

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Privatdozent Dr. med. vet. Gerhard Wess

**Mikro-Ribonukleinsäuren-Expressionsprofile im Serum von
Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie**

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

von

Nadine Annette Rostert

aus Heidelberg

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

To anyone, who has ever been owned by a cat, it will come as no surprise, that there are all sort of things about your cat, you will never, as long as you live, forget.

(Cleveland Amory)

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	2
1	Die feline hypertrophe Kardiomyopathie	2
1.1	Definition und Klassifizierung	2
1.2	Epidemiologie	3
1.3	Ätiologie.....	3
1.4	Pathogenese.....	6
1.4.1	Makroskopische Pathologie	7
1.4.2	Pathohistologie	8
1.4.3	Pathophysiologie	9
1.5	Klinik.....	11
1.6	Diagnose.....	12
1.6.1	Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung.....	12
1.6.2	Radiographie und Elektrokardiographie	13
1.6.3	Echokardiographie	14
1.6.4	Biomarker.....	17
1.6.5	Differentialdiagnosen	20
1.7	Therapie.....	20
2	Mikro-Ribonukleinsäure	22
2.1	Biogenese	23
2.2	Wirkmechanismen.....	25
2.3	Die Rolle von Mikro-Ribonukleinsäure bei physiologischen und pathologischen Prozessen.....	26
2.3.1	Nicht-kardiale Erkrankungen	27
2.3.2	Kardiale Erkrankungen	27
2.3.2.1	Konzentrische Hypertrophie des Herzens	28
2.3.2.2	Kongestives Herzversagen	30
2.4	Mikro-Ribonukleinsäure in der Zirkulation	32
2.5	Methoden zum Nachweis von Mikro-Ribonukleinsäuren	34
2.6	Funktionsanalyse von Mikro-Ribonukleinsäuren	35
2.7	Mikro-Ribonukleinsäuren-basierte Therapie	36

III	MATERIAL UND METHODEN	38
1	Material	38
1.1	Patienten	38
1.1.1	Einschlusskriterien	38
1.1.2	Ausschlusskriterien	39
1.2	Geräte	39
1.3	Chemikalien	40
1.4	Kits	40
1.5	Primer	41
1.6	Verbrauchsmaterial	41
1.7	Software und Datenbanken	41
2	Methoden.....	42
2.1	Untersuchungen.....	42
2.1.1	Signalement und Anamnese	42
2.1.2	Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung.....	42
2.1.3	Echokardiographie	42
2.1.4	Radiographie und Elektrokardiographie	44
2.1.5	Ausschluss von Differentialdiagnosen und Bestimmung Nierenwerte.....	44
2.2	Mikro-Ribonukleinsäure	45
2.2.1	Blutprobennahme und Probenaufbereitung.....	45
2.2.2	Extraktion von Ribonukleinsäure.....	45
2.2.3	Microarray	47
2.2.4	Quantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion	49
2.3	Statistik.....	50
2.3.1	Microarray	50
2.3.2	Quantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion	51
IV	ERGEBNISSE	52
1	Patientencharakteristika	52
1.1	Gruppen für die Microarray-Analyse	52
1.2	Gruppen für die Mikro-Ribonukleinsäuren-Analyse mittels quantitativer Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion	57
2	Microarray-Analyse	59
3	Quantitative Reverse-Transkription-Polymerase-kettenreaktion.....	63

V	DISKUSSION	67
1	Population	67
2	Analyse der Mikro-Ribonukleinsäure-Expression im Serum.....	68
3	Limitationen und Ausblick.....	76
VI	ZUSAMMENFASSUNG	78
VII	SUMMARY.....	80
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	82
IX	ANHANG	130
X	DANKSAGUNG	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ac-pre-miRNA	<i>Ago2-cleaved precursor micro-ribonucleic acid</i>
Ao	Aorta
Argonaut 2	Ago2
ARVC	<i>Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy</i> , Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie,
ATE	Arterielle Thrombembolie
bkv	Humanes Polyoma Virus
BNP	<i>B-type natriuretic peptide</i> , B-Typ natriuretisches Peptid
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHF	<i>Congestive heart failure</i> , kongestives Herzversagen
CHIEF	<i>Canine Heart Failure International Expert Forum</i>
CP	<i>Crossing Point</i> , Schnittpunkt
Ct	<i>Cycle threshold</i> , Zyklusschwellenwert
cTnI	<i>Cardiac troponin I</i> , kardiales Troponin I
DCM	<i>Dilated cardiomyopathy</i> , dilatative Kardiomyopathie
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
ebv	Epstein-Barr-Virus
EKG	Elektrokardiogramm
FIV	Felines Immunschwächevirus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCL	Hierarchische Clusteranalyse
HCM	<i>Hypertrophic cardiomyopathy</i> , Hypertrophe Kardiomyopathie

HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HIV	Humanes Immunschwächevirus
hsa	<i>Homo sapiens</i>
HSV	Herpes-Simplex-Virus
ICM	<i>Ischemic cardiomyopathy</i> , ischämische Kardiomyopathie
IVRT	<i>Isovolumetric relaxation time</i> , isovolumetrische Relaxationszeit
IVS	Interventrikuläres Septum
JCV	Humanes Polyoma Virus 2
KSHV	Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
LA	Linkes Atrium
LVFW	Linksventrikuläre freie Wand
LVID	Linksventrikulärer Innendurchmesser
MHz	Megahertz
microRNA, miRNA	<i>Micro-ribonucleic acid</i> , Mikro-Ribonukleinsäure
miRISC	<i>Micro-ribonucleic acid-containing RNA-induced silencing complex</i>
MREs	<i>MiRNA recognition elements</i> , miRNA-Erkennungselemente
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MYBPC3	<i>Cardiac myosin binding protein C gene</i> , Gen des kardialen Myosin-bindenden Protein C
MYH7	<i>β-myosin heavy chain gene</i> , Gen der schweren Kette des β-Myosins
NT-proBNP	<i>N-terminal pro B-type natriuretic peptide</i> , N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid
NYHA	<i>New York Heart Association</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
piRNA	<i>Piwi-interacting ribonucleic acid</i> , PIWI-Protein interagierende Ribonukleinsäure
pre-miRNA	<i>Precursor micro-ribonucleic acid</i> , Vorläufer Mikro-Ribonukleinsäure
pri-miRNA	<i>Primary micro-ribonucleic acid</i> , Primärtranskript der Mikro-Ribonukleinsäure
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> , Quantitative Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> , Quantitative Reverse-Transkription Polymerasekettenreaktion
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLC	<i>RNA-induced silencing complex loading complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNA-I	<i>Ribonucleic acid interference</i> , Ribonukleinsäure-Interferenz
RT	Reverse Transkription
SAM	<i>Systolic anterior motion</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i> , kleine interferierende Ribonukleinsäure
TDI	<i>Tissue doppler imaging</i> , Gewebedoppler
TVI	<i>Tissue velocity index</i> , Gewebegeschwindigkeit
UCM	<i>Unclassified cardiomyopathy</i> , unklassifizierte Kardiomyopathie
UTR	<i>Untranslated region</i> , untranslatierter Bereich
VSN	Variance stabilization and calibration for microarray data

I EINLEITUNG

Die feline hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) stellt die häufigste Herzerkrankung der Katze dar (FERASIN et al., 2003; RIESEN et al., 2007a, 2007b). Diese Kardiomyopathie kann sich äußerst vielfältig präsentieren. Betroffene Tiere können klinisch gesund erscheinen, mit steigendem Schweregrad der Krankheit aber auch von Symptomen wie Dyspnoe, Synkopen, arteriellen Thrombembolien betroffen sein oder am Sekudentod sterben (RUSH et al., 2002; PAYNE et al., 2010). Eine sichere Diagnose ist daher unerlässlich, um eine optimale Therapie der erkrankten Tiere zu gewährleisten. Zudem wurde für bestimmte Rassen die Vererbung von HCM nachgewiesen und es wird eine Heredität für weitere Rassen vermutet (MEURS et al., 1997; KITTLESON et al., 1999; KITTLESON, 2012). Die Identifikation betroffener Katzen gehört daher auch zu einem verantwortungsvollen Zuchtmanagement. Methoden wie die klinische Untersuchung, Röntgen oder bisher eingesetzte Gentests besitzen nicht die ausreichende Sensitivität und Spezifität, um eine zuverlässige Diagnose in allen Stadien der Erkrankung sicherzustellen (PAYNE et al., 2010; WESS et al., 2010b; SCHOBER et al., 2013a). Die Echokardiographie erlaubt eine Beurteilung der Herzdimensionen sowie der diastolischen und systolischen Funktion (FOX et al., 1995; KOFFAS et al., 2006). Diese ist jedoch aufgrund der diffizilen Durchführung und Interpretation meist nur Spezialisten vorbehalten. Die Entwicklung einer sensitiven und spezifischen Methode, die sich durch eine einfache Durchführung auszeichnet und das Potenzial besitzt, pathologische Prozesse in einem frühen Stadium anzuzeigen, ist daher erstrebenswert. Mikro-Ribonukleinsäure (*micro-ribonucleic acid*, miRNA) weist sich durch eine oftmals pathologiespezifische Expression, eine hohe Stabilität in transzellulären Flüssigkeiten sowie eine Übertragbarkeit vom Tiermodell auf den Menschen aus (LU et al., 2005; IKEDA et al., 2007; CHEN et al., 2008; WEBER et al., 2010). Dies lässt miRNAs als mögliche Kandidaten für eine neue Generation von Biomarkern erscheinen (ETHERIDGE et al., 2011; AJIT, 2012).

Ziel der Studie war es, das miRNA-Muster im Serum von an HCM erkrankten Katzen zu bestimmen und zu evaluieren, ob eine Abweichung zu der miRNA-Signatur herzgesunder Katzen nachweisbar ist.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Die feline hypertrophe Kardiomyopathie

Die feline HCM zählt zu den primären myokardialen Erkrankungen und zeichnet sich durch eine milde bis hochgradige konzentrische Hypertrophie der Papillarmuskeln und Wände aus, die vorrangig den linken Ventrikel betrifft (KIENLE, 2008). Eine HCM kommt in ähnlicher Ausprägung spontan auftretend auch beim Mensch (LIU et al., 1993; MARON et al., 1995) oder Schwein vor (LIU et al., 1994). Selten ist diese Form von Kardiomyopathie auch bei Hunden zu finden (LIU et al., 1979; LIU et al., 1993).

1.1 Definition und Klassifizierung

Die *European Society of Cardiology* (2008) definiert Kardiomyopathie als „myokardiale Erkrankung mit einem strukturell und funktionell abnormen Herzmuskel, in Abwesenheit von Koronararterienerkrankung, Hypertension, Herzklappenerkrankung und kongenitaler Herzerkrankung, die eben jene beobachtete myokardiale Abnormität verursachen können“ (ELLIOTT et al., 2008). Kardiomyopathien werden anhand des spezifischen morphologischen und funktionellen Phänotyps in HCM, dilatative Kardiomyopathie (*dilated cardiomyopathy*, DCM), restriktive Kardiomyopathie (*restrictive cardiomyopathy*, RCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (*arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*, ARVC) und unklassifizierte Kardiomyopathie (*unclassified cardiomyopathy*, UCM) eingeteilt. Für jede dieser Herzerkrankungen erfolgt eine Subklassifizierung mit familiärer/genetischer oder nicht-familiärer/nicht-genetischer Ursache. Auf eine Unterscheidung von primären und sekundären Kardiomyopathien wird verzichtet (ELLIOTT et al., 2008).

Abweichend von der *European Society of Cardiology* definiert die *American Heart Association* (2006) primäre Kardiomyopathien als solche, die nur das Herz als Organ betreffen. Bei sekundären Kardiomyopathien sei das Herz nur ein betroffenes Organ einer generalisierten Erkrankung (MARON et al., 2006). Die Unterteilung der primären Kardiomyopathien erfolgt in genetisch, nicht-genetisch und erworben, wobei HCM zu den primären genetischen Kardiomyopathien

gezählt wird (MARON et al., 2006).

In der Veterinärliteratur erfolgt die Klassifizierung nach dem morphologischen Phänotyp. Zu den primären (idiopathischen) Kardiomyopathien zählen HCM, DCM, RCM, ARVC und UCM, wobei das Kriterium der letztgenannten ist, dass sie keine der anderen Kategorien zuzuordnen ist (KIENLE, 2008).

Gemäß der *American Heart Association* (2006) ist die „HCM charakterisiert durch einen hypertrophierten Ventrikel ohne systemische oder kardiale Krankheiten, die eine Wandverdickung verursachen können“ (MARON et al., 2006). Die Definition von primärer feliner HCM entspricht der humanmedizinischen (FOX, 1999; KIENLE, 2008). Sekundäre Kardiomyopathien können z. B. nutritive, metabolische oder inflammatorische Ursachen haben. An anderer Stelle der Literatur wird der Terminus „sekundäre Kardiomyopathie“, durch z. B. Hyperthyreose oder systemische Hypertension, als ungeeignet bezeichnet. Ein zutreffenderer Begriff sei vielmehr „konzentrische Hypertrophie sekundär durch Hyperthyreose“ (COTE et al., 2011).

1.2 Epidemiologie

Die HCM ist bei Katzen die häufigste primäre Kardiomyopathie und auch die häufigste Herzerkrankung überhaupt (FERASIN et al., 2003; RIESEN et al., 2007b; PAIGE et al., 2009; SMITH & DUKES-MCEWAN, 2012).

Bei klinisch inapparenten Katzen konnten für HCM durch echokardiographisches Screening Prävalenzen zwischen 8 % - 15 % ermittelt werden (RIESEN et al., 2007a; GUNDLER et al., 2008; PAIGE et al., 2009; GRANSTRÖM et al., 2011). Zumeist tritt HCM bei der Europäisch Kurzhaar (EKH) respektive der *domestic shorthair cat* auf, wobei bestimmte Rassekatzen, wie Maine Coon, Perser oder Sphynx überrepräsentiert sind (RUSH et al., 2002; FERASIN et al., 2003; RIESEN et al., 2007b, 2007a; TREHIU-SECHI et al., 2012).

In verschiedenen HCM-Katzenpopulationen sind erkrankte Tiere häufiger männlichen Geschlechts. Der Anteil männlicher Tieren variiert dabei zwischen 64 % - 79 % (RUSH et al., 2002; FERASIN et al., 2003; RIESEN et al., 2007b; PAYNE et al., 2010; TREHIU-SECHI et al., 2012).

1.3 Ätiologie

Die humane HCM lässt sich in den meisten Fällen auf eine Mutation mit

autosomal-dominanten Erbgang zurückführen (MARON et al., 1984b; SOLOMON et al., 1990). Dabei wird eine HCM größtenteils durch Mutationen der Gene verursacht, die für die kontraktilen Proteine der kardialen Sarkomere kodieren. Aktuell werden mehrere hundert Mutationen mit HCM assoziiert. In den meisten Fällen einer humanen HCM ist eine Mutation im Gen der schweren Kette des β -Myosins (*β -myosin heavy chain gene*, MYH7) oder im Gen des kardialen Myosin-bindenden Protein C (*cardiac myosin binding protein C gene*, MYBPC3) die Ursache (MARON et al., 2006; MARON et al., 2012). Die Mehrheit der Punktmutationen führt zu nicht-homologen Aminosäureänderungen im Protein (*missense*-Mutationen). Jedoch kann es auch durch Insertion oder Deletion einer Base zu Verschiebungen des Leserasters kommen, die zu verkürzten Proteinen oder abnormalem Spleißen von Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) führen (MARIAN & ROBERTS, 2001).

Bei der Katze wurde bisher eine familiäre HCM mit autosomal-dominantem Erbgang bei einer Maine Coon Kolonie nachgewiesen. KITTLESON und Mitarbeiter (1999) züchteten eine Kolonie aus an HCM erkrankten Katzen heran und konnten durch Kreuzungsversuch den Erbgang nachweisen (KITTLESON et al., 1999). Die Stammbaumanalyse einer American Shorthair Familie mit 27 Tieren lässt auch für diese Rasse einen autosomal-dominanten Erbgang als wahrscheinlich erscheinen (MEURS et al., 1997). Hinweise auf einen hereditären Ursprung finden sich für weitere Katzenrassen wie Perser, Britisch Kurzhaar, Norwegische Waldkatze, Ragdoll, Türkisch Van Katze, Sphynx, Sibirische Katze, die Scottish Fold (COTE et al., 2011; KITTLESON, 2012) sowie wie für die EKH (KRAUS et al., 1999; BATY et al., 2001; FUJII et al., 2001; NAKAGAWA et al., 2002).

Als mögliche Ursachen der felines primären HCM sind bisher bei der Maine Coon und der Ragdoll spezifische Punktmutationen im MYBPC3 ermittelt worden (MEURS et al., 2005; MEURS et al., 2007; NYBERG et al., 2007). Bei der Maine Coon wurden zwei Polymorphismen im Bereich des MYBPC3 entdeckt, die möglicherweise die Sarkomerproteinkonformation- und interaktion beeinflussen. MEURS und Mitarbeiter (2005) machten die A31P-Punktmutation als mögliche Ursache für die HCM aus (MEURS et al., 2005). In einer Population von 23 Maine Coon Katzen wiesen sämtliche der an HCM erkrankten Tiere im Codon 31 des Exon 3 im MYBP3 ein Austausch von Guanin mit Cytosin auf.

Dies bewirkt eine *missense*-Mutation von Alanin zu Prolin. Die Mutation konnte bei keiner der herzgesunden Kontrollkatzen festgestellt werden. Basierend auf einer errechneten Proteinstrukturanalyse und der immunhistochemisch festgestellten Störung der Proteine des Sarkomers, wurde geschlussfolgert, dass die Punktmutation eine Änderung der Interaktion von MYBPC und anderen kardialen Proteinen bewirken kann (MEURS et al., 2005). Die Prävalenz der A31P-Punktmutation bei Maine Coon Katzen lag bei einer weltweiten Studie bei 34 % (FRIES et al., 2008) und in einer großen europäischen Population von Maine Coon Katzen bei 42 % (MARY et al., 2010). Bis auf drei einzelne Tiere (British Langhaar, Sibirische Katze und Ragdoll) konnte die A31P-Punktmutation bisher bei keiner anderen Rasse als der Maine Coon nachgewiesen werden und scheint somit für diese Rasse spezifisch (FRIES et al., 2008; MEURS et al., 2009; MARY et al., 2010; WESS et al., 2010b).

Die zweite Punktmutation, die bei der Maine Coon im kausalen Zusammenhang mit HCM publiziert wurde, liegt ebenfalls auf Exon 3, jedoch im Kodon 74 (NYBERG et al., 2007). Durch den Austausch von Guanin durch Adenin entsteht die Aminosäure Threonin anstatt Alanin. Es konnte für die A31P- und A74T-Punktmutationen eine Gesamtprävalenz von weniger als 50 % bei an HCM erkrankten Maine Coon Katzen ausgemacht werden (NYBERG et al., 2007). Die A74T-Punktmutation konnte auch bei anderen Katzenrassen nachgewiesen werden, jedoch war keine Korrelation zwischen dem HCM-Genotyp und HCM-Phänotyp auszumachen (WESS et al., 2010b).

WESS und Mitarbeiter (2010) konnten sowohl für die A31P-, als auch für die A74T-Punktmutation bei dem prozentualen Anteil von an HCM erkrankten Maine Coon Katzen (verifiziert durch Echokardiographie) keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Mutationen und Wildtypen feststellen. Ebenso war keine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp nachzuweisen (WESS et al., 2010b).

Durch DNA-Sequenzierung von 21 Ragdolls mit HCM wurden bei allen Phänotyp-positiven Katzen eine Punktmutation im Kodon 820 im MYBPC3 festgestellt, wohingegen Tiere der herzgesunden Kontrollgruppe diese Mutation nicht aufwiesen (MEURS et al., 2007).

Für die meisten Katzen bleibt bislang die Ursache der HCM unbekannt. Über mögliche Ursachen wie unentdeckte vererbte Mutationen, *de novo* Mutationen

oder andere ätiologische Faktoren, kann bisher nur spekuliert werden (ABBOTT, 2010; COTE et al., 2011).

1.4 Pathogenese

Die humane HCM ist nicht nur genetisch, sondern auch phänotypisch eine äußerst heterogene Erkrankung (MARON et al., 1984b; SOLOMON et al., 1990).

Die genauen pathogenetischen Mechanismen, die der Ausbildung des Phänotyps zugrunde liegen, sind derzeit noch Gegenstand intensiver Forschung. Basierend auf den Ergebnissen vieler *in vivo* und *in vitro* Studien, sind dazu verschiedene Hypothesen aufgestellt worden. Diese versuchen den Weg zu erklären, wie es von der einzelnen primären Mutation der Gene, die für die Proteine des Sarkomers kodieren, zu dem entsprechenden Phänotyp kommt (ROTTBAUER et al., 1997; ANDERSEN et al., 2004; MARSTON et al., 2009; THEIS et al., 2009).

Da viele unterschiedliche Mutationen zu dem gleichen Phänotyp führen können, wird angenommen, dass sie in einem gemeinsamen pathogenetischen Pfad münden (BONNE et al., 1998). Jedoch können gleiche Mutationen wiederum sehr variable Phänotypen nach sich ziehen. Daher geht man davon aus, dass die Ausprägung nicht nur durch die primäre Genmutation, sondern auch durch weitere Faktoren, wie modifizierende Gene, beeinflusst wird (MARIAN & ROBERTS, 2001).

Eine Hypothese ist die der dominant negativen mutierten Proteine. Als *poison peptides* werden sie stabil in Myofilamente inkorporiert und stören so Aufbau und Funktion der Proteine des Sarkomers (HERSKOWITZ, 1987; THEIS et al., 2009). Eine weitere Theorie beruht auf der Haploinsuffizienz. Dies bedeutet, dass eine Mutation dazu führt, dass nicht ausreichend Proteine zu Verfügung stehen, um der Funktion der Zelle gerecht zu werden (ANDERSEN et al., 2004; MARSTON et al., 2009).

Es wird vermutet, dass strukturell und funktionell veränderte Sarkomere eine verschlechterte Funktion der kardialen Myozyten vermitteln (MARIAN & ROBERTS, 2001). Wie dies letztlich zu einer Myozytenhypertrophie führt ist unklar: So könnte erhöhter Stress der Myozyten der Anstoß für die Aktivierung verschiedener stressresponsiver mitotischer und trophischer Faktoren sein. Unter dem Einfluss dieser Faktoren soll sich dann der beschriebene Phänotyp mit Myozytenhypertrophie, einer veränderten myozytären Anordnung und

interstitieller Fibrose ausbilden (MARIAN & ROBERTS, 2001). Eine Hypertrophie sei also keine primäre Manifestation, sondern eine kompensatorische Reaktion auf eine gestörte Sarkomerfunktion (FATKIN & GRAHAM, 2002). Auf den Phänotyp soll in den folgenden Kapiteln eingegangen werden.

1.4.1 Makroskopische Pathologie

Das primäre pathomorphologische Merkmal einer HCM ist ein konzentrisch hypertropher, nicht dilatierter linker Ventrikel. In Abhängigkeit des Schweregrades der Erkrankung sind die Kammerwände mild bis hochgradig verdickt (KITTLESON, 1998). Der Phänotyp ist sehr variabel ausgeprägt. FOX und Mitarbeiter (1995) ermittelten mittels Echokardiographie bei den meisten Katzen (67 %) eine diffus ausgeprägte Hypertrophie, bei der sowohl das interventrikuläre Septum (IVS) als auch die linksventrikuläre freie Wand (LVFW) betroffen waren. Etwa ein Drittel der Katzen mit HCM zeichnete sich durch eine segmentale Verdickung des Myokards aus, bei der jeweils der anteriore oder posteriore Teil des IVS oder der LVFW hypertrophiert waren. Bei den meisten Tieren (57 %) beschränkte sich die Hypertrophie auf den proximalen (basalen) Anteil des Myokards. Bei den restlichen Tieren waren proximale und der distale (apikale) Segmente gleichermaßen betroffen (FOX et al., 1995). Ein ähnliches Verteilungsmuster der Hypertrophie bestätigten auch BRIZARD und Mitarbeiter (2009). Sie erstellten eine sechs Phänotypen umfassende Klassifikation für die feline HCM, modifiziert aus der Humanmedizin. Eine diffuse Hypertrophie von IVS und LVFW entsprach Typ D, der bei 61 % der Tiere ausgeprägt war (MARON et al., 1981; BRIZARD et al., 2009). Eine weitere morphologische Abnormalität bei der feline HCM ist eine Verdickung der Papillarmuskeln, die mit linksventrikulärer Hypertrophie einhergehen (TILLEY et al., 1977) oder isoliert ohne weitere makroskopische Veränderungen auftreten kann (BRIZARD et al., 2009). Bei manchen Populationen ist dies als dominierendes und konstantestes Merkmal auszumachen (KITTLESON et al., 1999). Des Weiteren liegen das absolute und das relative Herzgewicht bei an HCM erkrankten Katzen signifikant höher als bei herzgesunden Kontrolltieren (TILLEY et al., 1977; LIU et al., 1981; FOX et al., 1995; KITTLESON et al., 1999; KERSHAW et al., 2012). In Abhängigkeit des Schweregrades ist häufig eine Vergrößerung des linken Atriums zu finden (TILLEY et al., 1977; FOX et al., 1995; FOX, 1999;

KITTLESON et al., 1999; BRIZARD et al., 2009). In solch einem pathologisch veränderten linken Atrium oder im linken Aurikel kann sich ein Thrombus bilden (KITTLESON et al., 1999; FERASIN et al., 2003). Dieser bedingt bei Abschwemmung meist als Sattelthrombus eine arterielle Thrombembolie (ATE) im Bereich der Trifurkation der Aorta (TILLEY et al., 1977; LIU et al., 1981). Ein weiterer Befund kann eine zusätzliche Vergrößerung des rechten Atriums und/oder eine konzentrische Hypertrophie des rechten Ventrikels sein (TILLEY et al., 1977; FOX, 2003a). Wie auch in der Humanmedizin beschrieben ist, kann ein Teil der Patienten mit HCM eine *endstage*-HCM, auch bekannt als *burnout*-HCM, entwickeln. Sie ist gekennzeichnet durch eine Verdünnung der ursprünglich hypertrophierten Kammerwände, einer relativen Vergrößerung des initial verengten linksventrikulären Innendurchmessers (LVID) in der Diastole und einer reduzierten Kontraktionskraft, was üblicherweise zu einer linksatrialen Vergrößerung führt. Da dies ein dynamischer Prozess ist, kann eine definitive Diagnose nicht allein anhand von postmortem erhobenen Befunden erfolgen. Hierfür ist immer mindestens ein Echokardiogramm nötig, das eine vorherige Hypertrophie des Myokards belegt (BATY et al., 2001; CESTA et al., 2005).

