen des Tumors mit Bildung von Granulationsgewebe. Während der Therapie erschwerte sich auf Grund der ungünstigen Lokalisation und Schmerzhaftigkeit der Läsion in zunehmendem Maße die Applikation durch das Verhalten des Tieres. Etwa sechs Wochen nach Behandlungsbeginn waren nur noch schorfige Auflagerungen auf der reepithelisierten Wundfläche zu erkennen (Abb. 55B). Bei diesem Patienten rezidierte der Tumor nach zwei Monaten.



Abb. 55 **Equines Sarkoid, fibroblastischer Typ, Tumorrezidiv.**

A: Blumenkohlartig zerklüftete, stellenweise ulzerierte Oberfläche eines breitbasig an der Ohrmuschel aufsitzenden equinen Sarkoids. B: Frisches Granulationsgewebe und beginnende Reepithelisierung der Wundfläche sechs Wochen nach Beginn der Behandlung mit XXTerra™.

Fall III: Bei einem zwölf Jahre altem Warmblutwallach mit einem okkulten equinen Sarkoid medial an der Vordergliedmaße auf Höhe des Schultergelenkes wurde XXTerra™ als erste Therapie gewählt. Bereits am zweiten Behandlungstag zeigte das den Tumor umgebende Gewebe eine geringgradige Schwellung (Abb. 56A). Der Tumor selbst begann sich 7 Tage nach Beginn der Therapie scharf begrenzt als ca. 0,5 cm dicke schwarz gefärbte Platte abzulösen. Das darunter liegende rosa Gewebe war von unebener Struktur und besaß einzelne oberflächlich schwarz gefärbte Areale bis 0,3 cm

Durchmesser. Nach dem zweiten Behandlungsintervall löste sich erneut eine ca. 0,5 cm dicke Platte nekrotischen Gewebes ab. Das darunter liegende Hautgewebe zeigte eine glatte Oberfläche und war einheitlich rosa. Daraufhin wurde die Behandlung beendet. Die Reepithelisierung der Wundfläche begann 3 Wochen nach Behandlungsbeginn (Abb. 56B). Das Pferd ist seit einem Jahr rezidivfrei.



Abb. 56 **Equines Sarkoid, okkultes Typ.**

A: Zustand am 3. Behandlungstag mit XXTerra™. Die Tumoroberfläche ist durch eingetrocknete Creme schwarz und das umliegende Gewebe geringgradig geschwollen.

B: Zustand zwei Wochen nach der letzten Behandlung mit XXTerra™, deutlich erkennbare Reepithelisierung an den Wundrändern.

5 Diskussion

Hauptziel der Arbeit war es, das Wachstumsverhalten equiner Sarkoidzellen in Zellkultur mit demjenigen normaler Fibroblasten zu vergleichen und zu überprüfen, ob durch BPV induzierte Hamstertumoren morphologisch und pathogenetisch dem equinen Sarkoid als Modell gleichzusetzen sind.

Zu diesem Zweck wurden zunächst 30 resezierte Hauttumoren von **Pferden** histopathologisch als equine Sarkoide diagnostiziert. Es bestätigte sich, wie bereits beschrieben (Teifke, 1993; Bogaert et al., 2007), der fibroblastische Typ mit ca. 64 % als die häufigste Form, gefolgt von dem Mischtyp mit 25 % und dem verrukösen Sarkoid mit ca. 11 %. Bei Vorliegen von einem oder mehreren histopathologisch charakteristischen Merkmalen des equinen Sarkoids ist die Diagnose einfach, jedoch kann beispielsweise bei Sarkoiden im Anfangsstadium oder zum Ausschluss von Differentialdiagnosen der Nachweis des BPV-Genoms mittels PCR oder ISH für eine sichere Diagnose zusätzlich notwendig sein (Teifke, 1993). So konnte auch eine Hautveränderung, bei der proliferierende Fibroblasten von zahlreichen eosinophilen Granulozyten fast vollständig überlagert waren, differentialdiagnostisch von einem eosinophilen Granulom abgegrenzt und mit Hilfe der PCR eindeutig als equines Sarkoid diagnostiziert werden.

Für die ISH wurden Sonden aus drei verschiedenen Abschnitten des BPV-1-Genoms verwendet, die jeweils zu vergleichbaren Hybridisierungssignalen führten. Hierdurch wird deutlich, dass die untersuchten Genabschnitte in allen Tumorzellen offenbar in gleichem Mengenverhältnis vorhanden sind. Das Signal war in nahezu allen mesenchymalen Tumorzellen equiner Sarkoide besonders im Bereich des dermoepidermalen Überganges zu erkennen. In dieser Proliferationszone equiner Sarkoide scheint das Virus zunächst Fibroblasten in Nähe der Basalmembran zu infizieren, wo eine massive Replikation der viralen DNA stattfindet. Es ist jedoch fraglich, ob es sich hierbei um eine aktive Infektion benachbarter Zellen handelt oder um eine vermehrte Proliferation infizierter Zellen, die ihre Genomkopien an Tochterzellen weitergeben.

Während der DNA-Nachweis beim Pferd ein zuverlässiges Diagnostikum ist, gelingt er bei experimentell mit BPV induzierten Hauttumoren von **Hamstern** nicht immer. Trotz des histopathologischen Nachweises charakteristischer fibroblastoider Tumorzellen war in vier von dreizehn Fällen kein Nachweis von BPV-1-DNA möglich. Hier scheint vor allem die Menge der viralen DNA einen entscheidenden Einfluss auf den Nachweis zu haben. Durch ISH an den Hamstertumoren werden in den meisten Fällen nur wenige schwach positive Zellen gefunden. Ob die negativen Tumorzellen tatsächlich keine BPV-1-DNA enthalten oder ob die Kopienzahl in der einzelnen Zelle für einen DNA-Nachweis mittels ISH zu gering ist, bleibt unklar. Die Tatsache, dass mittels PCR Fragmente von BPV-1-DNA in diesen Tumoren nachgewiesen werden können, spricht für eine geringere Sensitivität der ISH. Dignität des Tumors, Größe oder Wachstumsgeschwindigkeit scheinen vom BPV-DNA-Gehalt unbeeinflusst zu sein, denn offensichtlich genügt auch beim Hamster eine geringe Menge, um das Tumorgeschehen aufrecht zu erhalten. Vergleichbares konnte beim Pferd beobachtet werden. In einer Studie mit insgesamt 99 equinen Sarkoiden vom fibroblastischen, verrukösen, nodulären oder okkulten Typ konnte keine Korrelation zwischen dem Proliferationsverhalten des Tumors und der Anzahl der BPV-Genomkopien sowie der mRNA-Expression gezeigt werden (Bogaert et al., 2007). Das ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass anhand nur einer Genomkopie zahlreiche Proteine synthetisiert werden, die auf parakrinem Wege benachbarte nichtinfizierte Zellen transformieren können. Denkbar ist auch ein „Hit-and-Run“-Mechanismus, wie er bei BPV-4-bedingten Tumoren beschrieben wurde. In diesem Fall genügt die Infektion der Zelle als auslösender Impuls für die Tumorentstehung. Diese kann trotz Verlust des Virus, bzw. der viralen DNA fortschreiten. Bei ursprünglich BPV-4-infizierten transformierten Zelllinien ändert sich auch nach Verlust der viralen DNA der Phänotyp nicht. Dennoch können Zellen, in denen die BPV-4-DNA nicht mehr nachweisbar ist, Tumoren in Mäusen induzieren (Smith und Campo, 1989).

Auffällig ist weiterhin, dass in der ISH vor allem die kollagenreichen Hamstertumoren schwach reagierten. Es sind daher auch technische Schwierigkeiten als Ursache schwacher Hybridisierungssignale nicht außer Acht zu lassen. Der hohe Kollagenfasergehalt kann eine ausreichende Verdauung des Gewebes mit Proteinase K erschweren, so dass es durchaus möglich ist, dass zelluläre und virale DNA nicht

genügend demaskiert werden und somit die Zellkerne für die Sonde nur schwer zugänglich sind. Andererseits lösten sich häufig, vor allem nach stärkerer Proteolyse, während der Hitzedenaturierung große Gewebssareale vom Glasobjektträger ab.

Alle Hamster wurden mit der gleichen Dosis auf identischem Wege subkutan inokuliert. Dennoch ist es zu dem unterschiedlichen Erscheinungsbild gekommen: 27 der 63 infizierten Hamster bildeten nach 7 bis 10 Monaten Tumoren aus, die makroskopisch und histopathologisch equinen Sarkoiden glichen. Die beiden beobachteten Tumortypen verhielten sich vollkommen unterschiedlich. Der erste Eindruck, bei dem „okkulten“ Typ könne es sich um eine frühe Form des Tumors handeln, die im weiteren Verlauf in den fibroblastischen Typ übergeht, bestätigte sich nicht. Vielmehr behielten beide Formen während der Beobachtungszeit ihr ursprüngliches Erscheinungsbild auch bei zunehmender Größe bei. Die Tumoren vom okkulten Typ wuchsen nur langsam und zeigten unbehandelt keine Ulzeration. Histopathologisch zeigten die okkulten Tumoren ein geordnetes Zellbild. Im Unterschied dazu wuchsen die fibroblastischen Tumoren in kürzerer Zeit. Sie waren zellreicher und entwickelten ein unruhiges Zellbild. Da im Rahmen dieses Versuches alle Hamster unter gleichen Bedingungen infiziert und gehalten wurden, ist es schwer zu erklären, warum die Mehrzahl der Hamster entweder keine Tumoren entwickelte oder warum sich die entstandenen Tumoren derart unterschieden. Neben der ursächlichen BPV-1-Infektion sind verschiedene Faktoren bekannt, die das Entstehen eines equinen Sarkoids begünstigend beeinflussen können. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem physikalische Noxen, die zu einer mechanischen Vorschädigung der Haut führen (Mohammed et al., 1992). Da die Hamster gruppenweise gehalten wurden, kommen hier vor allem Bisswunden in Betracht. Die Hautregionen, in denen die Tumoren entstanden sind, Nacken und Flanke, sind beide bei möglichen Rankämpfen gut zugänglich. Allerdings entwickelten auch Hamster in Einzelhaltung Tumoren und es gab auch Hamster aus aggressiveren Gruppen ohne Tumoren. Es scheint also nicht jeder Hamster gleichermaßen durch die physikalischen Noxen belastet zu werden. Es könnten weiterhin, wie auch beim Pferd diskutiert, genetische Faktoren eine Rolle spielen (Meredith et al., 1986; Broström et al., 1988; Gerber et al., 1988, Broström, 1995). Jedoch ist hierbei zu bedenken, dass die Hamster für diesen Versuch alle aus einer engen Zucht stammten und daher der Verwandtschaftsgrad hoch ist. Die genetische Variabilität der Hamster untereinander ist

daher in diesem Versuch als gering zu erachten. Aufgrund der einheitlichen experimentellen Haltung konnten viele weitere Variablen, wie Fütterung oder Alter der Tiere ausgeschlossen werden. Es ist daher anzunehmen, dass vor allem der Immunstatus des Einzeltieres bei der Tumorentstehung oder Tumorsuppression eine entscheidende Rolle spielt.

Einige Hamster haben mehrere Tumoren in der Inokulationszone ausgebildet. Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich nicht um Metastasen. Die Entstehung multipler Tumoren im Rückenbereich ist vielmehr auf die Inokulation an sich zurückzuführen. Die Hamster waren am Tag der Inokulation nur ca. 3 cm groß. Das Infektionsvolumen betrug 150 μ l. Nach der subkutanen Injektion dehnte sich die entstandene Quaddel mitunter entlang der gesamten Rumpflänge des Hamsters aus. Vermutlich hat sich bei den Hamstern mit mehr als einem Tumor diese Quaddel geteilt und konnte an verschiedenen Lokalisationen resorbiert werden, so dass mehrere Infektionsherde entstanden sind. Interessant ist in diesem Zusammenhang Hamster XII, der während des Therapieversuches neben dem ersten Tumor vom okkulten Typ einen zweiten Tumor vom fibroblastischen Typ ausbildete. Dieser hatte eine wesentlich schnellere Wachstumsgeschwindigkeit, das histopathologische Bild entsprach einem wenig differenzierten Sarkom mit ulzerierter Oberfläche. Hierbei ist auch zu bedenken, dass die Hamster bekanntermaßen sehr empfindlich auf Stress reagieren. Stress war für dieses Tier möglicherweise durch den Versuch entstanden, während dem auch die Tiere der Placebo-Gruppe, wie Hamster XII einer gewissen Belastung ausgesetzt waren. Sie wurden täglich klinisch untersucht und dreimal täglich behandelt. Auch der durch Sektionen im Rahmen des Versuches bedingte Verlust von Käfigpartnern führt zu belastenden Änderungen des gewohnten Umfeldes. Es ist daher möglich, dass durch diesen Stress das Immunsystem der Hamster zusätzlich geschwächt wurde.

Obwohl sowohl das equine Sarkoid als auch die Hamstertumoren auf eine Infektion mit BPV-1 zurückzuführen sind und beide Tumoren durchaus pathogenetisch vergleichbar sind, gibt es morphologische Unterschiede. Hier sind vor allem das pleomorphe zellreichere Erscheinungsbild des Tumors zu nennen, die nur geringgradig ausgeprägte oder gar nicht vorhandene Epithelhyperplasie und die Lokalisation der mesenchymalen Tumorzellen in der tieferen Dermis anstatt, wie beim equinen Sarkoid, unmittelbar am dermoepidermalen Übergang. Es spricht Vieles dafür, dass aber gerade dieser Kontakt

zwischen epithelialer und mesenchymaler Tumorkomponente für intratumorale Wechselwirkungen beim equinen Sarkoid von Bedeutung ist. Schon alleine die Proliferation der nicht infizierten epithelialen Tumorkomponente weist auf derartige Interaktionen hin. Obwohl niemals papillomavirale DNA in den epithelialen Zellen von equinen Sarkoiden nachgewiesen werden konnte, kommt es häufig zu einer zum Teil hochgradigen Epithelhyperplasie. Bei fehlendem dermoepidermalen Kontakt ist das Epithel hingegen normal ausgebildet (Martens et al., 2000). Eine Transformation von Epithelzellen durch E5 auf parakrinem Wege könnte eine mögliche Ursache für diesen Wachstumsreiz darstellen. Weiterhin ist anzunehmen, dass die durch virale DNA transformierten fibroblastenähnlichen Tumorzellen mittels verschiedener Wachstumsfaktoren, z.B. Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) 7 die Keratinozyten zu vermehrter Proliferation anregen könnten.

