

DDB2-assoziiertes Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen beim Haflinger: Risikominimierung durch Genotypisierung

J. Schäfer¹, A. May², J. Wittenberg², K. Hahn², C. Graubner¹, V. Gerber¹, C. Drögemüller³, L. Unger¹

¹Swiss Institute of Equine Medicine (ISME), Departement für klinische Veterinärmedizin, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, Schweiz;

²Pferdeklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Universität München, Deutschland;

³Institut für Genetik, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, Schweiz

Zusammenfassung

SCC (Plattenepithelkarzinom) zählen bei Pferden zu den häufigsten Neoplasien am Auge. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Haflinger mit homozygotem Genotyp für eine missense Variante im *DDB2*-Gen (*damage specific DNA binding protein 2*) ein deutlich erhöhtes Risiko für das Auftreten von okulären SCC aufweisen.

Die Ziele dieser Studie bestanden darin, die Häufigkeit des SCC-assoziierten Risikoallels im *DDB2*-Gen in schweizerischen und österreichischen Haflingerpopulationen zu bestimmen, sowie die zuvor beschriebene Phänotypkorrelation zu validieren. Dazu wurden an verschiedenen Pferdekliniken der Schweiz vorgestellte Haflinger (n = 21, darunter 11 SCC-Fälle), privat gehaltene Haflinger (n = 52, darunter 1 SCC-Fall), sowie Haflinger eines Gestüts im österreichischen Tirol (n = 53) rekrutiert. Der individuelle *DDB2*-Genotyp der Tiere wurde per PCR-Test anhand von Haarwurzel- oder Vollblutproben bestimmt.

Unter den insgesamt 12 SCC-erkrankten Pferden fanden sich neun mit okulären und drei mit nicht-okulären SCC. Sechs der neun Haflinger mit okulärem SCC und einer der drei Haflinger mit nicht-okulärem SCC waren homozygot für die *DDB2*-Variante. Von den 113 klinisch unauffälligen Tieren waren 7/113 homozygot (6%) und 42/113 heterozygot (37%), was einer Allelfrequenz von 24,8% in der Kontrollkohorte entspricht.

Das Risiko für das Auftreten des okulären SCC beim Haflinger ist mit dem homozygoten *DDB2*-Genotyp deutlich erhöht. Allerdings tragen nicht alle SCC-erkrankten Tiere diese Genvariante und nicht alle *DDB2*-homozygoten Tiere entwickeln ein SCC, was sich mit der multifaktoriellen Genese der Erkrankung erklären lässt. Aufgrund der hohen Frequenz des unerwünschten Allels empfehlen wir, den individuellen *DDB2*-Genotyp von Zuchttieren zu beachten, um so reinerbige Nachzucht mit stark erhöhtem SCC-Risiko durch den Ausschluss von Risikoanpaarungen zu vermeiden.

Schlüsselwörter: Gentest, Onkologie, Pferd, Zuchthygiene

DDB2-associated incidence of squamous cell carcinoma in Haflingers: risk minimization by genotyping

SCC (squamous cell carcinomas) are among the most common eye neoplasms in horses. In recent studies Haflinger horses with a homozygous genotype for a missense variant in the *DDB2* gene (*damage specific DNA binding protein 2*) had a significant increased risk of developing ocular SCC.

The aims of this study were to determine the frequency of the SCC-associated risk allele in the *DDB2* gene in Swiss and Austrian Haflinger populations and to validate the previously described phenotypic correlation. For this purpose, Haflingers presented at various horse clinics in Switzerland (n = 21, including 11 SCC cases), privately kept Haflingers (n = 52, including 1 SCC case), and Haflingers from a stud farm in the Austrian Tyrol (n = 53) were recruited. The individual *DDB2* genotype of the animals was determined using a polymerase chain reaction (PCR) test using hair follicle or whole blood samples.

Of the 12 horses suffering from SCC, nine had ocular SCC and three had non-ocular SCC. Six of the nine Haflingers with ocular SCC and one of the three Haflingers with non-ocular SCC were homozygous for the *DDB2* variant. Of the 113 clinically normal animals, 7/113 were homozygous (6%) and 42/113 were heterozygous (37%), which corresponds to an allele frequency of 24,8% in the control cohort.

The risk of ocular SCC occurring in Haflingers is significantly increased with the homozygous *DDB2* genotype. However, not all animals with SCC carry this gene variant and not all *DDB2* homozygous animals develop SCC, which can be explained by the multifactorial genesis of the disease. Due to the high frequency of the undesirable allele, we recommend taking the individual *DDB2* genotype of breeding animals into account in order to avoid homozygous offspring with a greatly increased SCC risk by excluding high-risk matings.

Keywords: Genetic testing, oncology, horse, breeding hygiene

<https://doi.org/10.17236/sat00409>

Eingereicht: 22.02.2023
Angenommen: 25.08.2023

DDB2-assoziiertes Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen beim Haflinger: Risikominimierung durch Genotypisierung
J.Schäfer et al.

Einleitung

Das Plattenepithelkarzinom (SCC) ist eine von den Epithelien der Haut und Schleimhaut ausgehende und in der Regel langsam wachsende, maligne Neoplasie und gilt als der am häufigsten auftretende Augentumor beim Pferd.^{1,6,14} Hauptprädispositionsstellen sind das dritte Augenlid, der Limbus, die Augenlider und seltener infiltrieren SCC auch die Orbita. Bei Haflingern ist der Limbus die häufigste Lokalisation von okulären SCC.^{6,13,20} Unbehandelt können okuläre SCC zu irreversiblen Schäden am Auge, zu Schmerzen und zur Beeinträchtigung bis hin zum Verlust der Sehfähigkeit führen sowie lokal und in entfernte Organe metastasieren.^{1,7} Ebenfalls häufig treten SCC beim Pferd an den äusseren Genitalien auf oder seltener auch in diversen anderen Lokalisationen, wie beispielsweise im Maul, in den Nasennebenhöhlen oder im Magen.^{8,10,17,24,32}

Die Ätiopathogenese von okulären und nicht-okulären SCC ist nicht vollständig geklärt. Ultraviolette (UV)-Strahlung sowie fehlende photoprotektive Pigmentierung sind jedoch bekannte Risikofaktoren, welche DNA-Schäden und infolgedessen unkontrolliertes Zellwachstum und damit die Entstehung von Tumoren begünstigen können.^{20,35} Als weiterer Einflussfaktor auf die Entstehung von SCC bei Pferden werden UV-Licht induzierte Punktmutationen des *p53*-Genes diskutiert. *p53* ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Expression bei DNA-Schäden hochreguliert wird. So wird entweder der Zellzyklus verzögert, damit die nötigen DNA-Reparaturmechanismen greifen können, oder direkt die Apoptose eingeleitet. Bei Mutationen des *p53*-Genes kann es zu unkontrolliertem Wachstum von Zellen mit DNA-Schäden kommen.^{11,13,20,28,36,40} Ausserdem gelten chronische Irritationen der Augen als prädisponierender Faktor für okuläre SCC.¹³ Als zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung von okulären SCC werden fehlende Androgene und Östrogene vermutet, was erklären könnte, weshalb Wallache offensichtlich häufiger betroffen sind als Hengste oder Stuten.³⁵ Das equine Papillomavirus Typ 2 (EcPV2) wird als möglicher Co-Faktor für die Entstehung von SCC angesehen.³⁸