Im Falle einer dekompensierten HCM können Hinweise auf Linksherzversagen wie Lungenödem, Pleuraerguss oder Perikarderguss und seltener auch Manifestationen des Rechtsherzversagens, wie Aszites oder Leberkongestion, gefunden werden (TILLEY et al., 1977; FOX et al., 1995; FOX, 1999, 2003a; HALL et al., 2007).

1.4.2 Pathohistologie

Das Hauptcharakteristikum der HCM ist ein Anstieg der linksventrikulären myokardialen Masse durch die Vergrößerung kardialer Myozyten (BISHOP, 2004). Ein besonderes zusätzliches Merkmal der Myozyten ist, dass sie nicht nur normal parallel angeordnet, sondern auch in verschiedenen, ungeordneten Ausrichtungen zueinander liegen können. Dieses Phänomen wird als *myocyte disarray* oder *myofiber disorientation* bezeichnet. Weitere Befunde können myokardiale Fibrose oder abnormale intramurale Koronararterien sein. Auftreten, Verteilung und Ausmaß genannter Befunde sind sehr variabel (TILLEY et al., 1977; LIU et al., 1993; FOX et al., 1995; KITTLESON et al., 1999; KERSHAW et al., 2012).

Das Vorkommen von *myocyte disarray* variiert von 30 % bis 100 % bei an HCM erkrankten Katzen und reicht von einer milden bis zu einer hochgradigen Ausprägung (LIU et al., 1993; FOX et al., 1995; KITTLESON et al., 1999; TAUGNER, 2001).

In der Humanmedizin sind abnormale intramurale Koronararterien durch einen Anstieg der Größe mit Verdickung der Gefäßwand charakterisiert, was meist von einer Verringerung des intravasalen Lumens begleitet wird. Die Wandverdickung ist bedingt durch eine Proliferation glattmuskulärer, kollagener, elastischer und mukoider Anteile der Tunica intima und/oder der Tunica media (MARON et al., 1986). Ähnliche Befunde konnten auch bei der feline HCM nachgewiesen werden (FOX et al., 1995; KITTLESON et al., 1999). Bei Katzen proliferiert insbesondere der bindegewebige Anteil der genannten Gefäßwandschichten (LIU et al., 1993). LIU und Mitarbeiter (1993) konnten abnormale intramurale Koronararterien bei insgesamt 74 % der Katzen mit HCM feststellen. Fünf Prozent der herzgesunden Kontrollgruppe wiesen ähnliche Befunde auf (LIU et al., 1993).

Bereiche von ausgeprägter myokardialer Fibrose, in variierendem Ausmaß, ließen sich bei 53 % - 100 % der an HCM erkrankten Katzen nachweisen (LIU et al., 1993; FOX et al., 1995; KITTLESON et al., 1999). KERSHAW und Mitarbeiter (2012) hingegen konnten keinen Unterschied der Ausprägung einer interstitiellen Fibrose im Vergleich von feline HCM mit herzgesunden Katzen feststellen (KERSHAW et al., 2012).

1.4.3 Pathophysiologie

Die Diastole umfasst die isovolumetrische Relaxation, die frühe schnelle Füllungsphase der Ventrikel, die Diastase und die atriale Kontraktion (LITTLE & DOWNES, 1990). Einfluss auf diese Phasen der Diastole und damit auf die diastolische Funktion haben die myokardiale Relaxation und die ventrikuläre Compliance (NISHIMURA & TAJIK, 1997). Bei einer HCM verursachen verschiedene Veränderungen auf molekularer und struktureller Ebene eine abnorme Relaxation und eine verminderte Compliance, was in einer Verschlechterung der diastolischen Funktion resultiert (YAMAKADO & NAKANO, 1990; GWATHMEY et al., 1991; OHSATO et al., 1992; RAKOWSKI & CARASSO, 2007; COTE et al., 2011). So führen beispielsweise

myozytäre Hypertrophie, interstitielle Fibrose und eine gestörte Anordnung der Herzmuskelfasern zu einer erhöhten Wandsteifigkeit und damit verminderten passiven Dehnbarkeit des Ventrikels (OHSATO et al., 1992). Schließlich kommt es bei der HCM zu einer Veränderung des diastolischen Druck-Volumen-Verhältnisses dahingehend, dass für jedes gegebene Volumen ein höherer linksventrikulärer Druck besteht, als in einem normalen Ventrikel bestehen würde (MANDINOV et al., 2000). Zusammen mit einem durch die verdickten Kammerwände reduzierten endsystolischen Volumen und einer vermehrten Natrium- und Wasserretention, die durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bedingt ist (TAUGNER, 2001), führt dies zu einer Druckerhöhung im linken Ventrikel (KITTLESON, 1998). Diese setzt sich in das linke Atrium fort, was wiederum zu erhöhten hydrostatischen Drücken in den Kapillaren von Lunge und Pleura führt. Mit steigendem Druck erhöht sich die Gefahr des kongestiven Linksherzversagens (KITTLESON, 1998). Dieses kann sich bei Katzen unterschiedlich manifestieren in Form eines Lungenödemes, Thoraxergusses oder Perikardergusses (FERASIN et al., 2003; HALL et al., 2007; MACDONALD, 2009; PAYNE et al., 2010).

Neben der humanen HCM ist auch die feline HCM häufig mit einer dynamischen Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes assoziiert, die durch das *systolic anterior motion* (SAM) des anterioren Mitralklappensegels bedingt wird. Das Auftreten in Zusammenhang mit feliner HCM wird mit 28 % - 67 % angegeben (FOX et al., 1995; RUSH et al., 2002; BRIZARD et al., 2009; PAYNE et al., 2010; TREHIOU-SECHI et al., 2012). Als zugrunde liegender Mechanismus wird unter anderem ein ursächlich verdickter oder versetzter Papillarmuskel diskutiert. Dieser soll die Chorda tendineae und damit das anteriore Mitralsegel im linksventrikulären Ausflusstrakt Richtung IVS ziehen (LEVINE et al., 1995; SHERRID et al., 2000; WESS, 2011). SAM kann in variierenden Schweregraden den linksventrikulären systolischen Druck erhöhen und man geht davon aus, dass dies die linksventrikuläre Hypertrophie verschlimmern kann (SCHOBER & TODD, 2010). Zudem entsteht durch das deplatzierte Mitralsegel eine Mitralinsuffizienz, die möglicherweise zur linksatrialen Druckerhöhung beiträgt (KITTLESON, 1998).

Die feline HCM bedingt eine Prädisposition erkrankter Katzen, Thromben im linken Atrium oder im linken Aurikel zu bilden. Seltener kann ein Thrombus auch

im linken Ventrikel lokalisiert sein (VENCO, 1997; FERASIN et al., 2003; CESTA et al., 2005). Eine Thrombusbildung setzt eine Störung mindestens einer der Faktoren der Virchow-Trias voraus, wie Hyperkoagulabilität, Endothelzellschaden und abnorme Strömungsgeschwindigkeiten des Blutes (LIP & GIBBS, 1999). Bei der Katze sind die zugrunde liegenden Mechanismen der kardial bedingten Thrombusbildung noch nicht vollständig aufgeklärt. SCHOBER und MÄRZ (2006) konnten einen Zusammenhang zwischen feline Kardiomyopathien, verlangsamten linksaurikulären Blutflussgeschwindigkeiten und dem Auftreten von spontanem echokardiographischen Kontrast nachweisen (SCHOBER & MAERZ, 2006). Über Vorliegen und Einfluss von Hyperkoagulabilität bei an HCM erkrankten Katzen gibt es konträre Ergebnisse (BEDARD et al., 2007; JANDREY et al., 2008; STOKOL et al., 2008; JANDREY et al., 2009). Ein gebildeter Thrombus, oder Teile dessen, können als Embolus in die Zirkulation gelangen und sich an verschiedenen Stellen festsetzen. Diese Komplikation manifestiert sich zumeist als ATE im Bereich der Aortenaufzweigung. Andere nachgewiesene Lokalisationen für Thrombembolien sind Brachial-, Renal-, Mesenterial- oder Zerebralarterien (SMITH et al., 2003).

1.5 Klinik

Betroffene Tiere durchlaufen eine variabel dauernde asymptomatische Phase (FOX et al., 1995; RUSH et al., 2002; RIESEN et al., 2007a; PAIGE et al., 2009; PAYNE et al., 2010; TREHIOU-SECHI et al., 2012). Im Stadium des kongestiven Herzversagens (*congestive heart failure*, CHF) zeigen Tiere, bedingt durch Lungenödem oder Thoraxerguss, klinische Anzeichen wie Polypnoe und Dyspnoe (FERASIN et al., 2003; PAYNE et al., 2010; SMITH & DUKES-MCEWAN, 2012). Eine weitere schwere Komplikation der feline HCM ist eine Lähmung zumeist im Bereich der Hintergliedmaße, die durch eine ATE verursacht wird (SCHOEMAN, 1999; SMITH et al., 2003). Durch HCM können manche Katzen supraventrikuläre- und ventrikuläre Tachyarrhythmien, sowie Bradyarrhythmien entwickeln (TILLEY et al., 1977; KANESHIGE et al., 2006; COTE & JAEGER, 2008). Diese können eine mögliche Ursache für Synkopen darstellen, welche im Zusammenhang mit HCM auftreten (RUSH et al., 2002; PAYNE et al., 2010). Der plötzliche Herztod ist, neben CHF und ATE, eine potenzielle Todesursache, die mit der feline HCM einhergeht (TILLEY et al., 1977; FOX et al., 1995; RUSH et al., 2002).

1.6 Diagnose

Das wichtigste praktikable diagnostische Mittel, um eine frühe und genaue Diagnose zu stellen, ist die transthorakale Echokardiographie. Die definitive Diagnose „primäre feline HCM“ basiert auf einer linksventrikulären diastolischen Wanddicke von ≥ 6 mm in Abwesenheit einer generalisierten Erkrankung, die eine konzentrische Hypertrophie bedingen kann (FOX et al., 1995; KIENLE, 2008).

1.6.1 Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung

In der subklinischen und in der symptomatischen Phase der feline HCM können ein oder mehrere auffällige Befunde der klinischen Untersuchung ein erster Hinweis auf das Vorliegen einer Herzerkrankung sein.

Bei der Auskultation ist bei 47 % – 89 % der an HCM erkrankten Katzen ein Herzgeräusch wahrnehmbar (RUSH et al., 2002; FERASIN et al., 2003; PAYNE et al., 2010; TREHIOU-SECHI et al., 2012). Ein Herzgeräusch, das ein Punctum maximum parasternal aufweist und oft deutlicher wahrnehmbar bei höheren Herzfrequenzen ist, kann durch SAM bedingt sein. Differentialdiagnostisch kommt auch eine dynamische rechtsventrikuläre Ausflusstraktsobstruktion (*dynamic right ventricular outflow tract obstruction*, DR VOTO) in Frage (RISHNIW & THOMAS, 2002; DIRVEN et al., 2010). Des Weiteren ist auch ein Galopprrhythmus ein möglicher pathologischer Befund. Durch Tachy- oder Bradyarrhythmien können unregelmäßige Herztöne auftreten. Im Stadium des kongestiven Linksherzversagens kann Tachypnoe und Maulatmung beobachtet werden, wobei eine verschärfte Respiration möglicherweise auf ein bestehendes Lungenödem, eine Dämpfung der Herztöne auf Thorax- oder Perikarderguss hinweisen kann. Seltener tritt Aszites auf, der eine Umfangsvermehrung des Abdomens verursacht. Häufig sind Katzen im Herzversagen hypotherm (PAYNE et al., 2010; SMITH & DUKES-MCEWAN, 2012; TREHIOU-SECHI et al., 2012).

Bei einer Aortenthrombose führt eine neuromuskuläre Ischämie zu einer Paraparese bis Paraplegie der Hintergliedmaße. Seltener können eine oder beide Vordergliedmaßen, isoliert oder in Kombination mit den Hintergliedmaßen, durch weitere abgeschwemmte Emboli betroffen sein. Die Extremitäten sind dabei kalt, verhärtet und es ist kein Puls palpierbar. Bei unvollständiger Okklusion der

Gefäße kann eventuell noch ein schwacher Puls vorhanden sein kann. Das Krallenbett erscheint blass bis zyanotisch und ein Verlust des Tiefenschmerzes ist möglich. Die Tiere sind zumeist hochgradig schmerzhaft, zeigen starke Vokalisation und häufig auch Tachypnoe, die durch Schmerz oder begleitendes CHF bedingt sein kann. Auch bei dieser klinischen Komplikation sind die meisten Tiere hypotherm (SCHOEMAN, 1999; SMITH et al., 2003).

1.6.2 Radiographie und Elektrokardiographie

Mögliche assoziierte röntgenologische Auffälligkeiten der HCM sind Kardiomegalie, eine linksatriale Vergrößerung, eine Vergrößerung der Pulmonalvenen, ein kardiales Lungenödem, Thoraxerguss und seltener Aszites. Anhand dieser Befunde lässt sich eine HCM allerdings nicht von anderen Kardiomyopathien, wie RCM oder DCM, differenzieren (TILLEY et al., 1977; RUSH et al., 2002; FERASIN et al., 2003; HAYWARD et al., 2004; RIESEN et al., 2007b; SCHOBER et al., 2007a). Die Radiographie ist im Vergleich zur Echokardiographie weniger sensitiv, um beispielsweise bei Katzen im Linksherzversagen ein vergrößertes linkes Atrium erfassen zu können (SCHOBER et al., 2013a).

Bei 74 % - 79 % an HCM erkrankter Katzen im symptomatischen Stadium können Abnormalitäten des Elektrokardiogramms (EKG) festgestellt werden (TILLEY et al., 1977; RIESEN et al., 2007b). Bei einer Studienpopulation aus klinisch und subklinisch erkrankten Tieren wird eine Prävalenz von 47 % angegeben (FERASIN et al., 2003). EKG-Abweichungen, die mit einer HCM einhergehen können, sind morphologische Veränderungen wie P-pulmonale, P-mitrale oder Hypervoltage. Auch Überleitungsstörungen wie linksanteriorer Faszikelblock, Rechts- und Linksschenkelblock und AV-Block I. bis III. Grades können beobachtet werden. Des Weiteren wurden schon folgende Rhythmusstörungen dokumentiert: Sinustachykardie, Sinusbradykardie, supraventrikuläre Extrasystolen, atriale Tachykardie, Vorhofflimmern und ventrikuläre Extrasystolen bis hin zur ventrikulären Tachykardie. Diese Befunde sind nicht spezifisch für HCM, sondern werden auch im Zusammenhang mit anderen Kardiomyopathien beschrieben (TILLEY et al., 1977; FERASIN et al., 2003; RIESEN et al., 2007b; COTE & JAEGER, 2008; SMITH & DUKES-MCEWAN, 2012).

1.6.3 Echokardiographie

Gemäß echokardiographischer Standardebenen erfolgt die transthorakale Herzultraschalluntersuchung von rechts, mit einem parasternal lokalisierten Schallkopf für einen Längs- und Kurzschnitt und von links mit apikaler Orientierung (THOMAS et al., 1993).

Die Diagnose einer feline HCM basiert auf der Vermessung der Dimensionen der LVFW und des IVS jeweils in der maximalen Diastole. Wenn die Wände oder Teilbereiche der Wände mit ≥ 6 mm gemessen werden können, wird von einem Vorliegen einer feline HCM ausgegangen (FOX et al., 1995). Der Graubereich ist hingegen noch nicht einheitlich definiert. Der Grenzwert, ab dem bereits der Verdacht auf eine HCM besteht (*equivocal*), wird unterschiedlich angegeben und variiert zwischen 5,0 mm – 5,5 mm (GUNDLER et al., 2008; BRIZARD et al., 2009).

Im zweidimensionalen Bild lässt sich im Zusammenhang mit einer HCM zumeist eine Hypertrophie der Papillarmuskeln feststellen, wobei dies in einem frühen Stadium der einzige Hinweis auf das Vorliegen dieser Kardiomyopathie sein kann. Die subjektive Beurteilung der Papillarmuskeln kann von einer milden Vergrößerung bis hin zu einer endsystolischen Kammerobliteration reichen, bei der am Ende der Systole kein Lumen mehr darzustellen ist (KITTLESON et al., 1999; ADIN & DILEY-POSTON, 2007; BRIZARD et al., 2009). Die Bestimmung der Wanddicken erfolgt bei der Katze idealerweise im zweidimensionalen Bild. Im M-Mode kann fälschlicherweise der Papillarmuskel mitgemessen und so die Wanddicke überschätzt werden oder eventuell asymmetrische Hypertrophien nicht erkannt werden (BONAGURA, 2000; MACDONALD, 2009). Es sind viele unterschiedliche Phänotypen der Hypertrophie beschrieben, wie unter dem Punkt „Makroskopische Pathologie“ erläutert.

Eine Möglichkeit, die Größe des linken Atriums zu evaluieren, ist im zweidimensionalen Bild den Durchmesser des linken Atriums (LA) in das Verhältnis zu der Aorta (Ao) zu setzen (LA/Ao) (HANSSON et al., 2002). Bei einem Verhältnis $LA/Ao \geq 1,5$ kann von einem vergrößerten Vorhof und damit der Gefahr einer Dekompensation ausgegangen werden (ABBOTT & MACLEAN, 2006; SMITH & DUKES-MCEWAN, 2012). Auch atrialer spontaner echokardiographischer Kontrast oder ein Thrombus lassen sich im

zweidimensionalen Bild nachweisen (FERASIN et al., 2003; SCHOBER & MAERZ, 2006; STOKOL et al., 2008).

Bei Einteilung der Schwere einer HCM besteht kein einheitliches Schema. Nach WESS und Mitarbeitern (2011) (siehe auch Tabelle 1) wird eine geringgradige HCM definiert durch eine fokale oder generalisierte Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS in der Diastole von 6,0 mm bis 6,6 mm und einem LA/Ao < 1,5. Eine mittelgradige HCM besteht bei fokaler oder generalisierter Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS von 6,5 bis 7,0 mm und einem LA/Ao < 1,8 oder bei fokaler oder generalisierter Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS von 6,0 mm bis 6,5 mm und einem LA/Ao zwischen 1,5 - 1,8. Von einer hochgradigen HCM wird ausgegangen, wenn eine fokale oder generalisierte Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS von > 7,0 mm oder eine fokale oder generalisierte Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS von > 6,0 mm und ein LA/Ao > 1,8 vorliegt (WESS et al., 2011).

Tabelle 1: Schweregrade der felines hypertrophen Kardiomyopathie, basierend auf Wanddicken in der Diastole und der Größe des linken Atriums (WESS et al., 2011). LVFW = linksventrikuläre freie Wand; IVS = interventrikuläres Septum; LA/Ao = Verhältnis linkes Atrium zu linkem Vorhof.

	fokale oder generalisierte Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS	LA/Ao
Geringgradig	6,0 mm – 6,6 mm	< 1,5
Mittelgradige	6,5 – 7,0 mm	< 1,8
	6,0 mm – 6,5 mm	1,5 – 1,8
Hochgradig	> 7,0 mm	Unabhängig
	> 6,0 mm	> 1,8

Das zweidimensionale Herzultraschallbild einer Katze mit hochgradiger HCM ist in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1: Rechts parasternale Längsachse einer Katze mit einer hochgradigen hypertrophen Kardiomyopathie im kongestiven Herzversagen. Die linksventrikuläre freie Wand, das interventrikuläre Septum und der posteriore Papillarmuskeln des linken Ventrikels sind hypertrophiert. Das linke Atrium ist hochgradig vergrößert. Ein Flüssigkeitssaum ist unterhalb der linksventrikulären freien Wand sichtbar. IVS = interventrikuläres Septum, LVFW = linksventrikuläre freie Wand, PM = Papillarmuskel, LA = linkes Atrium, PE = Perikarderguss.

Mit Hilfe des Blutflussdopplers lässt sich SAM darstellen. Typischerweise kann mittels Farbdoppler, bedingt durch die dynamische Aortenstenose, in der Systole eine Verwirbelung im linksventrikulären Ausflusstrakt sichtbar gemacht werden. Gleichzeitig besteht eine Mitralinsuffizienz mit einem Blutrückfluss vom linken Ventrikel in den linken Vorhof in der Systole. Mittels Spektraldoppler lässt sich die Geschwindigkeit der Stenose und damit deren Schweregrad bestimmen (SCHÖBER & TODD, 2010; BOON, 2011).

Ebenso lässt sich durch Verwendung eines Spektraldoppler über das Mitraleinflussprofil, welches den Phasen der Diastole entspricht, auch die diastolische Funktion des linken Ventrikels beurteilen. Bei an HCM erkrankten Katzen konnte im Vergleich zu herzgesunden Tieren eine abnormale Relaxation festgestellt werden, die sich durch eine verlängerte isovolumetrische Relaxationszeit (*isovolumetric relaxation time*, IVRT), eine reduzierte frühdiastolische Geschwindigkeit (E-Welle), eine reduzierte E-Wellen

Dezeleration, eine erhöhte spätdiastolische Geschwindigkeit (A-Welle) und ein reduziertes Verhältnis von E-Welle zu A-Welle ($E/A < 1$) auszeichnet. In selteneren Fällen lässt sich auch ein restriktives Muster nachweisen mit verkürzter IVRT, einer hohen spitzen E-Welle und einer kleinen A-Welle ($E/A > 2$) (BRIGHT et al., 1999). Nachteile dieser Methode sind der Einfluss verschiedener Faktoren wie Alter, Herzfrequenz und Vor- und Nachlast (SANTILLI & BUSSADORI, 1998; BRIGHT et al., 1999; SCHOBER et al., 2003) oder eine Fusionierung der E- und A-Wellen bei hohen Herzfrequenzen (SCHOBER et al., 2003). Zusätzlich schließt ein scheinbar normales Mitraleinflussprofil eine HCM nicht aus. Im Übergang einer abnormalen Relaxation zu einem restriktiven Muster, durch linksatriale Druckerhöhung, kann ein pseudonormales Muster beobachtet werden (BRIGHT et al., 1999).

Eine gute Methode zur direkten Beurteilung der diastolischen und systolischen Myokardfunktion ist der Gewebedoppler (*tissue doppler imaging*, TDI). Durch verschiedene Gewebedopplerverfahren, wie etwa dem Pulsed-Wave-Gewebedoppler und Farbgewebedoppler, lassen sich myokardiale Parameter wie Tissue Velocity Imaging (TVI), Strain und Strain Rate bestimmen. Strain und Strain Rate sind nur über den Farbgewebedoppler zu ermitteln (ABRAHAM et al., 2007). Veränderte TVI-Parameter im Zusammenhang mit einer felines HCM sind eine reduzierte früh diastolische Geschwindigkeit, eine reduzierte Akzeleration und Dezeleration, sowie eine verlängerte IVRT (KOFFAS et al., 2006; SARKAR, 2011). Eine reduzierte Geschwindigkeit der E-Welle reflektiert dabei die verschlechterte Relaxation und reduzierte Compliance des linken Ventrikels (NAGUEH et al., 1997; KOFFAS et al., 2006). WESS und Mitarbeiter (2010) konnten erstmals bei Tieren mit HCM mit ansteigender Schwere einer HCM eine abnehmende longitudinale systolische myokardiale Verformung (longitudinale Strain) nachweisen. Dies ist Ausdruck einer reduzierten systolischen Funktion (WESS et al., 2010a).

1.6.4 Biomarker

Auf der Suche nach einem einfach anzuwendendem und zuverlässigen Test, der den Herzultraschall ergänzen oder sogar ersetzen kann, wurden Biomarker des Blutes bei HCM zum Forschungsthema verschiedener Studien. Der Schwerpunkt liegt bisher bei der Untersuchung von kardialen Troponin-I (*cardiac troponin I*, cTnI) und B-Typ natriuretisches Peptid (*B-type natriuretic peptide*, BNP)

(HERNDON et al., 2002; CONNOLLY et al., 2003; FOX et al., 2009; WESS et al., 2011).

CTnI ist ein myofibrilläres Protein, welches in dieser Isoform in der Herzmuskulatur lokalisiert ist (CUMMINS & PERRY, 1978). Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität für myokardiale Schäden wird cTnI in der Humanmedizin als zuverlässiger Laborparameter in der Infarkt Diagnostik angewandt (WRIGHT et al., 2011). In der Veterinärmedizin konnte eine erhöhte Plasma- und Serumkonzentration von cTnI bei an HCM erkrankten Katzen nachgewiesen werden (HERNDON et al., 2002; CONNOLLY et al., 2003). Dabei stellten HERNDON und Mitarbeiter (2002) auch einen signifikanten Unterschied von Katzen im akuten Herzversagen im Vergleich zu nicht-dekompensierten Tieren oder Katzen mit einer vorangegangenen Episode eines Herzversagens fest (HERNDON et al., 2002). In einer anderen Studie konnte hingegen kein Unterschied zwischen Katzen im CHF durch HCM und Tieren mit HCM im subklinischen Stadium ausgemacht werden (CONNOLLY et al., 2003). Ebenso wurde das Potenzial von cTnI evaluiert, kardial bedingte Dyspnoe von nicht-kardialer bedingter Dyspnoe zu unterscheiden. Es waren signifikant höhere Konzentration von cTnI bei Katzen mit Dyspnoe kardialer Genese nachzuweisen, jedoch waren auch große Überlappungen auszumachen (HERNDON et al., 2008; CONNOLLY et al., 2009). Ein cTnI-Test der neueren Generation wurde als Screening-Test für HCM erprobt. Mittels ultrasensitiver cTnI-Assays wurden signifikant unterschiedliche cTnI-Konzentrationen zwischen herzgesunden Katzen und Katzen mit HCM der Schweregrade verdächtig bis hochgradig festgestellt. Durch einen Cut-Off-Wert von 0,06 ng/ml ließen sich mit einer Sensitivität von 91,7 % und einer Spezifität von 95,4 % Katzen mit HCM von herzgesunden Tieren unterscheiden (ROOS & WESS, 2012).

Einer Erhöhung der cTnI-Konzentration liegt jedoch nicht ausschließlich ein HCM bedingter Myozytenuntergang zugrunde. Auch bei anderen Herzerkrankungen wie beispielsweise DCM, Mitralendokardiose, Perikarderguss oder Myokarditis sowie nicht-kardialen Erkrankungen wie feline Hyperthyreose, Neoplasie oder Nierenerkrankungen sind veränderte cTnI-Werte beschrieben (CONNOLLY et al., 2005; SERRA et al., 2010).

BNP ist ein Polypeptid, das durch Dehnung, Druck- oder Volumenüberlastung und neurohormonelle Aktivierung von Myozyten des Ventrikels in die Zirkulation

sezerniert wird. In der Zirkulation wird BNP in aktives BNP und inaktives N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid (*N-terminal pro B-type natriuretic peptide*, NT-ProBNP) gespalten. Da letzteres eine längere Serumhalbwertszeit aufweist, eignet es sich besser zur Diagnostik (LEVIN et al., 1998; PALAZZUOLI et al., 2010).

