Aus der Medizinischen Kleintierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Genetische Assoziation der A31P- und A74T-Polymorphismen im kardialen Myosin-binding-protein-C-Gen mit der felinen familiären hypertrophen Kardiomyopathie bei Maine-Coon-Katzen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christel Gerlinde Schinner
aus Kemnath

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. K. Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Gehlen

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

„Es muss Herzen geben, die die Tiefe unseres Wesens kennen und auf uns schwören, selbst wenn die ganze Welt uns verlässt.“

Karl Gutzkow
(1811-1878)

Meinen lieben Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis ..... **I**

II. Abkürzungsverzeichnis ..... **IV**

III. Einleitung **1**

IV. Literaturübersicht **2**

1. Aufbau des Herzmuskels *2*
1.1. Struktur der kardialen Muskelfasern 2
1.2. Ultrastruktur des Sarkomers und des intrasarkomerischen Zytoskeletts 3
1.3. Zytoskelett außerhalb des Sarkomers 5

2. Mechanismus der Kontraktion *8*
2.1. Aktin-Myosin-Komplex 8
2.2. Troponin-Tropomyosin-Komplex 8
2.3. Die Rolle des Kalziums 9

3. Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie des Menschen *9*
3.1. Definition und Einteilung 9
3.2. Prävalenz und Klinik 11
3.3. Genetik 12
3.3.1. Sarkomer-/Myofilament-assoziierte hypertrophe Kardiomyopathie 14
3.3.2. Z-Scheiben-assoziierte hypertrophe Kardiomyopathie 19
3.3.3. Kalziummetabolismus-assoziierte hypertrophe Kardiomyopathie 22
3.3.4. Metabolische hypertrophe Kardiomyopathie 24
3.3.5. Neuer Genlokus auf Chromosom 7 29
3.3.6. Modifizierende Gene und Umwelteinflüsse 30
3.3.7. Genotyp-Phänotyp-Korrelation 32
3.4. Pathogenese 34
3.4.1. Pathologie und Pathohistologie 35
3.4.2. Pathophysiologie 38
3.5. Diagnose 41

4. Feline familiäre hypertrophe Kardiomyopathie *44*
4.1. Definition und Klassifizierung 44
4.2. Prävalenz und Klinik 44
4.3. Genetik 46
4.3.1. Myosin-binding-protein-C-Punktmutationen bei der Maine Coon 48
4.3.2. Myosin-binding-protein-C-Punktmutation bei der Ragdoll 50
4.3.3. Polymorphismen im β-Myosinschwerketten-Gen 51
4.3.4. Polymorphismen essentiellen Myosinleichtketten-Gen 51
4.3.5. Hochpolymorphe Marker im Intron 15 des Troponin C-Gens 51
4.3.6. Analyse von Sarkomerproteinen 51
4.4. Pathogenese 52
4.4.1. Pathologie und Pathohistologie 52
4.4.2. Pathophysiologie 55
4.5. Diagnose 57
4.5.1. Klinische Untersuchung 57
4.5.2. Radiographie 58
4.5.3. Echokardiographie 58
4.5.4. Magnetic Resonance Imaging 63
4.5.5. Andere Ursachen für Myokard-Hypertrophie 64
4.5.6. Gentests 65

V. Material und Methodik 66

1. Material 66
1.1. Alters- und Geschlechtsverteilung 66
1.2. Rassen 66

2. Methoden 67
2.1. Phänotypisierung der Katzen 67
2.1.1. Anamnese und klinische Untersuchung 67
2.1.2. Blutdruckmessung 68
2.1.3. Echokardiographie 68
2.1.4. Einschlusskriterien 69
2.1.5. Ausschlusskriterien 70
2.2. Genotypisierung der Katzen 70
2.2.1. Isolierung und quantitative Bestimmung feliner DNA 70
2.2.2. Primerauswahl 71
2.2.3. Polymerasekettenreaktion 71
2.2.4. Qualitative Bestimmung der PCR-Produkte 72
2.2.5. Reinigung der PCR-Produkte 73
2.2.6. Sequenzierung 74
2.2.7. Real Time PCR mittels Primer-Probe-Assay 74
2.3 Auswirkung der A31P- und A74T-Polymorphismen auf das Protein 79
2.4. Statistische Auswertung 80
2.4.1. Prävalenzbestimmung 80
2.4.2. Allelfrequenzbestimmung 81
2.4.3. Statistische Tests 81
2.4.4. Bestimmung der klinischen Validität der Gentests 82

VI. Ergebnisse 85

1. Phänotypisierung 85
1.1. Einteilung der klinischen Phänotypen 85
1.2. Altersverteilung in den Phänotypgruppen 85
1.3. Geschlechterverteilung in den Phänotypgruppen 87
1.4. Prävalenz 88

2. Genotypisierung 89
2.1. Qualitative Überprüfung des PCR-Produkts 89
2.2. Sequenzierung 89
2.3. Genotypisierung und Allelunterscheidung mittels Taqman®-Sonde 90
2.4. Auswirkung der A31P- und A74T-Polymorphismen auf das Protein 93

3. Vergleich von Geno- und Phänotypen 94
3.1. Allelfrequenzen 94
3.3. Vergleich der Allelfrequenzen beider Phänotypgruppen 96
3.3. Gepaartes Auftreten der A31P- und A74T-Polymorphismen 97
3.4. Risiko der verschiedenen Genotypen 98
3.5. Alter der Geno- und Phänotypgruppen 99
3.6. Klinische Validität der Gentests 101

VII. Diskussion 104

1. Methodik 104

2. Limitationen dieser Studie 105

3. Klinische Relevanz der Studie und Vergleich zu Vorgängerstudien 109

4. Gentestergebnisse 114

5. Einsatz von Gentests für die A31P- und A74T-Polymorphismen 117

6. Humane versus feline hypertrophe Kardiomyopathie 119

7. Ausblick *120*

8. Zuchtempfehlungen *122*

VIII. Zusammenfassung **125**

IX. Summary **127**

X. Literaturverzeichnis **129**

XI. Lebenslauf **154**

XII. Danksagung **155**

II. Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACTC	Kardiales Aktin-Gen
ACTN2	α-Aktinin-Gen
AGT	Angiotensinogen-Gen
AGTR1	Angiotensin II-Rezeptor-Typ-1-Gen
α-MHC	α-Myosin heavy chain
AMPK	γ_2-Regulatorische Untereinheit der AMP-aktivierten Protein-kinase
AMPKK	Upstream-Kinase der AMPK
Ao	Aorta
AR	Alle untersuchten Rassen außer Maine Coon
ARMS-PCR	Amplification Refractory Mutation System-PCR
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosintriphosphat
B	Asparagin
β-MHC	β-Myosin heavy chain
bp	Basenpaare
C	Cystin
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Kalziumionen
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläres Kalzium
CBS	Cytathionin-β-Synthetase-Domänen
cDNA	Komplementäre DNA
CMA	Kardiales Chymase-Gen
CS-1	Calsarcin
CSRP3	Kardiales Muskel-LIM-Protein-Gen
CYP11B2	Aldosteronsyntetase-Gen
CW	Continious wave
D	Aspartat
DAD	Delayed after depolarisations
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DCP1	Dipeptidylcarboxypeptidase 1
Del	Deletion
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutamat
EAsum	Verschmolzene frühdiastolische E-Welle und spätdiastolische A-Welle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
EKH	Europäisch Kurzhaar
Em	Frühdiastolische Welle bei der Gewebegeschwindigkeit oder der Strain Rate am Mitralannulus
F	Phenylalanin
FAM	6–Carboxy-Fluorescein
FKBP9	FK506-bindendes Protein 9
FRET	Förster resonance energy transfer

FS	Fractional shortening, Verkürzungsfraktion
FXN	Frataxin-Gen
g	Gramm
G	Glycin
GAA	α-1,4-Glukosidase-Gen
GATA4	Cardiac-restricted zinc finger transcription factor
GLA	α-Galaktosidase A-Gen
GNAI1	α-Untereinheit des Guanin-Nucleotid-bindenden Protein G(i)
GSD2B	Glykogenspeichererkrankung 2B
H	Histidin
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
I	Isoleukin
IVSd	Enddiastolische Myokarddicke interventrikuläres Septum
JPH2	Junktophilin 2-Gen
K	Lysin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
L	Leukin
LA	Linkes Atrium
LA/Ao	Verhältnis des linken Atriums zu Aorta
LAMP2	Lysosom-assoziiertes Membranprotein 2-Gen
LDB3	LIM-domain-binding-3-Gen
LOD-Score	Logarithmus des Odds Score
LV	Linker Ventrikel
LVIDd	Enddiastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser
LVPWd	Enddiastolische Myokarddicke der linken Hinterwand
M	Methionin
µg	Mikrogramm
MGB	Minor Groove Binder
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLC	Myosin light chain; Myosinleichtkette
MLP	Muskel-LIM-Protein
mm	Millimeter
mmHg	Torr, Millimeter-Quecksilbersäule
MORN	Multiple membrane occupation and recognition nexus-Domänen
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MYBPC3	Myosin-binding-protein-C-Gen
MYH6	Myosin heavy chain 6 gene; Myosinschwerkette 6-Gen
MYH7	Myosin heavy chain 6 gene; Myosinschwerkette 6-Gen
MYL2	Myosin essential light chain gene; essentielles Myosin-leichtketten-Gen
MYL3	Myosin regulatory light chain gene; regulatorisches Myosinleichtketten-Gen
MYOZ2	Myozenin 2-Gen
Na^+	Natriumionen
NFAT3	Nuclear factor of activated T cells

NFQ	Nichtfloureszierender Quencher
nm	Nanometer
nmol/l	Nanomol/Liter
NPW	Negativer prädiktiver Wert
N-RAP	Nebulin-related-anchoring protein
NTC	No template control; Negativkontrolle
OR	Odds Ratio
P	Prolin
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PHKG1	Phosphorylase-Kinase γ1
PKC	Proteinkinase C
PLN	Phospholamban-Gen
POM121	Nuclear pore membrane protein 121
POMZP3	Nuclear pore membrane protein Ap3
PPW	Positiver prädiktiver Wert
PRKAG2	γ_2-regulatorische Untereinheit der AMP-aktivierten Protein-kinase-Gen
PSIC	Position-specific independent counts
PTAH	Phosphotungstic acid hematoxylin
PTPN11	Protein-Tyrosinphosphatase-SHP-2-Gen
PW	Pulse wave
Q	Glutamin
R	Arginin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
r-RNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
RyR2	Kardiales Ryanodinrezeptor-Gen
s	Endsystolisch
S	Serin
SAM	Systolic anterior motion
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SEC61G	γ-Untereinheit des Protein-Transportprotein SEC61
SERCA2a	SR-Ca^{2+}-ATPase
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNSA	Sympathikusaktivität
SPSS	Statistical Package for the Social Science
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STR	Short tandem repeat-Marker
T	Threonin
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBL2	Transducin (β)-like 2 isoform 1
TCAP	Telethonin-Gen
Tcap	Telethonin
TDI	Tissue Doppler Imaging
Tm	Schmelztemperatur
TMPIT	Tumornekrosefaktor-α induziertes Transmembranprotein

TNNC1	Kardiales Troponin C-Gen
TNNI3	Kardiales Troponin I-Gen
TNNT2	Kardiales Troponin T-Gen
TPM1	α-Tropomyosin
t-RNA	Transfer-RNA
TTN	Titin-Gen
TVI	Tissue Velocity Imaging
UCM	Unklassifizierte Kardiomyopathie
V	Valin
VCL	Vinculin/Metavinculin-Gen
W	Tryptophan
WBSCR18	„Williams Beuren Syndrome“-Chromosomenregion 18
WHO	World Health Organisation
Y	Tyrosin
Z	Glutamin
ZASP	Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein, = LIM-domain-binding-3-Protein

III. Einleitung

Die humane familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) gilt als häufigste genetisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankung des Menschen und wird bei den meisten Patienten autosomal dominant vererbt. Bei zwei Dritteln der Patienten sind HCM oder plötzlicher Herztod innerhalb der Familie bekannt; bei sporadischen Fällen werden „de-novo"-Mutationen vermutet (NANNI *et al.*, 2003; OLSON *et al.*, 2000). Die feline HCM stellt die häufigste Herzerkrankung der Katze dar. Bei einer Maine-Coon-Kolonie konnte ein autosomal dominantes Vererbungsmuster für die feline familiäre HCM nachgewiesen werden (KITTLESON *et al.*, 1999; MEURS *et al.*, 2005; NAKAGAWA *et al.*, 2002). Sie ist durch konzentrische Hypertrophie des Herzmuskels und histopathologisch durch gestörte Muskelfaseranordnung und Fibrose im Herzmuskelgewebe gekennzeichnet (KITTLESON *et al.*, 1999). Aufgrund der diastolischen Dysfunktion ist ein kongestives Linksherzversagen die Folge; plötzlicher Herztod kann ebenfalls bei Katzen mit feliner HCM auftreten. Die endgültige Diagnose einer HCM erfolgt bisher mittels Echokardiographie, nicht selten erst dann, wenn viele der Katzen schon jahrelang in der Zucht eingesetzt wurden (KITTLESON, 2005). Da für die humane familiäre HCM bereits über 400 Mutationen in 24 Genen verantwortlich gemacht werden (BOS *et al.*, 2007; MARON *et al.*, 2006), wurde auch bei der Katze nach genetischen Ursachen gesucht. Bei einer Maine-Coon-Kolonie mit familiärer HCM konnte ein autosomal dominanter Erbgang mit variabler Penetranz nachgewiesen werden. Diese dient als Tiermodell der humanen Erkrankungsform (KITTLESON *et al.*, 1999). Bei Maine-Coon-Katzen wurden bisher zwei Punktmutationen und bei der Ragdollkatze eine Punktmutation in einem kardialen Sarkomergen (Myosin binding protein C) für die HCM verantwortlich gemacht (MEURS *et al.*, 2007; MEURS *et al.*, 2005; NYBERG *et al.*, 2007). Inzwischen wurden von kommerziellen Laboratorien Gentests für Maine-Coon-Katzen und Ragdoll-Katzen entwickelt. Genaue Daten über die Prävalenz der HCM bei Maine-Coon-Katzen in Deutschland und die klinische Korrelation sowie die Validität dieser Gentests bezüglich ihrer Anwendung in der Gesamtpopulation sind nicht bekannt. Sowohl für Züchter als auch Tierärzte ist derzeit unklar, wie mit positiven Ergebnissen im Gentest bei herzgesunden Katzen umgegangen werden soll.

IV. Literaturübersicht

1. Aufbau des Herzmuskels

Im Folgenden wird zunächst der Aufbau des Myokards beschrieben, anschließend wird auf die Ultrastruktur des Sarkomers, das sarkomerische Zytoskelett und das extrasarkomerische Zytoskelett eingegangen.

1.1. Struktur der kardialen Muskelfasern

Kardiale Muskelfasern bilden einen Komplex aus in Serien angeordneten zellulären Einheiten (Myozyten) und Bindegewebe. Das Myokard besteht aus quergestreiften Muskelfasern wie die Skelettmuskulatur, die sich nicht parallel anordnen, sondern ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Die Herzmuskelzellen enthalten jedoch mittelständige Zellkerne, wie sie bei der glatten Muskulatur zu finden sind. Die einzelnen Myozyten werden über so genannte Glanzstreifen (Disci intercalati) verbunden, welche sich aus Gap Junctions (Konnexine) zur Reizübertragung, aus Desmosomen (bestehend aus Desmin, Desmoplakin, Desmocollin und Desmoglein) zur Stabilisierung des Zellverbandes und aus Adhärenzkontakten (N-Cadherin, Katenin und Vinculin) zusammensetzen.
Innerhalb der kardialen Myozyten befinden sich Myofibrillen, welche sich aus longitudinal angeordneten Sarkomeren zusammensetzen und die kontraktilen Elemente darstellen. Diese werden von einer dünnen Membran, dem Sarkolemm (Zellmembran) umhüllt und bilden ein Synzytium. Die Myofibrillen werden teilweise durch Abspaltungen von Zytoplasma, welche Mitochondrien und membranöse T-Tubuli enthalten, voneinander separiert. Das Sarkomer bildet die kontraktile Einheit des Muskels und besteht aus einem schweren und einem leichten Filament. Die beiden Filamente werden durch die so genannte Z-Scheibe, aus Z-Filamenten bestehend, vom nächsten Sarkomer abgetrennt. Die dünnen Filamente (Aktin) ziehen von den Z-Banden zum Zentrum des Sarkomers, während sich die dicken Filamente (Myosin) im Zentrum des Sarkomers (M-Banden) längs der dünnen Filamente befinden. Durch die Überlappung der Filamente werden so genannte A-Banden sichtbar, welche typisch für quergestreifte Muskulatur sind und dunkler erscheinen, während die hellere I-Bande nur durch die dünnen Filamente gebildet wird (Abbildung 1). Die A-Bande im Zentrum des Sarkomers, welche ebenfalls heller erscheint, wird

durch die alleinige Präsenz der dicken Filamente geprägt (FATKIN & GRAHAM, 2002).

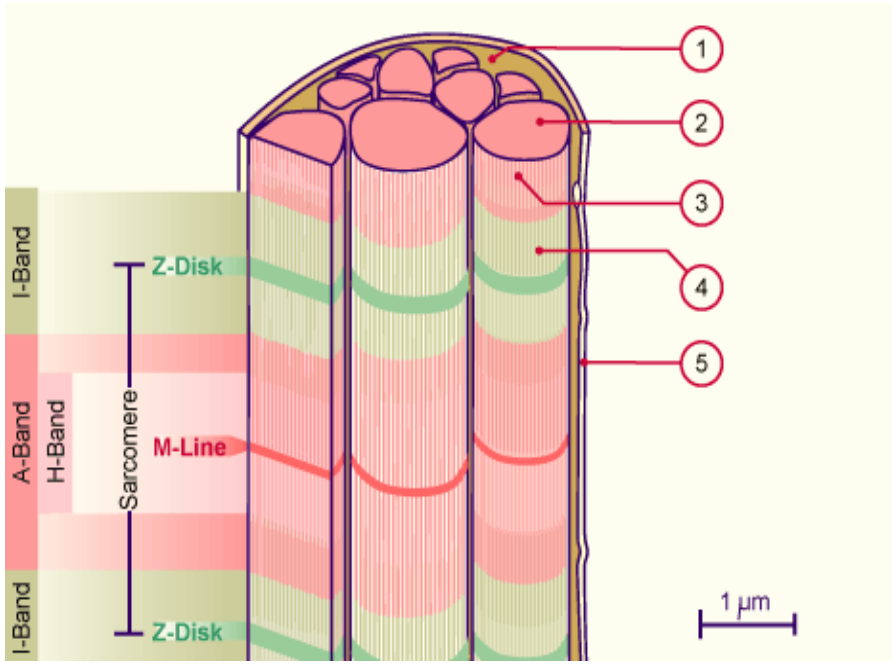


Abbildung 1: Aufbau der Myofibrille mit (1) Sarkoplasma, (2) Myofibrille, (3) Myosinabschnitt, (4) Aktinabschnitt, (5) Sarkolemm (SCHWALLER, 2005).

1.2. Ultrastruktur des Sarkomers und des intrasarkomerischen Zytoskeletts

Das Sarkomer ist die strukturelle und funktionelle Einheit des Herzmuskels und besteht wie oben beschrieben aus interdigitierenden dicken und dünnen Filamenten. Das dicke Filament besteht auf Proteinebene hauptsächlich aus Myosin. Dieses setzt sich aus zwei schweren Ketten, α- und β-Myosin heavy chain (α-MHC und β-MHC), und zwei leichten Ketten, ventrikuläre essentielle und regulatorische Myosinleichtkette, zusammen. Die Myosin binding proteins C, H und X sind ebenfalls Bestandteil des dicken Filaments und bilden Querbrücken zum dünnen Filament. Das dünne Filament wird aus dem kardialen Aktin, α-Tropomyosin, den Troponinen C, I und T gebildet (Abbildung 2) (REDWOOD *et al.*, 1999).

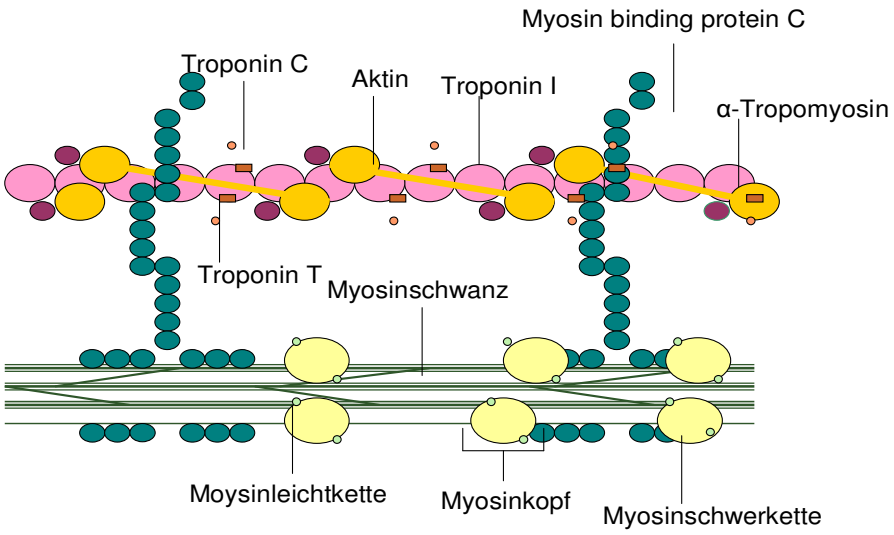


Abbildung 2: Ultrastruktur des Sarkomers; eigene Zeichnung, modifiziert nach REDWOOD und Mitarbeitern (1999).

Das Zytoskelett innerhalb des Sarkomers wird durch die Proteine Titin und Myomesin gebildet, welche als Gerüst für die dicken und dünnen Filamente fungieren. Titin ist mit 3 kDa das größte bekannte Polypeptid, welches sich von der Z- zur M-Bande erstreckt. Myomesin 1 und 2 sind titinassoziierte Proteine. Die Z-Scheibe wird durch ein Netzwerk von interdigitierenden Proteinen geformt, welche die Myofilamentstruktur stabilisieren. Letzteres wird durch die Verbindung antiparallel angeordneter Titin-Proteine mit den dünnen Filamenten gewährleistet. Durch die Z-Scheibe wird die mechanische Kopplung der Sarkomerkontraktion und der Sarkomerdehnung gewährleistet. Der Titin/Tcap/ Muskel-LIM-Protein-Komplex dient hierbei als mechanischer Dehnungssensor. Telethonin (Tcap) interagiert mit Calsarcin-1 (CS-1), welches Kalzineurin mit der Z-Scheibe verbindet (FATKIN & GRAHAM, 2002; HAYASHI *et al.*, 2004). Die einzelnen Proteinbestandteile der Z-Scheibe und deren gemeinsame Interaktion werden in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

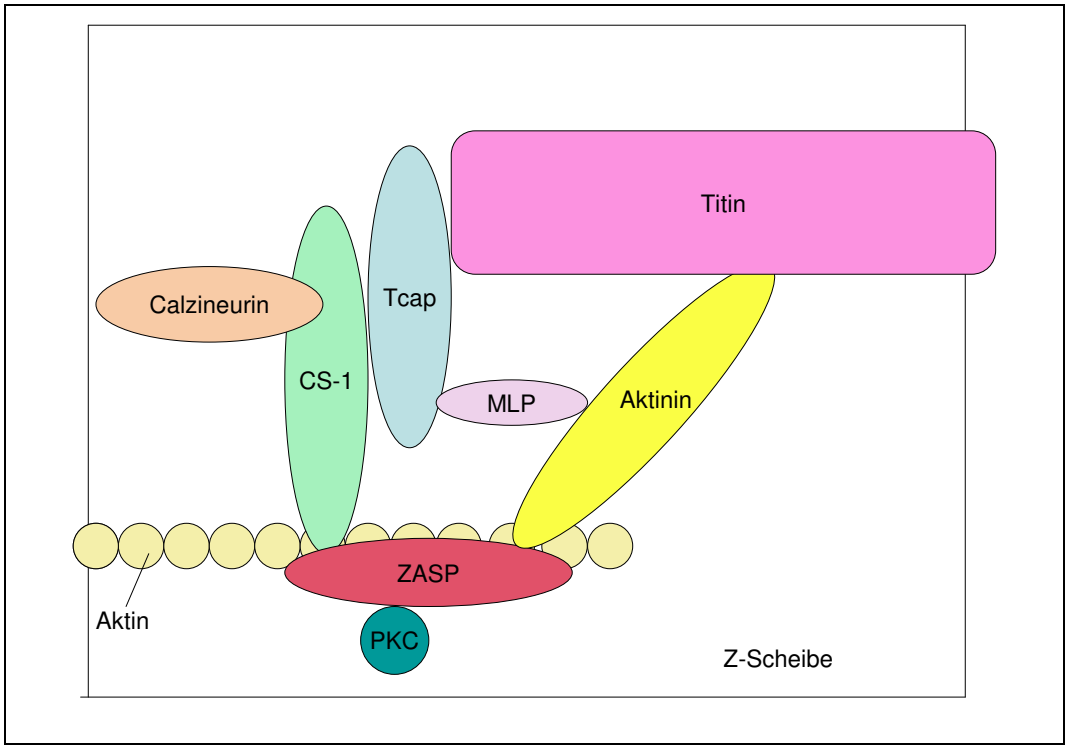


Abbildung 3: Schematische Darstellung der gemeinsamen Interaktion der Z-Scheiben assoziierten Proteine (Tcap = Telethonin, CS-1 = Calsarcin-1; MLP = Muskel-LIM-Protein; PKC = Proteinkinase C; ZASP = Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein, = LIM domain binding 3-Protein); eigene Zeichnung, modifiziert nach HAYASHI und Mitarbeitern (2004).

1.3. Zytoskelett außerhalb des Sarkomers

Das Zytoskelett außerhalb des Sarkomers stellt ein komplexes Netzwerk dar, welches das Sarkomer mit dem Sarkolemm und der extrazellulären Matrix verbindet. Somit wird einerseits Struktur gewährleistet und andererseits können dadurch chemische und mechanische Signale innerhalb und zwischen den Zellen transferiert werden. Das Zytoskelett außerhalb des Sarkomers besteht aus intermyofibrillären und subsarkolemmalen Komponenten. Die intermyofibrillären Filamente bestehen wiederum aus intermediären Filamenten, Mikrofilamenten und Mikrotubuli. Intermediäre Desminfilamente formen ein dreidimensionales Gitter innerhalb des extrasarkomerischen Zytoskeletts. Desminfilamente umgeben die Z-Scheiben und bilden longitudinale Verbindungen zu den benachbarten Z-Scheiben sowie laterale Verbindungen zu den subsarkolemmalen Costameren. Zusätzlich formen Mikrofilamente, die aus nichtsarkomerischem Aktin bestehen (hauptsächlich γ-Aktin) ein komplexes Netzwerk, welches das Sarkomer mit verschiedenen Komponenten der Costamere verbindet. Durch die Veränderung der Summe und der Form von Tubulin, welches in einer polymerisierten Form und einer nicht polymerisierten

Form existiert, wird die zytoskelettale Steifheit und folglich die kontraktile Funktion beeinflusst. Costamere sind subsarkolemmale Einheiten, welche gitterartig die Z-Linien flankieren und entlang der zytoplasmatischen Seite des Sarkolemms über den I-Banden liegen. Hierbei dienen sie als Verbindung zwischen verschiedenen zytoskelettalen Netzwerken sowie dem Sarkomer einerseits und dem Sarkolemm andererseits. Somit gewährleisten sie zudem eine Stabilisierungsfunktion sowie eine Kraftübertragungsfunktion. Die Costamere beinhalten drei prinzipielle Komponenten, bestehend aus dem fokalen Adhäsionstypkomplex, dem Spektrin gestützten Komplex und dem Dystrophin/Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplex. Der fokale Adhäsionstypkomplex besteht aus diversen zytoplasmatischen Proteinen wie Vinculin, Talin, Tensin, Paxillin und Zyxin, die sich mit zytoskelettalen Aktinfilamenten und mit den Transmembranproteinen α- und β-Integrin verbinden. Die extrazellulären Domänen der Integrine interagieren wiederum mit Kollagenen, Laminin und Fibronektin in der extrazellulären Matrix. Der Spektrin gestützte Komplex enthält Ankyrin, welches Aktin mit Spektrin verbindet, und Spektrin, welches mit Ankyrin, Aktin und Desmin interagiert. Der Dystrophin/Dystrophin-assoziierte Glykoproteinkomplex besteht aus dem zytoskelettalen Protein Dystrophin, welches an die Aktinfilamente und an den Dystrophin/Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplex (α- und β-Dystroglykane; α-, β-, γ- und δ-Sarkoglykane, Dystrobrevin und Syntrophin) bindet. Der Dystrophin/Dystrophin-assoziierte Glykoproteinkomplex besitzt zytoplasmatische, transmembranöse und extrazelluläre Komponenten. Die zytoplasmatische Komponente bindet an den terminalen COOH-Komplex (COOH = Carboxylgruppe) des Dystrophins. Die extrazelluläre Domäne bindet das Laminin. Außerdem liegen verschiedene aktinassoziierte Proteine (α-Aktinin und Muskel-LIM-Protein MLP) an den Bindungsstellen zwischen den zytoskelettalen Aktinfilamenten und den Kostamerkomplexen. Eine schematische Darstellung der kardialen Muskelzelle ist in Abbildung 4 ersichtlich (FATKIN & GRAHAM, 2002).

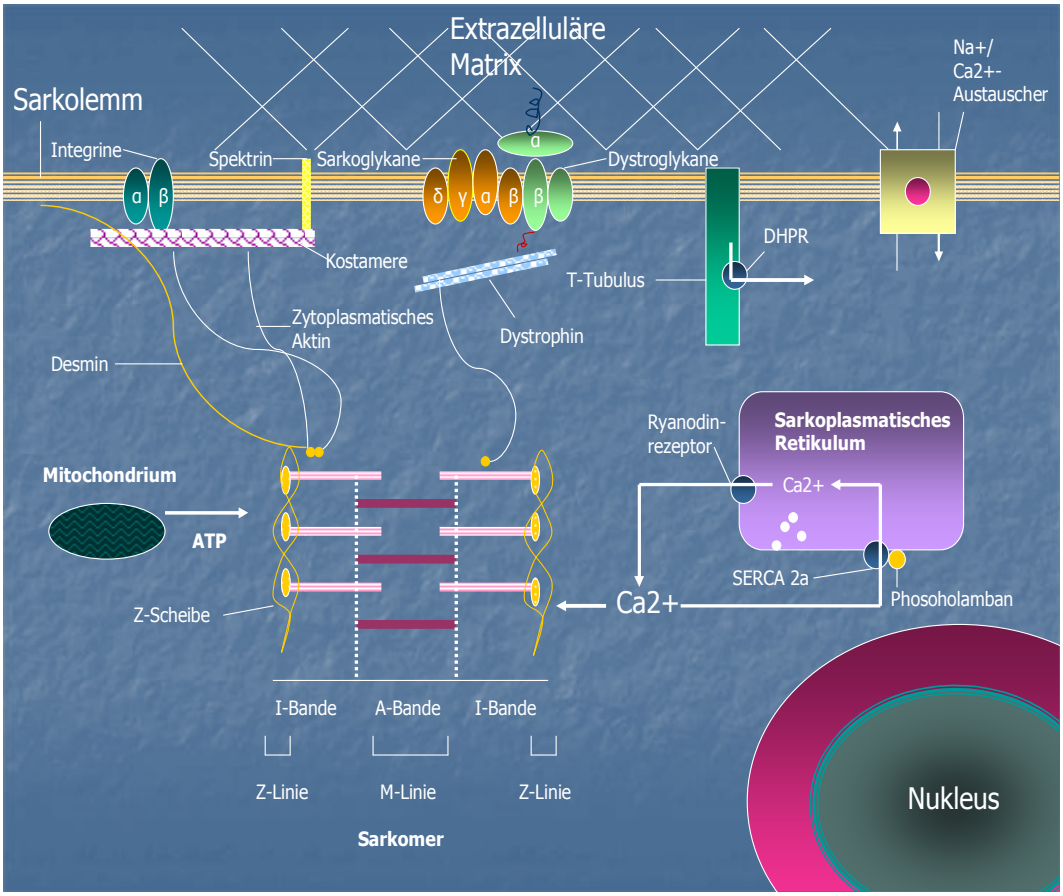


Abbildung 4: Schematische Darstellung der kardialen Myozytenstruktur; eigene Zeichnung, modifiziert nach FATKIN und GRAHAM (2002): Das Sarkomer bildet sich aus interdigitierenden dicken und dünnen Myosinfilamenten und stellt die strukturelle und funktionale Einheit des Herzmuskels dar. Die Sarkomere werden durch ein komplexes Netzwerk aus zytoskelettalen Proteinen mit dem Sarkolemm, der extrazellulären Matrix und dem Nukleus verbunden. Das intermyofibrilläre Zytoskelett wird aus intermediären Desminfilamenten, Aktin enthaltenden Mikrofilamenten und Mikrotubuli gebildet. Das subsarkolemmale Zytoskelett bildet sich aus Costameren, welche auf unterschiedliche Weise die sarkolemmalen Transmembranproteine mit den Sarkomeren verbinden. Die Muskelkontraktion ist ein Energie verbrauchender Prozess, wobei ATP aus den Mitochondrien verbraucht wird. Die intrazelluläre freie Kalziumkonzentration reguliert die Muskelkontraktion und -relaxation. Die Muskelkontraktion wird durch einen Anstieg des intrazellulären freien Kalziumspiegels initiiert. Letzteres resultiert aus einem depolarisationsabhängigen Influx einer kleinen Menge an Kalziumionen via spannungsabhängige Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) in die T-Tubuli, welche die Ausschüttung einer großen Menge an Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) auslösen. Dieser Prozess wird kalziumabhängige Kalziumausschüttung genannt. Die Muskelrelaxation wird durch die Aufnahme von zytosolischen Kalziumionen in das SR über die energieabhängige Pumpe SERCA2a und durch die Extrusion von Kalziumionen über die Na+/Ca2+-Pumpe initiiert.

2. Mechanismus der Kontraktion

Die hauptsächlich an der Kontraktion beteiligten Komplexe bestehen aus dem Aktin-Myosinkomplex und dem Troponin-Tropomyosin-Komplex. Deren Funktionen werden nachfolgend beschrieben.

2.1. Aktin-Myosin-Komplex

Die universell akzeptierte Theorie über den Prozess der Muskelkontraktion wurde 1957 von HUXLEY aufgestellt. Er propagiert in diesem Modell des „sliding filament“, dass die Kraftentwicklung aus der gleitenden Bewegung des dicken Filaments hin zum dünnen Filament und der gleichzeitigen Bildung von Myosinquerbrücken zum Aktin resultiert. Diese Querbrücken bestehen aus Molekülen der schweren Myosinkette (MHC), die vom dicken Filament entspringen. Jede MHC besteht aus einem Kopf mit einer Aktinbindungsstelle und einer ATPase-Bindungsstelle sowie einem Schwanz. Der so genannte Myosinschwanz ist ein elastisches Element, das an die leichten Myosinketten (MLC) bindet (FATKIN & GRAHAM, 2002; HUXLEY, 1957).

2.2. Troponin-Tropomyosin-Komplex

Der Troponin-Tropomyosin-Komplex ist eine kalziumsensitive Einheit, welche die Aktin-Myosin-Interaktion reguliert. Die Hauptstütze des dünnen Filaments wird durch die doppelhelikale Anordnung der globulären Aktinmoleküle gewährleistet. Die Tropomyosinmoleküle liegen inmitten der Aktinfilamente. Der Troponinkomplex (Troponin I, T, C) wird vor allem über Troponin T an das Tropomyosin gebunden. Während der Diastole wird die Aktin-Myosin-Interaktion durch die Bindung des Troponin I zum Aktin-Tropomyosin-Komplex unterbunden. Die Bindung von Kalziumionen (Ca^{2+}) an Troponin C induziert eine Konformationsänderung, die die Interaktion des Troponin I zum Aktin-Tropomyosin-Komplex schwächt und gleichzeitig die Interaktion zwischen Troponin I und Troponin C verstärkt. Letztere löst den inhibierten Status des dünnen Filaments auf und fördert wiederum die Aktin-Myosin-Interaktion und die Kraftentfaltung. Eine Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration führt zu einer Dissoziation des Ca^{2+} vom Troponin C (FATKIN & GRAHAM, 2002).

2.3. Die Rolle des Kalziums

Während des Aktionspotentials steigt die Konzentration des intrazellulären Kalziums $[Ca^{2+}]_i$ durch direktem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle über spannungsabhängige L-Type-Kanäle und zu einem geringeren Teil über Na^+/Ca^{2+}-Kanäle. Dieser Einstrom von Ca^{2+} löst wiederum eine Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über Ryanodin- und Inositol-1, 4, 5-Triphosphat-Rezeptoren aus. Eine Steigerung des $[Ca^{2+}]_i$-Spiegels fördert die Ca^{2+}-Bindung an zahlreiche zytosolische Puffer und an das Troponin C. Während der Relaxation wird Ca^{2+} durch die SR-Ca^{2+}-ATPase (SERCA2a), durch sarkolemmale Na^+/Ca^{2+}-Austauscher, die sarkolemmale Ca^{2+}-ATPase und mitochondriale Ca^{2+}-Uniporter wieder aus dem Zytosol entfernt (FATKIN & GRAHAM, 2002). Abbildung 4 illustriert diesen Mechanismus.

3. Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie des Menschen

3.1. Definition und Einteilung

Die erste klinische Beschreibung der HCM geht auf das Jahr 1869 zurück (HALLOPEAU, 1869). Der Begriff Kardiomyopathie wurde in der Humanmedizin zum ersten Mal im Jahr 1957 für seltene, nicht koronare Erkrankungen des Myokards verwendet (BRIGDEN, 1957). In den 70er und 80er Jahren wurden die Kardiomyopathien durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der International Society and Federation of Cardiology Task Force (ISFC) noch als primäre Herzerkrankungen unbekannter Ursache definiert und in dilatative, hypertrophe und restriktive Formen untergliedert (GOODWIN & OAKLEY, 1972; WHO/ISFC, 1980). Im Jahr 1995 wurden die Kardiomyopathien von der WHO/ISFC neu definiert und eingeteilt. Ab diesem Zeitpunkt bezeichnete man als Kardiomyopathie alle Herzmuskelerkrankungen, welche eine Beeinträchtigung der kardialen Funktion zeigen. Nun wurden in Anlehnung an hämodynamische Kriterien folgende fünf Formen der primären Kardiomyopathien unterschieden: 1. dilatative (DCM), 2. hypertrophe (HCM), 3. restriktive (RCM), 4. arrhythmogene rechtsventrikuläre (ARVC) und 5. unklassifizierte Kardiomyopathie (UCM). Dadurch konnten nun auch primäre Kardiomyopathien von sekundären Formen wie ischämische Kardiomyopathie, hypertensive Kardiomyopathie, valvuläre Kardiomyopathie, entzündliche Kardiomyopathie und metabolische Kardiomyopathie, die oft im Zusammenhang

mit multiorganischen Geschehen assoziiert sind, abgegrenzt werden. Die sekundären Kardiomyopathien wurden mitunter als spezifische Kardiomyopathien oder spezifische Herzmuskelerkrankungen bezeichnet. Zudem sollten die primären Kardiomyopathien ab diesem Zeitpunkt auch von allgemeinen systemischen Erkrankungen, muskulären Dystrophien, neuromuskulären Funktionsstörungen, sensiblen und toxischen Reaktionen sowie von der peripartalen Kardiomyopathie abgegrenzt werden (FATKIN & GRAHAM, 2002; MAISCH, 1998; NAKATA & KOGA, 2000; RICHARDSON *et al.*, 1996). In den späten 50er Jahren wurde zum ersten Mal eine genetische Ursache der HCM vermutet. Auf dieser Vermutung basierend, wurde auf genetischer Ebene eingehend geforscht. So konnten in den letzten zwei Dekaden über 400 Mutationen in 24 Genen, die für unterschiedliche Formen der HCM verantwortlich sind, entdeckt werden (BOS *et al.*, 2007; FATKIN & GRAHAM, 2002; MARON *et al.*, 2006). Aufgrund der bestehenden Komplexität wurden die Kardiomyopathien im Jahr 2006 ihrem kausalen Ursprung nach in genetische, gemischte und erworbene Kardiomyopathien eingeteilt (Abbildung 5). Der Begriff „spezifische Kardiomyopathie“ oder „spezifische Herzmuskel-erkrankung“ sollte nun nicht mehr gebraucht werden (HO & SEIDMAN, 2006; MARON *et al.*, 2006).

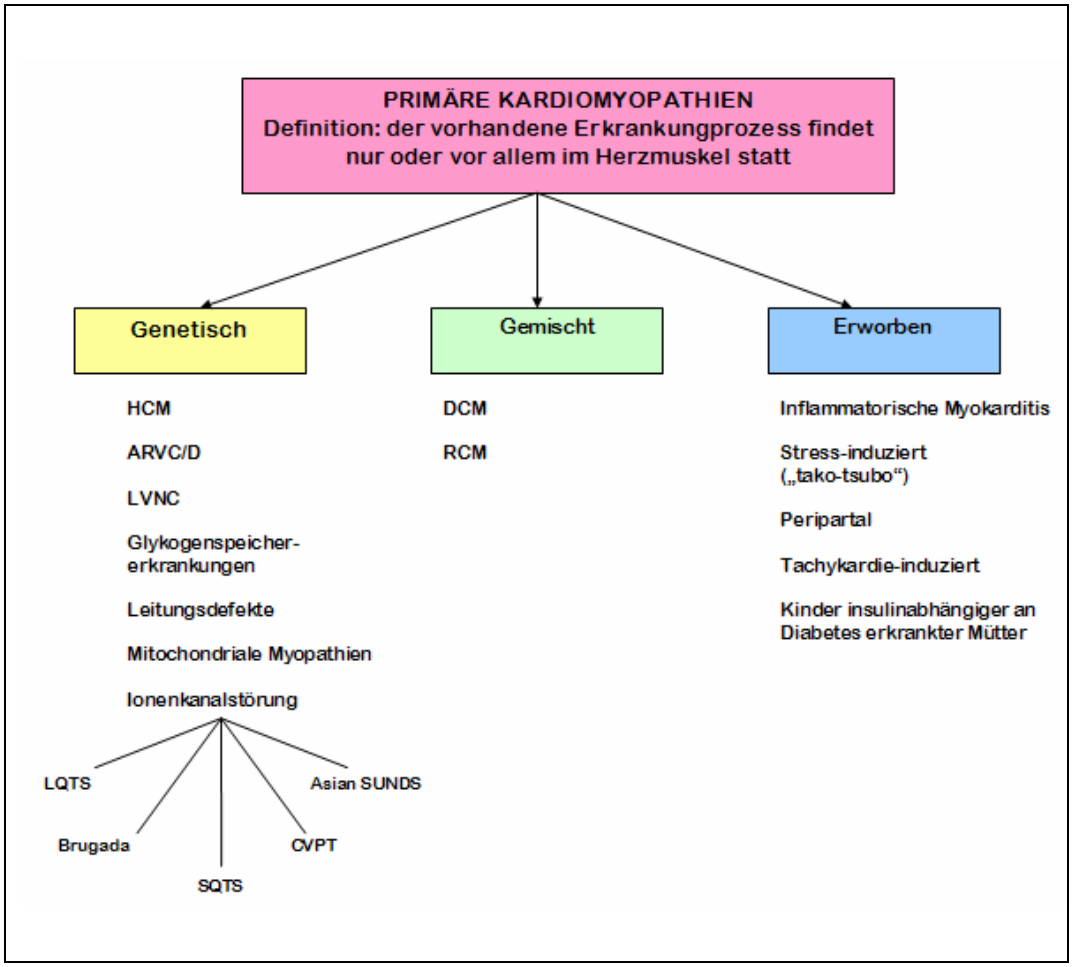


Abbildung 5: Klassifizierung der Kardiomyopathien, Darstellung modifiziert nach MARON und Mitarbeitern, (2006). Abkürzungen: HCM = hypertrophe Kardiomyopathie; ARVC/D = arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie; LVNC = left ventricular non compaction; LQTS = long QT-syndrome; SQTS = short QT-syndrome; CPVT = catecholaminergic polymorphic ventricular tachykardia; Asian SUNDS = unexplained nocturnal death syndrome, eine Erkrankung die in Südasien vorkommt und dem Brugada-Syndrom genetisch, phänotypisch und funktionell entspricht; DCM = dilatative Kardiomyopathie; RCM = restriktive Kardiomyopathie .

3.2. Prävalenz und Klinik

In der Humanmedizin wird die HCM als häufigste genetische Herzerkrankung mit einer Prävalenz von 1/500 angesehen und stellt gleichzeitig die häufigste Ursache für den plötzlichen Herztod bei jungen Menschen und Athleten dar (BOS *et al.*, 2007; MARON, 2002). Die Erkrankung ist durch generalisierte oder asymmetrische Hypertrophie der Kammerwände des linken Ventrikels (LV), mit oder ohne Beteiligung des rechten Ventrikels, und histologisch durch eine gestörte myofibrilläre Faseranordnung sowie interstitielle Fibrose charakterisiert. Dabei kommt es bei einigen der Patienten zu einer reduzierten diastolischen Dysfunktion mit oder ohne linksventrikulärer Ausflusstraktsobstruktion durch

Kontakt des septalen Mitralklappensegels mit dem Septum („systolic anterior motion“ = SAM des septalen Mitralklappensegels). Eine obstruktive Form der HCM mit endsystolischer Kammerobliteration ist bei weniger als 25% der HCM-Patienten vorhanden. Einige der Betroffenen bleiben lebenslang asymptomatisch, andere entwickeln kongestives Herzversagen, Vorhofflimmern oder versterben plötzlich, ohne jemals vorher klinische Symptome entwickelt zu haben (ANAN *et al.*, 2000; ARAD *et al.*, 2002b; BOS *et al.*, 2007; JURYNEC, 2007; MARON, 2002; MARON *et al.*, 1995). Im Falle offensichtlicher Symptome, werden diese in Form von Palpitationen, Synkopen, Angina pectoris oder Dyspnoe beschrieben. Die Synkopen oder der plötzliche Herztod kommen durch Brady- (Reizleitungsanomalien des Sinus- und AV-Knotens) und Tachyarrhythmien (oft Reentrytachykardien) zustande. Im Endstadium der HCM kommt es häufig vor, dass sich die Wanddicke des LV aufgrund von Myozytenuntergang und Fibrose wieder reduziert („Burned out“-HCM). Zehn bis 20 % der Patienten entwickeln diese Form der dilatativen Kardiomyopathie, die zudem durch eine starke systolische Dysfunktion gekennzeichnet ist. Zehn bis 16 % der betroffenen Patienten entwickeln Vorhofflimmern, wobei das Risiko hierfür bei Patienten mit vergrößertem Vorhof erhöht ist (FATKIN & GRAHAM, 2002).

3.3. Genetik

Die humane familiäre HCM ist eine zumeist autosomal dominant vererbte Herzmuskelerkrankung mit einer starken phäno- und genotypischen Heterogenität. Selten werden auch rezessive Vererbungsformen beschrieben. Bei zwei Drittel der Patienten ist eine Familienanamnese nachvollziehbar, während beim Rest „de novo“-Mutationen vermutet werden (NANNI *et al.*, 2003). Als Ursache der humanen familiären HCM werden größtenteils Mutationen in Genen, die Proteine des Sarkomers kodieren, angesehen. Diese Form wird kausal als Sarkomer- oder Myofilament-HCM bezeichnet. In aktuellen Studien wird diese Form der HCM von der Z-Scheiben-HCM, der metabolischen und der Kalziummetabolismus-assoziierten HCM abgegrenzt. Zur Z-Scheiben-HCM führen Mutationen in Genen, die Proteine der Z-Scheibe kodieren. Als metabolische HCM werden nun Herzerkrankungen bezeichnet, die durch die Hypertrophie der Kammerwände morphologisch von einer HCM im Ultraschall nicht zu unterscheiden sind. Eine solche Form der HCM kann z. B. durch die Glykogenspeicherkrankheit hervorgerufen werden (BOS *et al.*, 2007).

Zumeist sind es Punktmutationen, seltener auch Deletions- und Insertionsmutationen, die bisher als Ursache verschiedener Formen der HCM nachgewiesen wurden. Beim Menschen konnten bisher über 400 Mutationen in 24 Genen mit der HCM in Verbindung gebracht werden (BOS *et al.*, 2007; MAISCH, 1998; MARON *et al.*, 2006; RICHARDSON *et al.*, 1996; WHO/ISFC, 1980). 1990 gelang die Identifikation der ersten beiden kausalen Mutationen im β-MHC-Gen (GEISTERFER-LOWRANCE *et al.*, 1990). Nachdem weitere Mutationen in anderen Sarkomergenen (im α-Tropomyosin-Gen und im kardialen Troponin T-Gen) entdeckt wurden, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der familiären HCM des Menschen um eine Erkrankung des Sarkomers handelt (THIERFELDER *et al.*, 1994; WATKINS *et al.*, 1995b). Diese Hypothese wurde später durch die Identifizierung weiterer Punktmutationen in Genen, die die folgenden Sarkomerproteine kodieren gefestigt. Darunter fielen das kardiale Myosin binding protein C (WATKINS *et al.*, 1995a), die ventrikuläre essentielle und regulatorische Myosinleichtkette (POETTER *et al.*, 1996), das kardiale Troponin I (KIMURA *et al.*, 1997) und das kardiale α-Aktin (MOGENSEN *et al.*, 1999). Schließlich konnten aber auch im neuen Jahrtausend kausale Mutationen außerhalb des Sarkomers detektiert werden, auf die später eingegangen wird (BOS *et al.*, 2007).

Die Mechanismen, die zur Ausbildung einer Hypertrophie führen, sind noch nicht komplett erforscht. In Genotyp-Phänotypstudien konnte ein Zusammenhang der variablen Penetranz mit unterschiedlichen Mutationen hergestellt werden. So verursachen zum Beispiel Mutationen im β-MHC-Gen schwerwiegendere Formen der HCM als zum Beispiel Mutationen im kardialen Myosin-binding-Protein-C-Gen oder im Troponin T-Gen (MOOLMAN *et al.*, 1997; NIIMURA *et al.*, 1998; WATKINS *et al.*, 1995b). Aufgrund der massiven Anzahl bereits bekannter kausaler Mutationen, haben BOS und Mitarbeiter (2007b) ein neues Schema zur Einteilung der HCM erstellt. In ihren Studien konnten sie nachweisen, dass verschiedene anatomische Varianten der HCM mit bestimmten Mutationen korrelieren. So vermuten sie in Verbindung mit der so genannten „Reverse septal curve“-HCM Mutationen in Sarkomergenen und in Verbindung mit der so genannten sigmoidalen HCM eher Mutationen in Z-Scheiben-Genen (siehe Abbildung 6).

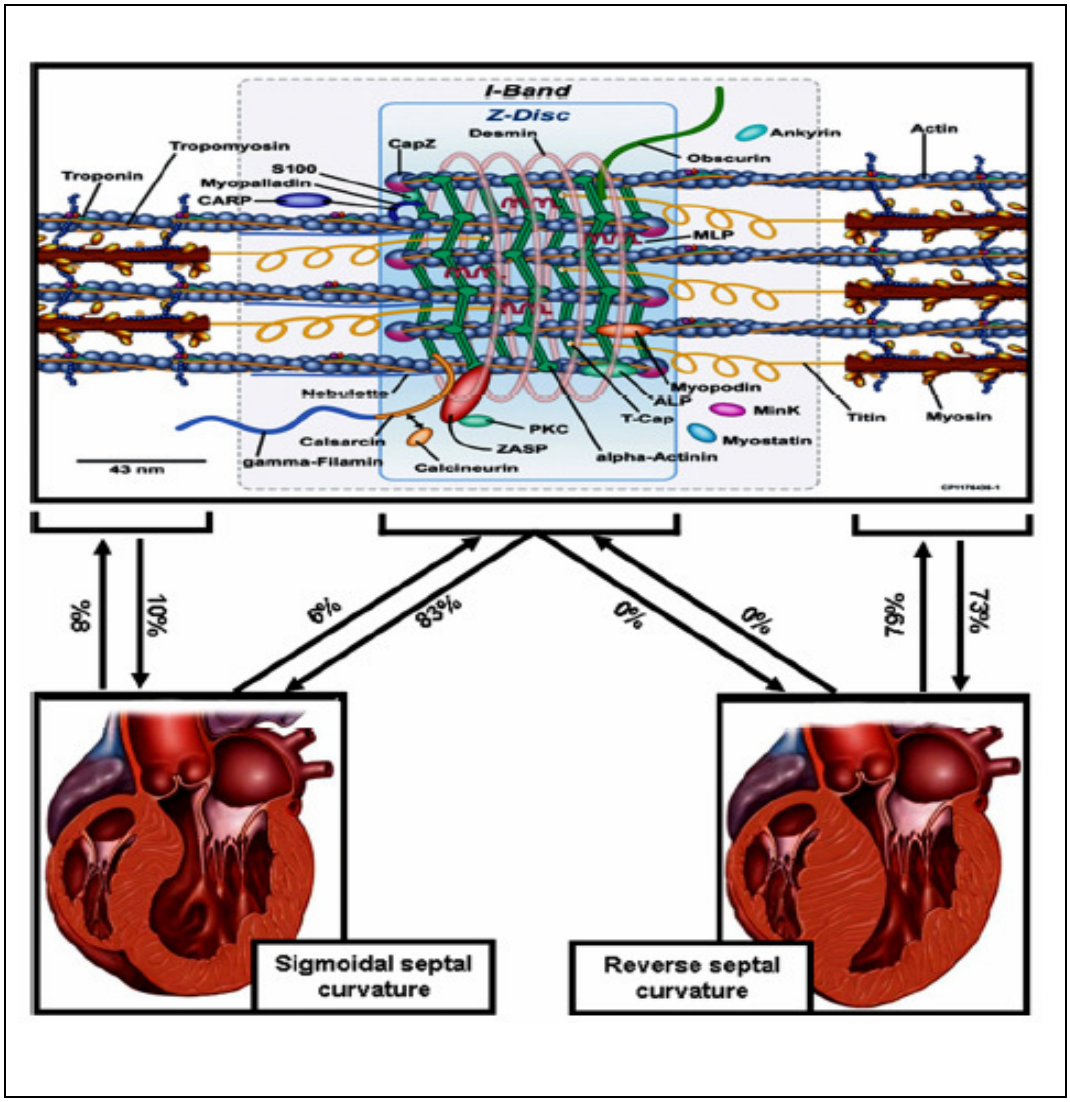


Abbildung 6: Darstellung der sigmoidalen HCM und der „Reverse septal curve"-HCM aufgrund ihres genetischen Ursprungs in Sarkomergenen oder Z-Scheiben-Genen (BOS *et al.*, 2007).