Es ist davon auszugehen, dass umgekehrt ebenfalls eine Beeinflussung der fibroblastoiden Tumorzellen durch die Keratinozyten stattfindet. Offensichtlich sind die Tumorzellen im equinen Sarkoid im Gegensatz zu normalen Fibroblasten bei ihrer Differenzierung auf Wachstumsfaktoren angewiesen, die z. B. von Keratinozyten stammen können. Darauf deuten die Ergebnisse der **Immunhistologie** hin. Während die epitheliale Tumorkomponente equiner Sarkoide mit dem Antikörper gegen Zytokeratin zu 100 % positiv reagierte, war in den mesenchymalen Tumorzellen fast nur im Bereich des dermoepidermalen Überganges ein kräftiges, für Vimentin spezifisches Signal zu sehen, das sich jedoch in tieferen Tumorschichten verlor. Tumorzellen ohne Verbindung zum Epithel in der Tiefe sind demnach weniger differenziert. Dermoepidermale Wechselwirkungen, die dafür verantwortlich sein können, sind vor allem im Bereich der Wundheilung beschrieben. Versuche mit Keratinozytenkokulturen zeigen im Vergleich zu Fibroblastenmonokulturen ein unterschiedliches Expressionsmuster von verschiedenen Genen, z.B. auch Zytoskelett-assoziiertes Gene wie Tropomyosin oder von glattmuskulärem Aktin (Werner et al., 2007). Es ist bekannt, dass von Keratinozyten exprimierte Zytokine wie TGF- α und TGF- β Fibroblasten zur vermehrten Proliferation anregen. Auch die Differenzierung kann entscheidend durch diese Faktoren beeinflusst werden (Rosenthal et al., 1986; Desmoulière et al., 1993; Werner et al., 2007). Ähnlich könnte es sich im equinen Sarkoid verhalten, nämlich dass es in den fibroblastenähnlichen Tumorzellen zu einer Vimentinexpression nur unter

dem Einfluss von durch Keratinozyten exprimierten Wachstumsfaktoren und somit auch nur in unmittelbarer Nähe der Keratinozyten kommt.

Bei der **immunzytologischen Charakterisierung** der von equinen Sarkoiden gewonnenen Primärzellen zeigten nur wenige Zellen ein schwaches intrazytoplasmatisches Signal für Vimentin oder reagierten negativ. Damit ähneln sie der mesenchymalen Komponente des Tumors. Geht man davon aus, dass, wie zuvor diskutiert, *in vivo* die mesenchymalen Tumorzellen für ihre Differenzierung auf Wachstumsfaktoren der Epithelzellen angewiesen sind, muss man schließen, dass diese notwendigen Faktoren den Zellen bei einer Sarkoidzellmonokultur nicht zur Verfügung stehen.

Beim Hamster, wo es häufig zu keinem direkten Kontakt von epidermaler und mesenchymaler Tumorkomponente kommt, sind diese Wechselwirkungen vermutlich ebenfalls erschwert oder gar nicht vorhanden. Bedenkt man diese Zusammenhänge, ist es nicht weiter verwunderlich, dass in den Hamstertumoren die Epithelhyperplasie meist eher geringgradig ausgebildet ist. Eine Transformation der epithelialen Zellen ohne direkten Kontakt mit den E5-exprimierenden fibroblastoiden Tumorzellen ist kaum möglich. Ebenso wenig können die Keratinozyten durch Expression von TGF- α und TGF- β die Tumorzellen beeinflussen.

Die fokale Verteilung von differenzierten Vimentin-positiven Tumorzellen, aber auch das lobulierte Erscheinungsbild mancher Tumoren lässt annehmen, dass es beim Hamster, anders als beim equinen Sarkoid, keine aktive Wachstumszone im Bereich des dermoepidermalen Überganges gibt, sondern dass das Tumorstadium vielmehr auf einer klonalen, möglicherweise multizentrischen Expansion beruhen könnte.

Eine Beeinflussung von zellulären Proteinen durch BPV ist bekannt. So kann das Aktinnetzwerk durch E5 und E6 von BPV-1 in Rinderzellen beeinflusst werden (Tsimonaki et al., 2006), während es in equinen Zellen zu keinen Störungen kommt (Yuan et al., 2008). Weitere, bislang nicht belegte Interaktionen, wie eine Unterdrückung der Vimentinexpression, wären eine weitere mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte in equinen Sarkoiden, in Sarkoidzellkulturen und in Hamstertumoren. Dagegen spricht aber, dass beim equinen Sarkoid die Vimentin-positive Region am dermoepidermalen Übergang mit der Zone übereinstimmt, die das stärkste Signal für BPV-DNA in der ISH aufweist. Gerade in dieser Region ist auch der

stärkste Einfluss der viralen Proteine zu erwarten. Eine virusbedingte Herabregulierung von Vimentin ist daher als eher unwahrscheinlich zu erachten.

Bislang kann man nur spekulieren, in welchen Regionen des equinen Sarkoids oder des Hamstertumors welche viralen Proteine exprimiert werden. Dieser Frage sollte immunhistologisch nachgegangen werden. Der Nachweis von papillomaviralen Proteinen gelang jedoch nicht. Das beruht zum einen auf technischen Gründen. Obwohl die spezifische Bindung des **E5-Antikörpers** im equinen Sarkoid mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte (Carr et al., 2001), bindet der Antikörper bei Pferd und Hamster sowohl immunhistologisch im Paraffinschnitt als auch immunzytologisch in der Zellkultur sehr stark unspezifisch. Eine Differenzierung von positiven und negativen Zellen war dadurch unmöglich. Das legt nun den Verdacht nahe, dass der Antikörper nicht paraffingängig ist. Genau das widerlegt aber die Immunhistologie an einem bovinen Papillom, das als Positivkontrolle diente. Hier konnten spezifische Signale generiert werden. Auch bei einem in Paraffin eingebetteten BPV-2 induzierten bovinen Blasenkarzinom konnten spezifische Signale gezeigt werden (Borzacchiello et al., 2003).

Anders verhält es sich beim Nachweis der **genuspezifischen BPV-Strukturproteine**, die in equinen Sarkoiden nicht nachgewiesen werden können. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass die Produktion von papillomaviralen Proteinen eng an die verschiedenen Keratinisierungsschichten der Haut gekoppelt ist, und die Strukturproteine erst in den oberflächlichen verhornten epithelialen Zellen produziert werden. Beim equinen Sarkoid wird aber im Gegensatz zu einer Infektion im natürlichen Wirt die papillomavirale DNA nur in der mesenchymalen Tumorkomponente nachgewiesen. Eine Produktion von L1 und L2 ist nicht möglich, ebenso wenig wie die Freisetzung von Virionen. Dieser Unterschied resultiert zum einen aus der hohen Wirtsspezifität, ist zum anderen aber möglicherweise auch durch Variationen im Virusgenom verursacht. Es ist seit langem bekannt, dass sich im equinen Sarkoid das **Genom von BPV-1** von ca. 8 kbp nachweisen lässt (Ammann et al., 1980). Aber bislang gibt es in der Literatur noch keinen Nachweis, dass das Genom von BPV-1 auch vollständig in equinen Sarkoiden enthalten ist. Gerade in der LCR oder im Bereich von E2 wären Deletionen oder Mutationen für die Virusreplikation von großer Bedeutung und würden eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen der

Pathogenese einer BPV-Infektion beim natürlichen Wirt und beim Pferd bieten. Auch Mutationen im Bereich der für die Strukturproteine kodierenden Gene wären denkbar. Mittels PCR unter Verwendung von 19 überlappenden Oligonukleotidpaaren und nachfolgender DNA-Sequenzierung konnte im Rahmen dieser Untersuchungen exemplarisch an einem Sarkoid, erstmalig soweit herausgefunden werden konnte, gezeigt werden, dass das BPV-1-Genom in equinen Sarkoiden vollständig enthalten ist. Die festgestellten Punktmutationen waren über das Genom verteilt. Auf Grund der angewandten Technik kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass darunter Amplifikationsfehler enthalten waren. Vergleicht man die hier erhaltene BPV-Sequenz mit bekannten sarkoidspezifischen Abweichungen im ORF von E5, findet man Übereinstimmungen mit der BPV-Sequenz vom Typ SWISS 1 (Chambers et al., 2003). Die in der Literatur bei Sarkoiden als typisch beschriebenen verschiedenen Abweichungen in der LCR oder in E2 konnten in der erhaltenen Sequenz nicht gefunden werden (Nasir et al., 2007). Vielmehr entsprach die Sequenz der LCR zu 100 % der für BPV-1 in der Datenbank verfügbaren Sequenz (Chen et al., 1982).

Tumorwachstum lässt sich in den meisten Fällen auf ein entartetes Proliferations- oder Apoptosegeschehen zurückführen. Die Untersuchung der Proliferation erfolgte immunhistologisch mit Antikörpern gegen die **Proliferationsmarker PCNA** und **Ki67**. Die Untersuchung mit den beiden Antikörpern führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während der Antikörper gegen PCNA mit bis 67 % positiven Zellen den Eindruck eines stark proliferierenden Tumors erweckt, konnte Ki67-Antigen nur in 2 % der Tumorzellen nachgewiesen werden. Dieser Befund lässt sich auf die verschiedenen Expressionsmuster der beiden Proliferationsmarker zurückführen. Ki67 wird spezifisch nur in der S-Phase der Mitose exprimiert, wohingegen PCNA auch über die S-Phase hinaus noch in der folgenden G-Phase nachweisbar ist und somit auch Zellen anzeigt, die sich schon nicht mehr in der S-Phase befinden (Bravo und MacDonald-Bravo, 1987). Daher ist der immunhistologische Nachweis von Ki67 als aussagekräftiger zu werten. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen immunhistologischen Untersuchungen, die den geringen Anteil mit Ki67-positiver proliferierender Zellen in equinen Sarkoiden beschreiben (Nixon et al., 2005; Bogaert et al., 2007). Die geringe Anzahl mitotischer Zellen in Paraffinschnitten equiner Sarkoide weist ebenfalls auf einen geringen Proliferationsstatus hin. Ebenso verhält es sich bei den Hamstertumoren. Da es bei

beiden Tierarten trotz offensichtlich geringer Proliferationsrate zu einem zum Teil starken Wachstum der Tumoren kommt, ist zu vermuten, dass die Ursache hierfür in einem gestörten Apoptosegeschehen (Nixon et al., 2005) oder in einer Beeinträchtigung der Eigenregulierung der Tumorzellen zu sehen ist. Weil offenbar der Tumorsuppressor p53 bei der Pathogenese des equinen Sarkoids keine Rolle spielt (Bucher et al., 1996; Bogaert et al., 2007), wurde die Expression des **Tumorsuppressorproteins PTEN** in equinen Sarkoiden näher untersucht. Da bekannt ist, dass es durch Bindung des papillomaviralen Onkoproteines E5 an den PDGF-Rezeptor zu einer Phosphorylierung von AKT und damit zu einer Zellproliferation kommt, ist als Reaktion der infizierten Zellen eine die Kaskade unterbrechende Expression von PTEN zu erwarten. Im Gegensatz zu unveränderter Haut, wo kein PTEN nachgewiesen werden konnte, exprimierten in equinen Sarkoiden bis zu 68 % der Tumorzellen PTEN. Dennoch konnte in bis zu 64 % der fibroblastoiden Tumorzellen auch ein intrazytoplasmatisches Signal für pAKT dargestellt werden. Es kommt also in equinen Sarkoiden trotz PTEN-Expression zu einer Phosphorylierung von AKT und somit auch zu einer, wenn auch geringen Zellproliferation, was wiederum auch die Expression von Ki67 und PCNA belegt. Hierzu lassen sich verschiedene Hypothesen aufstellen.

Eine Möglichkeit wäre, dass BPV in der Lage ist, zusätzlich zu dem bereits bekannten Weg über den PDGF-Rezeptor, mittels einer weiteren bislang unbekanntem Reaktionskaskade die Phosphorylierung von AKT herbeizuführen. In Folge dieser vermehrten Aktivierung käme es zu einer regulatorischen, gegensteuernden Expression von PTEN. PTEN könnte jedoch die Phosphorylierung von AKT nicht erfolgreich supprimieren, da es nur an der PDGF-vermittelten Kaskade ansetzen würde. Gegen diese Ansicht spricht die an C127-Zellen mit defekter PDGF-Signalkaskade gemachte Beobachtung, dass eine Transformation durch BPV-E5 eben diese Signalkaskade benötigt (Riese und DiMaio, 1995). Einen Alternativweg zur Stimulation von AKT scheint es demnach nicht zu geben.

Eine zweite Möglichkeit wäre, dass der Tumorsuppressor PTEN direkt durch BPV in seiner Funktion eingeschränkt werden könnte. Denkbar ist in diesem Fall beispielsweise die Blockade einer Bindungsstelle durch ein virales Protein.

Drittens ist bekannt, dass Mutationen von PTEN zu einem Funktionsverlust des Proteins und nachfolgend zur Entstehung von Tumoren führen können (Ali et al., 1999). Es ist

daher nicht auszuschließen, dass der Funktionsverlust von PTEN und auch die nachfolgende Entstehung equiner Sarkoide auf Genommutationen zurückzuführen sind. Jedoch ist vor allem eine Infektion mit BPV als auslösendes Moment für die Entstehung des equinen Sarkoids zu sehen, so dass Mutationen von PTEN als alleinige Ursache unwahrscheinlich, allerdings als weiterer prädisponierender genetischer Faktor denkbar sind.

Im Western Blot zeigte der verwendete Antikörper gegen humanes PTEN auch beim Pferd ein Protein in der Größe von ca. 47 kDa an. Die mit diesem Antikörper in der Immunhistologie von equinen Sarkoiden und von als Positivkontrolle verwendetem equinen Nierengewebe erhaltenen Signale sind daher als spezifisch zu werten. Die Sequenzierung des RT-PCR-Produktes weist mit einer Übereinstimmung von 95 % mit murinem PTEN auf die Homologie bei unterschiedlichen Spezies hin.