Unter Anwendung unterschiedlicher Fragestellungen wurde der diagnostische Nutzen der NT-proBNP-Konzentration im Plasma bei Kardiomyopathien der Katze evaluiert. Verschiedene Studien attestieren demnach NT-ProBNP eine hohe Sensitivität und Spezifität, um Katzen im Herzversagen von Katzen mit nicht-kardial bedingter Dyspnoe zu unterscheiden. Dabei waren bei kardial bedingter Dyspnoe die Plasmakonzentrationen von NT-ProBNP signifikant höher. Eine Unterscheidung, welche Kardiomyopathie dem klinischen Bild zugrunde liegt, ist durch NT-proBNP nicht möglich (WESS et al., 2008; CONNOLLY et al., 2009; FOX et al., 2009). Dekompensierte Katzen, deren NT-proBNP-Konzentrationen oberhalb eines bestimmten Cut-Off-Wertes lagen, wiesen ein höheres Risiko auf, den ersten Monat im Herzversagen nicht zu überleben. Über den ersten Monat hinaus konnte jedoch keine Aussage getroffen werden (FOX et al., 2013). Inwiefern sich NT-proBNP eignet, auch mildere Formen einer Kardiomyopathie zu detektieren, wird konträr diskutiert. Einige Studien hatten zum Ergebnis, dass sich durch die Bestimmung der NT-proBNP-Konzentration mildere Formen einer subklinischen HCM nicht nachweisen ließen. Lediglich eine hochgradige HCM war mit einer signifikant erhöhten NT-proBNP-Konzentration assoziiert (HSU et al., 2009; SINGH et al., 2010). Auch ein SNAP®-Schnelltest, der auf der Technik eines *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) basiert, bestätigte NT-ProBNP als zuverlässig im Detektieren von moderaten bis hochgradigen Formen feliner Kardiomyopathien. Jedoch erwies er sich als wenig sensitiv in der Diagnose von geringgradigen Stadien (MACHEN et al., 2012). FOX und Mitarbeiter (2011) hingegen kamen zu dem Ergebnis, dass sich auch mildere okkulte Formen verschiedener feliner Kardiomyopathien zuverlässig durch die Bestimmung der NT-proBNP-Konzentration von herzgesunden Katzen unterscheiden lassen (FOX et al., 2011). Auch WESS und Mitarbeiter (2011) konnten in ihrer Studie milde, moderate und schwere Formen einer HCM von herzgesunden Tieren unterscheiden. Des Weiteren wurden für einen Cut-Off-Wert von 100 pmol/L eine Sensitivität von 92,4 % und eine Spezifität von 93,9 %

ermittelt, um HCM erkrankte Katzen von herzgesunden Tieren zu unterscheiden. Ab diesem Wert wird die Empfehlung gegeben einen Herzultraschall durchführen zu lassen, um die Diagnose HCM zu bestätigen (WESS et al., 2011).

Die NT-Pro-BNP-Sekretion der Katze kann auch durch generalisierte Erkrankungen wie Hyperthyreose oder chronische Niereninsuffizienz in Kombination mit systemischer Hypertension beeinflusst werden (LALOR et al., 2009; MENAUT et al., 2012).

1.6.5 Differentialdiagnosen

Die Diagnose primäre HCM kann erst sicher gestellt werden, wenn andere (klinisch) wahrscheinliche Erkrankungen ausgeschlossen wurden, die eine konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels bedingen können. Verschiedene Krankheiten können das echokardiographische Bild einer primären HCM imitieren (GLAUS & WESS, 2010), wie beispielsweise systemische Hypertension (CHETBOUL et al., 2003; HENIK et al., 2004), feline Hyperthyreose (BOND et al., 1988), Myokarditis (MEURS et al., 2000) oder Dehydratation (CAMPBELL & KITTLESON, 2007). Sehr selten kann auch ein infiltrativer Prozess (CARTER et al., 2008) oder Akromegalie ursächlich für das phänotypische Erscheinen einer primären HCM sein (PETERSON et al., 1990; GRECO, 2012). Erst wenn wahrscheinliche Differentialdiagnosen für das Vorliegen einer Hypertrophie ausgeschlossen wurden, kann von einer primären feline HCM gesprochen werden. Daher muss bei einer linksventrikulären Myokardverdickung eine Blutdruckmessung durchgeführt werden. Zudem sollte bei älteren Katzen die T4-Konzentration bestimmt werden (KITTLESON, 1998).

1.7 Therapie

Ziele der Therapie der feline HCM sind Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie, Verbesserung der diastolischen Funktion, Reduktion von SAM, Stabilisation des CHF und Verhinderung einer Thrombusbildung (MACDONALD, 2009). Randomisierte und kontrollierte Therapiestudien mit großen Fallzahlen, die Therapieerfolg und Sicherheit eines Medikamentes untersuchen, fehlen jedoch. Daher fundiert die Therapie zumeist auf kleinen retrospektiven Studien mit niedrigem Evidenzlevel, theoretischen Vorteilen eines Wirkstoffes, Ableitungen aus der Humanmedizin und persönlicher Erfahrung (RISHNIW & PION, 2011).

Für die Therapie asymptomatischer Katzen konnte noch kein Konsensus erreicht werden, wobei dieses Thema in der Praxis sehr unterschiedlich gehandhabt wird. MACDONALD und Mitarbeiter (2006) konnten bei Katzen keinen positiven Einfluss eines Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer) auf linksventrikuläre Masse, myokardiale Fibrose, diastolische Funktion und Blutdruck nachweisen (MACDONALD et al., 2006a). Eine retrospektive Studie und eine Studie, bei der zusätzlich allen Studienkatzen Kalziumkanalblocker verabreicht wurden, ermittelten hingegen durch Gabe eines ACE-Hemmers eine Abnahme der linksventrikulären Wandverdickung mittels Herzultraschall (RUSH et al., 1998; AMBERGER et al., 1999). Von einem β -Blocker verspricht man sich, dass er durch seine negativ inotrope und chronotrope Wirkung den myokardialen Sauerstoffverbrauchs verringert und die diastolische Funktion verbessert. Zudem soll die Schwere einer linksventrikulären Ausflusstraktobstruktion verringert und mögliche Rhythmusstörungen reduziert werden (LOPEZ-SENDON et al., 2004; SCHOBER et al., 2007b). So konnte intravenös verabreichtes Esmolol bei Katzen mit hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie die Flussgeschwindigkeit im linksventrikulären Ausflusstrakt senken und die Herzfrequenz verringern (WEY & KITTLESON, 2000). Bei Katzen mit hochgradiger, kompensierter HCM konnte jedoch durch die Gabe von Atenolol keine Senkung von NT-ProBNP oder cTnI erzielt werden, welche als Marker für Ischämie und Myozytenuntergang dienen (JUNG & KITTLESON, 2011). Ebenso wurde bei Katzen, die im CHF waren, kein Überlebensvorteil der Therapie Furosemid und Atenolol in Kombination im Vergleich zu Furosemid als Monotherapie nachgewiesen (FOX, 2003b). Des Weiteren wurde der Einfluss von Atenolol auf das 5-Jahres-Überleben von Katzen mit HCM im subklinischen Stadium untersucht. Es konnte kein Unterschied zum Überleben von unbehandelten Tieren festgestellt werden (SCHOBER et al., 2013b). Ähnliche Vorteile, welche man sich von einem β -Blocker verspricht, erhofft man sich von einem Calciumkanalblocker wie Diltiazem. Bisher wurde nur in einer kleinen, unkontrollierten Studie ein positiver Effekt von Diltiazem auf Klinik, Wanddicke und diastolische Funktion bei Katzen mit dekompensierter HCM gesehen (BRIGHT et al., 1991; SCHOBER et al., 2007b).

Eine antikoagulatorische Therapie dient dazu, das Risiko einer Thrombusbildung und der damit verbundenen Komplikation der ATE zu minimieren. Ab welchem

Stadium eine solche Therapie indiziert ist, ist bisher nicht festgelegt. Als Faktoren für ein erhöhtes Thromboserisiko werden ein stark vergrößertes LA, spontaner echokardiographischer Kontrast, ein bereits gebildeter Thrombus oder vorherige Episoden einer ATE gesehen (MACDONALD, 2009; COTE et al., 2011). Häufig eingesetzte Wirkstoffe sind Acetylsalicylsäure, Clopidogrel oder niedermolekulares Heparin (SMITH et al., 2003; HOGAN et al., 2004; SMITH et al., 2004; VARGO et al., 2009). Studien über Wirksamkeit, optimale Dosierung und Nebenwirkungen sind bislang unzureichend (SMITH, 2012). Bei einer prospektiven doppelt-geblindeten Multicenterstudie wurden die Überlebenszeiten von Katzen verglichen, die nach einer Episode einer ATE Clopidogrel oder Acetylsalicylsäure erhielten. Es konnte eine signifikant längere Überlebenszeit für Tiere der Clopidogrel-Gruppe festgestellt werden (HOGAN et al., 2013).

Geeignete Mittel, um eine Katze im akuten Herzversagen zu stabilisieren, sind Sauerstoffapplikation, Diurese und die Drainage von Körperhöhlenergüssen (FUENTES, 2008). Bei Katzen im durch HCM bedingtem Herzversagen konnte bisher kein Überlebensvorteil einer Kombinationstherapie aus Furosemid mit jeweils einem β -Blocker oder einem ACE-Hemmer im Vergleich zu Furosemid alleine aufgezeigt werden (FOX, 2003b). Für Katzen im Herzversagen wird jedoch meist eine Kombination aus Furosemid und einem ACE-Hemmer als Standardtherapie angesehen (RISHNIW & PION, 2011). Dekompensierten Katzen mit systolischer Dysfunktion, wie bei einer *burnout*-HCM, wurde der positiv inotrope Wirkstoff Pimobendan gegeben. Dadurch konnte im Vergleich zu Studienpopulationen mit ähnlichen kardiologischen Befunden eine signifikant längere Überlebenszeit erzielt werden (FOX et al., 1997; GORDON et al., 2012; HAMBROOK & BENNETT, 2012).

2 Mikro-Ribonukleinsäure

MiRNA zählt zusammen mit kleiner interferierender Ribonukleinsäure (*small interfering ribonucleic acid*, siRNA) und PIWI-Proteinen interagierender Ribonukleinsäure (*Piwi-interacting ribonucleic acid*, piRNA) zu der Gruppe der kleinen, nicht-kodierenden Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, RNA). Diese nehmen über RNA-Interferenz (RNA-I) und analoge Mechanismen Einfluss auf die Genexpression (AMBROS & CHEN, 2007; JINEK & DOUDNA, 2009; SIOMI et al., 2011). MiRNAs sind einsträngige Moleküle, die 18 - 25 Nukleotide

umfassen. Sie sind an der posttranskriptionellen Regulation proteinkodierender Gene durch Bindung spezifischer Ziel-mRNA beteiligt (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004).

1993 wurde die erste miRNA erstmals in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) beschrieben (LEE et al., 1993). 20 Jahre später sind in der elektronischen miRNA-Datenbank miRBase Version 20 (Juni 2013) 30 424 mature miRNAs in 206 Spezies erfasst (KOZOMARA & GRIFFITHS-JONES, 2011).

2.1 Biogenese

MiRNAs sind beim Säugetier auf allen Chromosomen außer dem Y-Chromosom zu finden (GUO et al., 2009). Die Position von miRNAs innerhalb des Genoms variiert. MiRNAs können in intergenetischen Regionen, in Transkriptionseinheiten nicht-proteinkodierender Exons oder in Transkriptionseinheiten proteinkodierender und nicht-kodierender Introns lokalisiert sein (RODRIGUEZ et al., 2004; THATCHER et al., 2008; OLENA & PATTON, 2010). Bei Säugetieren sind schätzungsweise 50 % der miRNAs in Introns proteinkodierender Gene kodiert (RODRIGUEZ et al., 2004). MiRNAs können entweder einzeln (monocistronisch) oder zusammen als Cluster von einem gemeinsamen Promotor (polycistronisch) transkribiert werden (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; LAGOS-QUINTANA et al., 2003; OLENA & PATTON, 2010).

Die Prozessierung zu reifer miRNA findet zu Teilen im Zellkern und im Zytoplasma statt. Die Transkription von miRNA Genen erfolgt über die RNA Polymerase II (LEE et al., 2004), wobei auch Transkription durch die RNA Polymerase III nachgewiesen wurde (PFEFFER et al., 2005; BORCHERT et al., 2006). Zunächst entsteht ein Primärtranskript (*primary micro ribonucleic acid*, pri-miRNA), dessen Länge mehrere hundert bis tausende Nukleotide erreichen kann. Im Nukleus erfolgt die weitere Prozessierung durch Drosha, einer Nuklease der RNase III Familie, zu einer Vorläufer-miRNA mit Haarnadelstruktur (*precursor micro-ribonucleic acid*, pre-miRNA) (LEE et al., 2003). Hierfür benötigt Drosha den Cofaktor *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8)-Protein, der bei *Drosophila* als Pasha bekannt ist. Drosha und DGCR8 bilden einen Mikroprozessor-Komplex von ungefähr 500 Kilodalton. Während DGCR8/Pasha die Haarnadelstruktur erkennt und den Doppelstrang bindet,

schneidet Drosha asymmetrisch und spezifisch beide Enden nahe der Basis der Stammschleife. Schließlich entsteht pre-miRNA von ungefähr 70 Nukleotiden Länge (LEE et al., 2003; DENLI et al., 2004; GREGORY et al., 2004). Bestimmte miRNAs, sogenannte miRtrons, überspringen die Prozessierung durch Drosha/DGCR8, wenn sie in einem proteinkodierenden Intron kodiert sind. Dabei entsteht direkt pre-miRNA durch Spleißen des primären Transkriptes (OKAMURA et al., 2007).

Pre-miRNA wird via des Transport-Rezeptor-Komplexes Exportin-5/Ran-GTP ins Zytoplasma exportiert (YI et al., 2003). Im Zytoplasma formiert sich der *RNA-induced silencing complex loading complex* (RLC), ein Multiproteinkomplex, der zunächst die weitere zytoplasmatische Prozessierung vermittelt. Beim Menschen besteht dieser aus Dicer, einer Endonuklease der RNase II Familie, und seinen Cofaktoren TRBP und Argonaut 2 (Ago2) (CHENDRIMADA et al., 2005; MANIATAKI & MOURELATOS, 2005; MACRAE et al., 2008). Bei *Drosophila* dient Loquacious/R3D1 als Cofaktor für Dicer-1 (FORSTEMANN et al., 2005). Nach Erkennung und Bindung der pre-miRNA durch den RLC, schneidet Dicer diese zu einer ungefähr 22 Nukleotiden langen miRNA:miRNA* Duplex mit 5'-Phosphatgruppe und einem zwei Nukleotiden langen 3'-Überhang (HUTVAGNER et al., 2001; ZHANG et al., 2004; HAMMOND, 2005). Bei manchen miRNAs wird, vor der Spaltung durch Dicer, der zukünftige *Strang (*passenger strand*) durch Ago2 zuerst zu einer gekerbten Haarnadelstruktur gespalten (*Ago2-cleaved precursor miRNA*, ac-pre-miRNA) (DIEDERICHS & HABER, 2007). Nach der Dicer-medierten Spaltung dissoziieren Dicer und TRBP von der miRNA:miRNA* Duplex. Die doppelsträngige miRNA wird entwunden und in der Regel wird der *Strang abgebaut (DIEDERICHS & HABER, 2007). Der andere mature Strang hat ein 5'-Ende, dass im Vergleich weniger stabil gepaart ist (KHVOROVA et al., 2003). Er wird an ein Argonaut-Protein gebunden und bildet den Kern des *miRNA-containing RNA-induced silencing complex* (miRISC) (LIU et al., 2004b; MEISTER et al., 2004; FABIAN & SONENBERG, 2012). MiRISC reprimiert die Expression spezifischer Gene durch Ausschaltung von mRNA mittels verschiedener Mechanismen (YEKTA et al., 2004; BAGGA et al., 2005; PETERSEN et al., 2006; CHENDRIMADA et al., 2007; KIRIAKIDOU et al., 2007). Dabei kann miRNA als Sensor beschrieben werden, der durch seine komplementäre Struktur bestimmte Nukleotidsequenzen

der Ziel-mRNA erkennt, während die beteiligten Proteine die Effektoren der Gen-Inaktivierung darstellen (FABIAN & SONENBERG, 2012).

2.2 Wirkmechanismen

Es wird geschätzt, dass miRNAs 30 % - 60 % der proteinkodierenden Gene des Menschen regulieren (BEREZIKOV et al., 2005; LEWIS et al., 2005; FRIEDMAN et al., 2009). Unabhängig von den spezifischen Mechanismen erfolgt die Regulation der Genexpression auf der posttranskriptionellen Ebene. Die genauen zugrunde liegenden Abläufe sind noch nicht vollständig aufgeklärt (EULALIO et al., 2008).

Durch Inkorporation in RISC führt miRNA den Komplex durch Basenpaarung zur spezifischen Ziel-mRNA. Bei Tieren findet sich nur sehr selten eine nahezu perfekte Komplementarität zwischen mRNA und miRNA, wie sie bei Pflanzen zu finden ist (RHOADES et al., 2002). Bei Tieren bindet sich die miRNA an spezifische miRNA-Erkennungselemente (*miRNA recognition elements*, MREs) ihrer Ziel-mRNA, die im 3'-untranslatierten Bereich (*untranslated region*, UTR) lokalisiert sind. Dabei bindet miRNA meist nur mit der sich über 2 – 8 Nukleotide erstreckenden proximalen 5'-Region, die als *seed region* bezeichnet wird. Die restliche miRNA-Sequenz hybridisiert nur unvollkommen mit ihrem Ziel (LEWIS et al., 2003). In tierischen Zellen werden drei grundsätzliche Wege der miRNA-medierten post-transkriptionellen Genregulation postuliert, die wiederum über verschiedene Mechanismen beeinflusst werden sollen.

Ein Modell beschreibt, wie miRNAs durch Reprimierung der Translation ihren Einfluss auf die Proteinsynthese ausüben.

Die genauen Vorgänge sind bisher noch nicht hinreichend aufgeklärt (CHEKULAEVA & FILIPOWICZ, 2009). Es gibt Studien, die darauf hinweisen, dass miRNAs die Translation in der Phase der Initiation blockieren (HUMPHREYS et al., 2005; PILLAI et al., 2005; CHENDRIMADA et al., 2007; MATHONNET et al., 2007; WAKIYAMA et al., 2007). Die Ergebnisse anderer Studien hingegen lassen auf eine Blockierung der Translation nach Initiation schließen (SEGGERSON et al., 2002; MARONEY et al., 2006; NOTTROT et al., 2006; PETERSEN et al., 2006). Die Translation wird möglicherweise am *cap-recognition step* inhibiert, was Einfluss auf die Initiation ausübt. Dabei konkurrieren Argonaut-Proteine mit eIF4E an der Cap-Struktur (KIRIAKIDOU et

al., 2007). Nach einer Studie von CHENDRIMADA und Mitarbeitern (2007) inhibiert miRNA die Translation, indem RISC eIF6 rekrutiert. Dies verhindert, dass sich große und kleine ribosomale Einheiten verbinden (CHENDRIMADA et al., 2007). Ein Modell, das auf den Ergebnissen von PETERSON und Mitarbeitern (2006) beruht, beschreibt eine Reprimierung der Translation nach Initiation durch ein vorzeitiges Abfallen der Ribosomen (*ribosome drop-off*) (PETERSEN et al., 2006).

Eine etablierte Vorstellung der miRNA-medierte post-transkriptionellen Genregulation ist die Destabilisierung der Ziel-mRNA durch Deadenylierung und Decapping (CHEKULAEVA & FILIPOWICZ, 2009).

Dieser konnte sowohl durch *in vivo* (BAGGA et al., 2005; GIRALDEZ et al., 2006), als auch *in vitro* Studien nachgewiesen werden (WU et al., 2006). Initiierender Schritt ist immer die Kürzung des Poly(A)-Schwanzes der mRNA (Deadenylierung) durch RISC. Damit ist die mRNA angreifbar für den Abbau, entweder durch progressiven 3' → 5' Abbau durch Exonukleasen des Exosoms oder durch Entfernung der 5' Kappe gefolgt von 5' → 3' Abbau durch die Exonuklease Xrn1 (FILIPOWICZ et al., 2008).

Ein bei Tieren sehr seltener Mechanismus ist die direkte mRNA-Spaltung, da diese nur bei (nahezu) perfekter Komplementarität auftritt (LLAVE et al., 2002; DU & ZAMORE, 2005). Ein Beispiel ist miR-196, welche direkt die transkribierte mRNA von HOXB8 spaltet (YEKTA et al., 2004).

2.3 Die Rolle von Mikro-Ribonukleinsäure bei physiologischen und pathologischen Prozessen

MiRNAs sind an der Steuerung eines breiten Spektrums grundlegender Vorgänge wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (BRENNECKE et al., 2003; XU et al., 2003; CHEN et al., 2004).

Dabei fungieren miRNAs beispielsweise in der ontogenetischen Entwicklung als essentielle Regulatoren (BERNSTEIN et al., 2003; SUN et al., 2010). So konnte nachgewiesen werden, dass miRNAs bei der Differenzierung spezieller Organsysteme, wie die des kardiovaskulären Systems, eine wichtige Rolle spielen: Mausembryonen, die durch das selektive Ausschalten des Enzyms Dicer im Herzen nicht in der Lage waren, reife miRNA zu produzieren, starben früh an Herzversagen (ZHAO et al., 2007).

Des Weiteren wird miRNA eine zentrale Bedeutung bei der Genese unterschiedlicher Krankheitsbilder beigemessen. Die temporäre miRNA-Expression korreliert hierbei mit dem spezifischen pathologischen Status des entsprechenden Organs (SUN et al., 2010). Darauf soll im Folgenden eingegangen werden.

2.3.1 Nicht-kardiale Erkrankungen

Die erste Arbeit, die einen Zusammenhang zwischen miRNA-Deregulation und Krankheit belegen konnte, stammt von CALIN und Mitarbeitern (2002). Hier wurde bei der Mehrheit von Fällen chronisch lymphozytärer Leukämie eine Deletion oder erniedrigte Expression jener Genregionen nachgewiesen, die für miR-15 und miR-16 kodieren (CALIN et al., 2002). Seither wurden diverse Studien durchgeführt, die sich mit der Rolle von miRNA bei pathologischen Geschehen beschäftigten. Veränderte miRNA-Expressionen konnten bereits bei unterschiedlichen neoplastische Erkrankungen (LU et al., 2005), Endokrinopathien (HERRERA et al., 2010; MAO et al., 2010), Autoimmunerkrankungen (PAULEY et al., 2008; WANG et al., 2012b), viralen Infektionen (UMBACH et al., 2008) sowie bei neurodegenerativen Zuständen belegt werden (COGSWELL et al., 2008; ASIKAINEN et al., 2010).

2.3.2 Kardiale Erkrankungen

MiRNAs sind auch notwendig für die Erhaltung der physiologischen Funktion des Herzens. So führt das Ausschalten von myokardialem Dicer und dem damit verbundenen Fehlen von maturer miRNA im Myokard bei adulten Mäusen zu massivem kardialen Remodeling mit Myozytenhypertrophie und Reaktivierung des fetalen Genprogrammes (DA COSTA MARTINS et al., 2008).

Bisher konnte im Nagermodell (JI et al., 2009; JEONG et al., 2012; ENDO et al., 2013; VIGNIER et al., 2013), beim Haushund (STEUDEMANN et al., 2013; XU et al., 2013) und beim Menschen ein Zusammenhang von deregulierten miRNAs und unterschiedlichen Herzerkrankungen beobachtet werden.

In humanmedizinischen Arbeiten ist bisher eine abweichende miRNA-Expression bei kardialer Hypertrophie (PALACIN et al., 2011), Herzversagen (GOREN et al., 2012), diastolischer Dysfunktion (NAIR et al., 2012), verminderter Kontraktilität (LEPTIDIS et al., 2013) und bei ischämischen Kardiomyopathien nachgewiesen (ADACHI et al., 2010). Die Expression von miRNA bei felines

Herzerkrankungen wurde bislang nicht untersucht.

Diverse Studien haben sich mit der Fragestellung beschäftigt, ob eine veränderte miRNA-Expression Ursache oder Folge von pathologischen Zuständen ist. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist der Nachweis gelungen, dass die Modulation des Expressionslevels spezifischer miRNAs kardiale Hypertrophie und Herzversagen zur Folge haben können (VAN ROOIJ et al., 2006; CARE et al., 2007; TATSUGUCHI et al., 2007; MATKOVICH et al., 2012; WANG et al., 2012c; XU et al., 2012). Ebenso konnte durch Modifikation der miRNA-Expression Hypertrophie und Herzversagen verhindert oder reduziert werden (CHENG et al., 2007; TATSUGUCHI et al., 2007; CALLIS et al., 2009; SONG et al., 2010; WANG et al., 2012c; XU et al., 2012).

2.3.2.1 Konzentrische Hypertrophie des Herzens

Eine konzentrische Hypertrophie ist eine Wanddickenzunahme des Herzens, wobei das Verhältnis von Wanddicke zu Gesamtkammerdimension ansteigt (LORELL & CARABELLO, 2000). Dieses Erscheinungsbild kann nicht nur Ausdruck einer primären HCM sein, sondern auch kompensatorisch als Adaption des Herzens auf beispielsweise chronische Drucküberlastung auftreten (FREY et al., 2004; GLAUS & WESS, 2010; GÖKTEPE et al., 2010).

An verschiedenen Tiermodellen wurde ein Zusammenhang von erhöht oder erniedrigt exprimierten miRNAs und reaktiver konzentrischer Myokardhypertrophie demonstriert (VAN ROOIJ et al., 2006; CARE et al., 2007; CHENG et al., 2007; SAYED et al., 2007; TATSUGUCHI et al., 2007; SONG et al., 2010; XU et al., 2012).

VAN ROOIJ und Mitarbeiter (2006) erzeugten zwei Modelle von kompensatorischer konzentrischer Hypertrophie bei Mäusen. Die Hypertrophie wurde durch das Abbinden der thorakalen Aorta oder Calcineurin A induziert. Die Analyse der miRNA-Signatur des Myokards ergab übereinstimmend in beiden Modellen 21 unterschiedlich exprimierte miRNAs im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen oder Wurfgeschwistern (VAN ROOIJ et al., 2006). Eine erhöhte Expression von fünf dieser miRNAs konnte beim Menschen im idiopathischen Herzversagen nachgewiesen werden. Es wurde geschlossen, dass diese miRNAs einen Teil der Signatur von kardialem Remodeling repräsentieren könnten (VAN ROOIJ et al., 2006). Mittels künstlicher

Konstriktion der abdominalen Aorta wurde bei Ratten eine reaktive kardiale Hypertrophie erzeugt und es konnte zu verschiedenen Zeitpunkten differierende miRNA-Signaturen festgestellt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass spezifische miRNAs bei unterschiedlichen Hypertrophiestadien verändert exprimiert werden und als Modulatoren des pathologischen Prozesses wirken (SONG et al., 2010).