3.3.1. Sarkomer-/Myofilament-assoziierte hypertrophe Kardiomyopathie

Kausale Mutationen der im Folgenden beschriebenen Gene werden mit der Sarkomer/Myofilament-HCM assoziiert. Jedes Kandidatengen soll nachfolgend kurz charakterisiert werden.

3.3.1.1. β-Myosin-heavy-chain-Gen

Das Muskelprotein Myosin besteht aus zwei schweren (MHC) und zwei leichten Ketten (MLC). Die kardialen MHCs kommen in zwei Isoformen vor: als β-MHC und α-MHC. Beim Menschen wird die β-MHC im embryonalen Herz und im adulten Atrium exprimiert und bildet die vorherrschende Isoform im adulten Ventrikel. Die die schweren Ketten kodierenden Gene MYH7 (β-Myosin-heavy-chain-Gen, kodiert β-MHC) und MYH6 (kodiert α-MHC) liegen hintereinander

auf Chromosom 14. MYH7 besteht aus 41 Exons. 38 davon kodieren das Protein mit 1935 Aminosäuren (FATKIN & GRAHAM, 2002). Bis heute konnten weit über 100 Mutationen, meistens in Form von Punktmutationen, mit der HCM in Verbindung gebracht werden. Somit ist das MYH7 bei 30-35 % der genetisch identifizierten HCM-Fälle das am häufigsten von Mutationen betroffene Gen (GEISTERFER-LOWRANCE *et al.*, 1990; MARON *et al.*, 1979). Dreidimensionale Untersuchungen des β-MHC-Moleküls haben ergeben, dass die Mutationen sich vorwiegend in kodierenden Domänen des MHC-Kopfes befinden und nur wenige im Bereich des MHC-Schwanzes. Die funktionalen Konsequenzen dafür sind noch nicht beschrieben (RAYMENT *et al.*, 1995). Allerdings entwickeln Patienten mit einer β-MHC-Mutation frühzeitigere (in den ersten zwei Lebensdekaden) und schwerwiegendere Formen der HCM als z. B. bei einer MYBPC3- oder TNNT3-Mutation (MOOLMAN *et al.*, 1997; NIIMURA *et al.*, 1998; WATKINS *et al.*, 1995b).

3.3.1.2. Kardiales Myosin-binding-protein-C-Gen

Vom Myosin binding protein C (MYBPC) existieren drei Isoformen. Zwei Isoformen befinden sich im Skelettmuskel und eine Isoform ist ausschließlich im Herzmuskelgewebe vorhanden. Das MYBPC liegt in den A-Banden des Sarkomers und bildet eine Reihe von transversalen Banden im Abstand von 43 nm-Intervallen. Es besitzt Bindungsstellen für Myosin und Titin. Das kardiale Myosin-binding-protein-C-Gen (MYBPC3) besteht aus 24 kb genomischer DNA und enthält 37 Exons, die 1274 Aminosäuren kodieren. Bisher konnte im MYBPC3 eine ähnliche Anzahl kausaler Mutationen wie im MYH7-Gen bei unterschiedlichen Familien und Patienten detektiert werden (MARON *et al.*, 1979). Mutationen im MYBPC3-Gen kommen somit bei 15 - 20 % der HCM-Patienten vor. Am häufigsten treten in diesem Gen Mutationen in der Form von Insertions-, Deletionsmutationen und Mutationen in der Splicingregion auf. Punktmutationen, die die Myosin- und Titinbindungsregion betreffen, kommen ebenfalls vor (FATKIN & GRAHAM, 2002). In Genotyp-Phänotyp-Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Penetranz der HCM bei MYBPC3-Mutationen geringer ist als bei β-MHC-Mutationen und dass die Erkrankung erst im späteren Lebensalter, vorwiegend in der fünften oder sechsten Lebensdekade, auftritt (NIIMURA *et al.*, 1998). Jedoch konnte in einer anderen Studie ein Einfluss auf die Penetranz der Erkrankung durch Renin-Angiotensin-Aldosteron-

System (RAAS) assoziierte Polymorphismen nachgewiesen werden. Hierbei zeigten verwandte Patienten mit einer MYBPC3-Mutation und Polymorphismen in Genen des RAAS eine stärkere Penetranz der Erkrankung und einen schwerwiegenderen Grad der LV-Hypertrophie als MYBPC3-Mutationsträger, die keine Mutationen im RAAS-Genen aufwiesen (ORTLEPP *et al.*, 2002). Ebenso konnte ein deutlicher modifizierender Einfluss des ACE-D/D Genotyps auf eine vermehrte LV-Hypertrophie bei HCM-Patienten mit einer Mutation im MYBPC3-Gen dargestellt werden (PERKINS *et al.*, 2005).

3.3.1.3. Kardiales Troponin T-Gen

Das Sarkomerprotein Troponin T wird im embryonalen und adulten Herzmuskel sowie im sich entwickelnden Skelettmuskel exprimiert. Das kardiale Troponin T-Gen (TNNT2) besteht aus 17 kb genomischer DNA. 17 Exons kodieren die Herzmuskel-Isoform des Proteins, welche aus 288 Aminosäuren besteht. Das kardiale Troponin T besitzt zwei Hauptbindungsdomänen, die NH2-terminale Domäne, welche mit Tropomyosin interagiert und die COOH-terminale Domäne, welche an Tropomyosin, Troponin C und Troponin I bindet. Weniger als 5 - 10 % der HCM-Patienten zeigen in Screenings eine Mutation im TNNT2-Gen (MARON *et al.*, 1979). Meistens handelt es sich hierbei um Punktmutationen im NH2- und COOH-Ende, zudem konnte eine kausale Mutation in der Splicingregion und eine kausale Deletionsmutation nachgewiesen werden (FATKIN & GRAHAM, 2002; THIERFELDER *et al.*, 1994). Troponin T-Mutationen verursachen generell milde oder klinisch irrelevante Formen der HCM (MOOLMAN *et al.*, 1997; WATKINS *et al.*, 1995b).

3.3.1.4. Kardiales Troponin I-Gen

Das kardiale Troponin I wird nur im Herzmuskel exprimiert und besteht aus 210 Aminosäuren, die durch acht Exons der 6,2 kb langen DNA kodiert werden. Das kardiale Troponin I besitzt eine inhibierende Region, wobei bei niedrigen Kalziumkonzentrationen die Kontraktion durch eine Hemmung der Actomyosin-ATPase unterbunden wird. Vermehrte Bindung von kardialem Troponin I an das dünne Filament führt ebenfalls zu einer Hemmung der Kontraktion. Wenn die inhibierende Region dieses herzspezifischen Proteins an den Troponin C-Kalzium-Komplex bindet, kommt es zu einer Aktin-Myosin-Interaktion und somit zur Kontraktion. Mehr proximal am Protein befinden sich zudem eine

Aktin-Tropomyosin-Bindungsstelle und eine zweite Troponin C-Binderegion. Troponin I bildet ein antiparalleles Dimer mit Troponin C. Nur weniger als 5 % der humanen HCM werden durch eine Mutation des kardialen Troponin I-Gens (TNNI3) hervorgerufen. Bei den bereits für die HCM verantwortlich gemachten Mutationen handelt es sich zumeist um Punktmutationen. Zwei kausale Mutationen konnten in der inhibierenden Region lokalisiert werden (DOOLAN *et al.*, 2005; FATKIN & GRAHAM, 2002; KIMURA *et al.*, 1997; MARON *et al.*, 1979; MOGENSEN *et al.*, 2004).

3.3.1.5. Kardiales Troponin C-Gen

Troponin C kommt einerseits als spezifische Isoform im Herzmuskel vor. Eine zweite Isoform ist im Skelettmuskel präsent. Das kardiale Troponin C-Gen (TNNC1) kodiert die im Herzmuskel und im langsam kontrahierenden Skelettmuskel (rote Fasern) vorhandene Isoform. Das kardiale Troponin C-Gen besteht aus 161 Aminosäuren und wird von 3 kb genomischer DNA, die sechs Exons enthält, kodiert. Durch die Bindung dieses Proteins mit Ca^{2+} wird eine Konformationsänderung im Troponin-Tropomyosin-Komplex erzeugt, welche zur Muskelkontraktion führt (FATKIN & GRAHAM, 2002). Bisher konnte nur eine HCM-assoziierte Mutation in diesem Gen gefunden werden, wobei es sich um eine Punktmutation handelt (FATKIN & GRAHAM, 2002; HOFFMANN *et al.*, 2001; MARON *et al.*, 1979).

3.3.1.6. α-Tropomyosin-Gen

α-Tropomyosin wird im ventrikulären Myokardium und im schnell kontrahierenden Skelettmuskel (weiße Fasern) exprimiert. Das TPM1 besteht aus 15 Exons, wobei mehrere Isoformen dieses Gens durch alternierendes Splicing existieren. Fünf Exons sind in allen α-Tropomyosin-Transkripten vorhanden, während zehn Exons variabel in unterschiedlichen Geweben präsent sind. Die kardiale α-Tropomyosin-Isoform besteht aus 284 Aminosäuren, die durch zehn Exons kodiert werden. α-Tropomyosin besitzt zwei Bindungsstellen für Troponin T, wobei sich eine kalziumsensitiv und die andere nicht kalziumsensitiv verhält. Sechs HCM verursachende Punktmutationen konnten bisher im α-Tropomyosin-Gen (TPM1) bei HCM-Patienten identifiziert werden. Drei davon sind in dem für die kalziumsensitive Troponin T-Bindungsstelle kodierenden DNA-Abschnitt

lokalisiert (FATKIN & GRAHAM, 2002; MARON *et al.*, 1979; THIERFELDER *et al.*, 1994).

3.3.1.7. Regulatorisches Myosinleichtketten-Gen

Die leichten Ketten (MLC) gehören zu einer Überfamilie der kalziumbindenden Proteine. Ihre Kalziumbindestelle besitzt einen speziellen Helix-Schleifen-Helix-Aufbau. Im Herzmuskel kommen zwei Isoformen dieses Proteins vor. Die so genannte langsame Isoform befindet sich im Ventrikel und im langsam kontrahierenden rotfaserigen Skelettmuskel, während die schnellere Isoform im atrialen Myokardium präsent ist. Das regulatorische Myosinleichtketten-Gen (MYL2) kodiert die langsame Isoform mit 166 Aminosäuren und besteht aus sieben Exons. Bei circa 1 % der gescreenten HCM-Population in verschiedenen Studien spielt eine Mutation in diesem Gen eine kausale Rolle (FATKIN & GRAHAM, 2002; FLAVIGNY *et al.*, 1998; KABAEVA *et al.*, 2002; MARON *et al.*, 1979; POETTER *et al.*, 1996).

3.3.1.8. Essentielles Myosinleichtketten-Gen

Im Herzmuskel kommen zwei Isoformen der essentiellen MLC vor. Die MLC-1-Isoform wird im ventrikulären Myokard und im rotfaserigen langsam kontrahierenden Skelettmuskel exprimiert. Das essentielle Myosinleichtketten-Gen (MYL3) besteht aus sieben Exons, wovon sechs das aus 195 Aminosäuren zusammengesetzte Protein kodieren. Bisher konnten nur zwei Punktmutationen für die HCM in diesem Gen verantwortlich gemacht werden (FATKIN & GRAHAM, 2002; MARON *et al.*, 1979; POETTER *et al.*, 1996).

3.3.1.9. Kardiales Aktin-Gen

Im humanen Genom kommen 20 verschiedene Aktingene vor. Aber nur vier Aktinisoformen sind in der Herzmuskulatur, in der Skelettmuskulatur und in der glatten Muskulatur anzutreffen. Die Herz- und Skelettmuskel-Aktinisoformen sind beide sowohl im Herzmuskel als auch im Skelettmuskel präsent. Das so genannte „α-sceletal actin“ ist die prädominante Isoform im embryonalen Herzmuskel und wird im adulten Herzmuskel herunterreguliert. Das kardiale Aktin-Gen (ACTC) besteht aus sechs Exons, welche ein Protein aus 375 Aminosäuren kodieren. Das NH2-Ende des kardialen Aktins bildet die Bindungsstelle für die Myosin-Querbrücken-Bindung. Das COOH-Ende dagegen

dient als Bindungsstelle für α-Aktinin und Dystrophin. (FATKIN & GRAHAM, 2002; MARON *et al.*, 1979; OLSON *et al.*, 2000).

3.3.1.10. Titin-Gen

Titin stellt mit 3 kDa das größte bekannte Polypeptid dar. Es nimmt einen Anteil von 10 % in der quergestreiften Muskulatur der Vertebraten ein. Titin erstreckt sich über die Hälfte des Sarkomers von der Z- zur M-Bande. Ein dehnbarer Abschnitt des Titins befindet sich innerhalb der I-Bande, während ein steiferer Teil innerhalb der A-Bande liegt. 90 % des Titins werden von 289 Immunglobulin- und Fibronektindomänen umschlossen. Aus gewebespezifisch exprimierten Titinisoformen resultieren unterschiedliche Grade von Gewebeelastizität. Bisher konnte eine Mutation im Titin-Gen (TTN) in der Binderegion mit der Z-Scheibe identifiziert werden und mit der HCM in Verbindung gebracht werden, wobei diese Mutation die Bindungsfähigkeit des Titins an α-Aktinin steigert (FATKIN & GRAHAM, 2002; HAYASHI *et al.*, 2004; SATOH *et al.*, 1999).

3.3.2. Z-Scheiben-assoziierte hypertrophe Kardiomyopathie

Im Folgenden werden die Kandidatengene, die Proteine der Z-Scheibe kodieren, abgehandelt.

3.3.2.1. Kardiales Muskel-LIM-Protein-Gen

Kardiales Muskel-LIM-Protein (MLP) wird im Herzmuskel und im rotfaserigen Skelettmuskel exprimiert. Dieses Protein besitzt zwei LIM-Domänen, welche als sehr cysteinreiche Strukturen mit zwei Zinkfingern beschrieben werden. Das MLP kommt im embryonalen Herz vor und trägt zur Differenzierung des Muskelgewebes bei. Gleichzeitig dient das MLP als Gerüst zwischen den zytoskelettalen Aktinfilamenten und den Costamerkomplexen. Die erste LIM-Domäne interagiert mit den myofibrillären Bindungsproteinen α-Aktinin und „Nebulin-related-anchoring protein“ (N-RAP), während die zweite LIM-Domäne mit den Aktinfilamenten und dem Spektrin in Verbindung steht. Das kardiale Muskel-LIM-Protein-Gen (CSRP3) besteht aus 4 Exons, welche das aus 194 Aminosäuren zusammengesetzte Protein kodieren. Bisher konnten vier Punktmutationen im Bereich der LIM-1-Domäne bei Patienten mit HCM gefunden werden. Laut Studien führen Mutationen in diesem Bereich zu einer herabgesetzten Bindungsaktivität des MLP mit α-Aktinin und N-RAP. Die

Patienten in den Studien zeigten eine typische asymmetrische septale Hypertrophie (BOS *et al.*, 2007; BOS *et al.*, 2006; FATKIN & GRAHAM, 2002; GEHMLICH *et al.*, 2004; GEIER *et al.*, 2003).

3.3.2.2. Telethonin-Gen

Telethonin (Tcap) ist ein 19 kDa Protein mit 128 Aminosäuren, das von TCAP mit zwei Exons kodiert wird. Es spielt eine Rolle bei der Sarkomergenese im quergestreiften Muskel. Tcap weist eine Art innere Symmetrie auf und kann dadurch an die N-terminalen Domänen zweier Titin-Moleküle binden. Außerdem interagiert es mit Calsarcin-2 und Calsarcin-3. Bisher konnten fünf Mutationen im Telethonin-Gen (TCAP) mit der HCM assoziiert werden (BOS *et al.*, 2007; BOS *et al.*, 2006; EXPASY, 2007; HAYASHI *et al.*, 2004).

3.3.2.3. LIM-domain-binding-3-Gen

Das vom LIM-domain-binding-3-Gen (LDB3) kodierte LIM-domain-binding-3-Protein (offizielle HUGO-Nomenklatur) wird auch als von ZASP kodiertes „Z-band-associated-alternatively-spliced-PDZ-motif-Protein“ bezeichnet und fungiert als Bestandteil des Z-Scheiben-Komplexes. Es kommt hauptsächlich im Myokard und im Skelettmuskel vor, wurde aber ausserdem im Gehirn und in der Plazenta detektiert. Mit seinen LIM-Domänen interagiert dieses Protein, welches in sechs Isoformen vorkommt, mit verschiedenen PKC-Isoformen und der C-terminalen Region des Aktinins. Das LIM-domain-binding-3-Protein besitzt ein Molekulargewicht von 77 kDa und besteht aus 727 Aminosäuren, die durch 13 Exons des LDB3 kodiert werden (HUBBARD *et al.*, 2007; UNIPROT, 2007). Fünf von sechs HCM-Patienten mit Mutationen im LDB3 zeigten in einer Studie eine sigmoidale HCM, während bei einer Mutationsform eine apikale HCM ausgeprägt war (THEIS *et al.*, 2006).

3.3.2.4. α-Aktinin-Gen

α-Aktinin ist ein weiteres im Z-Scheiben-Komplex involviertes Protein mit einem molekularen Gewicht von 103 kDa. Es kommt sowohl im Myokard als auch im Herzmuskel vor. Das α-Aktinin-Gen (ACTN2) besitzt 21 Exons, welche die 894 Aminosäuren des 4883 bp langen α-Aktinin-Transkripts kodieren (HUBBARD *et al.*, 2007; UNIPROT, 2007). Bisher konnten drei Punktmutationen, die zu einem Aminosäurenaustausch innerhalb des ACTN2 (G111V, T495M, R759T) führen,

mit der Pathogenese einer sigmoidalen HCM in Verbindung gebracht werden (THEIS *et al.*, 2006).

3.3.2.5. Vinculin/Metavinculin-Gen

VCL liegt auf dem Chromosom 10q22.1-q23 und enthält 22 Exons, die ein ubiquitär im Skelettmuskel vorkommendes Protein mit 1133 Aminosäuren kodieren (MOISEYEVA *et al.*, 1993). Es kommen drei Isoformen des Proteins Vinculin vor, wobei durch alternatives Splicing die für den Herzmuskel und die glatte Muskulatur spezifische Isoform Metavinculin hervorgebracht wird, welche zusätzliche 68 Aminosäuren enthält (BELKIN *et al.*, 1988b; KOTELIANSKY *et al.*, 1992). Beide Formen, Vinculin und Metavinculin, sind zwischen den *Disci intercalati* und den Costameren lokalisiert und fungieren als Verbindungsproteine der *Disci intercalati* und der Aktinfilamente (BELKIN *et al.*, 1988a). Ihnen wird auch eine wichtige Rolle für die Beschaffenheit der Zellmorphologie und für die Lokomotion zugesprochen (HUBBARD *et al.*, 2007; UNIPROT, 2007). Bisher konnten zwei Punktmutationen im Vinculin/Metavinculin-Gen (VCL), R975W im Metavinculin- und L277M im Vinculin-Gen, mit der HCM assoziiert werden (THEIS *et al.*, 2006; VASILE *et al.*, 2006).

3.3.2.6. Myozenin 2-Gen

Myozenin 2 ist auch unter dem Namen Calsarcin 1 (CS-1) bekannt und ist Bestandteil des Z-Scheiben-Proteinkomplexes. Es wird im Herzmuskel sowie im Skelettmuskel exprimiert. Myozenine dienen intrazellulär der Verbindung von Z-Scheiben-Proteinen wie α-Aktinin, γ-Filamin, Tcap sowie LBD3/ZASP und spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation von Kalzineurinsignalen. Zusätzlich soll dieses Protein die Myofibrillogenese beeinflussen. Bei HCM-Patienten, die keine Mutationen in den bisher genannten Sarkomergenen aufwiesen, sollte in einer Studie das kausale Gen mittels Linkage-Analyse und anschließender Sequenzierung gefunden werden. Es konnten fünf „Short tandem repeats“ (STRs) auf der Chromosomenregion 4q26-q27 genotypisiert werden, welche das Z-Scheiben-Protein Myozenin 2 umfassten. Der maximale Logarithmus des „Odds Score“ ergab hierbei einen Wert von 2,03 bei $P < 0,05$. Bei allen zehn HCM-Patienten einer Familie konnte in der nachfolgenden Sequenzanalyse eine Punktmutation (S48P) im Myozenin 2-Gen (MYOZ2) ausfindig gemacht werden. Bei vier klinisch unauffälligen Familienmitgliedern

und 658 Probanden der Kontrollgruppe war dieselbe Mutation nicht nachzuweisen. Um die Frequenz von MYOZ2-Mutationen bei HCM-Patienten zu bestimmen, wurde das MYOZ2-Gen bei 516 HCM-Patienten sequenziert. Dabei konnte bei einem Patienten eine weitere Punktmutation (I246M) im selben Gen detektiert werden, die bei keinem Probanden der Kontrollgruppe vorkam (OSIO *et al.*, 2007).

3.3.3. Kalziummetabolismus-assoziierte hypertrophe Kardiomyopathie

In der Herzmuskelzelle spielen Ca^{2+} und die an der Kalzium-induzierten-Kalziumausschüttung beteiligten Proteine eine große Rolle bei den Abläufen der Reizbildung bis zur Kontraktion. Bei anderen Kardiomyopathien konnten bereits ursächliche Defektgene der am Kalziummetabolismus beteiligten Proteine gefunden werden. Der Kalziummetabolismus ist von daher auch ein großes neues Interessensgebiet in der HCM-Forschung. Somit konnten in der letzten Dekade mehrere Mutationen im Zusammenhang mit dem myokardialen Kalzium-metabolismus für bestimmte HCM-Formen verantwortlich gemacht werden (BOS *et al.*, 2007; TSOUTSMAN *et al.*, 2006b).

3.3.3.1. Phospholamban-Gen

Phospholamban ist ein wichtiges Protein im Kalziumstoffwechsel, welches die Ca^{2+}-ATPase (SERCA2a) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) hemmt. Die SERCA2a ist dafür zuständig, Ca^{2+} aus dem Zytosol zu entfernen (siehe Abbildung 4). Phospholamban spielt eine wichtige Rolle im Ablauf der Kontraktion und Relaxation. Das Phospholamban-Gen (PLN) enthält zwei Exons. Die Translationslänge beträgt 2001 bp und das Transkript besteht aus 52 Aminosäuren (HUBBARD *et al.*, 2007; UNIPROT, 2007). Im PLN konnten bisher zwei Punktmutationen mit der HCM assoziiert werden, einerseits die Punktmutation A77G in der Promotorregion des PLN, die in neonatalen Rattenkardiomyozyten eine Steigerung der der Promotoraktivität im PLN herbeiführte. Andererseits die Punktmutation C42G, die bei einem Patienten für eine benigne apikale HCM verantwortlich gemacht wurde (MEDIN *et al.*, 2007; MINAMISAWA *et al.*, 2003).

3.3.3.2. Kardiales Ryanodinrezeptor-Gen

Der kardiale Ryanodinrezeptor ist ein Multi-Pass-Membranprotein. Während des Aktionspotentials steigt durch direktem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle über

spannungsabhängige L-Type-Kanäle und zu einem geringeren Teil über Na^+/Ca^{2+}-Kanäle der Gehalt des $[Ca^{2+}]_i$. Dieser Einstrom von Ca^{2+} löst wiederum eine Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem SR über Ryanodin- und Inositol-1, 4, 5-Triphosphat-Rezeptoren aus. Aus alternativem Splicing gehen zwei Isoformen dieses Proteins hervor (HUBBARD *et al.*, 2007; UNIPROT, 2007). Im Jahr 2006 konnten erstmals Mutationen im kardialen Ryanodinrezeptor-Gen (RyR2) nachgewiesen werden, die bei den betroffenen Patienten eine HCM-Form mit massiver Hypertrophie und Arrhythmien hervorriefen (FUJINO *et al.*, 2006). Das RyR2 besitzt 105 Exons, die Länge des Transkriptionsprodukts beträgt 14865 bp genomische DNA. Dadurch wird ein Polypeptid von 4954 Aminosäuren kodiert (BOS *et al.*, 2007; FATKIN & GRAHAM, 2002; HUBBARD *et al.*, 2007; UNIPROT, 2007).

3.3.3.3. Junctophilin 2-Gen

Das Junctophilin Typ 2-Protein, welches durch das Junctophilin 2-Gen (JPH2) kodiert wird, gehört zur Junctophilin-Familie der junktionalen Membrankomplexproteine und dient der Stabilisierung. Es trägt dazu bei, die Plasmamembran und das SR zu verankern. Junctophiline besitzen so genannte „multiple membrane occupation and recognition nexus-Domänen“ (MORN) und eine SR-Transmembrandomäne, die den richtigen Sitz zwischen Diadenspalt, den transversen Tubuli und dem SR erlauben (NISHI *et al.*, 2000; TAKESHIMA *et al.*, 2000). Zudem spielt es eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des Herzmuskels (ROTTBAUER *et al.*, 2001). Junctophilin 2 kommt sowohl im Herz- als auch im Skelettmuskel vor. JPH2 besteht aus zwei Exons mit einer Transkriptlänge von 2408 bp genomischer DNA, womit ein Polypeptid von 129 Aminosäuren kodiert wird (HUBBARD *et al.*, 2007; UNIPROT, 2007). In Genexpressionsstudien bei Knock-in-Mäusen war JHP2 sowohl bei der DCM als auch bei der HCM herunterreguliert und wurde somit als neues Kandidatengen herangezogen (MINAMISAWA *et al.*, 2004). Bisher konnten fünf kausale Punktmutationen bei Patienten mit HCM im JPH2 entdeckt werden: S101R, Y141H, S165F, R436C und G505S (BOS *et al.*, 2007; LANDSTROM *et al.*, 2007; MATSUSHITA *et al.*, 2007).

3.3.4. Metabolische hypertrophe Kardiomyopathie

Die meisten Gene, die an der Pathogenese der HCM beteiligt sind, kodieren Proteine, die sehr herzmuskelspezifisch sind. Bei circa 13 % der HCM-Patienten kann in den Genen der kontraktilen Proteine kein genetischer Defekt gefunden werden. In Kandidatengenstudien wird oft die Hypothese aufgestellt, dass ein jeweiliges Gen als Kandidatengen auch deshalb in Frage kommen könnte, weil das kodierte Protein im Herzmuskel exprimiert wird. Seit kurzem werden auch Gendefekte, die mit der Energiehomöostase im Herzmuskel assoziiert sind, als eine weitere Ursache von Herzmuskelhypertrophie angesehen. Diese werden neuerdings in die Gruppe der zur metabolischen HCM führenden Gendefekte eingestuft. Bei dieser Form der HCM treten histologisch weder gestörte Myozytenanordnung noch interstitielle Fibrose auf, sondern sie kann durch eine ausgeprägte Ausbildung von mit Glykogengranula gefüllten Vakuolen in den Myozyten charakterisiert werden. Im Herzultraschall gleicht diese Form jedoch der Muskelhypertrophie einer Myofilament-HCM. So kann eine solche Art der Hypertrophie eine linksventrikuläre Ausflusstraktobstruktion hervorrufen oder gleichzeitig als rechtsventrikuläre Hypertrophie auftreten. Diese Form der Kardiomyopathie kann die typischen Symptome einer Myofilament-HCM (Brustschmerz, Palpitationen, Synkopen) hervorrufen. In einer Studie mit HCM-Patienten, die keine Sarkomermutation aufwiesen, konnte bei immerhin 46 % eine PRKAG2 oder LAMP2-Mutation nachgewiesen werden. In HCM-Populationen beherbergen circa 4 - 12 % der Patienten eine Mutation in Genen, die eine Glykogenspeicherkrankheit hervorrufen. In der „Framingham Heart Study“ konnte die Lipidspeichererkrankung „Morbus Fabry“ für die linksventrikuläre Hypertrophie eines Patienten verantwortlich gemacht werden. Zudem führen auch Mutationen in mitochondrial kodierten t-RNAs, der ATP-Synthase und im Cytochrom B zu verschiedenen Syndromen, wie das „Kearns-Sayre-Syndrom“, die stets von einer Hypertrophie des LV begleitet werden (ARAD *et al.*, 2002a; BLAIR *et al.*, 2001; HO & SEIDMAN, 2006; MORITA *et al.*, 2006).

3.3.4.1. γ_2-regulatorische Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase

Die γ_2-regulatorische Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) ist ein Heterotrimer, welches eine katalytische (α-) und zwei regulatorische (β- und γ-) Untereinheiten besitzt. Die γ-Untereinheit kommt in drei Isoformen vor

(γ_1, γ_2, γ_3), welche in Länge und Gewebeexpression variieren. Die α- und β-Untereinheiten treten jeweils ebenfalls in zwei Isomeren auf, wobei alle erwähnten Isomere im Herzmuskel exprimiert werden. Das Gen der γ_2-regulatorischen Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase (PRKAG2) besitzt eine Transkriptionslänge von > 280 kb genomischer DNA. Das PRKAG2 kommt in zwei Isoformen vor: PRKAG2a, welches mit 12 Exons ein kürzeres Transkript von 352 und 328 Aminosäuren kodiert und PRKAG2b, welches mit 16 Exons ein längeres Transkript von 569 Aminosäuren erzeugt. Das AMPK-Protein besteht primär aus vier hintereinander folgenden Cytathionin-β-Synthetase-Domänen (CBS). Es fungiert als metabolischer Sensor in den Zellen, wobei es bei einem Erschöpfungszustand von ATP reagiert und diverse andere intrazelluläre Systeme reguliert, die ATP erzeugen. Beim Nichtvorhandensein von metabolischem Stress wird die AMPK-Aktivität von einer autoinhibitorischen Region in der α-Untereinheit unterdrückt. Steigende ATP-Levels aktivieren die AMPK durch Interaktion zwischen der autoinhibitorischen Region und der γ-Untereinheit und gleichzeitig wird die Upstream-Kinase, AMPKK aktiviert. Neben der Proteinkinaseaktivität soll AMPK auf die Transkription regulierend wirken (SALT *et al.*, 1998). Mutationen im PRKAG2 führen zu einer Erhöhung der AMPK-Aktivität und resultieren in einer Glykogenspeicherung im Herzmuskel, die einer HCM phänotypisch ähnlich ist. Bisher konnten sieben Mutationen, davon sechs Punkt- und eine Insertionsmutation mit dieser Art von Glykogenspeicherkardiomyopathie, die sich mit einer in der Echographie darstellbaren Hypertrophie des Herzmuskels in Verbindung mit Arrhythmien oder Leitungsblocks äußert, assoziiert werden (ARAD *et al.*, 2002a; ARAD *et al.*, 2005; ARAD *et al.*, 2002b; BLAIR *et al.*, 2001; FATKIN & GRAHAM, 2002; GOLLOB *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

3.3.4.2. Lysosom-assoziiertes Membranprotein 2-Gen

Das Lysosom-assoziierte Membranprotein 2 fungiert als Membranprotein, welches die lysosomale Membran vor Autodigestion schützt und die saure Umgebung der Lysosomen aufrecht hält. Wenn es auf der Zelloberfläche (Plasmamembran) exprimiert wird, trägt es zur Adhäsion der Zellkomponenten bei und dient der inter- und intrazellulären Signalübertragung. Das Protein besitzt einen kleinen zytoplasmatischen Ausläufer, der in den rezeptorvermittelten

lysosomalen Uptake involviert ist und eine große lysosominterne Domäne, mit stark glykosyliertem Anteil. Vom Lysosom-assoziierten Membranprotein 2-Gen (LAMP2) sind zwei Isoformen bekannt, LAMP2a und LAMP2b. Die Isoform LAMP2a wird sehr stark in Plazenta, Lunge und Leber, weniger stark in Pankreas und Nieren und sehr wenig in Gehirn und Skelettmuskel exprimiert, während LAMP2b sehr stark im Skelettmuskel ausgebildet wird. LAMP2 besitzt zwei Exons, die zwei isomere Transkripte mit circa 1800 bp genomischer DNA erzeugen, welche ein Polypeptid von 410 Aminosäuren kodieren. LAMP2-Mutationen verursachen typischerweise „Danon's Disease", ebenfalls bekannt als Glykogenspeichererkrankung 2B (GSD2B). Sie wird durch eine X-Chromosom-gekoppelte Defizienz des „lysosome associated membrane protein 2" ausgelöst und präsentiert sich mit einem multisystemischem Erkrankungsbild. Letzteres wird durch neuromuskuläre Defizite, zentralnervöse Störungen, abnorme Leber- und Nierenfunktion und vakuoläre kardiale Hypertrophie gekennzeichnet. Jedoch ist ein primäres Erscheinungsbild einer Kardiomyopathie ebenfalls möglich. Patienten, die eine LAMP2-Mutation hatten, zeigten im Herzultraschall eine massive konzentrische Hypertrophie und die typischen Symptome einer HCM (Brustschmerz, Palpitationen, Synkopen, Herzversagen und Herzstillstand) traten bereits in der Adoleszenz im Alter von 8 bis 15 Jahren auf (ARAD *et al.*, 2005; BALMER *et al.*, 2005; CHARRON *et al.*, 2002; LACOSTE-COLLIN *et al.*, 2002; NISHINO *et al.*, 2000; SUGIE *et al.*, 2002).

3.3.4.3. Frataxin-Gen

Frataxin ist ein mitochondriales Protein und nimmt im Zellmetabolismus eine antiapoptotische Rolle ein. Es schützt die Zelle, indem es durch mitochondriale Eisendetoxifikation einer oxidativen Schädigung vorbeugt (GAKH *et al.*, 2006). Die Expression von Frataxin erfolgt im Herz, in den peripheren Blutlymphozyten und in dermalen Fibroblasten. Mutationen im Frataxin-Gen (FXN) führen zu einer Erkrankung namens „Friedreich-Ataxie", welche autosomal rezessiv vererbt wird und zu einer Defizienz von Frataxin führt. Letztendlich führt die „Friedreich-Ataxie" wie auch andere mitochondriale Gendefekte zu einer myokardialen Hypertrophie und zu einer Degeneration des Nervengewebes (LEV *et al.*, 2004). Gewöhnlich manifestiert sich diese Erkrankung bereits in der Kindheit und wird durch unkoordinierte Gliedmaßenbewegung, Dysarthrie, Nystagmus, verminderte oder ausfallende Zehenreflexe, Babinski-Zeichen, *Pes*

cavus und Hammerzehen gekennzeichnet. Eine myokardiale Hypertrophie ist meistens vorhanden und die betroffenen Patienten versterben in der Regel an Herzversagen (ALPER & NARAYANAN, 2003). Bei den meisten Patienten kommt es durch eine Ausbreitung von „GAA-Triplet Repeats“ im ersten Intron zu dieser Erkrankung, aber bei wenigen Fällen wurde auch eine Mutation in der kodierenden Region gefunden. FXN hat vier kodierende Exons und die Transkriptlänge beträgt 2608 bp genomische DNA. Dadurch wird ein Polypeptid mit 210 Aminosäuren kodiert. In einer Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine heterozygote FXN-Mutation entweder einer Sarkomer-HCM ähnelt oder eine vorhandene Sarkomer-HCM modifizieren kann (MOLKENTIN *et al.*, 1998; OLSON & MOLKENTIN, 1999; VAN DRIEST *et al.*, 2005).

3.3.4.4. α-Galaktosidase A-Gen

Die α-Galaktosidase ist ein Enzym, welches die α-D-glykosidische Bindung der so genannten Glykosphingolipide durch Hydrolyse zu nicht reduzierenden α-D-Galaktoseresten spaltet, die somit abgebaut werden können. Das Enzym kommt in den Lysosomen vor. Das α-Galaktosidase A-Gen (GLA) besitzt sieben Exons und 1350 bp genomische DNA. Das dadurch kodierte Enzym besteht aus 429 Aminosäuren. Durch Mutationen im GLA entsteht ein organismusweiter Mangel an α-Galaktosidase, der zu dem Krankheitsbild des „Morbus Fabry“, einer Lipidspeichererkrankung führt. Dabei kommt es zu einer Anreicherung der Glykosphingolipide im Plasma und in den zellulären Lysosomen, was schließlich zum Tod der Zelle führt. Dieser Erbfehler wird X-chromosomal vererbt. Die Erberkrankung tritt daher bei männlichen Patienten in einem schlimmeren Ausmaß auf. Sie zeigen charakteristische Hautläsionen (Angiokeratome) und Herzmuskelhypertrophie. Der Tod resultiert schließlich aus Herz- oder Nierenversagen, zerebralen Hypertensionskrisen oder vaskulären Komplikationen. Heterozygote Frauen zeigen die Erkrankung in einer abgeschwächten Form. Eine GLA-Mutation war im Rahmen der „Framingham Heart Study“ bei der Untersuchung von 50 Patienten mit einer linksventrikulären Hypertrophie von > 13 mm bei einem Patienten (2 %) für den HCM-Phänotyp verantwortlich (HUBBARD *et al.*, 2007; MORITA *et al.*, 2006; UNIPROT, 2007).

3.3.4.5 α-1,4-Glukosidase-Gen

Ein weiteres lysosomales Enzym, welches durch Mutationen zu einer Glykogenspeicherkrankheit Typ II namens „Pompe-Erkrankung“ führt, ist die α-1,4-Glukosidase. Sie ist im Lysosom für den Abbau von Glykogen zu Glukose zuständig. Das α-1,4-Glukosidase-Gen (GAA) besitzt 19 Exons und erzeugt eine Transkriptlänge von 2859 bp (HUBBARD *et al.*, 2007; UNIPROT, 2007). Bei der „Pompe-Erkrankung“ zeigt dieses Enzym eine verminderte Aktivität oder fehlt völlig. So lagert sich Glykogen in den Lysosomen der Muskelzellen und in der Leber ab. Diese Erkrankung hat ein breites klinisches Spektrum, was sich vor allem in muskulärer Hypotonie äußert, jedoch endet sie zumeist im ersten Lebensjahr tödlich aufgrund des durch myokardiale Hypertrophie hervorgerufen Linksherzversagens oder durch Aussetzen der Atemmuskulatur. Eine Aneurysmabildung durch Glykogeneinlagerungen in der Gefäßmuskulatur kann zu einem plötzlichen Tod führen. Bisher konnten 150 Mutationen mit dieser Erkrankung assoziiert werden. Jedoch konnten in genetischen Screening-Studien bei Patienten, die nur eine HCM vorwiesen, keine GAA-Mutationen gefunden werden (ARAD *et al.*, 2005; MOLKENTIN *et al.*, 1998).

3.3.4.6. Protein-Tyrosinphosphatase-SHP-2-Gen

Mutationen im Protein-Tyrosinphosphatase-SHP-2-Gen (PTPN11) gelten bei 30 % der Patienten mit dem „Noonan- und dem LEOPARD-Syndrom“ als Ursache der Erkrankung mit autosomal dominantem Vererbungsmuster. Klassische Symptome ergeben sich aus dem Wort LEOPARD: **L**entigo ohne Beteiligung der Schleimhäute, **E**rregungsleitungsstörungen, **O**kularer Hypertelorismus, **P**ulmonalstenose, **A**bnormalitäten der Genitalien, **R**etardation des Wachstums und **D**eafness (Taubheit). Die kardialen Missbildungen beziehen sich nicht nur auf die Pulmonalklappe, sondern gehen bei einem Großteil der Patienten mit einer linksventrikulären Hypertrophie einher. Da die Penetranz dieses Syndroms sehr variabel ist, wird bei manchen Patienten oft nur eine linksventrikuläre Hypertrophie beobachtet und fälschlicher Weise als HCM diagnostiziert. In einer Studie sollte evaluiert werden, ob PTPN11-Mutationen bei einer Kohorte von 250 HCM-Patienten (davon 200 ohne Mutationen in Sarkomergenen) in Abwesenheit des „Noonan/LEOPARD-Syndroms“ vorkommen. Es konnte keine PTPN11-Mutation in dieser Studie als Ursache der myokardialen Hypertrophie identifiziert werden (LIMONGELLI *et al.*, 2006).

3.3.4.7. Mitochondriale Gene

Defekte in der mitochondrialen Atmungskette in den kardialen Myozyten sind eine weitere Ursache, die zu einer markanten Hypertrophie des Herzmuskels und letztendlich zum Herzversagen führen kann. Bisher konnten einige Punktmutationen in spezifischen mitochondrialen Genen bei Kindern mit vorher ungeklärter Ursache der HCM gefunden werden. Beispiele wären die Gene, die Komplexe der Atmungskette kodieren (Komplex I-V, außer Komplex II und Cytochrom B). Jedoch kamen diese Mutationen nicht in einem isolierten kardialen Geschehen vor (MARIN-GARCIA *et al.*, 1997; MARIN-GARCIA *et al.*, 2000). Im Rahmen der „Framingham Heart Study" wurden 11 Varianten in mitochondrialen Genen (t-RNA-Gene, r-RNA-Gene, ATP-Synthetase-6-Gen, ATP-Sythetase-8-Gen und Cytochrom-B-Gen) bei 50 Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie gefunden. Da keiner dieser Patienten eine Mutation in anderen HCM verursachenden Genen aufwies, wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese mitochondrialen Gendefekte die Ursache der kardialen Hypertrophie waren. In einer Folgestudie wurde jedoch bewiesen, dass diese neuen Sequenzvarianten bei 60 zufällig aus der mitochondrialen Gendatenbank ausgewählten Individuen ebenfalls vorkamen. Somit wurde widerlegt, dass die linksventrikuläre Hypertrophie der Probanden in der „Framingham Heart Study" aus den in derselben Studie gefundenen Polymorphismen resultiert. In einer zweiten Folgestudie konnte gezeigt werden, dass 16 Mütter und Geschwister der „Framingham Heart Study"-Teilnehmer dieselben Sequenzvarianten aufwiesen und nur eine Testperson davon zeigte eine linksventrikuläre Hypertrophie des Herzmuskels (MORITA *et al.*, 2006).

3.3.5. Neuer Genlokus auf Chromosom 7

Bei vier Generationen einer Familie mit autosomal dominant auftretender linksventrikulärer Hypertrophie und Histopathologiebefunden ohne einer gestörten Faseranordnung und interstitieller Fibrose, wurde eine genomweite Linkage-Analyse durchgeführt, um auf neue Ursachen der HCM zu stoßen. Beim direkten Sequenzieren der Sarkomergene und für die Glykogenspeicherkrankheit verantwortlichen Gene konnten keine Mutationen identifiziert werden. Nun wurde eine Linkage-Analyse unter Verwendung von STRs von Chromosom 1 bis 22 durchgeführt, um den Genlokus der Erkrankung zu identifizieren. Es wurde ein „Maximum LOD score" von 4,11 auf dem Lokus D7S669 erreicht. Durch die

Kopplungsanalyse konnten neun Gene identifiziert werden, die sich im kritischen Intervall befanden: SEC61G (γ-Untereinheit des Protein-Transportprotein SEC61), FKBP9 (FK506-bindendes Protein 9), PHKG1 (Phosphorylasekinase γ1), POM121 („nuclear pore membrane protein 121“), TBL2 („transducin (β)-like 2 isoform 1“), WBSCR18 („Williams Beuren Syndrome“-Chromosomenregion 18), TMPIT (Tumornekrosefaktor-α induziertes Transmembranprotein), POMZP3 („nuclear pore membrane protein Ap3“) und GNAI1 (α-Untereinheit des Guanin-Nucleotid-bindenden Protein G(i)). Diese wurden anhand der Basis ihres Expressionsprofils und ihrer Funktion als mögliche potentielle Kandidatengene angesehen. Die potentiellen neun Kandidatengene wurden schließlich sequenziert, es konnten jedoch keine krankheitsassoziierten Mutationen identifiziert werden. Dennoch wird vermutet, dass im identifizierten kritischen Intervall Gene liegen, die in die kontraktile Funktion des Herzmuskels oder in den Glukosestoffwechsel der Myozyten involviert sind. Mit dieser Studie sollte auch gezeigt werden, dass nicht alle Formen von kardialem Remodeling und myokardialer Hypertrophie denselben Krankheitsursprung haben und dass mit weiteren präzisen molekularen Techniken dem Krankheitsbild der HCM weiter nachgegangen werden muss (SONG *et al.*, 2006).

3.3.6. Modifizierende Gene und Umwelteinflüsse

In vielen Studien über die humane familiäre HCM wird der Aspekt aufgegriffen, dass es entweder sekundäre Gene gibt, die den klinischen Phänotyp beeinflussen oder dass Gen-zu-Gen-Interaktionen mit dem ursächlich betroffenen Gen bestehen (DOOLAN, A. *et al.*, 2004b; MARIAN, 2002). In diesem Zusammenhang stellen Gene des Renin-Angiotensin-Alsosteron-Systems (RAAS) ein breites Forschungsgebiet dar. Eine Schlüsselkomponente des RAAS ist das Angiotensin converting enzyme (ACE)-Gen, welches bisher im Rahmen der Forschung an einigen kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinfarkt, Bluthochdruck und DCM ein großes wissenschaftliches Interessensgebiet darstellt (CAMBIEN *et al.*, 1992; DOOLAN, A. *et al.*, 2004b; LINDPAINTNER *et al.*, 1996; SCHUNKERT *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 2001). Das ACE-Gen befindet sich auf Chromosom 17 und besitzt eine polymorphe Region, in der entweder eine Insertion oder eine Deletion eines 287 bp-Fragments, dem so genannten I/D-Polymorphismus, vorkommt. Das ACE-Gen spielt eine enorme

Rolle im Zusammenhang mit myokardialem Wachstum und Blutdruckhomöostase. Obwohl in einigen Studien kein Zusammenhang zwischen ACE-Polymorphismus und linksventrikulärer Hypertrophie hergestellt werden konnte, zeigten andere Studien eine signifikante Korrelation (LINDPAINTNER *et al.*, 1996). Letztendlich konnte gezeigt werden, dass der D/D-Genotyp signifikant mit dem plötzlichen Herztod und dem Fortschreiten der myokardialen Hypertrophie assoziiert ist. Die Assoziation zwischen dem D/D-Genotyp und plötzlichem Herztod und/oder ventrikulärer Hypertrophie scheint mit dem ACE-Spiegel im Plasma im Zusammenhang zu stehen. Höhere ACE-Spiegel scheinen auf die lokale ACE-Genexpression und -Aktivität Einfluss zu nehmen. Die veränderte ACE-Homöostase in gleichzeitiger Anwesenheit eines Sarkomergendefekts könnte zu abnormalem myokardialem Wachstum führen (DOOLAN, G. *et al.*, 2004; TSOUTSMAN *et al.*, 2006b). Zudem wurden in der letzten Dekade auch weitere Polymorphismen innerhalb des RAAS identifiziert: im Angiotensinogen-Gen (AGT) (BRUGADA *et al.*, 1997; ISHANOV *et al.*, 1997), im Angiotensin II-Rezeptor-Typ-1-Gen (AGTR1) (BRUGADA *et al.*, 1997; OSTEROP *et al.*, 1998), im Aldosteronsynthetase-Gen (CYP11B2) (KUPARI *et al.*, 1998) und im kardialen Chymase-Gen (CMA) (PFEUFER *et al.*, 1996). Der AGTR1-Polymorphismus wurde mit einer höheren Angiotensin II Typ I Rezeptor-Responsivität assoziiert (AMANT *et al.*, 1997; VAN GEEL *et al.*, 1998), während der CYB11B2-Polymorphismus mit kardialer Hypertrophie bei gesunden Individuen in Verbindung gebracht wurde (KUPARI *et al.*, 1998). Der CMA-Polymorphismus wurde mit der HCM assoziiert (PFEUFER *et al.*, 1996).

In einer Familie, in der eine MYBPC3-Mutation autosomal dominant vererbt wurde, wurden gleichzeitig Gene des RAAS (I/D-Polymorphismus, DCP1, CMA, AGT, CYP11B2 und AGTR1) untersucht. Mutationen in RAAS-Genen waren sehr frequent und kamen auch in der gesunden Kontrollgruppe vor. Dennoch wiesen Patienten mit gemeinsamem Auftreten einer MYBPC3- und einer RAAS-Mutation eine signifikant schwerwiegendere linksventrikuläre Hypertrophie auf (ORTLEPP *et al.*, 2002). In einer anderen Studie zeigte das Vorhandensein des ACE-DD-Polymorphismus eindeutige modifizierende Wirkung auf die linksventrikuläre Hypertrophie von HCM-Patienten mit MYBPC3-Mutationen (PERKINS *et al.*, 2005). Es wurde weiterhin bereits belegt, dass trophische und mitotische Faktoren Einfluss auf den klinischen

Phänotyp und den Schweregrad der Hypertrophie nehmen. Beispiele hierfür wären eine Hochregulierung des „transforming growth factor-beta 1“, des „Insulin-like growth factor-1“ und des Endothelin-1, welche im Zusammenhang mit der Ausbildung des klinischen Phänotyps gestellt werden konnten (BRUGADA *et al.*, 1997; HASEGAWA *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997).

Ein weiteres Interessengebiet der HCM-Forschung stellt die Fragestellung nach dem Einfluss von Umweltfaktoren auf das klinische Erscheinungsbild der humanen familiären HCM dar. Umwelteinflüsse wie Sport, Ernährung, Blutdruck und Körpertemperatur werden als potentielle Einflussfaktoren angesehen. Eine eindeutige klinische Assoziation besteht zwischen Hochleistungssport und dem plötzlichen Herztod im Rahmen der HCM. 70 % der HCM-Patienten, die aufgrund eines plötzlichen Herztodes sterben, waren vorher oder währenddessen sportlich aktiv (DOOLAN, A. *et al.*, 2004a; LIBERTHSON, 1996; MARON *et al.*, 1996b). Der genaue molekulare oder pathologische Zusammenhang mit Sport und plötzlichem Herztod ist unbekannt, dennoch scheint ein größeres Ausmaß von interstitieller Fibrose, gestörter myofibrillärer Faseranordnung und Myozytenhypertrophie einen bedeutenden Einfluss auf den plötzlichen Herztod während des Sports darzustellen (MARON, 2003). Eine weitere Ursache des familiär gekoppelten plötzlichen Herztodes stellt eine Dysregulation des Ca^{2+} dar (BAUCE *et al.*, 2002; ELDAR *et al.*, 2003; POSTMA *et al.*, 2002; PRIORI *et al.*, 2001; WEHRENS & MARKS, 2003). Eine spontane Ca^{2+}-Ausschüttung aus dem SR während der Diastole endet in späten Nachdepolarisationen („delayed afterdepolarizations“ = DAD). Wenn die Amplitude der DAD größer ist als die des normalen Schwellenpotentials kommt es zur Depolarisation und zur Auslösung von lebensbedrohlichen Arrhythmien (TSOUTSMAN *et al.*, 2006b).

3.3.7. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

In Genotyp-Phänotyp-Studien werden häufig die Ausdrücke „variable Penetranz“ und „variable Expressivität“ genetisch bedingter Erkrankungen verwendet, welche die Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp beeinflussen. Die Penetranz einer Erkrankung beschreibt den Anteil von Patienten mit einer kausalen Mutation, die tatsächlich Merkmale der jeweiligen Erkrankung entwickeln. Von einer variablen Expressivität hingegen spricht man, wenn der Grad der Merkmalsausprägung bei unterschiedlichen Patienten mit derselben Mutation betrachtet wird (KRÄUßLICH & BREM, 1997). Um das Potential

kausaler Mutationen auf die phänotypische Expression abzuschätzen, wurden in der Humanmedizin bezüglich der familiären HCM bereits für eine limitierte Anzahl von Mutationen verschiedener Gene Genotyp-Phänotyp-Studien durchgeführt (CHARRON *et al.*, 1998; EPSTEIN *et al.*, 1992; MARIAN *et al.*, 1995a; TESSON *et al.*, 1998; WATKINS *et al.*, 1995b; WATKINS *et al.*, 1992). Einige Faktoren wie die Größe der untersuchten Familien, die geringe Anzahl von Familien mit denselben Mutationen, die variierende Expressivität innerhalb der Familien und die geringe Frequenz der beschriebenen Mutationen sowie der Einfluss modifizierender Gene oder nicht genetischer Faktoren auf die phänotypische Expression stellten die Limitationen oben genannter Studien dar (MARIAN & ROBERTS, 2001). Generell wird jedoch davon ausgegangen, dass Mutationen im β-MHC-Gen vor allem bei jüngeren Patienten eine HCM verursachen, welche mit schwerwiegender Hypertrophie und häufigerem Auftreten von plötzlichem Herztod im Vergleich zu anderen kausalen Genen (MYBPC3, TPM1) einhergeht (CHARRON *et al.*, 1998; NIIMURA *et al.*, 1998). Mutationen im MYBPC3 und im TPM1 werden generell mit einer geringen Penetranz, milder Hypertrophie und einer geringen Inzidenz von plötzlichem Herztod in Verbindung gebracht. Dennoch konnten bisher auch bei MYBPC3- und TPM1-Mutationen maligne Formen beobachtet werden; nicht zuletzt scheinen diese durch modifizierende Faktoren verursacht zu werden (ORTLEPP *et al.*, 2002; TSOUTSMAN *et al.*, 2006b). Auch eine Form der hypertensiven HCM bei älteren Patienten ist mit MYBPC3-Mutationen zu vergesellschaften (NIIMURA *et al.*, 1998). Bezüglich Patienten mit Mutationen im MYBPC3 wird beschrieben, dass diese erst im Erwachsenenalter (im Alter zwischen 30 und 40 Jahren) eine phänotypisch offensichtliche HCM entwickeln können und die Erkrankung somit eine altersabhängige Penetranz aufweist (MARON *et al.*, 2001; NIIMURA *et al.*, 1998). In einer Langzeit-Follow-up-Studie zeigten für MYBPC3 Genotyp-positive Patienten im Alter von über 50 Jahren sogar eine Penetranz von 100 % (KUBO *et al.*, 2005). Eine Einschätzung des Erkrankungsrisikos von Mutationsträgern ohne linksventrikulärer Hypertrophie kann laut MARON und Mitarbeitern (2001) nicht getroffen werden, jedoch geben obige Ergebnisse Anlass zu engmaschigeren kardiologischen Screenings Genotyp-positiver Individuen und derer Verwandter bis ins hohe Alter, um frühzeitig Symptome erkennen und behandeln zu können. Genotyp-positive herzgesunde Individuen werden angehalten, auf Hochleistungssport zu verzichten

und ihren Lebensstil dem Risikofaktor „Mutation“ anzupassen (MICHELS *et al.*, 2007). In Tabelle 1 ist ersichtlich, in welchen Genen in der Humanmedizin bis zum heutigen Tage Mutationen, die mit der HCM in Verbindung gebracht werden, detektiert werden konnten.