Aktuelle Studien haben eine erbliche Veranlagung für okuläre SCC festgestellt, was darauf hindeutet, dass die Genetik einen wesentlichen Beitrag zum Krebsrisiko leistet. Zu den Rassen mit dem höchsten Vorkommen von okulärem SCC gehören der Appaloosa und das American Paint Horse.²⁹ Seit einiger Zeit wurde auch berichtet, dass Haflinger im Vergleich zu anderen Rassen besonders häufig und zudem offensichtlich bereits in jüngerem Alter an okulären SCC erkranken.^{1,13,20,35} Eine bei dieser Pferderasse durchgeführte genomweite Assoziationsstudie gefolgt von der Sequenzierung von Kandidatengenomen entdeckte eine verbreitete Missense-Mutation im *DDB2*-Gen (c.1013C>T; p.Thr338Met; EVA ID rs1139682898). Diese ist nachweislich mit einem erhöhten Risiko für limbale SCC sowie SCC am

dritten Augenlid assoziiert.^{1,3,34,35} Das *DDB2*-Gen kodiert für das DNA-binding protein 2, welches an geschädigte DNA bindet und an deren Reparatur beteiligt ist. Bei Vorliegen des mutierten *DDB2*-Allels p.Thr338Met ist die DNA-Reparatur beeinträchtigt. Die Missense-Mutation im *DDB2*-Gen wurde bislang bei vier Pferderassen (Haflinger, Connemara Pony, Belgier und Rocky Mountain Horse) mit SCC in der Limbusregion und am dritten Augenlid in Verbindung gebracht und soll die Bindung an UV-geschädigte DNA beeinträchtigen.^{4,15} Kürzlich wurden erste direkte funktionelle Beweise dafür geliefert, dass *DDB2*-p.Thr338Met das ursächliche Allel mit Funktionsverlust ist, welches das Risiko für okuläre SCCs bei Pferden erhöht.³ Die *DDB2*-Genvariante wird autosomal rezessiv vererbt und scheint als homozygote Variante in gut drei Viertel aller okulären SCC-Fälle beim Haflinger an der Tumorentstehung beteiligt zu sein.^{4,34} Das *DDB2*-Risikoallel scheint bisher ausschliesslich für okuläre SCC relevant zu sein und nicht für orale oder urogenitale SCC.³⁵

Das Ziel dieser Studie ist es, die Frequenz der *DDB2*-Variante in alpenländischen Haflinger-Populationen zu untersuchen und Empfehlungen für die Zucht im Allgemeinen und zur Risikoeinschätzung beim individuellen Pferd im Speziellen zu geben.

Material und Methoden

Für diese Studie wurden insgesamt 125 Haflinger durch vier unterschiedliche Herangehensweisen rekrutiert: 1) Zur Rekrutierung von privat gehaltenen Haflingern in der Schweiz wurde eine Ausschreibung der Studie (Supplement 1) auf der Website des Institut suisse de médecine équine (ISME) und auf Facebook veröffentlicht sowie diversen Pferdetierärzten und Pferdekliniken in der Schweiz per Mail zugesandt. 2) Zur Rekrutierung von Zuchtieren wurde ein Haflingergestüt in Tirol, Österreich (Fohlenhof Ebbs, Weltzentrum der Haflinger Pferde), zur Teilnahme an der Studie angefragt. 3) Des Weiteren wurden während der Studierendurchführung (Oktober 2020 bis Januar 2022) an der ISME Pferdeklinik Bern und in der Pferdeklinik der Universität Zürich aufgrund von SCC und anderen Grunderkrankungen vorgestellte Haflinger aufgenommen. 4) Zusätzlich konnten an der ISME Pferdeklinik in Bern vorgestellte Haflinger mit SCC mithilfe der seit 2015 geführten internen Tumordatenbank retrospektiv identifiziert werden.

Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie waren 1) schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme durch die Besitzenden, 2) reinrassiger Haflinger, 3) Möglichkeit, eine Haarprobe zu entnehmen oder auf eine in der Tumordatenbank vorhandene Blutprobe zurückzugreifen und 4) Durchführung einer Augenuntersuchung mit besonderem Fokus auf Hornhaut, Konjunktiven, Nickhaut und Augenlidern. Falls möglich zusätzlich fotografische Dokumenta-

tion von Abweichungen von der Norm entweder in einer Klinik oder vor Ort. 5) Angaben zu Identität, Geschlecht, aktuellem Gesundheitszustand und allfälligen Vorerkrankungen der Pferde.

Als bestätigte okuläre oder nicht-okuläre SCC-Fälle wurden nur Tiere mit histopathologischer Diagnose berücksichtigt. Die histologischen Untersuchungen wurden entweder am Institut für Tierpathologie der Vetsuisse-Fakultät Bern, am Institut für Tierpathologie der Vetsuisse-Fakultät Zürich oder im Labor Freienstein (Freienstein-Teufen, Schweiz) durchgeführt.

Bei der Augenuntersuchung wurde besonders auf Veränderungen geachtet, die charakteristisch für ein SCC sind: erhabene, rosa- bis pinkfarbene Masse(n) mit rauer und ggf. ulzerierter Oberfläche an Konjunktiven, Kornea und deren Übergang ineinander (Limbus) sowie am dritten Augenlid oder an den Augenlidern selbst. Die Einschlusskriterien für Kontrollpferde umfassten die Abwesenheit von für ein SCC verdächtigen Proliferationen im Bereich der Augen oder anderen Lokalisationen sowie, soweit bekannt, keine anamnestischen Hinweise auf das Vorliegen eines SCC in der Vergangenheit.

Die Haare mitsamt Haarwurzel wurden den Tieren präferentiell aus der Mähne entnommen, per Hand oder mithilfe einer Flachzange in kleinen Büscheln (ca. 30–50 Haare pro Tier) und ohne Anwendung von Zwangsmassnahmen. Die ausgezupften Haare wurden anschliessend auf einer Haarkarte (Neogen GeneSeek Igenity, www.genomics.neogen.com) fixiert und bei Raumtemperatur gelagert. Bei Haflingern, bei denen auf eine Vollblutprobe aus der Tumordatenbank der ISME Pferdeklinik Bern zurückgegriffen wurde, war diese initial aus der Jugularvene in ein Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (EDTA)-Blut Röhrchen entnommen, in ein Cryotube (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) transferiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt worden.