SAYED und Mitarbeitern (2007) ist es gelungen, eine Abweichung der miRNA-Expression auch bereits vor Eintritt von makropathologischen Veränderungen des Herzens nachzuweisen. Sie induzierten bei Mäusen ebenfalls durch Drucküberlastung eine kompensatorische konzentrische Hypertrophie. Einen Tag post-OP waren fünf miRNAs dereguliert, aber noch kein Unterschied des relativen Herzgewichtes von Proben-Tieren im Vergleich zu Kontroll-Tieren auszumachen (SAYED et al., 2007).

Auch bei konzentrischer Hypertrophie aufgrund einer primären HCM, konnte bereits bei Mäusen und Menschen veränderte miRNA-Expressionen dokumentiert werden (CARE et al., 2007; PALACIN et al., 2011; BAGNALL et al., 2012; LEPTIDIS et al., 2013; VIGNIER et al., 2013).

Bei transgenen Mäusen, deren primäre HCM durch eine Mutation von MYBP3 erzeugt wurde, wurden sieben deregulierte miRNAs gefunden. Beim Vergleich mit anderen Erkrankungen der quergestreiften Muskulatur, wie der Muskeldystrophie des Typs Duchenne oder der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, waren sechs miRNAs exklusiv nur bei dem HCM-Modell verändert (VIGNIER et al., 2013). Eine Deregulation von miRNA konnte auch schon in sehr frühen Stadien einer primären HCM nachgewiesen werden: Die Analyse des myokardialen miRNA-Expressionsprofils von transgenen Mäusen mit primärer HCM ergab bereits im *pre-disease*-Stadium (5. Lebensstag) abnorme Mengen von miR-1 und miR-133a (BAGNALL et al., 2012). Eine abweichende Expression von miR-1 und miR-133 ließ sich auch im Endomyokard von Menschen mit primärer HCM nachweisen (CARE et al., 2007). Anhand humaner Myokardproben wurde das miRNA-Expressionsprofil von hypertrophierten Herzen mit gesunden Herzen verglichen (PALACIN et al., 2011). Zwei der hypertrophierten Herzen entsprachen einer primären HCM und drei Herzen waren reaktiv hypertroph sekundär zu Klappenerkrankungen. In der hypertrophen Gruppe waren zehn miRNAs signifikant höher und zwei miRNAs signifikant

niedriger exprimiert. Nur miR-495 erwies sich als nicht einheitlich innerhalb der hypertrophen Gruppe mit einer erniedrigten Expression bei der primären HCM und einer erhöhten Expression in der sekundär hypertrophen Untergruppe (PALACIN et al., 2011). Beim Vergleich von miR-221 im humanen Myokard bei primärer HCM mit einer herzgesunden Kontrollgruppe, konnte eine signifikant erhöhte Expression von miR-221 festgestellt werden (WANG et al., 2012a). Die Analyse zehn ausgewählter miRNAs im Plasma ergab hingegen keinen Unterschied bei primärer HCM gegenüber herzgesunden Patienten (PALACIN et al., 2012).

2.3.2.2 Kongestives Herzversagen

In der Humanmedizin wird Herzversagen definiert als Zustand, bei dem durch eine abnormale kardiale Struktur oder Funktion das Herz nicht mehr in der Lage ist, das Gewebe mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Der Begriff CHF beschreibt akutes oder chronisches Herzversagen mit Anzeichen von Kongestion, also Blutüberfüllung der Gefäße, durch beispielsweise Natrium- und Wasserretention (MCMURRAY et al., 2012). Ursachen für CHF beim Menschen sind unter anderem koronare Herzerkrankungen, Hypertension, Klappenerkrankungen, ischämische Kardiomyopathien, HCM oder RCM (RICH, 1997). Bei der Katze ist die häufigste Herzerkrankung, der CHF zugrunde liegt, die HCM (FERASIN et al., 2003; RIESEN et al., 2007b; SMITH & DUKES-MCEWAN, 2012).

THUM und Mitarbeiter (2007) konnten bei Menschen im Herzversagen die Reaktivierung von fetalen Genen aufzeigen. Hierbei verglichen sie die mRNA- und miRNA-Expressionsprofile von normalen mit versagenden Herzen anhand von Myokardproben. Dabei wurden 67 erhöht- und 43 erniedrigt exprimierte miRNAs in versagenden Herzen im Vergleich zu gesunden Herzen identifiziert. Dieses spezifische Expressionsmuster korreliert zu mehr als 80 % mit dem im fetalen Stadium (THUM et al., 2007).

Einige klinische Studien in der Humanmedizin konnten bei Herzversagen unterschiedliche miRNA-Expressionsmuster in Abhängigkeit ihrer Ätiologie nachweisen.

IKEDA und Mitarbeiter (2010) verglichen das miRNA-Profil von Patienten im Herzversagen unterschiedlicher Genese untereinander (Ischämische

Kardiomyopathie [ICM], DCM und Aortenstenose) und mit einer herzgesunden Kontrollgruppe. Bei Patienten mit Aortenstenose waren 13 miRNAs differierend exprimiert gegenüber der herzgesunden Kontrollgruppe und Patienten mit ICM und DCM. Bei ICM und DCM waren wiederum acht miRNAs abweichend exprimiert, die sich nicht mit Kontrollgruppe und Aortenstenose überschneiden. IKEDA und Mitarbeiter kamen zu dem Ergebnis, dass die Proben anhand ihrer miRNA Expressionsprofile ihren unterschiedlichen Krankheitsursachen zugeordnet werden konnten (IKEDA et al., 2007). SUCHAROV und Mitarbeiter (2008) extrahierten miRNA aus Myokardproben von Patienten mit DCM und ICM und von Patienten, die nicht im Herzversagen waren. Sie verglichen ebenfalls die miRNA-Expressionsprofile mittels Microarray. Es ließen sich einige miRNAs nachweisen, die im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bei DCM und ICM ähnlich abweichend exprimiert waren. Zudem erwiesen sich einige miRNAs als spezifisch für die jeweilige zugrunde liegende Ursache (SUCHAROV et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde zirkulierende miRNA in peripheren mononukleären Blutzellen bei Patienten, die sich im CHF unterschiedlicher Genese befanden, untersucht. Beim Vergleich der miRNA-Profile von CHF und der herzgesunden Kontrollgruppe, waren sowohl bei ICM, als auch bei DCM übereinstimmend miR-107, miR-139 und miR-142-p5 niedriger exprimiert. Andere miRNAs waren jeweils nur bei einer bestimmten Herzerkrankung abnormal exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe (VOELLENKLE et al., 2010). In einer Arbeit von TIJSEN und Mitarbeitern (2010) erwies sich miR-423-5p im Plasma als die sensitivste und spezifischste miRNA, um akutes Herzversagen von nicht-kardial bedingter Dyspnoe und einer gesunden Kontrollgruppe zu unterscheiden (TIJSEN et al., 2010). CHEN und Mitarbeiter (2010) konnten eine signifikant erniedrigte Expression von miR-361-5p bei Menschen im CHF im Vergleich zur herzgesunden Kontrollgruppe feststellen (CHEN et al., 2010). Bei 50 Patienten, die sich durch eine DCM im Herzversagen befanden, konnte bei acht miRNAs ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu herzgesunden Personen nachgewiesen werden (NAGA PRASAD et al., 2009).

Durch die Analyse des miRNA-Musters lassen sich nicht nur Hinweise auf die zugrunde liegende Ursache von CHF finden. Darüber hinaus belegen einige Studien auch eine dynamisch alternierende miRNA-Expression in Abhängigkeit

des Krankheitsstadiums.

In einer humanmedizinischen Studie wurden miRNA-Signaturen des Myokards bei Patienten im Herzversagen mit einer herzgesunden Kontrollgruppe und mit Patienten mit einem linksventrikulären Herzunterstützungssystem (*left ventricular assist device*) verglichen. In der behandelten Gruppe normalisierten sich 20 der 28 miRNAs, die bei Patienten im Herzversagen erhöht exprimiert waren (MATKOVICH et al., 2009). Des Weiteren konnten in humanmedizinischen Studien für verschiedene zirkulierende miRNAs gezeigt werden, dass deren Expressionsstärke mit der Schwere des Herzversagens (gemäß *New York Heart Association* (NYHA)-Klassifikation) korreliert (TIJSEN et al., 2010; FUKUSHIMA et al., 2011). Die NYHA-Klassifikation ist ein System, um Herzversagen zu beurteilen und beruht auf der Schwere der klinischen Symptome und der körperlicher Leistungsfähigkeit des Patienten (MCMURRAY et al., 2012). Zudem wurde auch ein Zusammenhang zwischen Höhe der miRNA-Expression und klinischen Parametern wie der Durchmesser des linken Atriums beschrieben (GOREN et al., 2012).

2.4 Mikro-Ribonukleinsäure in der Zirkulation

MiRNAs sind intrazellulär in dem Organ ihrer Synthese lokalisiert und aus Gewebeproben extrahierbar (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; LIU et al., 2004a). Zudem sind sie auch in verschiedenen transzellulären Körperflüssigkeiten nachzuweisen (WEBER et al., 2010). Dadurch ist die Voraussetzung einer schnellen und einfachen Probengewinnung gegeben.

Neben humanem Serum und Plasma sind miRNAs in unterschiedlicher Konzentration und Anzahl auch aus Muttermilch, Speichel, Tränenflüssigkeit, Sperma, Urin oder Zerebrospinalflüssigkeit isolierbar (WEBER et al., 2010). Die Anwesenheit von miRNAs in Serum konnte beim Menschen, Mäusen, Ratten, Kälbern, Pferden (CHEN et al., 2008) und Haushunden nachgewiesen werden (STEUDEMANN et al., 2013). Eine klinische Studie aus der Veterinärmedizin hat das miRNA-Expressionsmuster im Serum von an Diabetes mellitus erkrankten und gesunden Katzen analysiert. Dabei konnten Signale von mehr als 200 miRNAs detektiert werden (FLEISCHHACKER et al., 2013).

Trotz der Anwesenheit von Ribonukleasen in Serum und anderen Körperflüssigkeiten (WEICKMANN & GLITZ, 1982) zeichnen sich miRNAs

durch eine hohe Stabilität aus. Selbst bei experimenteller Zugabe von RNase A, erwiesen sich miRNAs als resistent gegen den Abbau (CHEN et al., 2008). Auch beim Vergleich nativer Serumproben mit Serumproben, die gekocht, lange gelagert oder extremen pH-Werten und Temperaturen ausgesetzt waren, war ein signifikanter Unterschied der miRNA-Signatur nicht festzustellen (CHEN et al., 2008). Beim Vergleich verschiedener Blutfraktionen wie Vollblut, Serum, Plasma, Blutplättchen oder mononukleäre Zellen wurde eine Überlappung der detektierten miRNAs festgestellt. In Abhängigkeit des Aliquots variierten einige miRNAs in Höhe ihrer Expression oder waren sogar spezifisch für dieses (FREEDMAN et al., 2012). Eine gute Korrelation wurde beim Vergleich der miRNA-Profile zwischen Serum und Plasma nachgewiesen (MITCHELL et al., 2008; D'ALESSANDRA et al., 2010).

Diese beschriebenen Eigenschaften (hoher Stabilität in Körperflüssigkeiten und Variation der miRNA-Expression in Abhängigkeit der Blutbestandteile) legen die Vermutung nahe, dass miRNAs nicht nur passiv durch Zelluntergang austreten können, sondern auch über selektive Mechanismen in die Zirkulation gelangen (ZHU & FAN, 2011). So konnten extrazelluläre miRNAs auch in Mikrovesikeln (HUNTER et al., 2008), Exosomen (VALADI et al., 2007), apoptotischen Körpern (ZERNECKE et al., 2009) und in Komplexen mit Proteinen nachgewiesen werden (WANG et al., 2010b).

Für verschiedene Krankheitsbilder konnte eine Korrelation zwischen der Konzentration und Konstellation extrazellulärer miRNA gezeigt werden (MITCHELL et al., 2008; RABINOWITS et al., 2009; KONG et al., 2011). So wiesen MITCHELL und Mitarbeiter (2008) nach, dass miRNA im menschlichen Plasma bemerkenswert stabil ist und dass mittels zirkulierender miR-141 Menschen mit Prostatakrebs von einer gesunden Kontrollgruppe unterschieden werden können (MITCHELL et al., 2008). In weiteren Studien wurden auch für andere Neoplasien Hinweise darauf gefunden, dass zirkulierende miRNAs den pathologischen Status des erkrankten Gewebes reflektieren (TAYLOR & GERCEL-TAYLOR, 2008; LODES et al., 2009; ZHAO et al., 2010).

Auch für kardiovaskuläre Erkrankungen konnte bereits ein Zusammenhang der Qualität und Quantität verschiedener extrazellulärer miRNA-Signaturen belegt werden. Es wurden signifikante Abweichungen des miRNA-Musters im Blut bei ischämischen Herzerkrankungen, akutem oder chronischem Herzversagen

verschiedener Genese und primärer HCM nachgewiesen (ADACHI et al., 2010; AI et al., 2010; CHEN et al., 2010; CORSTEN et al., 2010; D'ALESSANDRA et al., 2010; FICHTLSCHERER et al., 2010; TIJSEN et al., 2010; VOELLENKLE et al., 2010; WANG et al., 2010a; FUKUSHIMA et al., 2011; WIDERA et al., 2011; GOREN et al., 2012; MATSUMOTO et al., 2012; VIGNIER et al., 2013).

2.5 Methoden zum Nachweis von Mikro-Ribonukleinsäuren

Es sind verschiedene Techniken beschrieben, die der Detektion von miRNA aus gewonnenem Probenmaterial dienen. Die meisten Techniken setzen voraus, dass die Sequenzen der zu untersuchenden miRNAs bereits bekannt sind (DE PLANELL-SAGUER & RODICIO, 2011). Häufig verwendete Methoden sind beispielsweise Microarray-Analysen (LIU et al., 2004a; NELSON et al., 2004; THOMSON et al., 2004; BEUVINK et al., 2007) oder Variationen der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (MESTDAGH et al., 2008; KROH et al., 2010; KANG et al., 2012). Weitere Verfahren stellen der Northern Blot (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; AMBROS et al., 2003), in-situ-Hybridisierung (CHEN, 2004) oder die jüngst eingeführte Technologie des *deep sequencing* dar, die auch die Ermittlung neuer miRNA-Sequenzen erlaubt (LEPTIDIS et al., 2013).

Für den Nachweis und die Quantifizierung von miRNA aus Serum, Plasma oder Gewebeproben durch quantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, qRT-PCR) sind unterschiedliche Protokolle beschrieben (CHEN et al., 2005; RAYMOND et al., 2005; MESTDAGH et al., 2008; YANG et al., 2009; KROH et al., 2010). Dabei kann die qRT-PCR sowohl zum Erstellen eines miRNA-Profiles durch Analyse vieler miRNAs gleichzeitig (MESTDAGH et al., 2008), als auch zur Validierung anderer Methoden eingesetzt werden (D'ALESSANDRA et al., 2010).

Die parallele Ermittlung der Expression hunderter miRNAs aus einer Probe ist durch die Analyse mittels Microarray möglich. Der Nachweis basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren zwischen Ziel-miRNA und komplementären Sonden (LI & RUAN, 2009). Dem Schema eines Microarrays entsprechend werden Sonden (*probes*), wie DNA-Oligonukleotide (BARAD et al., 2004; NELSON et al., 2004) oder andere Nukleinsäuren (CASTOLDI et al., 2006) auf

dem Trägermaterial immobilisiert. Die miRNAs des Probenmaterials werden direkt (BABAK et al., 2004; THOMSON et al., 2004) oder nach Umschreiben in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (*complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) indirekt mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert (BARAD et al., 2004; LIU et al., 2004a). Anschließend werden sie zur Hybridisierung mit den Sonden auf den präparierten Microarray verbracht. Nach der Auswaschung von ungebundener miRNA oder cDNA wird die Intensität der Fluoreszenz jeder einzelnen Lokalisation (*feature*) gemessen (LI & RUAN, 2009).

Die Präzision der Methoden zum Nachweis von miRNA, wie der Microarray oder die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative real-time PCR*, qPCR), ist auch abhängig von adäquater Normalisierung der miRNA-Daten. Bisher konnte jedoch noch keine einheitliche Methode etabliert werden. Eine mögliche Herangehensweise ist die Nutzung von kleinen, nicht-kodierende RNAs, wie 5S (TAKAMIZAWA et al., 2004), U6 (CHOONG et al., 2007), 18S (IORIO et al., 2007) oder Referenz-miRNAs, wie miR-191 oder miR-103 (PELTIER & LATHAM, 2008). Möglich ist auch die Zugabe synthetischer miRNA, korrespondierend zu bekannten miRNAs von *C. elegans* wie cel-miR-39, cel-miR-54 oder cel-miR-238 (MITCHELL et al., 2008; FICHTLSCHERER et al., 2010). Alternative Methoden zur Normalisierung von qRT-PCR-Daten ist die Berechnung des mittleren Expressionswertes (*mean expression value*) (PELTIER & LATHAM, 2008; MESTDAGH et al., 2009) oder die Quantil-Normalisierung (MAR et al., 2009).

2.6 Funktionsanalyse von Mikro-Ribonukleinsäuren

Durch Identifikation von miRNA und deren Einordnung in biologische Prozesse erhofft man sich neue Erkenntnisse und Einblicke in die pathophysiologischen Vorgänge verschiedenster Krankheiten (IKEDA et al., 2009; SU et al., 2009; ZHANG et al., 2012b; SHWETHA et al., 2013). Für die Bestimmung der genauen Funktion von miRNAs sind diverse Ansätze beschrieben. Eine Möglichkeit ist die Identifikation der Zielgene, an die man sich über bioinformatische Methoden (LEWIS et al., 2003; KIRIAKIDOU et al., 2004; KREK et al., 2005; LEWIS et al., 2005), biochemische Untersuchungen (CHI et al., 2009), Transkriptomanalysen (SELBACH et al., 2008) und *in vitro* UTR-Analyse annähern kann (VAN ROOIJ, 2011). Zudem kann der Phänotyp einer Zelle oder eines Organismus über die Funktionen einer spezifischen miRNA Aufschluss

geben, auf die über *in vivo* oder *in vitro* Einfluss genommen werden kann (VAN ROOIJ, 2011). Hierfür sind verschiedene *gain-of-function*-Verfahrensweisen beschrieben, wie z. B. die Erschaffung transgener Tiere (HATLEY et al., 2010) oder der Einsatz von miRNA-Imitaten (TRANG et al., 2011a). *Loss-of-function*-Methoden umfassen den Einsatz von Knockout-Mäusen (PARK et al., 2010), miRNA-Schwämmen (EBERT et al., 2007) oder eine Inhibierung von spezifischen miRNA durch Antagomire (KRUTZFELDT et al., 2005; STENVANG et al., 2012).

2.7 Mikro-Ribonukleinsäuren-basierte Therapie

Das Bestreben miRNAs in der Medizin einsetzen zu können, gründet auch auf deren therapeutischen Potenzial. Dieses wurde bereits durch verschiedene Ansätze geprüft (KRUTZFELDT et al., 2005; CARE et al., 2007; HU et al., 2010).

Das Prinzip des therapeutischen Ansatzes ist eine Normalisierung der Gewebeexpression spezifischer miRNAs (WANG et al., 2008; TOPKARA & MANN, 2010). Antagomire sind einsträngige Nukleotidsequenzen komplementär zur Ziel-miRNA, die sie durch Bindung inhibieren (KRUTZFELDT et al., 2005). KRUTZFELDT und Mitarbeiter (2005) berichteten als Erste von einer miRNA-Ausschaltung beim Säugetier *in vivo* durch Antagomire. Diese binden, *intravenös* bei Mäusen verabreicht, die leberspezifische miR-122 und senken so den Serumcholesterolspiegel (KRUTZFELDT et al., 2005). Ein Anstieg der Aktivität spezifischer miRNAs, die sich bei bestimmten Krankheitsbildern als erniedrigt exprimiert erwiesen, kann durch Applikation von miRNA-Imitaten erreicht werden (TRANG et al., 2011b). Diese sind als doppelsträngige Oligonukleotide aufgebaut, die die mature miRNA-Sequenz sowie den *passenger strand* beinhalten. Sie können durch Inkorporation in RISC wie endogene miRNAs Einfluss auf Genexpression nehmen (VAN ROOIJ et al., 2008). Eine vielversprechende Lösung für das Erreichen von hoher Gewebespezifität und das Vermeiden von Nebenwirkungen ist, Viren als Vektoren zu nutzen (GREGOREVIC et al., 2004).

Auch für kardiale Erkrankungen wurde ein erfolgreicher Einsatz von Antagomiren und miRNA-Imitaten beschrieben. THUM und Mitarbeiter (2008) verabreichten Mäusen mit kardialer Hypertrophie systemisch Antagomire, die miR-21 inhibierten. Ergebnis war ein Rückgang von kardialer Hypertrophie und Fibrose

mit Verbesserung der kardialen Funktion (THUM et al., 2008). Bei Ratten mit hypertensiv-induziertem Herzversagen verhinderten *parenteral* verabreichte Antagomire kardiale Umbauvorgänge, verbesserten die kardiale Funktion und verlängerten die Überlebenszeit im Vergleich zu Kontrolltieren (MONTGOMERY et al., 2011). SUCKAU und Mitarbeiter (2009) verabreichten Ratten mit kardialer Hypertrophie und Herzversagen mittels viralem Vektor miRNA-Imitate. Dadurch konnten Hypertrophie und Fibrose signifikant reduziert werden. Durch die hohe Affinität des Vektors für myokardiales Gewebe wurde keine miRNA-Deregulation oder Hepatotoxizität festgestellt (SUCKAU et al., 2009).

III MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Patienten

Die Studienpopulation umfasst Katzen, die in der kardiologischen Abteilung der Medizinischen-Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität zwischen 2009 – 2012 untersucht wurden. Von jedem Tier wurden klinische Parameter erfasst und für die Bestimmung der miRNA-Expression Serumproben gesammelt und aufbereitet.

Für die Untersuchung des miRNA-Serumprofils durch Microarray-Technik wurden an HCM erkrankte Katzen im CHF und herzgesunde Tiere gewählt.

In einem weiteren Schritt wurden auf Grundlage der Microarray-Ergebnisse miRNAs ausgewählt und durch qRT-PCR quantifiziert. Bei diesem Analyse-Abschnitt wurden jeweils Tiere der bekannten Gruppen „CHF durch HCM“ und „herzgesund“ sowie weitere Katzen, die sich in einem hochgradigen subklinischen Stadium einer HCM befanden, miteinander verglichen.

Im Folgenden werden Katzen im CHF durch HCM auch als dekompensiert bezeichnet.

1.1.1 Einschlusskriterien

Jede der Katzen musste eine vollständige klinische, kardiovaskuläre und echokardiographische Untersuchung erhalten haben. Neben herzgesunden Katzen wurden Katzen mit einer primären hochgradigen HCM im subklinischen und im dekompensierten Stadium in die Studie aufgenommen.

Von einer hochgradigen HCM im subklinischen Stadium wurde ausgegangen, wenn in der Diastole eine fokale oder generalisierte Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS von $> 7,0$ mm oder eine fokale oder generalisierte Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS von $> 6,0$ mm und ein LA/Ao $> 1,8$ in gleichzeitiger Abwesenheit von klinischen Anzeichen einer Dekompensation vorlag.

In die Gruppe hochgradig dekompensierter Katzen wurden jene Tiere aufgenommen, die neben einer fokalen oder generalisierten Hypertrophie der LVFW und/oder des IVS von $\geq 6,0$ mm, klinisch, echokardiographisch und/oder

röntgenologisch evidenten kongestiven Linksherzversagen aufwiesen.

Voraussetzung für die Aufnahme gesunder Katzen in die Studie war, dass sie anamnestisch, klinisch und echokardiographisch unauffällig waren und mindestens das 6. Lebensjahr erreicht hatten.

Bei allen Tieren wurden Harnstoff- und Kreatininkonzentration bestimmt und bei Vorliegen einer konzentrischen Hypertrophie durch Blutdruckmessung und Bestimmung des Gesamt-T4 mögliche sekundäre Ursachen untersucht.

1.1.2 Ausschlusskriterien

Von der Analyse ausgeschlossen wurden Katzen, deren konzentrische Hypertrophie durch eine sekundäre Ursache bedingt hätte sein können, wie z. B. eine vorliegende systemische Hypertension, Hyperthyreose, fixe Aortenstenose oder Myokarditis. Zudem führte der Verdacht auf eine Niereninsuffizienz oder eine andere generalisierte Erkrankung ebenso zum Ausschluss.

1.2 Geräte

GeneChip® Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
Cardiovit®	Schiller Medizintechnik, Ottobrunn
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf® twin.tec PCR Plates	Eppendorf AG, Hamburg
Heraeus® Multifuge® 3 L-R	Thermo Scientific, Waltham, USA
Hybridization Chamber Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Hybridization Gasket Slides	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Röntgen XSTAR-14	COMET AG, Liebfeld, Schweiz
SureScan DNA Microarray Scanner G2505C	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
TaqMan 7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

Thermocycler Eppendorf Mastercycler® ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermowell®Gold PCR 96 Well Plates	Corning Incorporated, Corning, USA
Universal 32 R Zentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Vakuumpkonzentrator	Infors HT AG, Bottmingen, Schweiz
Vivid 7®	General Electric Medical Systems, Horten, Norwegen
VTX-3000L	LMS, Tokyo, Japan
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wärmeschrank	KENDRO LABORATORY PRODUCTS GmbH, Langenselbold
Wasserbad	Bachofer, Reutlingen
1.3 Chemikalien	
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1.4 Kits	
Custom microRNA Microarrays, 8x60k	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Version 2.4)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
miRNeasy mini Kit	QIAGEN, Hilden
miScript II RT Kit	QIAGEN, Hilden
miScript SYBR® Green PCR Kit	QIAGEN, Hilden

1.5 Primer

miScript Primer Assay hs_miR-1246_2	QIAGEN, Hilden
miScript Primer Assay hs_miR-208b_1	QIAGEN, Hilden
miScript Primer Assay hs_miR-320e_1	QIAGEN, Hilden
miScript Primer Assay hs_miR-368_1	QIAGEN, Hilden
miScript Primer Assay hs_miR-381_1	QIAGEN, Hilden
miScript Primer Assay hs_miR-486-3p_2	QIAGEN, Hilden
miScript Primer Assay hs_RNU1A_1	QIAGEN, Hilden
miScript Primer Assay hs_RNU6B_2	QIAGEN, Hilden

1.6 Verbrauchsmaterial

Eppendorf LoBind® tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Gefäße™	Eppendorf AG, Hamburg
Micro Bio-Spin® 6 Chromatography Columns	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Probenröhren zur Serumgewinnung	Sarstedt, Nürnbrecht
Sterican®-Einmalkanüle (G 20 x 1 ½ / Ø 0,90 x 40 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

1.7 Software und Datenbanken

7500 System SDS Software	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
EchoPAC	General Electric Medical Systems, Horten, Norwegen
ENSEMBL Version 69	www.ensembl.org
Feature Extraction Software Version 10.7.3.1	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Linear Models for Microarray Data (LIMMA)	BioConductor, www.bioconductor.org
miRBase: the microRNA database Version 19	www.mirbase.org/
Multiexperiment Viewer (MEV) 4.7.3	Open-source Software, www.tm4.org/mev/
PASW® (Predictive Analytics Software) Statistics	SPSS Inc., Chicago, USA

REST© (Relative Expression Software Tool) 2009	QIAGEN, Hilden, Germany & M. W. Pfaffl, TU München
Variance stabilization and calibration for microarray data	BioConductor, www.bioconductor.org

2 Methoden

2.1 Untersuchungen

Zur Evaluation des Gesundheitsstatus und der genauen kardiologischen Diagnose wurden bei jeder Katze eine allgemeine klinische, kardiovaskuläre und echokardiographische Untersuchung durchgeführt. Weitere spezielle Untersuchungen, die im Folgenden beschrieben werden, wurden in Abhängigkeit des Falles durchgeführt. Bei allen Untersuchungen waren die Tiere wach und standen nicht unter dem Einfluss von Sedativa.