Tabelle 1: Potentielle Kandidatengene für die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), modifiziert nach BOS und Mitarbeiter, 2007a.

	Gen	**Lokus**	**Protein**
Sarkomer-HCM	TTN	2q24.3	Titin
	MYH7	14q11.2-q12	β-Myosinschwerkette
	MYH6	14q11.2-q12	α-Myosinschwerkette
	MYL2	12q23-q24.3	Regulatorische Myosinleichtkette
	MYL3	3p21.2-p21.3	Essentielle Myosinleichtkette
	MYBPC3	11p11.2	Kardiales Myosin binding protein C
	TNNT2	1q32	Kardiales Troponin T
	TNNI3	19p13.4	Kardiales Troponin I
	TPM1	15q22.1	α-Tropomyosin
	ACTC	15q14	Kardiales α-Aktin
Z-Scheiben-HCM	LDB3	10q22.2-q23.3	LIM bindende Domäne 3 (alias ZASP)
	CSRP3	11p15.1	Muskel-LIM-Protein
	TCAP	17q12-21.1	Telethonin
	ACTN2	1q42-q43	α-Aktinin 2
	VCL	10q22.1-q23	Vinculin/Metavinculin
	MYOZ2	4q26-q27	Myozenin 2 (Calsarcin 2)
Kalzium-metabolismus-assoziierte-HCM	RyR2	1q42.1-q43	Kardialer Ryanodinrezeptor
	JPH2	20q12	Junctophilin-2
	PLN	6q22.	Phospholamban
Metabolische HCM	PRKAG2	7q35-q36.36	AMP-aktivierte Proteinkinase
	LAMP2	Xq24	Lysosom-assoziiertes Membranprotein 2
	GLA	Xq22	α-Galaktosidase A
	FXN	9q13	Frataxin

3.4. Pathogenese

Im Bezug auf die Entstehung der Hypertrophie des Herzmuskels sind bis heute trotz intensiver Forschung viele Fragen offen geblieben. Ob die Hypertrophie kompensatorisch, pathologisch oder aufgrund von Energiedefiziten des Herzmuskels entsteht und welche molekularen Abläufe stattfinden, ist bis heute Gegenstand intensiver Forschung. Zunächst wird im Folgenden darauf eingegangen welche Veränderungen auf pathologischer und pathohistologischer Ebene bei der HCM präsent sind.

3.4.1. Pathologie und Pathohistologie

Die HCM wird makroskopisch durch eine generalisierte oder asymmetrische linksventrikuläre Hypertrophie gekennzeichnet (DAVIES & MCKENNA, 1995). Ein erhöhtes Herzgewicht, welches im Verhältnis zum Körpergewicht beurteilt wird, stellt ein erstes typisches pathologisches Indiz für eine HCM dar. Durch die Hypertrophie der Papillarmuskeln bei der HCM wird das septale Mitralklappensegel in den linksventrikulären Ausflusstrakt gezogen. Hierbei entsteht durch ein ständiges mechanisches Trauma eine septale Wulst („sigmoid septum“) mit endokardialer Fibroseneigung auf Höhe der Herzbasis, welche als zweites wichtiges Indiz für eine HCM herangezogen wird (DAVIES & MCKENNA, 1995; POMERANCE & DAVIES, 1975; SHAH *et al.*, 1981). Bei der Autopsie ist es wichtig, dass diese septale Wulst nicht überinterpretiert wird. Letztere liegt auch häufig bei älteren Patienten (GOOR *et al.*, 1969; WALLER, 1988; WALLER & ROBERTS, 1983), bei systemischer Hypertension oder bei Anwesenheit einer Subaortenstenose vor (DALLDORF & WILLIS, 1985; GOOR *et al.*, 1969). Die generalisierte Form der HCM kommt bei 42 % der Patienten vor (DAVIES & MCKENNA, 1995), wobei eine Studie zeigt, dass diese Form prädominant bei älteren Patienten in Erscheinung tritt, während jüngere Patienten eher die asymmetrische Form zeigen (LITOVSKY & ROSE, 1998). Andere Ultraschallstudien widersprachen dieser Tatsache allerdings (LAI *et al.*, 1999). Bei 17,6 % der Patienten mit generalisierter oder asymmetrischer HCM konnte zudem eine Beteiligung der rechten Kammer nachgewiesen werden (DAVIES & MCKENNA, 1995). Die Lokalisation der asymmetrischen Hypertrophie bei der HCM kann dennoch sehr variieren (DAVIES & MCKENNA, 1995; WIGLE *et al.*, 1985), wobei einige bestimmte Lokalisationen der Hypertrophie, z. B. mittkavitär oder apikal eher seltener sind (FALICOV *et al.*, 1976; FIGHALI *et al.*, 1987; MARON *et al.*, 1996a). Die apikale HCM hielt man für eine geographisch abhängige HCM-Variante und wurde zunächst in Japan beschrieben (SAKAMOTO *et al.*, 1976). Diese Form konnte dann aber auch vermehrt bei Patienten westlicher Abstammung gefunden werden (WEBB *et al.*, 1990; WIGLE, 2001). Eine asymmetrische Ausprägung der HCM wird in der Pathologie mittels Querschnitten im 10 mm-Abstand verifiziert und die Septum/Freie Wand-Ratio sollte nicht größer als 1,3 sein (MARON *et al.*, 1977; ROSE, 1984). Ein weiteres pathologisches Indiz für eine HCM sind weiß-graue narbenartige Verfärbungen, die vor allem im Septum auftreten und schon

makroskopisch eine Fibrose erkennen lassen (MARON *et al.*, 1977; UNVERFERTH *et al.*, 1987). Das morphologische Spektrum der HCM wird dadurch erweitert, dass eine linksventrikuläre Dilatation in der so genannten „Burned out"-Phase das makroskopische Bild prägt, was bei circa 10 % der Patienten vorkommt (HINA *et al.*, 1993; SEILER *et al.*, 1995; YUTANI *et al.*, 1985). Letzteres entsteht durch Zugrundegehen des Myokardiums aufgrund von Ischämie und Ersatzfibrose. Hierbei scheinen genetische Faktoren eine Rolle zu spielen, z. B. konnte eine K27Z-Punktmutation im kardialen Troponin T-Gen mit einer Neigung zur Dilatation in Verbindung gebracht werden (FUJINO *et al.*, 2002). Ein weiterer und gleichzeitig der wichtigste Aspekt, der bei der pathologischen Diagnosestellung der HCM erfüllt werden muss, ist die gestörte Anordnung der Myozyten, welche aber nur regional vorkommt. Diese wird durch eine windrad- oder fischgrätenartige Anordnung (Abbildung 7) mit entweder senkrecht oder schräg zueinander stehenden Muskelfasern um zentrale Kollagenbereiche gekennzeichnet (DAVIES & MCKENNA, 1995; MARON *et al.*, 1981a; MARON *et al.*, 1992; TANAKA *et al.*, 1986).

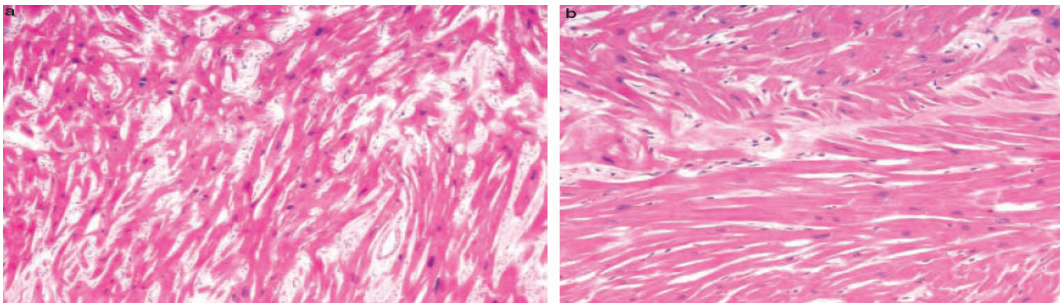


Abbildung 7: Gestörte Myozytenanordnung bei der hypertrophen Kardiomyopathie um Foki interstitiellen Kollagens in a) Windrad- und b) Fischgrätenmuster (HUGHES, 2004).

Diese gestörte Myozytenanordnung ist nicht unbedingt in der Gegend der maximalen Hypertrophie lokalisiert, sondern eher in normalen bis nur mild hypertrophierten Regionen (MARON *et al.*, 1992). Die Gegenden der maximalen Hypertrophie werden viel mehr durch architektonisch dysorganisierte Zellen geprägt. Dennoch kann bei Athleten und Kindern in der Wachstumsphase, die oft strukturelle Abnormalitäten im Herzmuskelgewebe aufweisen, ein ähnliches Bild vorhanden sein. Daher kann die Histologie in der pathologischen Diagnosefindung bei Athleten und Kindern Probleme bereiten. Ähnliche Veränderungen können auch bei anderen kongenitalen Herzerkrankungen oder

erworbenen Herzerkrankungen vorkommen (BULKLEY *et al.*, 1977; MARON *et al.*, 1979; MARON *et al.*, 1986a; TANAKA *et al.*, 1986; VAN DER BEL-KAHN, 1977). Wichtig ist jedoch, dass eine gestörte Myozytenanordnung bei sekundärer Hypertrophie des Herzens durch systemische Hypertonie oder Aortenstenose nicht vorkommt. Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass eine ungeordnete Myozytenanordnung physiologischer Weise an den Stellen, wo sich die posteriore und anteriore Wand mit dem Septum verbinden oder z. B. in der Nähe von Blutgefäßen vorkommt (MARON *et al.*, 1992). Um einen Konsensus zu finden, wann die Menge der gestörten Myozytenanordnung die Kriterien für die HCM erfüllt, müssen mindestens 5 % der septalen Myozyten eine gestörte Anordnung aufweisen. Einige Pathologen sprechen aber von mindestens 10 % und halten 5 % für zu wenig, um eine sichere Diagnose zu stellen (DAVIES, 1984; MARON & ROBERTS, 1979). Bei den meisten HCM-Fällen zeigen jedoch mehr als 20 % der septalen Myozyten eine gestörte Anordnung (DAVIES & MCKENNA, 1995). Somit gilt dieses Phänomen als wichtigstes spezifisches und sensitives pathologisches Indiz für eine HCM (MARON *et al.*, 1981a; ST JOHN SUTTON *et al.*, 1980; TANAKA *et al.*, 1986). Ein zudem wichtiges pathohistologisches Kriterium, welches für eine HCM spricht, ist die Hypertrophie der Myozyten in der subendokardialen Region (MARON & ROBERTS, 1979; UNVERFERTH *et al.*, 1987). Außerdem ist der Zellkern bei der HCM oft pleomorph, vergrößert und zeigt zudem eine Hyperchromasie. Innerhalb der Myozyten wird die HCM durch eine ungeordnete myofibrilläre Architektur geprägt. Diese gestörte Ultrastruktur kann mittels Spezialfärbungen wie der PTAH-Färbung („phosphotungstic acid hematoxylin“) nach Mallory sichtbar gemacht werden (HUGHES, 2004). Weiterhin ist die HCM auch durch eine Zunahme von interstitiellem Bindegewebe mit einer veränderten Kollagenfasermorphologie gekennzeichnet (FACTOR *et al.*, 1991; SHIRANI *et al.*, 2000; ST JOHN SUTTON *et al.*, 1980). Die Fibrose kann perizellulär, fokal oder sehr ausgedehnt stattfinden, wobei das Septum zumeist schwerer betroffen ist als die linke freie Wand (MARON *et al.*, 1977; UNVERFERTH *et al.*, 1987). In manchen Fällen kann die gestörte Myozytenanordnung durch die extreme Fibrose maskiert werden (HUGHES, 2004). Die histologische Darstellung einer massiven interstitiellen Fibrose mittels modifizierter Massonfärbung ist in Abbildung 8 ersichtlich.

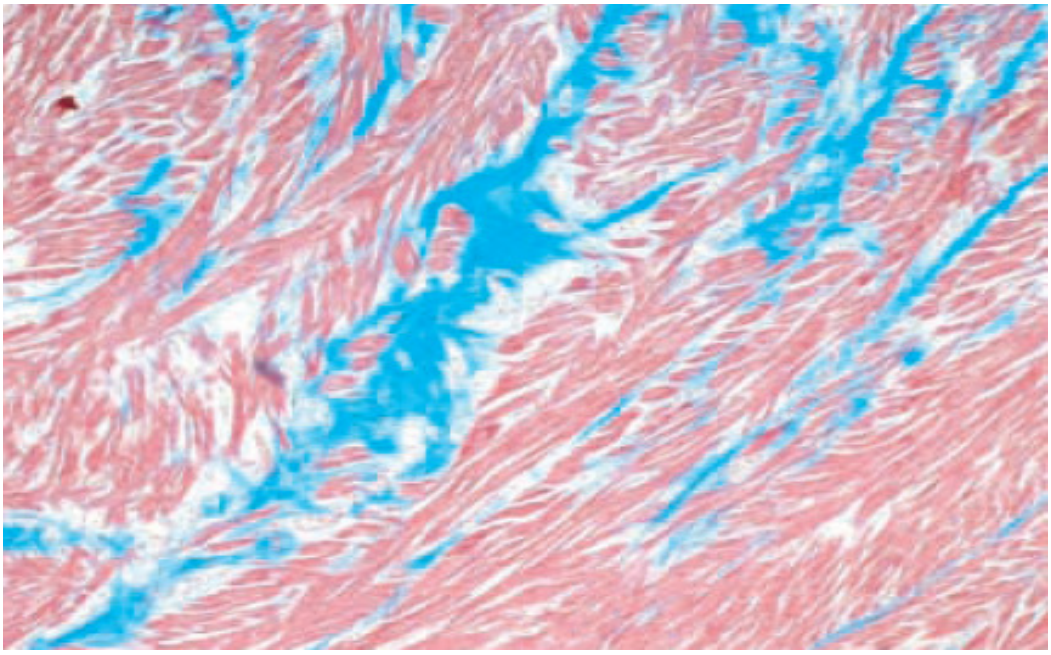


Abbildung 8: Darstellung einer massiven interstitiellen Fibrose (blau) im Myokard mittels modifizierter Massonfärbung (HUGHES, 2004).

Auch die intramyokardialen Arterien und Kapillaren erfahren im Rahmen der HCM gewisse histologisch erkennbare Veränderungen (MARON *et al.*, 1986b; 1987; TAKEMURA *et al.*, 1998). Viele der intramuralen Koronararterien zeigen ein schmales Lumen aufgrund von Hyperplasie der Intima- und Mediamyozyten (MARON *et al.*, 1986b). Zudem werden die intramuralen Gefäße bei der HCM vermehrt von Kollagen umgeben, wobei ein erhöhter Kollagengehalt auch innerhalb der Media gesehen werden kann (SHIRANI *et al.*, 2000). Die so genannte „small vessel disease“ scheint mit dem Fibrosegrad bei der HCM zu korrelieren und führt letztendlich zu Ischämien, Myozytenverlust und schließlich zur „Burned out“-HCM (IIDA *et al.*, 1998; TAKEMURA *et al.*, 1998). Die Kombination aus gestörter Myozytenanordnung und/oder Ischämie kann dann zu lebensgefährlichen elektrischen Inbalancen führen, die den plötzlichen Herztod verursachen (BASSO *et al.*, 2000).

3.4.2. Pathophysiologie

Der Hauptmechanismus, der den klinischen Phänotyp einer Sarkomer-HCM herbeiführt, beruht auf der Theorie des „poison polypeptide“-Effekts. Es wird postuliert, dass durch Mutationen fehlerhafte Polypeptide entstehen, die mit normalen (Wildtyp-) Proteinen interferieren. Diese Hypothese beruht darauf, dass aufgrund der Sarkomermutation ein abnormales Protein erzeugt wird und dadurch wiederum malfunktionierende Sarkomere entstehen. Durch den daraus

resultierenden Stress im Myokardium werden die malfunktionierenden Sarkomere durch intakte Sarkomere ersetzt, es entsteht folglich eine kompensatorische Hypertrophie (CUDA *et al.*, 1993; LANKFORD *et al.*, 1995; MARIAN & ROBERTS, 1995; SWEENEY *et al.*, 1994). Ein alternativer Mechanismus ist die so genannte Haploinsuffizienz oder „null allel"-Theorie, bei welcher in Abwesenheit eines Allels oder dessen Proteinprodukts insuffiziente Mengen des normalen Wildtypproteins produziert werden. Dies führt zu einer Inbalance in der Sarkomerstöchiometrie und zu einer mangelhaften mechanischen Myozytenfunktion (DALLOZ *et al.*, 2001; HUGHES, 2004; MARIAN & ROBERTS, 2001). So entstehen durch mutierte Proteine strukturelle und funktionale Defekte im Sarkomer, die für erhöhten Stress der Myozyten verantwortlich sind. Daraufhin werden stressresponsive extrinsische und intrinsische Faktoren stimuliert, welche die transkriptionelle Maschinerie der Kardiomyozyten aktivieren. Extrinsische Faktoren bestehen aus vasoaktiven Peptiden (z. B. Angiotensin II oder Endothelin-1, α1-adrenerge Agonisten (z. B. Norepinephrin, Epinephrin, Phenylephrin), Aktivatoren der Proteinkinase C (z. B. Tumor produzierende Phorpholester), Peptidwachstumsfaktoren (z. B. „insulin-like growth factor"), Zytokinen (z. B. Kardiotrophin-1), Arachidonmetaboliten (z. B. Prostaglandin F2α) sowie mechanischen Reizfaktoren. Intrinsische Faktoren stellen ein erhöhter $[Ca^{2+}]_i$-Spiegel, das heterotrimerische G-Protein Gq', aktivierte kleine G-Proteine und transkriptionelle Faktoren dar (FATKIN & GRAHAM, 2002; HASEGAWA *et al.*, 1996; HUGHES, 2004; LI *et al.*, 1997). Letztendlich kommt es zu einer kompensatorischen Hypertrophie, einer gestörten Myozyten- und Muskelfaseranordnung, zu Veränderungen der Zellmorphologie und zur Fibrose (BONNE *et al.*, 1998; HUGHES, 2004; MARIAN, 2000; MARIAN & ROBERTS, 2001; MARIAN *et al.*, 2001; REDWOOD *et al.*, 1999). Eine Illustration der HCM-Pathogenese erfolgt in Abbildung 9. Vor einigen Jahren konnte beobachtet werden, dass transgene Mäuse mit einer Expression von aktiviertem Kalzineurin eine linksventrikuläre Hypertrophie entwickelten, der unter Verabreichung von Kalzineurininhibitoren wie Cyclosporin oder FK506 vorgebeugt werden konnte (MOLKENTIN *et al.*, 1998). Kalzineurin ist eine zytoplasmatische Proteinphosphatase, die durch $[Ca^{2+}]_i$ aktiviert wird und im aktivierten Zustand NFAT3-Transkriptionsfaktoren („nuclear factor of activated T cells") dephosphoryliert. Letztere werden in den Nukleus transloziert, wo sie

mit GATA4 („cardiac-restricted zinc finger transcription factor“) eine Bindung eingehen. Schließlich resultiert daraus eine Aktivierung embryonaler kardialer Gene, die eine Hypertrophie stimulieren können. Andere Studien bewiesen jedoch eine zusätzliche Anwesenheit oben beschriebener extrinsischer und intrinsischer Hypertrophiefaktoren. In einer Folgestudie entwickelten α-MHC$^{403/+}$-Mäuse bei der Verabreichung von Cyclosporin paradoxerweise einen dramatisch erhöhten Schweregrad linksventrikulärer Hypertrophie, welchem bei zusätzlicher Verabreichung von dem Kalziumkanalblocker Diltiazem vorgebeugt werden konnte. Trotzdem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der Kalziumhaushalt eine große Rolle bei der Ausbildung der linksventrikulären Hypertrophie im Rahmen der HCM spielen könnte. Durch Mutationen im RAAS, die die Konzentration des ACE-Spiegels erhöhen, können via Angiotensin II zusätzlich Onkogene induziert werden, die in die Regulation des Zellwachstums involviert sind (MARIAN *et al.*, 1993). Gleichzeitig wird vermutet, dass Umwelteinflüsse ebenfalls Einfluss auf oben genannte Systeme nehmen können (HUGHES, 2004; MARIAN, 2002).

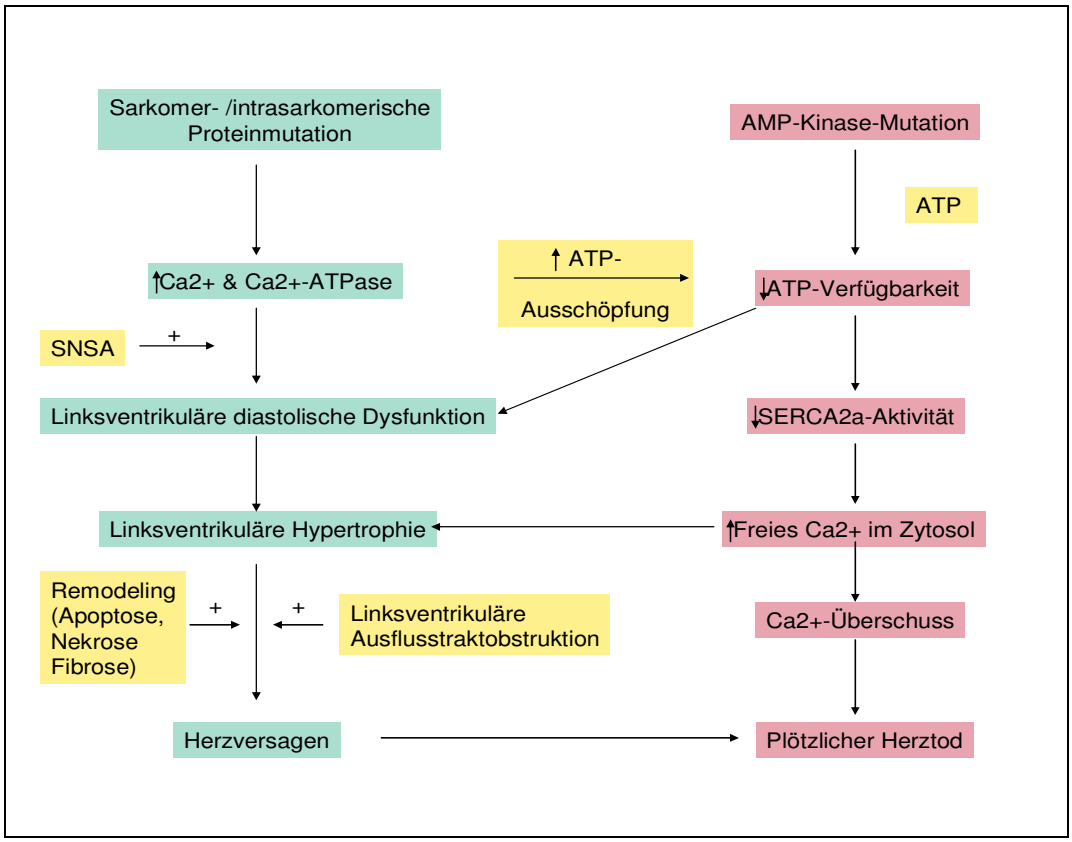


Abbildung 9: Hypothese zur Pathogenese der hypertrophen Kardiomyopathie modifiziert nach FATKIN und GRAHAM (2002). SERCA2a: Sarkoendoplasmatische Retikulum-Ca2+-ATPase, SNSA: Sympathikus-Aktivität.

3.5. Diagnose

Betroffene Patienten, die an HCM erkrankt sind, zeigen bei der klinischen Ausprägung dieser Erkrankung eine starke Variabilität. Genotyp-positive Individuen können lebenslang asymptomatisch bleiben oder Symptome wie Palpitationen, Synkopen, kongestives Linksherzversagen zeigen oder dem plötzlichen Herztod erliegen. Auch das Alter, in welchem erste Symptome auftreten, ist selbst unter denselben Genotypen variabel.

Das Diagnostikum der Wahl stellt derzeit nach wie vor die transthorakale zweidimensionale Echokardiographie dar. Als wichtige diagnostische Kennzeichen der HCM werden die asymmetrische Hypertrophie (septale enddiastolische Wanddicke $\geq$ 13 - 15 mm und Verhältnis Septum/posteriore Wand $\geq$ 1,5:1) des linken und rechten Ventrikels mit oder ohne einer linksventrikulären Ausflusstraktsobstruktion angesehen (TAM *et al.*, 2002). Allerdings kann auch eine Hypertrophie der Papillarmuskeln das einzige Anzeichen einer HCM sein (KOBASHI *et al.*, 1998; POETTER *et al.*, 1996). Die asymmetrische septale Hypertrophie kann das anteriore Septum isoliert, panseptal oder panseptal mit Ausbreitung in die anterolaterale Wand betreffen (MARON *et al.*, 1981b; SHAPIRO & MCKENNA, 1983). Weiterhin kann die Hypertrophie symmetrisch sein oder isoliert die inferiore, posterobasale oder laterale Wand mittventrikulär oder apikal betreffen (MARON *et al.*, 1981b; SAKAMOTO, 2001; SHAPIRO & MCKENNA, 1983). Tangentielle oder schräge Bilder müssen bei der echokardiographischen Untersuchung vermieden werden und können nicht zur Messung herangezogen werden (MOVSOWITZ *et al.*, 1993). Die Wanddicken werden in der Humanmedizin normalerweise im M-Mode und im zweidimensionalen Schallbild gemessen. Anatomischer M-Mode bietet die Möglichkeit einer genaueren Platzierung des M-Mode-Cursors und sollte generell zusätzlich angewandt werden (PALMES *et al.*, 2000; STROTMANN *et al.*, 1999). In allen Fällen sollte das radiale und longitudinale Ausmaß der Hypertrophie in die Beurteilung mit einbezogen werden. Dennoch kann bei alleinigem Vorhandensein einer asymmetrischen Hypertrophie noch lange nicht auf eine HCM geschlossen werden und die klinische Diagnose wird letztendlich durch Ausschlussdiagnostik von Erkrankungen, die sekundär eine Hypertrophie der linken und rechten Kammerwand hervorrufen können, z. B. systemische Hypertension, Aortenstenose, Lungenhochdruck, Pulmonalstenose, oder Eisenmengersyndrom gestellt (ERIKSSON *et al.*, 2002; TAM *et al.*, 2002).

Als weiteres diagnostisches Kriterium im Ultraschall wird die linksventrikuläre Ausflusstraktobstruktion herangezogen, welche durch multifaktorielle Ursachen bei der HCM zustande kommt. Als Ursachen der linksventrikulären Ausflusstraktobstruktion und des so genannten SAMs (systolic anterior motion des septalen Mitralklappensegels) werden die durch die septale Hypertrophie hervorgerufene Verengung des linksventrikulären Ausflusstrakts, die anteriore Platzierung des septalen Mitralklappensegels und Submitralapparates und die hyperdynamische systolische Funktion des LV angesehen (HENRY *et al.*, 1975; SPIRITO & MARON, 1983). Es wird kontrovers diskutiert, ob eine venturieffektartige Kraft das septale Mitralklappensegel in den linksventrikulären Ausflusstrakt zieht (SHERRID *et al.*, 2000). SAM kann meistens schon im zweidimensionalen Schallbild und mittels M-Mode-Darstellung erkannt werden. Zur genauen Beurteilung der Ausflusstraktobstruktion wird in der Ultraschalluntersuchung der Farbdoppler herangezogen, um die hohe Geschwindigkeit und die Lokalisation des SAMs über dem linksventrikulären Ausflusstrakts darzustellen. Zur Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit wird dann die Funktion des Blutflussdopplers herangezogen. Zunächst wird mit dem Pulse wave-Doppler (PW) die Lokalisation der Obstruktion dargestellt und dann mittels Continious wave-Doppler (CW) die maximale Geschwindigkeit ermittelt. Charakteristisch ist der späte Peak im Blutflussdopplersignal, welches sich in einer dolchartigen (dagger-shaped) Form darstellt (TAM *et al.*, 2002). Bei HCM-Patienten, die nur eine minimale (< 25 mmHg) oder keine Ausflusstrakt-obstruktion zeigen, soll die frequenzabhängige Ausflusstraktobstruktion durch Veränderung der Körperposition, durch Valsalva-Manöver oder durch Inhalation von Amylnitrit provoziert werden (SASSON *et al.*, 1990). Es wird eine gute Korrelation zwischen dem Grad der Ausflusstraktobstruktion und dem Grad sowie der Art der Hypertrophie beschrieben (SASSON *et al.*, 1990). Ein weiteres echokardiographisches Diagnostikum stellt die Beurteilung der systolischen und diastolischen Funktion dar. Im Rahmen der HCM tritt aufgrund von strukturellen und funktionalen Abnormalitäten im Herzmuskel eine systolische und diastolische Dysfunktion bereits in Stadien ohne Anwesenheit morphologischer Veränderungen im zweidimensionalen Schallbild ein (RAJIV *et al.*, 2004). Bis vor kurzem galt die echokardiographische Beurteilung der globalen diastolischen Funktion mittels Blutflussdopplerprofilen (transmitraler Blutfluss, Pulmonal-venenfluss, isovolumische Relaxationszeit) als Mittel der Wahl. Blut-

flussdopplerprofile werden jedoch stark von Herzfrequenz, Vorlast und Patientenalter beeinflusst. So kann es im Rahmen des Krankheitsverlaufs durch die Lastabhängigkeit zu einer so genannten Pseudonormalisation der Blutflussprofile kommen, wobei eine Unterscheidung zwischen physiologischen und pathologischen Blutflussprofilen nicht mehr möglich ist (GROBAN & DOLINSKI, 2005; OH *et al.*, 2006; SHIMIZU *et al.*, 1998). Eine moderne Alternative zur Beurteilung der diastolischen Funktion bietet die Messung der Gewebegeschwindigkeit (TVI), Strain und Strain Rate, welche weniger Vor- und Nachlast abhängig sind. Hierbei können lokal die diastolischen Kurvenverläufe auf ihre Maxima sowie Beginn und Dauer der diastolischen Zeiten und der isovolumischen Relaxationszeit untersucht werden. Mit dieser Methode können auch pseudonormale Einflussprofile von normalen Einflussprofilen unterschieden werden. Der Grad der Hypertrophie korreliert hierbei mit dem Grad der Reduktion der Strain-Werte (NAGUEH *et al.*, 2003; RAJIV *et al.*, 2004; SUTHERLAND *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2003). Die Messung von TVI, Strain und Strain Rate bietet eine gute Möglichkeit, den klinischen Verlauf von HCM-Patienten zu verfolgen. Zudem stellen diese Messungen ein wichtiges Diagnostikum dar, da die genetische Diagnose aufgrund der Vielzahl vermuteter unbekannter Mutationen nicht immer gestellt werden kann.

Kommerzielle Gentests erlauben eine akkurate Diagnose von Mutationsträgern in Sarkomergenen, im PRKAG2-Gen und im LAMP2-Gen, ohne dass eine klinische Diagnose der HCM vorhanden sein muss. Hierbei werden in der Regel bidirektionale DNA-Sequenzanalysen durchgeführt, um kausale Sequenz-varianten zu identifizieren. Genetische Tests bei neuen Patienten auf bereits bekannte Mutationen haben sich als nicht hilfreich erwiesen, deshalb soll in der Regel immer ein systematisches Sequenzscreening durchgeführt werden, wobei am häufigsten sowohl bei sporadischer als auch bei familiärer HCM die Gene MYH7 und MYBPC3 betroffen sind (RICHARD *et al.*, 2003). Nur so kann die Diagnose der familiären HCM (82 % aller genotypisierten Familien) definitiv gestellt werden und bei weiteren Familienmitgliedern kann so eingeschätzt werden, ob durch Anwesenheit einer Mutation ein Risiko der Erkrankung existiert. Familienmitglieder, die keine Mutationsträger sind, können somit von den teuren kardiologischen Folgeuntersuchungen ausgeschlossen werden. Bei nur 60 % der Patienten mit einer im Ultraschall offensichtlichen HCM kann eine Sarkomermutation gefunden werden. Folglich bleibt der genetische Status bei

vielen Patienten undefiniert. Ein genetischer Ursprung kann dennoch auch bei diesen Patienten nicht ausgeschlossen werden (HO & SEIDMAN, 2006).

4. Feline familiäre hypertrophe Kardiomyopathie

Die feline HCM stellt die häufigste Herzerkrankung der Katze dar und ist durch eine primäre Hypertrophie des Myokardiums vorwiegend im LV gekennzeichnet. Seit den 70er Jahren wird die feline HCM als häufigste Ursache für Linksherzversagen, plötzlichen Herztod und systemische Thrombembolie angesehen. In ihrer Vererbung, der Klinik und der Prävalenz gleicht sie der humanen familiären HCM (KITTLESON *et al.*, 1999). In den nachfolgenden Kapiteln werden Prävalenz, Klinik, genetische Studien und diagnostische Möglichkeiten der felinen familiären HCM näher beschrieben.

4.1. Definition und Klassifizierung

Die feline HCM ist eine primäre myokardiale Erkrankung und fällt unter den Überbegriff der Kardiomyopathien. „Primär“ bedeutet, dass die myokardiale Erkrankung nicht sekundär durch andere Erkrankungen entsteht, z. B. durch Klappenerkrankungen, kongenitale oder andere systemische Erkrankungen. Die felinen Kardiomyopathien werden nach wie vor als primäre myokardiale Erkrankungen angesehen und auf eine kausative Einteilung, wie in der Humanmedizin neuerdings angewandt, wird verzichtet. Derzeit werden fünf Formen der primären felinen Kardiomyopathien unterschieden: (1) hypertrophe Kardiomyopathie, (2) dilatative Kardiomyopathie, (3) restriktive Kardiomyopathie, (4) unklassifizierte Kardiomyopathie und (5) arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (KITTLESON, 2005).

4.2. Prävalenz und Klinik

Die HCM ist die häufigste Herzerkrankung der Katze (KITTLESON, 2005; RIESEN *et al.*, 2007b). Im Veterinary Teaching Hospital, University of California, Davis wurden in einem Zehnjahresintervall von 1986 bis 1996 249 Katzen mit mittelgradiger bis hochgradiger HCM vorgestellt. Die „School of Veterinary Medicine“ der Tufts University, North Grafton, verzeichnete ebenfalls in einem Zeitraum von zehn Jahren 260 Fälle von feliner HCM. Von einer ähnlichen Inzidenz in einem kürzeren Zeitraum wird aus dem Animal Medical Center in New York berichtet (FOX *et al.*, 1995; KITTLESON, 1998b; RUSH *et al.*, 2002). In einer neueren Studie wird aber schon von einer fast doppelt so

hohen Inzidenz berichtet. So wurden in der letzten Dekade bereits 447 Katzen mit einer moderaten bis hochgradigen HCM diagnostiziert. Gründe dafür sind der wachsende Bekanntheitsgrad der Erkrankung, Durchführung von Screening-Programmen und die höhere Genauigkeit der heutigen Ultraschallgeräte (KITTLESON, 2005). In einer schweizer Multicenterstudie wurden in drei Jahren (2002 bis 2005) insgesamt 144 Zuchtkatzen auf Herzerkrankungen gescreent, dabei lag bei 8,3 % der untersuchten Rassekatzen eine HCM vor (RIESEN *et al.*, 2007a).

Viele der betroffenen Patienten bleiben lange asymptomatisch. Ein erster Hinweis für diese Erkrankung im Herzultraschall ist häufig nur eine Verdickung der Papillarmuskeln. Die Hypertrophie der Kammerwände kann wie beim Menschen den Herzmuskel generalisiert betreffen, oder aber auch nur Teilabschnitte umfassen, also fokal auftreten. Die Muskulatur des Herzens wächst somit in den Kammerinnenraum, so dass sich das Lumen im Verhältnis zur Wandstärke erheblich verkleinert. Es kommt dadurch häufig zu einer endsystolischen Kammerobliteration (KITTLESON, 1998b). Das primäre Problem bei der HCM stellt eine diastolische Dysfunktion der Ventrikel dar, die sich nicht mehr ausreichend mit Blut füllen können, worauf es zu einem Rückstau in die Vorhöfe und anschließend in den Lungenkreislauf kommt. Die Bildung von Lungenödemen oder Pleuralergüssen sind die Folge, worauf die Katzen mit massiver Dys- und Tachypnoe häufig erst dann zum ersten Mal klinisch auffällig werden. Die Dyspnoe aufgrund von Linksherzversagen äußert sich bei Katzen eher mit Maulatmung und normalerweise nicht mit Husten. Zudem sind mit der HCM, wie auch mit anderen Kardiomyopathien, häufig Arrhythmien in der Form von ventrikulären oder supraventrikulären Extrasystolen vergesellschaftet. Bei einer massiven Vergrößerung des linken Atriums (LA) kann es zu Vorhofflimmern kommen. Bei einem vergrößerten Vorhof kann die Verlangsamung des Blutflusses zur Bildung von Thromben führen. Wie in der Humanmedizin kann diese Herzerkrankung auch mit dem plötzlichen Herztod einhergehen. Männliche Tiere sind von der felinen HCM häufiger, bzw. früher betroffen, als weibliche Katzen. Die Diagnose bei betroffenen Tieren kann im Alter zwischen einem halben Jahr und fünf Jahren gestellt werden (KITTLESON, 2005). Im Jahr 1996 berichteten KITTLESON und Mitarbeiter bereits von neun engverwandten Phänotyp-positiven Katzen aus einer Maine-Coon-Kolonie hinsichtlich der Entwicklung und des Fortschreitens

der HCM im Herzultraschall. Drei dieser Katzen waren das Kreuzungsprodukt aus zwei jeweils Phänotyp-positiven Elterntieren. Zwei dieser drei Katzen entwickelten bereits im Alter von sechs Monaten eine hochgradige HCM. Die dritte Katze zeigte ein hochgradiges SAM-Phänomen im Alter von dreieinhalb Jahren. Die anderen sechs Katzen waren Kreuzungsprodukte aus einem Phänotyp-negativen und einem Phänotyp-positiven Elterntier. Keines der Tiere zeigte eine hochgradige HCM vor Vollendung des ersten Lebensjahres. Die Schlussfolgerung der zuletzt erwähnten Studie war, dass die HCM bei Maine Coons zwischen dem ersten und vierten Lebensjahr einen hochgradigen Schweregrad erreicht (KITTLESON *et al.*, 1996). Bei den meisten betroffenen Maine-Coon-Katzen ist die HCM im ersten Lebensjahr nicht echokardiographisch präsent. Bei männlichen Maine Coons treten erste deutliche echokardiographische Veränderungen jedoch bereits ab dem zweiten Lebensjahr auf. Weibliche Tiere tendieren dazu, die HCM erst später zu entwickeln. Zumeist manifestierte sich die HCM bei weiblichen Maine Coons im Alter von drei Jahren. Jedoch zeigen einige wenige echokardiographische Anzeichen erst mit sechs bis sieben Jahren (KITTLESON, 2005). KITTLESON und Mitarbeiter berichteten im Jahr 1999 wiederum von Kreuzungsstudien zwischen Phänotyp-positiven und Phänotyp-negativen Maine Coons (Gruppe 1) sowie zwischen zwei Phänotyp-positiven Maine Coons (Gruppe 2). In Gruppe 1 entwickelten zwölf von 22 Katzenwelpen eine HCM. Bei elf der Phänotyp-positiven Tiere traten eindeutige Papillarmuskelveränderungen bereits im Alter zwischen neun und 21 Monaten auf. Ein weibliches Tier entwickelte die HCM erst mit 38 Monaten. Dieselben Tiere entwickelten im Alter zwischen 13 und 48 Monaten eine mittel- bis hochgradige HCM. In Gruppe 2 entwickelten drei von acht überlebenden Welpen eine HCM. Bei letzteren wurden phänotypische Veränderungen im Ultraschall bereits im Alter von vier bis sechs Monaten präsent (KITTLESON *et al.*, 1999). Bestimmte Rassen zeigen zudem eine Prädisposition für die HCM im Vergleich zu anderen Katzenrassen. Am häufigsten sind jedoch Hauskatzen betroffen (HÄGGSTRÖM, 2006; KITTLESON, 2005).

4.3. Genetik

Ein autosomal dominanter Erbgang der felinen HCM konnte bisher nur bei den Rassen Maine Coon und American Shorthair nachgewiesen werden. (KITTLESON *et al.*, 1999; KITTLESON *et al.*, 1997). Katzenrassen, die eine

Rasseprädisposition für die HCM zeigen, sind Maine-Coon-Katzen, American und British Shorthair, Burmesen, Norwegische Waldkatzen, Perser, Ragdoll-Katzen, Sibirische Katzen, Türkisch Van, Scottish Fold und Sphynx (HÄGGSTRÖM, 2006).

KITTLESON und Mitarbeiter konnten 1999 einen autosomal dominanten Erbgang der felinen HCM nachweisen, in dem sie mit einer echokardiographisch Phänotyp-positiven Maine Coon-Katze eine Maine-Coon-Kolonie heranzüchteten und Kreuzungen zwischen HCM-betroffenen und nicht betroffenen Katzen, aber auch mit den betroffenen Katzen untereinander durchführten. In der Nachzucht aus der Kreuzung zwischen Phänotyp-positiven und -negativen Maine-Coon-Katzen entwickelten schließlich 55 % (12 von 22) eine HCM. Bei der Kreuzung von Phänotyp-positiven Katzen untereinander entwickelten 45 % (4 von 9) der Nachzucht eine HCM, 22 % (2 von 9) Katzen waren Phänotyp-negativ und 33 % (3 von 9) wurden totgeboren. Bei den Totgeborenen wurde angenommen, dass diese Träger des letalen homozygoten Gens waren. Somit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der Erbgang, als auch die Pathophysiologie der felinen familiären HCM der humanen familiären HCM gleicht. In Abbildung 10 ist der Stammbaum der oben beschriebenen Maine-Coon-Kolonie dargestellt (KITTLESON *et al.*, 1999). Als Ursache der felinen familiären HCM werden wie in der Humanmedizin Mutationen in den Sarkomergenen vermutet, die zu einer gestörten Proteinkonformation führen.

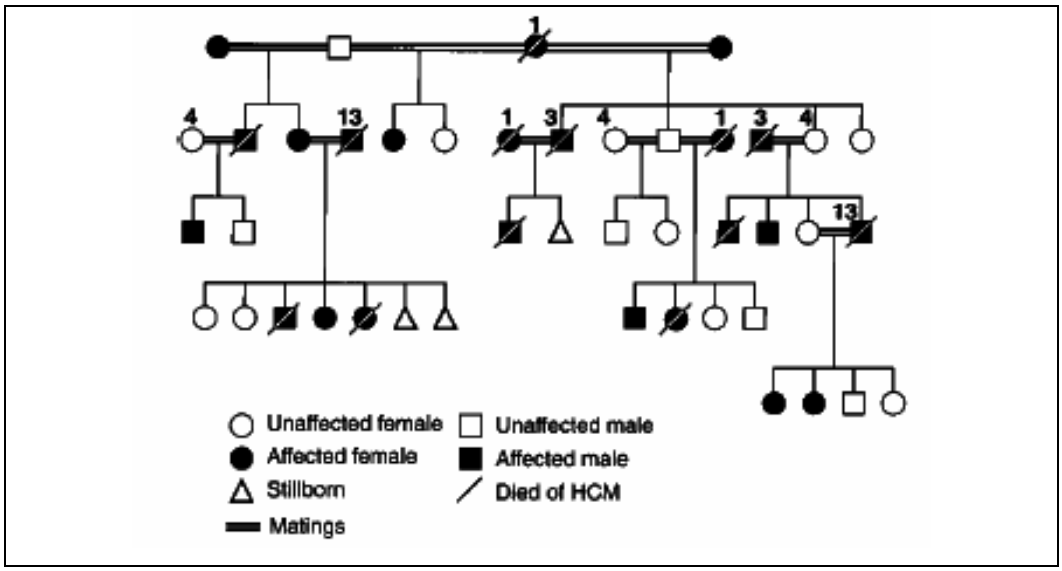


Abbildung 10: Stammbaum der Maine-Coon-Kolonie mit familiärer HCM: □ = männlich, herzgesund, ■ = männlich, HCM, ○ = weiblich, herzgesund, ● = weiblich, HCM, Δ = totgeboren, ⁄ = Tod durch HCM, ⎯ = Verpaarungen, (KITTLESON *et al.*, 1999)

4.3.1. Myosin-binding-protein-C-Punktmutationen bei der Maine Coon

Die Maine Coon gilt neben der Europäisch Kurzhaar in Europa als die am häufigsten an HCM erkrankte Rasse. Bisher wurden zwei Polymorphismen im MYBPC3 bei dieser Rasse gefunden, die möglicherweise die Proteinkonformation beeinflussen. Für beide SNPs werden bereits kommerzielle Gentests angeboten.

4.3.1.1. A31P-Punktmutation im kardialen Myosin-binding-protein-C-Gen

In einer von MEURS und Mitarbeitern (2005) durchgeführten Studie wurde das MYBPC3 als Kandidatengen für die feline HCM herangezogen, nachdem eine signifikante Reduktion des MYBPC in den Herzmuskelproben phänotypisch HCM-positiver Maine-Coon-Katzen mittels SDS-PAGE ermittelt werden konnte. In der Western Blot-Analyse und in der Immunfloureszenzmikroskopie konnte eine Reduktion des MYBPC in den Herzmuskelproben euthanasierter HCM-positiver Maine-Coon-Katzen bestätigt werden. Die Katzen stammten aus der von KITTLESON und Mitarbeitern (1999) auf HCM selektierten Maine-Coon-Kolonie. Bei jeder Phänotyp-positiven Katze dieser Familie konnte im Rahmen der DNA-Sequenzanalyse ein Basenaustausch (G > C) im Kodon 31 des MYBPC3-Gens detektiert werden. Letzterer führt zu einem Aminosäurenaustausch der Aminosäure Alanin zu Prolin (A31P). Keine der Phänotyp-negativen Maine-Coon-Katzen derselben Familie war Träger der Mutation. Ebenso war keines der Kontrolltiere für den A31P-SNP Genotyp-positiv getestet worden. Unter den 16 Phänotyp-positiven Katzen lag die Mutation bei zehn als heterozygotes und sechs als homozygotes Allel vor, wobei in derselben Studie die homozygoten Individuen schwerer und früher zu erkranken schienen. Auch in der Humanmedizin wird häufig von der Hypothese eines Gendosiseffekt ausgegangen, wobei Individuen mit einer homozygoten Mutation im MYBPC3-Gen eher einen hochgradigen Phänotyp der HCM entwickeln als heterozygote Individuen (NANNI *et al.*, 2003). Dennoch wurde von MEURS und Mitarbeitern (2005) in derselben Veröffentlichung diskutiert, dass die Anzahl der untersuchten Katzen zu gering sei, um eindeutig einen Gendosiseffekt darzustellen. Bei den betroffenen Tieren trat die HCM mit einer variablen Expressivität in Bezug auf Schweregrad und Überlebenszeit der Tiere auf. Eine größere Anzahl der homozygoten Individuen entwickelte die HCM in einer mittelgradigen bis hochgradigen Form und starb in einem Alter von vier

Jahren oder weniger. Davon erlagen vier von sechs homozygoten Tieren dem plötzlichen Herztod. Keines der homozygoten Tiere, aber fünf der heterozygoten Tiere entwickelten kongestives Herzversagen. Einer der homozygoten Probanden wies keine echokardiographische Auffälligkeit auf, verstarb aber plötzlich während einer Anästhesie im Alter von sieben Jahren. Bei den heterozygoten Probanden waren drei von zehn Katzen im Alter von acht bis zwölf Jahren nur im moderaten Stadium erkrankt. Eine heterozygote Katze wurde erst im Alter von sieben Jahren echokardiographisch auffällig (MEURS *et al.*, 2005). In einer anderen Studie mit nachgezüchteten Katzen aus derselben Familie wie oben beschrieben, blieben sechs Katzen mit nachgewiesener MYBPC3-Mutation im konventionellen Herzultraschall phänotypisch herzgesund und lediglich drei davon waren in der Gewebedoppleranalyse auffällig (MACDONALD *et al.*, 2007). Studien von Dr. Kathryn Meurs, Washington State University, zeigen, dass 33,6 % der Maine-Coon-Population in USA Träger einer A31P-Mutation sind. 4 % bis 5 % der Genotyp-positiven Tiere besitzen ein homozygotes Allel (MEURS, 2007). In einer Studie der Arbeitsgruppe Kardiologie der DKG-DVG wurde ermittelt, dass 30 % von 119 herzgesunden Maine-Coon-Katzen Gentest positiv für den A31P-SNP waren (TOBIAS, 2007). Das Odds Ratio (OR) bezüglich eines positiven HCM-Phänotyps lag im Falle der für den A31P-SNP homozygot getesteten Maine-Coon-Katzen in der Studie von NYBERG und Mitarbeitern (2007) bei 16,2 (95 % Konfidenzintervall (KI): 4,3 - 61,0). Der oben beschriebene Aminosäurenaustausch befindet sich in der Verbindungsregion zwischen C0 und C1 des betroffenen Proteins, funktionelle Aspekte dieser Region sind jedoch nicht genau bekannt, jedoch wird vermutet, dass diese Region in Verbindung mit dem Aktin und/oder dem Myosin steht (FLAVIGNY *et al.*, 1999; OAKLEY *et al.*, 2004; SQUIRE *et al.*, 2003; WITT *et al.*, 2001). Eine computergestützte Proteinstrukturanalyse zeigt im Falle der oben beschriebenen Punktmutation eine Reduktion der Alphahelix und eine vermehrte Anzahl von regellosen Proteincoils. Obwohl das MYBPC-Protein im SDS-PAGE bei Phänotyp-positiven Maine Coons vermindert war, war die mRNA-Expression erhöht (MEURS *et al.*, 2005). Erst vor kurzem konnte die Chromosomenlokalisation des MYBPC3-Gens im Rahmen des felinen Genomprojekts bestimmt werden. Das MYBPC3 befindet sich auf Chromosom D1 (PONTIUS *et al.*, 2007).

4.3.1.2. A74T-Punktmutation im Myosin-binding-protein-C-Gen

NYBERG und Mitarbeiter konnten 2007 mittels Sequenzanalyse eine zweite genetische Variante im MYBPC3-Gen bei Maine-Coon-Katzen feststellen, welche sich durch eine Punktmutation im Kodon 74 auszeichnet. Die Punktmutation hat zur Folge, dass ein Basenaustausch von G nach A entsteht, der zu einem Aminosäurenaustausch von Alanin durch Threonin führt. Das OR für das Risiko an der HCM zu erkranken lag bei Homozygosität in der untersuchten Kohorte bei 7,6. Der Altersdurchschnitt der untersuchten Population lag im Median bei 2,2 Jahren. Die A31P-Mutation und die A74T-Mutation im MYBPC3 werden laut dieser Studie für weniger als 50 % der HCM-Fälle bei jungen Maine-Coon-Katzen verantwortlich gemacht (NYBERG *et al.*, 2007).

4.3.2. Myosin-binding-protein-C-Punktmutation bei der Ragdoll

Da die Ragdoll-Katze ebenfalls für die HCM prädisponiert ist und nicht mit der Rasse Maine Coon verwandt ist, liegt es nahe, dass nicht dieselben Mutationen bei diesen Rassen für die HCM verantwortlich gemacht werden können. MEURS und Mitarbeiter (2007) untersuchten deshalb die Exons und Splice site-Regionen des MYBPC3 bei 21 Ragdollkatzen mit der Diagnose HCM mittels DNA-Sequenzierung. Acht Katzen dieser Kohorte waren Mitglieder von zwei unabhängigen Katzenfamilien. Bei allen Phänotyp-positiven Ragdollkatzen konnte ein Basenpaaraustausch im von C zu T im Kodon 820 des MYBPC3 festgestellt werden (neun homozygote Tiere und elf heterozygote), welches zu einem Aminosäurenaustausch von Arginin zu Tryptophan führt. Keine der Phänotyp-negativen Kontrollkatzen wies dieselbe Punktmutation auf. Das Ausmaß dieser Punktmutation auf das Protein wurde mit einer computergestützten prädiktiven Proteinanalyse der Firma PolyPhen durchgeführt (http://tux.embl-heidelberg.de/ramensky/PolyPhen.cgi), welche aussagt, dass das Protein „wahrscheinlich“ durch die diese Punktmutation geschädigt wird. Unter anderem wird in der betroffenen Molekülregion eine Unterbrechung der α-Helixstruktur und eine Vermehrung des „extended strand“-Anteils angezeigt. Das GOR4-Programm zur Proteinstrukturanalyse zeigte dieselben Veränderungen an. In der Humanmedizin sind Mutationen derselben Region als Ursache HCM bekannt (MEURS *et al.*, 2007).