Sowohl im Western Blot als auch in der RT-PCR konnten eine PTEN-Expression bzw. Transkripte von PTEN auch in gesunder Pferdehaut nachgewiesen werden. Es ist daher davon auszugehen, dass PTEN konstitutiv exprimiert wird und es erst im Bedarfsfall zu einer vermehrten Translation des Proteines kommt. Immunhistologisch konnte bei gesunder Haut keine PTEN-Expression nachgewiesen werden. Hier liegt vermutlich in der einzelnen Zelle der PTEN-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze. In den für RT-PCR und Western Blot aufgearbeiteten Proben steht hingegen insgesamt genug RNA bzw. Protein für den Nachweis durch die sensitiveren Methoden zur Verfügung.

Trotz umfangreicher Untersuchungen zur Pathogenese des equinen Sarkoids existieren bislang noch immer keine sicher wirksamen Behandlungsansätze. So stellt die **Therapie** des equinen Sarkoids weiterhin ein ungelöstes Problem dar, weshalb immer wieder verschiedene neuartige Methoden zum Einsatz kommen. Die Therapie mit **XXTerraTM** beruht auf einem pflanzlichen Präparat. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Behandlung von drei Pferden mit teils mehrfach rezidierten equinen Sarkoiden mit **XXTerraTM** begleitet werden. Zweimal wurde **XXTerraTM** nach zahlreichen Therapieversuchen als „Ultima ratio“ gewählt, einmal als erste Therapie. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist vor allem die zunächst einfache Anwendung dieses topischen Präparates, die vom Tierbesitzer nach Anweisung des Tierarztes selbst durchführbar ist. Dass es durch die Therapie zu keinen weiteren Nutzungseinschränkungen des Tieres kam, war ein zusätzliches positives Kriterium.

Allerdings kann sich mit der rasch einsetzenden und zunehmenden Ulzeration des Tumorgewebes die Applikation der Salbe immer schwieriger gestalten, so dass massive Abwehrbewegungen des Patienten eine adäquate Behandlung des Tumors möglicherweise komplizieren. Die Salbe scheint starkes Brennen oder Juckreiz herbeizuführen. Es zeigte sich allerdings auch wieder die bereits von anderen Therapiemethoden bekannte Rezidivbildung. Während beim ersten und dritten hier beschriebenen Fall die Therapie erfolgreich verlaufen ist und bislang nicht zu einem Rezidiv geführt hat, kam es bei dem zweiten Fall nach erfolgreicher Therapie bereits nach kurzer Zeit zu Rezidiven. Der Wirkmechanismus des Präparates sowie Ursachen für die unterschiedlichen Therapieerfolge sind hierbei noch unbekannt. Zur näheren Untersuchung wurden Tumoren BPV-infizierter Hamster mit XXTerra™ behandelt. Verglichen mit den Sarkoiden des Pferdes nahmen die Tumoren der Hamster in Relation zur Körpergröße einen deutlich größeren Anteil der Haut ein. Das durch die Applikation herbeigeführte Brennen oder Jucken könnte daher ungleich stärker gewesen sein als beim Pferd, so dass die starke Unruhe der Hamster nach jeder Behandlung verständlich ist. Betrachtet man die Histologie der mit XXTerra™ behandelten Hamstertumoren, dominieren abgestorbene und teilweise zusammengesinterte Zellen das Bild. Darunter folgt ein Wall aus mononukleären Entzündungszellen, der das nekrotische Gewebe vom noch intakten Tumorgewebe abgrenzt. Es ist möglich, dass der Zelluntergang auf das in dem kanadischen Blutwurz enthaltene Alkaloid Sanguinarin und dessen zellzyklushemmende und proapoptotische Eigenschaften zurückzuführen ist (Ahmad et al., 2000; Adhami et al. 2003, 2004;).

Die Etablierung eines **In-vitro-Modells** sollte eine intensivere Untersuchung des Alkaloids Sanguinarin und weiterer möglicher Wirksubstanzen ermöglichen. Es kam hierbei jedoch zunächst zu einigen Schwierigkeiten.

Trotz der relativ hohen Zahl von 29 verwendeten Tumoren konnten insgesamt nur fünf Zelllinien angelegt werden, die sich als BPV-1-DNA positiv erwiesen und die ein für Tumorzellen typisches Wachstumsverhalten zeigten. Drei Zelllinien stammten aus verrukösen Sarkoiden, die vierte Zelllinie aus einem Sarkoid vom Mischtyp und die fünfte Zelllinie aus einem Sarkoid vom fibroblastischen Typ. Ausgehend von der Theorie, dass es sich bei den Sarkoiden vom verrukösen Typ um frühe Sarkoide handelt, die im Laufe ihrer Entwicklung über die Mischform in den fibroblastischen

Typ übergehen (Jackson, 1936; Ragland, 1970), ist es verständlich, dass es bei den beiden erstgenannten Tumortypen zu einem schnelleren Auswachsen der vermutlich biologisch aktiveren „jungen“ Tumorzellen kommt. Es ist seit kurzem bekannt, dass bestimmte sarkoidspezifische Mutationen im BPV-1-Genom des Ausgangstumors eine Etablierung von Zellkulturen beeinflussen können. Sarkoidzellen, die bestimmte Abweichungen im E5- und E2-Gen sowie in der LCR besitzen, lassen sich über einen längeren Zeitraum kultivieren. Auch ist es nur möglich, equine Zellkulturen mit BPV-DNA zu transfizieren, die aus equinen Sarkoiden stammt, nicht aber mit BPV-DNA aus bovinen Papillomen (Yuan et al., 2008). Das im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Genom besaß nur eine der beschriebenen Mutationen im E5, keine jedoch in E2 oder LCR. Die aus diesem Tumor generierte Zellkultur war BPV-DNA-negativ. Möglicherweise lagen in den Ausgangstumoren der anderen BPV-DNA-negativen Zellkulturen ebenfalls BPV-Genome mit wenigen oder anderen Mutationen vor, so dass die Etablierung von BPV-DNA-positiven Zelllinien dadurch erschwert war.

Das Anlegen der **Zelllinien** war außerdem durch die zum Teil starke bakterielle Kontamination kompliziert. Während diese bei den ulzerierten Tumoren zu erwarten gewesen war, stellte sie bei zahlreichen Tumoren mit intaktem Oberflächenepithel ein überraschendes Ergebnis dar. Es ist unklar, wie es zu der Besiedelung des Tumorgewebes durch *Staphylococcus* spp. gekommen ist, die nicht zu der üblichen Hautflora von Pferden zählen. Da eine immunologische Komponente bei der Entstehung von equinen Sarkoiden diskutiert wird, ist eine allgemeine Abwehrschwäche, die im Tumorgewebe einen „Locus minoris resistentiae“ entstehen lässt, denkbar.

Die BPV-DNA-positiven Zelllinien zeichneten sich vor allem durch ihr für Tumorzellen charakteristisches Wachstumsverhalten aus, das sich vermutlich auch auf die von E6 herbeigeführte Unterdrückung von Paxillin zurückführen lässt. Durch das Fehlen von Zell-zu-Zell-Kontakten kam es zu keiner Wachstumsinhibition der Zellen, die normalerweise ein unkontrolliertes Übereinanderwachsen mit Criss-Cross-Muster und Focusbildung verhindert. Mit steigender Passagezahl veränderten sich diese Muster, bis die Zellen in ihrem Wachstum schließlich einer normalen fischzugartigen Fibroblastenkultur ähnelten. Diese Veränderung der Morphologie ging semiquantitativ mit einer Intensitätsabnahme der amplifizierten Bande nach PCR zum BPV-DNA-

Nachweis in der Zellkultur einher. Es ist anzunehmen, dass aus den Sarkoidexplantaten eine Mischkultur auswuchs, die sowohl aus BPV-DNA-positiven als auch BPV-DNA-negativen Zellen bestand. Die negativen Fibroblasten wurden vermutlich durch die parakrine Expression von beispielsweise E6 aus positiven Tumorzellen in ihrem Wachstumsverhalten derart beeinflusst, dass sich zunächst das hier beschriebene charakteristische ungeordnete Zellbild entwickeln konnte. Jedoch setzten sich offenbar mit steigender Passagezahl die BPV-DNA-negativen Zellen sukzessive durch. Dies würde folglich zu sinkender E6-Expression führen, die wiederum den Rückgang des charakteristischen transformierten Phänotyps bewirkte. Weiterhin ist anzunehmen, dass die BPV-DNA-positiven Zellen empfindlicher auf eine Kryokonservierung reagieren als die nicht infizierten Zellen und sich diese Zellpopulation nach längerer Kryokonservierung gegenüber den infizierten Zellen durchsetzt. So kommt es, dass der BPV-DNA-Nachweis mittels PCR bei kryokonservierten und aufgetauten Zellen schwächer ausfällt als bei frischen Sarkoidzellen oder nach längerer Lagerung bei -196°C sogar negativ war. Schon alleine anhand des Wachstumsverhaltens der Zellen, aber auch aufgrund der Intensitätsabnahme der amplifizierten Bande in der BPV-PCR war zu erkennen, dass eine einmal kryokonservierte Zellkultur in dieser Hinsicht nicht mehr mit dem frischen Ausgangsmaterial übereinstimmte.

Eine Schwierigkeit war die begrenzte Passagezahl der Sarkoidzelllinien. Wenige Passagen nach Verlust der BPV-DNA setzte die Seneszenz der Zellen ein.

Die kurze Überlebenszeit von equinen Zellen in Kultur ist bekannt. Dies steht in direktem Zusammenhang mit der Tatsache, dass keine permanenten equinen Zelllinien existieren. Für equine Dermiszellen werden, vergleichbar mit den in dieser Arbeit verwendeten equinen Fibroblasten, weniger als 40 Passagezahlen beschrieben (Maeda et al., 2007). Ähnlich verhält es sich bei humanen Fibroblasten, von denen eine ebenfalls nur begrenzte Teilungsfähigkeit bekannt ist (Hayflick und Moorhead, 1961). Die Lebensdauer von Zelllinien scheint mit der Lebensdauer der Ursprungsspezies zu korrelieren (Rohme, 1981). Hierfür sind, wie experimentelle Untersuchungen auch belegen, bessere Reparaturmechanismen als Ursache anzunehmen (Sherr und DePinho, 2000). Onkoproteine, wie das SV40 T-Antigen, sind zwar in der Lage, die Funktion von p53 und Rb zu neutralisieren, können aber dennoch keine Immortalisierung von humanen Zellen bewirken (Wright und Shay, 1992). Eine weitere Rolle bei der

Lebensdauer von Zellen spielt die Länge ihrer Telomere. Beim Pferd haben Telomere altersabhängig eine Länge von 7 bis 21 kbp (Argyle et al., 2003), beim Menschen von durchschnittlich 12 kbp. Vergleicht man das mit der Länge von murinen Telomeren, nämlich durchschnittlich 60 kbp, wird eine große Diskrepanz deutlich. Nach dem Abbau derart kurzer Telomeren befinden sich die Zellen in einer sogenannten „Krise“, die durch chromosomale Instabilität gekennzeichnet ist. Damit zumindest einige Zellen diese Krise überstehen und so zur Etablierung einer permanenten Linie führen, sind Telomerasen notwendig, die aber von normalen humanen Zellen nicht exprimiert werden. So ist es nicht weiter verwunderlich, dass die meisten permanenten humanen Zelllinien von Telomerase exprimierenden Tumoren stammen (Sherr und DePinho, 2000). Die Telomeraseaktivität wurde in primären equinen Zellen und in normalem equinen Gewebe, aber auch in equinen Papillomen und Sarkoiden untersucht. Es konnte keine Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden (Argyle et al., 2003). Dennoch gab es Chancen für die Entwicklung einer permanenten equinen Zelllinie mit dem equinen Sarkoid als Ausgangsmaterial. Wie die Untersuchungen zur Rolle von PTEN vermuten lassen, könnte das Sarkoid möglicherweise *in vivo* über durch BPV induzierte Möglichkeiten verfügen, Reparaturmechanismen der DNA zu umgehen. Es stellte sich aber heraus, dass das Gegenteil der Fall war. Die BPV-positiven Zellen hatten im Vergleich zu normalen equinen Fibroblasten sogar eine kürzere Überlebensdauer und schienen im direkten Wettbewerb mit nicht infizierten Zellen in der Mischkultur zu unterliegen. In diesem Zusammenhang wird erneut deutlich, dass den Sarkoidzellen *in vivo* andere Wachstumsfaktoren oder Möglichkeiten, die Reparaturmechanismen zu umgehen, zur Verfügung stehen als den Zellen gleichen Ursprungs *in vitro*. Die dermoepidermalen Wechselwirkungen scheinen auch in diesem Zusammenhang eine bedeutsame Rolle zu spielen. Eine Kokultur, die die Struktur von epithelialer und mesenchymaler Schicht imitiert, könnte die In-vivo-Situation besser darstellen.

Der geringe Anteil der BPV-positiven Zellen an den angelegten Zellkulturen und ihre kurze Lebensdauer erschweren die Arbeit mit diesem In-vitro-Modell. Daher wurde trotz der Veränderungen durch die Kryokonservierung für die beabsichtigten Experimente auf eingefrorene Zellen zurückgegriffen. Da es sich um primäre Zelllinien handelt, sind bereits bei den noch frischen Kulturen Variationen von Passage zu Passage unvermeidbar. Das belegt auch die zytogenetische Charakterisierung von zwei

Zelllinien. Zwischen dem ersten und zweiten Karyogramm sind deutliche Veränderungen feststellbar. Seneszenz tritt jedoch ein, bevor die Zellen das Stadium der Permanenz erreichen und einheitlich werden.

Auf diese nicht standardisierbaren Bedingungen und das daraus resultierende heterogene Zellmaterial sind die unterschiedlichen Ergebnisse im Stoffwechsellassay bei den verschiedenen getesteten Substanzen zurückzuführen.