2.1.1 Signalement und Anamnese

Das Signalement jeder Katze mit Rasse, Alter, Geschlecht und Gewicht wurde erfasst. Klinische Parameter, die auf das Vorliegen einer Dekompensation hinweisen können, wie Dyspnoe oder Polypnoe, ebenso wie der Zeitpunkt, seitdem diese ersichtlich waren, wurden erfragt. Zudem wurde eine bestehende medikamentelle Therapie notiert.

2.1.2 Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung

Die klinische Untersuchung umfasste die Begutachtung der Schleimhäute. Zudem wurden die peripheren Lymphknoten ertastet, das Abdomen durchgetastet und die Körpertemperatur rektal gemessen. Des Weiteren wurde bei jeder Katze der Bereich der Schilddrüse palpirt und das Lungenfeld auskultiert.

Neben der Beurteilung der Frequenz, der Intensität und Regelmäßigkeit der Herztöne durch Auskultation des Herzens wurde ebenso auf Herznebengeräusche geachtet. Parallel zur Auskultation erfolgte die Pulsbeurteilung an der *A. femoralis*.

2.1.3 Echokardiographie

Die transthorakalen Herzultraschalluntersuchungen wurden mit dem Gerät Vivid 7® der Firma General Electric Medical Systems (Horten, Norwegen) unter Verwendung eines 7 Megahertz (MHz) Schallkopfes durchgeführt. Hierfür

wurden die Tiere in Seitenlage verbracht. Den Tieren wurden für die komplette Dauer der echokardiographischen Untersuchung zwei EKG-Elektroden angelegt, die mit dem Ultraschallgerät gekoppelt waren und der Erfassung der II. Ableitung dienten. Gemäß echokardiographischer Standardebenen (THOMAS et al., 1993) erfolgten die Aufnahmen sowohl von rechts mit einem parasternal lokalisierten Schallkopf für Längs- und Kurzachsenschnitte und von links mit apikaler Orientierung. Anhand des zweidimensionalen Bildes sowie mit Hilfe von Blut- und Gewebedopplertechniken wurde der kardiale Phänotyp der Katzen bestimmt. Die Aufnahmen wurden zur Auswertung als Bildsequenzen, die mindestens drei Herzzyklen umfassen, gespeichert.

Die Beurteilung der linksventrikulären Dimensionen erfolgte im zweidimensionalen Bild in Längs- und Kurzachse. Diese umfasste die mehrfache Messung und Mittelwertbestimmung von LFW, IVS und LVID jeweils in Systole und Diastole. Zudem wurde die frühdiastolische Größe des linken Atriums im rechts parasternalen Kurzachsenblick, auf Höhe der Aorta, in das Verhältnis zum Durchmesser der Aorta gesetzt (HANSSON et al., 2002).

Ab 7,0 mm diastolischer Wanddicke oder 6,0 mm diastolischer Wanddicke in Kombination mit $LA/Ao \geq 1,8$ wurde in Abwesenheit einer fixen Aortenstenose, systemischen Hypertension oder Hyperthyreose, die Diagnose hochgradige primäre feline HCM gestellt (WESS et al., 2011).

In Fällen, in denen durch klinische Untersuchung, Echokardiographie und Thoraxröntgen Anzeichen von CHF festgestellt wurden, wurde bereits ab einer Hypertrophie von 6,0 mm die HCM als hochgradig bewertet.

Der Blutfluss im Bereich der Atrioventrikular- und Semilunarklappen wurde mittels Farbdoppler auf das Vorliegen von Turbulenzen untersucht, welches eine Beurteilung vorliegender Insuffizienzen oder Stenosen erlaubt. So wurde bei HCM von dem Vorliegen eines SAM ausgegangen, wenn in der Systole gleichzeitig eine Turbulenz in Aorta (Stenose) und über der Mitralklappe (Insuffizienz) im LA sichtbar war. Genaue Blutflussgeschwindigkeiten des links- und rechtsventrikulären Ausflusstraktes sowie des Mitraleinflusses wurden mittels der Spektraldoppler-Modi Continuous-Wave- oder Pulsed-Wave-Doppler ermittelt. Geschwindigkeiten des Aorten- und Pulmonalarterienflusses über 2,25 m/s wurden als abnormal gewertet (BUSSADORI et al., 2000).

Eine Beurteilung der diastolischen Funktion erfolgte über den Farbgewebedoppler. Die longitudinalen Gewebegeschwindigkeiten von LVFW und IVS wurden gemessen, in dem zunächst der linksapikale Vierkammerblick und jede Wand einzeln als Graubild und mit Farbgewebedoppler aufgenommen wurden. Die Auswertung der gespeicherten Zyklen wurde im Anschluss Off-Line unter Verwendung der Q-Analyse von EchoPAC (General Electric Medical Systems, Horten, Norwegen) durchgeführt. Hierfür wurde die Messzelle (Region Of Interest, ROI) mit einer Größe von 3 mm in das basale Segment der LVFW und des IVS gesetzt. Die ROI wurde dann manuell so korrigiert, dass sich diese in allen Phasen des Herzzyklus innerhalb des Myokards befand. Das Programm berechnete im Anschluss die TVI-Kurven mit den Maxima von S-Welle, E-Welle, A-Welle und ggf. der Fusionierung von E- und A-Welle (EA-Welle). Die Maxima von S-, E-, A- oder EA-Welle aller TVI-Kurven, die als qualitativ ausreichend erachtet wurden, wurden gemessen und der Mittelwert berechnet.

2.1.4 Radiographie und Elektrokardiographie

Bei dem klinischen Verdacht auf Linksherzversagen einhergehend mit einem Lungenödem oder Pleuralerguss wurden zur Verifizierung Röntgenaufnahmen des Thorax in zwei Ebenen durchgeführt.

Wenn bei der kardiovaskulären Untersuchung unregelmäßige Herztöne oder im mitlaufenden EKG des Herzultraschalls Arrhythmien auffielen, wurde ein ausführliches EKG durchgeführt. Hierzu wurden die Katzen in rechte Seitenlage verbracht und in der distalen Region der Gliedmaßen sowie im Bereich des Herzspitzenstoßes Elektroden angebracht. Mit dem Gerät Cardiovit® (Schiller Medizintechnik GmbH, Ottobrunn) wurden die bipolaren Ableitungen I, II und III nach Einthoven, die unipolaren Ableitungen aVR, aVL und aVF nach Goldberger und die Brustwandableitung V1 erfasst. Anhand der aufgezeichneten Ableitungen wurden Herzfrequenz, die mittlere elektrische Herzachse, der Rhythmus und die Morphologie der einzelnen Komplexe beurteilt.

2.1.5 Ausschluss von Differentialdiagnosen und Bestimmung Nierenwerte

Der systemische Blutdruck wurde nicht-invasiv durch das oszillometrische Blutdruckmessgerät MDS® (S + B medVet GmbH, Babenhausen) gemessen. Die Blutdruckmanschette wurde dem liegenden Tier an der Schwanzwurzel angebracht und der diastolische und systolische Blutdruck aus mindestens vier

Messungen ermittelt. Systolische Werte zwischen 100 – 160 mmHg wurden als normotensiv eingestuft.

Zum Ausschluss einer Hyperthyreose wurde die Schilddrüse palpirt und die Konzentration des Gesamt-T4 extern durch IDEXX Laboratories (Ludwigsburg, Deutschland) bestimmt, wobei Tiere in einem Bereich zwischen 0,8 – 4,7 µg/dl als euthyreot galten. Zur Beurteilung, ob eine Niereninsuffizienz vorliegt, wurden Harnstoff und Kreatinin des Serums herangezogen. Konzentrationen von 5,0 mmol/l bis 11,3 mmol/l (Harnstoff) und bis 169 µmol/l (Kreatinin) galten als physiologisch.

2.2 Mikro-Ribonukleinsäure

Durch die Microarray-Analyse von Serumproben wurde die miRNA-Signatur herzgesunder Katzen mit Tieren im CHF verglichen. Basierend auf den Resultaten des Microarrays wurden einige miRNAs ausgewählt, um deren Expression mittels qRT-PCR sowohl an genannten Patientengruppen, als auch an einer weiteren Kohorte (HCM, hochgradig, subklinisches Stadium) zu validieren.

Die Probenaufbereitung, die Extraktion der miRNA und die Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR wurden im PCR-Labor der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München unter der Leitung von Frau Dr. Karin Weber durchgeführt. Die Analyse der miRNA-Signatur durch Microarray-Technik ist im *Laboratory for Functional Genome Analysis* (LAFUGA) in Großhadern unter der Leitung von Herrn Dr. Stefan Bauersachs erfolgt.

2.2.1 Blutprobennahme und Probenaufbereitung

Die Blutentnahme wurde an der *V. cephalicae antibrachii*, *V. femoralis* oder *V. jugularis externa*, unter Verwendung einer Sterican®-Einmalkanüle (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) durchgeführt. Das Blut wurde in Probenröhren zur Serumgewinnung (Sarstedt, Nürnberg) aufgefangen. Das Serum wurde innerhalb von 15 Minuten durch Zentrifugation über fünf Minuten bei 25°C und 4000 Umdrehungen pro Minute vom Koagulum getrennt. Das Serum wurde zur Quantifizierung von Harnstoff, Kreatinin und Gesamt-T4 verwendet und der Rest unverzüglich bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Extraktion von Ribonukleinsäure

Bei dem im Rahmen dieser Studie angewandten Prinzip der RNA-Extraktion

wurde die Serumprobe durch Guanidinthiocyanat denaturiert und die Proteine und DNA in Phenol gelöst. Durch Chloroform wurden die Phasen RNA, DNA und Proteine getrennt und die RNA schließlich durch Ethanol ausgefällt (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). Die RNA wurde durch das Prinzip der Festphasenextraktion an beschichtete Säulen gebunden und schließlich mit RNase-freiem Wasser gelöst. Mit der gewählten Extraktionsmethode wurde die gesamte RNA mit der miRNA-Fraktion aus dem Serum extrahiert.

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus dem Serum ging allen weiteren molekularbiologischen Analysen voraus.

Das Serum wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut. RNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers „*Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit*“ durch das miRNeasy mini Kit (QIAGEN, Hilden) extrahiert. Von jedem Probanden wurden doppelte Lösungsansätze ausgehend von je 200 µl Serum hergestellt. Zu 200 µl Serum wurden 1000 µl QIAzol Lysis Reagent pipettiert. Das Lysat wurde mit einem Vortex-Gerät gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Lysat wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wurde 15 Sekunden durch das Vortex-Gerät gemischt und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 4°C für 15 Minuten mit 12 000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in neue Polypropylenröhrchen (Eppendorf AG, Hamburg) pipettiert und mit der 1,5-fachen Menge Ethanol (~ 600 µl) vermischt. 700 µl des Probengemischs wurden im Anschluss auf die RNeasy MinElute spin column, die sich in einem 2 ml Polypropylenröhrchen befand, pipettiert. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 Sekunden bei 10 000 Umdrehungen pro Minute wurde der Überstand verworfen und dieser Schritt mit dem Rest des Probengemisches wiederholt. Unter Verwendung der gleichen Säule wurde die beschriebene Zentrifugation mit dem 2. Lösungsansatz wiederholt und so die Ansätze wieder zusammengeführt. Durch die Verwendung zweier Ansätze sollte die Gesamtmenge von extrahierter miRNA erhöht werden. Nach Zugabe von 700 µl RWT Puffer wurde für 15 Sekunden bei 10 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Schritt zweifach mit 500 µl RPE Puffer wiederholt. Auf die Säule wurde 500 µl Ethanol (80 %) gegeben und für zwei Minuten bei 10 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Säule wurde nun in ein neues

Mikrozentrifugenröhrchen gegeben, für fünf Minuten bei höchster Umdrehungszahl zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 30 µl RNase-freies Wasser wurde auf die Säule gegeben und für eine Minute bei voller Umdrehungszahl zentrifugiert. Das Zentrifugat enthielt die gelöste RNA.

2.2.3 Microarray

Die miRNA wurde gemäß den Herstellerangaben durch das „*miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit*“ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cyanine3-pCp markiert und auf drei individuell gefertigte 8x60k Agilent Custom microRNA Microarrays hybridisiert. Grundlage für die Microarrays waren 1887 humane und 150 virale miRNAs nach der miRBase Version 19 (GRIFFITHS-JONES et al., 2008). Jede miRNA wurde durch mehrere Oligonukleotide (*probes*, Sonden) repräsentiert, die sich wiederum für jede miRNA auf insgesamt 30 Lokalisationen (*features*) verteilten. Die miRNAs der Probe konnten nach dem Auftragen auf den Microarray mit den entsprechenden komplementären Sequenzen hybridisieren. Dies erzeugte je nach Menge der gebundenen miRNA ein Fluoreszenzsignal mit bestimmter Intensität. Die gewaschenen Microarrays wurden im Anschluss gescannt und die gespeicherten Daten analysiert.

Als Grundlage für die Microarray-Analyse diente extrahierte miRNA aus dem Serum von an HCM erkrankten Katzen im CHF und herzgesunden Tieren.

Die gelöste RNA wurde zunächst in einer Vakuumzentrifuge für 60 Minuten bei 55°C getrocknet, in 2 µl RNase freiem Wasser gelöst und in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen auf Eis gestellt. Alle Proben wurde dephosphoryliert, in dem jedem Ansatz 2 µl des Calf Intestinal Alkaline Phosphatase Master Mix hinzugefügt und 30 Minuten in einem Heizblock bei 37°C inkubiert wurden. Durch die Zugabe von je 2,8 µl DMSO (100 %) und anschließender Inkubation in einem auf 100°C erhitzten Wasserbad wurden die Proben denaturiert und anschließend sofort auf Eis verbracht.

Die nun vorbereitete RNA wurde nun mit Cyanine3-pCp markiert, indem zu jeder Probe 4,5 µl des Ligation Master Mix für T4 RNA Ligase pipettiert wurde. Dieser entsprechende Master Mix wurde aus den Komponenten 27 µl 10X T4 RNA Ligase Buffer, 81 µl Cyanine3-pCp und 13,5 µl T4 RNA Ligase hergestellt. Nach Vermischung der Proben mit dem Mastermix wurden diese für zwei Stunden bei

16°C in einem Kühlblock inkubiert.

Die markierte RNA wurde durch Micro Bio-Spin® 6 Chromatography Columns (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) von freiem Farbstoff und DMSO gereinigt. Hierfür wurden zu jeder Probe 38,7 µl RNase freies Wasser gegeben, das gesamte Volumen auf das Gelbett der vorbereiteten Säulen pipettiert und für vier Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand entsprach der markierten und gereinigten RNA und wurde auf Eis gegeben.

Die Trocknung der Proben erfolgte in einer Vakuumzentrifuge für 45 Minuten bei 55°C.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung der Microarrays wurde die getrocknete RNA jeweils wieder in 17 µl RNase freiem Wasser gelöst und zu jedem Ansatz 1,0 µl Hyb Spike-In Lösung in dreifacher Verdünnung, 4,5 µl 10X GE Blocking Agent und 22,5 µl 2X Hi-RPM Hybridisierungs Puffer gegeben und durch ein Vortex-Gerät vermischt. Die Proben wurden für fünf Minuten in einem 100°C heißen Wasserbad inkubiert und im Anschluss umgehend für fünf Minuten auf Eis gelegt.

Nun wurde für je acht Proben die Agilent Microarray Hybridization Chamber vorbereitet und die Proben aufgebracht. Hierfür wurde je ein SureHyb gasket slide in die Agilent SureHyb Basis gelegt. Für die acht Microarrays, die auf jedem Slide aufgebracht waren, wurde eine Legende angelegt, damit später jedem Microarray eine Probe zugeordnet werden konnte. Acht Proben wurden auf einen Slide pipettiert. Mit der aktiven Seite nach unten wurde ein Microarray-Slide auf den SureHyb gasket slide verbracht und in der Kammer verschlossen. Die drei präparierten Agilent Microarray Kammern wurden zur Hybridisierung der Microarrays für 20 Stunden bei 55°C und 20 Umdrehungen pro Minute in einen Hybridisierungsöfen verbracht.

Anschließend wurden die Microarray-Slides gewaschen, indem diese in GE Wash Buffer 1 aus den Agilent Microarray Kammern entfernt wurden. Die Slides wurden nun je fünf Minuten in GE Wash Buffer 1 und in GE Wash Buffer 2 (37°C) gewaschen.

Die fluoreszierenden 8 x 60 000 *features* wurden durch den Agilent SureScan DNA Microarray Scanner mit 2 µm Auflösung erfasst und als Bild festgehalten. Die unterschiedlich starken Signale des gespeicherten Bildes wurden durch die

Feature Extraction Software Version 10.7.3.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verarbeitet. Schließlich wurde unter Berücksichtigung des Hintergrundes die mittlere Intensität jedes einzelnen *features* als Wert wiedergegeben.

2.2.4 Quantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion

Für die PCR-basierte Validierung einzelner miRNAs wurden diese zunächst mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die Menge der cDNA durch qPCR bestimmt.

Die miRNA wurde aus dem Serum von Katzen der Gruppen „herzgesund“, „CHF durch HCM“ und „hochgradige HCM im subklinischen Stadium“ extrahiert.

Die RT wurde durch das miScript® II RT Kit (QIAGEN) gemäß des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Ein Reaktionsansatz entsprach je 4 µl 5X miScript HiSpec Buffer, 2 µl 10X miScript Nucleics Mix, 2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix und 12 µl der gelösten RNA. Bei den Negativkontrollen wurde statt Reverse Transcriptase 2 µl RNase freies Wasser hinzugefügt (*no RT control*). Im Thermocycler Eppendorf Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf AG, Hamburg) wurden die Reaktionsansätze für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und durch Erhitzen auf 95°C (fünf Minuten) inaktiviert. Die cDNA wurde mit 20 µl RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 40 µl verdünnt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Die relative Quantifizierung einzelner miRNAs durch qPCR unter Verwendung von miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN, Hilden) und *homo sapiens* (hs) miScript Primer Assays (QIAGEN, Hilden) erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Hierfür wurden die miScript primer Assays hs_miR-208b_1, hs_miR-320e_1, hs_miR-381_1, hs_miR-1246_2, hs_miR-486-3p_2 und hs_miR-368_1 verwendet. MiR-368 entspricht der früheren Nomenklatur von miR-376c-3p. Zur Normalisierung wurden hs_RNU6B_2 und hs_RNU1A_1 gewählt. Pro jeweiliger Probe wurde für jeden miScript Primer Assay ein Doppelansatz auf Thermowell® Gold PCR 96-well Plates (Corning Incorporated, Corning, New York, USA) pipettiert. Ein Ansatz enthielt die Reaktionskomponenten 4 µl RNase-freies Wasser, 2 µl miScript Primer Assay, 2 µl 10X miScript Universal Primer, 10 µl Quantitect Sybr Green PCR MasterMix und 2 µl der verdünnten cDNA (*templates*) mit einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Negativkontrollen enthielten RNase-freies Wasser (*no template control*) oder extrahierte RNA (*no*

RT control) statt cDNA. Mit dem TaqMan 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) wurden pro Assay 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Den Zyklen ging die initiale Aktivierung der HotStar DNA Polymerase durch eine Inkubation bei 95°C (15 Minuten) voraus. Die Denaturierung erfolgte bei 94°C für 15 Sekunden mit folgender Primerhybridisierung bei 55°C für 30 Sekunden und Elongation bei 70°C für 35 Sekunden. Nach den PCR-Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse unter den Bedingungen 95°C für 15 Sekunden, 60°C für 60 Sekunden und 95°C für 15 Sekunden durchgeführt. Für jede cDNA wurde die Anzahl der Zyklen (*cycle threshold*, Zyklusschwellenwert, Ct) bestimmt, die nötig sind, um Fluoreszenz über einen definierten Grenzwert steigen zu lassen. Je höher der Ct war, desto mehr Zyklen waren nötig, um diesen Grenzwert zu erreichen.

2.3 Statistik

Die Deskription und Datenanalyse von Signalement und klinischen Parametern wurden mit PASW® Statistics (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test und der graphischen Darstellung durch Histogramme wurde geprüft, ob die Parameter normal verteilt waren. Beim Vergleich der Gruppen miteinander wurde bei nichtparametrischer Verteilung ein Mann-Whitney-U-Test gewählt. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Die Auswertung der molekularbiologischen Messungen erfolgte unter Verwendung bioinformatischer Software. Dies wird im Folgenden erläutert.

2.3.1 Microarray

Die durch die „Feature Extraction Software Version 10.7.3.1“ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ermittelte mittlere Expression jeder messbaren Lokalisation (*feature*) wurde durch die Software „Variance stabilization and calibration for microarray data“ (VSN) (BioConductor) normalisiert (HUBER et al., 2002). Die weitere statistische Analyse erfolgte mit dem Programm „Linear Models for Microarray Data“ (LIMMA) (BioConductor) unter Verwendung des „moderated t-test“. Nominale p-Werte wurden durch „LIMMA decideTests“ mittels *false discovery rate* für multiples Testen adjustiert (SMYTH, 2004). Korrigierte p-Werte (*p-value adjusted*) < 0,05 galten als signifikant. Basierend auf den relativen Expressionen der miRNAs mit nominalem p-Wert < 0,01, wurde mit dem „Multiexperiment Viewer 4.7.3“ des Microarray-Daten Analyse und

Management Systems „TM4“ eine hierarchische Clusteranalyse (HCL) durchgeführt (SAEED et al., 2003).

2.3.2 Quantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion

Unter Verwendung des Relative Expression Software Tool (REST©) 2009 (QIAGEN®, Hilden, & M. W. Pfaffl, Physiologie Weihenstephan, Technische Universität, München) wurde die Berechnung der mittleren Expressionsdifferenz (R) der einzelnen miRNAs zwischen den Patientengruppen durchgeführt. Normalisiert wurde über Referenz-miRNAs (PFAFFL, 2001; PFAFFL et al., 2002; PFAFFL, 2004). RNU6B und RNU1A dienten dabei als endogene Kontrollen. Mittels dem von der Verteilung unabhängigen „Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test“© wurden die p-Werte kalkuliert (PFAFFL et al., 2002). $P < 0,05$ galt als statistisch signifikant.

IV ERGEBNISSE

1 Patientencharakteristika

Insgesamt erfüllten 31 Katzen die Einschlusskriterien. Diese wurden entsprechend ihrer Krankheitsstadien als „herzgesund“ (n = 12), „CHF durch HCM“ (n = 11) oder „hochgradige HCM im subklinischen Stadium“ (n = 8) klassifiziert. Als Rassen der untersuchten Katzen waren die Norwegische Waldkatze (n = 9), EKH (n = 8), Maine Coon (n = 7), British Kurzhaar (n = 3), Perser (n = 2), Scottish Fold (n = 1) und Sibirisch Langhaar (n = 1) vertreten.

In die einzelnen miRNA-analytischen Abschnitte (Microarray und qRT-PCR) wurden jeweils unterschiedliche Teilpopulationen miteinbezogen:

Durch Microarray-Technik wurde das miRNA-Muster von zwölf herzgesunden Katzen und elf Katzen im CHF durch HCM analysiert und verglichen. Für die Quantifizierung einzelner miRNAs durch qRT-PCR wurden acht herzgesunde Katzen und acht Katzen im CHF durch HCM ausgewählt, deren miRNA-Profil bereits durch den Microarray untersucht wurde. Zusätzlich wurden acht weitere Katzen, die sich im subklinischen Stadium einer hochgradigen HCM befanden, in die qRT-PCR-Analyse eingeschlossen. Da sich die Teilpopulationen für Microarray und qRT-PCR überschneiden, jedoch unterschiedlich zusammengesetzt waren, wurden sie hinsichtlich ihrer klinischen Charakteristika getrennt betrachtet.

1.1 Gruppen für die Microarray-Analyse

Das Signalement und die echokardiographischen Parameter der Patientengruppen, die in die miRNA-Microarray-Analyse miteinbezogen wurden, sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2: Signalement der Katzen, deren Mikro-Ribonukleinsäuren-Profil mittels Microarray-Analyse verglichen wurde. HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, CHF = *congestive heart failure*, kongestives Herzversagen, EKH = Europäisch Kurzhaar, BKH = British Kurzhaar, NWK = Norwegische Waldkatze.

		Herzgesund (n = 12)	HCM CHF (n = 11)
Signalement			
Alter (Jahre)	Median	8,08	5,41
	Spannweite	5,76 – 10,19	1,05 – 11,90
Geschlecht (Anzahl männlich/weiblich)		3/9	9/2
Rasse (Anzahl)	EKH	1	4
	BKH	/	2
	NWK	7	/
	Perser	/	1
	Scottish Fold	/	1
	Maine Coon	4	2
	Sibirisch Langhaar	/	1

Herzgesunde Katzen waren signifikant älter als Tiere, die sich im CHF befanden ($p = 0,042$).

Weibliche und männliche Tiere waren in den Patientengruppen ungleichmäßig verteilt. Während in der herzgesunden Gruppe mit 75 % mehr weibliche Tiere waren, überwog in den Gruppen „CHF durch HCM“ (81,8 %) der Anteil männlicher Tiere.