4.3.3. Polymorphismen im β-Myosinschwerketten-Gen

MEURS und Mitarbeiter (2000) untersuchten 20 Exonregionen zwischen Exon 3 und 23 des MYH7 bei 20 gesunden Katzen unterschiedlicher Rassen, die für die feline HCM prädisponiert sind (American Shorthair, British Shorthair, Maine Coon, Hauskatzen). Das MYH7 ist am häufigsten von HCM verursachenden Mutationen in der Humanmedizin betroffen und wurde somit auch in der Veterinärmedizin als eines der Hauptkandidatengene angesehen. Bei der Sequenzierung konnten neun Polymorphismen in den Exons 5, 8, 13, 14,15 und 16 ausfindig gemacht werden, davon rief nur ein Polymorphismus eine Veränderung einer Aminosäure hervor (MEURS *et al.*, 2000).

4.3.4. Polymorphismen essentiellen Myosinleichtketten-Gen

Via SSCP-Analyse wurden bei gesunden Katzen zwei Allele (A und B) identifiziert. Im Allel B stellten sich bei der Sequenzanalyse letztendlich zwei SNPs im Intron 5 dar (G > A, C > T). Ein dritter SNP konnte alleinig bei Maine-Coon-Katzen im Exon 5 (A > G) identifiziert werden, letzterer konnte allerdings nicht mittels SSPC-Analyse detektiert werden (MAGNON *et al.*, 2000b).

4.3.5. Hochpolymorphe Marker im Intron 15 des Troponin C-Gens

Mittels SSCP-Analyse wurde in einer Studie eine Genotypisierung von 20 Maine-Coon-Katzen aus einer Familie, zwei American Shorthair-Katzen, einer British Shorthair-Katze und fünf Mischlingskatzen durchgeführt. Alle waren herzgesund. Im Intron 15 des Sarkomergens Troponin C konnten vier verschiedene Allele (A, B, C, D) identifiziert werden. Bei der Maine Coon-Familie war eine kodominante Vererbung nach den Mendelschen Regeln nachvollziehbar (MAGNON *et al.*, 2000a). Bisher konnten aber auch in diesem Gen keine HCM-relevanten Mutationen gefunden werden.

4.3.6. Analyse von Sarkomerproteinen

Mittels Herzmuskelproben von HCM-positiv phänotypisierten Maine-Coon-Katzen, die aufgrund von kongestivem Herzversagen euthanasiert wurden, führten MEURS und Mitarbeiter (2005) einen SDS-PAGE durch und verglichen dabei die Ergebnisse herzkranker und herzgesunder Tiere. Hierbei konnte eine Reduktion des kardialen Myosin binding Proteins C und des Myomesins bei den an HCM erkrankten Tieren nachgewiesen werden. Gleichzeitig war bei den

herzkranken Katzen ein abnormes Wanderverhalten des β-Myosins zu konstatieren. Mittels Western Blot konnten die Ergebnisse für das kardiale MYBPC und β-Myosin bestätigt werden, für Myomesin allerdings nicht. Mittels Immunfloureszenzmikroskopie konnte in derselben Studie eine Reduktion von MYBPC, Myomesin, kardialem Aktin und Titin bei den an HCM erkrankten Maine-Coon-Katzen dargestellt werden, während MHC und Konnexin keine Reduktion zeigten (MEURS *et al.*, 2005).

4.4. Pathogenese

Lange stellte sich die Frage, ob die feline HCM auch pathologisch und pathogenetisch der humanen familiären HCM gleicht, da sie im Falle einer Übereinstimmung als Tiermodell für die humane Form der Erkrankung geltend gemacht werden könnte. Bereits seit den 80er Jahren konnten pathologische Übereinstimmungen mit der humanen Form gefunden werden und viele Autoren stellten die Hypothese auf, dass die feline HCM ein Tiermodell der humanen Form sei (LIU *et al.*, 1981; LIU *et al.*, 1993; TILLEY *et al.*, 1977; VAN VLEET & FERRANS, 1986; VAN VLEET *et al.*, 1980). Im Jahre 1999 konnten KITTLESON und Mitarbeiter zudem einen autosomal dominanten Erbgang nachweisen und die pathologische Ähnlichkeit zur humanen HCM bestätigen. Später wies man die erste für die feline HCM verantwortliche Mutation im MYBPC3-Gen nach, während für die humane HCM bereits über 200 HCM-Mutationen in Sarkomergenen gefunden wurden, die möglicherweise verantwortlich sind (MEURS *et al.*, 2005). Im Folgenden wird näher auf die pathologischen Gegebenheiten der der felinen HCM eingegangen.

4.4.1. Pathologie und Pathohistologie

Bei Katzen mit schwerwiegender HCM findet man in der Regel eine Myokardverdickung (meistens in der linksventrikulären freien Wand oder/und im Septum) im Rahmen von 7 bis 10 mm vor. Die Hypertrophie kann sowohl symmetrisch (global) als auch asymmetrisch vorliegen. Im Falle der asymmetrischen Hypertrophie stellt sich bei manchen Katzen nur das Septum hypertroph dar, bei anderen wiederum nur die freie Wand (FOX *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1993; PETERSON *et al.*, 1993). Einige Katzen zeigen die Hypertrophie eher in der basalen Septumsregion, andere dagegen in der apikalen Region. Eine isolierte Verdickung der freien Wand kommt am häufigsten in der

Papillarmuskelregion vor. Bei vielen Katzen, die bereits im Echokardiogramm SAM und eine basoseptale Hypertrophie (septal bulge) zeigen, kann bei der Autopsie ein fibröses endokardiales Plaque am basalen Septum gesehen werden. Auch das anteriore Mitralklappensegel kann fibrös verdickt sein (FOX *et al.*, 1995). Da der Herzmuskel nach dem Tod im Rahmen des Rigor mortis in einen kontrahierten Zustand übergeht, nähert sich die Wanddicke post mortem eher der echokardiographisch gemessenen endsystolischen Wanddicke an (FOX *et al.*, 1995). Deshalb sollte bei einer pathologischen Untersuchung immer das Herzgewicht und dessen Verhältnis zum Körpergewicht bestimmt werden. Die Herzmasse der adulten herzgesunden Katze soll zwischen 7,8 g und 20 g liegen. Die Herzmasse bei Katzen mit HCM überschreitet meistens das Gewicht von 30 g und liegt zwischen 25 g und 38 g (BOLLINGER, 1958; KITTLESON, 2005). Die relative Herzmasse im Verhältnis zum Körpergewicht soll nicht mehr als 0,51 - 0,47 % betragen (BOLLINGER, 1958). Ein relatives Herzgewicht von 4,8 ± 1,2 g/kg wird allgemeingültig als normal angesehen (FOX *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1981). In einer Studie von FOX und Mitarbeitern (1995) erreichte das relative Herzgewicht von an HCM erkrankten Katzen 6,0 ± 1,4 g/kg. In Abbildung 11 ist der Querschnitt eines hochgradig hypertrophen Herzens einer Maine Coon mit einem Herzgewicht von 37 g dargestellt.

Abbildung 11: Herz einer an hochgradiger HCM erkrankten Maine Coon im Querschnitt (Herzgewicht 37 g). Das Herz befindet sich im Stadium der postmortalen Kontraktion, was in einer Kammerobliteration resultiert. Die inneren helleren Muskelmassen stellen die hochgradig verdickten Papillarmuskeln dar (KITTLESON *et al.*, 1999).

Das LA ist bei der hochgradigen felinen HCM normalerweise vergrößert, im frühen schweren Krankheitsstadium kann es im selteneren Fall noch normal groß sein. Gelegentlich befindet sich im LA oder im linken Aurikel ein Thrombus. Bei geringgradigeren Stadien ist das LA zunächst nicht vergrößert. Häufig zeigt sich hier nur eine Papillarmuskelvergrößerung als prädominante Läsion (KITTLESON, 2005). Bei kongestivem Herzversagen ist eine pulmonäre Kongestion vorzufinden. Zudem weisen Katzen mit hochgradiger HCM und vergrößertem LA bei der pathologischen Untersuchung oft einen Hydrothorax auf. Häufig sind bei der Autopsie als Folge der Thrombusbildung im LA auch Aortenthrombose und Niereninfarkte präsent (VAN VLEET *et al.*, 1980). Die in der Humanmedizin oft beschriebene „Burned out"-HCM oder „Endstage"-HCM, welche im Endstadium echokardiographisch eine dilatative Phase mit systolischer Dysfunktion zeigt, wurde bereits auch bei der Katze beschrieben (BATY *et al.*, 2001; CESTA *et al.*, 2005; MARON & SPIRITO, 1998). Makroskopisch erscheinen diese Herzen dilatiert, das LA ist meistens vergrößert. Blasse Infarktregionen im Myokard sind bei der „Endstage"-HCM zusätzlich häufig sichtbar. Die Dilatation kann, muss aber nicht normale Dimensionen erreichen. Die „Endstage"-HCM der Katze ist zumeist auch mit einem Thrombus im LA oder bereits mit einer Aortenthrombose und renalem Infarkt vergesellschaftet (BATY *et al.*, 2001; CESTA *et al.*, 2005).

Histopathologisch variieren die Veränderungen am HCM erkrankten Herzmuskel in einer großen Breite. In manchen Fällen ist eine Myozytenhypertrophie die einzige pathologische Veränderung, während in anderen Herzen ein breites Spektrum von histologischen Abnormalitäten vorgefunden wird. Interstitielle Fibrose und Ersatzfibrose stellen neben einer dystrophischen Mineralisierung (in 20 bis 40 % der Fälle) eine häufige Veränderung dar (KITTLESON, 1998b; LIU *et al.*, 1993; TAUGNER, 2001). Bei 75 % der HCM-Patienten liegt zudem eine intramurale koronare Arteriosklerose vor (FOX *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1993). Eine intramurale „small vessel disease" ist nicht für die feline HCM spezifisch und kommt auch bei anderen kardialen Erkrankungen sowohl bei Katzen und Hunden vor (KITTLESON, 2005; TANAKA *et al.*, 1986). Eine gestörte Anordnung der myokardialen Fasern kommt im Vergleich zur humanen HCM (90 % der humanen HCM-Patienten) bei Katzen nur bei 30 - 60 % der HCM-Patienten vor. Dennoch sind bei Vorhandensein einer gestörten myofibrillären Anordnung, wie in Abbildung 12 ersichtlich, dieselben Muster wie beim

Menschen zu erkennen (KITTLESON, 1998b; LIU *et al.*, 1993; MARON & EPSTEIN, 1980; MARON & ROBERTS, 1981; TAUGNER, 2001). Die beschriebenen histologischen Präparate der „Endstage"-HCM-Patienten in der „Burned out"-Phase zeigen vor allem multifokale subendokardiale und myokardiale Fibrosen, welche in der Humanmedizin als für die „Burned out"-HCM typisch angesehen werden, gestörte myozytäre Faseranordnung und bei einer Katze akute multifokale myokardiale Infarktzonen mit mononukleären Entzündungszellinfiltraten (BATY *et al.*, 2001; CESTA *et al.*, 2005).

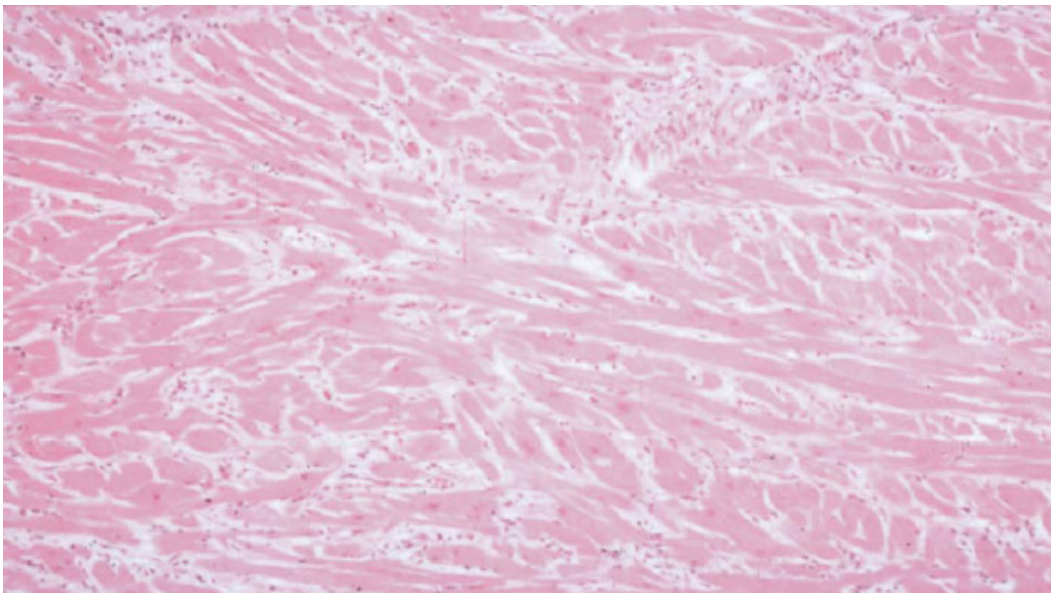


Abbildung 12: Histologischer Schnitt mit Hematoxilin-Eosin-Färbung; Herzmuskel einer an HCM erkrankten Maine Coon; zusehen ist die gestörte Anordnung der Muskelfasern, die sich wie bei der humanen HCM im Fischgräten- und Windradmuster darstellt (KITTLESON *et al.*, 1999).

4.4.2. Pathophysiologie

Die exakte Pathophysiologie der felinen HCM ist noch unbekannt. Bei zwei Rassen konnte bereits ein autosomal dominanter Erbgang aufgrund voneinander unabhängiger Punktmutationen im MYBPC3 nachgewiesen werden (MEURS *et al.*, 2007; MEURS *et al.*, 2005). 50 % der humanen HCM-Fälle gelten als autosomal dominant vererbt, die anderen gelten als sporadisch auftretend, ein genetischer Ursprung kann bei diesen Patienten dennoch nicht ausgeschlossen werden. Ähnliches wird schließlich auch bei der Katze vermutet (KITTLESON, 2005). In der Tiermedizin herrscht die Meinung, dass voneinander unabhängige Sarkomermutationen für die HCM verantwortlich sind. Über Mutationen in Z-Scheiben-Proteinen ist bisher nichts bekannt. Unter anderen zählen in der

Humanmedizin auch Glykogenspeichererkrankungen zu den genetischen Kardiomyopathien, die von einer HCM echokardiographisch nicht unbedingt zu unterscheiden sind. In welchem Ausmaß diese Erkrankung eine Rolle bei felinen HCM-Patienten spielt, ist nicht bekannt, da sie oft nur durch eine pathologische Untersuchung zur Sarkomer-HCM abgegrenzt werden kann (KITTLESON, 2005). Dennoch wird bei Norwegischen Waldkatzen die Glykogenspeicherkrankheit Typ IV vererbt, wobei auch Glykogenablagerungen in den Myozyten stattfinden (FYFE *et al.*, 2007). Anhand von Expressionsstudien in transgenen Tiermodellen kann jedoch eindeutig davon ausgegangen werden, dass humane Mutationen in Sarkomergenen die HCM verursachen können, denn in transgenen Mäusen ist die HCM durch Platzieren bekannter humaner Defektgene eindeutig reproduzierbar (BLANCHARD *et al.*, 1999; GEISTERFER-LOWRANCE *et al.*, 1996; MUTHUCHAMY *et al.*, 1999; PRABHAKAR *et al.*, 2003; TSOUTSMAN *et al.*, 2006a). Auch die bei der HCM eine tragende Rolle spielende diastolische Dysfunktion war bei transgenen Mäusen reproduzierbar (SPINDLER *et al.*, 1998). Die Reproduzierbarkeit der bekannten felinen Mutationen wurden bisher noch nicht in transgenen Tieren getestet. Die Expression einer der R403Q-Mutation im MYH7, welche beim Menschen als Ursache der familiären HCM bekannt ist, erzeugte auch in adulten felinen Kardiomyozyten einen Defekt des Sarkomerkomplexes und eine gestörte myofibrilläre Anordnung (MARIAN *et al.*, 1995b).

Bei Katzen wird generell von derselben Pathophysiologie wie bei der humanen HCM ausgegangen, obwohl es, wie oben erwähnt, bisher keine Expressionsuntersuchungen mit den bisher bekannten felinen Mutationen gibt. Jedoch wird die Pathophysiologie auch in der Humanmedizin kontrovers diskutiert. In den Lehrbüchern der Veterinärmedizin wird wie in der Humanmedizin die „poison polypeptide“-Theorie angenommen. Diese Hypothese beruht darauf, dass durch die Sarkomermutation ein abnormales Protein erzeugt wird und daraus defekte Sarkomere resultieren. Durch den erzeugten Stress im Myokardium werden die malfunktionierenden Sarkomere durch intakte Sarkomere ersetzt, folglich entsteht eine kompensatorische Hypertrophie. Der Herzmuskel kann dabei sogar auf das zweifache seiner herkömmlichen Wanddicke hypertrophieren (CUDA *et al.*, 1993; KITTLESON, 2005; LANKFORD *et al.*, 1995; MARIAN & ROBERTS, 1995; SWEENEY *et al.*, 1994). Diese Theorie ist sehr einfach formuliert und es wird auch bei der

Katze von vielen zusätzlichen in der Humanmedizin bereits beschriebenen Umbauvorgängen und weiteren extrinsischen und intrinschen Faktoren ausgegangen, die zu den bei der HCM vorzufindenden pathologischen und histopathologischen Mustern führen (FATKIN & GRAHAM, 2002; HASEGAWA *et al.*, 1996; HUGHES, 2004; LI *et al.*, 1997; MOLKENTIN *et al.*, 1998). Es wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung des RAAS-Systems einen beträchtlichen Einfluss auf die Hypertrophie und die Wandsteifheit des Myokards nimmt. Erhöhte Aldosteronwerte und erhöhte Reninwerte konnten bereits bei Katzen mit HCM nachgewiesen werden (KITTLESON, 1998b; TAUGNER, 2001). Das im RAAS-System entstehende Angiotensin II besitzt nicht nur vasokonstriktorische Effekte, sondern auch trophische Effekte auf das Myokard (BRILLA & RUPP, 1994; LIJNEN & PETROV, 1999; MAZZOLAI *et al.*, 1998; TAUGNER, 2001).

Die Pathophysiologie, die letztendlich die „Endstage"-HCM („Burned out"-Phase) herbeiführt, wird bei der Katze wie beim Menschen kontrovers diskutiert. Die Ursache könnte eine Okklusion der Koronar- oder der kleinen Gefäße sein. Beides kann durch Muskelhypertrophie, Intima- und Mediahypertrophie, Thrombembolie oder Arteriospasmus hervorgerufen werden. Gleichzeitig können Apoptose der Muskelzellen oder zusätzliche Mutationen vorliegen, die zu diesem Stadium beitragen. Von einer Kombination all dieser Faktoren kann ebenfalls ausgegangen werden (BATY *et al.*, 2001; CESTA *et al.*, 2005).

4.5. Diagnose

Das Diagnostikum der Wahl für die feline HCM stellt derzeit nach wie vor die Ultraschalluntersuchung dar (HÄGGSTRÖM, 2006; KITTLESON, 2005). Zur Früherkennung der HCM wird die Gewebedopplertechnologie auch in der Veterinärmedizin immer mehr ausgereift. Dennoch soll im folgenden Kapitel auf die kompletten kardiologischen Untersuchungsmöglichkeiten bis hin zum Gentest eingegangen werden.

4.5.1. Klinische Untersuchung

Ein erster Hinweis auf eine HCM kann ein auskultatorisch systolisches Herzgeräusch sein, welches sein *Punctum maximum* zwischen dem mittleren Sternum und dem linken Apexschlag hat. Die Diagnose kann nicht anhand des Herzgeräusches alleine gestellt werden, da neben des für die HCM typischen

SAMs auch ein gutartiges Geräusch, welches durch eine dynamische rechtsventrikuläre Ausflusstraktsobstruktion verursacht wird, existieren kann. SAM ist ein dynamisches Herzgeräusch und kann bei niedrigeren Herzfrequenzen verschwinden. Häufig existiert im Rahmen der HCM auch ein Gallopprhythmus, wobei der 3. oder 4. Herzton zu hören ist. Arrhythmien stellen zusätzlich einen Hinweis für eine Kardiomyopathie dar. Patienten im kongestiven Herzversagen werden zumeist mit massiver Dys- und Tachypnoe vorgestellt. Ein typisches Anzeichen für Dyspnoe stellt bei der Katze die Maulatmung dar (KITTLESON, 2005). Im Falle einer Aortenthrombose werden Katzen gewöhnlich mit einer Paraparese bis hin zur Paralyse der Hintergliedmaßen vorgestellt, manchmal ist auch nur ein Vorder- oder Hinterbein betroffen. Die Ballen der Hintergliedmaßen werden dabei kalt, blass bis bläulich, der Tiefenschmerz geht verloren, der Femoralispuls verschwindet und die innere Körpertemperatur wird hypotherm (MOISE, 2005).

4.5.2. Radiographie

Die HCM kann röntgenologisch nicht von anderen Kardiomyopathien differenziert werden. Bei Katzen mit kongestivem Linksherzversagen ist das LA gewöhnlich vergrößert und ein Lungenödem ist anhand eines interstitiellen und/oder alveolären Musters zu erkennen. Im Gegensatz zu Hunden kann dieses allerdings verstreut und mehr ventral auftreten. Katzen im kongestiven Linksherzversagen können einen Pleuralerguss entwickeln, der sich ebenfalls röntgenologisch darstellt (KITTLESON, 2005).

4.5.3. Echokardiographie

Aufgrund des geringen Fortschritts der HCM-Forschung auf genetischer Basis, stellt die Echokardiographie derzeit das Mittel der Wahl in der HCM-Diagnostik dar (HÄGGSTRÖM, 2006). Um die Standardschnitte gemäß den humanen Echokardiographienormen zu erhalten, werden die Katzen in rechter Seitenlage für die rechts parasternale Längs- und Kurzachse und in linker Seitenlage für die linke apikale Sicht geschallt (FOX *et al.*, 1995; GOTTDIENER *et al.*, 2004; TAJIK *et al.*, 1978). Aufgrund der Heterogenität der HCM, d.h. aufgrund der heterogenen asymmetrischen Hypertrophieformen, die bei der felinen HCM existieren, sollten die Standardmessungen der diastolischen Wanddicken in mehreren zweidimensionalen Ebenen gemessen werden, wobei die am breitesten

gemessene Region zählt. Mit M-Mode-Messungen können regionale Hypertrophien übersehen werden (HÄGGSTRÖM, 2006; KITTLESON, 2005). Die obere Grenze der linksventrikulären enddiastolischen Wanddicke bei herzgesunden Katzen wird traditioneller Weise bei 5,5 mm gesetzt. Bei einer Wanddickenmessung von über 6 mm wird von einer konzentrischen Hypertrophie ausgegangen (FOX *et al.*, 1995; KITTLESON, 1998b). Die Einteilung in Schweregrade erfolgt bisher subjektiv, für eine hochgradige HCM spricht unter anderem eine Vergrößerung des LA (KITTLESON, 2005). MACDONALD und Mitarbeiter (2006b) publizierten im Rahmen einer pharmakologischen Studie Messwerte, nach welchen eine Unterscheidung der HCM-Erkrankungsstadien mild, mittelgradig und hochgradig getroffen wurde. Demnach erfolgte die Einteilung des Schweregrades der HCM nach folgenden enddiastolischen Messwerten im Septum (IVSd) und/oder der linksventrikulären freien Wand (LVPWd): mild = 6 - 7 mm, mittelgradig = 7,1 - 8 mm, hochgradig ≥ 8,1 mm (MACDONALD *et al.*, 2006b). In Abbildung 13 ist das Herz einer hochgradig an HCM erkrankten Katze in der rechts parasternalen Längsachse zu sehen, während in Abbildung 14 die Kurzachse in der Enddiastole und Endsystole dargestellt ist.

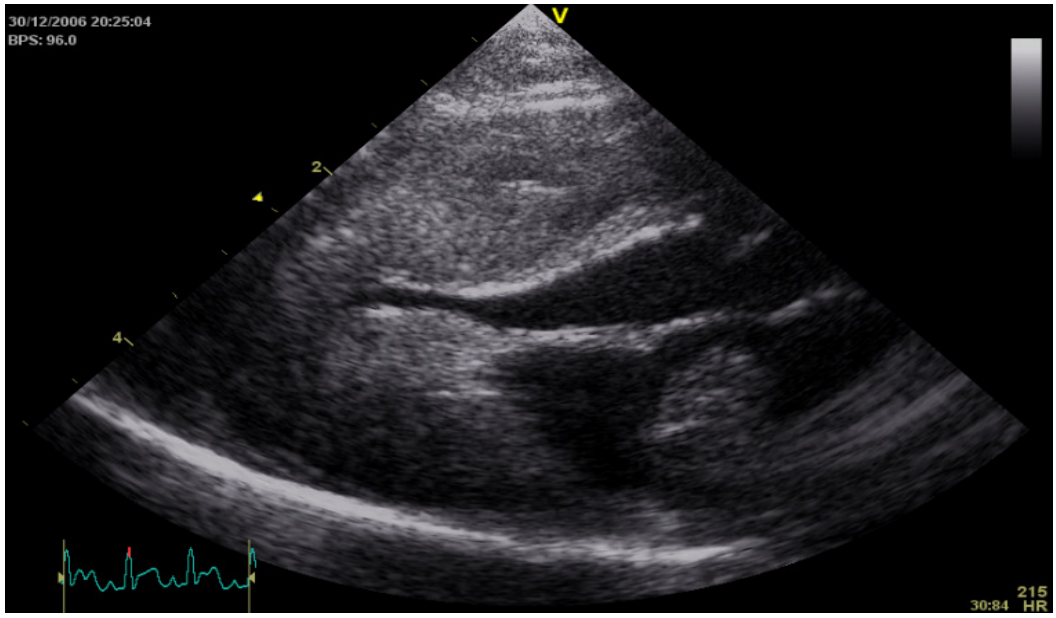


Abbildung 13: Ultraschallbild in der rechts parasternalen Längsachse des Herzens einer Katze mit hochgradiger HCM. Zu sehen sind eine generalisierte Verdickung des Septums sowie der linken freien Wand und eine Verdickung der Papillarmuskeln im linken Ventrikel. Im vergrößerten linken Atrium befindet sich ein Thrombus.

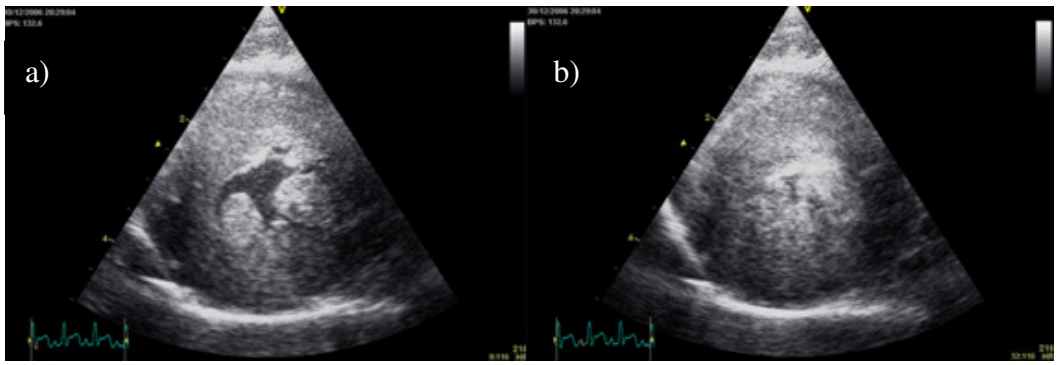


Abbildung 14: Kurzachse auf Höhe der Papillarmuskelebene; a) Enddiastole: Hypertrophie des Septums und der freien Wand und deutliche Hypertrophie der Papillarmuskeln ; b) Endsystole: endsystolische Kammerobliteration.

Die echokardiographischen Messungen werden bei Hunden normalerweise mit der Körpermasse korrigiert, bei Katzen geht man bei den enddiastolischen Messwerten aber von einem vernachlässigbaren Einfluss des Körpergewichts aus. Daher führt man bei Katzen keine Anpassung an das Körpergewicht durch (HÄGGSTRÖM, 2006). Da Maine-Coon-Katzen im Allgemeinen schwerer als normale Hauskatzen sind, wurden in einer Studie Referenzwerte für M-Mode-Messungen speziell für gesunde adulte Maine-Coon-Katzen erstellt, welche sich von den Werten bei Hauskatzen teilweise unterschieden (DROURR *et al.*, 2005). Die von DROURR und Mitarbeitern (2005) erstellten Referenzwerte sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Vergleich der M-Mode-Echoparameter und des Gewichts zwischen Maine-Coon-Katzen und Hauskatzen nach (DROURR *et al.*, 2005); SD = Standardabweichung, n = Anzahl der Tiere, LVIDd = diastolischer linksventrikulärer innerer Durchmesser, LVIDs = systolischer linksventrikulärer innerer Durchmesser, LVPWd = enddiastolische Wanddicke der Hinterwand, LVPWs: endsystolische Wanddicke der Hinterwand, IVSd = enddiastolische Wanddicke des Septums, IVSs = endsystolische Wanddicke des Septums, Ao = Durchmesser der Aorta, LA/Ao = Verhältnis Linkes Atrium/Aorta, %FS = prozentuale Verkürzungsfraktion.

	Maine Coon (n= 105)	**Hauskatze (79)**
Parameter	**Mittelwert ± SD**	**Mittelwert ± SD**
LVIDd (cm)	1,85 ± 0,21	1,5 ± 0,2
LVIDs (cm)	0,89 ± 0,2	0,72 ± 0,15
LVPWd (cm)	0,43 ± 0,06	0,41 ± 0,07
LVPWs (cm)	0,8 ± 0,11	0,68 ± 0,11
IVSd (cm)	0,4 ± 0,07	0,42 ± 0,07
IVSs (cm)	0,75 ± 0,13	0,67 ± 0,12
Ao (cm)	1,12 ± 0,13	0,95 ± 0,14
LA/Ao	1,23 ± 0,16	1,25 ± 0,18
%FS	51,85 ± 7,74	52,1 ± 7,11
Gewicht (kg)	5,5 ± 1,3	4,7 ± 1,2

Ein weiteres Indiz für eine HCM stellt die Präsenz von SAM dar, wobei das septal gelegene Mitralklappensegel in den linksventrikulären Ausflusstrakt gezogen wird. Dadurch kommt es zu einer dynamischen Subaortenstenose. Dieses Phänomen kann oft schon im zweidimensionalen Bild erkannt werden. Mit der Farbdopplerechokardiographie können die mit SAM assoziierten hämodynamischen Abnormalitäten in der Form eines Jets in den linksventrikulären Ausflusstrakt und nicht zwangsläufig aber meistens, eines Insuffizienzjets in den linken Vorhof dargestellt werden (Abbildung 15). Mit der Spektraldopplerechokardiographie kann der Druckgradient über der Region der dynamischen Subaortenstenose ermittelt werden, welcher mit dem Schweregrad des SAMs korreliert.

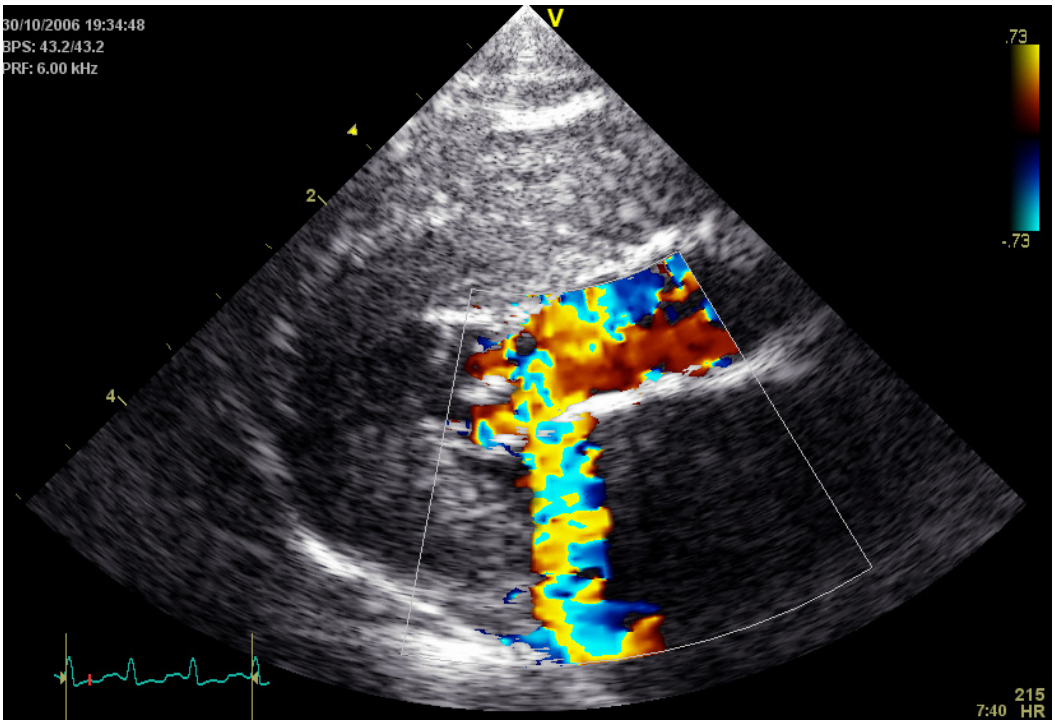


Abbildung 15: Darstellung des SAM-Phänomens mittels Farbdoppler.

Zudem kann SAM auch mittels der M-Mode-Einstellung dargestellt werden, was sich aufgrund der Größe der Katzenherzen aber schwieriger gestaltet. Nicht alle an HCM erkrankten Katzen weisen diese abnormale Bewegung der Mitralklappe auf. Manche Katzen können dieses Phänomen jedoch schon vor dem Vorhandensein einer sichtbaren Wandhypertrophie zeigen, wenn deren Papillarmuskeln entweder zu dick oder zu lang sind (KITTLESON, 2005). Letzteres ist oft das erste und manchmal auch das einzige Anzeichen einer HCM und stellt für den Untersucher eine große Herausforderung dar (ADIN & DILEY-

POSTON, 2007; KITTLESON, 2005). ADIN und DILEY-POSTON (2007) verwendeten in einer Studie verschiedene Messungen der Papillarmuskelgröße in der rechts parasternalen Kurzachse auf Höhe der Papillarmuskelebene und konnten einen signifikanten Größenunterschied der Papillarmuskeln zwischen herzgesunden und an HCM erkrankten Katzen zeigen. Die größte Herausforderung für den untersuchenden Kardiologen stellt bei Zuchtuntersuchungen die Entscheidung dar, ob eine Katze noch als herzgesund oder als „equivocal" (grenzwertig für HCM) eingestuft wird. Bei im Grenzbereich liegenden Messwerten oder Papillarmuskelgrößen sollen von züchterischer Seite derzeit laut HÄGGSTRÖM (2006) die in Tabelle 3 ersichtlichen Zuchtempfehlungen berücksichtigt werden:

Tabelle 3: Zuchtempfehlungen für „equivocal" befundete Katzen, modifiziert nach HÄGGSTRÖM (2006).

Alter mit dem Befund: „equivocal"	**Zuchtempfehlungen**
< 2 Jahre	Kein Zuchteinsatz bis zu einer Folgeuntersuchung nach zwei Jahren.
2 - 3 Jahre	Ein Wurf kann geplant werden, insofern beide Elternteile nicht mit bekannten HCM-Patienten näher verwandt sind. Ein Elternteil sollte herzgesund sein. Die Wurfgeschwister sollten bis zum sicheren Ausschluss der Erkrankung nicht verpaart werden. Dasselbe gilt wenn die Katze im Alter von drei Jahren immer noch als „equivocal" eingestuft wird.
> 3 Jahre	Die Katze kann in der Zucht eingesetzt werden, muss aber mit einem herzgesunden Partner verpaart werden. Zudem sollte keines der Elterneteile beider Geschlechtspartner an HCM erkrankt sein.

Bei der HCM stellt die beeinträchtigte Relaxation des Herzmuskels und die diastolische Dysfunktion das Hauptproblem der Erkrankung dar, welches letztendlich zum Herzversagen führt (BRIGHT *et al.*, 1999; GAVAGHAN *et al.*, 1999). Die momentan beste Möglichkeit zur Einschätzung der diastolischen Funktion des Herzens besteht im Gewebedoppler (CHETBOUL *et al.*, 2006; MACDONALD *et al.*, 2006a). Da konventionelle Ultraschallmethoden nur indirekt über morphologische Veränderungen, veränderte Flussprofile oder Druckverhältnisse auf eine gestörte Herzmuskelfunktion schließen lassen, kann anhand der Gewebedopplermethode (TDI) die Myokardfunktion direkt beurteilt

werden. TDI hat sich in der Humanmedizin als eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden für eine nicht invasive Beurteilung der diastolischen Dysfunktion herausgestellt (SOHN *et al.*, 1997). Mittels den TDI-Messgrößen TVI (Tissue Velocity Imaging), Strain (Verformung des Myokards) und Strain Rate (Verformungsrate) können Funktionsstörungen des Herzmuskels, wie sie bei der HCM auftreten sensitiv und differenziert beurteilt werden. In zwei Dissertationsschriften wurden hierzu für die Katze spezifische Referenzwerte erstellt und unterschiedliche Analyseverfahren anhand von großen Fallzahlen bewertet (SCHILLER, 2007; WAGNER, 2006). Zumeist wird die diastolische Dysfunktion mit der Messung der frühdiastolischen Geschwindigkeit am Mitralannulus (Em) beurteilt und ist bei Katzen mit HCM im Vergleich zu herzgesunden Katzen reduziert. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die isovolumische Relaxationszeit bei Katzen mit HCM verlängert ist. Katzen mit HCM zeigen nicht nur eine diastolische, sondern auch eine systolische Dysfunktion (GAVAGHAN *et al.*, 1999; KOFFAS *et al.*, 2006). In einer am Kardiologie-Service der Medizinischen Kleintierklinik, Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München, durchgeführten Studie nahmen die Werte der frühdiastolischen E-Welle der Gewebegeschwindigkeit wie auch der Strain Rate bei an HCM erkrankten Katzen mit zunehmendem Schweregrad im Vergleich zu herzgesunden Katzen signifikant ab (SARKAR *et al.*, 2007). In einer Gewebedopplerstudie bei für die A31P-Mutation im MYBPC3-Gen positiv getesteten Phänotyp-negativen und positiven Maine-Coon-Katzen konnte gezeigt werden, dass die diastolische Dysfunktion eine frühe Abnormalität im Rahmen der HCM vor Eintritt einer Muskelhypertrophie darstellt. Dennoch war diese Methode nicht sehr sensitiv für die Erkennung von Genotyp-positiven Katzen mit herzgesundem Phänotyp (MACDONALD *et al.*, 2007).

4.5.4. Magnetic Resonance Imaging

Magnetic Resonance Imaging (MRI) wird in der Humanmedizin erfolgreich zur Untersuchung der kardialen anatomischen Einheiten und kardialen Funktion eingesetzt. Die Quantifizierung der linksventrikulären Masse betreffend, kann der MRI-Technik nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Katzen ein höheres Maß an Genauigkeit zugerechnet werden (DEVLIN *et al.*, 1999; MACDONALD *et al.*, 2005a). Zudem kann in der Humanmedizin die diastolische Dysfunktion

ebenfalls mit der MRI-Technik beurteilt werden. Während mit der TDI-Technik signifikante Unterschiede der Em zwischen herzgesunden und an HCM erkrankten Katzen gefunden werden konnten, war dies bei der derselben Kohorte mittels MRI-Technik nicht möglich (MACDONALD *et al.*, 2006a). In der Humanmedizin wird die MRI zudem zur Beurteilung des Bindegewebsanteils im Myokard mittels Kontrastmittelanreicherung herangezogen, jedoch konnten auch mit dieser Technik keine signifikanten Unterschiede zwischen herzgesunden und an HCM erkrankten Katzen dargestellt werden (MACDONALD *et al.*, 2005b; MCCROHON *et al.*, 2003; VARGHESE & PENNELL, 2004).

4.5.5. Andere Ursachen für Myokard-Hypertrophie

Die häufigsten Ursachen einer sekundären Hypertrophie des Myokards bei der Katze sind Hyperthyreose und systemischer Bluthochdruck. Wenn keine Möglichkeit besteht, den systemischen Blutdruck zu evaluieren, sollten Niereninsuffizienz und Hyperthyreose als mögliche Ursachen von systemischem Bluthochdruck ausgeschlossen werden (KITTLESON, 2005). Selten können infiltrative Geschehen einer konzentrischen Hypertrophie gleichen. Bisher konnte in dieser Kategorie erst ein Fall in Form eines Lymphoms als Ursache einer infiltrativen Kardiomyopathie bei der Katze beschrieben werden (BRUMMER & MOISE, 1989). Weiterhin können Katzen mit Akromegalie eine schwerwiegende konzentrische Hypertrophie des LV aufweisen (PETERSON *et al.*, 1990). Eine Erhöhung des somatotropen Hormons war aber in einer Studie bei 60 % der Katzen mit HCM vorhanden (KITTLESON *et al.*, 1992). Ob die Erhöhung des somatotropen Hormons die Ursache einer HCM sein kann ist nicht bekannt (KITTLESON, 1998b). Katzen, die an der x-chromosomal vererbten felinen muskulären Dystrophie leiden, welche der humanen „Duchenne muscular dystrophy“ (DMD) entspricht, zeigen ebenfalls ein verdicktes, allerdings hypoechoisches Myokard und verdickte Papillarmuskeln (GASCHEN *et al.*, 1999). Eine weitere vielleicht derzeit noch unterschätzte Differentialdiagnose zur HCM kann wie beim Menschen die Glykogenspeicherkrankheit sein. Die Glykogenspeicherkrankheit Typ IV wurde vor kurzem als autosomal rezessiv vererbte Erkrankung bei der Norwegischen Waldkatze beschrieben. Hierbei kann sich Glykogen in den Myozyten ablagern und dem Phänotyp einer HCM ähneln (FYFE *et al.*, 2007). Echokardiographische Fehleinschätzungen der Wanddicken konnten bei Katzen mit alternierendem Hydratationsstatus nachgewiesen werden.

Bei vier von zehn dehydrierten Katzen wurden in einer Studie die diastolischen Wanddicken mit > 6 mm gemessen (Pseudohypertrophie). Eine Dehydratation kann dem zufolge eine Kammerwandhypertrophie vortäuschen und zu Fehldiagnosen führen (CAMPBELL & KITTLESON, 2007).

4.5.6. Gentests

Für die A31P- und die A74T-Mutation bei Maine-Coon-Katzen sowie für die C820T-Mutation bei Ragdoll-Katzen im MYBPC3, werden von kommerziellen Laboratorien Gentests angeboten. Die kommerziellen Laboratorien benötigen für den Gentest lediglich eine Blutprobe in Form von EDTA-Blut oder einen Backenabstrich, der mit einer vom Labor erhältlichen speziellen Bürste vom Besitzer selbst durchgeführt werden kann. Für den DNA-Test wird zunächst aus einer Blutprobe oder den Backenschleimhautabstrichen die DNA der Katze isoliert. Mittels PCR wird dann das betroffene Gen millionenfach vervielfältigt und anschließend wird automatisch mit Hilfe eines Genetic Analyzers die Erbsequenz gelesen. Somit kann die Mutation auf direktem Weg mit sehr hoher Testsicherheit nachgewiesen werden (LABOKLIN, 2007). Angaben über die klinische Validität dieser Tests existieren bisher nicht.

V. Material und Methodik

1. Material

In die Studie wurden prospektiv 198 Katzen aufgenommen. Die Katzen waren Patienten der Medizinischen Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, oder gesunde Katzen im Privatbesitz, die an regelmäßigen HCM-Screenings teilnahmen.

1.1. Alters- und Geschlechtsverteilung

Das Alter der Katzen lag bei Vorstellung in der Klinik im Mittel bei 75,5 Monaten mit einer Spanne von 3 - 216 Monaten (Median 67 Monate). Das in die Kalkulation einbezogene Alter entsprach dem Alter der Katzen bei Erstdiagnose. Aufgrund der Tatsache, dass Katzen erst im späteren Alter HCM entwickeln können, wurden alle herzgesunden weiblichen Katzen im Alter unter 36 Monaten und alle herzgesunden männlichen Katzen im Alter unter 24 Monaten gesondert in eine Gruppe „jung & herzgesund“ eingeteilt. Die Einteilung in oben genannte Altersgruppen erfolgte anhand der in der Literatur beschriebenen Altersangaben, wann erste sonographische Anzeichen einer HCM erkennbar sind. Demnach beschreibt KITTLESON (1996, 1999, 2005), dass bei den meisten betroffenen Maine-Coon-Katzen die HCM im ersten Lebensjahr nicht echokardiographisch präsent ist. Bei männlichen Maine Coons treten erste deutliche echokardiographische Veränderungen jedoch bereits ab dem zweiten Lebensjahr auf. Weibliche Tiere tendieren dazu, die HCM erst später zu entwickeln. Zumeist manifestiert sich die HCM bei weiblichen Maine Coons im Alter von drei Jahren. Bei grenzwertig eingestuften und zu jungen Katzen wurde der Herzultraschall nach einem Jahr wiederholt. In diesen Fällen zählte das Alter der Zweituntersuchung. Die Studienpopulation setzte sich aus 95 männlichen und 103 weiblichen Tieren zusammen.

1.2. Rassen

Im Rahmen des HCM-Screening-Programms wurden 115 reinrassige Maine-Coon-Katzen in die Studie aufgenommen. Die Katzen wurden zunächst phänotypisiert und anschließend dem Genotyp bezüglich der SNPs (A31P und A74T im MYBPC3) zugeordnet. Zusätzlich wurden an HCM erkrankte Katzen anderer Rassen (AR), in die Studie einbezogen, um bei diesen ebenfalls

Vorkommen und Häufigkeit der als Main Coon-spezifisch geltenden SNPs zu evaluieren. Für die herzgesunde Kontrollgruppe bezüglich der AR konnten 21 vorberichtlich gesunde Katzen aus Privatbesitz phäno- und genotypisiert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Patientengut: alle untersuchten Rassen exklusive Maine Coons wurden der Gruppe „andere Rassen“ (AR) zugeteilt. MC = Maine Coon, NWK = Norwegische Waldkatze, EKH = Europäisch Kurzhaar.

		AR			
Rasse	**MC**	**NWK**	**Perser**	**EKH**	**Andere**
Anzahl	115	20	11	49	2

2. Methoden

Die Phänotypisierung erfolgte an der Medizinischen Kleintierklinik, LMU München, Abteilung für Kardiologie, unter der Leitung von Dr. Gerhard Wess. Alle Laborarbeiten wurden, falls nicht anders angegeben, im Forschungslabor der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München unter Leitung von Dr. Karin Weber, Institut für Tierphysiologie, durchgeführt. Die statistische Betreuung erfolgte durch das Stablab München, Institut für Statistik der LMU München, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Küchenhoff und Frau Monja Mahling.

2.1. Phänotypisierung der Katzen

Zur Phänotypisierung wurden die Katzen jeweils einer kompletten kardiovaskulären Untersuchung unterzogen. Anschließend wurde die Studienpopulation in die Phänotyp-Gruppen „adult & herzgesund“ (männliche Tiere > 24 Monate und weibliche Tiere > 36 Monate), „HCM“, „equivocal“ und „jung & herzgesund“ (männliche Tiere < 24 Monate und weibliche Tiere < 36 Monate) unterteilt.

2.1.1. Anamnese und klinische Untersuchung

Bei jeder Katze erfolgte eine komplette Anamnese hinsichtlich des Auftretens von HCM in der Familie und hinsichtlich früherer Erkrankungen der Katze. Den Besitzern wurden gezielt Fragen über Auftreten von plötzlichem Herztod, Linksherzversagen oder HCM bei verwandten Tieren gestellt. Von allen Rassekatzen wurde eine Kopie des Stammbaums für spätere Stammbaumanalysen einbehalten. Jede Katze wurde komplett klinisch

untersucht, besonderer Wert wurde dabei auf das Herz-Kreislaufsystem gelegt. Zusätzlich erfolgte bei jeder Katze eine Palpation der Schilddrüsengegend. Bei einer palpierbaren hypertrophierten Schilddrüse wurde der Laborparameter T4 eingeleitet, ebenso bei Katzen mit Verdacht oder Anzeichen einer Hypertrophie des Herzmuskels ab einem Alter von über 3 Jahren zum Ausschluss einer Hyperthyreose. Als Referenzbereich von T4 wird in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München ein Wert zwischen 12 und 37 nmol/l angesehen.

2.1.2. Blutdruckmessung

Mit dem Gerät „Ultrasonic Doppler Flow Detector“ (Parks Medical Electronics, Aloha, Oregon, USA) wurde bei allen Studienpatienten mit Verdacht oder Anzeichen einer Hypertrophie des Herzmuskels eine nicht invasive Blutdruckmessung durchgeführt. Die Messung wurde bei jedem Patienten viermal wiederholt. Ein systolischer Blutdruck von weniger als 160 mmHg wurde als physiologisch angesehen.

2.1.3. Echokardiographie

Bei allen Studienpatienten wurde ein Herzultraschall mit dem Gerät Vivid 7 (GE Medical Systems, Horten, Norway) unter Verwendung einer 7,5 MHz-Sektorschallsonde durchgeführt. Die Ultraschalluntersuchung erfolgte unsediert jeweils in rechter und linker Seitenlage auf einem Plexiglastisch. Während der Ultraschalluntersuchung zeichnete dasselbe Gerät ein einkanaliges EKG (Ableitung II) auf. Bei jeder Katze wurden Standardschnittebenen aufgenommen (KITTLESON, 1998a). Die Standardaufnahmen beinhalteten die rechts parasternale Kurzachse und Längsachse sowie das links apikale und links kraniale Sichtfenster. Die Standardmessungen erfolgten im zweidimensionalen Bild mit der Bestimmung der enddiastolischen Wanddicke des Septums (IVSd) und der linksventrikulären freien Wand (LVPWd) sowie des enddiastolischen inneren Durchmessers des linken Ventrikels (LVIDd) unterhalb der Mitralklappen. Das LA und der Querschnitt der Aorta (Ao) wurden auf Höhe der Herzbasis dargestellt und anschließend der Durchmesser von LA und Ao gemessen. Zudem wurde nachfolgend das Verhältnis LA/Ao kalkuliert. Als HCM wurde eine enddiastolische Wanddicke ab 6 mm und/oder das Vorhandensein einer deutlichen Papillarmuskelhypertrophie angesehen. Der Bereich zwischen

5,5 mm und 5,9 mm wurde als „equivocal“ (Grauzone zwischen normaler Wanddicke und als hypertrophiert geltender Wanddicke) angesehen, ebenso eine geringgradige Papillarmuskelvergrößerung. Die Beurteilung der Papillarmuskelgröße erfolgte subjektiv. Zusätzlich erfolgte eine Einteilung in Schweregrade der HCM. Dazu wurden die Messungen der enddiastolischen Wanddicke an der breitesten Stelle im IVSd oder LVPWd in der rechts parasternalen Kurzachse und Längsachse im zweidimensionalen Bild herangezogen. Bei Messwerten zwischen 6 mm und 6,5 mm wurden die Katzen in den Schweregrad „milde“ HCM“ eingeteilt, bei 6,5 mm bis 7 mm galt die HCM als „moderat“. Lag die Wanddicke im IVSd und/oder LVPWd in einem Bereich über 7 mm, so wurde dies als „hochgradige“ HCM befundet. Auch bei einem Verhältnis von LA/Ao über 1,5 mit verdickten Kammerwänden und/oder einer endsystolischen Kammerobliteration wurde von einer hochgradigen HCM ausgegangen. Eine Beurteilung des Blutflusses über den Herzklappen fand mittels Farbdopplerechokardiographie statt, um auf Regurgitationen oder Turbulenzen rückzuschließen. Mittels PW-Doppler und CW-Doppler wurden die Blutflussgeschwindigkeiten über Aorten- und Pulmonalklappe sowie die Mitral- und Trikuspidaleinflussprofile gemessen. Bei Vorhandensein von Insuffizienzjets erfolgte eine genaue Beurteilung der Jetgeschwindigkeit mittels PW- und CW-Doppler.

2.1.4. Einschlusskriterien

Alle in die Studie aufgenommenen Maine-Coon-Katzen waren reinrassig. Letzteres wurde durch Einsicht in die Papiere inklusive Stammbaum und durch eine eindeutige Identifizierung (Ablesung von Chip oder Tätowierung) des Tieres gewährleistet. Der Herzultraschall wurde bei jedem Studienpatienten von dem erfahrenen Kardiologen (Dr. Gerhard Wess) durchgeführt. Bezüglich der phänotypisch herzgesunden Kontrollgruppe (Gruppe: „adult & herzgesund“) wurden nur männliche Tiere, die älter als 24 Monate und weibliche Tiere, die älter als 36 Monate waren, in die statistischen Berechnungen, die Prävalenzbestimmung sowie die Berechnungen für Schätzwerte der klinischen Validität der beiden Gentests einbezogen.