Die in dieser Studie verwendeten Proben von an SCC erkrankten Haflingern stellen entweder Reste von Proben dar, die im Rahmen des Klinikaufenthaltes zu diagnostischen Zwecken gewonnen worden waren, oder fallen unter die vom Kanton Bern genehmigten Tierversuchsbewilligungen BE110/15, BE41/19 und BE71/19. Die Haarwurzel-Probenentnahme bei den Kontrollpferden fällt für die Schweizer Haflingerpopulation unter die Tierversuchsbewilligung BE71/19 bzw. wurde für die von Tierärzten der Ludwig-Maximilians-Universität München beprobten Tiere aus Tirol von der dortigen Ethikkommission genehmigt.

Die Extraktion der genomischen DNA aus den Haarwurzeln wurde mit Hilfe des Maxwell Systems und des Maxwell® RSC Blood DNA Kits AS1400 (Promega, Dübendorf, Schweiz) halbautomatisch gemäss Herstellerangaben

im Institut für Genetik der Universität Bern durchgeführt. Eine spezifische Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde für die gezielte Genotypisierung der *DDB2*-Genvariante c.1013C>T entwickelt. Die PCR wurde für 30 Zyklen mit dem Amplitaq Gold Master Mix (ThermoFisher, Rotkreuz, Schweiz) in einer 10L Reaktion durchgeführt, die 10 ng genomische DNA und 5 pmol jedes Primers (F 5'-CCA-GATTCAGTGCCTTCCTT-3' und R 5'-AGAAGAGC-CGGGGGATAAG-3') enthielt. Nach Behandlung mit Exonuklease I und alkalischer Phosphatase wurden die PCR-Produkte auf einem ABI 3730 DNA Analyzer (ThermoFisher, Rotkreuz, Schweiz) sequenziert. Die Sanger-Sequenzen wurden mit der Software Sequencher 5.1 (GeneCodes, Ann Arbor, MI, USA) analysiert.

Jedem untersuchten Tier wurde somit ein *DDB2*-Genotyp zugeordnet: Homozygot für die Variante (Genotyp SCC-2), heterozygot für die Variante (Genotyp SCC-1) oder nicht Träger dieser Variante (Genotyp SCC-0). Im Folgenden wurde überprüft, inwiefern der Genotyp mit dem Phänotyp (Haflinger mit SCC vs. Haflinger ohne SCC) korreliert. Zudem wurde die Frequenz des *DDB2*-Riskiallels in der gesamthaft getesteten Kohorte bestimmt.

Mithilfe der gesammelten Daten wurden Mittelwert sowie die Standardabweichung des Alters, die Allelfrequenzen sowie das relative Risiko für den Genotyp SCC-2 als Risikofaktor für okuläre SCC berechnet.

Resultate

Insgesamt wurden 125 Haflinger, davon 20 in Kliniken vorgestellte Pferde, 52 privat gehaltene Tiere und 53 vom Fohlenhof Ebbs in Tirol, in die Studie eingeschlossen (Abb. 1). Ein Tier wurde aus der Studie ausgeschlossen, da es eine knotige Läsion am dritten Augenlid aufwies und kein Besitzereverständnis für eine Biopsie vorlag, so dass eine definitive SCC Diagnose nicht möglich war. Der Anteil der in der Studie berücksichtigten Schweizer Haflinger betrug 2,6 % der gesamten schweizerischen Haflingerpopulation (2'766 Haflinger, Stand Dezember 2021).⁴⁴

Neun Haflinger (7,2%) wurden mit einem histologisch bestätigten okulären SCC und drei mit einem histologisch bestätigten nicht-okulären SCC diagnostiziert.

Die Tabelle mit Auflistung von Entnahmedatum, Alter, Geschlecht, Ergebnissen der Augenuntersuchung, sonstigen Erkrankungen, Phänotyp und Genotyp der *DDB2*-Variante aller beprobten Haflinger befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Supplement 2).

Das mittlere Alter aller Pferde zum Zeitpunkt der Probenentnahme lag bei 10,9 +/- 6,7 Jahren (6 Monate – 31 Jahre) (Mittelwert +/- Standardabweichung (Bereich)). Das mittlere Alter der Kontrollpferde zum Zeitpunkt der Probeent-

DDB2-assoziertes Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen beim Haflinger: Risikominimierung durch Genotypisierung

J.Schäfer et al.

DDB2-assoziiertes Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen beim Haflinger: Risikominimierung durch Genotypisierung
J.Schäfer et al.

nahme war 10,4 +/- 6,6 Jahre (6 Monate – 31 Jahre). Das mittlere Alter der Pferde mit okulärem SCC betrug zum Zeitpunkt der Probeentnahme 18,1 +/- 7,4 Jahre (6–30 Jahre). Der Zeitpunkt der Probenentnahme entspricht jedoch nicht dem Zeitpunkt, als das SCC erstmals bemerkt oder behandelt wurde. Diese Informationen liegen nicht für alle Fälle vor. Pferde mit nicht-okulärem SCC waren bei der Erstvorstellung durchschnittlich 17 Jahre +/- 2,6 (15–20 Jahre) alt. Dies entspricht dem Auftreten der ersten bemerkten Symptome.

Unter den 125 beprobten Tieren waren 33 Hengste, 28 Wallache und 64 Stuten.

Genotyp

Von den insgesamt 125 beprobten Haflingern waren 15/125 (11 %) homozygot (SCC-2) und 44/125 (36 %) heterozygot (SCC-1) Träger der mit dem Risiko des Auftretens von okulärem SCC assoziierten Variante im *DDB2*-Gen (Abb. 2), was einer Allelfrequenz von 29,6 % in der gesamten beprobten Population entspricht. Somit trägt nahezu jedes zweite Pferd der betrachteten Stichprobe dieser Rasse mindestens eine Kopie des okulären SCC-Risikoallels.

Von den 113 nicht an SCC erkrankten Tieren wiesen 7/113 (6 %) den homozygoten (SCC-2) und 42/113 (37 %) den heterozygoten (SCC-1) Genotyp auf (Abb. 2). Bei diesen Kontrolltieren lag die Allelfrequenz somit bei 24,8 %. Die

sieben homozygoten Pferde (SCC-2), die bisher keine Anzeichen für ein okuläres SCC aufwiesen, waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 9,8 ± 3,8 (4–15) Jahre alt.

Die *DDB2*-Allelfrequenz bei den 9 okulären SCC Fällen lag bei 77,8 %. Bei den drei nicht-okulären SCC war jeder mögliche Genotyp je einmal vertreten.