Tabelle 3: Zusammenstellung der echokardiographischen Parameter der Katzen, deren Mikro-Ribonukleinsäuren-Profil mittels Microarray-Analyse verglichen wurde. HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, CHF = *congestive heart failure*, kongestives Herzversagen, LA = linkes Atrium, Ao = Aorta, TVI = *tissue velocity imaging*, Gewebegeschwindigkeit, E = frühdiastolische E-Welle, A = spätdiastolische A-Welle, EA = fusionierte E- und A-Welle.

		Herzgesund (n = 12)	HCM CHF (n = 11)	
Zweidimensionale Echokardiographie				
maximale Wanddicke in der Diastole in mm	Median	4,69	8,35	
	Spannweite	3,71 – 4,94	6,06 – 11,97	
LA/Ao	Median	1,37	2,48	
	Spannweite	1,23 – 1,49	1,98 – 3,11	
TVI-Parameter in Meter pro Sekunde				
Interventrikuläres Septum	E	Median	-5,05	-2,44
		Spannweite	-4,54 - -5,55	-1,66 - -3,45
	A	Median	-4,91	-3,08
		Spannweite	-3,95 - -6,06	-2,41 - -3,23
	EA	Median	-8,71	-4,76
		Spannweite	-6,58 - -10,62	-1,91 - -8,30
Linksventrikuläre freie Wand	E	Median	-7,59	-3,28
		Spannweite	-5,81 - -8,03	-2,40 - -4,16
	A	Median	-3,76	-1,82
		Spannweite	-3,08 - -4,21	-1,39 - -2,26
	EA	Median	-6,85	-2,93
		Spannweite	-6,67 - -11,93	-2,56 - -6,06

Beim Vergleich der Gruppen hinsichtlich zweidimensionaler echokardiographischer Parameter unterschieden sich Katzen im CHF durch HCM von der herzgesunden Kontrollgruppe durch signifikant höhere Werte für die LVFW ($p < 0,001$) und das IVS ($p < 0,001$) in der Diastole sowie für LA/Ao ($p < 0,001$).

Die Unterschiede der kardialen Phänotypen „herzgesund“ und „CHF durch HCM“ wird in Abbildung 2 und Abbildung 3 veranschaulicht.

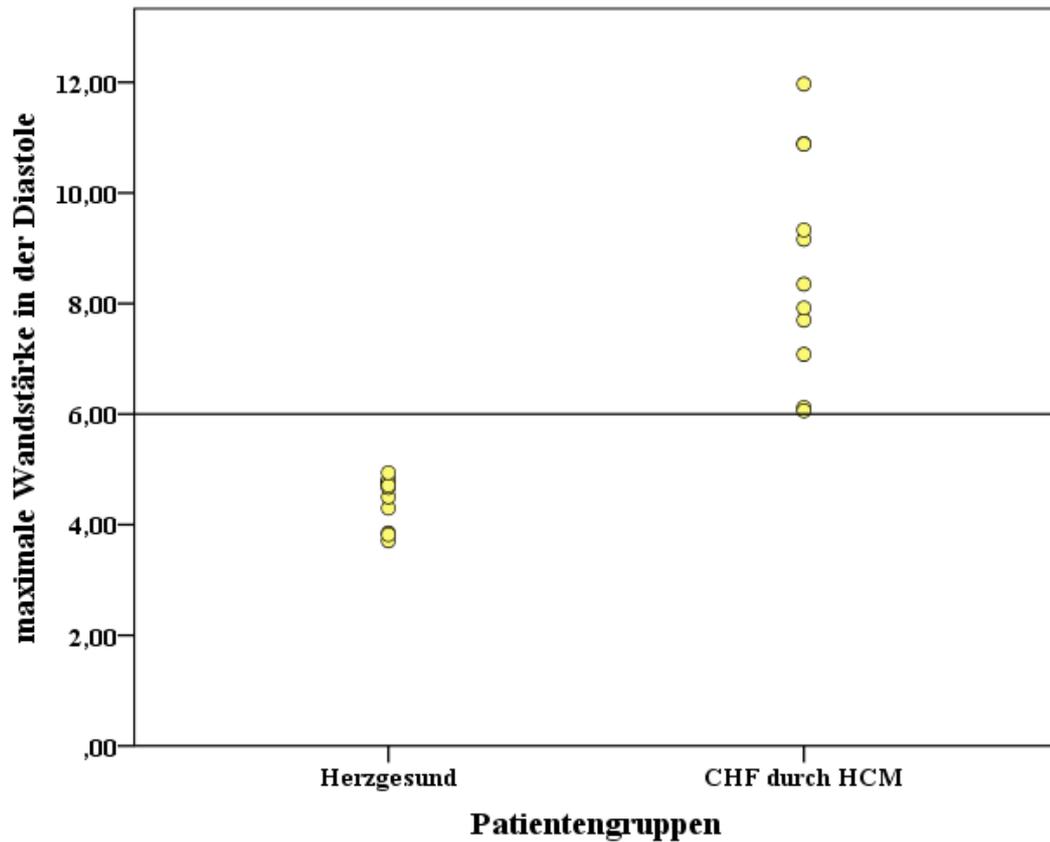


Abbildung 2: Die Verteilung der maximalen Wandstärken in Millimetern der Gruppen herzgesund ($n = 12$) und kongestives Herzversagen durch hypertrophe Kardiomyopathie ($n = 11$). Die maximale Wandstärke entspricht dabei der maximalen diastolischen Wanddicke des interventrikulären Septums oder der linksventrikulären freien Wand. Eingblendet ist der Cut-off-Wert von 6 Millimetern. HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, CHF = *congestive heart failure*, kongestives Herzversagen.

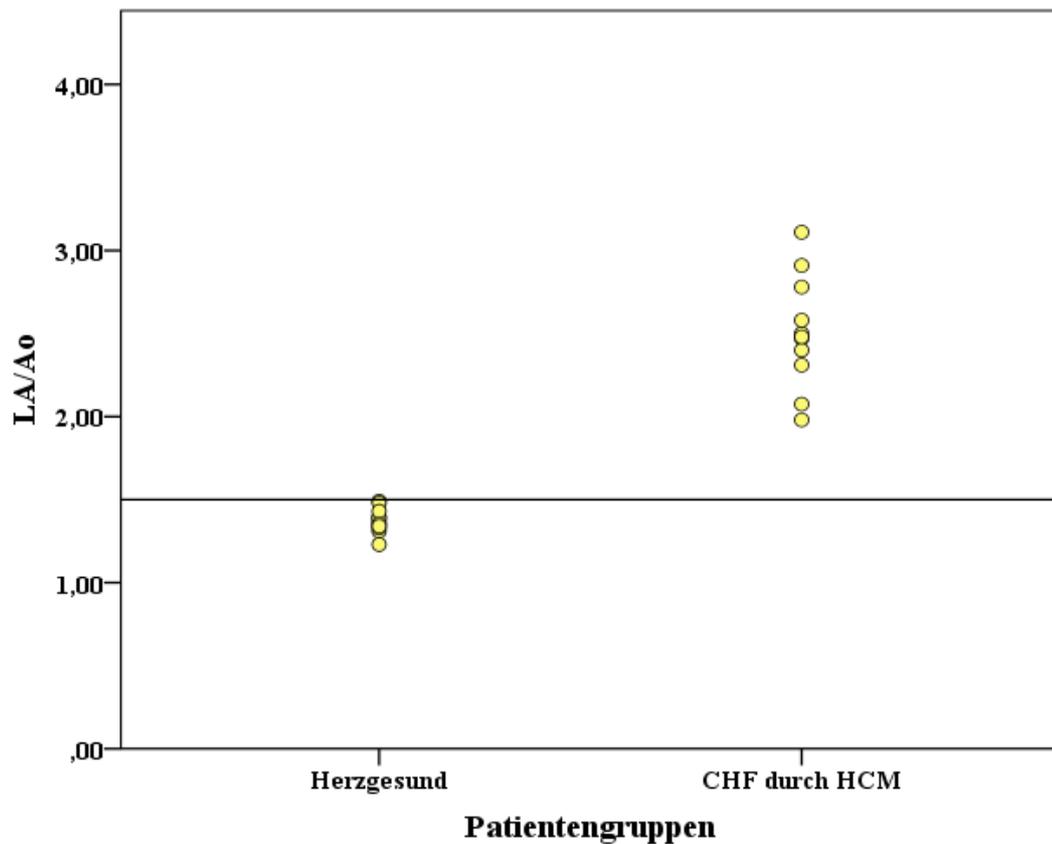


Abbildung 3: Die Verteilung des Verhältnisses des linken Vorhofs zur Aorta der Gruppen herzgesund und kongestives Herzversagen durch hypertrophe Kardiomyopathie. Eingebledet ist der Cut-off-Wert von 1,5. HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, CHF = *congestive heart failure*, kongestives Herzversagen.

Beim Vergleich der diastolischen Gewebeparameter wurde bei Katzen im CHF durch HCM signifikant geringere Geschwindigkeiten der E-Welle des IVS ($p = 0,014$), der fusionierten EA-Welle des IVS ($p = 0,018$) und der A-Welle des IVS ($p = 0,014$) sowie der fusionierten EA-Welle der LVFW ($p = 0,003$) gemessen. Jeweils zwei herzgesunde Katzen und ein an HCM erkranktes Tier konnten aufgrund fehlender Gewebedoppler-Aufnahmen nicht in die Auswertung miteingeschlossen werden.

Alle Katzen im CHF ($n = 11$) waren in einem klinisch stabilen Stadium, welches mit der Klasse C1 der *Canine Heart Failure International Expert Forum* (CHIEF)-Klassifikation zu vergleichen ist (STRICKLAND, 2008). Eine Übersicht dieses Systems ist in Tabelle 8 im Anhang zu finden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung und Blutprobennahme befanden sich die Tiere zwischen einem und 284 Tagen im CHF mit einem Medianwert von 30 Tagen. Alle Tiere dieser Gruppe erhielten Diuretika (Furosemid) und individuell zusätzlich weitere

Medikamente wie Thrombozytenaggregationshemmer (Clopidogrel), nichtsteroidale Antiphlogistika (Acetylsalicylsäure), Beta-Blocker (Atenolol) oder ACE-Hemmer.

1.2 Gruppen für die Mikro-Ribonukleinsäuren-Analyse mittels quantitativer Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion

Eine Zusammenstellung von Signalement und echokardiographischer Charakteristika der Gruppen, die mittels qRT-PCR verglichen wurden, ist in Tabelle 4 und Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 4: Signalement der Katzen, die in die Quantifizierung einzelner Mikro-Ribonukleinsäuren mittels quantitativer Reverser-Transkription Polymerasekettenreaktion miteinbezogen wurden. HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, CHF = *congestive heart failure*, kongestives Herzversagen, kongestives Herzversagen, EKH = Europäisch Kurzhaar, BKH = Britisch Kurzhaar, NWK = Norwegische Waldkatze.

		Herzgesund (n = 8)	HCM CHF (n = 8)	HCM subkl. (n = 8)
Signalement				
Alter (Jahre)	Median	8,32	3,57	5,66
	Spannweite	5,76 – 10,19	1,05 - 9,80	1,19 – 13,11
Geschlecht (Anzahl männlich/weiblich)		2/6	7/1	7/1
Rasse	EKH	/	2	3
	BKH	/	2	1
	NWK	5	/	2
	Perser	/	1	1
	Scottish Fold	/	1	/
	Maine Coon	3	1	1
	Sibirisch Langhaar	/	1	/

Wie bei den Gruppen des Microarrays waren herzgesunde Katzen signifikant älter als an HCM erkrankte Tiere im CHF ($p = 0,021$). Der Vergleich von herzgesunden Tieren mit Katzen im subklinischen Stadium einer hochgradigen HCM und der HCM-Gruppen untereinander erbrachte keinen Unterschied.

Ähnlich war auch die Verteilung des Alters mit einem Überwiegen männlicher Tiere in beiden HCM-Gruppen (je 87,5 %).

Tabelle 5: Zusammenstellung der echokardiographischen Parameter der Katzen, die in die Quantifizierung einzelner Mikro-Ribonukleinsäuren mittels quantitativer Reverser-Transkription Polymerasekettenreaktion miteinbezogen wurden. HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, CHF = *congestive heart failure*, kongestives Herzversagen, LA = linkes Atrium, Ao = Aorta, TVI = *tissue velocity imaging*, Gewebegeschwindigkeit, E = frühdiastolische E-Welle, A = spätdiastolische A-Welle, EA = fusionierte E- und A-Welle.

		Herzgesund (n = 8)	HCM CHF (n = 8)	HCM subkl. (n = 8)	
Zweidimensionale Echokardiographie					
maximale Wanddicke in der Diastole (mm)	Median	4,75	8,14	7,32	
	Spannweite	3,71 – 4,94	6,12 – 11,97	7,12 – 9,35	
LA/Ao	Median	1,37	2,53	1,43	
	Spannweite	1,31 – 1,49	1,98 – 3,11	1,20 – 1,72	
TVI-Parameter in Meter pro Sekunde					
Interventrikuläres Septum	E	Median	-5,05	-2,44	-2,88
		Spannweite	-4,54 - -5,55	-1,66 - -3,45	-1,48 - -4,43
	A	Median	-5,42	-3,08	-3,13
		Spannweite	-4,78 - -6,06	-2,41 - -3,23	-2,88 - -3,39
	EA	Median	-7,66	-5,96	-6,02
		Spannweite	-6,58 – 10,46	-3,62 - -8,30	-3,35 - -8,41
Linksventrikuläre freie Wand	E	Median	-8,01	-3,28	-6,85
		Spannweite	-5,81 - -8,03	-2,40 - -4,16	-6,85 - -6,85
	A	Median	-3,45	-1,82	-3,34
		Spannweite	-3,08 - -4,21	-1,39 - -2,26	-3,34 - -3,34
	EA	Median	-6,92	-4,03	-3,97
		Spannweite	-6,73 - -11,93	-2,56 - -6,56	-1,68 - -5,99

Die vergleichende Betrachtung von Kammerwanddimensionen und der Größe des LA ergab bei Katzen im CHF durch HCM eine signifikant dickere LVFW ($p = 0,005$) und IVS ($p = 0,001$) in der Diastole gegenüber herzgesunden Katzen. Zusätzlich war LA/Ao bei herzgesunden Katzen signifikant kleiner ($p < 0,001$). Auch Katzen mit hochgradiger HCM im subklinischen Stadium wiesen gegenüber herzgesunden Katzen höhere Werte für LVFW ($p < 0,001$) und IVS ($p = 0,009$) auf. Beim Vergleich von LA/Ao war kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die Gruppen „CHF durch HCM“ und „hochgradige HCM im subklinischen Stadium“ unterschieden sich nur hinsichtlich des Verhältnisses von LA/Ao ($p < 0,001$).

Die Geschwindigkeit der fusionierten EA-Welle der LVFW bei Katzen im CHF war signifikant niedriger als bei herzgesunden Tieren ($p = 0,025$). Der Vergleich der Gruppen „herzgesund“, „CHF durch HCM“ und „hochgradige HCM im

subklinischen Stadium“ untereinander ergab hinsichtlich der weiteren diastolischen Gewebegeschwindigkeiten keine Unterschiede signifikanten Ausmaßes. Von zwei herzgesunden Katzen, eine Katze im CHF durch HCM und eine Katze im hochgradigen subklinischen Stadium einer HCM lagen keine Gewebedoppleraufnahmen zur Auswertung vor.

2 Microarray-Analyse

In den feline Serumproben konnte für 970 miRNAs eine Signalintensität oberhalb zufälliger Signalschwankungen (*background noise*) nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der Gruppen „CHF durch HCM“ (n = 11) und „herzgesund“ (n = 12), wiesen 25 miRNAs einen nominalen p-Wert $\leq 0,01$ mit einem Expressionsunterschied (*fold change*) von -1,58 bis +4,05 auf, repräsentiert durch ein bis vier Sonden (*probes*). Von diesen miRNAs waren in der erkrankten Gruppe 21 höher und vier niedriger exprimiert. Eine Zusammenfassung der einzelnen miRNAs findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Darstellung der abweichenden Expression 25 verschiedener Mikro-Ribonukleinsäuren von Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie im kongestiven Herzversagen im Vergleich zu herzgesunden Katzen. Repräsentiert werden die Mikro-Ribonukleinsäuren durch insgesamt 36 Sonden (*probes*) mit nominalem p-Wert $\leq 0,01$. MiR = Mikro-Ribonukleinsäure, FC = *fold change*, Reg. = Regulation, hsa = *homo sapiens*, kshv = Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus.

	Log2	FC	Reg.	p-Wert nominal	p-Wert korrigiert
hsa-miR-381-3p	1,35	2,55	↑	< 0,001	0,019
hsa-miR-381-3p	1,38	2,60	↑	< 0,001	0,022
hsa-miR-486-3p	1,03	2,04	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-4751	1,06	2,08	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-376c-3p	1,48	2,78	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-5700	1,00	2,00	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-513a-3p	1,11	2,16	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-5700	1,05	2,07	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-4751	1,02	2,02	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-320e	0,82	1,76	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-513a-3p	1,15	2,22	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-513a-3p	1,13	2,18	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-513a-3p	1,09	2,13	↑	< 0,001	0,038
hsa-miR-5700	1,03	2,04	↑	< 0,001	0,0560
kshv-miR-K12-5-5p	-1,16	-2,24	↓	< 0,001	0,0560
hsa-miR-376c-3p	2,02	4,05	↑	0,001	0,1279
kshv-miR-K12-10b	0,98	1,98	↑	0,001	0,1279
hsa-miR-320e	0,72	1,65	↑	0,002	0,1786
hsa-miR-3177-3p	-1,11	-2,15	↓	0,002	0,1786
hsa-miR-486-3p	0,87	1,83	↑	0,002	0,1824
hsa-miR-1246	1,18	2,27	↑	0,002	0,1824
hsa-miR-371a-5p	0,77	1,70	↑	0,003	0,2391
hsa-miR-548x-3p	0,74	1,67	↑	0,003	0,2391
hsa-miR-4641	-1,00	-2,00	↓	0,003	0,2391
hsa-let-7a-5p	-0,66	-1,58	↓	0,003	0,2391
kshv-miR-K12-5-5p	-1,09	-2,13	↓	0,004	0,2504
hsa-miR-548ae	0,64	1,56	↑	0,007	0,4228
hsa-miR-4746-3p	0,63	1,55	↑	0,007	0,4248
hsa-miR-4668-5p	1,00	2,00	↑	0,007	0,4248
hsa-miR-548aj-3p	0,62	1,53	↑	0,008	0,4264
hsa-miR-629-3p	0,53	1,44	↑	0,008	0,4264
hsa-miR-409	0,56	1,48	↑	0,009	0,4264
hsa-miR-4497	0,48	1,40	↑	0,009	0,4264
hsa-miR-4721	0,66	1,58	↑	0,009	0,4465
hsa-miR-4327	0,79	1,73	↑	0,010	0,4513

Eine HCL wurde durchgeführt, um die Katzen auf Grundlage der Ähnlichkeit ihres miRNA-Expressionen in Gruppen („Cluster“) darzustellen. Hierfür wurden die relativen Expressionen der miRNAs mit nominalem p-Wert $\leq 0,01$ gewählt. Zur Bestimmung der Ähnlichkeit diente als Proximitätsmaß der Pearson-Korrelationskoeffizient. Die Klassen wurden dann nach ihrer geringsten Distanz zusammengefasst, beginnend mit einzelnen Proben (entsprechend den einzelnen Patienten), z. B. „HCM-5“ und „HCM-12“ in Abbildung 4. Zur weiteren Zusammenfassung von entstandenen Gruppen („Clustern“), die dann mehrere Patienten enthielten, wurde das Average-Linkage Verfahren verwendet. Hierfür wurde in jedem Cluster der Durchschnitt aller Distanzen gebildet und wiederum mit dem Cluster mit der geringsten Distanz fusioniert. Z. B. das Cluster „HCM-5/HCM-12“ mit dem Cluster „HCM-9/HCM-8“. Letztlich wurden alle Tiere in zwei Gruppen zusammengefasst. Diese Cluster stimmen mit den entsprechenden kardialen Phänotypen der Katzen überein, d.h., in einem Cluster befinden sich alle herzgesunden Katzen und in dem anderen Cluster alle Tiere im CHF durch HCM. Die HCL mit Heatmap ist in Abbildung 4 dargestellt.

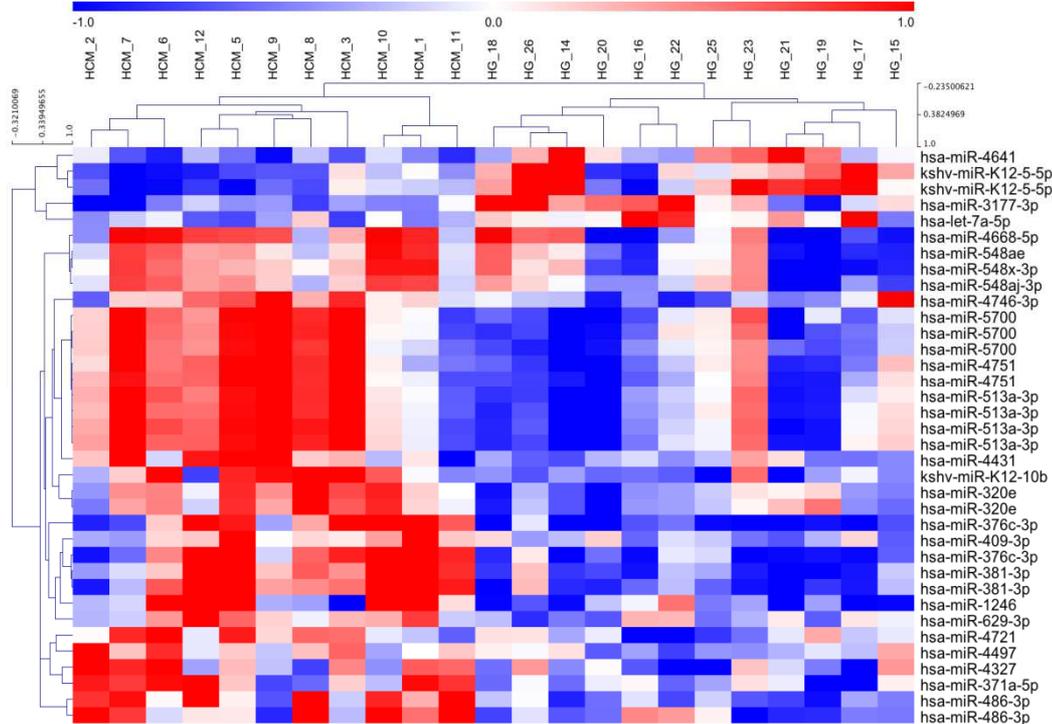


Abbildung 4: Hierarchische Clusteranalyse (Pearson-Korrelation, Average-Linkage) dargestellt als Heatmap von 25 Mikro-Ribonukleinsäuren des Expressionsprofils der Gruppen „herzgesund“ und „kongestives Herzversagen durch hypertrophe Kardiomyopathie“. Jede Spalte entspricht einer der Proben und jede Zeile entspricht einer Mikro-Ribonukleinsäure. Die Farben stimmen mit dem Expressionslevel überein, wobei Rot einer Hochregulierung und Blau einer Runterregulierung in Relation zum Mittelwert aller Proben entspricht. HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, HG = herzgesund, miR = Mikro-Ribonukleinsäure, hsa = *homo sapiens*, kshv = Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus.

Nach multiplem Testen bestätigten sich die statistisch signifikant erhöhte Expression von miR-381-3p, miR-486-3p, miR-4751, miR-376c-3p, miR-5700, miR-513a-3p und miR-320e in der Gruppe „CHF durch HCM“ im Vergleich zur Kontrollgruppe (korrigierter p-Wert < 0,05).

Neben humanen miRNAs waren auch die folgenden miRNAs humaner Viren nachzuweisen: Humane Polyoma Viren 1 und 2, Epstein-Barr-Virus, Hepatitis-B-Virus, humanes Zytomegalievirus, humanen Immundefizienz-Virus, Herpes-Simplex-Viren 1 und 2 und das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus. Eine Übersicht der viralen miRNAs kann der im Anhang beigefügten Tabelle 9 entnommen werden.

3 Quantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion

Aufgrund der Ergebnisse der Microarray-Analyse und der Beschreibung in bisherigen Studien im Zusammenhang mit kardialen Erkrankungen wurden folgende sechs miRNAs für eine Analyse mittels qRT-PCR ausgewählt: miR-381-3p, miR-486-3p, miR-376c-3p, miR-320e, miR-1246 und miR-208b.

Eine Validierung genannter miRNAs erfolgte jeweils für jene acht Tiere aus den Gruppen „herzgesund“ und „CHF durch HCM“, bei denen ausreichend Serummaterial für einen weiteren analytischen Schritt zur Verfügung stand, sowie zusätzlich für acht Katzen mit hochgradiger HCM im subklinischen Stadium.

MiR-208b und miR-376c-3p konnten mit den qPCR-miRNA Assays nicht in ausreichendem Maß amplifiziert werden. Sie wurden daher von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen.

Ein signifikanter Unterschied der Expression konnte für miR-1246 nachgewiesen werden. In der Gruppe „CHF durch HCM“ war miR-1246 sowohl im Vergleich zu Gruppe „herzgesund“ (Expressionsverhältnis 3,19, $p < 0,001$) als auch zur Gruppe „hochgradige HCM im subklinischen Stadium“ (Expressionsverhältnis 1,98, $p = 0,048$) signifikant erhöht exprimiert (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6). Für die endogenen Kontrollen RNU1A und RNU6B sowie für die miRNAs miR-320e, miR-381 und miR-486-3p konnte beim Vergleich der Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Eine Zusammenfassung der Expressionsverhältnisse und der p-Werte findet sich in Tabelle 7.