2.1.5. Ausschlusskriterien

Ein Ausschluss aus der Studie erfolgte bei Katzen mit Überfunktion der Schilddrüse oder systemischer Hypertonie.

2.2. Genotypisierung der Katzen

Zur Genotypisierung der Katzen erfolgte eine Untersuchung von herzgesunden und herzkranken Maine-Coon-Katzen sowie verschiedenen anderen Katzenrassen auf die bei Maine Coons bekannten SNPs (A31P- uns A74T) im felinen kardialen MYBPC3-Gen.

2.2.1. Isolierung und quantitative Bestimmung feliner DNA

Die feline genomische DNA wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Test Kits: QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) aus Leukozyten von frischem oder bei -80 °C tiefgefrorenem EDTA-Blut gewonnen. Die DNA-Isolierung erfolgte unter der Anwendung des folgenden Standardprotokolls der Firma Qiagen (Hilden, Germany). 20 µl Protease K® wurden in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert. Dazu wurden 200 µl EDTA-Blut und 200 µl Puffer AL® hinzu gegeben und 15 sec mit dem Vortex-Mixer gemischt, um die DNA aus den Zellen zu lösen. Es folgte eine Inkubation des Gemisches für 10 min bei 56 °C und danach eine Zentrifugation für 9 sec bei maximaler Geschwindigkeit. Nun wurden der Probe 200 µl Ethanol (96 %) hinzugefügt, und die Probe wiederum mit dem Vortex-Mixer gemischt und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Als nachfolgender Schritt wurde eine QIAamp Spin Column® in ein 2 ml Sammelröhrchen platziert, und das Flüssigkeitsgemisch auf zwei Teile in die Spin Column gegeben und jeweils bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert, damit sich die DNA auf dem Filter binden konnte. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen, um in die Spin Column 500 µl Puffer AW1® zu geben und diese wiederum bei 8000 rpm für 1 min zu zentrifugieren und die gebundene DNA von ihren Restbestandteilen zu waschen. Nun wurde die sich im Sammelröhrchen befindende Flüssigkeit ebenfalls verworfen und die Spin Column mit 500 µl Puffer AW2® gefüllt und für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat dieses Schrittes wurde wiederum verworfen. Die Zentrifugation wurde bei 14000 rpm für 1 min erneut durchgeführt. Die Spin Column wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen gegeben. Die sich auf dem Filter befindende DNA mit dem

Puffer AE® wurde 1 min lang inkubiert und anschließend mit dem Zentrifugationsvorgang für 1 min bei 8000 rpm vom Filter gelöst und zusammen mit dem Puffer AE® im Sammelröhrchen aufgefangen. Die mit Puffer AE® versehene DNA wurde direkt im Anschluss auf Konzentration und Reinheit mittels photometrischer Messung bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm bestimmt und bei -20°C gelagert (QIAGEN, 2003).

2.2.2. Primerauswahl

Die Konstruktion der Primersequenzen für das Exon 2 des felinen MYBPC3 erfolgte an homologen Sequenzen von Mensch, Maus, Hund, Ratte und Rind (felines MYBPC3-Transkript: Ensembl ID ENSFCAT 00000002530). Der GC-Anteil sollte hierbei relativ hoch sein. Die Schmelztemperatur (Tm) der beiden Primer musste in einem ähnlichen Bereich liegen. Zur Tm-Berechnung wurde der „oligo-calculator“ der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Germany, www.metabion.com/biocalc/index.html) herangezogen. Es wurde jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer konstruiert (Tabelle 5), so dass das PCR-Produkt eine Größe von 260 Basenpaaren (bp) erreiche. Letzteres stellt eine optimale Länge für das anschließende Sequenzieren dar. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Metabion GmbH (Martinsried, Germany).

Tabelle 5: Primerauswahl

Vorwärtsprimer:	5’-AGT CTC AGC CTT CAG CAA GAA GCC-3’
Rückwärtsprimer:	5’-GGT CAA ACT TGA CCT TGG AGG AGC C-3’

2.2.3. Polymerasekettenreaktion

Im nächsten Schritt wurden die gesuchten Sequenzen einer vorberichtlich auf die MYBPC3-Mutation negativ, zweier heterozygot und einer homozygot getesteten Maine-Coon-Katzen mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) unter Verwendung des Gerätes Mastercycler® (Eppendorf, Hamburg, Germany) amplifiziert. Für die Durchführung der PCR erfolgte die Anwendung des folgenden Standardprotokolls der Firma Qiagen (Hilden, Germany). Zunächst wurden die DNA-Proben so verdünnt, dass jedes Reaktionsgemisch weniger als 1 µg genomische DNA enthielt. Hierbei erfolgte eine Verdünnung der mit Puffer AE® versetzten DNA-Proben in einem Verhältnis von 1:49 mit *Aqua bidestillata*.

Anschließend folgte die Herstellung eines Reaktionsgemisches auf Eis unter Verwendung des Taq PCR Master Mix® (Qiagen, Hilden, Germany) laut Empfehlung des Herstellers. Die in Tabelle 6 aufgeführten Reagenzien wurden nacheinander in PCR Tubes® (Eppendorf, Hamburg, Germany) pipettiert. Schließlich konnte eine PCR unter Optimierung der Tm und der Anzahl der Zyklen ebenfalls laut Empfehlung des Herstellers mit in Tabelle 7 aufgeführten Reaktionsschritten durchgeführt werden (QIAGEN, 2002).

Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches.

Komponente	**Volumen/Reaktion**
Taq PCR Master Mix®	50 µl
Vorwärtsprimer	20 µl
Rückwärtsprimer	20 µl
Aqua bidestillata	5 µl
DNA 1:49 verdünnt	5 µl
Totalvolumen	100 µl

Tabelle 7: Reaktionsschritte der PCR und Programmierung des Cyclers.

Reaktionsschritt	**Zeit**	**Temperatur**	
Initiale Denaturierung	3 min	94°C	
3-step cycling:			
Denaturierung	1 min	94°C	
Annealing	30 sec	60°C	30 Zyklen
Extension	1 min	72°C	
Finale Extension	10 min	72°C	
Kühlung		4°C	

2.2.4. Qualitative Bestimmung der PCR-Produkte

Die Qualität der PCR-Produkte wurde mittels Agarosegelelektrophorese im Labor des Instituts für Tierphysiologie, LMU München, bestimmt. Dies erfolgte unter Herstellung eines 1-%igen Agarosegels aus 0,5 g Agarosepulver und 50 ml TBE-Puffer. Die Lösung wurde in der Mikrowelle mehrfach erwärmt, bis die

Schlierenbildung stoppte. Anschließend erfolgte eine Abkühlung auf 60°C. Der Gellösung wurde 1 µl Ethidiumbromid (GIBCO BRL, Paisley, Großbritannien) beigefügt und vermischt. Nun wurde die Gellösung unter Vermeidung von Luftblasenbildung in die Spannungskammer gegeben und der Kamm zur Taschenbildung auf die negative Seite der Kammer (schwarze Markierung) in die Lösung gesteckt werden. Nach 15 min wurde dem gehärteten Gel der Kamm entzogen. Das Gel wurde anschließend mit TBE-Puffer überdeckt. Die Herstellung des DNA-Leiter-Gemisches erfolgte mit 17 µl TBE Puffer, 1 µl DNA-Leiter und 2 µl Farbstoff (6x Loading Dye, Promega, Madison, USA) unter anschließender Vermischung auf einer Parafilmfolie. Nachfolgend wurden das DNA-Leiter-Gemisch und das PCR-Produkt-Gemisch in die Geltaschen pipettiert und die Spannungskammer auf 78 Volt für 40 min eingestellt. Das Elektrophoreseergebnis konnte anschließend unter ultraviolletem Licht dargestellt werden. Bei jeder PCR-Probe durfte nur eine Bande entstehen. Die Wanderstrecke des PCR-Produktes wurde anhand des DNA-Leiters, der als Referenz diente, beurteilt und musste bei 260 bp enden.

2.2.5. Reinigung der PCR-Produkte

Um das PCR-Produkt sequenzieren zu können, musste es vorher aufgereinigt werden. Hierzu wurde das MinElute PCR Purification Kit® (Qiagen, Hilden, Germany) angewandt und die Reinigung der Produkte laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 500 µl Puffer PBI® zu 100 µl PCR-Produkt-Gemisch pipettiert. Anschließend wurde die MinElute Column® in das 2 ml Sammelröhrchen gegeben und das vorherige Gemisch in die MinElute Column® platziert. Damit die DNA an den Filter bindet, wurde die sich im Sammelröhrchen befindende Column bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Nach der Verwerfung des Zentrifugats wurde die MinElute Column® nochmals in dasselbe Sammelröhrchen gesetzt. Zur Reinigung der DNA von Restbestandteilen der PCR, erfolgte eine Zugabe von 750 µl Puffer PE® direkt auf dem Filter. Anschließend folgte eine erneute Zentrifugation des Röhrchens samt MinElute Column® für 1 min bei 13000 rpm. Das Zentrifugat wurde im Anschluss noch einmal verworfen und die MinElute Column® in ein sauberes 1,5 Sammelröhrchen platziert. Anschließend wurde, um die DNA aus dem Filter zu lösen, 10 µl Puffer EB® in das Zentrum der Filtermembran gegeben und 10 min inkubiert. Mittels Zentrifugation (13000 rpm für 1 min) konnte die DNA

schließlich aus dem Filter gelöst und im Sammelröhrchen aufgefangen werden (QIAGEN, 2006).

2.2.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung der gereinigten PCR-Produkte übernahm die Firma Qiagen (Hilden, Germany). Es wurde ein „single read“ jeder Probe mit Vorwärts- und Rückwärtsprimer durchgeführt. Um die Qualität und Richtigkeit der sequenzierten Einzelstränge zu überprüfen, wurden die Sequenzen der drei Genotypen (GG, GC, CC bezüglich A31P) gegenseitig und mit der veröffentlichten Sequenz von MEURS und Mitarbeitern (2005) sowie mit dem humanen, bovinen und caninen Pendant verglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.2.7. Real Time PCR mittels Primer-Probe-Assay

Die Detektion und die Allelunterscheidung der SNPs erfolgten unter Anwendung des Taqman®-Prinzips. Die Real time quantitative PCR wird normalerweise zur Quantifizierung von PCR-Produkten mittels Floureszenzsignalen herangezogen, sie kann aber auch für andere Zwecke verwendet werden, z. B. Genotypisierung. Hierzu bietet sich der Einsatz von so genannten FRET-Sonden an, welche vom Förster resonance energy transfer (FRET)-Prinzip Gebrauch machen. Hierbei wird ein Donor-Flourochrom (Reporter) angeregt, welches sodann seine Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (bzw. einen „dunklen“ Quencher) abgibt. Wird der Abstand zwischen Akzeptor und Donor größer, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus. Beim Primer-Probe-Assay wird die Genotypisierung durch komplementäre DNA-Sonden nach dem FRET-Prinzip vorgenommen, hier wurde speziell das TaqMan®-Prinzip angewandt. Die TaqMan®-Sonde besitzt an einem Ende einen Quencher und wird an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff z. B. TAMRA oder FAM markiert. Durch die Taq-Polymerase, die zusätzlich Enukleaseaktivität besitzt, wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abgebaut, wodurch sich Quencher und Fluorophor voneinander entfernen. Dadurch kann eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden. Eine bildliche Darstellung des Taqman®-Prinzips ist in Abbildung 16 gegeben.

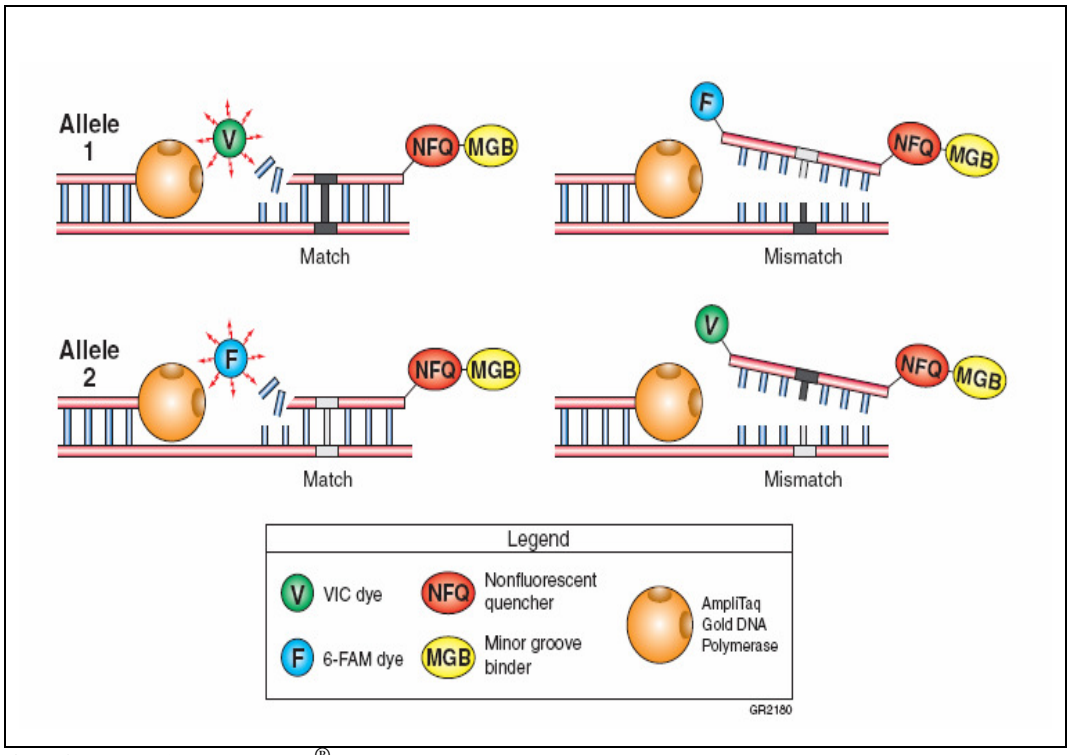


Abbildung 16: Taqman®-Prinzip (LIVAK *et al.*, 1995)

Zur Genotypisierung der Katzen hinsichtlich der A31P- und A74T-SNPs wurde ein kommerzieller Assay-by-Design-Service (Applied Biosystems, Foster City, USA) genutzt, der sowohl Primer- und Sondendesign als auch Herstellung eines fertigen Assaymixes mit Primer und Sonden in der richtigen Konzentration übernahm. Dieser TaqMan® SNP Genotyping Assay enthält zwei TaqMan®-Reportersequenzen (Sonden) mit dem Farbstoff FAM für das Allel X und mit dem Farbstoff VIC für das Allel Y. Durch den Zusatz eines „minor groove binders“ (MGB) wird eine Erhöhung der Tm erhalten, ohne dass die Sonde verlängert wird, wodurch es möglich wird, kürzere Sonden zu gestalten. Letzterer resultiert in größeren Tm-Unterschieden zwischen passenden und unpassenden Proben und garantiert eine genauere Allelunterscheidung. Zusätzlich sind im TaqMan® SNP Genotyping Assay ein Vorwärtsprimer und ein Rückwärtsprimer zur Amplifikation der Interessensregion und ein nicht floureszierender Quencher (NFQ) vorhanden, welcher ebenfalls eine genauere Detektion des Floureszenz-signals gewährleistet (AB, 2003). In Tabelle 8 und Tabelle 9 sind die angewandten Reporter- und Primersequenzen des SNP Genotyping Assay Mix für die SNPs A31P und A74T des felinen MYBPC3 ersichtlich.

Tabelle 8: Reporter- und Primersequenzen des TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix für den A31P-SNP; SNP-Lokalisation im Kodon 31 fettgedruckt.

Sonde VIC A31P:	5'-TGTCTCGG**G**CTCGAA-3'
Sonde FAM A31P:	5'-CTGTCTCGG**C**CTCGAA-3'
Vorwärtsprimer:	5'-GGCAGCCAGCAGCTCT-3'
Rückwärtsprimer:	5'-GCCAGCGCACCTTTACTC-3'

Tabelle 9: Reporter- und Primersequenzen des TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix für den A74T-SNP; SNP-Lokalisation im Kodon 74 fettgedruckt.

Sonde FAM A74T:	5'-CGTGGGCCCC**A**CC-3'
Sonde VIC A74T:	5'-CGTGGGCCCC**G**CC-3'
Vorwärtsprimer:	5'-CGAGGCACACTCTGACAGT-3'
Rückwärtsprimer:	5'- GAGGAGCCAGCGATGACT-3'

Der RT-PCR Master Mix wurde wie folgt hergestellt:

Bei jeder PCR erfolgte die Verwendung von 96-Loch-Mikrotiter-Platten (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die DNA-Proben wurden so mit *Aqua bidestillata* verdünnt, dass sie insgesamt 1-20 ng genomische DNA enthielten. Anschließend wurden jeweils 11,9 µl verdünnte DNA auf die 96-Loch-Mikrotiter-Platte verteilt, wobei sechs Wells ohne DNA verblieben, und somit die Negativprobe (NTC) darstellten. Zu jeder DNA-Probe mussten jeweils 0,625 µl TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) und 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix, No Amperase® (Applied Biosystems, Foster City, USA), welcher die AmpliTaq Gold DNA Polymerase® enthält, hinzu pipettiert werden. Nun wurde die RT-PCR und Allelunterscheidung in folgenden Schritten mit dem Gerät Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Zunächst erfolgte ein „Pre-read run", bei dem das Gerät kurzzeitig auf 60°C erhitzte, dann folgten die Schritte der Amplifizierung und des „Post-read runs" (AB, 2003). Die Konditionen des PCR-Programms sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Schritte und Konditionen der RT-PCR.

Pre-read run	**Initiale Schritte**	**PCR (40 Zyklen)**		**Post-read run**
	Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA Polymerase®	Denaturation	Annealing/Extension	
60°C	95°C	92°C	60°C	60°C
	10 min	15 sec	1 min	

Die Analyse der Floureszenzsignale erfolgte schließlich mit der ABI Prism 7300/7500 SDS Software® (Applied Biosystems, Foster City, USA). Mittels dieser Software wurden die Floureszenzmessungen auf jedes einzelne Well der 96-Loch-Mikrotiter-Platte (Applied Biosystems, Foster City, USA), bezogen kalkuliert. Mittels ABI Prism 7300/7500 SDS-Software® (Applied Biosystems, Foster City, USA) konnte anschließend eine Allelunterscheidung getroffen werden. Die unterschiedlichen Allele wurden in der Software je nach Farbstoff farblich markiert. In Abbildung 17 ist die Zuordnung des Farbstoffes für die jeweiligen Allele der zwei verschiedenen SNPs a) A31P und b) A74T ersichtlich.

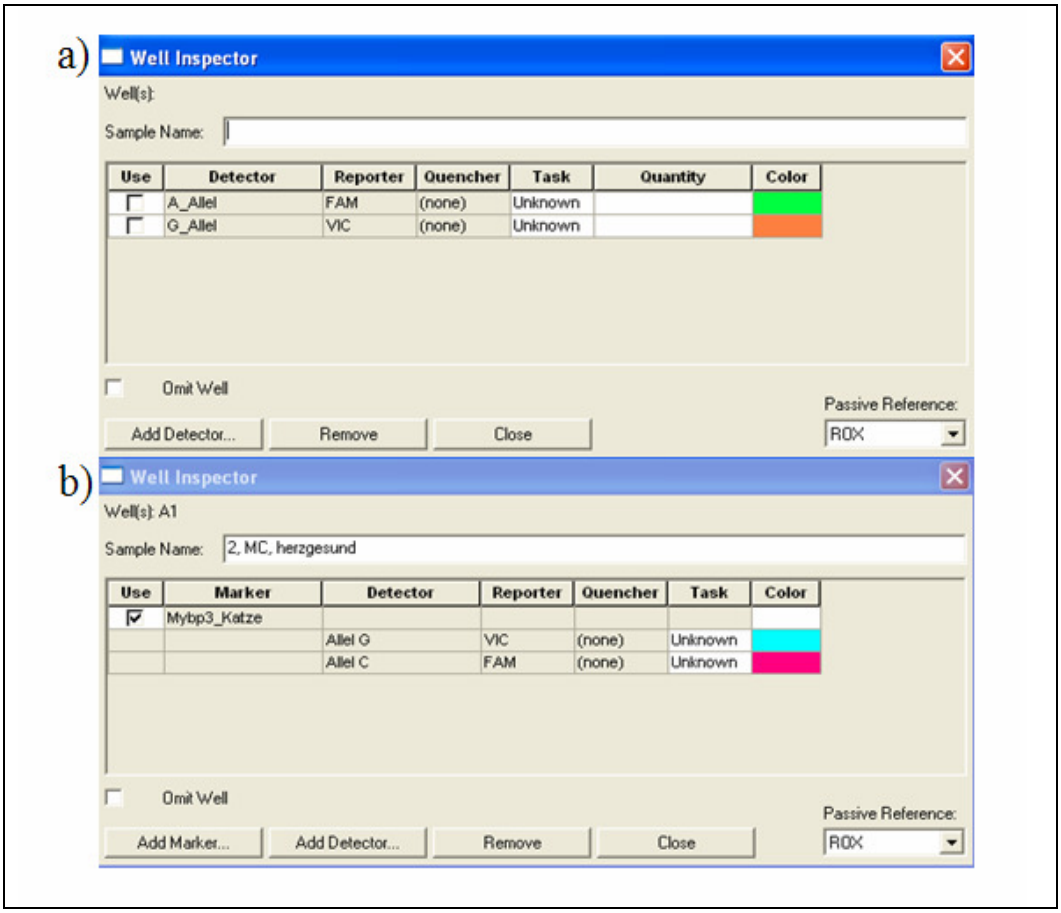


Abbildung 17: Farbstoffzuordnung für a) SNP A74T: Allel G = VIC, Allel A = FAM; b) SNP A31P: Allel G = VIC, Allel C = FAM.

Um den Genotyp für jede Probe zu bestimmen, wurden die Allele mittels der verwendeten Software in ein Diagramm mit zwei Achsen eingetragen (siehe Abbildung 18). Die Träger des Wildtypallels (G/G) befanden sich bei unserer Gruppierung unten rechts auf der X-Achse (rote Kreise), die homozygoten Allelträger (C/C bei A31P oder A/A bei A74T) der getesteten SNPs befanden sich oben an der Y-Achse (blaue aufgestellte Quadrate). Die heterozygoten Allelträger (G/C bei A31P oder G/A bei A74T) waren mittig angeordnet (grüne Dreiecke). In der linken unteren Ecke wurden die Negativproben (NTC) als gelbe Quadrate dargestellt, während sich undeterminierte, also nicht erfolgreich getestete Probanden, willkürlich im Diagramm verteilten (Kreuz). Bei jedem Probanden wurden zusätzlich die Spektren einzeln evaluiert (Abbildung 19). Erst dann wurde das Ergebnis als glaubwürdig angesehen. Insgesamt wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen (AB, 2004).

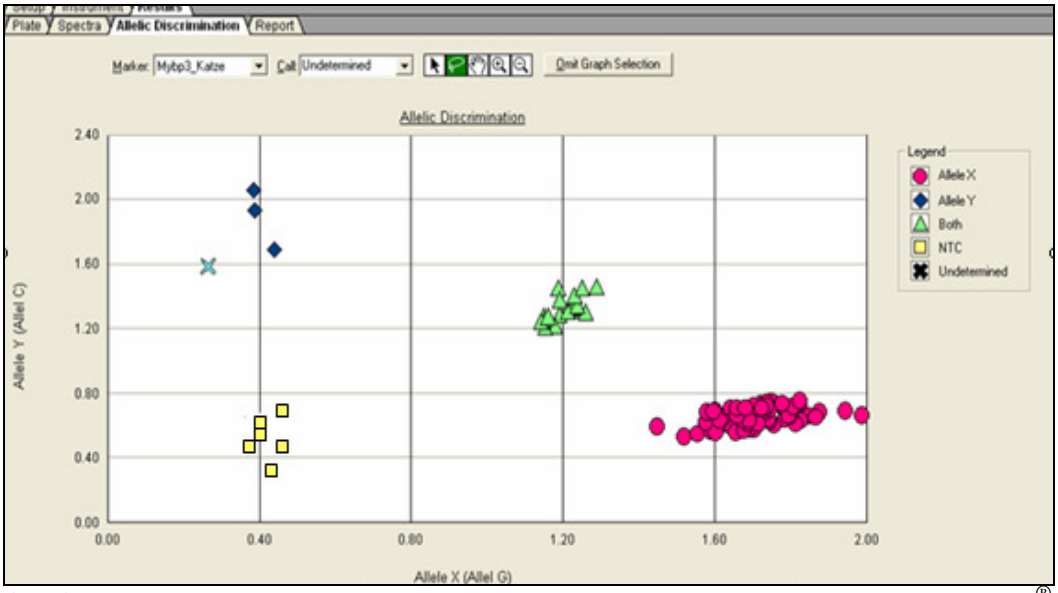


Abbildung 18: Allelunterscheidung in der ABI Prism 7300/7500 SDS-Software® (Applied Biosystems, Foster City, USA); rote Kreise = homozygot für das Wildtypallel (G/G); grüne Dreiecke = heterozygote Tiere (G/C bei A31P oder G/A bei A74T); blaue Quadrate = homozygote Mutationsträger (C/C bei A31P oder A/A bei A74T); gelbe Quadrate = Negativproben; Kreuz = undeterminierte Probe.

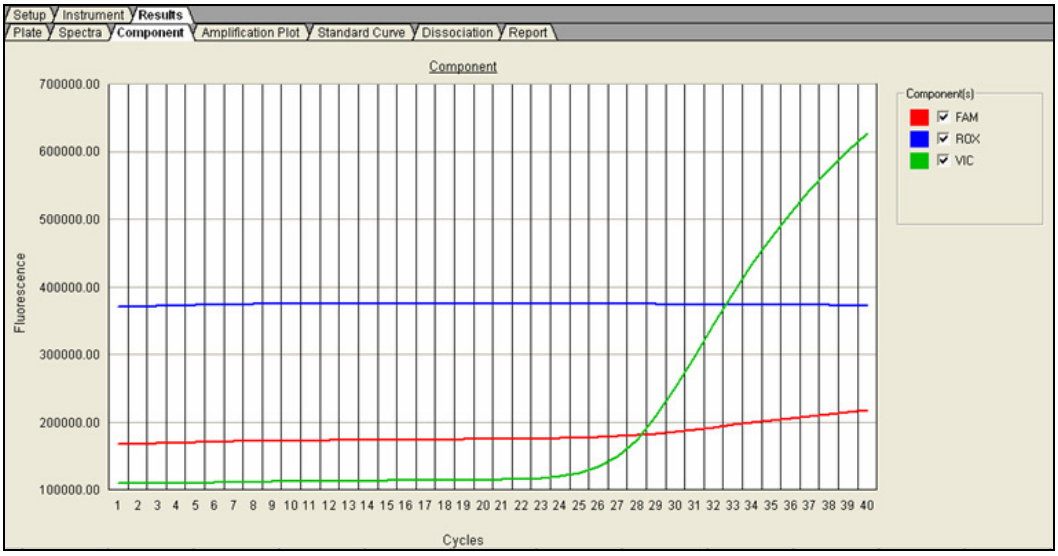


Abbildung 19: Spektralleistung über die gesamte PCR-Dauer hinweg; Beispiel eines für den A31P-Polymorphismus homozygot getesteten Probanden; grüne Linie = C-Allel mit Farbstoff VIC; rote Linie = G-Allel mit Farbstoff FAM; blaue Linie = Schwellenwert; nur die grüne Linie zeigt ein Floureszenzsignal über dem Schwellenwert.

2.3 Auswirkung der A31P- und A74T-Polymorphismen auf das Protein

Mit dem Programm PolyPhen (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html) wurde die wahrscheinliche Auswirkung der Punktmutationen bezüglich einer Schädigung des kodierten Proteins evaluiert. Das Programm benötigt hierzu lediglich die Proteinsequenz des betroffenen Gens im FASTA-Format, die Kodoninformation und eine Information über die Aminosäuren (im Programm PolyPhen als AA abgekürzt), die durch die Mutation ausgetauscht werden, z. B. Position 74, AA1 = A, AA2 = T (siehe Abbildung 20). Das Programm kalkuliert hierbei die so genannten „PSIC scores“ („position-specific independent counts“), um eine Profilmatrix („profile score“) zu errechnen. Diese stellt ein logarithmisches Verhältnis der Wahrscheinlichkeit einer an einer bestimmten Stelle auftretenden Aminosäure in das Verhältnis zur Wahrscheinlichkeit, wenn die Aminosäure an irgendeiner Stelle auftritt (Hintergrundfrequenz). PolyPhen berechnet den absoluten Wert der Differenz der „profile scores“ beider getesteten Allele. „PSIC score“-Differenzen zwischen 1,5 und 2 sagen aus, dass die Aminosäurensubstitution möglicherweise eine Schädigung des Proteins verursacht, ein Wert > 2 sagt aus, dass eine Proteinschädigung sehr wahrscheinlich ist (RAMENSKY *et al.*, 2002).

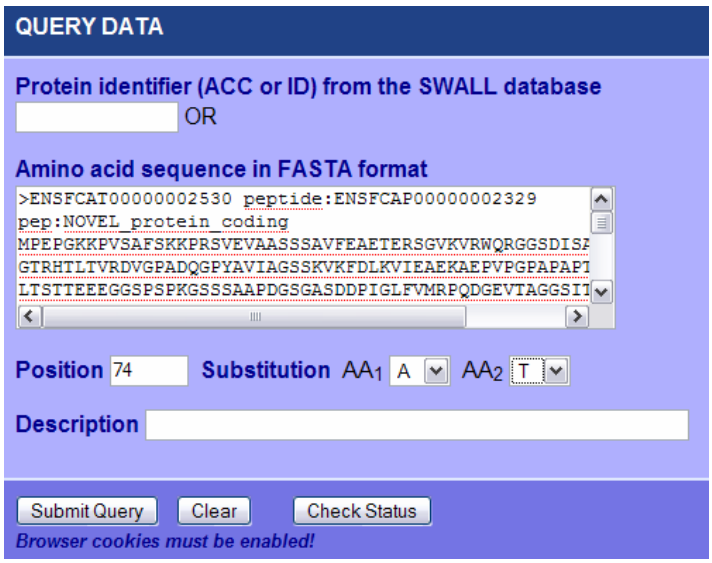


Abbildung 20: Ausschnitt aus dem Programm PolyPhen (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html) unter Eingabe der Aminosäurensequenz des MYBPC im Fasta-Format und Auswahl der Position der Aminosäurensubstitution; hier als Beispiel: A74T.

2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS für Windows, Version 13,01 (SPSS Inc., Chicago, USA) vorgenommen.

2.4.1. Prävalenzbestimmung

Die geschätzte Prävalenz *(P)* der Erkrankung errechnet sich wie in Formel 1 ersichtlich. Die Berechnung dieser Kennzahl erfolgte unter der Berücksichtigung, dass die untersuchten Tiere zufällig aus der Population herausgegriffen wurden und nicht aufgrund von Symptomen in der Klinik vorgestellt worden sind. Hierzu wurden die Maine-Coon-Katzen aus dem an der Medizinischen Kleintierklinik, Abteilung für Kardiologie, durchgeführtem HCM-Screening-Programm herangezogen. Katzen, die in die Gruppe „jung & herzgesund“ (weibliche Tiere < 36 Monate und männliche Tiere < 24 Monate) eingeteilt wurden, konnten bei der Berechnung der geschätzten Prävalenz nicht berücksichtigt werden, da sie nicht als eindeutig herzgesund angesehen werden können. Ebenso wurden die grenzwertigen Tiere aus der Gruppe „equivocal“ hierbei nicht betrachtet. Die Unsicherheit bei der Schätzung der wahren Prävalenz wurde mittels eines 95 %

KI ausgedrückt (siehe Formel 3). Das KI wurde unter dem Einschluss des Standardfehlers (SE) wie in Formel 2 dargestellt, berechnet.

Formel 1: Geschätzte Prävalenz (*P*); n = Anzahl der Tiere.

$$P = \text{n Kranke / n aller Untersuchten}$$

Formel 2: Berechnung des Standardfehlers (SE); $\hat{\pi}$ = Schätzgröße, n = Anzahl der Tiere.

$$SE(\hat{\pi}) = \sqrt{[\hat{\pi}\ (1 - \hat{\pi}) / n]}$$

Formel 3: Berechnung des 95 %igen Konfidenzintervalls (KI), $\hat{\pi}$ = Schätzgröße, SE = Standardfehler.

$$95\ \%\ KI = \hat{\pi} \pm (SE \times 1{,}96)$$

2.4.2. Allelfrequenzbestimmung

Die Allelfrequenz stellt die prozentuale Häufigkeit eines Alles dar und wird in der vorliegenden Studie in Prozent angegeben. Für die Allelfrequenzberechnung wurden die Phänotypgruppen („adult & herzgesund“, „HCM“, „equivocal“ und „jung & herzgesund“) den Genotypgruppen (Wildtypallel: GG, heterozygot: G/C bei A31P oder G/A bei A74T, homozygot: C/C bei A31P oder A/A bei A74T) gegenüber gestellt. Hierbei wurden Maine-Coon-Katzen und andere Rassen (AR) separat betrachtet. Den Allelfrequenzen der verschiedenen Genotypen entsprechend wurde das Alter der Tiere in Form von Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum beschrieben.

2.4.3. Statistische Tests

Zum Vergleich der der Allelfrequenzen zwischen den Phänotypgruppen wurde der exakte Test nach Fischer durchgeführt. Das Erkrankungsrisiko bei Vorhandensein eines jeweiligen Phänotyps wurde mittels der Berechnung von Odds Ratios eingeschätzt.

2.4.3.1. Exakter Test nach Fisher

Zunächst wurde der exakte Test nach Fisher auf der 3 × 2-Tafel gerechnet. Dieser wurde dem Chi-Quadrat-Test vorgezogen, da die Gruppenzahl zum Teil sehr klein war. Hierbei sollte ermittelt werden, ob sich die Allelfrequenzen der Gruppen „adult & herzgesund“ und „HCM“ signifikant unterschiedlich verhalten. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ gesetzt.

2.4.3.2. Odds Ratio

So wurden ORs im Falle des A31P-SNPs für die durch Zusammenfassung von G/G + G/C (Genotyp: nicht HCM-assoziiert) versus C/C (Genotyp: HCM-assoziiert) oder G/G (Genotyp: nicht HCM-assoziiert) versus G/C + C/C (Genotyp: HCM-assoziiert) jeweils entstehenden 2 × 2-Tafeln (und dazugehörige 95 % KIs) bestimmt. In Tabelle 11 wird die oben beschriebene 2 x 2- Feldertafel als Beispiel illustriert. Dabei wurde evaluiert, ob Katzen mit Mutation ein höheres Risiko hatten, an der HCM zu erkranken, als Katzen, die keine Mutationsträger waren. Für den A74T-SNP wurden entsprechend die Allele G/G + G/A (Genotyp: nicht HCM-assoziiert) versus A/A (Genotyp: HCM-assoziiert) oder G/G (Genotyp: nicht HCM-assoziiert) versus G/A und A/A (Genotyp: HCM-assoziiert) zusammengefasst. Sobald aber im KI der Wert 1,0 enthalten ist, wobei kein unterschiedliches Risiko zwischen den beiden Genotypgruppen an der HCM zu erkranken bestünde, reflektiert das OR keine statistische Signifikanz.

Tabelle 11: Angewandte 2 x 2- Feldertafel zur Berechnung der Odds Ratios; (n) = Anzahl der Tiere; „adult & herzgesund“ = männliche Tiere > 24 Monate, weibliche Tiere > 36 Monate.

	Genotyp: nicht HCM-assoziiert	**Genotyp: HCM-assoziiert**
Phänotyp: adult & herzgesund	(n) adult & herzgesund	(n) adult & herzgesund
Phänotyp: HCM	(n) HCM	(n) HCM

2.4.4. Bestimmung der klinischen Validität der Gentests

Die Schätzgrößen ($\hat{\pi}$) der klinischen Validität für beide Gentests bestehen aus Sensitivität, Spezifität, positivem prädiktiven Wert (PPW) und negativem prädiktiven Wert (NPW). Zur Berechnung dieser Werte wurden Tabelle 12 und

die Formel 4-7 angewandt. $\hat{\pi}$ errechnet sich allgemein betrachtet der Formel 8. $\hat{\pi}$ wurde zunächst für den Fall berechnet, wenn heterozygote (G/C oder G/A) und homozygote (C/C oder A/A) Tiere als Gentest positiv betrachtet werden. Anschließend wurde $\hat{\pi}$ für den Fall bestimmt, wenn nur homozygot getestete Tiere als Gentest positiv betrachtet werden. Dabei wurden die Genotypen im selben Schema wie bei der Berechnung des ORs zusammengefasst, so dass auch eine separate Betrachtung der homozygoten (C/C oder A/A) Tiere stattfinden konnte. Die 95 % KIs wurden so bestimmt, dass zunächst ein KI für die logit-Transformation (φ), siehe Formel 9 berechnet wurde, welches auf die $\hat{\pi}$-Skala (die Sensitivskala) zurück transformiert wurde. Die Rücktransformation geschah, indem die untere und obere Grenze des KIs (φ) unter Anwendung von Formel 10 zurück transformiert wurden. Diese Vorgehensweise wurde zur KI-Berechnung bevorzugt, da die Schätzwerte häufig in der Nähe von 1 oder 0 lagen. Die Konstruktion des KI-Intervalls von φ erhielt man aus der Standardfehlerberechnung (Formel 11) und der anschließenden Anwendung von Formel 12. Letztere Berechnungen wurden mit dem Statistik-Programmpaket R (http://www.r-project.org), Version 2.3.1 durchgeführt.

Tabelle 12: Tabelle zur Erstellung der prädiktiven Werte; „adult und herzgesund“ = m > 24 Monate und w > 36 Monate; (n) = Anzahl der Tiere; RP = richtig positiv; FP = falsch positiv; FN = falsch negativ; RN = richtig negativ, TP = Test positiv; TN = Test negativ; AN = Anzahl aller Phänotyp-negativen Tiere; AP = Anzahl aller Phänotyp-positiven Tiere; N = Gesamtanzahl der Tiere.

A31P	**Genotyp : HCM-assoziiert**	**Genotyp : nicht HCM-assoziiert**	**Total**
Phänotyp: HCM	(n) RP	(n) FN	(∑ n) AP
Phänotyp: adult & herzgesund	(n) FP	(n) RN	(∑ n) AN
Total	(∑ n) TP	(∑ n) TN	N

Formel 4: Berechnung der Sensitivität; RP = Anzahl der richtig positiv getesteten Tiere; AP = Anzahl aller Phänotyp-positiven Tiere.

Sensitivität = RP / AP

Formel 5: Berechnung der Spezifität; RN = Anzahl der richtig negativ getesteten Tiere; AN = Anzahl aller Phänotyp-negativen Tiere.

$$\text{Spezifität} = RN / AN$$

Formel 6: Berechnung des positiven prädiktiven Werts (PPW); RP = Anzahl der richtig positiv getesteten Tiere; TP = Anzahl aller positiv getesteten Tiere.

$$PPW = RP / TP$$

Formel 7: Berechnung des negativen prädiktiven Werts (NPW); RN = Anzahl der richtig negativ getesteten Tiere; TN = Anzahl aller negativ getesteten Tiere.

$$NPW = RN / TN$$

Formel 8: Berechnung der Schätzgröße $\hat{\pi}$.

$$\hat{\pi} = n1 / (n1 + n2) = n1 / (\sum n)$$

Formel 9: Berechnung der Logit-Transformation φ.

$$\varphi = \text{logit} (\hat{\pi}) = \log (\hat{\pi} / (1 - \hat{\pi})$$

Formel 10: Berechnung der Rücktransformation von φ zu $\hat{\pi}$.

$$\hat{\pi} = \exp (\varphi) / (1 + \exp (\varphi))$$

Formel 11: Standardfehlerberechnung von φ.

$$SE (\varphi) = \sqrt[2]{(1 / x + (1 / (n - x))}$$

Formel 12: Berechnung des KI-Intervalls von φ.

$$95\ \%\ KI(\varphi) = \varphi \pm 1{,}96 \times SE(\varphi)$$

VI. Ergebnisse

1. Phänotypisierung

Nachfolgend wird die phänotypische Charakterisierung der Studienpopulation dargestellt.

1.1. Einteilung der klinischen Phänotypen

Die Katzen wurden über eine Periode von zwei Jahren prospektiv phänotypisch evaluiert und wie in Tabelle 13 ersichtlich eingruppiert. Die Phänotyp-positiven Tiere wurden zusätzlich ihrem Schweregrad nach eingeteilt. Letzteres ist in Tabelle 14 ersichtlich. Die Gruppen „adult und herzgesund“ und „HCM“ können eindeutig einem Phänotyp zugeordnet werden, während die Gruppen „equivocal“ und „jung und herzgesund“ keinem eindeutigen Phänotyp zugeordnet werden können, da sie womöglich noch im späteren Alter eine HCM entwickeln können.

Tabelle 13: Einteilung der Katzen nach Phänotyp und Unterteilung in Rassen (MC = Maine Coon; AR = andere Rassen exklusive Maine Coon; n = Anzahl der Tiere; adult & herzgesund = m > 24 Monate, w > 36 Monate; jung & herzgesund = m < 24 Monate, w < 36 Monate).

	adult & herzgesund	**HCM**	**„equivocal“**	**jung & herzgesund**
n (MC)	71	12	5	27
n (AR)	23	45	8	7

Tabelle 14: Einteilung der Phänotyp-positiven Katzen nach dem Schweregrad der Erkrankung und Unterteilung in Rassen. (MC = Maine Coon; AR = andere Rassen exklusive Maine Coon; n = Anzahl der Tiere).

	milde HCM	**mittelgradige HCM**	**hochgradige HCM**
n (MC)	7	4	1
n (AR)	13	17	15

1.2. Altersverteilung in den Phänotypgruppen

Tabelle 15 stellt die Altersverteilung der Phänotypgruppen bei den Maine-Coon-Katzen dar, während in Tabelle 16 die Altersverteilung der anderen Rassen beschrieben wird.

Tabelle 15: Altersverteilung der einzelnen Phänotypgruppen bei den Maine-Coon-Katzen (MC); m = männlich, w = weiblich. Für jede Phänotypgruppe erfolgt die Angabe der Anzahl der jeweiligen Tiere in der Gruppe (n), des Mittelwerts (MW), der Standardabweichung (SD), des Medians, des Minimums (Min) und des Maximums (Max) in Monaten.

Alter (MC)	**Phänotyp eindeutig zuzuordnen:**	
adult & herzgesund (m > 24 Monate, w > 36 Monate)	n	71
	MW	70,2
	SD	26,8
	Median	64
	Min	24
	Max	146
HCM	n	12
	MW	81,8
	SD	51,3
	Median	80,5
	Min	15
	Max	171
	Phänotyp nicht zuzuordnen:	
„equivocal“	n	5
	MW	89,8
	SD	34,6
	Median	106
	Min	38
	Max	124
jung & herzgesund (m < 24 Monate, w < 36 Monate)	n	27
	MW	19,1
	SD	7,3
	Median	18
	Min	8
	Max	35

Tabelle 16: Altersverteilung der einzelnen Phänotypgruppen bei den anderen Rassen (AR); m = männlich, w = weiblich. Für jede Phänotypgruppe erfolgt die Angabe der Anzahl der jeweiligen Tiere in der Gruppe (n), des Mittelwerts (MW), der Standardabweichung (SD), des Medians, des Minimums (Min) und des Maximums (Max) in Monaten.

Alter (AR)	**Phänotyp eindeutig zuzuordnen:**	
adult & herzgesund (m > 24 Monate, w > 36 Monate)	n	23
	MW	91,4
	SD	41,7
	Median	87
	Min	28
	Max	177
HCM	n	45
	MW	108,1
	SD	53,0
	Median	129
	Min	3
	Max	190
	Phänotyp nicht zuzuordnen:	
„equivocal“	n	8
	MW	123,2
	SD	81,2
	Median	121,5
	Min	16
	Max	216
jung & herzgesund (m < 24 Monate, w < 36 Monate)	n	7
	MW	14,9
	SD	8,89
	Median	13
	Min	5
	Max	33

1.3. Geschlechterverteilung in den Phänotypgruppen

Auch die Geschlechterverteilung ergab in den verschiedenen Gruppen Unterschiede. So befanden sich in der adulten herzgesunden Gruppe (männliche > 24 Monate und weibliche > 36 Monate) 60 weibliche und 34 männliche Tiere, in der an HCM erkrankten Gruppe 16 weibliche und 41 männliche Tiere und in der als „equivocal“ befundeten Gruppe fünf weibliche und acht männliche Tiere. In der Gruppe der herzgesunden jungen Katzen (männliche < 24 Monate und weibliche < 36 Monate) waren 22 Tiere weiblich und 12 männlich. Prozentual gesehen waren in den nach Rassen unterteilten an HCM erkrankten Gruppen mehr männliche Tiere vertreten als in der herzgesunden Gruppe. 58,3 % der HCM-kranken Maine-Coon-Katzen und 75,6 % der an HCM erkrankten anderen Katzenrassen waren männlich (siehe Abbildung 21).

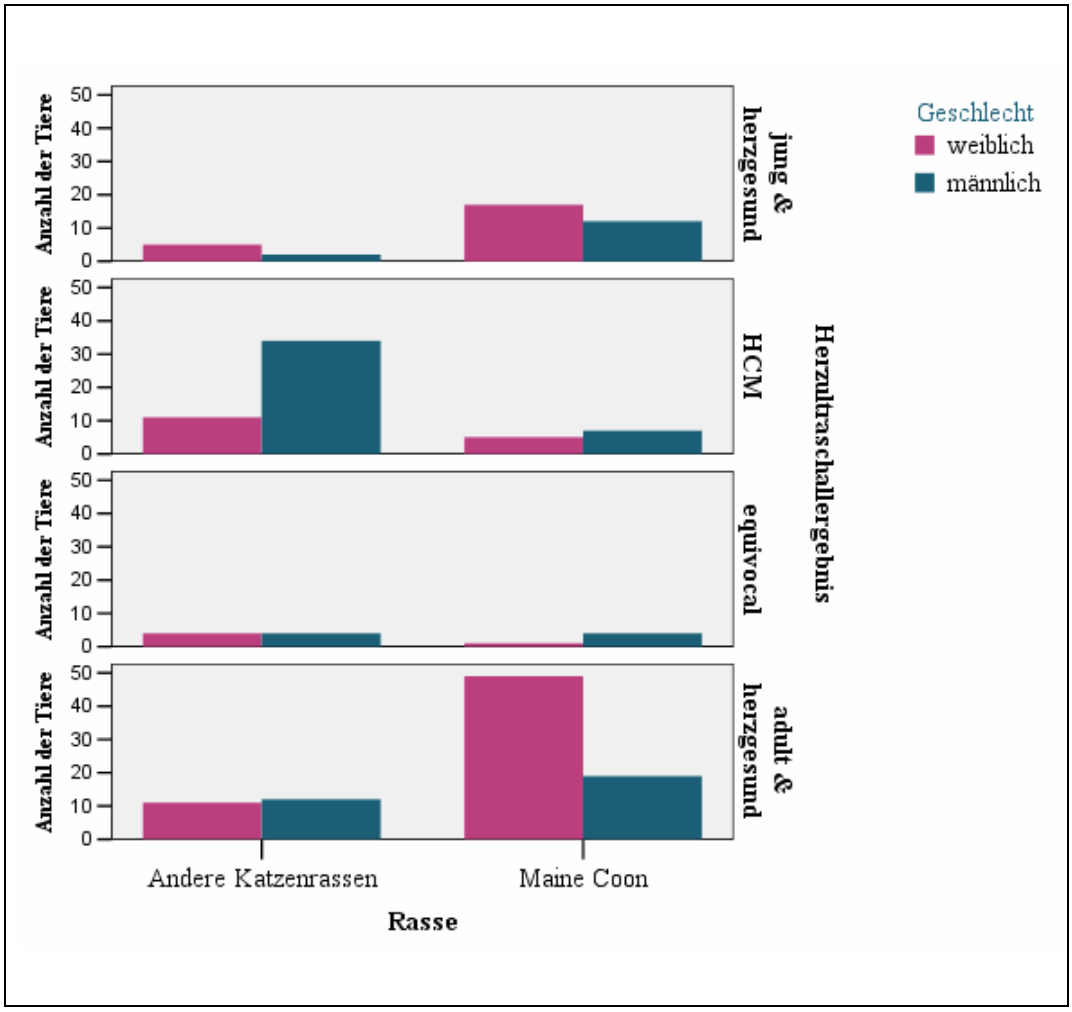


Abbildung 21: Unterscheidung des Geschlechteranteils innerhalb der vier verschiedenen Phänotypgruppen in Rassen unterteilt.

1.4. Prävalenz

In einer Zeitperiode von zwei Jahren (August 2005 bis August 2007) konnten im Rahmen von Zuchtuntersuchungen und des HCM-Screening-Programms 115 Maine-Coon-Katzen aus unterschiedlichen Zuchten in die Untersuchung eingeschlossen werden. Von der Berechnung der Prävalenzrate wurden die als „equivocal“ eingestuften Katzen und nicht evaluierbaren zu jungen Katzen (männlich < 24 Monate, weiblich < 36 Monate) ausgeschlossen. Von den restlichen 83 Maine-Coon-Katzen wurde bei zwölf eine HCM diagnostiziert. Dies ergibt aus oben angegebener Formel eine geschätzte Prävalenz von 14,5 % (95 % KI = 6,89 % - 22,02 %).

2. Genotypisierung

Die Studienpopulation konnte wie nachfolgend beschrieben genotypisiert werden.

2.1. Qualitative Überprüfung des PCR-Produkts

In Abbildung 22 wird das Ergebnis der qualitativen Überprüfung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese dargestellt.

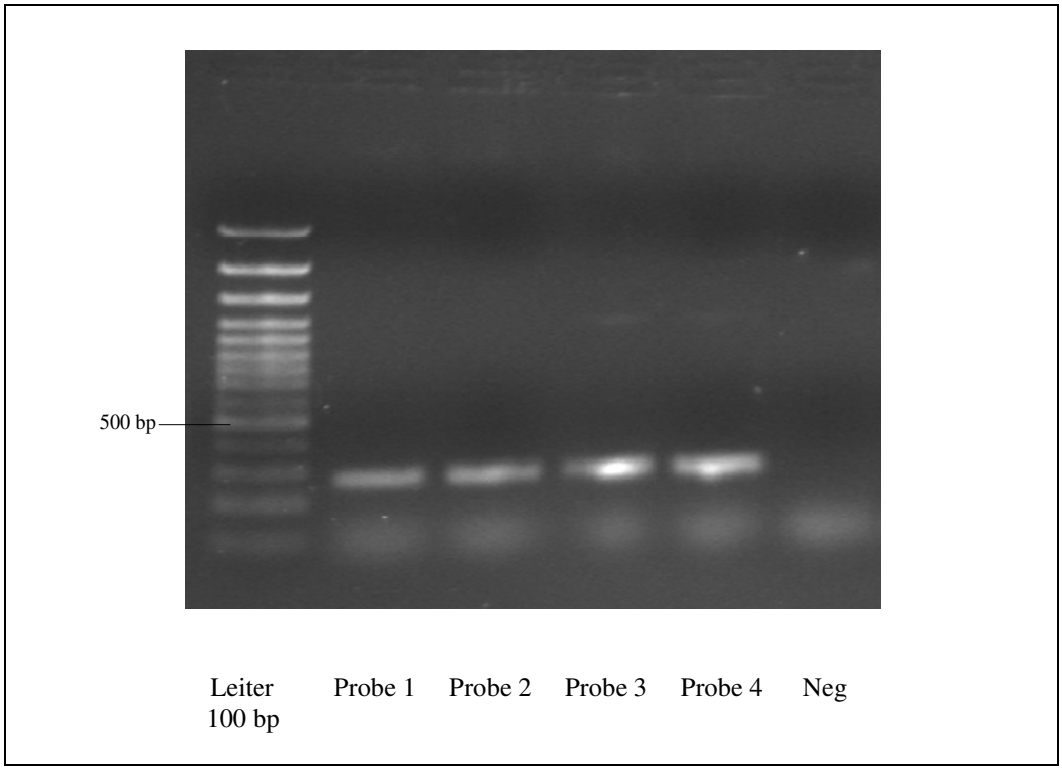


Abbildung 22: Darstellung der Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht; Neg = Negativprobe; bei jeder Probe ist jeweils nur eine Bande auf der Höhe von circa 260 bp entsprechend des Leiters sichtbar, die Negativprobe hat keine Bande.

2.2. Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden anschließend vom Gel gereinigt und in einem kommerziellen Labor sequenziert. In Abbildung 23 sind die Sequenzausschnitte der drei verschiedenen Allele bei Maine-Coon-Katzen ersichtlich. Die Sequenzergebnisse entsprachen dem vorberichtlichen Genotyp der getesteten Tiere.