Mit Ausnahme von Immodin und Foscarnet-Natrium wurde die **mitochondriale Dehydrogenaseaktivität** bei allen zu testenden Substanzen bei insgesamt drei Zellkulturen, zwei Sarkoidzelllinien (136/05 und 131/06) und zum Vergleich mit normalen equinen Fibroblasten (958), überprüft. Es zeigte sich, dass sich die beiden Sarkoidzellkulturen unterschiedlich, bei **AIM** zum Teil sogar gegensätzlich, verhielten. Beispielsweise wurde die Stoffwechselaktivität der Zelllinie 136/05 durch Behandlung mit „AIM 3“ gesteigert. Die Stoffwechselaktivität der Zelllinie 131/06 wurde hingegen unter gleichen Bedingungen gesenkt. Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Zelllinien liegt in der Kryokonservierung begründet. Bei der Zelllinie 131/06 handelte es sich zum Zeitpunkt der Untersuchung um eine frische Primärzelle unmittelbar nach der Explantation. Im Gegensatz dazu lag die Explantation der Zelllinie 136/05 zu diesem Zeitpunkt schon länger zurück. Deshalb musste hierfür auf kryokonservierte Kulturen zurückgegriffen werden. Durch die kryokonservierungsbedingte Populationsverschiebung unterschieden sich beide Zellkulturen.

Nach Behandlung mit CHP und Sanguinarin kam es bei beiden Tumorzelllinien sowie bei den normalen Fibroblasten (958) zu ähnlichen Reaktionen, am stärksten bei der frischen Zellkultur 131/06. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die BPV-infizierten Tumorzellen auf diese Substanzen empfindlicher reagieren als die negativen Zellen bzw. die normalen Fibroblasten. Mit sinkendem Anteil BPV-positiver Zellen in der Kultur, z. B. durch Kryokonservierung oder bei zunehmender Passagezahl, reduzieren sich daher gleichzeitig auch die für CHP oder Sanguinarin empfindlichen Zellen.

Mit **Sanguinarin** in geringer Dosierung lässt sich bei allen drei Zelllinien zunächst eine Steigerung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität beobachten. Bei stärkerer Konzentration war ein Abfall derselben festzustellen. Bei der Zelllinie 131/06 trat dieser Abfall der Enzymaktivität bei geringeren Konzentrationen als bei den anderen geprüften

Zellen ein, sie reagiert also empfindlicher als die normalen Fibroblasten oder die kryokonservierten Zellen. Dieses In-vitro-Ergebnis könnte der Wirkung von XXTerra™ bei der In-vivo-Therapie entsprechen, bei der das Tumorgewebe deutlich empfindlicher mit Nekrose reagiert als die umgebende Haut, die kaum durch das Präparat angegriffen wird. Diese schon bei anderen Zellarten beschriebene Selektivität lässt sich so auch in diesem Zellkulturmodell nachvollziehen (Ahmad et al., 2000).

CHP reagierte als einzige der untersuchten Substanzen ähnlich wie Sanguinarin mit einer dosisabhängigen Stoffwechselreduktion, die am stärksten bei der Zelllinie 131/06 ausfiel.

Nach Inkubation mit **Immodin** kam es bei beiden Zelllinien zunächst zu einer deutlichen Steigerung der Stoffwechselaktivität, die bei höchster Konzentration aber bereits nach 24 h wieder abflaute. Dieser plötzliche Abfall der Stoffwechselaktivität ist aber weniger auf die Wirkung der Substanz zurückzuführen, sondern vielmehr auf die Tatsache, dass bei dieser Dosierung den Zellen nur wenig Medium zur Verfügung stand. Anders verhält es sich bei der geringeren Immodin-Konzentration und folglich bei höherem Mediumgehalt. Hier ist während der gesamten Inkubationszeit eine stoffwechselsteigernde Wirkung von Immodin zu erkennen.

Die Substanzen CHP, AIM 2, 3 und 5, die Kombination von AIM 3 mit AIM 5 und Immodin wurden zusätzlich im CFSE-Assay untersucht. Hierdurch wurde die Proliferation der Zellen über mehrere Tage analysiert und mit der zuvor im „MTS-Proliferationsassay“ untersuchten mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität verglichen. Allerdings stimmten die Ergebnisse des MTS-Proliferationsassays nicht mit den Resultaten des CFSE-Proliferationstests überein. Bei CHP war sogar ein Gegensatz erkennbar. Der zunächst gemessenen Stoffwechselreduktion entsprechend, wäre eine Proliferationshemmung im CFSE-Test zu erwarten gewesen. Stattdessen konnte bei den Sarkoidzellen (131/06) eine Proliferationssteigerung gemessen werden, bei den normalen Fibroblasten eine Proliferationshemmung. Zusammengefasst muss festgestellt werden, dass die Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen im Falle der Sarkoidkulturen und der normalen equinen Fibroblasten nicht ohne weiteres der Zahl der proliferierenden Zellen entspricht.

Die Inkubationen mit AIM 3, AIM 5 und mit der Kombination AIM 3 + 5 zeigten im CFSE-Test eine interessante Wirkung. Es kam bei beiden behandelten Zelltypen zu

gegensätzlichen Effekten. Während die Sarkoidzellen nach der Inkubation mit AIM eine Proliferationshemmung zeigten, reagierten hingegen die normalen Fibroblasten mit einer Proliferationssteigerung. Eine derart selektive Wirkung, die zu einer Förderung der physiologischen und zu einer Hemmung der pathologischen Zellen führt, ist in der Tumorthherapie wünschenswert, so dass die Behandlung mit AIM einen interessanten Ansatz darstellen könnte.

Bei einer endgültigen Beurteilung dieses In-vitro-Modells für das equine Sarkoid sind Vor- und Nachteile kritisch gegeneinander abzuwägen. Zu den Nachteilen ist die schwierige Anzucht der Zellen zu zählen. Von der optimalen Situation, frisch operierte Sarkoide in Labornähe zur Verfügung zu haben, ist die Realität weit entfernt, so dass bakterielle Kontaminationen und lange Lagerungszeiten das Auswachsen der Zellen aus den Explantaten zusätzlich komplizieren. Allerdings stellen die langen Verweilzeiten bis zur Explantation für die zell- und kollagenfaserreichen Tumoren kein so bedeutsames Hindernis dar, wie bei anderen stoffwechselaktiven und rascher autolytischen Geweben. Von den schließlich angelegten Zellkulturen war nur ein geringer Teil BPV-DNA-positiv. Aufgrund dieser Gegebenheiten handelt es sich hierbei um ein nur schwierig plan- und etablierbares Modell. Dermoepidermale Wechselwirkungen können in der Zellmonokultur nicht dargestellt werden, obwohl sie offenbar pathogenetisch im equinen Sarkoid von großer Bedeutung sind. Auch blendet dieses In-vitro-Modell individuelle Unterschiede, beispielsweise eine mechanische Vorschädigung der Haut oder eine genetische Prädisposition aus, die die Pathogenese gerade von equinen Sarkoiden entscheidend beeinflussen können. Zellkulturmodelle equiner Sarkoidzellen simulieren also die In-vivo-Situation nur ansatzweise. Trotz dieser Einschränkungen, die das verwendete Zellkultursystem aufweist, sind doch in diesem In-vitro-Modell gewisse Analogien zum equinen Sarkoid erkennbar. Die BPV-DNA-positiven mesenchymalen Zellen ähneln morphologisch den Tumorzellen. Das für Tumorzellen charakteristische ungeordnete Wachstum, bei dem die Zellgrenzen nicht beachtet werden, zeigt, dass die Sarkoidzellen bei der Explantation einige ihrer Eigenschaften erhalten konnten. Mit sinkendem BPV-DNA-Gehalt in der Zellkultur verändert sich das charakteristische Wachstum. Es wird dadurch offensichtlich, dass auch *in vitro* diese Eigenschaften durch die papillomaviralen Onkoproteine hervorgerufen werden. Mittels Southern Blot konnte gezeigt werden, dass das BPV-1-

Genom in voller Länge in Zellkultur vorhanden ist, so dass prinzipiell die gleichen Virusproteine *in vitro* wie *in vivo* exprimiert werden können. Dies deckt sich mit neueren Untersuchungen. In Sarkoidzelllinien konnte mittels Realtime-RT-PCR die Expression der Onkoproteine E5, E6 und E7 gezeigt werden (Yuan et al., 2008). Sarkoidzellen *in vitro* sind schlecht differenziert und exprimieren nur vereinzelt Vimentin. Das immunhistologische Expressionsmuster der Zellen entspricht somit der Situation in der Tiefe des Tumors, wo die Tumorzellen ohne epithelialen Einfluss ebenfalls dieses Intermediärfilament nicht mehr exprimieren. Das Verhalten von BPV-1-infizierten equinen mesenchymalen Zellen kann offensichtlich durch das Modell gut imitiert werden. Hinweise auf eine Wirkung von verschiedenen Substanzen als mögliche Therapeutika für das equine Sarkoid ließen sich an diesem Modell gewinnen.

6 Zusammenfassung

1. Aus 29 equinen Sarkoiden konnten insgesamt fünf primäre fibroblastenähnliche Zelllinien angelegt werden, die bis zur 20. Passage BPV-1-DNA enthielten. Mittels Southern Blot konnte das BPV-1-Genom in voller Länge von ungefähr 8 kbp nachgewiesen werden. Die virale DNA ließ sich durch ISH in den Zellkernen der kultivierten Tumorzellen lokalisieren. Die Zelllinien zeigten ein für Tumorzellen typisches Wachstum. Alle fünf Zelllinien alterten, bevor sie das Stadium der Permanenz erreichten.
2. Die experimentelle Infektion von Syrischen Goldhamstern mit BPV-1 führte bei 27 von 63 Tieren innerhalb von 13 Monaten zur Ausbildung von Hauttumoren, die makroskopisch und histopathologisch dem equinen Sarkoid glichen. Mittels PCR und ISH war BPV-1-DNA in 9 von 13 untersuchten Tumoren nachweisbar. Es konnten keine Zusammenhänge zwischen Dignität, Größe oder Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors und der Anzahl BPV-DNA-positiver Tumorzellen nachgewiesen werden.
3. Die equinen Sarkoidzellen reagierten immunhistologisch hauptsächlich am dermoepidermalen Übergang positiv mit einem Antikörper spezifisch für Vimentin, wohingegen in der Tiefe kaum positive Zellen zu sehen waren. Beim Hamstertumor reagierten ebenfalls nur wenige Tumorzellen positiv für Vimentin. Die positiven Zellen waren sowohl subepithelial als auch in der Tiefe des Tumors zu finden. *In vitro* zeigten die Sarkoidzellen ein vergleichbares Muster und reagierten nur schwach mit dem Antikörper spezifisch für Vimentin. Eine Zelllinie war vollständig negativ.
4. Mittels PCR und 19 überlappenden Primerpaaren und nachfolgender DNA-Sequenzierung war es möglich, erstmalig an einem equinen Sarkoid zu zeigen, dass das BPV-1-Genom vollständig in equinen Sarkoiden enthalten ist. Die erhaltene Sequenz mit 7942 bp war mit einer bekannten BPV-1-Sequenz zu 98 % identisch. Sequenzabweichung im ORF von E5 stimmten mit der sarkoidspezifischen BPV-1 Sequenz SWISS 1 überein. Weitere als sarkoidspezifisch geltende Mutationen fanden sich in dieser Sequenz nicht.

5. In equinen Sarkoiden war mittels Immunhistologie und RT-PCR eine Expression des Tumorsuppressorproteins PTEN nachweisbar. Es konnte ein PTEN-Genabschnitt von 205 bp Länge sequenziert und mit einer murinen PTEN-Sequenz abgeglichen werden. Die Sequenzen stimmten zu 95 % überein.
6. In equinen Sarkoiden war trotz Expression von PTEN phosphoryliertes AKT darstellbar. Dies und der Nachweis der Proliferationsmarker Ki67 und PCNA belegen eine Funktionsstörung von PTEN in equinen Sarkoiden.
7. Die BPV-1-induzierten Hauttumoren von jeweils drei Hamstern wurden in einer orientierenden Studie topisch mit dem pflanzlichen Sanguinarin-haltigen Präparat XXTerraTM behandelt. Hierdurch kam es zu einer Koagulationsnekrose des Tumorgewebes. Der Nekroseherd wurde vom noch lebenden Tumorgewebe durch einen Lymphozytenwall abgegrenzt.
8. Bei insgesamt drei Pferden wurde die Therapie equiner Sarkoide mit XXTerraTM verfolgt. In zwei Fällen handelte es sich um mehrfach rezidierte Sarkoide nach teils unterschiedlicher Vorbehandlung. Durch die XXTerraTM-Therapie entwickelte sich bei allen drei Pferden eine Nekrose mit anschließender Abstoßung des Tumorgewebes. Es kam zu einem vollständigen Wundverschluss. Bei einem Pferd rezidierte der Tumor zwei Monate nach Therapieende. In den anderen zwei Fällen gab es keine Rezidive.
9. Durch Sanguinarin konnte eine dosisabhängige Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität bei equinen Zelllinien hervorgerufen werden. Sarkoidzellen reagierten empfindlicher auf die Sanguinarin-Behandlung als normale Fibroblasten.
10. Durch die inaktivierten animalen Pockenviren AIM 3 und AIM 5 wurden eine Proliferationshemmung der Sarkoidzellen und gleichzeitig eine Proliferationssteigerung der normalen Fibroblasten hervorgerufen. Diese Wirkung wurde durch eine Kombination von beiden Viren verstärkt. Obwohl Cis-4-Hydroxy-L-Prolin eine Senkung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität bewirkt, rief es eine Steigerung der Proliferation equiner Sarkoidzellen hervor. Immodin bewirkte eine Steigerung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität und der Proliferation.