Diskussion

Der Haflinger ist insbesondere in Norditalien, Österreich und Süddeutschland ein beliebtes Freizeit- und Sportpferd. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Allelfrequenz der unerwünschten *DDB2*-Genvariante in der untersuchten schweizerischen und österreichischen Haflingerpopulation hoch ist und, wie zuvor beschrieben, homozygote Träger offensichtlich ein deutlich erhöhtes Risiko aufweisen, an einem okulären SCC zu erkranken. Inwiefern der *DDB2*-Genotyp bei nicht-okulären SCC beim Haflinger eine Rolle spielt, kann in dieser Studie aufgrund der sehr geringen Anzahl von Fällen nicht geklärt werden.

Da für diese Studie gezielt SCC-erkrankte Haflinger gesucht wurden und diese sich überwiegend als reinerbig für das *DDB2*-Risikoallel gezeigt haben, liegt die Allelfrequenz in der gesamten Studienpopulation mit 29,6 % wohl über der tatsächlichen Verbreitung in der Gesamtpopulation. Somit liegt die in der Kontrollkohorte ermittelte Allelfrequenz von 24,8 % vermutlich näher an der tatsächlichen Allelfrequenz, zumal sie

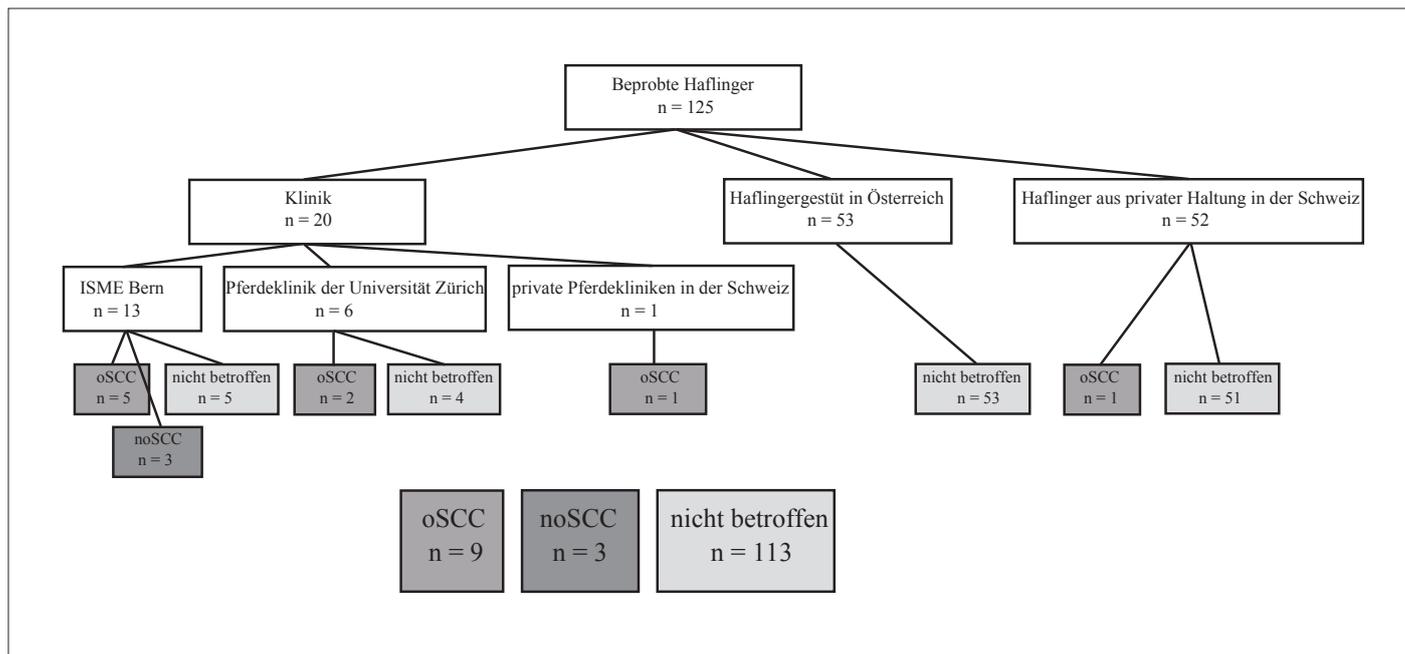


Abbildung 1: Übersicht zur Verteilung der untersuchten Haflingerpferde in der Schweiz und Österreich nach Herkunft und Plattenepithelkarzinom (SCC) Status.

mit der bisher geschätzten Allelfrequenz von 25 % bei Haflingern aus Nordamerika und Österreich nahezu identisch ist.¹ Beachtenswert ist die hohe Verbreitung von heterozygoten Haflingern in der Gesamtpopulation (44/125, 36 %). Obwohl bei Anlageträgern bisher kein Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko, an einem okulären SCC zu erkranken, festgestellt wurde, geben diese Tiere jedoch mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % das unerwünschte *DDB2*-Allel an ihre Nachkommen weiter. Bei Verpaarungen von zwei Pferden mit SCC-1 Genotyp beträgt das Risiko für homozygote Nachkommen 25 %. Basierend auf der in der Kontrollkohorte ermittelten Allelfrequenz von 24,8 % ist bei zufälliger Verpaarung von zwei Haflingern unbekanntem Genotyps das Risiko für das Auftreten eines homozygoten Nachkommens 6,25 %.

In dieser Studie wiesen 6/9 (66,6 %) der okulären SCC-Fälle den SCC-2 Genotyp auf. Bei anderen Studien zu okulären SCC, welche 43 resp. 74 erkrankte Haflinger einschlossen, waren es 77 % und 88 %.^{1,34} In dieser Studie ist das Risiko, an einem okulären SCC zu erkranken, somit 14,8× höher bei homozygoten Tieren im Vergleich zu Haflingern, die die Genvariante nicht oder nur heterozygot tragen. Bisher wurde für SCC am dritten Augenlid ein 16,3× höheres Risiko für Homozygote beschrieben.³⁴

Diese Studie bestätigt daher die zuvor berichtete hohe, aber nicht perfekte Assoziation zwischen dem homozygoten Genotyp für die Missense-Mutation im *DDB2*-Gen und dem Auftreten eines okulären SCC beim Haflinger. Die wenigen Fälle, bei denen die *DDB2*-Variante nicht vorkommt, zeigen, dass diese zwar einen signifikanten Risikofaktor, aber nicht die alleinige Ursache für okuläre SCC darstellt. Bisher konnte jedoch keine weitere prädisponierende Genvariante