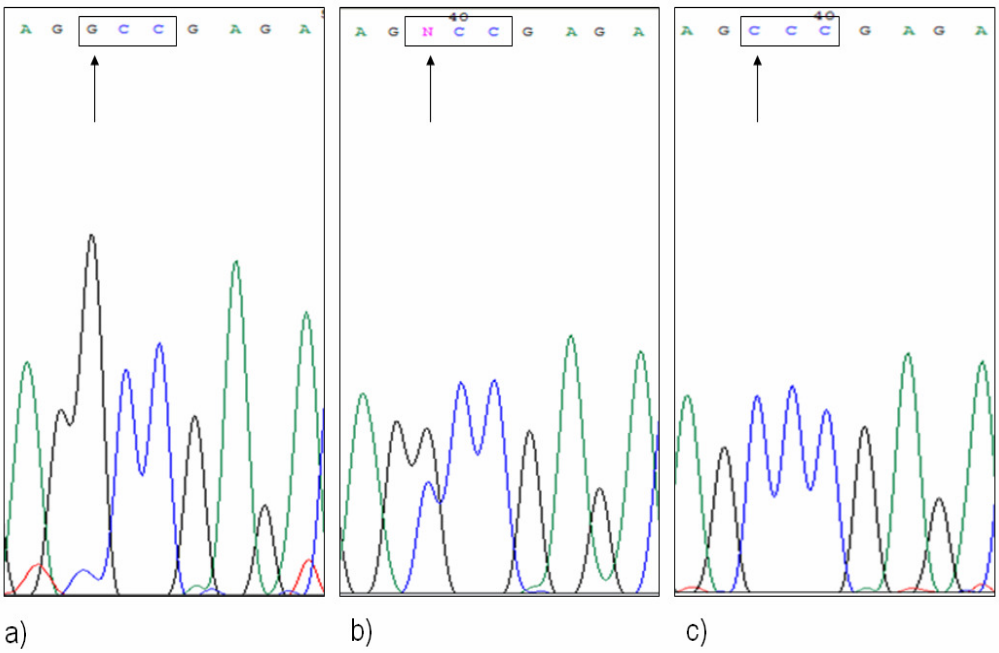


Abbildung 23: Sequenzausschnitt des MYBPC3-Gen; Kodon 31 ist eingerahmt; der Pfeil kennzeichnet die Lokalisation des Basenaustausches im Rahmen des A31P-Polymorphismus; a) Sequenz eines Probanden mit Wildtyp-Allel G; b) Sequenz eines heterozygoten Probanden für den A31P-Polymorphismus: ein blauer und ein schwarzer Floureszenzausschlag überlappen sich; c) Sequenz eines homozygoten Probanden für den A31P-Polymorphismus: an Kodon 31 hat ein Basenaustausch von Guanin (G) durch Cytosin (C) stattgefunden.

2.3. Genotypisierung und Allelunterscheidung mittels Taqman®-Sonde

In den unten ersichtlichen Tabellen werden die verschiedenen Phänotypgruppen den Genotypgruppen bezüglich beider untersuchter SNPs zugeordnet. Der A31P-SNP im MYBPC3 kam nur bei Maine-Coon-Katzen vor. Nur 2,6 % der 115 Maine-Coon-Katzen wurden homozygot (Allel C/C) und 20,9 % heterozygot (Allel G/C) für den A31P-Polymorphismus getestet. Insgesamt wiesen also 23,5 % der Maine-Coon-Katzen den A31P-SNP auf. In der echokardiographisch herzgesunden Maine Coon-Gruppe „adult und herzgesund“ (n = 71) waren 18,3 % der untersuchten Maine-Coon-Katzen heterozygote und 2,8 % homozygote Träger des A31P-SNPs. In der an HCM erkrankten Gruppe waren 75,0 % Träger des Wildtypallels, 16,7 % heterozygot und 8,3 % homozygot für den oben genannten SNP getestet worden. Die genaue Anzahl der Tiere in den jeweiligen Geno- und Phänotypgruppen bezüglich des A31P-SNPs ist in Tabelle 17 ersichtlich.

Tabelle 17: Phäno- und Genotypgruppen bezüglich des A31P-Polymorphismus; m = männlich, w = weiblich; dargestellt wird die Anzahl (n) der Maine-Coon-Katzen (MC) in den jeweiligen Geno- und Phänotypgruppen. Andere Katzenrassen werden hier nicht berücksichtigt, da der A31P-SNP nur bei Maine-Coon-Katzen vorkam. G/G = Wildtyp-Allel; G/C = heterozygotes Allel für SNP A31P; C/C = homozygotes Allel für SNP A31P.

MC	G/G Wildtyp	G/C Heterozygot A31P	C/C Homozygot A31P	n (MC)
adult & herzgesund (m > 24 Monate, w > 36 Monate)	56	13	2	71
HCM mild mittelgradig hochgradig	 5 4 0	 2 0 0	 0 0 1	12
„equivocal“	3	2	0	5
jung &herzgesund (m > 24 Monate, w > 36 Monate)	20	7	0	27

Der ursprünglich bei Maine-Coon-Katzen für spezifisch gehaltene A74T-Polymorphismus kam in der vorliegenden Studie neben Maine-Coon-Katzen auch bei Europäisch Kurzhaarkatzen, Perserkatzen und Norwegischen Waldkatzen vor. Diese wurden den Maine-Coon-Katzen als andere Rassen (AR) gegenüber gestellt. Auch bezüglich des A74T-Polymorphismus wurden die Phänotypgruppen den Genotypgruppen nach Rassen unterteilt gegenüber gestellt. 5,6 % von insgesamt 108 getesteten Maine-Coon-Katzen wurden homozygot (Allel A/A), 25,0 % wurden heterozygot (Allel G/A) für den A74T-Polymorphismus genotypisiert. In der Gruppe „adult und herzgesund“ waren 26,9 % der untersuchten Maine-Coon-Katzen heterozygote und 6,0 % homozygote Träger des A74P-SNPs. In der an HCM erkrankten Gruppe waren 50,0 % der Maine-Coon-Katzen Träger des gesunden Wildtypallels, 33,3 % heterozygot und 16,7 % homozygot für den A74T-SNP getestet worden. Genaue Zahlen dazu werden in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Phäno- und Genotypgruppen bezüglich des A74T-Polymorphismus; m = männlich, w = weiblich; dargestellt wird die Anzahl (n) der Maine-Coon-Katzen (MC) in den jeweiligen Geno- und Phänotypgruppen. G/G = Wildtyp-Allel; G/A = heterozygotes Allel für SNP A74T; A/A = homozygotes Allel für A74T.

MC	G/G Wildtyp	G/A Heterozygot A74T	A/A Homozygot A74T	n (MC)
adult & herzgesund (m > 24 Monate, w > 36 Monate)	45	18	4	65
HCM	6	4	2	12
„equivocal“	3	2	0	5
jung & herzgesund (m < 24 Monate, w < 36 Monate)	21	3	0	24

Die herzgesunden Katzen der anderen Rassen (AR), darunter EKH, Perser, Norwegische Waldkatzen, Langhaar-Mix, trugen zu 38,1 % das Wildtypallel (G/G), zu 42,9 % ein heterozygotes Allel (G/A) und zu 19,1 % ein homozygotes (A/A) Allel bezüglich des A74T-SNPs. In der an HCM erkrankten Gruppe wurden 35,0 % der Tiere heterozygot und 25,0 % homozygot für den A74T-SNP getestet, während 40,0 % das Wildtypallel G/G trugen. Die Gruppenzugehörigkeiten der Rassen (AR) sind in Tabelle 19 ersichtlich.

Tabelle 19: Phäno- und Genotypgruppen bezüglich des A74T-Polymorphismus; m = männlich, w = weiblich; dargestellt wird die Anzahl (n) der anderen Rassen exklusive Maine Coon (AR) in den jeweiligen Geno- und Phänotypgruppen. G/G = Wildtyp-Allel; G/A = heterozygotes Allel für SNP A74T; A/A = homozygotes Allel für A74T.

AR	G/G Wildtyp	G/A Heterozygot A74T	A/A Homozygot A74T	n (AR)
adult & herzgesund (m > 24 Monate, w > 36 Monate)	8	9	4	21
HCM	16	14	10	40
„equivocal“	1	3	2	6
jung & herzgesund (m < 24 Monate, w < 36 Monate)	0	3	2	5

2.4. Auswirkung der A31P- und A74T-Polymorphismen auf das Protein

Das Programm PolyPhen (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html) evaluierte das theoretische Ausmaß beider untersuchter SNPs auf das Protein als benigne. Die errechneten Daten der Software werden in Abbildung 24 und 25 dargestellt. Die vom Programm PolyPhen angezeigten übereinstimmenden Sequenzen anderer Spezies mit der Katze werden in Tabelle 20 aufgeführt. Die Sequenzen anderer Spezies stimmen an dieser Stelle mit der Sequenz der Katze gut überein. Somit ist Vorhersage der Proteinbeeinflussung durch den SNP auch für die Katze anwendbar.

Tabelle 20: Partielle Aminosäurensequenz des MYBPC3-Transkripts verschiedener Spezies inklusive Katze; Darstellung der Aminosäuren des Kodons 31 (rot) und des Kodons 74 grün); modifiziert nach den PolyPhen-Ergebnissen für A31P und A74T, http://genetics.bwh. harvard.edu/ pph/index.html.

Hund	VAAGSPAVFE	A	ETERSGVKVRWQRGGSDISASDKYGLAAEGTRHTLTVRDVGP	A	DQGSYA
Mensch	VAAGSPAVFE	A	ETERAGVKVRWQRGGSDISASNKYG LATEGTRHTLTVREVGP	A	DQGSYA
Maus	VTAGSAAVFE	A	ETERSGVKVRWQRDGSDITANDKYG LAAEGKRHTLTVRDASP	D	DQGSYA
Rind	VAAGSSAVFE	A	ETERAGLKVRWQRAGSDISASDKYS LAAEGTRHTLTVRDVGP	A	DQGSYA
Katze normal	VAASSSAVFE	A	ETERSGVKVRWQRGGSDISASDKYG LAAEGTRHTLTVRDVGP	A	DQGPYA
Katze SNP	VAASSSAVFE	P	ETERSGVKVRWQRGGSDISASDKYG LAAEGTRHTLTVRDVGP	T	DQGPYA
		31		74	

Query

Acc number	Position	AA_1	AA_2	Description
ENSFCAT00000002530	31	A	P	peptide:ENSFCAP00000002329 pep:NOVEL_protein_coding

Prediction

This variant is predicted to be benign

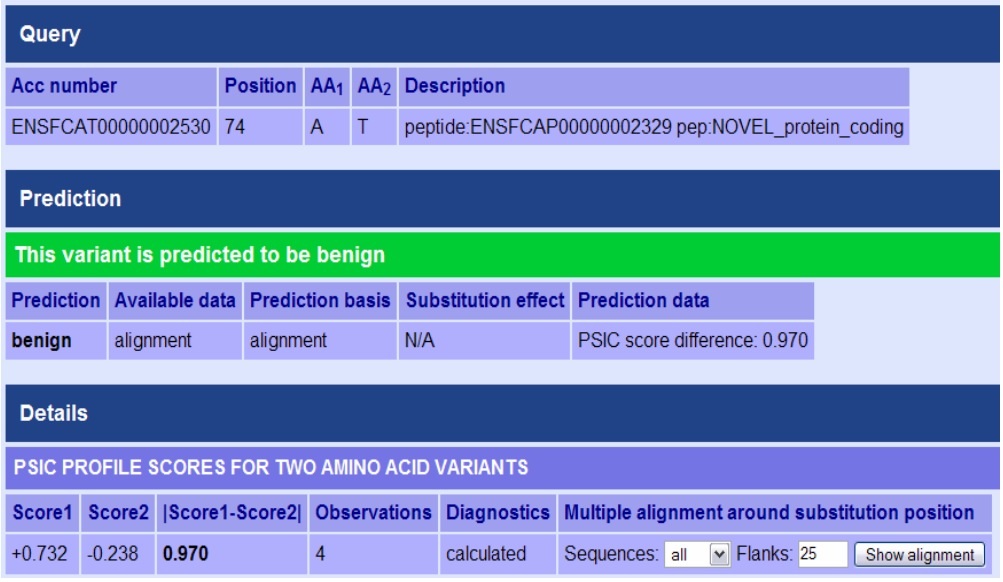
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
benign	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 1.452

Details

PSIC PROFILE SCORES FOR TWO AMINO ACID VARIANTS

Score1	Score2	|Score1-Score2|	Observations	Diagnostics	Multiple alignment around substitution position
+1.149	-0.303	**1.452**	4	calculated	Sequences: all Flanks: 25 Show alignment

Abbildung 24: Originalausschnitt aus der „PSIC-score-Differenz“-Berechnung mit PolyPhen für den A31P-SNP; prädiktive Aussage der Auswirkung des SNPs auf das Protein: benigne (grüne Zeile).



Query

Acc number	Position	AA_1	AA_2	Description
ENSFCAT00000002530	74	A	T	peptide:ENSFCAP00000002329 pep:NOVEL_protein_coding

Prediction

This variant is predicted to be benign

Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
benign	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 0.970

Details

PSIC PROFILE SCORES FOR TWO AMINO ACID VARIANTS

Score1	Score2	|Score1-Score2|	Observations	Diagnostics	Multiple alignment around substitution position
+0.732	-0.238	**0.970**	4	calculated	Sequences: all Flanks: 25 Show alignment

Abbildung 25: Originalausschnitt aus der „PSIC-score-Differenz“-Berechnung mit PolyPhen für den A74T-SNP; prädiktive Aussage der Auswirkung des SNPs auf das Protein: benigne (grüne Zeile).

3. Vergleich von Geno- und Phänotypen

Im folgenden Abschnitt erfolgt ein Vergleich von Geno- und Phänotypen hinsichtlich ihrer Korrelation.

3.1. Allelfrequenzen

Im Folgenden werden die Allelfrequenzen bezüglich der A31P- und A74T-SNPs in den unterschiedlichen Phänotypgruppen dargestellt; die errechneten Allelfrequenzen für Maine-Coon-Katzen sind in Tabelle 21 ersichtlich, die der anderen Rassen in Tabelle 22. Anhand der Tabellen ist zu erkennen, dass der A31P-Polymorhismus nur bei Maine-Coon-Katzen vorkam, während der A74T-Polymorphismus auch bei anderen Katzenrassen präsent war. Insgesamt waren 23,5 % der untersuchten Maine-Coon-Katzen Träger des A31P-Polymorphismus und 30,6 % der untersuchten Maine-Coon-Katzen Träger des A74T-Polymorphismus. Eine genaue Aufteilung der Maine Coons bezüglich ihrer Geno- und Phänotypen wird in Abbildung 26 für den A31P-Polymorphismus und in Abbildung 27 für den A74T-Polymorphismus illustriert. Bei den anderen Rassen (AR) waren 65,3 % Träger des A74T-Polymorphismus.

Tabelle 21: Errechnete Allelfrequenzen in % in den unterschiedlichen Phänotyp-Gruppen bei Maine-Coon-Katzen (MC); m = männlich, w = weiblich; SNP = „single nucleotide polymorphism“; G/G = Wildtyp-Allel; G/C = heterozygotes Allel für SNP A31P; C/C = homozygotes Allel für SNP A31P; G/A = heterozygotes Allel für SNP A74T; A/A = homozygotes Allel für A74T.

SNP	**adult & herzgesund** (m > 24 Monate, w > 36 Monate)			**HCM**			**„equivocal“**			**jung &herzgesund** (m < 24 Monate, w < 36 Monate)		
A31P	G/G 78,7	G/C 18,3	C/C 2,8	G/G 75,0	G/C 16,7	C/C 8,3	G/G 60,0	G/C 40,0	C/C -	G/G 74,1	G/C 25,9	C/C -
A74T	G/G 67,2	G/A 26,9	A/A 6,0	G/G 50,0	G/A 33,3	A/A 16,7	G/G 60,0	G/A 40,0	A/A -	G/G 87,5	G/A 12,5	A/A -

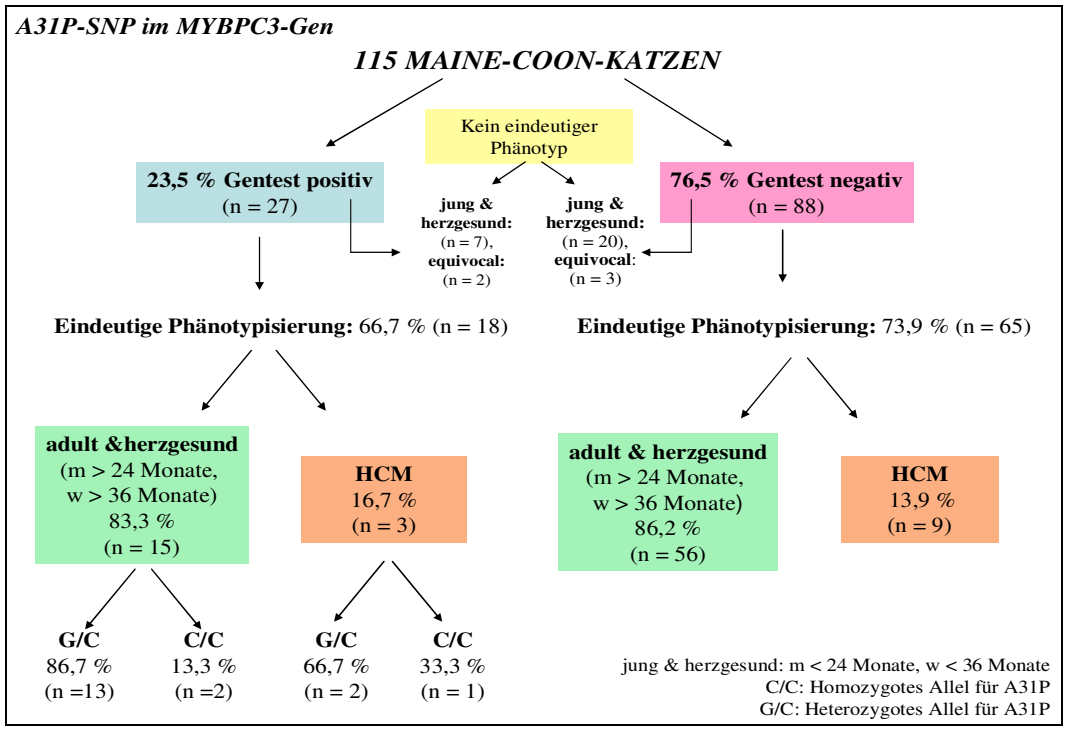


Abbildung 26: Aufteilung der untersuchten Maine-Coon-Population bezüglich ihrer Geno- und Phänotypen für den A31P-SNP.

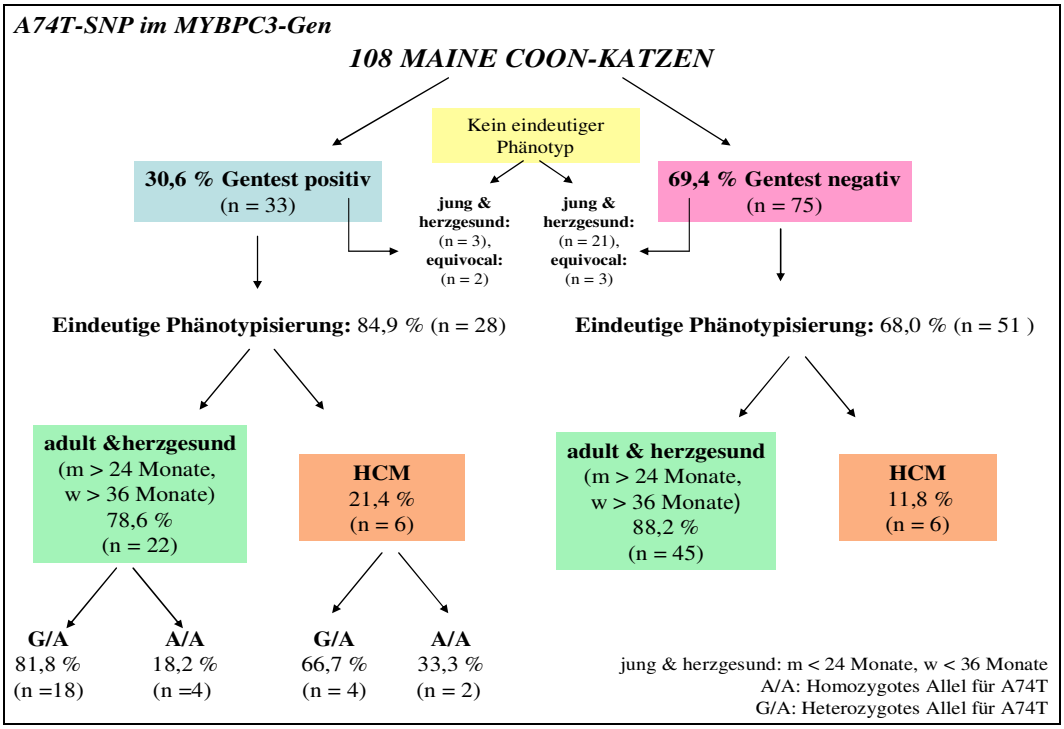


Abbildung 27: Aufteilung der untersuchten Maine-Coon-Population bezüglich ihrer Geno- und Phänotypen für den A74T-SNP.

Tabelle 22: Errechnete Allelfrequenzen in den unterschiedlichen Phänotyp-Gruppen bei den Rassen exklusive Maine Coons (AR); m = männlich, w = weiblich; SNP = „single nucleotide polymorphism"; G/G = Wildtyp-Allel; G/C = heterozygotes Allel für SNP A31P; C/C = homozygotes Allel für SNP A31P; G/A = heterozygotes Allel für SNP A74T; A/A = homozygotes Allel für A74T.

SNP	**adult & herzgesund** (m > 24 Monate, w > 36 Monate)			**HCM**			**„equivocal"**			**jung &herzgesund** (m < 24 Monate, w < 36 Monate)		
A31P	G/G 100	G/C -	C/C -	G/G 100	G/C -	C/C -	G/G 100	G/C -	C/C -	G/G 100	G/C -	C/C -
A74T	G/G 38,1	G/A 42,9	A/A 19,1	G/G 40,0	G/A 35,0	A/A 25,0	G/G 16,7	G/A 50,0	A/A 33,3	G/G 84,6	G/A 15,4	A/A -

3.3. Vergleich der Allelfrequenzen beider Phänotypgruppen

Bezüglich des A31P-SNPs wurden nur Maine-Coon-Katzen in die Berechnung einbezogen, da ein Polymorphismus (G > C) an dieser Stelle bei anderen Katzenrassen nicht vorkam (siehe Tabelle 23). Für den A74T-Polymorphismus wurden Maine-Coon-Katzen (MC), siehe Tabelle 24 und andere Rassen (AR), siehe Tabelle 25, getrennt betrachtet. Bei keinem der SNPs konnte ein signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen zwischen adulten herzgesunden

(männliche Tiere > 24 Monate alt, weibliche Tiere > 36 Monate alt) und an HCM erkrankten Katzen dargestellt werden.

Tabelle 23: 3 x 2-Feldertafel für die Anwendung des exakten Tests nach Fisher für SNP A31P: Maine Coon (MC). G/G = Wildtyp-Allel; G/C = heterozygotes Allel für SNP A31P; C/C = homozygotes Allel für SNP A31P; G/A = heterozygotes Allel für SNP A74T; A/A = homozygotes Allel für A74T.

MC	G/G Allel Wildtyp	G/C Allel heterozygot	C/C Allel homozygot	Total	Exakter Test nach Fisher p < 0,05
adult & herzgesund	56	13	2	71	
HCM	9	2	1	12	1,47
Total	65	15	3	83	

Tabelle 24: 3 x 2-Feldertafel für die Anwendung des exakten Tests nach Fisher für SNP A74T: Maine Coon (MC).

MC	G/G Allel Wildtyp	G/A Allel heterozygot	A/A Allel homozygot	Total	Exakter Test nach Fisher p < 0,05
adult & herzgesund	45	18	4	67	
HCM	6	4	2	12	2,48
Total	51	22	6	79	

Tabelle 25: 3 x 2-Feldertafel für die Anwendung des exakten Tests nach Fisher für SNP A74T: andere Katzenrassen (AR).

A	G/G Allel Wildtyp	G/A Allel heterozygot	A/A Allel homozygot	Total	Exakter Test nach Fisher p < 0,05
adult & herzgesund	8	9	4	21	
HCM	16	14	10	40	0,47
Total	24	23	14	61	

3.3. Gepaartes Auftreten der A31P- und A74T-Polymorphismen

Ein gepaartes Auftreten der beiden untersuchten SNPs kam bei keiner der Maine Coon-Katzen mit phänotypischer HCM vor. Keine der für A31P homozygot (C/C) getesteten Katzen trug zugleich einen A74T-Polymorphismus. Drei Tiere

der phänotypisch herzgesunden Maine-Coon-Katzen trugen beide SNPs als heterozygotes Allel (G/C und G/A).

3.4. Risiko der verschiedenen Genotypen

Im Folgenden sind die ORs für die beiden untersuchten SNPs bei Maine-Coon-Katzen (MC) in Tabelle 26 und andere Katzenrassen (AR) in Tabelle 27 getrennt dargestellt. Alle der in den Tabellen 26 und 27 aufgeführten ORs enthalten im 95 % KI den Wert 1,0 und reflektieren keine statistische Signifikanz.

Tabelle 26: Odds Ratios für die SNPs A31P und A74T des MYBPC3-Gens bei Maine-Coon-Katzen (MC); n = Anzahl der Tiere; OR = Odds Ratio; KI = Konfidenzintervall.

MC	**Phänotyp**	**Genotyp: nicht HCM-assoziiert**	**Genotyp: HCM-assoziiert**	**n**	**OR**	**KI = 95 %**
		G/G + G/C	C/C			
A31P	**adult & herzgesund**	69	2	71	3,14	0,25 – 35,96
	HCM	11	1	12		
		G/G	G/C + C/C			
A31P	**adult & herzgesund**	56	15 3	71 12	1,24	0,30 – 5,18
	HCM	9				
		G/G + G/A	A/A			
A74T	**adult & herzgesund**	63	4	67	3,15	0,51 – 19,52
	HCM	10	2	12		
		G/G	G/A + A/A			
A74T	**adult & herzgesund**	45	22	67	2,05	0,59 – 7,08
	HCM	6	6	12		

Tabelle 27: Odds Ratios für den A74T-SNP des MYBPC3-Gens bei den Rassen außer Maine Coon (AR); n = Anzahl der Tiere; OR = Odds Ratio, KI = Konfidenzintervall.

AR	Phänotyp	Genotyp: nicht HCM-assoziiert	Genotyp: HCM-assoziiert	n	OR	KI = 95 %
		G/G + G/A	A/A			
A74T	adult & herzgesund	17	4	21	1,42	0,39 – 5,22
	HCM	30	10	40		
		G/G	G/A + A/A			
A74T	adult & herzgesund	8	13	21	0,92	0,31 – 2,73
	HCM	16	24	40		

3.5. Alter der Geno- und Phänotypgruppen

Im Folgenden wird die Altersverteilung in den unterschiedlichen Geno- und Phänotypgruppen in Form von Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum beschrieben. Hierfür werden in den Tabellen 28 - 30 nur die Phänotypgruppen herzgesund und HCM betrachtet. Befinden sich in einer Gruppe nur zwei Patienten oder ein Patient, erfolgt nur eine Altersangabe und eine Angabe des Mittelwerts.

Tabelle 28: Darstellung der Altersverteilung der betrachteten Maine-Coon-Katzen (MC) in den verschieden Genotyp- und Phänotypen bezüglich des A31P-Polymorphismus. Die Altersangaben erfolgen in Monaten unter Angabe der Anzahl der Tiere (n), des Mittelwerts (MW), Medianwerts (Median), der Standardabweichung (SD), des Minimums (Min) und des Maximums (Max). SNP = „single nucleotide polymorphism"; G/G = Wildtyp-Allel; G/C = heterozygotes Allel für SNP A31P; C/C = homozygotes Allel für SNP A31P.

Alter der MC mit SNP A31P	G/G Wildtyp	G/C Heterozygot A31P	C/C Homozygot A31P
adult & herzgesund			
n:	56	13	2
MW:	71,4	66,3	61,0
Median:	67	60	-
SD:	26,2	31,6	-
Min:	24	25	58
Max:	146	131	64
HCM			
n:	9	2	1
MW:	79,0	64,5	-
Median:	71	-	-
SD:	49,8	-	-
Min:	18	15	Alter:
Max:	171	114	141,00

Tabelle 29: Darstellung der Altersverteilung der betrachteten Maine-Coon-Katzen (MC) in den verschieden Genotyp- und Phänotypen bezüglich des A74T-Polymorphismus. Die Altersangaben erfolgen in Monaten unter Angabe der Anzahl der Tiere (n), des Mittelwerts (MW), Medianwerts (Median), der Standardabweichung (SD), des Minimums (Min) und des Maximums (Max). SNP = „single nucleotide polymorphism"; G/G = Wildtyp-Allel; G/A = heterozygotes Allel für SNP A74T; A/A = homozygotes Allel für A74T.

Alter der MC mit SNP A74T	G/G Wildtyp	G/A Heterozygot A74T	A/A Homozygot A74T
adult & herzgesund			
n:	45	18	4
MW:	70,8	66,9	88,0
Median:	64	66	89
SD:	28,0	27,4	9,6
Min:	25	24	77
Max:	146	108	97
HCM			
n:	6	4	2
MW:	87,3	81,5	65,5
Median:	112,5	68,5	-
SD:	54,0	64,3	-
Min:	15	18	41
Max:	141	171	90

Tabelle 30: Darstellung der Altersverteilung der betrachteten anderen Rassen (AR) in den verschieden Genotyp- und Phänotypen bezüglich des A74T-Polymorphismus. Die Altersangaben erfolgen in Monaten unter Angabe der Anzahl der Patienten (n), des Mittelwerts (MW), Medianwerts (Median), der Standardabweichung (SD), des Minimums (Min) und des Maximums (Max). SNP = „single nucleotide polymorphism"; G/G = Wildtyp-Allel; G/A = heterozygotes Allel für SNP A74T; A/A = homozygotes Allel für A74T.

Alter der AR mit SNP A74T	**G/G Wildtyp**	**G/A Heterozygot A74T**	**A/A Homozygot A74T**
adult & herzgesund			
n:	8	9	4
MW:	99,0	98,0	70,5
Median:	107	107	75,5
SD:	40,4	47,9	19,2
Min:	48	33	44
Max:	163	177	87
HCM			
n:	16	14	10
MW:	122,8	83,4	112,3
Median:	137,5	76	122,5
SD:	46,3	53,3	66,1
Min:	18	3	3
Max:	178	157	190

3.6. Klinische Validität der Gentests

Aus den in Tabelle 31 und Tabelle 32 dargestellten Werten wurden die Schätzgrößen $\hat{\pi}$ der Sensitivität, der Spezifität, des PPW und des NPW sowohl für den A31P-Gentest, als auch für den A74T-Gentest kalkuliert. Die Ergebnisse der Schätzgrößen $\hat{\pi}$ bezüglich der klinischen Validität der Gentests werden in Tabelle 33 und 34 illustriert. Zu $\hat{\pi}$ werden die 95 % KIs angegeben, die jeweils aus SE (logit $\hat{\pi}$) errechnet wurden.

Tabelle 31: Tabelle zur Erstellung der Schätzgrößen für die klinische Validität des A31P-Gentests: RP = richtig positiv; FP = falsch positiv; FN = falsch negativ; RN = richtig negativ; TP = Summe der Gentest positiven Tiere; TN = Summe der Gentest negativen Tiere; AP = Summe der Phänotyp-positiven Tiere; AN = Summe der Phänotyp-negativen Tiere; N = Summe aller beurteilten Tiere; Fall 1 = Betrachtung der heterozygoten (G/C) und homozygoten (C/C) Tiere als Genotyp-positiv (Zahlen schwarz); Fall 2 = Betrachtung der homozygoten (C/C) Tiere als Genotyp-positiv (Zahlen grün, fettgedruckt).

A31P	**Genotyp: HCM-assoziiert G/C +C/C** **C/C**	**Genotyp: nicht HCM-assoziiert G/G (Wildtyp)** **G/C + G/G**	**Total**
HCM	3 (RP) **1**	9 (FN) **11**	12 (AP)
adult & herzgesund	15 (FP) **2**	56 (RN) **69**	71 (AN)
Total	18 (TP) **3**	65 (TN) **80**	83 (N)

Tabelle 32: Tabelle zur Erstellung der Schätzgrößen für die klinische Validität des A74T-Gentests: RP = richtig positiv; FP = falsch positiv; FN = falsch negativ; RN = richtig negativ; TP = Summe der Gentest positiven Tiere; TN = Summe der Gentest negativen Tiere; AP = Summe der Phänotyp-positiven Tiere; AN = Summe der Phänotyp-negativen Tiere; N = Summe aller beurteilten Tiere; Fall 1 = Betrachtung der heterozygoten (G/A) und homozygoten (A/A) Tiere als Genotyp-positiv (Zahlen schwarz); Fall 2 = Betrachtung der homozygoten (A/A) Tiere als Genotyp-positiv (Zahlen grün, fettgedruckt).

A74T	**Genotyp: HCM-assoziiert G/A + A/A** **A/A**	**Genotyp: nicht HCM-assoziiert G/G (Wildtyp)** **G/A + G/G**	**Total**
HCM	6 (RP) **2**	6 (FN) **10**	12 (AP)
adult & herzgesund	22 (FP) **4**	45 (RN) **63**	67 (AN)
Total	28 (TP) **6**	51 (TN) **73**	79 (N)

Tabelle 33: Werte der klinischen Validität für den A31P-Gentest; Fall 1: heterozygot (G/C) und homozygot (C/C) = HCM-assoziiert (Zahlen schwarz); Fall 2: homozygot = HCM-assoziiert (Zahlen grün, fettgedruckt); $\hat{\pi}$ = Schätzgröße; 95 % KI = 95 % Konfidenzintervall.

A31P	**G/C + C/C = Genotyp: HCM-assoziiert**		**C/C = Genotyp: HCM-assoziiert**	
	$\hat{\pi}$	95 % KI	$\hat{\pi}$	95 % KI
Sensitivität	0,25	0,08 – 0,55	**0,08**	**0,01 – 0,41**
Spezifität	0,80	0,68 – 0,87	**0,97**	**0,89 – 0,99**
PPW	0,17	0,06 – 0,41	**0,33**	**0,20 – 0,86**
NPW	0,86	0,76 – 0,93	**0,86**	**0,77– 0,92**

Tabelle 34: Werte der klinischen Validität für den A74T-Gentest; Fall 1: heterozygot (G/A) und homozygot (A/A) = HCM-assoziiert (Zahlen schwarz); Fall 2: homozygot = HCM-assoziiert (Zahlen grün, fettgedruckt); $\hat{\pi}$ = Schätzgröße; 95 % KI = 95 % Konfidenzintervall.

A74T	**G/A + A/A = Genotyp: HCM-assoziiert**		**A/A = Genotyp: HCM-assoziiert**	
	$\hat{\pi}$	95 % KI	$\hat{\pi}$	95 % KI
Sensitivität	0,50	0,24 – 0,75	**0,17**	**0,04 – 0,48**
Spezifität	0,67	0,55 – 0,77	**0,94**	**0,85 – 0,98**
PPW	0,21	0,01 – 0,40	**0,33**	**0,08 – 0,73**
NPW	0,88	0,76 – 0,95	**0,86**	**0,76 – 0,93**

VII. Diskussion

1. Methodik

Der Herzultraschall ist derzeit das Diagnostikum der Wahl für die feline HCM. Als Goldstandard zur Diagnostik gelten die im zweidimensionalen Bild gemessenen Maximalwerte des IVSd und des LVPWd sowie die Beurteilung der Papillarmuskelgröße (HÄGGSTRÖM, 2006; KITTLESON, 2005). Für Maine-Coon-Katzen wurden die speziell für diese Rasse erstellten Referenzwerte berücksichtigt (DROURR *et al.*, 2005). Die Papillarmuskeln wurden in der vorliegenden Studie durch den erfahrenen Untersucher (Dr. G. Wess) subjektiv eingeschätzt, was derzeit ebenso dem diagnostischen Standard entspricht (HÄGGSTRÖM, 2006). Wenn eine Katze im Herzultraschall als herzgesund beurteilt wird, bedeutet dies nicht, dass sie lebenslang herzgesund bleibt. In der vorliegenden Studie wurden deshalb Altersgrenzen für die Kontrollgruppe (herzgesunde Gruppe) herangezogen, wonach männliche Tiere über 24 Monate und weibliche Tiere über 36 Monate alt sein mussten. Diese Altersgrenzen wurden deshalb so gewählt, weil sich laut KITTLESON (2005) bei den meisten betroffenen Maine-Coon-Katzen die HCM im ersten Lebensjahr noch nicht echokardiographisch präsentiert. Bei männlichen Maine Coons treten erste deutliche echokardiographische Veränderungen jedoch bereits ab dem zweiten Lebensjahr auf. Weibliche Tiere tendieren dazu, die HCM erst später zu entwickeln. Zumeist manifestiert sich die HCM bei weiblichen Maine Coons im Alter von drei Jahren. Die Schlussfolgerung einer von KITTLESON und Mitarbeitern im Jahr 1996 durchgeführten Studie war, dass die HCM bei der damals untersuchten Maine-Coon-Kolonie zwischen dem ersten und vierten Lebensjahr einen hochgradigen Schweregrad erreicht. Aus Erfahrungen in weiteren Kreuzungsstudien beschreiben KITTLESON und Mitarbeiter (1999), dass zwei von drei Tieren aus Verpaarungen mit zwei Phänotyp-positiven Elterntieren die HCM bereits im Alter von sechs Monaten hochgradig ausprägten. Einige wenige Maine-Coon-Katzen zeigen echokardiographische Anzeichen erst mit sechs bis sieben Jahren (KITTLESON, 2005). Die Altersgrenzen für die Kontrollgruppe wurden anhand der Erfahrungen von KITTLESON und Mitarbeitern (1996, 1999) festgelegt. Das Alter der in der vorliegenden Studie als phänotypisch herzgesund beurteilten Tiere (herzgesund +

Wildtyp-Allel: Medianalter = 67 Monate; herzgesund + G/C (heterozygot A31P): Medianalter = 60 Monate; herzgesund + C/C (homozygot A31P): Alter = 58 und 64 Monate) relativ hoch war, kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass einige Tiere noch zu einem späteren Zeitpunkt eine HCM entwickeln könnten, aber es erscheint aufgrund des Alters unwahrscheinlich, dass dies für viele der Katzen der Fall sein wird.

Die Anwendung des Primer-Probe-Assays zur Genotypisierung wurde als bereits validiert aus der Literatur übernommen. Die TaqMan®-Sonden zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus. Sie sind wenig anfällig für veränderte Reaktionsbedingungen und andere Störfaktoren (z. B. Primer-Dimere). Die PCR muss folglich weniger etabliert werden (BOELHAUVE, 2007). Das Design der Primer und Sonden dieses Assays wurde von der liefernden Firma übernommen. Die DNA musste hierbei nur mit zwei Komponenten, dem Mastermix und dem vorgefertigten Assay-Mix, zusammen pipettiert werden. Die Auswertung erfolgte für alle Individuen mit einer Software. Die vorher sequenzierten Positivkontrollen (sowohl homozygot als auch heterozygot) brachten immer dasselbe Ergebnis wie die Primer-Probe-Assays. Alle anderen Proben haben einwandfreie Cluster gebildet. Die Allelfrequenzen der homo- und heterozygoten Tiere bezüglich des A31P-SNPs entsprechen im Wesentlichen den auf der Homepage der Washington State University des „Veterinary Cardiac Genetics Laboratory“ veröffentlichten Daten (WSU, 2007). Die Sensitivität und Spezifität von TaqMan® Genotyping Assays werden in der Virologie als ähnlich hoch wie bei der Standard-PCR eingestuft (WALKER *et al.*, 2007). Diese Methode gilt als schnellste und einfachste, jedoch auch teurere Methode im Vergleich zur ARMS-PCR oder Meltingcurve-PCR.

2. Limitationen dieser Studie

Diese Studie wurde im Rahmen einer prospektiven Studie der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Kleintierklinik, LMU München, durchgeführt. Die Anzahl der untersuchten Tiere war folglich davon abhängig, wie viele Tiere seit August 2005 vorstellig wurden. Studien, die nicht an Labortieren durchgeführt werden, sondern an Klinikpatienten, liegen einigen Beschränkungen zu Grunde, die eingehend diskutiert werden sollen.

Für die Untersuchung, ob die untersuchten Polymorphismen auch bei anderen Rassen vorkommen, wurden unterschiedliche Katzenrassen herangezogen, die

zufällig in der Abteilung für Kardiologie untersucht wurden. Unterschiede bezüglich des A74T-Polymorphismus innerhalb der Rassen wurden nicht untersucht, da lediglich der Gesichtspunkt, ob es sich um Maine-Coon-spezifische Polymorphismen handelt, für die Studie interessant war. Als Maine-Coon-Katzen wurden nur reinrassige Katzen in Besitz eines Stammbaumes angesehen.

Betroffene Katzen können erste Veränderungen des Herzmuskels im Alter zwischen einem halben Jahr und fünf Jahren zeigen (HÄGGSTRÖM, 2006; KITTLESON, 2005). Das vorgeschlagene Alter für Zuchtuntersuchungen liegt für männliche Tiere bei 24 Monaten und für weibliche Tiere bei 36 Monaten, da Studien zeigen, dass bei den meisten betroffenen Maine Coons ab dem dritten Lebensjahr echokardiographische Veränderungen präsent sind. Anhand einer Studie mit Kreuzungsversuchen innerhalb einer Maine-Coon-Kolonie mit familiärer HCM berichten KITTLESON und Mitarbeiter im Jahr 1996, dass bei den untersuchten Maine Coon-Katzen die HCM zwischen dem ersten und vierten Lebensjahr bereits einen hochgradigen Schweregrad erreicht. Bei Kreuzungen aus Phänotyp-positiven Elterntieren entwickelten in der oben genannten Studie zwei von drei Katzenwelpen sogar eine hochgradige HCM im Alter von nur sechs Monaten. Im Jahr 1999 berichteten KITTLESON und Mitarbeiter wiederum von Kreuzungsstudien zwischen Phänotyp-positiven und Phänotyp-negativen Maine-Coon-Katzen (Gruppe 1) sowie zwischen zwei Phänotyp-positiven Elterntieren (Gruppe 2). In Gruppe 1 entwickelten zwölf von 22 Tieren der folgenden Generation eine HCM. Bei elf der Phänotyp-positiven Tiere traten eindeutige Papillarmuskelveränderungen bereits im Alter zwischen neun und 21 Monaten auf. Ein weibliches Tier entwickelte die HCM erst mit 38 Monaten. Dieselben Tiere entwickelten im Alter zwischen 13 und 48 Monaten eine mittel- bis hochgradige HCM. In Gruppe 2 entwickelten drei von acht überlebenden Welpen eine HCM. Bei letzteren wurden phänotypische Veränderungen im Ultraschall bereits im Alter von vier bis sechs Monaten präsent. Zusammenfassend beschreibt KITTLESON (2005), dass bei den meisten betroffenen Maine-Coon-Katzen die HCM im ersten Lebensjahr nicht echokardiographisch präsent ist. Bei männlichen Maine Coons treten erste deutliche echokardiographische Veränderungen jedoch bereits ab dem zweiten Lebensjahr auf. Weibliche Tiere tendieren dazu, die HCM erst später zu entwickeln. Zumeist manifestiert sich die HCM bei weiblichen Maine Coons im

Alter von drei Jahren. Jedoch zeigten einige wenige Tiere von Kittlesons Studienpopulation echokardiographische Anzeichen erst mit sechs bis sieben Jahren. Anhand der oben genannten Studien mit Maine-Coon-Katzen wurde das Mindestalter für die Kontrollgruppe in der vorliegenden Studie festgelegt. Sicherlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein geringerer Anteil der Tiere im höheren Alter eine HCM entwickeln könnte. Jedoch lag das berechnete Medianalter der vorliegenden herzgesunden Population weit über der festgelegten Altersgrenze. So lag das Alter der beiden für den A31P-Polymorphismus homozygot getesteten phänotypisch herzgesunden Tiere bei 58 und 64 Monaten bei der Erstuntersuchung. Die 58 Monate alte Katze war bei einer echokardiographischen Kontrolluntersuchung nach einem Jahr im Alter von 70 Monaten immer noch echokardiographisch herzgesund. Das Medianalter der echokardiographisch herzgesunden homozygot für A74T getesteten Maine Coons lag sogar bei 89 Monaten. Das Medianalter der heterozygot für A31P getesteten phänotypisch herzgesunden Tiere lag bei 60 Monaten, das Medianalter der für A74T heterozygot getesteten herzgesunden Katzen bei 66 Monaten. Auch dieser Wert liegt weit über der festgelegten Altersgrenze für weibliche Tiere von 36 Monaten. Da laut KITTLESON (2005) sich die HCM bei der Maine Coon zumeist im Alter von drei Jahren entwickelt, kann schlussfolgernd gesagt werden, dass das Medianalter der vorliegenden Phänotyp-negativen Studienpopulation drei Jahre weit übersteigt und somit die Chance, dass diese Katzen im späteren Alter eine HCM entwickeln könnten, relativ gering ist, jedoch nicht ignoriert werden sollte. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie alle herzgesunden männlichen Tiere im Alter unter 24 Monaten und alle herzgesunden weiblichen Tiere im Alter unter 36 Monaten aus den statistischen Berechnungen ausgeschlossen, da diese eventuell noch im späteren Lebensalter eine HCM entwickeln. Ein Ausschluss von zu jungen Tieren erfolgte scheinbar in der Studie von NYBERG und Mitarbeitern (2007) nicht, in welcher der Median der gesunden Kontrollgruppe bei einem Alter von 2,2 Jahren lag.

Die Geschlechtsverteilung innerhalb der gesamten Studienpopulation war ausgeglichen. Von 198 untersuchten Katzen waren 95 (47,98 %) männlich und 103 (52,02 %) weiblich. Jedoch waren in der nach Rassen untergliederten „HCM-kranken“ Gruppe 58,33 % der Maine-Coon-Katzen und 75,56 % der anderen Rassen (AR) männlich. In den Studien von KITTLESON und Mitarbeitern (1999), RIESEN und Mitarbeitern (2007a) sowie in Studien mit

HCM exprimierenden transgenen Mäusen erkrankten männliche Tiere früher als weibliche. Ebenso entwickelten in der zuletzt erwähnten Studie mehr männliche als weibliche Mäuse eine gestörte Myozytenanordnung (GEISTERFER-LOWRANCE *et al.*, 1996). Hierbei wird vermutet, dass das männliche Geschlecht die phänotypische Expression modifizieren kann. Letzteres könnte aufgrund von bekannten geschlechtsspezifischen Unterschieden bezüglich des kardialen Muskelumsatzes zustande kommen (CAPASSO *et al.*, 1983). Eine Mehrheit des männlichen Geschlechts innerhalb der HCM-positiven Gruppe wird auch innerhalb der vorliegenden Studienpopulation repräsentiert.

Die Allelfrequenzen der Gruppen „herzgesund“ und „HCM“ bezüglich der SNPs A31P und A74T des MYBPC3-Gens unterschieden sich nicht signifikant. Ein Grund hierfür kann sein, dass tatsächlich keine signifikanten Unterschiede zwischen Allelfrequenzen in den untersuchten Gruppen existieren. Andererseits könnte auch die untersuchte Tierzahl zu klein sein, um vorhandene geringe Unterschiede nachzuweisen. Anstatt einer Powerberechnung wurden in der vorliegenden Studie ein 95 % KI für die OR und die Schätzwerte der klinischen Validität bestimmt. Im 95 % KI kommt der Umfang der Stichprobe zum Ausdruck, denn es würde mit steigendem Stichprobenumfang enger, also genauer werden. Dadurch wird die vorliegende Situation in dieser Arbeit gut beschrieben. Da in einigen Fällen der untersuchten Gruppen die Anwendung eines Chi-Quadrat-Test als unangemessen erschien (wenn eine der erwarteten Häufigkeiten kleiner als 1 bzw. mehr als 20 % kleiner als 5 waren), wurden die Allelfrequenzen mittels des exakten Test nach Fisher betrachtet. Dieser ist zwar unüblicher, erschien aber in einigen Fällen angemessener. Hierbei wurde das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ gesetzt.

Der festgelegte Zeitrahmen der Studie von zwei Jahren ließ es nicht zu, die Katzen auf Langzeitbasis zu evaluieren. Eine Langzeitstudie wäre sicherlich genauer, Phänotyp-positive Tiere könnten hinsichtlich der Progression ihrer Erkrankung besser beurteilt werden und Phänotyp-negative Tiere könnten zum Teil bis ins hohe Alter verfolgt werden, um sicher zu gehen, dass keine HCM auftritt. Mit einer Langzeitstudie könnten die Phänotypen eindeutig bestimmt werden. Demnach besteht die Möglichkeit, dass in der vorliegenden Studienpopulation derzeit herzgesunde Tiere im späteren Alter eine HCM entwickeln. Da die vorliegende herzgesunde Studienpopulation aber ein relativ hohes Medianalter (siehe oben) aufweist, besteht eine gewisse Sicherheit, dass

die in der hiesigen Studie als herzgesund beurteilten Tiere auch in Zukunft keine HCM entwickeln. Letzteres kann durch oben beschriebene Studien bezüglich des Alters, in welchem eine HCM bei Maine Coons am häufigsten auftritt (KITTLESON 1996, 1999, 2005), bekräftigt werden.

Die Studie erfolgte im Rahmen einer Fall-Kontrollstudie bezüglich der genetischen Polymorphismen A31P und A74T im MYBPC3-Gen und deren Assoziation mit dem Risiko an der HCM zu erkranken. Auf ein familienbezogenes Screening wurde verzichtet, da laut der Homepage der Washington State University (WSU), „Veterinary Cardiac Genetics Laboratory", circa ein Drittel der Maine-Coon-Population Träger des A31P-Polymorphismus ist (WSU, 2007) und da keine eng verwandten Maine-Coon-Familien komplett zur Verfügung standen. Zusätzlich kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass innerhalb der Rasse ein hoher Verwandtschaftsgrad zugrunde liegt. In der Humanmedizin werden Kandidatengen-Fall-Kontroll-Studien als nützliche und auch wichtige ergänzende Alternativen zu Familien-Screenings angesehen (DALY & DAY, 2001). Ein Fall-Kontroll-Studien-Design wurde auch für die Untersuchungen von NYBERG und Mitarbeitern (2007) angewandt, die den A74T-SNP bei der Maine Coon detektierten und als die zweite kausale Mutation für die feline HCM bei der Maine Coon ansahen. Weiterhin evaluierte dieselbe Arbeitsgruppe auch die die Häufigkeit und das Risiko der A31P-Mutation des MYBPC3-Gens bei der Maine Coon anhand einer Fall-Kontroll-Studie.

3. Klinische Relevanz der Studie und Vergleich zu Vorgängerstudien

Aufgrund des kommerziellen Angebots von Gentests für die mit HCM-assoziierten Polymorphismen bei der Maine Coon, ist für Züchter und Tierärzte häufig unklar, wie sie mit den Testergebnissen und den bisherigen Veröffentlichungen zu den angeblich kausalen Mutationen verfahren sollen. Im Folgenden werden insbesondere die Schwachpunkte der bisherigen Veröffentlichungen aufgezeigt, um die klinische Relevanz und die Ergebnisse der vorliegenden Studie zu bekräftigen.

KITTLESON und Mitarbeiter (1999) gehen bei ihrer auf HCM selektierten Kolonie mit autosomalem Erbgang von einer 100-%igen Penetranz der HCM aus. Diese Gegebenheit trifft weder für den A31P- noch für den A74T-Polymorphismus zu. Dass die homozygoten Tiere tot geboren werden, wie es von

KITTLESON und Mitarbeitern (1999) in derselben Studie hypothetisiert wurde, trifft weder für den A31P-SNP noch für den A74T-Polymorphismus zu. MEURS und Mitarbeiter (2005) konnten in ihrer Studie bei derselben Katzenkolonie sechs lebende homozygote Tiere vorweisen, welche eine 100-%ige Penetranz der Erkrankung aufwiesen. In der hiesigen Studie weisen zwei der homozygoten Tiere (56 und 64 Monate alt) auch bei der Folgeuntersuchung nach 12 Monaten noch keinerlei echokardiographische Auffälligkeiten auf. Bei der Folgeuntersuchung waren die Tiere bereits 68 und 76 Monate alt. Auch Katzen, die homozygote Träger des A74T-Polymorphismus sind, werden nicht tot geboren und entwickelten in der vorliegenden Studie zu einem großen Teil keinen klinischen Phänotyp. In der Studie von MEURS und Mitarbeitern (2005) wurde von den Autoren angedeutet, dass alle Maine-Coon-Katzen, die Träger des SNPs A31P waren, auch phänotypisch eine HCM zeigten. Jedoch war ein homozygot getestetes Tier, welches plötzlich während einer Anästhesie verstarb, nie im Herzultraschall auffällig geworden, Angaben zur Pathologie dieses bestimmten Tieres gibt es im zugehörigen Artikel nicht. Die anderen homozygoten Tiere entwickelten im Gegenzug dazu eine vergleichsweise rasant verlaufende und schwerwiegendere Form der HCM mit hoher Expressivität. Die Frage, ob die HCM bei der von MEURS und Mitarbeitern (2005) untersuchten Familie aufgrund von erhöhten Inzuchtfaktoren schwerer ausgeprägt war, bleibt offen, jedoch waren andere angeborene Defekte nach der Verpaarung innerhalb der Familie präsent. Keines der 100 herzgesunden Kontrolltiere wies in derselben Veröffentlichung einen A31P-Polymorphismus auf, jedoch wird nicht darauf eingegangen, ob die Kontrolltiere ebenfalls Maine-Coon-Katzen waren oder herzgesunde Katzen anderer Rassen. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der A31P-Polymorphismus nur bei der Maine Coon präsent ist. Nach derzeitigem Wissensstand sind 33,6 % der Maine-Coon-Population Träger des A31P-Polymorphismus, infolgedessen waren die 100 Kontrolltiere in der Studie von MEURS und Mitarbeitern (2005) mit großer Wahrscheinlichkeit keine Maine-Coon-Katzen. In einer Folgestudie konnten MACDONALD und Mitarbeiter (2007) bei sechs Genotyp-positiven Katzen aus Nachzuchten der von MEURS und Mitarbeitern (2005) beschriebenen Kolonie keine HCM detektieren. Zudem wurde von MEURS und Mitarbeitern (2005) in deren Studie nicht darauf eingegangen, ob die Möglichkeit bestünde, dass das Krankheitsbild und eine unabhängige kausale Mutation kosegregieren, ohne im direkten Zusammenhang

miteinander zu stehen. In derselben Veröffentlichung wird davon ausgegangen, dass der detektierte A31P-SNP im kardialen MYBPC3 eine kausale Mutation darstellt. Zudem wird in derselben Studie von MEURS und Mitarbeitern (2005) immer wieder propagiert, dass die festgestellte Reduktion des MYBPC-Proteins und des Myomesins im SDS-PAGE und bei der Immunfloureszenzmikroskopie der Mutation zuzuschreiben sind. Es wird dabei nicht berücksichtigt, ob die Pathologie des Herzversagens zu den Proteinreduktionen oder zum Anstieg der mRNA in den verwendeten Herzmuskelproben geführt haben könnte. In der vorliegenden Studie konnte zumindest mit dem Programm PolyPhen die theoretische Auswirkung des A31P- und des A74T-SNPs auf das Protein als benigne eingestuft werden.