7 Summary

1. Five fibroblast-like cell lines were established from 29 equine sarcoids that contained BPV-1-DNA up to the 20th passage. Using Southern blotting it was possible to detect the BPV-1-genome in full length of approximately 8 kbp. By means of ISH, the viral DNA was demonstrated to be localized in the nuclei of the cultured tumour cells. The cell lines showed a growth pattern typical for neoplastic cells. All of the five cell lines became senescent before reaching permanence.
2. The experimental infection of Syrian goldhamsters with BPV-1 resulted in the development of skin tumours in 27 of 63 animals within 13 months. These tumours resembled macroscopically and histopathologically equine sarcoids. Using PCR and ISH, BPV-1-DNA was detectable in 9 of 13 tested tumours. There was no correlation between biological behaviour, size or proliferation of the tumours and the number of BPV-DNA-positive tumour cells.
3. Using immunohistochemistry with an antibody specific for vimentin, neoplastic cells in equine sarcoids reacted mainly at the dermeoepidermal junction. In contrast, vimentin positive tumour cells were seen only sporadical in deeper layers. In hamster tumours, only a few neoplastic cells reacted positively for vimentin as well. Positive cells were localized subepithelial and in deeper layers. *In vitro* sarcoid cells showed a comparable pattern and reacted only weakly with a vimentin antibody. One cell line was completely negative.
4. Using PCR with 19 overlapping primer pairs and subsequent DNA-sequencing, it was possible to demonstrate in one equine sarcoid, for the first time, that the complete BPV-1-genome is present in equine sarcoids. The obtained sequence of 7942 bp was identical with a known BPV-1-sequence to 98 %. Sequence variations in the ORF of E5 corresponded with the sarcoid specific sequence SWISS 1. Further sarcoid specific mutations were not found in the new sequence.
5. In equine sarcoids the expression of the tumoursuppressor protein PTEN was demonstrable using immunohistochemistry and RT-PCR. 205 nucleotides of the equine PTEN gene were analyzed and were identical with a murine PTEN-sequence to 95 %.

6. In spite of PTEN expression, phosphorylated AKT was present in equine sarcoids as well. This and the detection of the proliferation associated antigens Ki67 and PCNA account for an impaired function of PTEN in equine sarcoids.
7. The BPV-1 induced skin tumours of three hamsters were treated topically with the herbal sanguinarine containing compound XXTerra™ in an exploratory experiment. Coagulation necrosis of tumour tissue developed. The necrotic tissue was demarcated from the viable tumour tissue by lymphocytes.
8. The therapy of equine sarcoids in three horses with XXTerra™ was followed. In two cases, the tumours had recurred several times and were pretreated with different methods. XXTerra™ therapy induced necrosis of tumour tissue in all three horses followed by a complete wound healing. In one horse the tumour recurred two months after the completion of therapy. There was no relapse in the other two cases.
9. Sanguinarine caused a dose-dependent reduction of the mitochondrial dehydrogenase activity in equine cell lines. Sarcoid cells reacted more sensitive to the Sanguinarine treatment than normal fibroblasts.
10. The inactivated animal poxviruses AIM 3 and AIM 5 inhibited proliferation of sarcoid cells and caused increased proliferation in normal fibroblasts at the same time. A combination of both viruses potentiated the effects. Even though Cis-4-Hydroxy-Proline caused a reduction of mitochondrial dehydrogenase activity, administration resulted in increased proliferation. Immodin caused an increase of mitochondrial dehydrogenase activity and cellular proliferation.

8 Literaturverzeichnis

Adduci AJ und **Schlegel R**. The transmembrane domain of the E5 oncoprotein contains functionally discrete helical faces. *J Biol Chem* **1999**; 274: 10249-10258.

Adhami VM, **Aziz MH**, **Mukhtar H** und **Ahmad N**. Activation of prodeath Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCaT keratinocytes. *Clin Cancer Res* **2003**; 9: 3176-3182.

Adhami VM, **Aziz MH**, **Reagan-Shaw SR**, **Nihal M**, **Mukhtar H** und **Ahmad N**. Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. *Mol Cancer Ther* **2004**; 3: 933-940.

Ahmad N, **Gupta S**, **Husain MM**, **Heiskanen KM** und **Mukhtar H**. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin Cancer Res* **2000**; 6: 1524-1528.

Ali IU, **Schriml LM** und **Dean M**. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* **1999**; 91: 1922-1932.

Amtmann E, **Müller H** und **Sauer G**. Equine connective tissue tumors contain unintegrated bovine papillomavirus DNA. *J Virol* **1980**; 35: 962-964.

Andrei G, **Snoeck R**, **Piette J**, **Delvenne P** und **De CE**. Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol Res* **1998**; 10: 523-531.

Angelos J, **Oppenheim Y**, **Rebhun W**, **Mohammed H** und **Antczak DF**. Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. *Anim Genet* **1988**; 19: 417-425.

Araibi EH, **Marchetti B**, **Ashrafi GH** und **Campo MS**. Downregulation of major histocompatibility complex class I in bovine papillomas. *J Gen Virol* **2004**; 85: 2809-2814.

Argyle D, **Ellsmore V**, **Gault EA**, **Munro AF** und **Nasir L**. Equine telomeres and telomerase in cellular immortalisation and ageing. *Mech Ageing Dev* **2003**; 124: 759-764.

Ashrafi GH, **Tsirimonaki E**, **Marchetti B**, **O'Brien PM**, **Sibbet GJ**, **Andrew L** und **Campo MS**. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene* **2002**; 21: 248-259.

- Avrameas S und Ternynck T.** Biologically active water-insoluble protein polymers. I. Their use for isolation of antigens and antibodies. *J Biol Chem* **1967**; 242: 1651-1659.
- Bellacosa A, Kumar CC, Di CA und Testa JR.** Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* **2005**; 94: 29-86.
- Berezutskaya E und Bagchi S.** The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **1997**; 272: 30135-30140.
- Bergman P, Ustav M, Sedman J, Moreno-Lopez J, Vennstrom B und Petterson U.** The E5 gene of bovine papillomavirus type 1 is sufficient for complete oncogenic transformation of mouse fibroblasts. *Oncogene* **1988**; 2: 453-459.
- Bernstein DI, Schlepner CJ, Evans TG, Blumberg DA, Bryson Y, Grafford K, Broberg P, Martin-Munley S und Spruance SL.** Effect of foscarnet cream on experimental UV radiation-induced herpes labialis. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41: 1961-1964.
- Bloch N, Sutton RH und Spradbrow PB.** Bovine cutaneous papillomas associated with bovine papillomavirus type 5. *Arch Virol* **1994**; 138: 373-377.
- Bogaert L, Van PM, De BC, Dewulf J, Peelman L, Ducatelle R, Gasthuys F und Martens A.** Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. *J Gen Virol* **2007**; 88: 2155-2161.
- Bohl J, Hull B und Vande Pol SB.** Cooperative transformation and coexpression of bovine papillomavirus type 1 E5 and E7 proteins. *J Virol* **2001**; 75: 513-521.
- Borzacchiello G, Iovane G, Marcante ML, Poggiali F, Roperto F, Roperto S und Venuti A.** Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *J Gen Virol* **2003**; 84: 2921-2926.
- Bosch FX und Munoz N.** The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* **2002**; 89: 183-190.
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W und zur Hausen H.** A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* **1984**; 3: 1151-1157.
- Brandt B, Ohnesorge B, Döpfer D und Deegen E.** Equine Sarkoide-Vorkommen und Bedeutung. *Pferdeheilkunde* **1996**; 12: 739-748.
- Bravo R und Macdonald-Bravo H.** Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* **1987**; 105: 1549-1554.

- Broström H, Fahlbrink E, Dubath ML und Lazary S.** Association between equine leucocyte antigens (ELA) and equine sarcoid tumors in the population of Swedish halfbreds and some of their families. *Vet Immunol Immunopathol* **1988**; 19: 215-223.
- Broström H.** Equine sarcoids. A clinical and epidemiological study in relation to equine leucocyte antigens (ELA). *Acta Vet Scand* **1995**; 36: 223-236.
- Bucher K, Szalai G, Marti E, Griot-Wenk ME, Lazary S und Pauli U.** Tumour suppressor gene p53 in the horse: Identification, cloning, sequencing and a possible role in the pathogenesis of equine sarcoid. *Res Vet Sci* **1996**; 61: 114-119.
- Burkhardt A, DiMaio D und Schlegel R.** Genetic and Biochemical Definition of the Bovine Papillomavirus E5 Transforming Protein. *EMBO J* **1987**; 6: 2381-2385.
- Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT und Schlegel R.** The E5-Oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and Plasma-Membranes. *Virology* **1989**; 170: 334-339.
- Byam-Cook KL, Henson FMD und Slater JD.** Treatment of periocular and non-ocular sarcoids in 18 horses by interstitial brachytherapy with iridium-192. *Vet Rec* **2006**; 159: 337-341.
- Carr EA, Theon AP, Madewell BR, Hitchcock ME, Schlegel R und Schiller JT.** Expression of a transforming gene (E5) of bovine papillomavirus in sarcoids obtained from horses. *Am J Vet Res* **2001**; 62: 1212-1217.
- Carstanjen B, Jordan P und Lepage OM.** Carbon dioxide laser as a surgical instrument for sarcoid therapy - A retrospective study on 60 cases. *Can Vet J* **1997**; 38: 773-776.
- Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SW, Love S, Campo MS und Nasir L.** Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids. *Virus Res* **2003**; 96: 141-145.
- Chaturvedi MM, Kumar A, Darnay BG, Chainy GB, Agarwal S und Aggarwal BB.** Sanguinarine (pseudocheletrythrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation. *J Biol Chem* **1997**; 272: 30129-30134.
- Cheevers WP, Roberson SM, Brassfield AL, Davis WC und Crawford TB.** Isolation of a retrovirus from cultured equine sarcoid tumor-cells. *Am J Vet Res* **1982**; 43: 804-806.
- Cheevers WP, Fatemi-Nainie S und Anderson LW.** Spontaneous expression of an endogenous retrovirus by the equine sarcoid-derived MC-1 cell line. *Am J Vet Res* **1986**; 47: 50-52.

- Chen EY, Howley PM, Levinson AD und Seeburg PH.** The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* **1982**; 299: 529-534.
- Cheville NF.** Studies on connective tissue tumors in the hamster produced by bovine papilloma virus. *Cancer Res* **1966**; 26: 2334-2339.
- Cole ST und Danos O.** Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol* **1987**; 193: 599-608.
- Colombo ML und Bosisio E.** Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). *Pharmacol Res* **1996**; 33: 127-134.
- Dahia PLM.** PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endoc Relat Cancer* **2000**; 7: 115-129.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU und zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology* **2004**; 324: 17-27.
- DeMasi J, Huh KW, Nakatani Y, Münger K und Howley PM.** Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**; 102: 11486-11491.
- Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F und Gabbiani G.** Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **1993**; 122: 103-111.
- Dickerson EB, Thomas R, Fosmire SP, Lamerato-Kozicki A, Bianco SR, Wojcieszyn JW, Breen M, Helfand SC und Modiano JF.** Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma. *Vet Pathol* **2005**; 42: 618-632.
- Diehl M, Vingerhoets M und Stornetta D.** Spezifische Methoden zur Entfernung des equinen Sarkoids. *Prakt Tierarzt* **1987**; Collegium Veterinarium XVIII: 14-17.
- DiMaio D und Mattoon D.** Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins *Oncogene* **2001**; 20: 7866-7873.
- Ding Z, Tang SC, Weerasinghe P, Yang X, Pater A und Liepins A.** The alkaloid sanguinarine is effective against multidrug resistance in human cervical cells via bimodal cell death. *Biochem Pharmacol* **2002**; 63: 1415-1421.
- Dubath ML.** Recherche d'association entre le système ELA et une prédisposition aux sarcoides équines. Dissertation, Universität Bern, Veterinärmedizinische Fakultät **1986**.

- Dyson N, Howley PM, Münger K und Harlow E.** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **1989**; 243: 934-937.
- Emanuel JR.** Simple and efficient system for synthesis of non-radioactive nucleic acid hybridization probes using PCR. *Nucleic Acids Res* **1991**; 19: 2790.
- England JJ, Watson RE und Larson KA.** Virus-like particles in an equine sarcoid cell line. *Am J Vet Res* **1973**; 34: 1601-1603.
- Fairley RA und Haines DM.** The electron microscopic and immunohistochemical demonstration of a papillomavirus in equine aural plaques. *Vet Pathol* **1992**; 29: 79-81.
- Fan XL, Liu Y und Chen JJ.** Activation of c-Myc contributes to bovine papillomavirus type 1 E7-induced cell proliferation. *J Biol Chem* **2003**; 278: 43163-43168.
- Fatemi-Nainie S, Anderson LW und Cheevers WP.** Identification of a transforming retrovirus from cultured equine dermal fibrosarcoma. *Virology* **1982**; 120: 490-494.
- Fatemi-Nainie S, Anderson LW und Cheevers WP.** Culture characteristics and tumorigenicity of the equine sarcoid-derived MC-1 cell line. *Am J Vet Res* **1984**; 45: 1105-1108.
- Firatli E, Unal T, Onan U und Sandalli P.** Antioxidative activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. *J Clin Periodontol* **1994**; 21: 680-683.
- Fretz PB und Barber SM.** Prospective analysis cryosurgery as the sole treatment for equine sarcoids. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **1980**; 10: 847-859.
- Gerber H.** Sir Frederick Hobday memorial lecture. The genetic basis of some equine diseases. *Equine Vet J* **1989**; 21: 244-248.
- Godowski KC, Wolff ED, Thompson DM, Housley CJ, Polson AM, Dunn RL, Duke SP, Stoller NH und Southard GL.** Whole mouth microbiota effects following subgingival delivery of sanguinarium. *J Periodontol* **1995**; 66: 870-877.
- Goldstein DJ, Li WQ, Wang LM, Heidarman MA, Aaronson S, Shinn R, Schlegel R und Pierce JH.** The bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein specifically binds and activates the beta-type receptor for the platelet-derived growth-factor but not other related tyrosine kinase-containing receptors to induce cellular transformation. *J Virol* **1994**; 68: 4432-4441.
- Gross G und Braun D.** Efficacy and tolerability of topical foscarnet sodium in treatment of herpes labialis. Results of post-marketing surveillance. *Hautarzt* **2006**; 57: 40-46.