für das erhöhte Vorkommen von okulären SCC-Erkrankungen beim Haflinger identifiziert werden.^{1,35} Genetische Heterogenität auf Grund bislang unbekannter weiterer genetischer Faktoren und äusserer Einflüsse wie z.B. UV-Exposition können als Ursache für diese weiteren nicht *DDB2*-assoziierten okulären SCC-Fälle in Frage kommen.^{34,35} Die Tiere, welche die Mutation tragen und bisher keine Anzeichen für ein okuläres SCC aufweisen, waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme durchschnittlich knapp 10 Jahre alt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese Pferde im Laufe ihres Lebens noch ein okuläres SCC entwickeln könnten. Neben zur Zeit nicht bekannten genetischen Faktoren könnten hierbei auch externe Faktoren, wie reduzierte UV-Licht-Exposition der Augen durch das Tragen einer Schutzmaske oder vermehrter Aufenthalt im Stall, v.a. tagsüber, einen Einfluss haben. Das Alter der okulären SCC-Fälle zum Zeitpunkt der Vorstellung in der Klinik (14,9 Jahre) liegt deutlich über dem bisher beschriebenen Alter von 8,7 Jahren (2–16) für limbale SCC bei Haflingern.²⁰ Jedoch muss dabei berücksichtigt werden, dass in dieser Studie nur das Alter zum Zeitpunkt der ersten Vorstellung in einer Klinik beschrieben wird und bei vielen Haflingern das SCC schon deutlich früher bemerkt wurde und auch teilweise schon behandelt worden war. Dies könnte die deutliche Abweichung vom zuvor beschriebenen mittleren Erkrankungsalter erklären. Bei anderen Pferderassen ist das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose von okulären SCC höher als bei den Haflingern (12,9, 11,8 und 11 Jahre).^{14,16,20}

Wallache zeigten in dieser Studie ein ca. 2x höheres Risiko an einem okulären SCC zu erkranken als Stuten. Dies geht einher mit den bisherigen Beobachtungen, dass Wallache am häufigsten von okulären SCC betroffen sind.^{4,7,26,35} Ne-

DDB2-assoziiertes Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen beim Haflinger: Risikominimierung durch Genotypisierung

J.Schäfer et al.

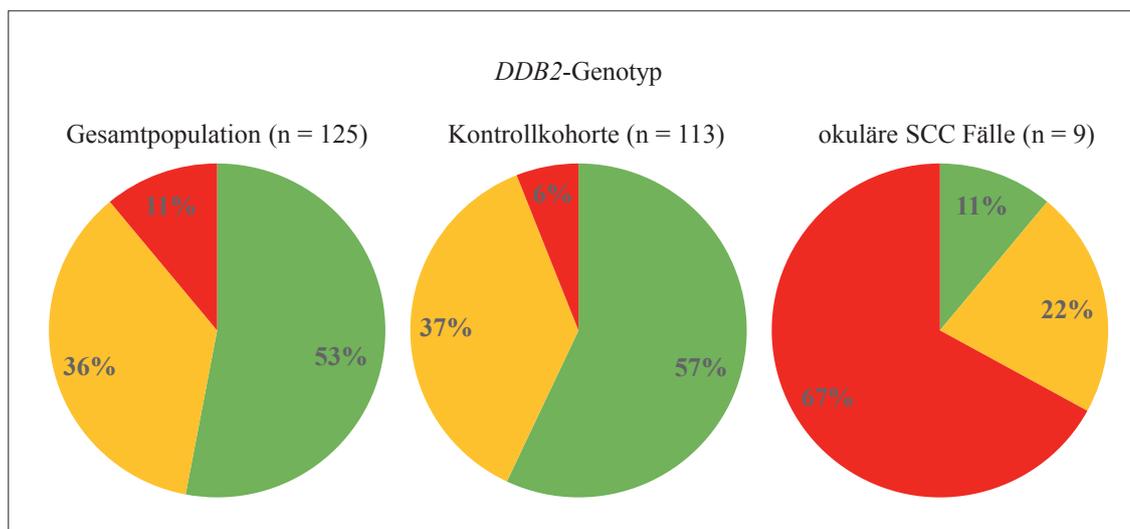


Abbildung 2: *DDB2*-Genotypverteilung bei Haflingerpferden aus der Schweiz und Österreich. Rot = SCC-2 (homozygote Träger) | Gelb = SCC-1 (heterozygote Träger) | Grün = SCC-0 (nicht Träger)

DDB2-assoziiertes Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen beim Haflinger: Risikominimierung durch Genotypisierung

J.Schäfer et al.

ben der bisher noch nicht bestätigten Hypothese eines möglichen Zusammenhangs mit tieferen Werten von zirkulierenden Androgenen oder Östrogenen bei Wallachen^{4,7,26,35} könnte hier auch eine Rolle spielen, dass Haflinger, die Anzeichen für ein SCC hatten, möglicherweise von der Zucht ausgeschlossen und darum kastriert wurden.

Eine Einschränkung dieser Studie ist, dass 21 von 125 Haflingern in Kliniken vorgestellt wurden und somit nicht einen Querschnitt der Gesamtpopulation darstellen. Wie oben erwähnt, wurden zusätzliche SCC-Fälle auch retrospektiv über die Tumordatenbank des ISME rekrutiert mit dem Ziel, eine grössere Fallkohorte zu bilden. Allerdings bleibt die Zahl der betroffenen Haflinger mit neun okulären und nur drei nicht-okulären SCC-Fällen klein, was die statistische Aussagekraft der Daten beschränkt. Der österreichische Teil der beprobten Population besteht nur aus klinisch unauffälligen Zuchttieren (22 Stuten, ein Wallach und 30 Hengste, Alter: 7,83 Jahre +/- 5,55 (6 Monate – 28 Jahre), was eine gewisse Einschränkung im Hinblick auf die Geschlechterverteilung darstellen könnte und auch eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit von SCC-erkrankten Tieren in dieser Stichprobe sein könnte.

Eine weitere Einschränkung dieser Studie ist, dass die Tiere zwar alle einer makroskopischen Augenuntersuchung unterzogen wurden, SCC jedoch im frühen Stadium nicht unbedingt grobsinnlich erkannt werden können und die Tiere auch noch nach der Untersuchung ein SCC entwickeln können. Zusätzlich wurde keine Einschränkung des Alters für den Einschluss in die Studie gemacht, was die Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl erkrankter Tiere sehr wahrscheinlich beeinflusst, da jüngere Pferde seltener von SCC betroffen sind. Eine Möglichkeit, dies zu beachten wäre, nicht betroffene Pferde nur zu inkludieren, wenn sie eine Standardabweichung (3,5 Jahre) über dem Durchschnittsalter (8,7 Jahre) sind (12,2 Jahre), in welchem Haflinger typischerweise an SCC erkranken.²⁰ In dieser Studie war das jüngste eingeschlossene Pferd 6 Monate alt. Um die Stichprobenpopulation nicht weiter einzuschränken, wurde jedoch auf eine Alterseinschränkung verzichtet.