Der klinischen Erfahrung nach steht seitens anderer Tierkardiologen zur Diskussion, dass die Ultraschallergebnisse bei getesteten Maine Coons nicht unbedingt mit dem festgestellten Genotyp der Katzen korrelieren (NYBERG *et al.*, 2007; TOBIAS, 2007). Für diese Tatsache stehen unterschiedliche Interpretationsmöglichkeiten im Raum. In zahlreichen humanmedizinischen Studien wird bezüglich kausaler Mutationen für die HCM eine stark variierende Penetranz und Expressivität innerhalb von Familien mit familiärer HCM beschrieben (MARON *et al.*, 2001). Die klinische Variabilität lässt den Einfluss von additiven und synergistischen Effekten bestimmter Risikofaktoren vermuten (MICHELS *et al.*, 2007), zudem könnten modifizierende Gene ebenso einen Einfluss auf eine bereits bestehende Mutation haben (TSOUTSMAN *et al.*, 2006b). Ausserdem ist beschrieben, dass die HCM bei Mutationsträgern erst im späteren Lebensalter auftreten kann. Bei Mutationen im MYBPC3 tritt die HCM beispielsweise vergleichsweise im späteren Lebensalter als bei MHC-Mutationen auf (MARON *et al.*, 2001). Jedoch wiesen in einer anderen Studie Patienten mit einer MYBPC3-Mutation und einem zusätzlichen Polymorphismus im ACE-Gen eine vergleichsweise früher auftretende und schwerwiegendere HCM-Form auf. Bei Patienten mit multiplen HCM-Gen-Mutationen wird zudem von einem schwerwiegenderen Phänotyp ausgegangen, also einer stärkeren Expressivität (MICHELS *et al.*, 2007). Hierbei stellt sich die Frage, ob die zuletzt erwähnten Tatsachen auch auf die Katzenkolonie von KITTLESON und Mitarbeitern zutreffen könnten. Obengenannte Gegebenheiten stellen multiple Interpretationsmöglichkeiten für die schlechte Genotyp-Phänotyp-Korrelation der untersuchten Population dar. Die Penetranz und die Expressivität waren in der

Kolonie von KITTLESON und Mitarbeitern (1999) sicherlich in höherem Maße ausgeprägt als in der vorliegenden Population. Die Frage, warum Tiere mit derselben Mutation nicht dieselbe Expressivität wie bei KITTLESON und Mitarbeitern (1999) und MEURS und Mitarbeitern (2005) zeigen, bleibt somit ungeklärt. Wenn letztendlich eine oder multiple andere Mutationen im Zusammenhang mit der starken Penetranz bei KITTLESON und Mitarbeitern (2005) im Zusammenhang stehen würden, wären die Gentests nur begrenzt zur Zuchtauslese anwendbar. Über die Expressivität werden in der Studie von NYBERG und Mitarbeitern (2007) keine Angaben gemacht, die Penetranz war jedoch sowohl für A31P als auch A74T unvollständig.

Wird mittels Echokardiographie bei einem Menschen eine hypertrophe Kardiomyopathie diagnostiziert, wird in der Regel ein systematisches Sequenzscreening der Sarkomergene und diverser anderer Kandidatengene durchgeführt, um auf Mutationssuche zu gehen. Sequenzvariationen können mittels Restriktionsenzymanalyse bestätigt werden. Weiterhin können mittels reverser Transkriptase aus aberranten RNA-Transkripten DNA-Produkte erzeugt, amplifiziert und sequenziert werden. In der Regel werden anschließend Stammbaumanalysen durchgeführt, der Penetrationsgrad und die Expressivität beurteilt (GEISTERFER-LOWRANCE *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 2000; KONNO *et al.*, 2006; LUTUCUTA *et al.*, 2004; MARIAN *et al.*, 1999; MCCONNELL *et al.*, 2001; TARDIFF *et al.*, 1998; VIKSTROM *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 1998). Letztendlich muss auf molekularer Ebene beurteilt werden, welche Regionen von dem betreffenden Genabschnitt kodiert werden und welchen Einfluss die Mutation auf die Funktion oder die Ausbildung des Proteins hat (KONNO *et al.*, 2006). Die meisten kausalen Mutationen der humanen HCM befinden sich im MYBPC3-Gen oder im MYH7-Gen. Genetische Tests auf bereits bekannte Mutationen haben sich in der Humanmedizin als nicht hilfreich erwiesen (RICHARD *et al.*, 2003), da im Zweifelsfall jede betroffene Familie eine andere Mutation trägt. Mithilfe der Sequenzscreenings kann die molekularbiologische Diagnose der familiären HCM definitiv gestellt werden und bei weiteren Familienmitgliedern kann so eingeschätzt werden, ob durch Anwesenheit einer Mutation ein Risiko der Erkrankung existiert. Bei nur 60 % der Patienten mit einer im Ultraschall offensichtlichen HCM kann eine Sarkomermutation gefunden werden. Folglich bleibt der genetische Status bei vielen Patienten undefiniert. Ein genetischer Ursprung kann dennoch auch bei

diesen Patienten nicht ausgeschlossen werden (HO & SEIDMAN, 2006). Penetranz und Expressivität einer vermuteten kausalen Mutation können auch mittels transgenen Tieren beurteilt werden, was in selteneren Fällen bisher in humanmedizinischen Studien durchgeführt wurde, um so die Kausalität einer Mutation zu beweisen (TSOUTSMAN *et al.*, 2006b).

NYBERG und Mitarbeiter (2007) führten ebenfalls wie vorliegend präsentiert eine Fall-Kontroll-Studie durch und konnten neben des Vorkommens des A31P-SNPs das Vorhandensein eines anderen Polymorphismus (A74T) bei einer Kohorte von 204 Maine Coons nachweisen. Ihre gesunden Kontrolltiere weisen eine Allelfrequenz von 20 % bezüglich des A31P-Polymorphismus und von 13 % bezüglich des A74T-Polymorphismus auf. Dennoch kalkulierten NYBERG und Mitarbeiter (2007) für die Entwicklung des Phänotyps einer HCM ein OR von 16,2 bei Homozygotie des A31P-Allels und von 7,6 bei Homozygotie des A74T-Allels. Obwohl eine sehr umfangreiche Studienpopulation von 204 Maine-Coon-Katzen zur Verfügung stand, wurde dafür ein sehr breites 95 % KI errechnet. Dabei muss zudem berücksichtigt werden, dass der Wert des ORs, welches eine Approximation zum relativen Risiko darstellt, mit steigender Prävalenz vom relativen Risiko abweicht (BICKEBÖLLER & FISCHER, 2006). Davon abgesehen, geben NYBERG und Mitarbeiter (2007) in ihrem Abstract keine nähere Auskunft über die Phänotypisierungsmethode und über Ausschlusskriterien. Bezüglich des A74T-Polymorphismus gibt es im Gegensatz zum A31P-Polymorphismus keinen Bericht, dass dieser jemals familiär zusammen mit einem klinischen Phänotyp zusammen aufgetreten ist. Um zu beweisen, dass es sich hierbei ebenfalls um eine potentielle kausale Mutation handeln könnte, wären familiengenetische Aspekte unerlässlich.

So zeigen viele Genotyp-positive Tiere auch im hohen Alter noch keine HCM, während an HCM erkrankte Tiere nicht sehr häufig ein positives Ergebnis in den beiden Gentests aufweisen. Deshalb wurde diese Studie an einem Patientenkollektiv im süddeutschen Raum durchgeführt, um einen Eindruck der vorhandenen Geno- und Phänotypen zu bekommen und um die klinische Korrelation statistisch zu interpretieren. Letztere konnte bisher in keiner vorhergehenden Fall-Kontroll-Studie beweisend dargestellt werden. Zudem sollte die klinische Validität der beiden Gentests, die bereits in kommerziellen Laboratorien angeboten werden, beurteilt werden, da eine Beurteilung dieser Werte bisher nicht existierte. Da in der von NYBERG und Mitarbeitern (2007)

untersuchten Kohorte das Alter im Median nur 2,2 Jahre betrug, wurden in der vorliegenden Studie die jungen herzgesunden Tiere von Beginn an aus der statistischen Berechnung ausgeschlossen, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass herzgesund eingestufte Katzen im Alter nicht doch in das kranke Lager wechseln. So lag wie bereits erwähnt, das Alter der beiden für den A31P-Polymorphismus homozygot getesteten phänotypisch herzgesunden Tiere bei 58 und 64 Monaten. Das Medianalter der echokardiographisch herzgesunden homozygot für A74T getesteten Maine Coons lag bei 89 Monaten, der herzgesunden heterozygot für A31P getesteten Maine Coons bei 60 Monaten und der herzgesunden für A74T heterozygot getesteten Maine Coons 66 Monaten. Mittels Langzeitstudien könnten, wie ebenfalls oben erwähnt, die klinischen Phänotypen eindeutig bestimmt werden. Jedoch ist das Medianalter der vorliegenden herzgesunden Kontrollgruppe bereits relativ hoch.

4. Gentestergebnisse

Die Gentestergebnisse der vorliegenden Studie werden im Folgenden für den A31P-SNP und dem A74T-SNP des kardialen MYBPC3-Gens nacheinander betrachtet. Von einer Verstärkung des Erkrankungsbildes, wenn beide Mutationen zugleich bei einem Tier auftreten, kann nicht ausgegangen werden, da ein gemeinsames Auftreten beider SNPs nur bei phänotypisch gesunden Tieren zu verzeichnen war.

Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten echokardiographisch herzgesunden Maine-Coon-Katzen waren 20,87 % heterozygote und 2,61 % homozygote Träger des A31P-SNPs. Die homozygoten herzgesunden Träger befanden sich in einem Alter, in dem die HCM eigentlich schon echokardiographisch offensichtlich sein sollte (58 und 64 Monate). Insgesamt waren 21,13 % der eindeutig als herzgesund phänotypisierten Katzen Träger des A31P-Polymorphismus. 76,52 % der an HCM erkrankten Maine-Coon-Katzen trugen das gesunde Allel G/G, was darauf hinweist, dass von weiteren oder anderen kausalen Mutationen oder zusätzlichen Einflüssen ausgegangen werden muss. Durch die bereits von MEURS und Mitarbeitern (2005) dargestellte variable Expressivität der Erkrankung, wird deutlich, dass von einer komplexen Erkrankung auszugehen ist. Letztere definiert sich als genetische Erkrankung, deren Erkrankungsrisiko, durch verschiedene Allelvarianten oder sogar durch eine Kombination von Allelen an multiplen Loki steigt und nicht immer in der

Erkrankung resultiert (YANG *et al.*, 2000). Mittels des exakten Tests nach Fisher konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen des A31P-SNPs zwischen den Phänotypgruppen „herzgesund“ und „HCM“ bei der untersuchten Kohorte dargestellt werden. Gründe hierfür wurden bereits bei den Limitationen dieser Studie abgehandelt. Einerseits könnte die Gruppengröße in der vorliegenden Studie zu gering sein, um signifikante Unterschiede mit engen 95 % KI zu kalkulieren, andererseits besteht die Möglichkeit, dass die kalkulierten Ergebnisse tatsächlich der Realität entsprechen. In der vorliegenden Studie wurde für die homozygoten Tiere bezüglich des A31P-SNPs nur ein 3,1 fach höheres Erkrankungsrisiko berechnet, wobei zusätzlich angemerkt werden muss, dass das 95 % KI dabei von 0,25 <OR> 35,96 reichte. Dass die OR keine statistische Signifikanz reflektiert, spiegelt sich im 95 % KI wider, welches bei allen in der vorliegenden Studie berechneten ORs den Wert 1,0 enthielt. Ein Wert von 1,0 sagt aus, dass kein Unterschied bezüglich des Risikos mit oder ohne Mutation besteht. Wie im Kapitel der Limitationen dieser Studie schon besprochen, würde sich mit einem größeren Patientengut das KI enger darstellen. Die vorliegenden 95 % KI reflektierten folglich auch die Unsicherheit des Tests bezüglich der untersuchten Patientenzahl. Im Falle des A31P-SNPs konnte also bei der vorliegenden untersuchten Population kein Zusammenhang zwischen SNP und HCM dargestellt werden. Die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen SNP und Erkrankung bei einer größeren Population hergestellt werden könnte, bleibt offen. Genauso bleibt weiterhin ungeklärt, ob sich die Ergebnisse in einer anderen Maine-Coon-Population ähnlich verhalten würden. Da die untersuchten Katzen aber aus verschiedenen Zuchten kamen, ist die Wahrscheinlichkeit nicht sehr groß, dass sich andere Populationen bezüglich der klinischen Korrelation abweichend verhalten. Bei TOBIAS und Koautoren, 2007, der mit der Arbeitsgruppe Kardiologie der DGK-DVG vorwiegend Maine-Coon-Katzen aus dem mittel- und norddeutschen Raum untersucht hat, verhält sich die Verteilung in den Genotyp- und Phänotypgruppen ähnlich wie in der vorliegenden Studie. Ebenso war bei der Studie von NYBERG und Mitarbeitern (2007) ein A31P-SNP bei 20 % der Kontrollkatzen vorhanden. Jedoch liefern NYBERG und Mitarbeiter (2007) keine Angaben über die Herkunft der Tiere, es bleibt daher offen, ob es sich dabei um eine dänische Population handelt, oder ob Blutproben aus dem gesamteuropäischen Raum per Postweg zur Genotypisierung

herangezogen wurden. Ebenso wurden bei der zuletzt erwähnten Studie auch keine Angaben zur Phänotypisierung gemacht. Nur durch Langzeitstudien kann mit Sicherheit beantwortet werden, ob die Tiere tatsächlich im Alter eine HCM entwickeln. Andererseits ist das Medianalter der vorliegenden Kontrollpopulation bereits sehr hoch und überschreitet den festgelegten Wert des Mindestalters weit, in welchem bei den meisten Tieren eine HCM echokardiographisch erkannt werden kann. Auch pathologische und histopathologische sowie weitere molekularbiologische Untersuchungen wären zusätzlich zu den echokardiographischen Studien bei einer großen Anzahl von Trägern des A31P-Polymorphismus nötig, um zu beweisen, dass die Todesursache letztendlich eine HCM war. Auch Tiere mit plötzlichem Herztod müssen weiter pathologisch differenziert werden um mit Sicherheit zu sagen, dass eine HCM zugrunde liegt. Angenommen KITTLESON und Mitarbeiter haben Recht, und alle ihre homozygoten Tiere entwickeln letztendlich eine HCM, dann bleiben immer noch Fragen offen, ob diese Tatsache in Europa oder in Deutschland ebenfalls gegeben ist. Zum einen könnte die amerikanische Population im Laufe der Zeit einen komplett differenzierten Genpool besitzen, anderen Umweltfaktoren unterliegen, oder dem Einfluss anderer modifizierender Gene unterliegen. Zum anderen wurde von KITTLESON und Mitarbeitern (1999) und MEURS und Mitarbeitern (2005) nur eine engverwandte Katzenkolonie untersucht, wobei bedacht werden muss, dass die Vorkommnisse in dieser Kolonie womöglich nicht auf die Gesamtpopulation oder die europäische Population übertragbar sind. Letzteres zeigt sich bereits in der Expressivität und der Penetranz in der Kolonie von KITTLESON und Mitarbeitern (1999) und MEURS und Mitarbeitern (2005) im Vergleich zur vorliegenden und zu anderen Studien aus dem europäischen Raum (NYBERG *et al.*, 2007; TOBIAS, 2007).

Aufgrund der Tatsache, dass der A74T-Polymorphismus des MYBPC3-Gens in der vorliegenden Studie auch bei allen anderen getesteten Rassen vorkam, konnte die Hypothese, dass es sich hierbei um eine Maine-Coon-spezifische kausale Mutation handelt, widerlegt werden. Die Allelfrequenzen, das heißt die prozentuale Häufigkeit des Vorkommens dieses Polymorphismus, verhielten sich sowohl in der herzkranken als auch in der herzgesunden Gruppe ähnlich. Mittels der statistischen Überprüfung konnte kein signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen zwischen den herzgesunden und herzkranken Populationen dargestellt werden. Ebenfalls lieferten die Schätzwerte der klinischen Validität

bezüglich des A74T-Gentests keine brauchbaren prädiktiven Werte. Auch von NYBERG und Mitarbeiter (2007) wurde bezüglich des A74T-SNPs ein häufiges Vorkommen bei gesunden Kontrollkatzen beschrieben, und zwar mit einer prozentualen Häufigkeit von 13 %. In der vorliegenden Studie konnte kein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Vorhandensein des A74T Polymorphismus ermittelt werden, da in jedem der 95 % KI der berechneten ORs immer der Wert 1,0 enthalten war. Ob der A74T-Polymorphismus eine kausale Mutation darstellt oder nicht, ist daher fragwürdig. Das Vererbungsmuster dieses SNPs konnte in keiner Katzenfamilie nachgewiesen werden. Zumindest wird die Auswirkung des SNPs auf das Protein im Programm PolyPhen ebenfalls wie beim anderen untersuchten SNP (A31P) als benigne eingestuft, was somit nicht dafür spricht, dass es sich um eine kausale Mutation handelt. Bezüglich des A74T-SNPs hatten die homozygoten Maine-Coon-Katzen ein 3,15 fach höheres Risiko an HCM zu erkranken als die anderen. Jedoch lag auch bei diesem Test das KI bei 0,51 <OR> 19,52. Das Erkrankungsrisiko bei Vorliegen des A74T-Polymorphismus bezüglich der homozygoten Tiere der anderen Rassen (AR) lag bei OR = 1,42 (KI von 0,39 <OR> 5,22), was wiederum anzeigt, dass keine statistische Signifikanz der berechneten ORs vorliegt. Somit ist zusammenfassend zu sagen, dass anhand der statistischen Daten bei der vorliegenden süddeutschen Katzenpopulation nicht davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um eine kausale Mutation handelt. Wie im Falle des A31P-Polymorphismus, kann nicht definitiv gesagt werden, ob eine größere Tierzahl, Langzeitstudien oder eine andere Zusammensetzung der Studienpopulation die statistischen Ergebnisse verändern könnten.

5. Einsatz von Gentests für die A31P- und A74T-Polymorphismen

Der Einsatz der untersuchten Gentests ist nicht als Diagnostikum für die HCM geeignet. So wird es auch auf der Homepage des Veterinary Cardiac Genetics Laboratory, Washington State University und den kommerziellen Laboratorien propagiert (LABOKLIN, 2007; WSU, 2007). Dennoch werden die Gentests „zum Nachweis der HCM bei Maine-Coon-Katzen“ in kommerziellen Laboratorien angeboten (LABOKLIN, 2007). Von den Laboratorien werden die A31P- und A74T-SNPs als „genetische Ursache der HCM bei der Rasse Maine Coon“ vermarktet (BIOFOCUS, 2007). Demnach stellte sich im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob die Gentests überhaupt für die züchterische Auslese eingesetzt

werden sollen. Ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung HCM und den beiden untersuchten SNPs konnte bisher in keiner Fall-Kontroll-Studie, sondern nur bei einer Maine-Coon-Kolonie in Verbindung mit dem A31P-Polymorphismus dargestellt werden (KITTLESON *et al.*, 1999), wodurch die Anwendbarkeit der Gentests bei einer Gesamtpopulation bereits in Frage gestellt werden muss. Daten über die klinische Validität dieser Gentests existierten bisher nicht. Vorhersagewerte, wie Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert sind jedoch unabdingbar, bevor ein Einsatz von genetischen Tests zur Prävention und Diagnostik bei einer Gesamtpopulation erfolgt (BICKEBÖLLER & FISCHER, 2006; YANG *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurde die klinische Validität der Gentests für die A31P- und A74T-Polymorphismen in der vorliegenden Studie evaluiert. Für die züchterische Auslese sind vor allem der positive prädiktive Wert (PPW) und die Sensitivität der Tests von Interesse. Mit einem PPW von 0,16 für homozygote und heterozygote Tiere zusammengefasst und 0,33 für homozygote Tiere, konnte keine Eignung des A31P-Gentests zur Zuchtauslese anhand der vorliegenden Studienpatienten demonstriert werden. Auch die Sensitivität zeigte sich in der vorliegenden Studie bezüglich des A31P-SNPs als sehr gering (0,25 für hetero- und homozygote Tiere und 0,08 wenn nur homozygote Tiere betrachtet werden). Der PPW und die Sensitivität verhielten sich bei der Betrachtung des A74T-Gentests in der vorliegenden Studienpopulation ebenso schlecht wie die klinische Validität des A31P-Gentests. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide evaluierten Gentests keine klinisch geeigneten prädiktiven Werte bei der vorliegenden Studienpopulation zeigten. Einschränkend muss festgestellt werden, dass es sich bei der vorliegenden Studie nur um eine Momentanaufnahme der aktuellen Situation einer vorwiegend süddeutschen Studienpopulation handelt und dass Langzeitstudien und Untersuchungen in weiteren betroffenen Katzenkolonien für eine endgültige Aussage unabdingbar sind. Vor allem homozygote Tiere, die die HCM laut MEURS und Mitarbeitern (2005) meist früher und hochgradiger entwickeln, wären als Untersuchungsgut bei einer Langzeitstudie sehr interessant, da heterozygote Tiere aufgrund der bereits vermuteten niedrigeren Expressivität im europäischen Raum eventuell gar nicht echokardiographisch auffällig werden und homozygote Tiere eventuell später und mit in einem geringeren Schweregrad. Pathologische und vor allem histopathologische Untersuchungen wären in Folgestudien weitere wichtige und

nicht zu vernachlässigende Diagnostika, um die hypertrophe Kardiomyopathie von einer sekundär hervorgerufenen Hypertrophie zu unterscheiden.

6. Humane versus feline hypertrophe Kardiomyopathie

Im Folgenden sollen die Ähnlichkeiten der felinen HCM zum humanen Pendant dargestellt werden, um die Eignung der Katze als Tiermodell der humanen familiären HCM zu demonstrieren. Gleichzeitig soll gerechtfertigt werden, dass die Forschungsansätze der humanen HCM auch für die Erforschung der felinen HCM brauchbar sind.

Bereits im Jahr 1999 stellten KITTLESON und Mitarbeiter ausführlich dar, dass die feline HCM sowohl pathologisch als auch klinisch der humanen familiären Form ähnelt. Auch bei Katzen führt die Erkrankung letztendlich zum Linksherzversagen oder zum plötzlichen Herztod. Pathologisch gesehen konnten die Veränderungen des Menschen auch bei der Katze gezeigt werden. Auch die variierende Penetranz tritt sowohl bei der Katze als auch beim Menschen auf. In einer Kolonie von Maine-Coon-Katzen konnte letztendlich auch ein autosomal dominanter Erbgang nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Schwein und zum Hund wurde somit bei der Katze zum ersten Mal eine familiäre Form der Krankheit bestätigt. Dadurch kann die Katze als Tiermodell für die humane Form der familiären HCM geltend gemacht werden (KITTLESON *et al.*, 1999). Bei derselben Katzenkolonie wurde schließlich eine Sarkomermutation nachgewiesen (MEURS *et al.*, 2005). Mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte, jedoch zumindest mit der hier untersuchten Patientenzahl, keine klinische Korrelation zur Erkrankung festgestellt werden. Es muss folglich hinterfragt werden, ob MEURS und Mitarbeiter (2005) tatsächlich eine kausale Mutation detektiert haben, und welcher genetische Hintergrund vorhanden ist. Wie bereits diskutiert, können multiple additive und synergistische Effekte und modifizierende Gene einen klinischen Phänotyp beeinflussen. Weiterhin ist zu hinterfragen, wieso bei den betroffenen Katzen in der Studie von MEURS und Mitarbeitern (2005) im SDS-PAGE neben dem MYBPC auch das Myomesin reduziert war, und das β-Myosin im Gegenzug dazu erhöht war, was die Sensitivität des SDS-PAGE, eine kausale Mutation nachzuweisen, ebenfalls in Frage stellt. In der Immunofloureszenzanalyse der Herzmuskelproben der betroffenen Katzen von MEURS und Mitarbeitern (2005) waren neben den MYBPC auch Myomesin, Titin und das kardiale Aktin in ihrer Intensität

reduziert, während die Summe der mRNA des MYBPC3 betroffener Katzen in der RT-PCR erhöht war. Zudem ist weiterhin unklar, welcher genetische Hintergrund bei HCM-positiven Katzen ohne A31P- oder A74T-SNP eine tragende Rolle spielt, da diese Katzen in der vorliegenden Studie die Mehrzahl HCM-kranker Tiere darstellten.

Circa 200 genetische Erkrankungen der Katze verhalten sich ähnlich zu humanen Erkrankungen. Die Katze fungiert mit den felinen Pendants wie dem felinen Immundefizienzvirus, dem felinen Coronavirus und dem felinen Leukosevirus bereits als Tiermodell für infektiöse humane Erkrankungen, wie Aids, SARS und Leukämie (GRIFFIN & BAKER, 2000; PONTIUS *et al.*, 2007). Ziel für Studien in der Tiermedizin wäre, die feline HCM auf dieser Basis des Tiermodells noch besser zu ergründen.

7. Ausblick

Größere Studien mit noch strikter angewandten Ausschlusskriterien (z. B. Katzen im Alter unter fünf Jahren) und einer ausreichenden Teststärke wären als Folgestudie dieser Arbeit denkbar. Zudem wären Langzeitstudien mit jährlichen Kontrolluntersuchungen nützlich, um den Phänotyp der Katzen rückblickend sicherer einstufen zu können. Besonders wichtig wäre die Information, ob homozygote Tiere in Europa oder Deutschland aufgrund der hiesigen niedrigen Expressivität tatsächlich erst im hohen Alter phänotypische Anzeichen einer HCM entwickeln. Um zu evaluieren, ob die beiden Mutationen tatsächlich eine HCM verursachen können, wäre eine Studie mit transgenen Versuchstieren vorstellbar, die die bereits bekannten Katzen-Mutationen exprimieren. Jedoch deutet die Proteinanalyse mit dem Programm PolyPhen bereits theoretisch darauf hin, dass die bei der Maine Coon bekannten Mutationen keine funktionelle Schädigung des Proteins hervorrufen. Laut der Homepage des Veterinary Cardiac Genetics Laboratory der Washington State University (http://www.vetmed.wsu.edu/deptsVCGL/FAQ.aspx#science) ist ein Drittel der Maine-Coon-Population Träger der A31P-Mutation. Sehr viele dieser Katzen entwickeln nie eine HCM. Folglich kann bei den Phäno- und Genotyp-positiven Katzen von zusätzlichen oder anderen kausalen Einflüssen auf die Ausprägung der Erkrankung ausgegangen werden. Letzteres könnten zum Beispiel kodominant vererbte Mutationen in anderen Genen, der Einfluss modifizierender Gene oder Umwelteinflüsse sein. Nicht zuletzt stellt sich die Frage, ob es sich bei

der HCM nicht vielleicht doch um eine multifaktorielle Erkrankung handelt und es dadurch zu unterschiedlicher Penetranz und Expressivität sogar innerhalb einer Familie kommen kann. In einer humanmedizinischen Fall-Kontrollstudie mit 811 Patienten und 650 Kontrollen, in der 85 Polymorphismen getestet wurden, die als kausal für das akute Koronarsyndrom gehalten wurden, stellte sich heraus, dass nicht einmal ein einziger dieser Polymorphismen signifikant mit der Erkrankung korreliert (MORGAN *et al.*, 2007). Auf der Homepage des Journals „Nature“ (http://www.nature.com/index.html) wird anhand der Studie von MORGAN und Mitarbeitern ausdrücklich gewarnt, dass genetische Tests für das Herzerkrankungsrisiko irreführen können. LEDFORD argumentiert, dass komplexen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Fettsucht oder Herzerkrankungen kein einzelnes verändertes Gen oder kein einzelner genetischer Pfad zugeordnet werden darf, da von anderen Einflüssen, wie Umweltfaktoren und anderen genetisch prädisponierenden Faktoren ausgegangen werden muss. Oft würden in kleineren Studien falsch positive Gentestergebnisse auftauchen, welche mit Studien an größeren Populationen widerlegt werden können (LEDFORD, 2007). Da Maine-Coon-Katzen als Rassekatzen gut für Stammbaumanalysen und angewandte Familiengenetik geeignet wären, sollten weitere Kandidatengenuntersuchungen anhand von Familien, in welchen die HCM und plötzlicher Herztod nachgewiesen vermehrt auftritt, durchgeführt werden. Ob dort gefundene Polymorphismen in der breiten Population testwürdig sind, müsste anschließend evaluiert werden. Auch in der Humanmedizin wird die Meinung vertreten, dass es nicht sinnvoll ist, an HCM erkrankte Patienten auf bereits bekannte Mutationen zu testen, sondern, dass ein systematisches Sequenzscreening der Kandidatengene bei jeder Familie durchgeführt werden sollte (RICHARD *et al.*, 2003). Als Kandidatengene für die Katze dienen weiterhin die in der Humanmedizin bereits herangezogenen Kandidatengene, da die feline Form sowohl bezüglich des Vererbungsmusters als auch klinisch und pathophysiologisch mit der humanen Form übereinstimmt (KITTLESON *et al.*, 1999). Im Rahmen des felinen Genomprojekts wurde die feline Genomsequenz kürzlich zu 65 % entschlüsselt. Im selben Projekt konnte eine große Anzahl von SNPs, Deletions- und Insertionspolymorphismen (DIPs) und STRs für die Katze charakterisiert werden, die für weitere Studien (z. B. Kopplungsanalysen) bezüglich feliner Erbkrankheiten eine sehr wichtige Basis darstellen (PONTIUS *et al.*, 2007). Bereits existierende „Radiation-Hybrid“-Karteien könnten dann

zum „Fine-Mapping“ herangezogen werden, wie es zum Beispiel bei einer Studie der spinalen muskulären Atrophie bei der Katze erfolgte (FYFE *et al.*, 2006). In den letzten vier Jahren wurden bei der Katze schon mehrere Mutationen in Kandidatengenen im Zusammenhang mit Fellfarbe und Erkrankungsphänotypen mittels Kopplungsanalysen detektiert, indem auf bereits existierende „Genome Mapping“-Resourcen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cat/index.html) zurückgegriffen wurde (EIZIRIK *et al.*, 2003; FYFE *et al.*, 2007; FYFE *et al.*, 2006; IMES *et al.*, 2006; LYONS *et al.*, 2004; LYONS *et al.*, 2005; SCHMIDT-KUNTZEL *et al.*, 2005; YOUNG *et al.*, 2005).

8. Zuchtempfehlungen

Eine Empfehlung, anhand des A74T-Polymorphismus Entscheidungen zur Zuchtauslese zu treffen, kann aus folgenden Gründen nicht ausgesprochen werden. Bezüglich des A74T-Polymorphismus existieren keine ausreichenden wissenschaftlich veröffentlichten Daten, die bekräftigen, dass trotz der in der vorliegenden Studie nicht vorhandenen klinischen Korrelation eine kausale Mutation vorliegen könnte. Zudem konnte bisher nicht gezeigt werden, dass dieser Polymorphismus familiär in Kolonien mit HCM auftritt. Da der A74T-Polymorphismus neben Maine Coon-Katzen bei einigen anderen Rassen vorkommt, handelt es sich hierbei auch nicht um eine Maine-Coon-spezifische Mutation, wie vorher propagiert wurde (NYBERG *et al.*, 2007). Zudem lag bei einer großen Anzahl der vorliegenden herzgesunden Maine-Coon-Population ein homozygoter Genotyp vor. Diese Gegebenheit lässt weiterhin vermuten, dass keine kausale Mutation vorliegt. Aufgrund dieser Tatsachen wird im Folgenden vor allem auf den A31P-Polymorphismus eingegangen.

Auf der Homepage der „Maine Coon Breeders & Fanciers Association“ werden folgende Zuchtempfehlungen ausgesprochen. Als Vorsichtsmaßnahme sollte eine heterozygote Katze nur mit einer negativ getesteten Katze verpaart werden. Die Nachkommen sollten anschließend wieder getestet werden. Nur mit den negativen Individuen sollte dann weitergezüchtet werden (MEURS, 2007). KITTLESON empfiehlt in einer persönlichen Mitteilung an Dr. Gerhard Wess (2008) jedoch folgendes Vorgehen in der Zucht: „Alle Zuchtkatzen sollten hinsichtlich der A31P-Mutation getestet werden. Ein homozygoter Träger der A31P-Mutation sollte nie verpaart werden. Heterozygote Tiere sollten im Idealfall ebenso nicht verpaart werden. Wenn eine heterozygote Katze mit einem

enormen züchterischen Wert Vorteile für die Gesamtpopulation liefern sollte, dann kann sie verpaart werden, aber nur ein einziges Mal. Zudem sollte ein Genotyp-positives Tier nie verkauft werden.“ In einem Beitrag auf der Homepage der „Maine Coon Breeders & Fanciers Association“ äussert sich Jerold S. Bell, DVM, Clinical Associate Professor for Genetics, dass durch eine radikale Zuchtauslese und Eingrenzung des genetischen Pools das Risiko für andere genetisch bedingte Erkrankungen extrem ansteigen könnte (BELL, 2007). Anhand der vorliegenden Untersuchungen muss der Einsatz des genetischen Tests zur Zuchtauslese grundsätzlich kritisch betrachtet werden. In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal eine klinische Validität der beiden Gentests bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse und der fehlenden klinischen Validität der Gentests für den A31P-SNP und den A74T-SNP im felinen kardialen MYBPC3-Gen, scheint eine Eignung oben genannter Tests zur Zuchtauslese anhand der vorliegenden süddeutschen Studienpopulation bei Maine-Coon-Katzen fraglich zu sein. Keiner der evaluierten Gentests konnte einen brauchbaren prädiktiven Hinweis bezüglich der HCM liefern. Um eine Einengung des genetischen Pools der Maine-Coon-Population zu vermeiden, wäre es höchstens sinnvoll, dass vor allem homozygote A31P-Gentest positive Tiere, die immerhin einen geringeren Anteil der Maine-Coon-Population darstellen, weiterhin aus der Zucht genommen werden, bis mittels Langzeitstudien und weiteren Studien bisherige Unklarheiten bezüglich der Penetranz und Expressivität in der Gesamtpopulation eindeutiger charakterisiert werden können. Die klinische Variabilität der HCM, die auch innerhalb von Familien beobachtet werden kann, lässt vermuten, dass synergistische und additive Effekte weiterer Risikofaktoren, seien es andere modifizierende Mutationen oder Umwelteinflüsse, eine große Rolle spielen. Trotzdem wird in der Humanmedizin ein positiver Genotyp ernst genommen und als Risikofaktor betrachtet. Familienmitglieder, die denselben Risikofaktor (positiver Genotyp) tragen, werden regelmäßigen und engmaschigen kardiologischen Screenings unterzogen, um frühzeitig die Krankheit zu erkennen und Symptome wie Arrhythmien symptomatisch zu behandeln. Zusätzlich wird Patienten, die den Risikofaktor des positiven Genotyps tragen, geraten, weitere Risikofaktoren wie Hochleistungssport zu unterlassen und den Lebensstil zu verändern (MICHELS *et al.*, 2007). So sollte auch die vorhandene Genotyp-positive Katzenpopulation engmaschig echokardiographisch gescreent werden, nicht nur um Material für

weitere wichtige Studien zu bekommen, sondern auch um frühzeitig in die mit der Krankheit verbundenen Symptome (z. B. Arrhythmien) einzugreifen. Demnach sollten homozygote Tiere für den A31P-Gentest, die laut MEURS und Mitarbeitern (2005) und KITTLESON (2005) eine deutlich höhere Penetranz aufweisen, unbedingt einer jährlichen Ultraschalluntersuchung bis ins hohe Alter unterzogen werden. Zudem sollte in Zukunft großer Wert auf das genetische und jährliche echokardiographische Screening von verwandten Geno- oder Phänotyp-positiven Tieren bis ins hohe Alter gelegt werden. Humane Studien zeigen, dass MYBPC3-Mutationen auch zu einer HCM führen kann, die erst im hohen Alter echokardiographisch präsent wird und dann auch in einem kürzeren Zeitrahmen eine schwerwiegende Erkrankung hervorrufen kann (KUBO *et al.*, 2005; MARON *et al.*, 2001; NIIMURA *et al.*, 1998). Heterozygote getestete Tiere sollten weiterhin nur mit A31P-Gentest negativen Tieren verpaart werden, bis aussagekräftige Langzeitstudien verfügbar sind. Für Maine-Coon-Katzen, die mit den Tieren der „KITTLESON- & MEURS-Population“ verwandt sind, ist der Einsatz des A31P-Gentests möglicherweise anwendbar, da ein ähnlicher genetischer Hintergrund besteht. Die regelmäßige jährliche echokardiographische Zuchtuntersuchung stellt im Moment die einzig sichere Möglichkeit dar, an HCM erkrankte Katzen zu erkennen und von der Zucht auszuschließen.

VIII. Zusammenfassung

Genetische Assoziation der A31P- und A74T-Polymorphismen im kardialen Myosin-binding-protein-C-Gen mit der felinen familiären hypertrophen Kardiomyopathie bei Maine-Coon-Katzen

Die feline familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die häufigste Herzerkrankung bei der Katze. Bei der Maine Coon wird von einem autosomal dominanten Erbgang mit variierender Penetranz und Expressivität ausgegangen. Zwei Punktmutationen, A31P und A74T, im Sarkomer-Strukturprotein-Gen MYBPC3 werden derzeit als Ursache der HCM bei Maine-Coon-Katzen angesehen. Bei der Ragdoll-Katze wird bisher eine Punktmutation (C820T) im selben Gen für die HCM verantwortlich gemacht. Für Maine-Coon-Katzen und Ragdoll-Katzen werden Gentests für die erwähnten Einzelnukleotid-polymorphismen (SNPs) kommerziell angeboten. In der Praxis weicht der Phänotyp aber häufig vom Genotyp der Tiere ab. Es ist bislang unklar, wie mit herzgesunden Gentest positiven Katzen verfahren werden soll. Ziel der Studie war deshalb die Evaluation der genetischen Assoziation der A31P- und A74T-SNPs im MYBPC3 zur HCM sowie die Evaluation der klinischen Validität der A31P- und A74T-Gentests für die Anwendung in der Maine-Coon-Population. Im Rahmen dieser Studie wurde ausserdem getestet, ob die für Maine Coons spezifischen SNPs auch bei anderen Katzenrassen vorkommen.

115 Maine-Coon-Katzen und 82 Katzen verschiedenster Rassen wurden in die Studie aufgenommen und prospektiv hinsichtlich des Geno- und Phänotyps evaluiert. Die Phänotypisierung erfolgte mittels klinischer Untersuchung, Herzultraschall und Ausschluss diverser Differentialdiagnosen. Für die Genotypisierung wurde DNA aus peripheren Blutleukozyten isoliert. Anschließend wurde ein Teil des MYBPC3-Gens von vier Tieren mit bekanntem Genotyp für den A31P-SNP mittels PCR amplifiziert und sequenziert, um den Genotyp zu verifizieren und einen Gentest zu etablieren. Die Genotypisierung der Tiere bezüglich der A31P und A74T-SNPs erfolgte mittels eines Taqman® Genotyping Assays. Schließlich wurden für die Phänotypgruppen „adult & herzgesund“ (m > 24 Monate, w > 36 Monate), „HCM“, „equivocal“ und „jung & herzgesund“ (m < 24 Monate, w < 36 Monate) die Allelfrequenzen beider SNPs bestimmt. In die statistische Berechnung wurden nur in die Gruppen „adult & herzgesund“ oder „HCM“ einzuordnende Tiere eingeschlossen. 21,1 % der

echokardiographisch herzgesunden Maine-Coon-Katzen („adult und herzgesund“) waren bezüglich des A31P-SNPs im Gentest positiv (heterozygot G/C: Alter im Median = 60 Monate; homozygot C/C: Alter = 58 und 64 Monate). Bezüglich des A74T-SNPs waren 32,8 % (heterozygot G/A: Alter im Median = 66 Monate; homozygot A/A: Alter im Median = 89 Monate) der echokardiographisch herzgesunden Maine-Coon-Katzen im Gentest positiv. 75,0 % der HCM-Gruppe trugen das Wildtypallel G/G im A31P- und 50,0 % im A74T-Gentest. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Allelfrequenzen beider Polymorphismen zwischen der Gruppe „adult & herzgesund“ und der Gruppe „HCM“ nachgewiesen. Die Genotyp-positiven (A31P und A74T) herzgesunden Maine-Coon-Katzen (Gruppe: „adult & herzgesund“) zeigten keine signifikant erhöhte Erkrankungsprävalenz. Eine computergestützte Analyse ordnete die Auswirkung der Punktmutationen auf das Protein als strukturell und funktionell bedeutungslos ein.

Der A31P-Polymorphismus ist für Maine-Coon-Katzen spezifisch, während der A74T-Polymorphismus auch bei anderen Katzenrassen vorkommt. Die jährliche echokardiographische Untersuchung stellt weiterhin den Goldstandard zur Zuchtauslese dar. Langzeitstudien und Untersuchungen mit einer größeren Population werden nötig sein, um zu beurteilen, ob die Tests für eine Anwendung an der Maine-Coon-Gesamtpopulation sinnvoll sind. Nur Langzeitstudien können eine definitive Aussage liefern, ob alle homozygoten Tiere jemals eine HCM entwickeln. Das Alter der hier untersuchten herzgesunden homozygoten (C/C) Tiere war jedoch mit 58 und 64 Monaten relativ hoch und die Wahrscheinlichkeit, dass viele solcher Tiere noch im späten Alter eine HCM entwickeln, ist relativ gering. Da der A74T-SNP bei anderen Katzenrassen außer Maine Coons vorkommt und bisher kein familiärer Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, kann dieser SNP nicht als kausale Mutation eingestuft werden. Es ist von additiven und synergistischen Einflüssen modifizierender Gene oder Umwelteinflüsse auszugehen, die die variable Penetranz und Expressivität der HCM bei der Katze hervorrufen.

IX. Summary

Genetic association of A31P and A74T polymorphisms in the cardiac myosin binding protein C gene with hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon cats

Feline familial hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common heart disease in cats and was shown to be inherited as an autosomal dominant trait. Disease outcome is heterogenous in Maine Coon cats. Two point mutations in the cardiac MYBPC3 gene (A31P and A74T) are reported to cause HCM in Maine Coon cats, one point mutation in the same gene (C820T) is supposed to cause HCM in Ragdoll cats. Commercial laboratories are currently providing genetic tests for the above-mentioned mutations. In the experience of many investigators, the clinical phenotype, however often differs from the genotype of the cats and it is not clear if phenotype-negative and genotype-positive cats should be used for breeding. The goal of this study was to evaluate the genetic association of the A31P and A74T single nucleotide polymorphisms (SNPs) with the clinical outcome of HCM in Maine Coon cats. The clinical validation by calculating sensitivity, specificity, positive, and negative predictive value for testing both SNPs in the Maine Coon population was also assessed. The presence of the two above-named SNPs was evaluated in other breeds as well.

One hundred and fifteen Maine Coon cats and 82 cats of different breeds were prospectively examined by physical examination and echocardiography. Other diseases causing concentric ventricular hypertrophy were excluded. The prevalence of HCM in Maine Coon cats was determined using randomly screened Maine Coon cats without overt clinical symptoms. To verify the genotype, DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Subsequently, a part of the MYBPC3 gene was amplified by PCR with DNA of four cats with known genotypes for the A31P-SNP. The PCR product was sequenced, and commercial Taqman® Genotyping Assays for the A31P and A74T were used for further processing. The cats were divided into four groups according to the echocardiographic results: “adult & healthy” (males older than 24 months and females older than 36 months), “HCM”, “equivocal” and “young & healthy” (males younger than 24 months and females younger than 36 months). The allele frequencies of point mutations were calculated for each of these groups. The “equivocal” and the “young and healthy” groups were excluded from further

statistical analysis because it could not be excluded in these cats, that they might develop HCM later. Of the phenotypically “adult & healthy” Maine Coon cats, 21.1 % had a positive genetic test result when tested for the A31P SNP (heterozygous G/C: median age = 60 months, homozygous C/C age = 58 and 64 months). Of the phenotypically “adult & healthy” Maine Coon cats (heterozygous: median age = 66 months, homozygous A/A: median age = 89 months) 32.5 % were tested positive with A74T genetic test. Of the “HCM“ group 75.0 % carried the wild type allele G/G when tested for A31P and 50.0 % when tested for A74T. There were no significant differences in frequencies of point mutations between cats in the “HCM” and “adult & healthy” group for the two SNPs. The risk for developing HCM was not significantly higher in genotype positives than in genotype negatives. Sensitivity of both tests was very low. The potential impact of the amino acid substitution caused by the A31P and A74T SNPs was evaluated with the program PolyPhen which predicted both substitutions to be “benign”.

The A74T SNP is present in other purebred and mixed-breed cats. Echocardiography remains the gold standard for the diagnosis of feline HCM. Extended duration of follow up and a bigger study population of Maine Coon cats are needed because of the heterogeneity in expressivity and penetrance of this disease. Cats that are homozygous (C/C) for the A31P SNP should not be bred because only long term evaluation could give reliable indication about the relevance of the genotype for development of HCM. However, the homozygous cats of the present study population were old enough that cardiac abnormalities should be present in cats proned to develop the disease. It seems very unlikely that these cats would develop HCM later at an even older age. As the A74T SNP occurs in healthy cats of other breeds as well and was never proven to occur in families, it should not be categorized as a causative mutation. Modifier genes or environmental factors may play an additional and decisive role causing HCM in cats.

X. Literaturverzeichnis

AB. Assays-by-Design Service For SNP Assays Protocol. Applied Biosystems, Foster City, 2003.

AB. Allelic Discrimination Getting Started Guide for the 7300/7500 System. Applied Biosystems, Foster City, 2004.

Adin DB and Diley-Poston L. Papillary muscle measurements in cats with normal echocardiograms and cats with concentric left ventricular hypertrophy. J Vet Intern Med 2007; 21(4): 737-41.

Alper G and Narayanan V. Friedreich's ataxia. Pediatr Neurol 2003; 28(5): 335-41.

Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Escudero X, Lablanche JM, Amouyel P and Bertrand ME. The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. J Am Coll Cardiol 1997; 29(3): 486-90.

Anan R, Niimura H and Tei C. [Genotype-phenotype correlations in familial hypertrophic cardiomyopathy]. Nippon Rinsho 2000; 58(1): 134-40.

Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman JG and Seidman CE. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 2002a; 109(3): 357-62.

Arad M, Seidman JG and Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. Hum Mol Genet 2002b; 11(20): 2499-506.

Arad M, Maron BJ, Gorham JM, Johnson WH, Jr., Saul JP, Perez-Atayde AR, Spirito P, Wright GB, Kanter RJ, Seidman CE and Seidman JG. Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med 2005; 352(4): 362-72.

Balmer C, Ballhausen D, Bosshard NU, Steinmann B, Boltshauser E, Bauersfeld U and Superti-Furga A. Familial X-linked cardiomyopathy (Danon disease): diagnostic confirmation by mutation analysis of the LAMP2gene. Eur J Pediatr 2005; 164(8): 509-14.

Basso C, Thiene G, Corrado D, Buja G, Melacini P and Nava A. Hypertrophic cardiomyopathy and sudden death in the young: pathologic evidence of myocardial ischemia. Hum Pathol 2000; 31(8): 988-98.

Baty CJ, Malarkey DE, Atkins CE, DeFrancesco TC, Sidley J and Keene BW. Natural history of hypertrophic cardiomyopathy and aortic thromboembolism in a family of domestic shorthair cats. J Vet Intern Med 2001; 15(6): 595-9.

Bauce B, Rampazzo A, Basso C, Bagattin A, Daliento L, Tiso N, Turrini P, Thiene G, Danieli GA and Nava A. Screening for ryanodine receptor type 2

mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death: early diagnosis of asymptomatic carriers. J Am Coll Cardiol 2002; 40(2): 341-9.

Belkin AM, Ornatsky OI, Glukhova MA and Koteliansky VE. Immunolocalization of meta-vinculin in human smooth and cardiac muscles. J Cell Biol 1988a; 107(2): 545-53.

Belkin AM, Ornatsky OI, Kabakov AE, Glukhova MA and Koteliansky VE. Diversity of vinculin/meta-vinculin in human tissues and cultivated cells. Expression of muscle specific variants of vinculin in human aorta smooth muscle cells. J Biol Chem 1988b; 263(14): 6631-5.

Bell J. "Recommendation from Jerold S Bell, DVM, Clinical Associate Professor for Genetics." MCBFA, 2007, Abruf: 15.09.2007, Homepage: http://www.mcbfa.org/recommendations.html#Recommendation%20%20S%20Bell,%DVM.

Bickeböller H and Fischer C. Betrachtungen genetischer Epidemiologien zu diagnostischen Tests mit SNP-Markern. J Lab Med 2006; 30(3): 152-159.

Biofocus. "Gentest für die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) bei der Rasse Maine Coon und Ragdoll." BIOFOCUS Gesellschaft für biologische Analytik GmbH, 2007, Abruf: 05.10.2007, Homepage: http://www.biofocus.de/data/biofo/de/data/Link_1286_download.pdf.

Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Kerr B, Salmon A, Ostman-Smith I and Watkins H. Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. Hum Mol Genet 2001; 10(11): 1215-20.

Blanchard E, Seidman C, Seidman JG, LeWinter M and Maughan D. Altered crossbridge kinetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. Circ Res 1999; 84(4): 475-83.

Boelhauve M. Quantitative PCR. Seminar des Graduiertenkollegs der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, München, 2007.

Bollinger O. Grundlagen für eine objektive, pathologisch-anatomische Beurteilung des Katzenherzens. Diss med vet, Zürich, 1958.

Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B and Schwartz K. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. Circ Res 1998; 83(6): 580-93.

Bos JM, Poley RN, Ny M, Tester DJ, Xu X, Vatta M, Towbin JA, Gersh BJ, Ommen SR and Ackerman MJ. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. Mol Genet Metab 2006; 88(1): 78-85.

Bos JM, Ommen SR and Ackerman MJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? Curr Opin Cardiol 2007; 22(3): 193-9.

Brigden W. Uncommon myocardial diseases: the non-coronary cardiomyopathies. 1957; 2(1179-84.

Bright JM, Herrtage ME and Schneider JF. Pulsed Doppler assessment of left ventricular diastolic function in normal and cardiomyopathic cats. J Am Anim Hosp Assoc 1999; 35(4): 285-91.

Brilla CG and Rupp H. Myocardial collagen matrix remodeling and congestive heart failure[abstract]. Cardiologia 1994; 39(12 Suppl 1): 389-93.

Brugada R, Kelsey W, Lechin M, Zhao G, Yu QT, Zoghbi W, Quinones M, Elstein E, Omran A, Rakowski H, Wigle D, Liew CC, Sole M, Roberts R and Marian AJ. Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. J Investig Med 1997; 45(9): 542-51.

Brummer DG and Moise NS. Infiltrative cardiomyopathy responsive to combination chemotherapy in a cat with lymphoma. J Am Vet Med Assoc 1989; 195(8): 1116-9.

Bulkley BH, Weisfeldt ML and Hutchins GM. Asymmetric septal hypertrophy and myocardial fiber disarray. Features of normal, developing, and malformed hearts. Circulation 1977; 56(2): 292-8.

Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S and et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. Nature 1992; 359(6396): 641-4.

Campbell FE and Kittleson MD. The Effect of Hydration Status on the Echocardiographic Measurements of Normal Cats. J Vet Intern Med 2007; 21(1008-1015.

Capasso JM, Remily RM, Smith RH and Sonnenblick EH. Sex differences in myocardial contractility in the rat. Basic Res Cardiol 1983; 78(2): 156-71.

Cesta MF, Baty CJ, Keene BW, Smoak IW and Malarkey DE. Pathology of end-stage remodeling in a family of cats with hypertrophic cardiomyopathy. Vet Pathol 2005; 42(4): 458-67.

Charron P, Dubourg O, Desnos M, Isnard R, Hagege A, Bonne G, Carrier L, Tesson F, Bouhour JB, Buzzi JC, Feingold J, Schwartz K and Komajda M. Genotype-phenotype correlations in familial hypertrophic cardiomyopathy. A comparison between mutations in the cardiac protein-C and the beta-myosin heavy chain genes. Eur Heart J 1998; 19(1): 139-45.

Charron P, Heron D, Gargiulo M, Richard P, Dubourg O, Desnos M, Bouhour JB, Feingold J, Carrier L, Hainque B, Schwartz K and Komajda M. Genetic

testing and genetic counselling in hypertrophic cardiomyopathy: the French experience. J Med Genet 2002; 39(10): 741-6.