- Hallamaa RE, Saario E und Tallberg T.** Macroscopical and histopathological changes in regressing primary and recurrent equine sarcoids during active specific bio-immunotherapy. *In Vivo* **2005**; 19: 761-767.
- Hamada M, Oyamada T, Yoshikawa H, Yoshikawa T und Itakura C.** Histopathological development of equine cutaneous papillomas. *J Comp Pathol* **1990**; 102: 393-403.
- Hayflick L und Moorhead PS.** The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp Cell Res* **1961**; 25: 585-621.
- Helgstrand E, Eriksson B, Johansson NG, Lannero B, Larsson A, Misiorny A, Noren JO, Sjoberg B, Stenberg K, Stening G, Stridh S und Oberg B.** Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science* **1978**; 201: 819-821.
- Hirt B.** Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **1967**; 26: 365-369.
- Hoepfner I und Löning T.** Human papillomavirus (HPV) infection of cervical lesions detected by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cancer Detect Prev* **1986**; 9: 293-301.
- Hoffmann KD, Kainer RA und Shidler RK.** Radio frequency current-induced hyperthermia for the treatment of equine sarcoid. *Equine Practice* **1983**; 5: 24-31.
- Horwitz BH, Burkhardt AL, Schlegel R und DiMaio D.** 44-amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific carboxyl-terminal amino acids. *Mol Cell Biol* **1988**; 8: 4071-4078.
- Hsu, SM, Raine L und Fanger H.** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **1981**; 29: 577-580.
- Jackson C.** The incidence and pathology of tumours of domestic animals in south Africa. *Onderstepoort J Vet Sci Animal Indust* **1936**; 6: 378-385.
- Kaufman RJ.** Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls *Genes Dev* **1999**; 13: 1211-1233.
- Kinnunen RE, Tallberg T, Stenbäck H und Sarna S.** Equine sarcoid tumour treated by autogenous tumour vaccine. *Anticancer Res* **1999**; 19: 3367-3374.
- Klein WR, Bras GE, Misdorp W, Steerenberg PA, de Jong WH, Tiesjema RH, Kersjes AW und Ruitenber EJ.** Equine sarcoid - BCG immunotherapy compared to cryosurgery in a prospective randomized clinical trial. *Cancer Immunol Immunother* **1986**; 21: 133-140.

- Knottenbelt DC, Edwards S und Daniel E.** Diagnosis and treatment of the equine sarcoid. In Pract **1995**; 17: 123-129.
- Knottenbelt DC und Kelly DF.** The diagnosis and treatment of periorbital sarcoid in the horse: 445 cases from 1974 to 1999. Vet Ophthalmol **2000**; 3: 169-191.
- Krishnamoorthy RR, Crawford MJ, Chaturvedi MM, Jain SK, Aggarwal BB, Al-Ubaidi MR und Agarwal N.** Photo-oxidative stress down-modulates the activity of nuclear factor-kappaB via involvement of caspase-1, leading to apoptosis of photoreceptor cells. J Biol Chem **1999**; 274: 3734-3743.
- Kuftinec MM, Mueller-Joseph LJ und Kopczyk RA.** Sanguinaria toothpaste and oral rinse regimen clinical efficacy in short- and long-term trials. J Can Dent Assoc **1990**; 56: 31-33.
- Lane JG.** The treatment of equine sarcoids by cryosurgery. Equine Vet J **1977**; 9: 127-133.
- Laster LL und Lobene RR.** New perspectives on Sanguinaria clinicals: individual toothpaste and oral rinse testing. J Can Dent Assoc **1990**; 56: 19-30.
- Lavach JD, Sullins KE, Roberts SM, Severin GA, Wheeler C und Lueker DC.** BCG treatment of periocular sarcoid. Equine Vet J **1985**; 17: 445-448.
- Lewko WM, Liotta LA, Wicha MS, Vonderhaar BK und Kidwell WR.** Sensitivity of N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors to cis-hydroxyproline, an inhibitor of collagen production. Cancer Res **1981**; 41: 2855-2862.
- Li DM und Sun H.** TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. Cancer Res **1997**; 57: 2124-2129.
- Löhr CV, Juan-Sallés C, Rosas-Rosas A, Paras GA, Garner MM und Teifke JP.** Sarcoids in captive zebras (*Equus burchellii*): association with bovine papillomavirus type 1 infection J Zoo Wildl Med **2005**; 36: 74-81.
- Lorincz AT, Temple GF, Patterson JA, Jenson AB, Kurman RJ und Lancaster WD.** Correlation of cellular atypia and human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequences in exfoliated cells of the uterine cervix. Obstet Gynecol **1986**; 68: 508-512.
- Maeda K, Yasumoto S, Tsuruda A, Andoh K, Kai K, Otoi T und Matsumura T.** Establishment of a novel equine cell line for isolation and propagation of equine herpesviruses. J Vet Med Sci **2007**; 69: 989-991.
- Marchetti B, Ashrafi GH; Tsirimonaki E, O'Brien PM und Campo MS.** The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. Oncogene **2002**; 21: 7808-7816.

- Martens A, De Moor A, Demeulemeester J und Ducatelle R.** Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. *Res Vet Sci* **2000**; 69: 295-300.
- Marti E, Lazary S, Antczak DF und Gerber H.** Report of the first international workshop on equine sarcoid. *Equine Vet J* **1993**; 25: 397-407.
- Mattil-Fritz S.** Chimäre Virus-ähnliche Partikel des Bovinen Papillomvirus Typ 1: Herstellung, Charakterisierung und Verwendung in einer klinischen Phase I-Studie zur Immuntherapie des equinen Sarkoids. Dissertation, Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät **2002**.
- Mattil-Fritz S, Scharner D, Piuko K, Thönes N, Gissmann L, Müller H und Müller M.** Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. *J Gen Virol* **2008**; 89: 138-147.
- Mayr A, Ahne W und Vilsmeier B.** Bewertung der Ergebnisse aus „In vitro“ und „Ex vivo-In vitro“-Versuchen für die Beurteilung einer klinischen Wirksamkeit von Paramunitätsinducern aus Pockenviren. *Tierärztl Umschau* **1997**; 52: 3-11.
- Mayr A.** Development of a non-immunising, paraspecific vaccine from attenuated pox viruses: A new type of vaccine. *New Microbiol* **2003**; 26: 7-12.
- Meredith D, Elser AH, Wolf B, Soma LR, Donawick WJ und Lazary S.** Equine leukocyte antigens: relationships with sarcoid tumors and laminitis in two pure breeds. *Immunogenetics* **1986**; 23: 221-225.
- Mitscher LA, Park YH, Clark D, Clark GW, Hammesfahr PD, Wu WN und Beal JL.** Antimicrobial agents from higher plants. An investigation of *Hunnemannia fumariaefolia* pseudoalcoholates of sanguinarine and chelerythrine. *Lloydia*, **1978**; 41: 145-150.
- Mohammed HO, Rebhun WC und Antczak DF.** Factors associated with the risk of developing sarcoid tumours in horses. *Equine Vet J* **1992**; 24: 165-168.
- Montironi R, Scarpelli M und López Beltran A.** Carcinoma of the prostate: inherited susceptibility, somatic gene defects and androgen receptors. *Virchows Arch* **2004**; 444: 503-508.
- Müller C, Emmrich J, Jaster R, Braun D, Liebe S und Sparmann G.** Cis-hydroxyproline-induced inhibition of pancreatic cancer cell growth is mediated by endoplasmic reticulum stress. *World J Gastroenterol* **2006**; 12: 1569-1576.
- Müller H.** Papillomatosen des Rindes und ihre Beziehungen zum equinen Sarkoid. *Tierärztl Prax* **1991**; 19: 39-43.
- Murphy JM, Severin GA, Lavach JD, Hepler DI und Lueker DC.** Immunotherapy in ocular equine sarcoid. *J Am Vet Med Assoc* **1979**; 174: 269-272.

- Nasir L** und **Reid SW**. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Res* **1999**; 61: 171-175.
- Nasir L**, **McFarlane ST** und **Reid SW**. Mutational status of the tumour suppressor gene (p53) in donkey sarcoid tumours. *Vet J* **1999**; 157: 99-101.
- Nasir L**, **Gault E**, **Morgan IM**, **Chambers G**, **Ellsmore V** und **Campo MS**. Identification and functional analysis of sequence variants in the long control region and the E2 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 isolated from equine sarcoids. *Virology* **2007**; 364: 355-361.
- Nel PJ**, **Bertschinger H**, **Williams J** und **Thompson PN**. Descriptive study of an outbreak of equine sarcoid in a population of Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in the Gariiep Nature Reserve. *J S Afr Vet Assoc* **2006**; 77: 184-190.
- Neumann FJ**, **Marx N**, **Gawaz M**, **Brand K**, **Ott I**, **Rokitta C**, **Sticherling C**, **Meinl C**, **May A** und **Schömig A**. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* **1997**; 95: 2387-2394.
- Nixon C**, **Chambers G**, **Ellsmore V**, **Campo MS**, **Burr P**, **Argyle DJ**, **Reid SW** und **Nasir L**. Expression of cell cycle associated proteins cyclin A, CDK-2, p27kip1 and p53 in equine sarcoids. *Cancer Lett* **2005**; 221: 237-245.
- Nogueira SAF**, **Torres SMF**, **Malone ED**, **Diaz SF**, **Jessen C** und **Gilbert S**. Efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of equine sarcoids: a pilot study. *Vet Dermatol* **2006**; 17: 259-265.
- Oberg B**. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther* **1989**; 40: 213-285.
- Ogawa T**, **Tomita Y**, **Okada M**, **Shinozaki K**, **Kubonoya H**, **Kaiho I** und **Shirasawa H**. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol* **2004**; 85: 2191-2197.
- Olson C** und **Cook RH**. Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. *Proc Soc Exp Biol Med* **1951**; 77: 281-284.
- Otten N**, **Marti E**, **Söderström C**, **Amtmann E**, **Burger D**, **Gerber H** und **Lazary S**. Experimental treatment of equine sarcoid using a xanthate compound and recombinant human tumour necrosis factor alpha. *Zentralbl Veterinärmed A* **1994**; 41: 757-765.
- Owen RA** und **Jagger DW**. Clinical observations on the use of BCG cell wall fraction for treatment of periocular and other equine sarcoids. *Vet Rec* **1987**; 120: 548-552.
- Peiffer SL**, **Herzog TJ**, **Tribune DJ**, **Mutch DG**, **Gersell DJ** und **Goodfellow PJ**. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res* **1995**; 55: 1922-1926.

- Pekárek J.** Immodin - Characteristics of the preparation. In SEVAPHARMA a.s. (ed), Immunmodulation Therapy and experiences with the preparation Immodin. Prag: **1996**; 3-5.
- Petti L** und **DiMaio D.** Stable association between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and activated platelet-derived growth factor receptor in transformed mouse cells. Proc Natl Acad Sci USA **1992**; 89: 6736-6740.
- Pfister H.** Biology and biochemistry of papillomaviruses. Rev Physiol Biochem Pharmacol **1984**; 99: 111-181.
- Piscopo SE.** The complexities of sarcoid tumors. Equine Practice **1999**; 21: 14-18.
- Postey RC, Appleyard GD** und **Kidney BA.** Evaluation of equine papillomas, aural plaques, and sarcoids for the presence of Equine papillomavirus DNA and Papillomavirus antigen. Can J Vet Res **2007**; 71: 28-33.
- Ragland WL** und **Spencer GR.** Attempts to relate bovine papilloma virus to the cause of equine sarcoid: equidae inoculated intradermally with bovine papilloma virus. Am J Vet Res **1969**; 30: 743-752.
- Ragland, WL, Keown GH** und **Spencer GR.** Equine Sarcoid. Equine Vet J **1970**; 2: 2-11.
- Rapp L** und **Chen JJ.** The papillomavirus E6 proteins. Biochim Biophys Acta **1998**; 1378: F1-F19.
- Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH** und **Bigner DD.** Molecular pathogenesis of malignant gliomas. Curr Opin Oncol **1999**; 11: 162-167.
- Reid SW, Smith KT** und **Jarrett WF.** Detection, cloning and characterisation of papillomaviral DNA present in sarcoid tumours of Equus asinus. Vet Rec **1994**; 135: 430-432.
- Ridley AJ.** Growth factor-induced actin reorganization in Swiss 3T3 cells. Methods Enzymol **1995**; 256: 306-313.
- Riese DJ** und **DiMaio D.** An intact PDGF signaling pathway is required for efficient growth transformation of mouse C127 cells by the bovine papillomavirus E5 protein. Oncogene **1995**; 10: 1431-1439.
- Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A** und **Barrett JC.** PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. Cancer Res **1997**; 57: 4736-4738.
- Robl MG** und **Olson C.** Oncogenic action of bovine papilloma virus in hamsters. Cancer Res **1968**; 28: 1596-1604.
- Rohme D.** Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. Proc Natl Acad Sci USA **1981**; 78: 5009-5013.