Tabelle 7: Darstellung des Expressionsverhältnisses spezifischer humaner Mikro-Ribonukleinsäuren beim Vergleich verschiedener Patientengruppen untereinander durch relative Quantifizierung nach quantitativer Reverser-Transkription Polymerasekettenreaktion. Eine Normalisierung erfolgte über RNU6B und RNU1A. MiRNA = mikro-Ribonukleinsäure, hsa = *homo sapiens*, HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, CHF = *congestive heart failure*, kongestives Herzversagen, subkl. = subklinisch, Expression = Expressionsverhältnis.

miRNA	Herzgesund versus CHF durch HCM		Herzgesund versus HCM im subkl. Stadium		HCM im subkl. Stadium versus CHF durch HCM	
	Expression	p-Wert	Expression	p-Wert	Expression	p-Wert
miR-320e	1,30	0,584	0,89	0,851	1,46	0,481
miR-381	2,04	0,285	0,75	0,762	2,73	0,14
miR-1246	3,19	<0,001	1,61	0,341	1,98	0,048
miR-486-3p	0,94	0,928	0,35	0,206	2,71	0,199

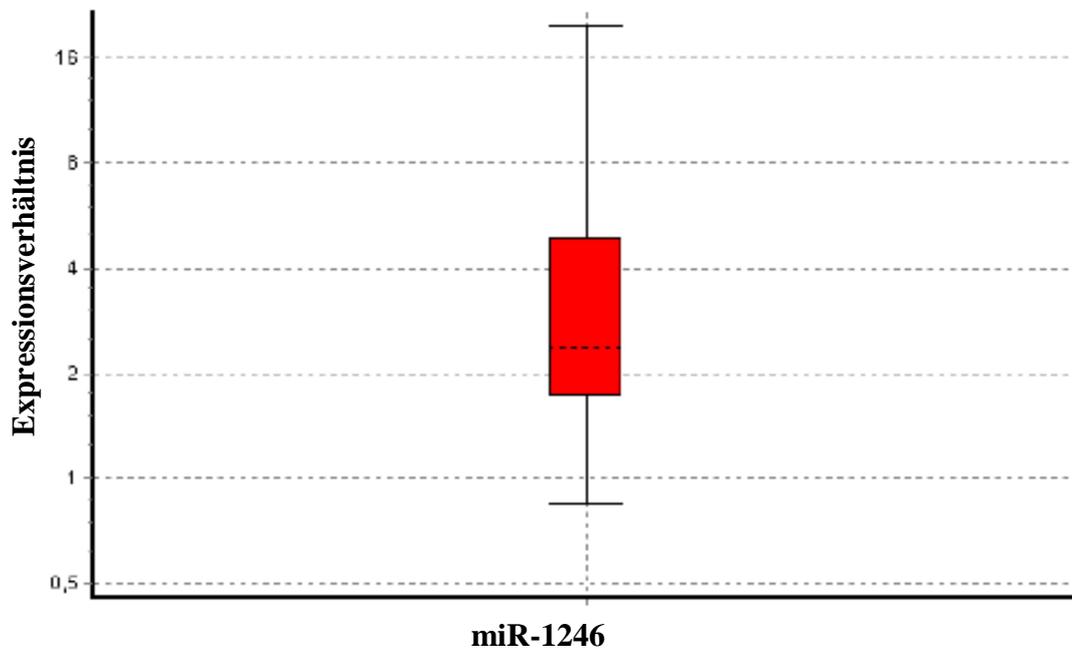


Abbildung 5: Darstellung des Expressionsverhältnisses von miR-1246 von Katzen im kongestiven Herzversagen durch hypertrophe Kardiomyopathie im Vergleich zur herzgesunden Kontrollgruppe mittels Whisker-Box-Plot. Eine Normalisierung erfolgte auf RNU6B und RNU1A. MiR-1246 ist in der Gruppe „kongestiven Herzversagen durch hypertrophe Kardiomyopathie“ um den mittleren Faktor 3,19-fach erhöht exprimiert im Vergleich zur Gruppe „herzgesunden“ mit $p < 0,001$. In der Box liegen die mittleren 50 % der Daten, die waagrechte Linie in der Box entspricht dem Median. Die Whisker repräsentieren die anderen 50 % der Daten.

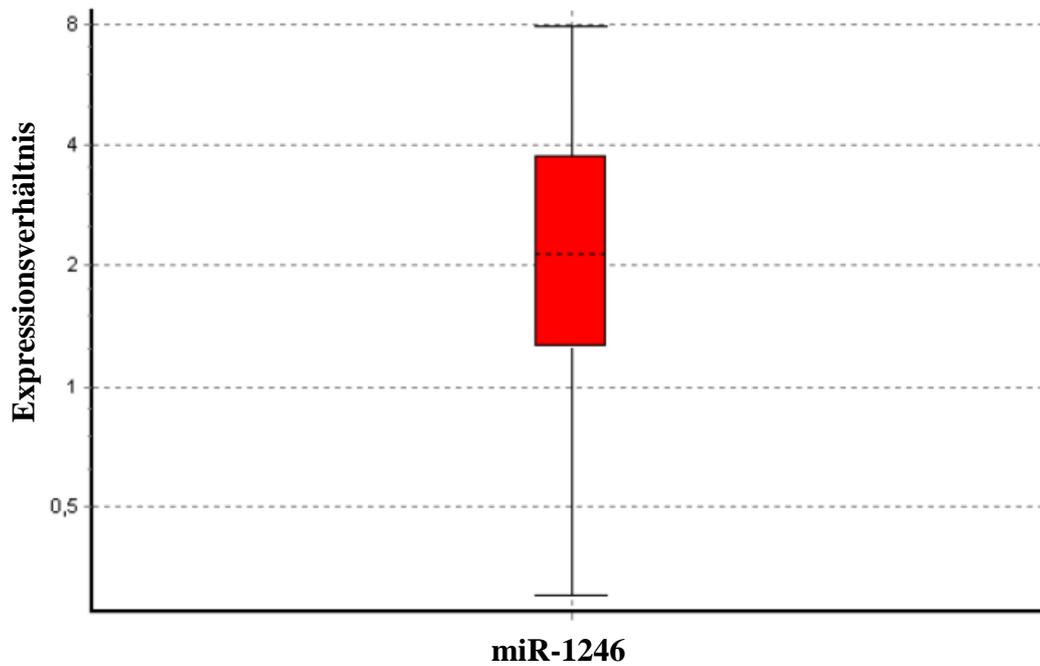


Abbildung 6: Darstellung des Expressionsverhältnisses von miR-1246 von Katzen im kongestiven Herzversagen durch hypertrophe Kardiomyopathie im Vergleich zu Katzen mit hochgradiger hypertropher Kardiomyopathie im subklinischen Stadium mittels Whisker-Box-Plot. Eine Normalisierung erfolgte auf RNU6B und RNU1A. MiR-1246 ist in der Gruppe „kongestiven Herzversagen durch hypertrophe Kardiomyopathie“ um den mittleren Faktor 1,98-fach erhöht exprimiert im Vergleich zur Gruppe „hochgradige hypertrophe Kardiomyopathie im subklinischen Stadium“ mit $p = 0,048$. In der Box liegen die mittleren 50 % der Daten, die waagrechte Linie in der Box entspricht dem Median. Die Whisker repräsentieren die anderen 50 % der Daten.

V DISKUSSION

Eine zunehmende Anzahl von Studien untersucht derzeit die Rolle von miRNA in der Pathophysiologie unterschiedlichster Krankheitsbilder. Die Evaluierung des Potenzials von miRNAs als Biomarker des Blutes zur verbesserten Diagnose von kardialen Erkrankungen, wie beispielsweise eines Myokardinfarktes, rückt dabei immer mehr in den Fokus (ADACHI et al., 2010; AI et al., 2010; D'ALESSANDRA et al., 2010). Die miRNA-Expression im Zusammenhang mit HCM oder CHF wurden bislang zumeist nur am Maus- oder Ratten-Modell oder in humanmedizinischen Arbeiten untersucht. Zur Diagnose von feliner HCM wäre die Entwicklung eines blutbasierten-Biomarkers von großem Wert, der nicht mit den Nachteilen bildgebender Diagnoseverfahren, wie grenzwertigen Befunde, hohen Kosten oder schwieriger Durchführung behaftet ist.

Die hier beschriebene Arbeit ist nach aktuellem Kenntnisstand die erste Abhandlung, welche die miRNA-Signatur im Serum der Katze im Zusammenhang mit HCM und CHF untersucht. Ziel der Studie war es, das miRNA-Muster von Katzen mit HCM im CHF und herzgesunden Katzen durch Microarray-Technik zu bestimmen und miteinander zu vergleichen. In einem zweiten Schritt wurden auf Grundlage der Microarray-Ergebnisse einzelne auffällige miRNAs mittels qRT-PCR validiert. Hierfür wurde, neben Katzen die bereits in die Microarray-Analyse eingeschlossen wurden, eine neue Gruppe miteinbezogen, die ein weiteres HCM-Stadium repräsentierte. Dies waren Katzen, die sich im subklinischen Stadium einer hochgradigen HCM befanden.

1 Population

Die Katzen der vorliegenden Studie wurden anhand klinischer und echokardiographischer unterschiedlichen Patientengruppen zugeordnet. Die kardialen Phänotypen „herzgesund“ sind dabei im Herzultraschall klar voneinander abgrenzbar. Herzgesunde Katzen waren signifikant älter als Tiere, die an HCM litten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass ein Einschlusskriterium der herzgesunden Gruppe das Erreichen des 6. Lebensjahres war. Dieses sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass eine Kardiomyopathie bei diesen Tieren auch im fortgeschrittenen Alter nicht mehr entsteht und diese tatsächlich herzgesund bleiben. In die HCM-Gruppe, kompensiert oder

dekompensiert, wurden Katzen jeglichen Alters aufgenommen. In den HCM-Gruppen war das Geschlechterverhältnis inhomogen, wobei männliche Tiere überrepräsentiert waren. In vorangegangenen größeren Studien wurde ebenfalls festgestellt, dass mehr männliche als weibliche Katzen an HCM erkrankten. (RUSH et al., 2002; FERASIN et al., 2003; RIESEN et al., 2007b; PAYNE et al., 2010; TREHIU-SECHI et al., 2012). Auch beim Menschen sind die betroffene Patienten häufiger männlich (MARON et al., 1984a; GREAVES et al., 1987). In der Humanmedizin wird vermutet, dass geschlechtsabhängige genetische und endokrine Faktoren die phänotypische Expression von HCM oder reaktiver Hypertrophie beeinflussen könnten (SCHWARTZBAUER & ROBBINS, 2001; VAN EICKELS et al., 2001; OLIVOTTO et al., 2005). Für die Katze gibt es in dieser Hinsicht noch keine Erkenntnisse.

Die Patientengruppen in dieser Studie wiesen eine unterschiedliche Alters- und Geschlechtsstruktur auf, was die miRNA-Expressionsmuster beeinflussen könnte. In verschiedenen humanmedizinischen Studien konnte jedoch, bis auf wenige Ausnahmen, kein Einfluss von Alter oder Geschlecht auf die Qualität und Quantität der miRNA-Expression nachgewiesen werden (IKEDA et al., 2007; AI et al., 2010; CORSTEN et al., 2010; FICHTLSCHERER et al., 2010; GOREN et al., 2012).

2 Analyse der Mikro-Ribonukleinsäure-Expression im Serum

Für die Hauskatze wurden bisher keine spezifischen felines miRNA-Sequenzen veröffentlicht (miRBase Version 19) (KOZOMARA & GRIFFITHS-JONES, 2011). Daher standen auch der vorliegenden Studie keine spezifischen felines miRNA-Sonden zur Verfügung. Stattdessen wurden hier die Microarrays mit humanen miRNA-Sonden bestückt. Ebenso wurden für die qRT-PCR humane miRNA-Assays verwendet. Jedoch konnte eine hohe Homologie vieler miRNA-Sequenzen zwischen einigen Vertebraten, darunter der *homo sapiens*, nachgewiesen werden (LAGOS-QUINTANA et al., 2002). SATHJYAMURTHY und SWAMY (2010) berichten von 405 möglichen miRNAs der Hauskatze, die sie anhand von *in silico* Methoden ermittelten (SATHYAMURTHY & SWAMY, 2010). Grundlage waren alle bekannten miRNA-Sequenzen der Wirbeltiere der miRBase Version 13 (GRIFFITHS-JONES et al., 2008), die mit einem

Katzengenom verglichen wurden (DAVIS et al., 2009). Sie berechneten, dass 53 der vorausgesagten miRNAs zu 100 % homolog mit denen des Menschen seien (SATHYAMURTHY & SWAMY, 2010). Ebenso konnten PONTIUS und Mitarbeiter (2007) bei der Sequenzierung eines Katzengenoms durch den Vergleich mit der miRNA-Datenbank miRBase insgesamt 201 feline miRNAs als homolog zu humanen miRNAs identifizieren (GRIFFITHS-JONES, 2004; PONTIUS et al., 2007). Auch in der vorliegenden Studie wurden durch die Online-Datenbank ENSEMBL Version 69 676 mögliche feline miRNA-Stammsschleifen ausgemacht. Dabei wurden beim Vergleich mit miRBase Version 19 321 humane miRNAs identifiziert, die zu 100 % homolog zu den vorausgesagten Sequenzen der Katze waren (FLICEK et al., 2013) (GRIFFITHS-JONES, 2004). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige nicht-homologe feline miRNAs nicht mit den humanen miRNA-Sonden hybridisieren konnten und so der Analyse entgingen.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass eine Vielzahl unterschiedlicher miRNA-Signale auch im Serum von an HCM erkrankten Katzen erfassbar ist. Des Weiteren ergab der Vergleich des miRNA-Musters von Katzen im CHF durch HCM mit dem miRNA-Muster herzgesunder Tiere unterschiedliche Expressionen verschiedener miRNAs. Die hier erzielten Ergebnisse konnten also demonstrieren, dass die miRNA-Signatur des Serums von Katzen mit HCM verändert ist. Ob die dokumentierten Deregulationen ursächlicher oder reaktiver Natur sind und welche Rolle die miRNAs bei der Pathophysiologie einer HCM spielen, wurde durch diese Studie nicht evaluiert.

Beim Vergleich von Microarray und qRT-PCR waren die Expressionen einzelner miRNAs nicht deckungsgleich. So konnten miR-208b und miR-376c-3p mit den verwendeten Assays nicht amplifiziert werden. MiR-381-3p, miR-320e und miR-486-3p waren bei Katzen im CHF durch HCM im Microarray signifikant höher exprimiert. Dieses signifikante Ergebnis konnte durch qRT-PCR nicht validiert werden, wobei für miR-381-3p und miR-320e eine Regulation in die gleiche Richtung auszumachen war. Die Quantifizierung von miR-486-3p durch qRT-PCR ergab keinen Unterschied der Expression zwischen den Gruppen „CHF durch HCM“ und „herzgesund“ mit einem Expressionsverhältnis von 0,94. MiR-1246 war signifikant erhöht exprimiert bei der Verifizierung durch qRT-PCR. Bei der Microarray-Analyse war ebenfalls eine Expressionsänderung in die

gleiche Richtung festzustellen, jedoch war diese nicht signifikant. Die Ursache für Differenzen zwischen Microarray und qRT-PCR könnte in der unterschiedlichen Sensitivität der genannten Methoden liegen. Auf dem Microarray wurde jede miRNA über mehrere Oligonukleotide (*probes*) repräsentiert, die in ihrer Länge voneinander abweichen. Bei der qRT-PCR wurde hingegen für jede miRNA nur ein humaner Primer Assay mit einer Sequenz verwendet. Bedingt durch die variierenden Oligonukleotide erscheint beim Microarray die Wahrscheinlichkeit höher, eine spezifische feline miRNA-Sequenz detektieren zu können. Zudem haben der Ausmaß des *fold change*, die Richtung der Regulation, der Signifikanzwert und die Höhe des Ct Einfluss auf die Korrelation der Ergebnisse von Microarray und qRT-PCR (MOREY et al., 2006). Auch die Wahl der Normalisierungsmethode kann sich auf Sensitivität und Spezifität der Methode auswirken (WANG et al., 2011). In der vorliegenden Studie kann des Weiteren ein Effekt der Gruppengröße nicht ausgeschlossen werden, da bei der Validierung durch qRT-PCR mit kleineren Gruppen als bei der Microarray-Analyse gearbeitet wurde. Die genauen Gründe für die hier vorliegenden Abweichungen sind jedoch unbekannt und bedürfen der Überprüfung durch größere Studienpopulationen.

In humanmedizinischen Studien, welche die miRNA-Expression des Myokards bei primärer HCM analysierten, sind einige miRNAs als verändert beschrieben worden, die nicht mit den hier erzielten Ergebnissen übereinstimmen (CARE et al., 2007; PALACIN et al., 2011; WANG et al., 2012a; LEPTIDIS et al., 2013).

Eine mögliche Ursache für die ungleiche miRNA-Expression von Gewebe und extrazellulärem Raum könnte sein, dass miRNAs, die im Myokard exprimiert und nachgewiesen werden, bei einer HCM nicht ausreichender Menge in die Zirkulation entlassen werden. Somit entspricht die miRNA-Signatur des Herzens nicht dem Muster der Zirkulation. Die Mechanismen, welche einer Entlassung von miRNA aus den Zellen zugrunde liegen, sind Thema eingehender Studien (VALADI et al., 2007; HUNTER et al., 2008; MITCHELL et al., 2008; ZERNECKE et al., 2009). Ein möglicher Vorgang ist die Freisetzung von miRNA durch Zelluntergang. Es ist denkbar, dass der Myozytenuntergang bei einer HCM nicht ausreicht, um ein miRNA-Muster in der Zirkulation zu erzeugen, welches dem des Gewebes entspricht. Abweichungen der miRNA-Zusammensetzung im Serum oder Plasma könnten also bei dieser Erkrankung das Ergebnis einer reaktiven selektiven miRNA-Freisetzung von extrakardialen Geweben sein, die

von pathophysiologischen Vorgängen einer HCM oder CHF betroffen sind. So konnte beispielsweise eine abweichende Konzentration von endothelzellspezifischen miRNAs in der Zirkulation bei verschiedenen kardialen Pathologien wie Herzversagen oder stabiler koronarer Herzkrankheit nachgewiesen werden (FICHTLSCHERER et al., 2010; FUKUSHIMA et al., 2011). Für einige zirkulierende miRNAs, deren Expression bei bestimmten Muskel- oder Tumorerkrankungen verändert ist, konnte eine Korrelation mit dem Blutbild der Patienten nachgewiesen werden. Daher wird vermutet, dass die spezifische miRNA-Expression im Serum oder Plasma bei bestimmten Erkrankungen auch durch die sekundär veränderte Zusammensetzung der zellulären Blutfraktion beeinflusst wird (PRITCHARD et al., 2012; VIGNIER et al., 2013). Auch PALACIN und Mitarbeiter (2012) konnten beim Vergleich zehn ausgesuchter miRNAs im Plasma von Patienten mit HCM versus herzgesunde Kontrollen keine signifikanten Ergebnisse erzielen. Sie wählten hierfür miRNAs, welche sich bereits als auffällig im Myokard von HCM-Patienten erwiesen haben und miRNAs, welche im Zusammenhang mit ischämischen Herzerkrankungen in Plasma oder Serum beschrieben worden sind (PALACIN et al., 2012). Daher ist zu vermuten, dass auch bei Katzen mit HCM die miRNA-Expression von Serum und Endomyokard nicht verglichen werden können. Dies könnte durch eine miRNA-Analyse myokardialer Proben von Katzen mit HCM verifiziert werden. Eine Entnahme von Myokardproben war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da dies eine klinische Studie war.

In der vorliegenden Studie konnten auch einige Ergebnisse von Arbeiten, welche die miRNA-Zusammensetzung im Serum, Plasma oder mononukleären Zellen von Patienten im CHF analysierten, nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist dies auf die unterschiedlichen kardialen Pathologien zurückzuführen, die in diesen Studien dem CHF zugrunde lagen, wie Klappendefekte, koronare Herzerkrankungen, artherosklerotische Erkrankungen, DCM oder ICM (CORSTEN et al., 2010; TIJSEN et al., 2010; VOELLENKLE et al., 2010; GOREN et al., 2012).

Ein Einfluss des Krankheitsstadiums oder der zur Therapie der Krankheit verwendeten Medikamente auf die miRNA-Expression ist ebenfalls nicht auszuschließen. So waren signifikant erhöhte Mengen an miR-210 in mononukleären Zellen von Patienten im CHF der NYHA Klasse III und IV, nicht

aber bei Patienten der NYHA Klasse II, nachweisbar (ENDO et al., 2013). Es wurde bereits dokumentiert, dass miR-210 im Zusammenhang mit Hypoxie verstärkt exprimiert wird (KULSHRESHTHA et al., 2007), ein Zustand, der nicht auf die klinisch stabilen Katzen der vorliegenden Studienpopulation zutrifft. Auch andere Studien konnten Unterschiede von miRNA-Expressionen in Abhängigkeit des Stadiums des Herzversagens feststellen (TIJSEN et al., 2010; FUKUSHIMA et al., 2011).

Unter Therapie konnte zwei Wochen bis zwei Monate post akutem myokardialem Infarkt eine Verringerung der zirkulierenden miRNA-Menge bis hin zur Normalisierung dokumentiert werden (AI et al., 2010; WANG et al., 2010a). Ebenso konnte bei Ratten bei induziertem hypertensiven Herzversagen ein Unterschied der miRNA-Plasmakonzentration bei ACE-Hemmer-Therapie im Vergleich zu Placebo-Gabe festgestellt werden (DICKINSON et al., 2013). Daher kann auch bei den Katzen im CHF durch HCM der vorliegenden Studie, die durch Diuretika und individuell weitere Medikamente stabilisiert wurden, ein Einfluss von Therapieart- und -dauer auf die miRNA-Expression nicht ausgeschlossen werden.

Ferner sind miRNA-Nachweismethoden bis dato nicht standardisiert und in Abhängigkeit der Studie wurden unterschiedliche Verfahren und Protokolle verwendet. So kann auch der verwendete Microarray-Typ (SATO et al., 2009) und die Normalisierungsmethode (DEO et al., 2011) die miRNA-Analyse beeinflussen.

Einige der miRNAs, anhand derer in der vorliegenden Studie mittels HCL eine klare Differenzierung der Patientengruppen herzgesund und CHF durch HCM möglich war, wurden hingegen bereits zuvor im Zusammenhang mit kardialen Erkrankungen und weiteren Pathologien beschrieben. Eine Zusammenfassung der miRNAs mit entsprechenden Studien ist im Anhang in Tabelle 10 dargestellt.

Im Folgenden soll im Detail auf miRNAs eingegangen werden, die sich bei der Analyse mittels Microarray oder qRT-PCR als signifikant erhöht exprimiert erwiesen haben.

THUM und Mitarbeiter (2007) verglichen die miRNA-Expressionsprofile von Menschen im CHF durch DCM, fetalen Herzen und herzgesunden Kontrollen anhand von Myokardproben. MiR-381, welche die ältere Nomenklatur

miR-381-3p darstellt, war sowohl in versagenden, als auch in fetalen Herzen im Vergleich zu gesunden Kontroll-Herzen verstärkt exprimiert (THUM et al., 2007). Auch bei anderen Krankheiten, wie bei der myotonen Dystrophie Typ 2 (GRECO et al., 2012), welche auch das Herz betreffen kann, oder bei verschiedenen Krebserkrankungen konnte eine abweichende Expression von miR-381(-3p) nachgewiesen werden (TANG et al., 2011; ROTHSCHILD et al., 2012)

MiR-486-3p konnte im Gewebe von gesunden Herzen und Herzen der Phänotypen HCM oder DCM mittels *deep sequencing* nachgewiesen werden. Sowohl in der HCM-, als auch in der DCM-Gruppe war miR-486-3p tendenziell erhöht exprimiert, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant (LEPTIDIS et al., 2013). Des Weiteren zeigten Patienten mit Mitralstenose, mit oder ohne Vorhofflimmern, eine veränderte Expression von miR-486-3p im rechtsatrialem Gewebe. Dabei wurde im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen eine erniedrigte Expression nachgewiesen (XIAO et al., 2011). Ebenso wurden veränderte Regulationen von miR-486-3p bei hepatozellulären (HUANG et al., 2012) oder kolorektalen Karzinomen (MOSAKHANI et al., 2012) und intraepithelialen Veränderungen des Pankreas (YU et al., 2012) beschrieben.

Ein Nachweis von miR-4751, miR-5700 und miR-513a-3p bei Herzerkrankungen ist bisher nicht dokumentiert. Sie wurden jedoch in Zusammenhang mit verschiedenen Neoplasien beschrieben, wie Brustkrebs (miR-4751) (PERSSON et al., 2011), Brustkrebs und Lungenadenokarzinom (miR-513a-3p) (COCHRANE et al., 2012; ZHANG et al., 2012a) oder Prostatakrebs (miR-5700) (WATAHIKI et al., 2011).

Im veränderten rechten Atrium von Patienten mit Klappenerkrankung konnten COOLEY und Mitarbeiter (2012) eine signifikante verstärkte Expression von miR-376c, welche miR-376c-3p entspricht, feststellen (COOLEY et al., 2012). Ähnlich wie miR-486-3p konnte beim Vergleich von Patienten mit HCM oder DCM mit herzgesunden Menschen eine tendenziell erhöhte Expression von miR-376c-3p festgestellt werden (LEPTIDIS et al., 2013).

Erhöhte Konzentration von miR-320 konnte sowohl im Myokard von Patienten im CHF, als auch in fetalen Herzen nachgewiesen werden (THUM et al., 2007). Im Maus-Modell mit induzierter Ischämie des Myokards ließ sich *in vivo* und *ex vivo* ebenso eine Deregulation von miR-320 nachweisen (REN et al., 2009). In diesen

genannten Studien wurde jedoch die Nomenklatur von miR-320 nicht weiter spezifiziert, so dass unklar ist, ob diese Ergebnisse mit miR-320e gleichzusetzen sind. Eine veränderte Expression von miR-320e konnte in der zellulären Blutfraktion von Glioblastom-Patienten festgestellt werden (ROTH et al., 2011).

Der Beleg einer Deregulation von miR-1246 bei kardialen Pathologien ist bereits NAIR und Mitarbeitern (2012) gelungen (NAIR et al., 2012). Sie analysierten die miRNA-Zusammensetzung der Leukozytenfraktion. Sowohl bei Patienten mit isolierter diastolischer Dysfunktion als auch bei kompensierten oder dekompenzierten Patienten mit zusätzlicher systolischer Dysfunktion konnte eine signifikant höhere Expression von miR-1246 festgestellt werden. Die diastolische Funktion wurde anhand der Gewebedoppler-Parametern „E_a“ (Gewebebeschwindigkeit in der frühen Diastole auf Höhe des Mitralannulus) und „E/E_a“ (Verhältnis der Geschwindigkeit der frühen Diastole im Mitraleinfluss zu E_a) evaluiert (NAIR et al., 2012). Eine reduzierte frühdiastolische Gewebebeschwindigkeit, die Ausdruck einer reduzierten diastolischen Funktion ist, konnte in verschiedenen Studien bei Katzen mit HCM nachgewiesen werden (KOFFAS et al., 2006; MACDONALD et al., 2006b). Auch bei der Gruppe „CHF durch HCM“ (n = 8) der vorliegenden Studie konnte durch qRT-PCR-Analyse eine signifikant erhöhte miR-1246-Expression gegenüber herzgesunden Tieren (n = 8) dokumentiert werden. Zur Beurteilung, ob auch hier eine erhöhte Expression von miR-1246 mit einer reduzierten diastolischen Funktion verknüpft ist, wurden die ermittelten diastolischen Gewebebeschwindigkeiten herangezogen. Alle Geschwindigkeiten der Gruppe „CHF durch HCM“ (n = 8) waren, mit Ausnahme einer Gewebebeschwindigkeitsmessung, niedriger als die angegebenen Referenzwerte für TVI bei Katzen (WAGNER, 2006; SCHILLER, 2007). Im direkten Vergleich mit den herzgesunden Tieren (n = 8) wies die Gruppe „CHF durch HCM“ (n = 8) auch tendenziell geringere Geschwindigkeiten von E-, A- und EA-Wellen auf. Bis auf die fusionierte EA-Welle der LVFW waren die Unterschiede jedoch nicht von signifikantem Ausmaß. Dies könnte durch die geringe Gruppengröße bedingt sein. Der Vergleich der Microarray-Gruppen „CHF durch HCM“ (n = 11) und „herzgesund“ (n = 12), erbrachte, mit Ausnahme der isolierten E-Welle und A-Welle in der LVFW, signifikant geringere diastolische Gewebebeschwindigkeiten in der HCM-Gruppe.