Chetboul V, Blot S, Sampedrano CC, Thibaud JL, Granger N, Tissier R, Bruneval P, Gaschen F, Gouni V, Nicolle AP and Pouchelon JL. Tissue Doppler imaging for detection of radial and longitudinal myocardial dysfunction in a family of cats affected by dystrophin-deficient hypertrophic muscular dystrophy. J Vet Intern Med 2006; 20(3): 640-7.

Cuda G, Fananapazir L, Zhu WS, Sellers JR and Epstein ND. Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1993; 91(6): 2861-5.

Dalldorf FG and Willis PWt. Angled aorta ("sigmoid septum") as a cause of hypertrophic subaortic stenosis. Hum Pathol 1985; 16(5): 457-62.

Dalloz F, Osinska H and Robbins J. Manipulating the contractile apparatus: genetically defined animal models of cardiovascular disease. J Mol Cell Cardiol 2001; 33(1): 9-25.

Daly AK and Day CP. Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. Br J Clin Pharmacol 2001; 52(5): 489-99.

Davies MJ. The current status of myocardial disarray in hypertrophic cardiomyopathy. Br Heart J 1984; 51(4): 361-3.

Davies MJ and McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy--pathology and pathogenesis. Histopathology 1995; 26(6): 493-500.

Devlin AM, Moore NR and Ostman-Smith I. A comparison of MRI and echocardiography in hypertrophic cardiomyopathy. Br J Radiol 1999; 72(855): 258-64.

Doolan A, Langlois N and Semsarian C. Causes of sudden cardiac death in young Australians. Med J Aust 2004a; 180(3): 110-2.

Doolan A, Nguyen L and Semsarian C. Hypertrophic cardiomyopathy: from "heart tumour" to a complex molecular genetic disorder. Heart Lung Circ 2004b; 13(1): 15-25.

Doolan A, Tebo M, Ingles J, Nguyen L, Tsoutsman T, Lam L, Chiu C, Chung J, Weintraub RG and Semsarian C. Cardiac troponin I mutations in Australian families with hypertrophic cardiomyopathy: clinical, genetic and functional consequences. J Mol Cell Cardiol 2005; 38(2): 387-93.

Doolan G, Nguyen L, Chung J, Ingles J and Semsarian C. Progression of left ventricular hypertrophy and the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy. Int J Cardiol 2004; 96(2): 157-63.

Drourr L, Lefbom BK, Rosenthal SL and Tyrrell WD, Jr. Measurement of M-mode echocardiographic parameters in healthy adult Maine Coon cats. J Am Vet Med Assoc 2005; 226(5): 734-7.

Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS and O'Brien SJ. Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. Curr Biol 2003; 13(5): 448-53.

Eldar M, Pras E and Lahat H. A missense mutation in the CASQ2 gene is associated with autosomal-recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia. Trends Cardiovasc Med 2003; 13(4): 148-51.

Epstein ND, Cohn GM, Cyran F and Fananapazir L. Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene. A 908Leu----Val mutation and a 403Arg----Gln mutation. Circulation 1992; 86(2): 345-52.

Eriksson MJ, Sonnenberg B, Woo A, Rakowski P, Parker TG, Wigle ED and Rakowski H. Long-term outcome in patients with apical hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2002; 39(4): 638-45.

ExPASy. "ExPASy Proteomics Server." Swiss Institute of Bioinformatics, 2007, Abruf: 23.06.2007, Homepage: http://www.expasy.org.

Factor SM, Butany J, Sole MJ, Wigle ED, Williams WC and Rojkind M. Pathologic fibrosis and matrix connective tissue in the subaortic myocardium of patients with hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1991; 17(6): 1343-51.

Falicov RE, Resnekov L, Bharati S and Lev M. Mid-ventricular obstruction: a variant of obstructive cardiomyopathy. Am J Cardiol 1976; 37(3): 432-7.

Fatkin D and Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. Physiol Rev 2002; 82(4): 945-80.

Fighali S, Krajcer Z, Edelman S and Leachman RD. Progression of hypertrophic cardiomyopathy into a hypokinetic left ventricle: higher incidence in patients with midventricular obstruction[Abstract]. J Am Coll Cardiol 1987; 9(2): 288-94.

Flavigny J, Richard P, Isnard R, Carrier L, Charron P, Bonne G, Forissier JF, Desnos M, Dubourg O, Komajda M, Schwartz K and Hainque B. Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Med 1998; 76(3-4): 208-14.

Flavigny J, Souchet M, Sebillon P, Berrebi-Bertrand I, Hainque B, Mallet A, Bril A, Schwartz K and Carrier L. COOH-terminal truncated cardiac myosin-binding protein C mutants resulting from familial hypertrophic cardiomyopathy mutations exhibit altered expression and/or incorporation in fetal rat cardiomyocytes. J Mol Biol 1999; 294(2): 443-56.

Fox PR, Liu SK and Maron BJ. Echocardiographic assessment of spontaneously occurring feline hypertrophic cardiomyopathy. An animal model of human disease. Circulation 1995; 92(9): 2645-51.

Fujino N, Shimizu M, Ino H, Yamaguchi M, Yasuda T, Nagata M, Konno T and Mabuchi H. A novel mutation Lys273Glu in the cardiac troponin T gene shows

high degree of penetrance and transition from hypertrophic to dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 2002; 89(1): 29-33.

Fujino N, Ino H and Hayashi K. A novel missense mutation in cardiac ryanodine receptor gene as a possible cause of hypertrophic cardiomyopathy: evidence from familial analysis [Abstract]. Circulation 2006; 114(II): 165.

Fyfe JC, Menotti-Raymond M, David VA, Brichta L, Schaffer AA, Agarwala R, Murphy WJ, Wedemeyer WJ, Gregory BL, Buzzell BG, Drummond MC, Wirth B and O'Brien SJ. An approximately 140-kb deletion associated with feline spinal muscular atrophy implies an essential LIX1 function for motor neuron survival. Genome Res 2006; 16(9): 1084-90.

Fyfe JC, Kurzhals RL, Hawkins MG, Wang P, Yuhki N, Giger U, Van Winkle TJ, Haskins ME, Patterson DF and Henthorn PS. A complex rearrangement in GBE1 causes both perinatal hypoglycemic collapse and late-juvenile-onset neuromuscular degeneration in glycogen storage disease type IV of Norwegian forest cats. Mol Genet Metab 2007; 90(4): 383-92.

Gakh O, Park S, Liu G, Macomber L, Imlay JA, Ferreira GC and Isaya G. Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. Hum Mol Genet 2006; 15(3): 467-79.

Gaschen L, Lang J, Lin S, Ade-Damilano M, Busato A, Lombard CW and Gaschen FP. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. J Vet Intern Med 1999; 13(4): 346-56.

Gavaghan BJ, Kittleson MD, Fisher KJ, Kass PH and Gavaghan MA. Quantification of left ventricular diastolic wall motion by Doppler tissue imaging in healthy cats and cats with cardiomyopathy. Am J Vet Res 1999; 60(12): 1478-86.

Gehmlich K, Geier C, Osterziel KJ, Van der Ven PF and Furst DO. Decreased interactions of mutant muscle LIM protein (MLP) with N-RAP and alpha-actinin and their implication for hypertrophic cardiomyopathy. Cell Tissue Res 2004; 317(2): 129-36.

Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, van der Ven PF, Furst DO, Vornwald A, von Hodenberg E, Nurnberg P, Scheffold T, Dietz R and Osterziel KJ. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 2003; 107(10): 1390-5.

Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE and Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. Cell 1990; 62(5): 999-1006.

Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE and Seidman JG. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. Science 1996; 272(5262): 731-4.

Gollob MH, Green MS, Tang AS, Gollob T, Karibe A, Ali Hassan AS, Ahmad F, Lozado R, Shah G, Fananapazir L, Bachinski LL and Roberts R. Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. N Engl J Med 2001; 344(24): 1823-31.

Goodwin JF and Oakley CM. The Cardiomyopathies. Br Heart J 1972; 34(6): 545-52.

Goor D, Lillehei CW and Edwards JE. The "sigmoid septum". Variation in the contour of the left ventricular outt. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med 1969; 107(2): 366-76.

Gottdiener JS, Bednarz J, Devereux R, Gardin J, Klein A, Manning WJ, Morehead A, Kitzman D, Oh J, Quinones M, Schiller NB, Stein JH and Weissman NJ. American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials. J Am Soc Echocardiogr 2004; 17(10): 1086-119.

Griffin B and Baker HJ. Domestic cats as laboratory animals. Academic Press, San Diego, 2000.

Groban L and Dolinski SY. Transesophageal echocardiographic evaluation of diastolic function. Chest 2005; 128(5): 3652-63.

Häggström J. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in cats - the european experience. Proceedings of the North American Veterinary Conference - 2006, Orlando, Florida, 2006.

Hallopeau M. Retrecissement ventriculoaortique. Gazette Medicale Paris 1869; 24.

Hasegawa K, Fujiwara H, Koshiji M, Inada T, Ohtani S, Doyama K, Tanaka M, Matsumori A, Fujiwara T, Shirakami G, Hosoda K, Nakao K and Sasayama S. Endothelin-1 and its receptor in hypertrophic cardiomyopathy. Hypertension 1996; 27(2): 259-64.

Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H, Koga Y, Nakamura H, Matsuzaki M, Choi BY, Bae SW, You CW, Han KH, Park JE, Knoll R, Hoshijima M, Chien KR and Kimura A. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2004; 44(11): 2192-201.

Henry WL, Clark CE, Griffith JM and Epstein SE. Mechanism of left ventricular outlfow obstruction in patients with obstructive asymmetric septal hypertrophy (idiopathic hypertrophic subaortic stenosis). Am J Cardiol 1975; 35(3): 337-45.

Hina K, Kusachi S, Iwasaki K, Nogami K, Moritani H, Kita T, Taniguchi G and Tsuji T. Progression of left ventricular enlargement in patients with hypertrophic cardiomyopathy: incidence and prognostic value. Clin Cardiol 1993; 16(5): 403-7.

Ho CY and Seidman CE. A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 2006; 113(24): e858-62.

Hoffmann B, Schmidt-Traub H, Perrot A, Osterziel KJ and Gessner R. First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. Hum Mutat 2001; 17(6): 524.

Hubbard TJ, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cunningham F, Cutts T, Down T, Dyer SC, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Graf S, Haider S, Hammond M, Herrero J, Holland R, Howe K, Howe K, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Melsopp C, Megy K, Meidl P, Ouverdin B, Parker A, Prlic A, Rice S, Rios D, Schuster M, Sealy I, Severin J, Slater G, Smedley D, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wood M, Cox T, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Flicek P, Kasprzyk A, Proctor G, Searle S, Smith J, Ureta-Vidal A and Birney E. Ensembl 2007. Nucleic Acids Res 2007; 35(Database issue): D610-7.

Hughes SE. The pathology of hypertrophic cardiomyopathy. Histopathology 2004; 44(5): 412-27.

Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. Prog Biophys Biophys Chem 1957; 7(255-318.

Iida K, Yutani C, Imakita M and Ishibashi-Ueda H. Comparison of percentage area of myocardial fibrosis and disarray in patients with classical form and dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy. J Cardiol 1998; 32(3): 173-80.

Imes DL, Geary LA, Grahn RA and Lyons LA. Albinism in the domestic cat (Felis catus) is associated with a tyrosinase (TYR) mutation. Anim Genet 2006; 37(2): 175-8.

Ishanov A, Okamoto H, Yoneya K, Watanabe M, Nakagawa I, Machida M, Onozuka H, Mikami T, Kawaguchi H, Hata A, Kondo K and Kitabatake A. Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. Am Heart J 1997; 133(2): 184-9.

James J, Zhang Y, Osinska H, Sanbe A, Klevitsky R, Hewett TE and Robbins J. Transgenic modeling of a cardiac troponin I mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. Circ Res 2000; 87(9): 805-11.

Jurynec J. Hypertrophic cardiomyopathy: a review of etiology and treatment. J Cardiovasc Nurs 2007; 22(1): 65-73; quiz 74-5.

Kabaeva ZT, Perrot A, Wolter B, Dietz R, Cardim N, Correia JM, Schulte HD, Aldashev AA, Mirrakhimov MM and Osterziel KJ. Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy. Eur J Hum Genet 2002; 10(11): 741-8.

Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T and Sasazuki T. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. Nat Genet 1997; 16(4): 379-82.

Kittleson MD, Pion PD and DeLellis LA. Increased serum growth hormone concentration in feline hypertrophic cardiomyopathy. J Vet Intern Med 1992; 6(320).

Kittleson MD, Kittleson JA and Mekhamer Y. Development and progression of inhereted cardiomyopathy in Maine Coon cats [ACVIM abstract]. J Vet Intern Med 1996; 10(165.

Kittleson MD, Meurs KM and Towbin JA. Familial systolic anterior motion of the mitral valve and /or hypertrophic cardiomyopathy is apperently inherited as an autosomal dominant trait in a family of American Shorthair cats. J Vet Intern Med 1997; 11(138).

Kittleson MD. Echocardiography.In: Small Animal Cardiovascular Medicine. M. D. Kittleson and R. D. Kienle. St. Louis, Mosby, Inc.1998a**:** 95-117.

Kittleson MD. Hypertrophic Cardiomyopathy.In: Small Animal Cardivascular Medicine. M. D. Kittleson and R. D. Kienle. St. Louis, Mosby, Inc.1998b**:** 347-362.

Kittleson MD, Meurs KM, Munro MJ, Kittleson JA, Liu SK, Pion PD and Towbin JA. Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease. Circulation 1999; 99(24): 3172-80.

Kittleson MD. Feline myocardial disease.In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. E. J. Ettinger and E. C. Feldman. St. Louis, Elsevier.2005**:** 1082-1103.

Kobashi A, Suwa M, Ito T, Otake Y, Hirota Y and Kawamura K. Solitary papillary muscle hypertrophy as a possible form of hypertrophic cardiomyopathy. Jpn Circ J 1998; 62(11): 811-6.

Koffas H, Dukes-McEwan J, Corcoran BM, Moran CM, French A, Sboros V, Simpson K and McDicken WN. Pulsed tissue Doppler imaging in normal cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy. J Vet Intern Med 2006; 20(1): 65-77.

Konno T, Shimizu M, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Mabuchi T, Sakata K, Kaneda T, Fujita T, Masuta E and Mabuchi H. A novel mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene is responsible for hypertrophic cardiomyopathy with severe ventricular hypertrophy and sudden death. Clin Sci (Lond) 2006; 110(1): 125-31.

Koteliansky VE, Ogryzko EP, Zhidkova NI, Weller PA, Critchley DR, Vancompernolle K, Vandekerckhove J, Strasser P, Way M, Gimona M and et al. An additional exon in the human vinculin gene specifically encodes meta-vinculin-specific difference peptide. Cross-species comparison reveals variable and conserved motifs in the meta-vinculin insert. Eur J Biochem 1992; 205(3): 1218.

Kräußlich H and Brem G. Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre für Tiermediziener. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1997.

Kubo T, Kitaoka H, Okawa M, Matsumura Y, Hitomi N, Yamasaki N, Furuno T, Takata J, Nishinaga M, Kimura A and Doi YL. Lifelong left ventricular

remodeling of hypertrophic cardiomyopathy caused by a founder frameshift deletion mutation in the cardiac Myosin-binding protein C gene among Japanese. J Am Coll Cardiol 2005; 46(9): 1737-43.

Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkila H and White PC. Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. Circulation 1998; 97(6): 569-75.

Laboklin. "Gentest zum Nachweis der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) bei Maine Coon-Katzen." LABOKLIN GmbH & Co.KG, 2007, Abruf: 06.07.2007, Homepage: http://www.laboklin.de/frame.php?lang=de&PHPSESSID=7baa488c0f26b93876f1f96bfe8e5fb0.

Lacoste-Collin L, Garcia V, Uro-Coste E, Arne-Bes MC, Durand D, Levade T and Delisle MB. Danon's disease (X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy): a case with a novel Lamp-2 gene mutation. Neuromuscul Disord 2002; 12(9): 882-5.

Lai ZY, Shih CM, Chang NC and Wang TC. Clinical and morphologic features of hypertrophic cardiomyopathy in elderly patients 85 years or older[abstract]. Jpn Heart J 1999; 40(2): 155-64.

Landstrom AP, Weisleder N, Batalden KB, Bos JM, Tester DJ, Ommen SR, Wehrens XH, Claycomb WC, Ko JK, Hwang M, Pan Z, Ma J and Ackerman MJ. Mutations in JPH2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. J Mol Cell Cardiol 2007; 42(6): 1026-35.

Lankford EB, Epstein ND, Fananapazir L and Sweeney HL. Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1995; 95(3): 1409-14.

Ledford H. "Tests for heart-disease risk could be misleading. ." news@nature.com, 2007, Abruf: 12.04.2007, Homepage: http://www.nature.com/news/2007/070410/full/news070409-4.html.

Lev D, Nissenkorn A, Leshinsky-Silver E, Sadeh M, Zeharia A, Garty BZ, Blieden L, Barash V and Lerman-Sagie T. Clinical presentations of mitochondrial cardiomyopathies. Pediatr Cardiol 2004; 25(5): 443-50.

Li RK, Li G, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Luss H, Rao V, Christakis GT and Williams WG. Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 1997; 96(3): 874-81.

Liberthson RR. Sudden death from cardiac causes in children and young adults. N Engl J Med 1996; 334(16): 1039-44.

Lijnen P and Petrov V. Antagonism of the renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1999; 21(5): 363-74.

Limongelli G, Hawkes L, Calabro R, McKenna WJ and Syrris P. Mutation screening of the PTPN11 gene in hypertrophic cardiomyopathy. Eur J Med Genet 2006; 49(5): 426-30.

Lindpaintner K, Lee M, Larson MG, Rao VS, Pfeffer MA, Ordovas JM, Schaefer EJ, Wilson AF, Wilson PW, Vasan RS, Myers RH and Levy D. Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. N Engl J Med 1996; 334(16): 1023-8.

Litovsky SH and Rose AG. Clinicopathologic heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy with regard to age, asymmetric septal hypertrophy, and concentric hypertrophy beyond the pediatric age group. Arch Pathol Lab Med 1998; 122(5): 434-41.

Liu SK, Maron BJ and Tilley LP. Feline hypertrophic cardiomyopathy: gross anatomic and quantitative histologic features. Am J Pathol 1981; 102(3): 388-95[Abstract].

Liu SK, Roberts WC and Maron BJ. Comparison of morphologic findings in spontaneously occurring hypertrophic cardiomyopathy in humans, cats and dogs. Am J Cardiol 1993; 72(12): 944-51.

Livak KJ, Marmaro J and Todd JA. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. Nat Genet 1995; 9(4): 341-2.

Lutucuta S, Tsybouleva N, Ishiyama M, Defreitas G, Wei L, Carabello B and Marian AJ. Induction and reversal of cardiac phenotype of human hypertrophic cardiomyopathy mutation cardiac troponin T-Q92 in switch on-switch off bigenic mice. J Am Coll Cardiol 2004; 44(11): 2221-30.

Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, Lipinski MJ, Young AE, Roe BA, Qin B and Grahn RA. Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1. J Am Soc Nephrol 2004; 15(10): 2548-55.

Lyons LA, Foe IT, Rah HC and Grahn RA. Chocolate coated cats: TYRP1 mutations for brown color in domestic cats. Mamm Genome 2005; 16(5): 356-66.

MacDonald KA, Kittleson MD, Reed T, Larson R, Kass P and Wisner ER. Quantification of left ventricular mass using cardiac magnetic resonance imaging compared with echocardiography in domestic cats. Vet Radiol Ultrasound 2005a; 46(3): 192-9.

MacDonald KA, Wisner ER, Larson RF, Klose T, Kass PH and Kittleson MD. Comparison of myocardial contrast enhancement via cardiac magnetic resonance imaging in healthy cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy. Am J Vet Res 2005b; 66(11): 1891-4.

MacDonald KA, Kittleson MD, Garcia-Nolen T, Larson RF and Wisner ER. Tissue Doppler imaging and gradient echo cardiac magnetic resonance imaging in normal cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy. J Vet Intern Med 2006a; 20(3): 627-34.

MacDonald KA, Kittleson MD, Larson RF, Kass P, Klose T and Wisner ER. The effect of ramipril on left ventricular mass, myocardial fibrosis, diastolic function, and plasma neurohormones in Maine Coon cats with familial hypertrophic cardiomyopathy without heart failure. J Vet Intern Med 2006b; 20(5): 1093-105.

MacDonald KA, Kittleson MD, Kass PH and Meurs KM. Tissue Doppler imaging in Maine Coon cats with a mutation of myosin binding protein C with or without hypertrophy. J Vet Intern Med 2007; 21(2): 232-7.

Magnon AL, Meurs KM, Kittleson MD and Ware WA. A highly polymorphic marker identified in intron 15 of the feline cardiac troponin T gene by SSCP analysis. Anim Genet 2000a; 31(3): 236-7.

Magnon AL, Meurs KM, Kittleson MD and Ware WA. Single nucleotide polymorphisms in intron 5 of the feline myosin regulatory light chain gene detected by SSCP analysis. Anim Genet 2000b; 31(4): 281-2.

Maisch B. Classification of cardiomyopathies according to WHO/ISFC Taskforce--more questions than answers? Med Klin (Munich) 1998; 93(4): 199-209.

Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G and Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. Lancet 1993; 342(8879): 1085-6.

Marian AJ, Mares A, Jr., Kelly DP, Yu QT, Abchee AB, Hill R and Roberts R. Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. Variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. Eur Heart J 1995a; 16(3): 368-76.

Marian AJ and Roberts R. Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 1995; 92(5): 1336-47.

Marian AJ, Yu QT, Mann DL, Graham FL and Roberts R. Expression of a mutation causing hypertrophic cardiomyopathy disrupts sarcomere assembly in adult feline cardiac myocytes. Circ Res 1995b; 77(1): 98-106.

Marian AJ, Wu Y, Lim DS, McCluggage M, Youker K, Yu QT, Brugada R, DeMayo F, Quinones M and Roberts R. A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1999; 104(12): 1683-92.

Marian AJ. Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. Lancet 2000; 355(9197): 58-60.

Marian AJ and Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 2001; 33(4): 655-70.

Marian AJ, Salek L and Lutucuta S. Molecular genetics and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy[Abstract]. Minerva Med 2001; 92(6): 435-51.

Marian AJ. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. Curr Opin Cardiol 2002; 17(3): 242-52.

Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Filiano JJ and Perez-Atayde A. Cardiac mitochondrial dysfunction and DNA depletion in children with hypertrophic cardiomyopathy. J Inherit Metab Dis 1997; 20(5): 674-80.

Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ and Pierpont ME. Biochemical and molecular basis for mitochondrial cardiomyopathy in neonates and children. J Inherit Metab Dis 2000; 23(6): 625-33.

Maron BJ, Henry WL, Roberts WC and Epstein SE. Comparison of echocardiographic and necropsy measurements of ventricular wall thicknesses in patients with and without disproportionate septal thickening. Circulation 1977; 55(2): 341-6.

Maron BJ and Roberts WC. Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 1979; 59(4): 689-706.

Maron BJ, Sato N, Roberts WC, Edwards JE and Chandra RS. Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum. Comparison of fetuses and infants with and without congenital heart disease and patients with hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 1979; 60(3): 685-96.

Maron BJ and Epstein SE. Hypertrophic cardiomyopathy. Recent observations regarding the specificity of three hallmarks of the disease: asymmetric septal hypertrophy, septal disorganization and systolic anterior motion of the anterior mitral leaflet. Am J Cardiol 1980; 45(1): 141-54.

Maron BJ, Anan TJ and Roberts WC. Quantitative analysis of the distribution of cardiac muscle cell disorganization in the left ventricular wall of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 1981a; 63(4): 882-94.

Maron BJ, Gottdiener JS and Epstein SE. Patterns and significance of distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. A wide angle, two dimensional echocardiographic study of 125 patients. Am J Cardiol 1981b; 48(3): 418-28.

Maron BJ and Roberts WC. Hypertrophic cardiomyopathy and cardiac muscle cell disorganization revisited: relation between the two and significance. Am Heart J 1981; 102(1): 95-110.

Maron BJ, Spirito P, Wesley Y and Arce J. Development and progression of left ventricular hypertrophy in children with hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med 1986a; 315(10): 610-4.

Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE and Roberts WC. Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1986b; 8(3): 545-57.

Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE and Roberts WC. Morphologic evidence for "small vessel disease" in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Z Kardiol 1987; 76 Suppl 3(91-100.

Maron BJ, Wolfson JK and Roberts WC. Relation between extent of cardiac muscle cell disorganization and left ventricular wall thickness in hypertrophic cardiomyopathy. Am J Cardiol 1992; 70(7): 785-90.

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT and Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. Circulation 1995; 92(4): 785-9.

Maron BJ, Hauser RG and Roberts WC. Hypertrophic cardiomyopathy with left ventricular apical diverticulum. Am J Cardiol 1996a; 77(14): 1263-5.

Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC and Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. Jama 1996b; 276(3): 199-204.

Maron BJ and Spirito P. Implications of left ventricular remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. Am J Cardiol 1998; 81(11): 1339-44.

Maron BJ, Niimura H, Casey SA, Soper MK, Wright GB, Seidman JG and Seidman CE. Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. J Am Coll Cardiol 2001; 38(2): 315-21.

Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. Jama 2002; 287(10): 1308-20.

Maron BJ. Sudden death in young athletes. N Engl J Med 2003; 349(11): 1064-75.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE and Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. Circulation 2006; 113(14): 1807-16.

Matsushita Y, Furukawa T, Kasanuki H, Nishibatake M, Kurihara Y, Ikeda A, Kamatani N, Takeshima H and Matsuoka R. Mutation of junctophilin type 2 associated with hypertrophic cardiomyopathy. J Hum Genet 2007.

Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR and Pedrazzini T. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. Hypertension 1998; 31(6): 1324-30.

McConnell BK, Fatkin D, Semsarian C, Jones KA, Georgakopoulos D, Maguire CT, Healey MJ, Mudd JO, Moskowitz IP, Conner DA, Giewat M, Wakimoto H, Berul CI, Schoen FJ, Kass DA, Seidman CE and Seidman JG. Comparison of two murine models of familial hypertrophic cardiomyopathy. Circ Res 2001; 88(4): 383-9.

McCrohon JA, Moon JC, Prasad SK, McKenna WJ, Lorenz CH, Coats AJ and Pennell DJ. Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. Circulation 2003; 108(1): 54-9.

Medin M, Hermida-Prieto M, Monserrat L, Laredo R, Rodriguez-Rey JC, Fernandez X and Castro-Beiras A. Mutational screening of phospholamban gene in hypertrophic and idiopathic dilated cardiomyopathy and functional study of the PLN -42 C>G mutation. Eur J Heart Fail 2007; 9(1): 37-43.

Meurs K. "Update from Kathyrn M. Meurs, DVM, PhD, Professor." MCBFA, 2007, Abruf: 15.09.2007, Homepage: http://www.mcbfa.org/testingservice.html.

Meurs KM, Kittleson M, Spangler E, Ware WA, Womack JE and Towbin JA. Nine polymorphisms within the head and hinge region of the feline cardiac beta-myosin heavy chain gene. Anim Genet 2000; 31(3): 231.

Meurs KM, Sanchez X, David RM, Bowles NE, Towbin JA, Reiser PJ, Kittleson JA, Munro MJ, Dryburgh K, Macdonald KA and Kittleson MD. A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. Hum Mol Genet 2005; 14(23): 3587-93.

Meurs KM, Norgard MM, Ederer MM, Hendrix KP and Kittleson MD. A substitution mutation in the myosin binding protein C gene in ragdoll hypertrophic cardiomyopathy. Genomics 2007; 90(2): 261-4.

Michels M, Hoedemaekers YM, Kofflard MJ, Frohn-Mulder I, Dooijes D, Majoor-Krakauer D and Ten Cate FJ. Familial screening and genetic counselling in hypertrophic cardiomyopathy: the Rotterdam experience. Neth Heart J 2007; 15(5): 184-90.

Minamisawa S, Sato Y, Tatsuguchi Y, Fujino T, Imamura S, Uetsuka Y, Nakazawa M and Matsuoka R. Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2003; 304(1): 1-4.

Minamisawa S, Oshikawa J, Takeshima H, Hoshijima M, Wang Y, Chien KR, Ishikawa Y and Matsuoka R. Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. Biochem Biophys Res Commun 2004; 325(3): 852-6.

Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baandrup U and Borglum AD. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1999; 103(10): R39-43.

Mogensen J, Murphy RT, Kubo T, Bahl A, Moon JC, Klausen IC, Elliott PM and McKenna WJ. Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2004; 44(12): 2315-25.

Moise S. Thromboembolism in the Cat. 30th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Mexico City, Mexico, 2005.

Moiseyeva EP, Weller PA, Zhidkova NI, Corben EB, Patel B, Jasinska I, Koteliansky VE and Critchley DR. Organization of the human gene encoding the cytoskeletal protein vinculin and the sequence of the vinculin promoter. J Biol Chem 1993; 268(6): 4318-25.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR and Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. Cell 1998; 93(2): 215-28.

Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA and Watkins H. Sudden death due to troponin T mutations. J Am Coll Cardiol 1997; 29(3): 549-55.

Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP and Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. Jama 2007; 297(14): 1551-61.

Morita H, Larson MG, Barr SC, Vasan RS, O'Donnell CJ, Hirschhorn JN, Levy D, Corey D, Seidman CE, Seidman JG and Benjamin EJ. Single-gene mutations and increased left ventricular wall thickness in the community: the Framingham Heart Study. Circulation 2006; 113(23): 2697-705.

Movsowitz HD, Movsowitz C, Jacobs LE and Kotler MN. Pitfalls in the echo-Doppler diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. Echocardiography 1993; 10(2): 167-79.

Muthuchamy M, Pieples K, Rethinasamy P, Hoit B, Grupp IL, Boivin GP, Wolska B, Evans C, Solaro RJ and Wieczorek DF. Mouse model of a familial hypertrophic cardiomyopathy mutation in alpha-tropomyosin manifests cardiac dysfunction. Circ Res 1999; 85(1): 47-56.

Nagueh SF, McFalls J, Meyer D, Hill R, Zoghbi WA, Tam JW, Quinones MA, Roberts R and Marian AJ. Tissue Doppler imaging predicts the development of hypertrophic cardiomyopathy in subjects with subclinical disease. Circulation 2003; 108(4): 395-8.

Nakagawa K, Takemura N, Machida N, Kawamura M, Amasaki H and Hirose H. Hypertrophic cardiomyopathy in a mixed breed cat family. J Vet Med Sci 2002; 64(7): 619-21.

Nakata M and Koga Y. Definition and classification of cardiomyopathies and specific cardiomyopathies. Nippon Rinsho. 2000; 58(1): 7-11.

Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, Frustaci A and Lanfranchi G. Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2003; 309(2): 391-8.

Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG and Seidman CE. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med 1998; 338(18): 1248-57.

Nishi M, Mizushima A, Nakagawara K and Takeshima H. Characterization of human junctophilin subtype genes. Biochem Biophys Res Commun 2000; 273(3): 920-7.

Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, Sue CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S, Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S and Hirano M. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). Nature 2000; 406(6798): 906-10.

Nyberg MT, Koch J and Christiansen M. Intra-allelic Genetic Heterogenity of Hypertrophic Cardiomyopathy in the Maine Coon Cat. HGM2007 [Poster Abstract], 2007.

Oakley CE, Hambly BD, Curmi PM and Brown LJ. Myosin binding protein C: structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. Cell Res 2004; 14(2): 95-110.

Oh JK, Hatle L, Tajik AJ and Little WC. Diastolic heart failure can be diagnosed by comprehensive two-dimensional and Doppler echocardiography. J Am Coll Cardiol 2006; 47(3): 500-6.

Oliveira SM, Ehtisham J, Redwood CS, Ostman-Smith I, Blair EM and Watkins H. Mutation analysis of AMP-activated protein kinase subunits in inherited cardiomyopathies: implications for kinase function and disease pathogenesis. J Mol Cell Cardiol 2003; 35(10): 1251-5.

Olson EN and Molkentin JD. Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition: hope or hype? Circ Res 1999; 84(6): 623-32.

Olson TM, Doan TP, Kishimoto NY, Whitby FG, Ackerman MJ and Fananapazir L. Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 2000; 32(9): 1687-94.

Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schroder D, Klues HG, Hanrath P and McKenna WJ. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. Heart 2002; 87(3): 270-5.

Osio A, Tan L, Chen SN, Lombardi R, Nagueh SF, Shete S, Roberts R, Willerson JT and Marian AJ. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. Circ Res 2007; 100(6): 766-8.

Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA and Danser AH. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. Hypertension 1998; 32(5): 825-30.

Palmes PP, Masuyama T, Yamamoto K, Kondo H, Sakata Y, Takiuchi S, Kuzuya T and Hori M. High-frame-rate tissue harmonic imaging enhances anatomic M-

mode sections of the left ventricle in short-axis view. J Am Soc Echocardiogr 2000; 13(8): 738-47.

Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR and Ackerman MJ. Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. Eur Heart J 2005; 26(22): 2457-62.

Peterson EN, Moise NS, Brown CA, Erb HN and Slater MR. Heterogeneity of hypertrophy in feline hypertrophic heart disease. J Vet Intern Med 1993; 7(3): 183-9.

Peterson ME, Taylor RS and Greco DS. Acromegaly in 14 cats. J Vet Intern Med 1990; 4(192.

Pfeufer A, Osterziel KJ, Urata H, Borck G, Schuster H, Wienker T, Dietz R and Luft FC. Angiotensin-converting enzyme and heart chymase gene polymorphisms in hypertrophic cardiomyopathy. Am J Cardiol 1996; 78(3): 362-4.

Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master SR, Chang A, Dalakas MC, Rayment I, Sellers JR, Fananapazir L and Epstein ND. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. Nat Genet 1996; 13(1): 63-9.

Pomerance A and Davies MJ. Pathological features of hypertrophic obstructive cardiomyopathy (HOCM) in the elderly. Br Heart J 1975; 37(3): 305-12.

Pontius JU, Mullikin JC, Smith DR, Team AS, Lindblad-Toh K, Gnerre S, Clamp M, Chang J, Stephens R, Murphy WJ, Giger U, Roca AL, Antunes A, Menotti-Raymond M, Yuhki N, Pecon-Slattery J, Johnson WE, Bourque G, Tesler G, Program NCS and O'Brien SJ. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. Genome Res 2007; 17(1675-1689.

Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA and Guicheney P. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circ Res 2002; 91(8): e21-6.

Prabhakar R, Petrashevskaya N, Schwartz A, Aronow B, Boivin GP, Molkentin JD and Wieczorek DF. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by a alpha-tropomyosin mutation. Mol Cell Biochem 2003; 251(1-2): 33-42.

Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V and Danieli GA. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation 2001; 103(2): 196-200.

Qiagen. Taq PCR Handbook. 2002.

Qiagen. QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook. 2003.

Qiagen. MinElute Handbook. Hilden, 2006.

Rajiv C, Vinereanu D and Fraser AG. Tissue Doppler imaging for the evaluation of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Curr Opin Cardiol 2004; 19(5): 430-6.

Ramensky V, Bork P and Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. Nucleic Acids Res 2002; 30(17): 3894-900.

Rayment I, Holden HM, Sellers JR, Fananapazir L and Epstein ND. Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(9): 3864-8.

Redwood CS, Moolman-Smook JC and Watkins H. Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy. Cardiovasc Res 1999; 44(1): 20-36.

Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B and Komajda M. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. Circulation 2003; 107(17): 2227-32.

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connel J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfas I, Martin I and Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. Circulation 1996; 93(5): 841-2.

Riesen SC, Kovacevic A, Lombard CW and Amberger C. Echocardiographic screening of purebred cats: an overview from 2002 to 2005. Schweiz Arch Tierheilkd 2007a; 149(2): 73-6.

Riesen SC, Kovacevic A, Lombard CW and Amberger C. Prevalence of heart disease in symptomatic cats: an overview from 1998 to 2005. Schweiz Arch Tierheilkd 2007b; 149(2): 65-71.

Rose AG. Evaluation of pathological criteria for diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. Histopathology 1984; 8(3): 395-406.

Rottbauer W, Baker K, Wo ZG, Mohideen MA, Cantiello HF and Fishman MC. Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel alpha1 subunit. Dev Cell 2001; 1(2): 265-75.

Rush JE, Freeman LM, Fenollosa NK and Brown DJ. Population and survival characteristics of cats with hypertrophic cardiomyopathy: 260 cases (1990-1999). J Am Vet Med Assoc 2002; 220(2): 202-7.

Sakamoto T, Tei C, Murayama M, Ichiyasu H and Hada Y. Giant T wave inversion as a manifestation of asymmetrical apical hypertrophy (AAH) of the left ventricle. Echocardiographic and ultrasono-cardiotomographic study. Jpn Heart J 1976; 17(5): 611-29.

Sakamoto T. Apical hypertrophic cardiomyopathy (apical hypertrophy): an overview. J Cardiol 2001; 37 Suppl 1(161-78.

Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D and Hardie DG. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. Biochem J 1998; 334 (Pt 1)(177-87.

Sarkar R, Schiller S, Killich M, Hartmann K and Wess G. Evaluation der diastolischen Myokardfunktion bei Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie mittels Gewebedoppler, [Abstract]. 15. Jahrestagung der Fachgruppe „Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik“ der DVG, München, 2007.

Sasson Z, Rakowski H, Wigle ED and Popp R. Echocardiographic and Doppler studies in hypertrophic cardiomyopathy. Cardiol Clin 1990; 8(2): 217-32.

Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F and Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. Biochem Biophys Res Commun 1999; 262(2): 411-7.

Schiller S. Farbgewebedoppler bei der herzgesunden Katze: Einfluss von Auswertungsprogrammen, Software- und Aufnahmeeinstellungen auf die Gewebegeschwindigkeit, Strain und Strain Rate. Diss med vet, München, 2007.

Schmidt-Kuntzel A, Eizirik E, O'Brien SJ and Menotti-Raymond M. Tyrosinase and tyrosinase related protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci. J Hered 2005; 96(4): 289-301.

Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH and Riegger GA. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. N Engl J Med 1994; 330(23): 1634-8.

Schwaller B. "Muskelapparat." Departement de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg, Pérolles, CH-1705 Fribourg, Suisse, 2005, Abruf: 16.05.2007, Homepage: www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/muskel/aufbau/d-aufbau.php.

Seiler C, Jenni R, Vassalli G, Turina M and Hess OM. Left ventricular chamber dilatation in hypertrophic cardiomyopathy: related variables and prognosis in patients with medical and surgical therapy. Br Heart J 1995; 74(5): 508-16.

Shah PM, Taylor RD and Wong M. Abnormal mitral valve coaptation in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: proposed role in systolic anterior motion of mitral valve. Am J Cardiol 1981; 48(2): 258-62.

Shapiro LM and McKenna WJ. Distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a two-dimensional echocardiographic study. J Am Coll Cardiol 1983; 2(3): 437-44.

Sherrid MV, Gunsburg DZ, Moldenhauer S and Pearle G. Systolic anterior motion begins at low left ventricular outflow tract velocity in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2000; 36(4): 1344-54.

Shimizu Y, Uematsu M, Shimizu H, Nakamura K, Yamagishi M and Miyatake K. Peak negative myocardial velocity gradient in early diastole as a noninvasive indicator of left ventricular diastolic function: comparison with transmitral flow velocity indices. J Am Coll Cardiol 1998; 32(5): 1418-25.

Shirani J, Pick R, Roberts WC and Maron BJ. Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. J Am Coll Cardiol 2000; 35(1): 36-44.

Sohn DW, Chai IH, Lee DJ, Kim HC, Kim HS, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS, Seo JD and Lee YW. Assessment of mitral annulus velocity by Doppler tissue imaging in the evaluation of left ventricular diastolic function. J Am Coll Cardiol 1997; 30(2): 474-80.

Song L, DePalma SR, Kharlap M, Zenovich AG, Cirino A, Mitchell R, McDonough B, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG and Ho CY. Novel locus for an inherited cardiomyopathy maps to chromosome 7. Circulation 2006; 113(18): 2186-92.

Spindler M, Saupe KW, Christe ME, Sweeney HL, Seidman CE, Seidman JG and Ingwall JS. Diastolic dysfunction and altered energetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1998; 101(8): 1775-83.

Spirito P and Maron BJ. Significance of left ventricular outflow tract cross-sectional area in hypertrophic cardiomyopathy: a two-dimensional echocardiographic assessment. Circulation 1983; 67(5): 1100-8.

Squire JM, Luther PK and Knupp C. Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain. J Mol Biol 2003; 331(3): 713-24.

St John Sutton MG, Lie JT, Anderson KR, O'Brien PC and Frye RL. Histopathological specificity of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. Myocardial fibre disarray and myocardial fibrosis. Br Heart J 1980; 44(4): 433-43.

Strotmann JM, Escobar Kvitting JP, Wilkenshoff UM, Wranne B, Hatle L and Sutherland GR. Anatomic M-mode echocardiography: A new approach to assess regional myocardial function--A comparative in vivo and in vitro study of both fundamental and second harmonic imaging modes. J Am Soc Echocardiogr 1999; 12(5): 300-7.

Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Oh SJ, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Colomer J, Iturriaga C, Meloni A, Lamperti C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Nonaka I, Hirano M and Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. Neurology 2002; 58(12): 1773-8.

Sutherland GR, Di Salvo G, Claus P, D'Hooge J and Bijnens B. Strain and strain rate imaging: a new clinical approach to quantifying regional myocardial function. J Am Soc Echocardiogr 2004; 17(7): 788-802.

Sweeney HL, Straceski AJ, Leinwand LA, Tikunov BA and Faust L. Heterologous expression of a cardiomyopathic myosin that is defective in its actin interaction. J Biol Chem 1994; 269(3): 1603-5.

Tajik AJ, Seward JB, Hagler DJ, Mair DD and Lie JT. Two-dimensional real-time ultrasonic imaging of the heart and great vessels. Technique, image orientation, structure identification, and validation. Mayo Clin Proc 1978; 53(5): 271-303.

Takemura G, Takatsu Y and Fujiwara H. Luminal narrowing of coronary capillaries in human hypertrophic hearts: an ultrastructural morphometrical study using endomyocardial biopsy specimens. Heart 1998; 79(1): 78-85.

Takeshima H, Komazaki S, Nishi M, Iino M and Kangawa K. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. Mol Cell 2000; 6(1): 11-22.

Tam JW, Shaikh N and Sutherland E. Echocardiographic assessment of patients with hypertrophic and restrictive cardiomyopathy: imaging and echocardiography. Curr Opin Cardiol 2002; 17(5): 470-7.

Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Hamashima Y and Kawai C. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. Br Heart J 1986; 55(6): 575-81.

Tardiff JC, Factor SM, Tompkins BD, Hewett TE, Palmer BM, Moore RL, Schwartz S, Robbins J and Leinwand LA. A truncated cardiac troponin T molecule in transgenic mice suggests multiple cellular mechanisms for familial hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1998; 101(12): 2800-11.

Taugner FM. Stimulation of the renin-angiotensin system in cats with hypertrophic cardiomyopathy. J Comp Pathol 2001; 125(2-3): 122-9.

Tesson F, Richard P, Charron P, Mathieu B, Cruaud C, Carrier L, Dubourg O, Lautie N, Desnos M, Millaire A, Isnard R, Hagege AA, Bouhour JB, Bennaceur M, Hainque B, Guicheney P, Schwartz K and Komajda M. Genotype-phenotype analysis in four families with mutations in beta-myosin heavy chain gene responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. Hum Mutat 1998; 12(6): 385-92.

Theis JL, Bos JM, Bartleson VB, Will ML, Binder J, Vatta M, Towbin JA, Gersh BJ, Ommen SR and Ackerman MJ. Echocardiographic-determined septal morphology in Z-disc hypertrophic cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2006; 351(4): 896-902.

Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JG and Seidman CE. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. Cell 1994; 77(5): 701-12.

Tilley LP, Liu SK, Gilbertson SR, Wagner BM and Lord PF. Primary myocardial disease in the cat. A model for human cardiomyopathy. Am J Pathol 1977; 86(3): 493-522.

Tobias R. Aktuelles zur HKM-Diagnostik und Therapie unter besonderer Berücksichtigung der Maine Coon. 53. Jahreskongress der DGK-DVG, Berlin, 2007.

Tsoutsman T, Chung J, Doolan A, Nguyen L, Williams IA, Tu E, Lam L, Bailey CG, Rasko JE, Allen DG and Semsarian C. Molecular insights from a novel cardiac troponin I mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 2006a; 41(4): 623-32.

Tsoutsman T, Lam L and Semsarian C. Genes, calcium and modifying factors in hypertrophic cardiomyopathy. Clin Exp Pharmacol Physiol 2006b; 33(1-2): 139-45.

UniProt. "Uni Prot the universal protein resource." European Bioinformatics Institute, 2007, Abruf: 23.06.2007, Homepage: http://www.ebi.uniprot.org.

Unverferth DV, Baker PB, Pearce LI, Lautman J and Roberts WC. Regional myocyte hypertrophy and increased interstitial myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. Am J Cardiol 1987; 59(9): 932-6.

van der Bel-Kahn J. Muscle fiber disarray in common heart diseases. Am J Cardiol 1977; 40(3): 355-64.

Van Driest SL, Gakh O, Ommen SR, Isaya G and Ackerman MJ. Molecular and functional characterization of a human frataxin mutation found in hypertrophic cardiomyopathy. Mol Genet Metab 2005; 85(4): 280-5.

van Geel PP, Pinto YM, Buikema H and van Gilst WH. Is the A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor involved in cardiovascular disease? Eur Heart J 1998; 19 Suppl G(G13-7.

Van Vleet JF, Ferrans VJ and Weirich WE. Pathologic alterations in hypertrophic and congestive cardiomyopathy of cats. Am J Vet Res 1980; 41(12): 2037-48.

Van Vleet JF and Ferrans VJ. Myocardial diseases of animals. Am J Pathol 1986; 124(1): 98-178.

Varghese A and Pennell DJ. Late gadolinium enhanced cardiovascular magnetic resonance in Becker muscular dystrophy. Heart 2004; 90(9): e59.

Vasile VC, Will ML, Ommen SR, Edwards WD, Olson TM and Ackerman MJ. Identification of a metavinculin missense mutation, R975W, associated with both hypertrophic and dilated cardiomyopathy. Mol Genet Metab 2006; 87(2): 169-74.

Vikstrom KL, Factor SM and Leinwand LA. Mice expressing mutant myosin heavy chains are a model for familial hypertrophic cardiomyopathy. Mol Med 1996; 2(5): 556-67.

Wagner T. Tissue-Doppler-Imaging (TDI): Erstellung von Referenzwerten für Tissue Velocity, Strain und Strain-Rate bei der Katze. Diss med vet, München, 2006.

Walker ED, Thibault AR, Thelen AP, Bullard BA, Huang J, Odiere MR, Bayoh NM, Wilkins EE and Vulule JM. Identification of field caught Anopheles gambiae s.s. and Anopheles arabiensis by TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping. Malar J 2007; 6(23.

Waller BF and Roberts WC. Cardiovascular disease in the very elderly. Analysis of 40 necropsy patients aged 90 years or over. Am J Cardiol 1983; 51(3): 403-21.

Waller BF. The old-age heart: normal aging changes which can produce or mimic cardiac disease. Clin Cardiol 1988; 11(8): 513-7.

Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE and Seidman JG. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med 1992; 326(17): 1108-14.

Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG and Seidman CE. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. Nat Genet 1995a; 11(4): 434-7.

Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman JG and et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med 1995b; 332(16): 1058-64.

Webb JG, Sasson Z, Rakowski H, Liu P and Wigle ED. Apical hypertrophic cardiomyopathy: clinical follow-up and diagnostic correlates. J Am Coll Cardiol 1990; 15(1): 83-90.

Wehrens XH and Marks AR. Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease. Trends Biochem Sci 2003; 28(12): 671-8.

WHO/ISFC. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. Br Heart J 1980; 44(6): 672-3.

Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA, Ruddy TD, Fulop J, Rakowski H and Williams WG. Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. Prog Cardiovasc Dis 1985; 28(1): 1-83.

Wigle ED. Cardiomyopathy: The diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. Heart 2001; 86(6): 709-14.

Witt CC, Gerull B, Davies MJ, Centner T, Linke WA and Thierfelder L. Hypercontractile properties of cardiac muscle fibers in a knock-in mouse model of cardiac myosin-binding protein-C. J Biol Chem 2001; 276(7): 5353-9.

WSU. " Frequently Asked Questions about the test for the Hypertrophic Cardiomyopathy Mutation." Washington State University, College of Veterinary

Medicine, Veterinary Cardiac Genetics Lab, 2007, Abruf: 19.10.2007, Homepage: http://www.vetmed.wsu.edu/deptsvcgl/FAQ.aspx.

Yang H, Sun JP, Lever HM, Popovic ZB, Drinko JK, Greenberg NL, Shiota T, Thomas JD and Garcia MJ. Use of strain imaging in detecting segmental dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. J Am Soc Echocardiogr 2003; 16(3): 233-9.

Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R and Robbins J. A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1998; 102(7): 1292-300.

Yang Q, Khoury MJ, Coughlin SS, Sun F and Flanders WD. On the use of population-based registries in the clinical validation of genetic tests for disease susceptibility. Genet Med 2000; 2(3): 186-92.

Young AE, Biller DS, Herrgesell EJ, Roberts HR and Lyons LA. Feline polycystic kidney disease is linked to the PKD1 region. Mamm Genome 2005; 16(1): 59-65.

Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Hatanaka K, Nagata S, Sakakibara H and Nimura Y. Three autopsy cases of progression to left ventricular dilatation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Am Heart J 1985; 109(3 Pt 1): 545-53.

Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen G, Elston RC and Ward R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. Am J Hum Genet 2001; 68(5): 1139-48.

XI. Lebenslauf

Persönliche Daten:	
Name:	Christel Gerlinde Schinner
Geburtstag:	06.10.1980 in Kemnath
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Dr. Wolfgang Maximilian Schinner, Tierarzt Ingeborg Barbara Schinner, Praxis- und Büroangestellte
Geschwister:	Bruder Matthias Michael Schinner, Student
Ausbildung:	
1987 – 1991	Grundschule Waldeck
1991 – 2000	Gymnasium Eschenbach
2000	Allgemeine Hochschulreife
2000 – 2002	Studium der Veterinärmedizin und Absolvierung des Vorphysikums und Physikums: Szent István-Universität in Budapest
2002 – 2005	Studium der Veterinärmedizin und Absolvierung des 1., 2. und 3. Staatsexamens: Freie Universität Berlin
30.12.2005	Approbation als Tierärztin
Seit 01.03. 2006	Doktorandin an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München, Abteilung für Tierkardiologie
2006 – 2007	Aushilfe im Wochenend- und Notdienst, Tierärztliche Klinik Gessertshausen: Notdienst im Kleintier-, Vogel-, und Reptilienbereich
Seit 01.01. 2008	Internship an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München
Sprachkenntnisse:	Deutsch, Englisch, Französisch, Latein

XII. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an

Frau Univ. Prof. Dr. Katrin Hartmann, meine Doktormutter, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen hat. Durch ihre Freundlichkeit, ihren Teamgeist, ihren Elan und Einsatz für die Klinik herrschte immer ein gutes Arbeitsklima, wie ich es bisher in keiner anderen Klinik erlebt habe.

meinen Betreuer **Dr. Gerhard Wess**, der diese Arbeit aus kardiologischer Sicht betreut und ins Leben gerufen hat. Mein beruflicher Werdegang wurde durch ihn maßgebend beeinflusst. Durch ihn habe ich meine Begeisterung für die Kardiologie und auch die Internistik für mich entdeckt. Durch zahlreiche Diskussionen hat er nicht nur meinen Horizont erweitert, sondern auch mein Selbstbewusstsein langfristig gestärkt. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Gleichzeitig möchte ich ihn nicht nur für das kollegiale sondern auch freundschaftliche Verhältnis danken.

Dr. Karin Weber, die als Retterin in der Not die genetische Betreuung im Labor übernahm und mir tatkräftig und beratend bis zum Schluss zur Seite stand.

Herrn Professor Dr. Küchenhoff und Frau **Monja Mahling** für die statistische Betreuung meiner Doktorarbeit.

meine lieben Eltern für die jahrelange seelische, freundschaftliche, finanzielle und fachliche Unterstützung, ohne die ich heute nicht das wäre was ich bin. Sie haben mich während der Dissertation immer wieder ermutigt und mir Stärke und Halt gegeben.

meinen Freund, **Basti**, der mich auch in stressigen Zeiten glücklich machte, der mir immer zuhörte, mich tröstete, mit mir diskutierte und zusammen mit mir lachte. Er hat mir das Gefühl gegeben, immer für mich da zu sein, wenn ich ihn brauchte.

Markus, den kleinen Kardiologie-General, der mich in die großen Geheimnisse der Kardiologie eingeweiht hat und der es nicht scheute, meinen fachlichen Horizont täglich zu erweitern. Ich danke ihm auch für die wunderbare Freundschaft, die kulinarischen Abende, die gemeinsamen Gesangsübungen und die weisen und philosophischen Tiefgänge.

Sarah, meine liebe Freundin, die mich zu jeder Tages- und Nachtzeit abgelenkt, aufgemuntert und mir in allen Lebenssituationen beigestanden hat. Sie hat mir in der Endphase der Dissertation oft zugehört und mich mit aufmunternden kleinen Geschenken versorgt.

meine **Lieblingskolleginnen Julia, Rotna** und **Bibi** für die Freundschaft und die tolle Zusammenarbeit im Kardiologie-Team. Sie teilten in den letzten eineinhalb Jahren Freude und Leid mit mir und gaben mir das Gefühl zusammen in einem Boot zu sitzen.

Sonja, Lisa, Ana und Verena, meine Vorgänger, Vorbilder und Lehrmeister.

Luna, die mir die ersten Herzultraschallkenntnisse ermöglichte, indem sie mir ihr Herz als Schall-Model mit größter Geduld zur Verfügung stellte.

Danke!