- Rosenbloom J** und **Prockop DJ**. Incorporation of cis-hydroxyproline into protocollagen and collagen. Collagen containing cis-hydroxyproline in place of proline and trans-hydroxyproline is not extruded at a normal rate. *J Biol Chem* **1971**; 246: 1549-1555.
- Rosenthal A**, **Lindquist PB**, **Bringman TS**, **Goeddel DV** und **Derynck R**. Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor-alpha cDNA results in transformation. *Cell* **1986**; 46: 301-309.
- Sanger F**, **Nicklen S** und **Coulson AR**. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1977**; 74: 5463-5467.
- Schlegel R**, **Wade-Glass M**, **Rabson MS** und **Yang YC**. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science* **1986**; 233: 464-467.
- Sherr CJ** und **DePinho RA**. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?. *Cell* **2000**; 102: 407-410.
- Simhofer H** und **Kleiter M**. Equines Sarkoid: chirurgische Exzision und lokale Infiltration mit Cisplatin in Öl-Emulsion; ein Fallbericht. *Wien Tierärztl Monatsschr* **2000**; 87: 65-69.
- Smith KT** und **Campo MS**. Amplification of specific DNA sequences in C127 mouse cells transformed by bovine papillomavirus type 4. *Oncogene* **1989**; 4: 409-413.
- Sparkowski J**, **Mense M**, **Anders J** und **Schlegel R**. E5 oncoprotein transmembrane mutants dissociate fibroblast transforming activity from 16-kilodalton protein binding and platelet-derived growth factor receptor binding and phosphorylation. *J Virol* **1996**; 70: 2420-2430.
- Steck PA**, **Pershhouse MA**, **Jasser SA**, **Yung WKA**, **Lin H**, **Ligon AH**, **Langford LA**, **Baumgard ML**, **Hattier T**, **Davis T**, **Frye C**, **Hu R**, **Swedlund B**, **Teng DHF** und **Tavtigian SV**. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **1997**; 15: 356-362.
- Steiner A**. Prüfung des Immuntherapeutikums NomagenR zur Behandlung des equinen Sarkoids im Vergleich zur kryochirurgischen Therapie. Dissertation, Universität Zürich, Vetsuisse-Fakultät **1988**.
- Stewart AA**, **Rush B** und **Davis E**. The efficacy of intratumoural 5-fluorouracil for the treatment of equine sarcoids. *Aust Vet J* **2006**; 84: 101-106.
- Stubenrauch F** und **Laimins LA**. Humanpapillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* **1999**; 9: 379-386.
- Studer U**, **Marti E**, **Stornetta D**, **Lazary S** und **Gerber H**. Treatment of equine sarcoid with an unspecific immunostimulant - Remarks on the epidemiology and

- the spontaneous regression of sarcoids. *Schweiz Arch Tierheilkd* **1997**; 139: 385-391.
- Syrjänen KJ.** HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* **2002**; 55: 721-728.
- Tan EML, Ryhanen L und Uitto J.** Proline analogues inhibit human skin fibroblast growth and collagen production in culture. *J Invest Dermatol* **1983**; 80: 261-267.
- Teifke JP.** Anwendung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und nichtradioaktiven in situ Hybridisierung (NISH) zum Nachweis boviner Papillomvirus-DNA in Sarkoiden des Pferdes. Dissertation, Universität Gießen, Veterinärmedizinische Fakultät **1993**.
- Teifke JP.** Morphologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Ätiologie des equinen Sarkoids. *Tierärztl Prax* **1994**; 22: 368-376.
- Tong XA und Howley PM.** The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**; 94: 4412-4417.
- Tsirimonaki E, Ullah R, Marchetti B, Ashrafi GH, McGarry L, Ozanne B und Campo MS.** Similarities and differences between the E5 oncoproteins of bovine papillomaviruses type 1 and type 4: cytoskeleton, motility and invasiveness in E5-transformed bovine and mouse cells. *Virus Res* **2006**; 115: 158-168.
- Turrel JM, Stover SM und Gyorgyfalvy J.** Ir-192 Interstitial Brachytherapy of Equine Sarcoid. *Vet Radiol* **1985**; 26: 20-24.
- Uitto J, Hoffmann HP und Prockop DJ.** Retention of nonhelical procollagen containing cis-hydroxyproline in rough endoplasmic reticulum. *Science* **1975**; 190: 1202-1204.
- Uitto J und Prockop DJ.** Incorporation of proline analogs into procollagen. Assay for replacement of imino acids by cis-4-hydroxy-L-proline and cis-4-fluoro-L-proline. *Arch Biochem Biophys* **1977**; 181: 293-299.
- Vanselow BA, Abetz I und Jackson AR.** BCG emulsion immunotherapy of equine sarcoid. *Equine Vet J* **1988**; 20: 444-447.
- Vasickova M, Pekárek J und Cech J.** A flow-up cell mediated immunity in patients with malignant skin melanoma and an adjuvant therapy with transfer factor. VI. Internat. Workshop on Transfer Factor 383, **1988**.
- von Felbert I, Dreschel W und Teifke JP.** Regression eines infraorbitalen equinen Sarkoids nach Behandlung mit einem Präparat aus *Sanguinaria canadensis* - Ein Fallbericht. *Prakt Tierarzt* **2005**; 86: 330-334.
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T und Itakura K.** Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* **1979**; 6: 3543-3557.

- Weber O, Siegling A, Friebe A, Limmer A, Schlapp T, Knolle P, Mercer A, Schaller H und Volk HD.** Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol* **2003**; 84: 1843-1852.
- Werner S, Krieg T und Smola H.** Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* **2007**; 127: 998-1008.
- Winston T, Rings M und Wyman M.** Treatment of equine sarcoids. *J Am Vet Med Assoc* **1979**; 175: 775.
- Wolter H.** Die homöopathische Behandlung des equinen Sarkoid. *Prakt Tierarzt* **1987**; Collegium Veterinarium XVIII: 19-22.
- Wright WE und Shay JW.** The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* **1992**; 27: 383-389.
- Wu H, Goel V und Haluska FG.** PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **2003**; 22: 3113-3122.
- Yang YC, Spalholz BA, Rabson MS und Howley PM.** Dissociation of transforming and trans-activation functions for bovine papillomavirus Type-1. *Nature* **1985**; 318: 575-577.
- Yoo JS, Sakamoto T, Spee C, Kimura H, Harris MS, Hinton DR, Kay EP und Ryan SJ.** cis-Hydroxyproline inhibits proliferation, collagen synthesis, attachment, and migration of cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **1997**; 38: 520-528.
- Yuan ZQ, Philbey AW, Gault EA, Campo MS und Nasir L.** Detection of bovine papillomavirus type 1 genomes and viral gene expression in equine inflammatory skin conditions. *Virus Res* **2007**; 124: 245-249.
- Yuan ZQ, Gault EA, Gobeil P, Nixon C, Campo MS und Nasir L.** Establishment and characterization of equine fibroblast cell lines transformed in vivo and in vitro by BPV-1: model systems for equine sarcoids. *Virology* **2008**; 373: 352-361.
- Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU und O'Connor MJ.** The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* **1999**; 73: 6209-6219.
- Zimmermann H, Koh CH, Degenkolbe R, O'Connor MJ, Müller A, Steger G, Chen JJ, Lui Y, Androphy E und Bernard HU.** Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol* **2000**; 81: 2617-2623.
- zur Hausen H.** Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* **1996**; 1288: F55-F78.

9 Anhang

9.1 BPV-1-Sequenz, aus dem equinen Sarkoid E 84/04

GTTAACAATAATCACACCATCACCGTTTTTTCAAGCGGGAAAAAATAGCCAGCTAACTAT
 AAAAGGCTGCTGACAGACCCCGTTTTTACATGGACCTGAAACCTTTTGCAAGAACCAAT
 CCATTCTCAGGGTTGGATTGTCTGTGGTGCAGAGAGCCTCTTACAGAAGTTGATGCTTTT
 AGGTGCATGGTCAAAGACTTTCATGTTGTAATTCGGGAAGGCTGTAGATATGGTGCATGT
 ACCATTTGTCTTGAAAACGTGTTTAGCTACTGAAAGAAGACTTTGGCAAGGTGTTCCAGTA
 ACAGGTGAGGAAGCTGAATTATTGCATGGCAAAACACTTGATAGGCTTTGCATAAGATGC
 TGCTACTGTGGGGGCAAACTAACAAAAAATGAAGAACATCGGCATGTGCTTTTTAATGAG
 CCTTTCTGCAAAACCAGAGCTAACATAATTAGAGGACGCTGCTACGACTGCTGCAGACAT
 GGTTCAAGGTCCAAATACCCATAGAAACTTGGATGATTACCTGCAGGACCGTTGCTGAT
 TTTAAGTCCATGTGCAGGCACACCTACCAGGTCTCCTGCAGCACCTGATGCACCTGATTT
 CAGACTTCCGTGCCATTTCCGCCGTCTACTAGGAAGCGAGGTCCCACTACCCCTCCGCT
 TTCCCTCTCCCGAAAACGTGTGTGCAACAGGGCCACGTGAGTGTATTCTGTGACTGTCTG
 CTGTGGAAACTGCGGAAAAGAGCTGACTTTTGCAGTGAAGACCGGCTCGACGTCCCTGCT
 TGGATTGCAACACCTTTTAAACTCAGATTTAGACCTCTTGTGTCCACGTTGTGAATCTCG
 CGAGCGCCATGGCAAACGATAAAGGTAGCAATTGGGATTCCGGCTTGGGATGCTCATATC
 TGCTGACTGAGGCAGAATGTGAAAGTGACAAAGAGAATGAGGAACCCGGGGCAGGTGTAG
 AACTGTCTGTGGAATCTGATCGGTATGATAGCCAGGATGAGGATTTTGTGACAATGCAT
 CAGTCTTTCAGGGAAATCACCTGGAGGTCTTCCAGGCATTAGAGAAAAAGGCGGGTGAGG
 AGCAGATTTTAAATTTGAAAAGAAAAGTATTGGGGAGTTTCGCAAAACAGCAGCGGTTCCG
 AAGCATCTGAACTCCAGTTAAAAGACGGAAATCAGGAGCAAAGCGAAGATTATTTGCTG
 AAAATGAAGCTAACCGTGTCTTACGCCCTCCAGTACAGGGGGAGGGGGAGGGGAGGC
 AAGAACTTAATGAGGAGCAGGCAATTAGTCATCTGCATCTGCAGCTTGTAAATCTAAGA
 ATGCTACAGTTTTTAAAGCTGGGGCTCTTTAAATCTTTGTTTCTGTGTAGCTTCCATGATA
 TTACAAGGTTGTTTAAAGAAATGATAAGACCACTAATCAGCAATGGGTGCTGGCTGTGTTT
 GCCTTGCAGAGGTGTTTTTTGAGGCGAGTTTTCGAACTCCTAAAGAAGCAGTGTAGTTTTT
 TGCAGATGCAAAAAAGATCTCATGAGGGAGGAACTTGTGCAGTTTACTTAAATCTGCTTTA
 ACACAGCTAAAAGCAGAGAAAACAGTCCGGAATCTGATGGCAAACACGCTAAATGTAAGAG
 AAGAGTGTGTTGATGCTGCAGCCACCTAAAATTCGAGGACTCAGCGCAGCTCTATTCTGGT
 TTTAAAAGTAGTTTGTCAACCGCTACACTTAAACATGGTGCTTTACCTGAGTGGATAACGG
 CGCAAACCTACTCTGAACGAGAGCTTGCAGACCGAGAAATTCGACTTCGGAACCTATGGTGC
 AATGAGCCTATGATCACAAATATGCTGAAGAGTCTAAAATAGCCTATGAATATGCTTTGG
 CTGCAGGATCTGATAGCAATGCACGGGCTTTTTTAGCAACTAACAGCCAAGCTAAGCATG
 TGAAGGACTGTGCAACTATGGTAAGACACTATCTAAGAGCTGAAACACAAGCATTAAAGCA
 TGCTGCTATATATTAAGCTAGGTGCAAGCTGGCAACTGGGGAAGGAAGCTGGAAGTCTA
 TTCTGACTTTTTTTAACTATCAGAATATCGAATTAATTACCTTTATTAATGCTTTGAAGC
 TCTGGCTAAAAGGAATTCAAAAAAAACGTGTTTAGCATTTATTGGCCCTCCAAACACAG
 GCAAGTCTATGCTCTGCAACTCATTAAATTCATTTTTTGGGTGGTAGTGTTTTATCTATTG
 CCAACCATAAAAAGTCACTTTTGGCTTGCTTCCCTAGCAGATACTAGAGCTGCTCTAATAG
 ATGATGCTACTCATGCTTGCTGGAGGTACTTTCGACACATACCTCAGAAATGCATTGGATG
 GCTACCCTGTCTAGTATTGATAGAAAACACAAAGCAGCGGTTCAAATTAAGCTCCACCCC
 TCTTGGTAACCAGTAATATTGATGTGCAGGCAGAGGACAGATATTTGTACTTGCATAGTC
 GGGTGCAAACCTTTTCGCTTTGAGCAGCCATGTACAGATGAATCGGGTGAGCACCCTTTTTA
 ATATTACTGATGCAGATTGGAATCTTTTTTTGTAAGGTTATGGGGGCGTTTAGACCTGA
 TTGACGAGGAGGAGGATAGTGAAGAGGATGGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGTTGCC
 CAAGAAACCCAAATGCAGTTGATTGAGAAAAGTAGTGATAAGTTGCAAGATCATATACTG
 TACTGGACTGCTGTTAGAACTGAGAACACACTGCTTTATGCTGCAAGGAAAAAAGGGGTG
 ACTGTCTTAGGACCCTGCAGAGTACCACACTCTGTAGTTTGTCAAGAGAGAGCCAAGCAG
 GCCATTGAAATGCAGTTGTCTTTGCAGGAGTTAAGCAAACTGAGTTTGGGGATGAACCA
 TGGTCTTTGCTTGACACAAGCTGGGACCGATATATGTGCAACCTAAACGGTGCTTTAAG
 AAAGGCGCCAGGGTGGTAGAGGTGGAGTTTATGGAATGCAAGCAATACAACTGGTAC