Es ist anzuraten, zukünftig bei allen in der Zucht eingesetzten Haflingern den individuellen *DDB2*-Genotyp zu bestimmen. Für alle rezessiv vererbten genetischen Besonderheiten gilt, dass ein Tier nur ein erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweist, wenn es die unerwünschte Anlage sowohl vom Vater wie auch von der Mutter erhalten hat. Es ist daher ausreichend, sogenannte Risikopaarungen zu vermeiden. Darunter versteht man Anpaarungen, bei denen sowohl der Hengst als auch das belegte Tier Träger, also SCC-1, sind. Durch die gewonnenen Kenntnisse ist es nun auf einfache Art und Weise möglich, die *DDB2*-Allelfrequenz in der Rasse zu monitoren bzw. zu reduzieren. Es ist daher einerseits zu empfehlen, SCC-1 x SCC-1 Anpaarungen zu vermeiden und andererseits den Ein-

satz von heterozygoten Hengsten mit potentiell vielen Nachkommen im Blick zu behalten. Diese sollten möglichst nur dann für den Zuchteinsatz selektiert werden, wenn sie züchterisch wertvoller erscheinen als alternative SCC-0 Tiere.

Schlussfolgerung

Die Studienergebnisse bestätigen einerseits die zuvor publizierte Assoziation des *DDB2*-Genotyps mit dem Auftreten von SCC bei Haflingern. Allerdings sind nicht alle erkrankten Tiere Träger der Variante, was mit der bekannten multifaktoriellen Ätiologie zu erklären ist. Entsprechend zeigen, wie zuvor beschrieben, nicht alle homozygoten Tiere SCC. Die hohe Frequenz für das unerwünschte Allel in alpenländischen Haflingerpopulationen ist besorgniserregend. Daher empfehlen wir eine züchterische Berücksichtigung des individuellen *DDB2*-Genotyps aller Zuchttiere zur Vermeidung reinerbiger Nachzucht mit erhöhtem SCC-Risiko durch den Ausschluss von Risikoanpaarungen. Haflinger mit homozygotem *DDB2*-Genotyp sollten nicht für die Zucht eingesetzt werden und es sollte ein besonderes Augenmerk auf UV-Schutz, z. B. mittels entsprechender Masken, und regelmässige tierärztliche Augenkontrollen zur SCC-Früherkennung gelegt werden. Die empfohlene umfassende *DDB2*-Genotypisierungsstrategie würde helfen, Gesundheit und Tierwohl in der Haflinger Rasse nachhaltig zu steigern.

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt allen Tierärztinnen und Tierärzten, welche bei der Fallrekrutierung und der Probenentnahme geholfen haben: Dem Team der Pferdeklunik der Vetsuisse-Fakultät in Zürich, dem Team des ISME Bern und Avenches, der Pferdeklunik Dalchenhof und allen weiteren involvierten Privattierärztinnen und Privattierärzten.

Weiter danken wir allen Haflingerbesitzerinnen und Haflingerbesitzern, welche ihre Pferde für die Studie zur Verfügung gestellt haben. Ein besonderer Dank gilt dabei dem Fohlenhof Ebbs, Tirol.

Es bestehen keine Interessenskonflikte.

Abkürzungen:

PEK = Plattenepithelkarzinom

SCC = squamous cell carcinoma

DDB2 = damage-specific DNA-binding protein 2

DNA = deoxyribonucleic acid

Incidence du carcinome épidermoïde associé à *DDB2* chez les Haflingers : minimisation du risque par le génotypage

Les carcinomes épidermoïdes (CE) sont parmi les néoplasmes oculaires les plus fréquents chez les chevaux. Des études récentes ont montré que les chevaux Haflinger présentant un génotype homozygote pour un variant faux-sens dans le gène *DDB2* (*damage specific DNA binding protein 2*) avaient un risque significativement plus élevé de développer un CE oculaire.

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer la fréquence de l'allèle à risque associé au CE dans le gène *DDB2* dans les populations suisses et autrichiennes de Haflinger et de valider la corrélation phénotypique décrite précédemment. Pour ce faire, des Haflingers présentés dans différentes cliniques équinées en Suisse (n = 21, dont 11 cas de CE), des Haflingers privés (n = 52, dont 1 cas de CE) et des Haflingers d'un haras du Tyrol autrichien (n = 53) ont été recrutés. Le génotype *DDB2* individuel des animaux a été déterminé à l'aide d'un test de réaction en chaîne par polymérase (PCR) utilisant des échantillons de follicules pileux ou de sang total.

Sur les 12 chevaux souffrant de CE, neuf avaient un CE oculaire et trois un CE non oculaire. Six des neuf Haflingers atteints de CE oculaire et un des trois Haflingers atteints de CE non oculaire étaient homozygotes pour la variante *DDB2*. Sur les 113 animaux cliniquement normaux, 7/113 étaient homozygotes (6%) et 42/113 étaient hétérozygotes (37%), ce qui correspond à une fréquence d'allèle de 24,8% dans la cohorte de contrôle.

Le risque de CE oculaire chez les Haflingers augmente de manière significative avec le génotype *DDB2* homozygote. Cependant, tous les animaux atteints de CE ne sont pas porteurs de cette variante génétique et tous les animaux homozygotes *DDB2* ne développent pas de CE, ce qui peut s'expliquer par la genèse multifactorielle de la maladie. En raison de la fréquence élevée de l'allèle indésirable, nous recommandons de tenir compte du génotype *DDB2* individuel des animaux reproducteurs afin d'éviter une progéniture homozygote présentant un risque fortement accru de CE en excluant les accouplements à haut risque.

Mots clés: Tests génétiques, oncologie, cheval, hygiène d'élevage

Occorrenza associata a *DDB2* di carcinomi a cellule squamose nei cavalli Haflinger: minimizzazione del rischio via la genotipizzazione

Gli SCC (carcinomi a cellule squamose) sono tra le neoplasie oculari più comuni nei cavalli. Recenti studi hanno dimostrato che i cavalli Haflinger con un genotipo omozigote per una variante missenso nel gene *DDB2* (*damage specific DNA binding protein 2*) presentano un significativo aumento del rischio di sviluppare SCC oculari. Gli obiettivi di questo studio erano di determinare la frequenza dell'allele di rischio associato agli SCC nel gene *DDB2* nelle popolazioni di cavalli Haflinger svizzere e austriache e convalidare la correlazione fenotipica precedentemente descritta. A tale scopo, sono stati inclusi nello studio cavalli Haflinger presentati in varie cliniche veterinarie in Svizzera (n = 21, di cui 11 casi di SCC), cavalli Haflinger tenuti privatamente (n = 52, di cui 1 caso di SCC) e cavalli Haflinger provenienti da un allevamento in Tirolo, Austria (n = 53). Il genotipo individuale del gene *DDB2* degli animali è stato determinato mediante un test PCR utilizzando campioni di radici dei peli o sangue intero.

Dei 12 cavalli affetti da SCC, nove avevano SCC oculari e tre avevano SCC non oculari. Sei dei nove Haflinger con SCC oculari e uno dei tre Haflinger con SCC non oculari erano omozigoti per la variante *DDB2*. Dei 113 animali clinicamente normali, 7/113 erano omozigoti (6%) e 42/113 erano eterozigoti (37%), corrispondenti a una frequenza dell'allele del 24,8% nella coorte di controllo.