ACTGTCTACAGCAATTTGTACATGCGCACAGAGGACGGCTGGCAGCTTGCAGGCTGGG
GCTGACGGAAGCTGGGCTCTACTACTGCACCATGGCCGGTGCTGGACGCATTTACTATTCT
CGCTTTGGTGACGAGGCAGCCAGATTTAGTACAACAGGGCATTACTCTGTAAGAGATCAG
GACAGAGTGTATGCTGGTGTCTCATCCACCTCTTCTGATTTTAGAGATCGCCAGACGGA
GTCTGGGTGCGATCCGAAGGACCTGAAGGAGACCCCTGCAGGAAAAGAAGCCGAGCCAGCC
CAGCCTGTCTCTTTGCTCGGCTCCCCCGCTGCGGTCCCATCAGAGCAGGCCTCGGT
TGGGTGCGGGACGGTCTCGCCCGCACCCCTACAATTTTCTGCAGGCTCGGGGGGCTCT
ATTCTCCGCTCTTCCCTCCACCCCGTGCAGGGCACGGTACCCGGTGGACTTGGCATCAAGGC
AGGAAGAAGAGAAGCAGTCGCCCCACTCCACAGAGGAAGAACCAGTGACTCTCCAAGGC
GCACCACCAATGATGGATTCCACCTGTTAAAGGCAGGAGGGTTCATGCTTTGCTCTAATTT
CAGGAAGTGTAAACCAGGTAAAGTGTATCGCTTTTGGGTGAAAAAGAACCATAGACATC
GCTACGAGAAGTGCACCACCTGGTTACAGTTGCTGATAACGGTGTGAAAGACAAG
GACAAGCACAATACTGATCACCTTTGGATCGCCAAGTCAAAGGCAAGACTTTCTGAAAC
ATGTACCCTACTCCTGGAATGAACATTTCCGACTTTACAGCCAGCTTGGACTTCTGAT
CACTGCCATTGCTTTTTTCTTCTGACTGGTGTACTACGCCAAATCTATGGTTTCTATT
GTTCTTGGGACTAGTTGCTTCAATGCAACTGCTGCTGTTACTGTTCTTACTCTTGTTTTT
TCTTGTATACTGGGATCATTTTGAGTGTCTGCTGACAGGTCTGCCCTTTTAAATGCCTTTA
CATCACTGGCTATTAGCTGTGTTCTTACTATTGTGTGGATTTGATGTGTTTTATATACTG
TATGAAGTTTTTACATTTGTGCTTGTGTTGCTGTCTGTAAGTTTTTTACTAGAGTTTGT
TTCCCCCTGCTCAGATTTTATATGGTTTAAAGTGCAGCAATAAAAAATGAGTGCACGAAAA
AGAGTAAAACGTGCCAGTGCCTATGACCTGTACAGGACATGCAAGCAAGCGGGCACATGT
CCACCAGATGTGATAACCAAGGGAGAAGGAGATACTATAGCAGATAAAAATTTGAAATCT
GGGGGTCTTGCAATTTACTTAGGAGGGCTAGGAATAGGAACATGGTCTACTGGAAAAGTT
GCTGCAGGTGGATCACCGAGGTACACACCCTCCGAACAGCAGGGTCCACATCATCGCTT
GCATCAATAGGATCCAGAGCTGTTACAGCAGGGACCCCGCCCACTATAGGTGCGGGCATT
CCTTTAGACACCCTTGAACTCTTGGGGCCTTTCGCTCCAGGAGTGTATGAGGACACTGTG
CTACCACAGGCCCCGTGCAATAGTCACTCCTGATGCTGTTTCTGCAGATTGAGGGCTTGAC
GCCCTGTCCATAGGTACAGACTCGTCCACGGAGACCCCTCATTACTCTGTTAGAGCCTGAG
GGTCCCAGAACATAGCGGTTCTTGGAGTGCACACCCCTGGACCGTCCAACCTTGGCAAGTA
AGCAATGTCTTTCATCAATCCTCTGCACTACCACGCCCCCTCTGCAGCTGCAATCGTCCATT
GCAGAAACATCTGGTTTAGAAAAATTTTTTGTAGGAGGCTCGGGTTTAGGGGATACAGGA
GGAGAAAACATTGAACTGACATACTTTCGGGTCCCCACGAACAAGCACGCCCCGAGTATT
GCCTCTAAATCACGTGGCATTTTTTAACTGGTTTTCAGTAAACGGTACTACACACAGGTGCCC
ACGGAAGATCCCGAAGTGTTTTTTATCCCAAACATTTGCAAACCCACTGTATGAAGCAGAA
CCAGCTGTGCTTAAAGGGACCTAGTGGACGTGTTGGACTCAGTCAGGTTTATAAACCTGAT
ACACTTACAACACGTAGCGGGACAGAGGTGGGACCACAGCTACATGTCAGGTACTCATTTG
AGTACTATAACATGAAGATGTAGAAGCAATCCCCTACACAGTTGATGAAAAACACAAGGA
CTTGCATTTCGTACCCTTGCATGAAGAGCAGGCAGGTTTTGAGGAGATAGAATTAGATGAT
TTTAGTGAGACACATAGACTGCTACCTCAGAACACCTCTCCTACACCTGTTGGTAGTGGA
GTACGAAGAAGCCTCATTCCAACCTCAGGAATTTAGTGCAACACGGCCTACAGGTGTTGTA
ACCTATGGCTCACCTGACACTTATGCTAGCCCAGTGACTGACCCTGATTCTACCCCTCCT
AGTCTAGTTATCGATGACACTACTACTACACCAATCATTATAATTGATGGGCACACAGTT
GATTTGTACAGCAGTAACTACACCTTGCATCCCTCCTTGTGAGGAAAACGAAAAAACGG
AAACATGCCTAATTTTTTTTTGTCAGATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAAGCTGTATCTC
CCTCCAACCCCTGTAAGCAAGGTGCTTTGCAGTGAACCTATGTGCAAAGAAAAACATT
TTTTATCATGCAGAAAACGGAGCGCCTGCTAACTATAGGACATCCATATTACCCAGTGTCT
ATCGGGGACAAAACCTGTTCCCTAAGGTCTCTGCAAATCAGTATAGGGTATTTAAAAATACAA
CTACCTGATCCCAATCAATTTGCACTACCTGACAGGACTGTTTACAACCCAAGTAAAGAG
CGGCTGGTGTGGGCAGTCATAGGTGTGAGGTGTCCAGAGGGCAGCCTCTTGGAGGTACT
GTAACCTGGGCACCCCACTTTTTAATGCTTTGCTTGTGATGCAGAAAATGTGAATAGAAAAATC
ACCACCCAAACAGCAGATGACAGGAAAACAAACAGGCCTAGATGCTAAGCAACAACAGATT
CTGTTGCTAGGCTGTACCCCTGCTGAAGGGGAATATTGGACAACAGCCGTCATGTGTT
ACTGATCGTCCAATAATGGCGCCTGCCCTCCTTGAATTAACAAAAACAAGCACATAGAA
GATGGGGATATGATGGAATTTGGGTTTGGTGCAGCCAACCTTACAGAAAATTAATGCAAGT
AAATCAGATCTACCTCTTGACATACAAAATGAGATCTGCTTGTACCCAGACTACCTCAA
ATGGCTGAGGACGCTGCTGGTAATAGCATGTTCTTTTTTGAAGGAAAGAAGAGGTTGAT
GTTAGACACATCTGGACCAGAGGGGGCTCGGAGAAAAGAAGCCCTAGCACAGATTTTAT
TTAAAGAATAATAAAGGGGATGCCACCCCTTAAATACCCAGTGTGCATTTTGGTAGTCCC
AGTGGCTCACTAGTCTCAACTGATAATCAAATTTTTAATCGGCCCTACTGGCTATTCCGCT

GCCCAGGGCATGAACAATGGAATTGCATGGAATAATTTATTGTTTTTAAACAGTGGGGGAC
AATACACGTGGTACTAATCTTACCATAAGTGTAGCCTCAGATGGAACCCCACTAAAAGAG
TATGATAGCTCAAAATTC AATGTATACCATAGACATATGGAAGAATATAAGCTAGCCTTT
ATATTAGAGCTATGCTCTGTGGAAATCACAGCTCAAACCTGTGTACATCTGCAAGGACTT
ATGCCCTCTGTGCTTCAA AATGGGAAATAGGTGTGCAGCCTCCTACCTCATCGATATTA
GAGGACACCTATCGCTATATAGAGTCTCCTGCAACTAAATGTGCAAGCAATGTAATTCCT
GCAAAAGAAGACCCCTTATGCAGGGTTTAAAGTTTTGGAACATAGATCTTAAAGAAAAGCTT
TCTTTGGACTTAGATCAATTTCCCTTGGGAAGAAGATTTTAGCACAGCAAGGGGCAGGA
TGTTCAACTGTGAGAAAACGAAGAATTAGCCAAAAA AACTTCCAGTAAGCCTGCAAAAAA
AAAAAAAATAAAAAGCTAAGTTTCTATAAAGTTCTGTAAATGTAAAACAGAAGGTAAGT
CAACTGCACCTAATAAAAATCACTTAATAGCAATGTGCTGTGTGTCAGTTGTTTATTGGAAC
CACACCCGGTACACATCTGTCCAGCATTGTCAGTGCCTGCATTGAATTATTGTGCTGGC
TAGACTTCATGGCGCCTGGCACCGAATCCTGCCTTCTCAGCCAAAATGAATAATTGCTTT
GTTGGCAAGAACTAAGCATCAATGGGACGCGTGCAAAGCACCGGCGGCGGTAGATGCGG
GGTAAGTACTGAATTTTAAATTCGACCTATCCCGGTAAAGCGAAAGCGACACGCTTTTTTT
TCACACATAGCGGGACCGAACACGTTATAAGTATCGATTAGGTCTATTTTTGTCTCTCTG
TCGGAACCAGA AACTGGTAAAAGTTTCCATTGCGTCTGGGCTTGTCTATCATTGCGTCTCT
ATGGTTTTTTGGAGGATTAGACGGGGCCACCAGTAATGGTGCATAGCGGATGTCTGTACCG
CCATCGGTGCACCGATATAGGTTTGGGGCTCCCCAAGGGACTGCTGGGATGACAGCTTCA
TATTATATTGAATGGGCGCATAATCAGCTTAATTGGTGAGGACAAGCTACAAGTTGTAAC
CTGATCTCCACAAAGTACGTTGCCGGTTCGGGGTCAAACCGTCTTCGGTGCTCGAAACCGC
CTTAAACTACAGACAGGTCCCAGCCAAGTAGGCGGATCAAACCTCAAAAAGGCGGGGAGC
CAATCAAAATGCAGCATTATATTTTAAAGCTCACCGAAACCGGTAAGTAAAGACTATGTAT
TTTTTCCAGTGAATAATTGTT

9.2 PTEN-cDNA-Sequenz, Pferd, aus dem equinen Sarkoid E 58/05

TGGGAAAGTGCCATCTTTATTTATCCTAATTGAATTTTAAATGTCCTTTTGACACAAAAAG
ATATATACATAACACAGCTACACAACCTTTTTTCACTGGACAACAAGTGTCAAAACCCCTG
TGGATGTATAGGGTAAAACAAGATTGGT CAGGAAAAGAGAATTGTTCTATAACTGGTAA
TCTGACACAATGTCCTATTGCCATT

9.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC	3-Amino-9-Ethyl Carbazol-staining reagent
AIM	aktiver Immunmodulator
al.	alii
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
ATV	Alsevers Trypsin Versen
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
Bp	Basenpaare
BPV	bovines Papillomvirus

C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CFSE	5/6-Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidyl-Esther
CHP	Cis-4-Hydroxy-L-Prolin
°C	Grad Celsius
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorting)
FKS	fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
G	Guanin
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HIS	Hyperimmunserum
HPV	humanes Papillomvirus
IBDV	Virus der infektiösen Bursitis des Huhnes (infectious bursal disease virus)
ISH	In-situ-Hybrisierung
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertoni
LCR	long control region
mAK	monoklonaler Antikörper
MEM	minimal essential medium
MHC	major histocompatibility complex
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NSE	Neuronenspezifische Enolase
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentia hydrogenium
POD	Peroxidase
mRNA	Messenger RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkription – PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
SSC	Standard saline citrate
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TGF	transforming growth factor
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VP	Viruspartikel

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. P. Teifke danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit die Versuche in seinem Labor im Friedrich-Loeffler-Institut durchführen zu können und die Betreuung der Arbeit. Ohne seine Ideen und sein Engagement wäre diese Promotion nicht zu realisieren gewesen.

Frau Chem.-Ing. (FH) G. Czerwinski gilt mein Dank für die Einführung in die Methoden und ihre Hilfe bei unzähligen Versuchen. Sie war mir nicht nur in meinen ersten Monaten im Labor, sondern bis zum Ende dieser Arbeit eine unersetzliche Begleitung und Beratung. Auch für die Mithilfe von Frau G. Busch möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Herrn Dr. R. Riebe und Herrn Dipl.-Biol. M. Lenk danke ich für ihre Hilfe und Beratung zu sämtlichen Methoden und Problemen im Zusammenhang mit der Zellkultur.

Bei Frau Dr. U. Blohm und Frau S. Knöfel bedanke ich mich vielmals für ihre Unterstützung rund ums FACS. Diese Versuche wären ohne ihre Hilfe kaum möglich gewesen.

Weiterhin danke ich Herrn DVM U. Polster für zahlreiche bakteriologische Untersuchungen.

Bei meinen Mitdoktoranden möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere richtet sich mein Dank an Frau TÄ C. Maresch, die mich vor allem während der Zeit, in der ich nicht mehr ganztags am Friedrich-Loeffler-Institut sein konnte, und während der Tierversuche unterstützt hat.

Das Anlegen von primären Zelllinien war nur möglich, da mir immer wieder von Tierkliniken und Tierarztpraxen Tumoren als Ausgangsmaterial zur Verfügung gestellt wurden. Ihnen allen sei an dieser Stelle herzlich gedankt. Weiterhin danke ich allen

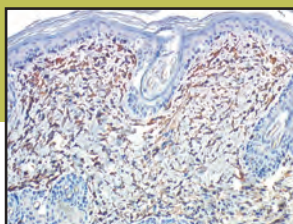
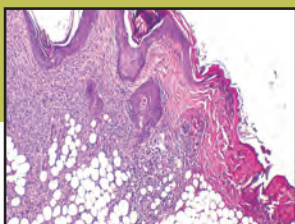
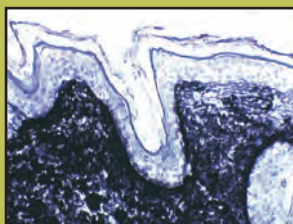
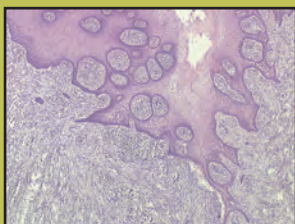
Tierärzten, Pferdebesitzern und Pferden, deren Therapieerfolge und leider auch -misserfolge ich während dieser Arbeit begleiten durfte.

Herrn Dr. habil. V. Kaden, Herrn Dr. G. Keil, Herrn Dr. B. Frisch, Herrn Prof. Dr. E. Weiss und Frau Prof. Dr. I. Käufer-Weiss danke ich sehr für die kritische Durchsicht und Korrektur meines Manuskriptes.

Der RIEMSER Arzneimittel AG danke ich für die Finanzierung von Teilen dieser Arbeit. Vor allem Frau Dr. D. Braun, Herrn Professor Dr. habil. W. Wittmann und Frau Dr. H. Küster danke ich vielmals für ihre Hilfe. Außerdem danke ich Herrn L. Schwarz für seine Hilfe bei PC-Schwierigkeiten.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung während meines gesamten Werdeganges und ihren unerschütterlichen Glauben an mich. Das schöne Zuhause, auf das ich immer zählen konnte, hat mir das Leben um so vieles leichter gemacht.

Hans-Björn danke ich für seinen Beistand, seinen Optimismus und sein Verständnis. Die vielen schönen Stunden mit ihm waren mir Aufmunterung und Ansporn gleichermaßen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5449-0

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