Il rischio di sviluppare SCC oculari nei cavalli Haflinger è significativamente aumentato con il genotipo omozigote per il gene *DDB2*. Tuttavia, non tutti gli animali affetti da SCC portano questa variante genetica e non tutti gli animali *DDB2* omozigoti sviluppano un SCC, il che può essere spiegato dalla natura multifattoriale della malattia. A causa dell'alta frequenza dell'allele indesiderato, raccomandiamo di tenere conto del genotipo individuale del gene *DDB2* negli animali da riproduzione al fine di evitare una discendenza omozigote con un elevato rischio di SCC, quindi escludendo gli accoppiamenti ad alto rischio.

Parole chiave: Test genetici, oncologia, cavallo, igiene dell'allevamento

DDB2-assoziertes Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen beim Haflinger: Risikominimierung durch Genotypisierung

J.Schäfer et al.

DDB2-assoziiertes
Vorkommen von Plat-
tenepithelkarzinomen
beim Haflinger:
Risikominimierung durch
Genotypisierung

J.Schäfer et al.

Literaturnachweis

- 1 Bellone RR, Liu J, Petersen JL, et al. A missense mutation in damage-specific DNA binding protein 2 is a genetic risk factor for limbal squamous cell carcinoma in horses: Genetics of limbal squamous cell carcinoma in Haflinger horses. *Int J Cancer*. 2017;141(2):342–353. doi:10.1002/ijc.30744
- 2 Bosch G, Klein WR. Superficial keratectomy and cryosurgery as therapy for limbal neoplasms in 13 horses. *Vet Ophthalmol*. 2005;8(4):241–246. doi:10.1111/j.1463-5224.2005.00395.x
- 3 Chen L, Bellone RR, Wang Y, et al. A novel DDB2 mutation causes defective recognition of UV-induced DNA damages and prevalent equine squamous cell carcinoma. *DNA Repair*. 2021;97:103022. doi:10.1016/j.dnarep.2020.103022
- 4 Crausaz M, Launois T, Smith-Fleming K, McCoy AM, Knickelbein KE, Bellone RR. DDB2 Genetic Risk Factor for Ocular Squamous Cell Carcinoma Identified in Three Additional Horse Breeds. *Genes*. 2020;11(12):1460. doi:10.3390/genes11121460
- 5 Dixon PM, Head KW. Equine Nasal and Paranasal Sinus Tumours: Part 2: A Contribution of 28 Case Reports. *Vet J*. 1999;157(3):279–294. doi:10.1053/tvj.1999.0371
- 6 Dugan SJ. Ocular Neoplasia. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1992;8(3):609–626. doi:10.1016/S0749-0739(17)30444-3
- 7 Dugan SJ, Roberts SM, Curtis CR, Severin GA. Prognostic factors and survival of horses with ocular/adnexal squamous cell carcinoma: 147 cases (1978–1988). *J Am Vet Med Assoc*. 1991;198(2):298–303.
- 8 Edwards JF. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. *Anim Reprod Sci*. 2008;107(3–4):197–207. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.002
- 9 Elce YA, Wilkie DA, Santschi EM, Green E. Metastasis or delayed local extension of ocular squamous cell carcinoma in four horses: Metastasis or delayed local extension of SCC. *Equine Vet Educ*. 2011;23(10):496–499. doi:10.1111/j.2042-3292.2010.00211.x
- 10 Head KW, Dixon PM. Equine Nasal and Paranasal Sinus Tumours. Part 1: Review of the Literature and Tumour Classification. *Vet J*. 1999;157(3):261–279. doi:10.1053/tvj.1998.0370
- 11 Hendrix DVH. Equine Ocular Squamous Cell Carcinoma. *Clin Tech Equine Pract*. 2005;4(1):87–94. doi:10.1053/j.ctep.2005.03.011
- 12 Kaps S, Richter M, Philipp M, Bart M, Eule C, Spiess BM. Primary invasive ocular squamous cell carcinoma in a horse. *Vet Ophthalmol*. 2005;8(3):193–197. doi:10.1111/j.1463-5224.2005.00358.x
- 13 Keller M. Retrospektive Studie zum Vorkommen des equinen okulären Plattenepithelkarzinoms an der LMU München in den Jahren 1995–2010. Published online 2011.
- 14 King TC, Priehs DR, Gum GG, Miller TR. Therapeutic management of ocular squamous cell carcinoma in the horse: 43 cases (1979–1989). *Equine Vet J*. 1991;23(6):449–452. doi:10.1111/j.2042-3306.1991.tb03759.x
- 15 Knickelbein KE, Lassaline ME, Bellone RR. Limbal squamous cell carcinoma in a Rocky Mountain Horse: Case report and investigation of genetic contribution. *Vet Ophthalmol*. 2019;22(2):201–205. doi:10.1111/vop.12612
- 16 Knickelbein KE, Lassaline ME, Singer-Berk M, et al. A missense mutation in damage-specific DNA binding protein 2 is a genetic risk factor for ocular squamous cell carcinoma in Belgian horses. *Equine Vet J*. 2020;52(1):34–40. doi:10.1111/evj.13116
- 17 Knottenbelt DC, Croft JS. Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC): «What’s the problem?» *Equine Vet Educ*. 2019;31(12):635–646. doi:10.1111/eve.12926
- 18 Kowalczyk L, Boehler A, Brunthaler R, Rathmanner M, Rijkenhuizen ABM. Squamous cell carcinoma of the paranasal sinuses in two horses: Squamous cell carcinoma of the paranasal sinuses in two horses. *Equine Vet Educ*. 2011;23(9):435–440. doi:10.1111/j.2042-3292.2010.00141.x
- 19 Labelle AL, Metzler AG, Wilkie DA. Nictitating membrane resection in the horse: A comparison of long-term outcomes using local vs. general anaesthesia: Nictitating membrane resection. *Equine Vet J*. 2011;43:42–45. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00486.x
- 20 Lassaline M, Cranford TL, Latimer CA, Bellone RR. Limbal squamous cell carcinoma in Haflinger horses. *Vet Ophthalmol*. 2015;18(5):404–408. doi:10.1111/vop.12229
- 21 Loftin P, Fowlkes N, McCauley C. Mandibular squamous cell carcinoma in a 5-year-old Tennessee Walking Horse: Mandibular squamous cell carcinoma in a young horse. *Equine Vet Educ*. 2015;27(1):4–8. doi:10.1111/eve.12231
- 22 Mair TS, Sherlock CE, Pearson GR. Delayed metastasis of ocular squamous cell carcinoma following treatment in five horses: Metastasis of ocular squamous cell carcinoma. *Equine Vet Educ*. 2015;27(7):e9–e14. doi:10.1111/j.2042-3292.2012.00435.x
- 23 Mair TS, Walmsley JP, Phillips TJ. Surgical treatment of 45 horses affected by squamous cell carcinoma of the penis and prepuce. *Equine Vet J*. 2010;32(5):406–410. doi:10.2746/04251640077591093
- 24 Monteiro S, Lemberger K, Gangl M. Mandibular squamous cell carcinoma in a young horse. *Equine Vet Educ*. 2009;21(8):406–410. doi:10.2746/095777309X465512
- 25 Moore AS, Beam SL, Rassnick KM, Provost P. Long-term control of mucocutaneous squamous cell carcinoma and metastases in a horse using piroxicam. *Equine Vet J*. 2010;35(7):715–718. doi:10.2746/042516403775696320
- 26 Mosunic CB, Moore PA, Carmicheal KP, et al. Effects of treatment with and without adjuvant radiation therapy on recurrence of ocular and adnexal squamous cell carcinoma in horses: 157 cases (1985–2002). *J Am Vet Med Assoc*. 2004;225(11):1733–1738. doi:10.2460/javma.2004.225.1733
- 27 Müller T, Wagner A, Beinecke A, Hewicker-Trautwein M, Ohnesorge B. Umfangsvermehrungen des Pharynx am Beispiel eines klinischen Falles. *Pferde Spieg*. 2018;21(01):29–40. doi:10.1055/s-0043-119681
- 28 Pazzi KA, Kraegel SA, Griffey SM, Theon AP, Madewell BR. Analysis of the equine tumor suppressor gene p53 in the normal horse and in eight cutaneous squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*. 1996;107(1):125–130. doi:10.1016/0304-3835(96)04359-5
- 29 Plummer CE, Smith S, Andrew SE, et al. Combined keratectomy, strontium-90 irradiation and permanent bulbar conjunctival grafts for corneolimbic squamous cell carcinomas in horses (1990?2002): 38 horses. *Vet Ophthalmol*. 2007;10(1):37–42. doi:10.1111/j.1463-5224.2007.00489.x

- ³⁰ de Preux M, Gurtner C, Klebic I, Waschk MA, Drögemüller C, Brünisholz HP. Skeletal metastasis from a squamous cell carcinoma of the nictitating membrane in a Haflinger horse. *Equine Vet Educ.* 2021;33(5). doi:10.1111/eve.13180
- ³¹ Scherrer NM, Lassaline-Utter M, McKenna BC. Characterization and outcome following excision of masses in the nictitating membranes of horses: 50 cases (1998–2012). *J Am Vet Med Assoc.* 2014;245(7):812–815. doi:10.2460/javma.245.7.812
- ³² Schuh JCL. Squamous Cell Carcinoma of the Oral, Pharyngeal and Nasal Mucosa in the Horse. *Vet Pathol.* 1986;23(2):205–207. doi:10.1177/030098588602300217
- ³³ Schwink K. Factors influencing morbidity and outcome of equine ocular squamous cell carcinoma. *Equine Vet J.* 1987;19(3):198–200. doi:10.1111/j.2042-3306.1987.tb01378.x
- ³⁴ Singer-Berk M, Knickelbein KE, Vig S, et al. Genetic risk for squamous cell carcinoma of the nictitating membrane parallels that of the limbus in Haflinger horses. *Anim Genet.* 2018;49(5):457–460. doi:10.1111/age.12695
- ³⁵ Singer-Berk MH, Knickelbein KE, Lounsberry ZT, et al. Additional Evidence for *DDB2* T338M as a Genetic Risk Factor for Ocular Squamous Cell Carcinoma in Horses. *Int J Genomics.* 2019;2019:1–10. doi:10.1155/2019/3610965
- ³⁶ Sironi G, Riccaboni P, Mertel L, Cammarata G, Brooks DE. p53 protein expression in conjunctival squamous cell carcinomas of domestic animals. *Vet Ophthalmol.* 1999;2(4):227–231. doi:10.1046/j.1463-5224.1999.00086.x
- ³⁷ Surjan Y, Donaldson D, Ostwald P, Milross C, Warren-Forward H. A Review of Current Treatment Options in the Treatment of Ocular and/or Periocular Squamous Cell Carcinoma in Horses: Is There a Definitive “Best” Practice? *J Equine Vet Sci.* 2014;34(9):1037–1050. doi:10.1016/j.jevs.2014.04.005
- ³⁸ Sykora S, Samek L, Schönthaler K, et al. EcPV-2 is transcriptionally active in equine SCC but only rarely detectable in swabs and semen from healthy horses. *Vet Microbiol.* 2012;158(1–2):194–198. doi:10.1016/j.vetmic.2012.02.006
- ³⁹ Top JGB, Heer N, Klein WR, Ensink JM. Penile and preputial squamous cell carcinoma in the horse: A retrospective study of treatment of 77 affected horses. *Equine Vet J.* 2008;40(6):533–537. doi:10.2746/042516408X281171
- ⁴⁰ van den Top JGB, Harkema L, Lange C, et al. Expression of p53, Ki67, EcPV2- and EcPV3 DNA, and viral genes in relation to metastasis and outcome in equine penile and preputial squamous cell carcinoma: Prognosticators in equine penile and preputial squamous cell carcinoma. *Equine Vet J.* 2015;47(2):188–195. doi:10.1111/evj.12245
- ⁴¹ Van Den TOP JGB, Ensink JM, Gröne A, Klein WR, Barneveld A, Van WEEREN PR. Penile and preputial tumours in the horse: Literature review and proposal of a standardised approach: Penis and preputial tumours in the horse. *Equine Vet J.* 2010;42(8):746–757. doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00290.x
- ⁴² Walker MA, Schumacher J, Schmitz DG, et al. Cobalt 60 radiotherapy for treatment of squamous cell carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in three horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1998;212(6):848–851.
- ⁴³ Witte TH, Perkins JD. Early diagnosis may hold the key to the successful treatment of nasal and paranasal sinus neoplasia in the horse: Nasal and paranasal sinus neoplasia in the horse. *Equine Vet Educ.* 2011;23(9):441–447. doi:10.1111/j.2042-3292.2011.00251.x
- ⁴⁴ Zanichelli S, Pezzoli G, DelBue M, Botti P, Scrollavezza P. Squamous cell carcinoma in the horse: *Pferdeheilkunde Equine Med.* 1994;10(3):219–225. doi:10.21836/PEM19940306
- ⁴⁵ Identitas, Tierstatistik Equiden. Entwicklung nach Rassen. Bern, CH <https://tierstatistik.identitas.ch/de/equids-breeds.html> (accessed 22.12.2021).

DDB2-assoziiertes Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen beim Haflinger: Risikominimierung durch Genotypisierung

J.Schäfer et al.

Korrespondenzadresse

Dr. med. vet. Lucia Unger
 Institut suisse de médecine équine, Vetsuisse-Fakultät,
 Universität Bern
 Länggassstrasse 124
 CH-3012 Bern
 Telefon: +41 31 684 22 43
 E-Mail: lucia.unger@vetsuisse.unibe.ch