MiR-1246 war bei Menschen mit Herzerkrankung in der Leukozytenfraktion ca.

30 000-fach höher exprimiert als bei der herzgesunden Kontrollgruppe (NAIR et al., 2012). Die Expressionserhöhung von miR-1246 im Serum von an HCM erkrankten Katzen im Vergleich zu gesunden Katzen fiel jedoch recht gering aus. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Expression von miR-1246 in der Leukozytenfraktion von Katzen mit HCM im Vergleich zu gesunden Katzen.

In einer weiteren humanmedizinischen Studie konnte im Gewebe von hochgradig vergrößerten linken Atrien eine höhere Expression von miR-1246 im Vergleich zu Gewebe von rechten Atrien mit zugrunde liegender Klappenerkrankung dokumentiert werden. Damit gelang auch ein direkter Nachweis von miR-1246 in verändertem endomyokardialen Gewebe (COOLEY et al., 2012). Weder bei der Analyse des miRNA-Profiles von Myokardproben, die von gesunden oder von HCM-erkrankten Menschen stammen (LEPTIDIS et al., 2013), noch in Ventrikeln von Mäusen, die sich in unterschiedlichen Stadien von primärer HCM befanden (BAGNALL et al., 2012), wurde miR-1246 nachgewiesen. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Gewebeproben von unterschiedlichen Lokalisationen des Herzens stammen. Während bei COOLEY und Mitarbeitern (2012) atriales Gewebe analysiert wurde, entnahmen sowohl LEPTIDIS und Mitarbeiter (2013), als auch BAGNALL und Mitarbeiter (2012) ventrikuläres Gewebe (BAGNALL et al., 2012; COOLEY et al., 2012; LEPTIDIS et al., 2013).

Eine Erhöhung der im Serum zirkulierenden Menge von miR-1246 konnte auch bei Patienten mit unterschiedlichen neoplastischen Erkrankungen wie etwa bei einem ösophagealen Plattenepithelkarzinom (TAKESHITA et al., 2013) oder bei einem Ovarialkarzinom festgestellt werden (KUHLMANN et al., 2012). Zudem ist eine höhere Expression von miR-1246 in Gewebeproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom dokumentiert (PIEPOLI et al., 2012).

Überraschenderweise wurden bei der Microarray-Analyse Signale verschiedener miRNAs angezeigt, die mit Sonden für die Sequenzen humaner Viren hybridisierten. Dabei wurden miRNAs der humanen Polyoma Viren 1 und 2, des Epstein-Barr-, Hepatitis-B-, humanem Zytomegalie-, humanem Immundefizienz- und Kaposi Sarkom-assoziierten Herpes-Virus, sowie die Herpes-Simplex-Viren 1 und 2 detektiert.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Kreuzreaktion entsprechender feliner

Viren-miRNA mit den Sequenzen der miRNA humaner Viren sein. Das feline Immunschwächevirus (FIV) und das humane Immunschwächevirus (HIV) gehören beide zur Gattung der Lentiviren (KAA DEN, 2002). Eine begrenzte Ähnlichkeit der Genome ist beschrieben, wobei einige akzessorische Gene nicht übereinstimmen (TALBOTT et al., 1989; ELDER et al., 2010). Daneben scheint es möglich, dass die Katzen tatsächlich Träger humaner Viren sind. Bei der Untersuchung von Katzen-Serumproben auf Antikörper gegen Epstein-Barr-Virus (EBV) im Vereinten Königreich wurde eine Prävalenz von EBV-Antikörperpositiven Katzen von 38,6% ermittelt (MILMAN et al., 2011). Mit welchen Sequenzen die Sonden des Microarrays hier hybridisierten, lässt sich aber nicht eindeutig sagen. Eine Untersuchung der verwendeten Katzenserumproben auf EBV-Antikörper könnte zur Klärung dieser Frage beitragen.

3 Limitationen und Ausblick

Eine Limitation dieser als Pilotstudie konzipierten Arbeit ist die geringe Größe der Gruppen. Des Weiteren unterschieden sich die Patientengruppen hinsichtlich Alter und Geschlecht, wobei in verschiedenen humanmedizinischen Studien, mit Ausnahme einzelner weniger miRNAs, keine Auswirkung von Alter oder Geschlecht auf die miRNA-Expression festgestellt werden konnte (IKEDA et al., 2007; AI et al., 2010; CORSTEN et al., 2010; FICHTLSCHERER et al., 2010; GOREN et al., 2012). Da dies eine klinische Studie mit Patienten der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Kleintierklinik war, nahmen Katzen unterschiedlicher Rassen teil. Auch dies ist ein Faktor mit möglichem Einfluss auf die miRNA-Expression

Um die Bedeutung und das diagnostische Potenzial von miRNA bei der feline HCM intensiver zu beleuchten, sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen nötig. Es wäre sinnvoll, dass künftige Studien auch akut dekompensierte Katzen einbeziehen, sodass ein Einfluss von Medikamenten auf die miRNA-Expression ausgeschlossen werden kann. Interessant wäre auch die Durchführung von Longitudinalstudien, die Katzen einschließen, die initial mildere Formen einer HCM aufweisen. Bei Folgeuntersuchungen sollte dann kontrolliert werden, ob die Krankheit fortschreitet und sich in abhängig des Krankheitsstadiums die miRNA-Expression ändert.

Zudem wäre es aufschlussreich zu überprüfen, ob die dokumentierten

Abweichungen des miRNA-Musters bei Katzen mit HCM Ursache oder Folge einer HCM sind und inwiefern diese miRNAs in die Pathogenese dieser Erkrankung einzuordnen sind. Hierfür sind Analysen erforderlich, die die Funktion der spezifischen miRNAs beleuchten. Dies ist durch die Identifikation von Zielgenen erreichbar. Eine mögliche Methode hierfür wäre beispielsweise die Verwendung von bioinformatischen Vorhersagesystemen (KIRIAKIDOU et al., 2004; KREK et al., 2005). Zudem könnte auch über induzierte miRNA-Deregulation der Einfluss einer spezifischen miRNA auf den Phänotyp einer Zelle untersucht werden (MATKOVICH et al., 2012; XU et al., 2012).

Diese Arbeit gewährte erstmals Einblicke in die miRNA-Expression von Katzen mit primärer HCM. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass zirkulierende miRNAs möglicherweise auch bei Katzen ein Potenzial als minimal-invasiver Biomarker zur Diagnose einer HCM und Herzversagen haben und bisher eingesetzte Methoden ergänzen könnten.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die feline hypertrophe Kardiomyopathie stellt die häufigste Herzerkrankung der Katze dar. Sie präsentiert sich klinisch mit einer variabel andauernden asymptomatischen Phase. Auf diese können Symptome folgen, die durch kongestives Herzversagen, arterielle Thrombembolien oder Rhythmusstörungen verursacht werden. Derzeit gilt die Echokardiographie als sicherste Methode zur Diagnosefindung. Deren Einsatz ist durch hohe Kosten, die Erfordernis eines hochqualifizierten Untersuchers und die schwierige Interpretation grenzwertiger Ultraschallbefunde limitiert. Eine Methode, die den genauen pathologischen Status reflektiert und einfach in der Handhabung ist, könnte dieses Manko in der Diagnostik der hypertrophen Kardiomyopathie ausgleichen.

Mikro-Ribonukleinsäuren sind kleine, einsträngige, nicht-kodierende Ribonukleinsäuren. Über verschiedene Mechanismen sind sie beteiligt an der Regulation von Genen und steuern grundlegende Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose. Eine spezifische Expression von Mikro-Ribonukleinsäuren ist auch im Zusammenhang mit Krankheitsbildern wie Neoplasien, Endokrinopathien und kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben. Sie können nicht nur im Gewebe ihrer Synthese nachgewiesen werden, sondern sie zeigen sich auch stabil in verschiedenen transzellulären Flüssigkeiten. Bislang wurde die Mikro-Ribonukleinsäuren-Zusammensetzung im Serum von Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Studie „**Mikro-Ribonukleinsäuren-Expressionsprofile im Serum von Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie**“ war es, die Qualität und Quantität der Mikro-Ribonukleinsäuren-Zusammensetzung im Serum von Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie im kongestiven Herzversagen und im subklinischen Stadium zu analysieren. Durch den Vergleich mit herzgesunden Tieren sollte auf mögliche abweichende Expressionen hin geprüft werden.

Insgesamt konnten 31 Katzen durch eine klinische Untersuchung, Echokardiographie und Radiographie einem kardialen Phänotyp zugeordnet und deren Mikro-Ribonukleinsäuren im Serum analysiert werden. Die Population setzte sich aus Katzen mit hochgradiger hypertropher Kardiomyopathie im kongestiven Herzversagen, Katzen mit hochgradiger hypertropher

Kardiomyopathie im subklinischen Stadium sowie herzgesunden Tieren zusammen. Zunächst wurde durch individuell gefertigte Microarrays die Mikro-Ribonukleinsäuren-Zusammensetzung von Katzen der Gruppen herzgesund und hypertrophe Kardiomyopathie im dekompensierten Stadium bestimmt und miteinander verglichen. Anschließend erfolgte eine relative Quantifizierung ausgesuchter Mikro-Ribonukleinsäuren mittels quantitativer Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion. In die Analyse wurden Teile der Kohorten herzgesund und hypertrophe Kardiomyopathie im kongestiven Herzversagen sowie Katzen mit hochgradiger hypertropher Kardiomyopathie im subklinischen Stadium miteinbezogen.

Im Serum der Katzen konnten Signale von 970 verschiedenen Mikro-Ribonukleinsäuren nachgewiesen werden. Der Vergleich von Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie im kongestiven Herzversagen mit herzgesunden Tieren ergab eine signifikant höhere Expression der Mikro-Ribonukleinsäuren-381-3p, -486-3p, -4751, -376c-3p, -5700, -513a-3p und -320e. Auf Grundlage der Expression der 25 Mikro-Ribonukleinsäuren mit der deutlichsten Deregulation war durch hierarchische Clusteranalyse eine korrekte Trennung der Katzen in ihre phänotypischen Gruppen möglich. Die signifikant deregulierten Mikro-Ribonukleinsäuren-381-3p, -486-3p, -376c-3p, -320e sowie zusätzlich -1246 und -208b wurden für die Validierung ausgewählt. Dabei konnten im Serum von Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie im dekompensierten Stadium signifikant höhere Mengen von Mikro-Ribonukleinsäure-1246 sowohl gegenüber herzgesunden Katzen, als auch Tieren mit hypertropher Kardiomyopathie im subklinischen Stadium ausgemacht werden. Eine erhöhte Expression dieser Mikro-Ribonukleinsäure wurde bereits beim Menschen im Zusammenhang mit diastolischer Dysfunktion beschrieben.

Diese Arbeit gewährte erstmals Einblicke in die Mikro-Ribonukleinsäuren-Expression von Katzen mit primärer hypertropher Kardiomyopathie. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass zirkulierende Mikro-Ribonukleinsäuren auch bei Katzen ein Potenzial als minimal-invasiver Biomarker zur Diagnose einer hypertrophen Kardiomyopathie und Herzversagen haben. Um die Eignung von Mikro-Ribonukleinsäuren als sensitiven und spezifischen Test intensiver zu evaluieren, sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen nötig. Diese sollten auch weitere Krankheitsstadien und andere feline Kardiomyopathien miteinbeziehen.

VII SUMMARY

Hypertrophic cardiomyopathy is the most common cardiac disease in cats. This type of cardiomyopathy is characterized by a variable period without clinical signs. Symptoms are caused by congestive heart failure, arterial thromboembolism or arrhythmias. Echocardiography is the best way to verify the diagnosis. However, this method is limited by high costs and the need for of a qualified examiner. A specific and easy applicable test would be very helpful in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy.

Micro-ribonucleic acids are small, single-stranded, non-coding ribonucleic acids. Micro-ribonucleic acids regulate genes by different mechanisms and control cell differentiation, proliferation and apoptosis. Specific expression profiles of micro-ribonucleic acids have been described for different pathologic processes like neoplasia, endocrinopathies and cardiovascular diseases. They are detected in all tissues and also in transcellular fluids. So far, the micro-ribonucleic acids profile in the serum of cats with hypertrophic cardiomyopathy has not yet been determined.

The aim of the study “**Micro-ribonucleic acids expression profiles in serum of cats with hypertrophic cardiomyopathy**” was to compare the micro-ribonucleic acids composition in serum of cats with hypertrophic cardiomyopathy with congestive heart failure, HCM cats without clinical signs, and healthy control cats.

31 cats were included and their micro-ribonucleic acids in serum samples were analyzed. Cats were assessed by clinical examination, echocardiography and radiography. According to these findings they were categorized in various phenotypes (“severe hypertrophic cardiomyopathy with congestive heart failure”, “severe hypertrophic cardiomyopathy without clinical signs” and “healthy”). The micro-ribonucleic acids signature in serum of cats with hypertrophic cardiomyopathy with congestive heart failure was determined using a custom-made miRNA microarray. The results were compared to the micro-ribonucleic acid expression of healthy cats. A quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction for six selected micro-ribonucleic acids was performed on samples from all phenotypes.

The microarray analysis detected signals of 970 different micro-ribonucleic acids

in feline serum. The micro-ribonucleic acids-381-3p, -486-3p, -4751, -376c-3p, -5700, -513a-3p were upregulated in cats with hypertrophic cardiomyopathy. The 25 micro-ribonucleic acids with the highest expression difference were used to perform a hierarchical cluster analysis, which separated the group of healthy cats from cats with severe hypertrophic cardiomyopathy with congestive heart failure.

The micro-ribonucleic acids-381-3p, -486-3p, -376c-3p, -320e and additionally -1246 und -208b were selected for validation. Micro-ribonucleic acid-1246 was upregulated in the serum of cats with severe hypertrophic cardiomyopathy with congestive heart failure compared to healthy cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy without clinical signs. An upregulation of micro-ribonucleic acid--1246 was previously reported for humans with diastolic dysfunction.

This study provides first insights of the micro-ribonucleic acid expression of cats with primary hypertrophic cardiomyopathy. The obtained results indicate that circulating micro-ribonucleic acids might be potentially useful as biomarkers to diagnose hypertrophic cardiomyopathy and congestive heart failure. Further studies will be needed to evaluate the applicability of micro-ribonucleic acid as a sensitive and specific test. Future studies should include a larger number of cases, additional disease stages and various types of cardiomyopathies.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

Abbott JA, MacLean HN. Two-dimensional echocardiographic assessment of the feline left atrium. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 111-9.

Abbott JA. Feline hypertrophic cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 685-700.

Abraham TP, Dimaano VL, Liang HY. Role of tissue Doppler and strain echocardiography in current clinical practice. *Circulation* 2007; 116: 2597-609.

Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2010; 56: 1183-5.

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

Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Yang B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 73-7.

Ajit SK. Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules. *Sensors (Basel)* 2012; 12: 3359-69.

Amberger CN, Glardon O, Glaus T, Horauf A, King JN, Schmidli H, Schroter L, Lombard CW. Effects of benazepril in the treatment of feline hypertrophic cardiomyopathy Results of a prospective, open-label, multicenter clinical trial. *J Vet Cardiol* 1999; 1: 19-26.

Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* 2003; 13: 807-18.

Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-5.

Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 2007; 134: 1635-41.

Andersen PS, Havndrup O, Bundgaard H, Larsen LA, Vuust J, Pedersen AK, Kjeldsen K, Christiansen M. Genetic and phenotypic characterization of mutations in myosin-binding protein C (MYBPC3) in 81 families with familial hypertrophic cardiomyopathy: total or partial haploinsufficiency. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 673-7.

Asikainen S, Rudgalvyte M, Heikkinen L, Louhiranta K, Lakso M, Wong G, Nass R. Global microRNA expression profiling of *Caenorhabditis elegans* Parkinson's disease models. *J Mol Neurosci* 2010; 41: 210-8.

Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA* 2004; 10: 1813-9.

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005; 122: 553-63.

Bagnall RD, Tsoutsman T, Shephard RE, Ritchie W, Semsarian C. Global MicroRNA Profiling of the Mouse Ventricles during Development of Severe Hypertrophic Cardiomyopathy and Heart Failure. *PLoS One* 2012; 7: e44744.

Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, Einav U, Gilad S, Hurban P, Karov Y, Lobenhofer EK, Sharon E, Shibolet Y, Shtutman M, Bentwich Z, Einat P. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 2004; 14: 2486-94.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.

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

Bedard C, Lanevski-Pietersma A, Dunn M. Evaluation of coagulation markers in the plasma of healthy cats and cats with asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Vet Clin Pathol* 2007; 36: 167-72.

Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005; 120: 21-4.

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003; 35: 215-7.

Beuvink I, Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F, Dengler U, Hall J, Filipowicz W, Weiler J. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: e52.

Bishop SP (2004) Canine and Feline Cardiomyopathy. 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). Middleton, Wisconsin

Bonagura JD. Feline echocardiography. *J Feline Med Surg* 2000; 2: 147-51.

Bond BR, Fox PR, Peterson ME, Skavaril RV. Echocardiographic findings in 103 cats with hyperthyroidism. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 192: 1546-9.

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

Boon JA (2011) *Veterinary Echocardiographie*, 2nd ed. edn. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 1097-101.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 2003; 113: 25-36.

Bright JM, Golden AL, Gompf RE, Walker MA, Toal RL. Evaluation of the calcium channel-blocking agents diltiazem and verapamil for treatment of feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 1991; 5: 272-82.

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

Brizard D, Amberger C, Hartnack S, Doherr M, Lombard C. Phenotypes and echocardiographic characteristics of a European population of domestic shorthair cats with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2009; 151: 529-38.

Bussadori C, Amberger C, Le Bobinnec G, Lombard CW. Guidelines for the echocardiographic studies of suspected subaortic and pulmonic stenosis. *J Vet Cardiol* 2000; 2: 15-22.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16

at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-9.

Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang DZ. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2772-86.

Campbell FE, Kittleson MD. The effect of hydration status on the echocardiographic measurements of normal cats. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1008-15.

Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Hoydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW, 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007; 13: 613-8.

Carter TD, Pariaut R, Snook E, Evans DE. Multicentric lymphoma mimicking decompensated hypertrophic cardiomyopathy in a cat. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1345-7.

Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M, Kulozik AE, Hentze MW, Muckenthaler MU. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006; 12: 913-20.

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

Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 452-60.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e179.

Chen C, Yang S, Wang F, Long G, Yang X, Chen F, Wang D. Plasma microRNA-361-5p as a biomarker of chronic heart failure. *Heart and Education in Heart* 2010; 96

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303: 83-6.

Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 2004; 303: 2022-5.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Zen K, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436: 740-4.

Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 2007; 447: 823-8.

Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol* 2007; 170: 1831-40.

Chetboul V, Lefebvre HP, Pinhas C, Clerc B, Boussof M, Pouchelon JL. Spontaneous feline hypertension: clinical and echocardiographic abnormalities, and survival rate. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 89-95.

Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 2009; 460: 479-86.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.

Choong ML, Yang HH, McNiece I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol* 2007; 35: 551-64.

Cochrane DR, Jacobsen BM, Connaghan KD, Howe EN, Bain DL, Richer JK. Progesterin regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 355: 15-24.

Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, Shi Y, Cannon B, Kelnar K, Kempainen J, Brown D, Chen C, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders AM, Roses AD, Richards CA. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis* 2008; 14: 27-41.

Connolly DJ, Cannata J, Boswood A, Archer J, Groves EA, Neiger R. Cardiac troponin I in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Feline Med Surg* 2003; 5: 209-16.

Connolly DJ, Guitian J, Boswood A, Neiger R. Serum troponin I levels in hyperthyroid cats before and after treatment with radioactive iodine. *J Feline Med Surg* 2005; 7: 289-300.

Connolly DJ, Brodbelt DC, Copeland H, Collins S, Fuentes VL. Assessment of the diagnostic accuracy of circulating cardiac troponin I concentration to distinguish between cats with cardiac and non-cardiac causes of respiratory distress. *J Vet Cardiol* 2009; 11: 71-8.

Cooley N, Cowley MJ, Lin RC, Marasco S, Wong C, Kaye DM, Dart AM, Woodcock EA. Influence of atrial fibrillation on microRNA expression profiles in left and right atria from patients with valvular heart disease. *Physiol Genomics* 2012; 44: 211-9.

Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3: 499-506.

Cote E, Jaeger R. Ventricular tachyarrhythmias in 106 cats: associated structural cardiac disorders. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1444-6.

Cote E, Macdonald KA, Meurs KM, Sleeper MM. Hypertrophic Cardiomyopathy. In: *Feline Cardiology*. Cote E, Macdonald KA, Meurs KM, Sleeper MM, eds. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell 2011: 103-76.

Cummins P, Perry SV. Troponin I from human skeletal and cardiac muscles. *Biochem J* 1978; 171: 251-9.

D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggiolini S, Marenzi G, Pompilio G, Capogrossi MC. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010; 31: 2765-73.

da Costa Martins PA, Bourajjaj M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, Molkenin JD, De Windt LJ. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* 2008; 118:

1567-76.

Davis BW, Raudsepp T, Pearks Wilkerson AJ, Agarwala R, Schaffer AA, Houck M, Chowdhary BP, Murphy WJ. A high-resolution cat radiation hybrid and integrated FISH mapping resource for phylogenomic studies across Felidae. *Genomics* 2009; 93: 299-304.

de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Anal Chim Acta* 2011; 699: 134-52.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-5.

Deo A, Carlsson J, Lindlof A. How to choose a normalization strategy for miRNA quantitative real-time (qPCR) arrays. *J Bioinform Comput Biol* 2011; 9: 795-812.

Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, Lynch JM, Hullinger TG, Seto AG, van Rooij E. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *Eur J Heart Fail* 2013;

Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 2007; 131: 1097-108.

Dirven MJ, Cornelissen JM, Barendse MA, van Mook MC, Sterenborg JA. Cause of heart murmurs in 57 apparently healthy cats. *Tijdschr Diergeneeskd* 2010; 135: 840-7.

Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005; 132: 4645-52.

Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of

small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 2007; 4: 721-6.

Elder JH, Lin YC, Fink E, Grant CK. Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels with HIV. *Curr HIV Res* 2010; 8: 73-80.

Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008; 29: 270-6.

Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, Nonogi H, Ma X, Weng H, Hirokawa G, Asada T, Kakinoki S, Yamaoka T, Fukushima Y, Iwai N. MicroRNA 210 as a Biomarker for Congestive Heart Failure. *Biol Pharm Bull* 2013; 36: 48-54.

Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011; 717: 85-90.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008; 132: 9-14.

Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 586-93.

Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002; 82: 945-80.

Ferasin L, Sturgess CP, Cannon MJ, Caney SM, Gruffydd-Jones TJ, Wotton PR. Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001). *J Feline Med Surg* 2003; 5: 151-9.

Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Roxel T, Muller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010; 107: 677-84.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102-14.

Fleischhacker SN, Bauersachs S, Wehner A, Hartmann K, Weber K. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats. *Vet J* 2013;

Flicek P, Ahmed I, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, García-Girón C, Gordon L, Hourlier T, Hunt S, Juettemann T, Kähäri AK, Keenan S, Komorowska M, Kulesha E, Longden I, Maurel T, McLaren WM, Muffato M, Nag R, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Pritchard E, Riat HS, Ritchie GRS, Ruffier M, Schuster M, Sheppard D, Sobral D, Taylor K, Thormann A, Trevanion S, White S, Wilder SP, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJP, Johnson N, Kinsella R, Parker A, Spudich G, Yates A, Zadissa A, Searle SMJ. Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D48-D55.

Forstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE, Zamore PD. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* 2005; 3: e236.

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

Fox PR, Petrie JP, Liu SK (1997) Clinical and pathological features of cardiomyopathy characterized by myocardial failure in 49 cats, 1990-1995

[abstract]. ACVIM Forum 1997. Lake Buena Vista, Florida

Fox PR. Feline Cardiomyopathies. In: Textbook of Canine and Feline Cardiology; Principles and Clinical Practice. Fox PF, Sisson D, Moise NS, eds. Philadelphia: W. B. Saunders 1999: 621-78.

Fox PR. Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical and pathologic correlates. *J Vet Cardiol* 2003a; 5: 39-45.

Fox PR (2003b) Prospective, double-blinded, multicenter evaluation of chronic therapies for feline diastolic failure: Interim analysis [abstract]. ACVIM Forum 2003. Charlotte, North Carolina

Fox PR, Oyama MA, Reynolds C, Rush JE, DeFrancesco TC, Keene BW, Atkins CE, Macdonald KA, Schober KE, Bonagura JD, Stepien RL, Kellihan HB, Nguyenba TP, Lehmkuhl LB, Lefbom BK, Moise NS, Hogan DF. Utility of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) to distinguish between congestive heart failure and non-cardiac causes of acute dyspnea in cats. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S51-61.

Fox PR, Rush JE, Reynolds CA, DeFrancesco TC, Keene BW, Atkins CE, Gordon SG, Schober KE, Bonagura JD, Stepien RL, Kellihan HB, Macdonald KA, Lehmkuhl LB, Nguyenba TP, Sydney Moise N, Lefbom BK, Hogan DF, Oyama MA. Multicenter evaluation of plasma N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-pro BNP) as a biochemical screening test for asymptomatic (occult) cardiomyopathy in cats. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1010-6.

Fox PR, Ettinger SJ, Lamb KE, Keene BW, deFrancesco TC, Atkins CA, Stepien RL, Kellihan HB, Rush JE, Oyama MA, Reynolds CA, Gordon SG, Macdonald KA, Rosenthal SL, Lefbom BK, Nguyenba TP, Lehmkuhl LB, Schober KE, Bonagura JD, Moise NS (2013) Evaluation of NT-Pro-Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP) as a Prognostic Indicator of Short-Term Outcome in Cats with Heart failure. In: ACVIM Forum 2013, Seattle, Washington

Freedman J, Ercan B, Morin K, Liu C-T, Tamer L, Ayaz L, Kanadasi M, Cicek D, Seyhan A, Akilli R, Camci C, Cengiz B, Oztuzcu S, Tanriverdi K. The distribution of circulating microRNA and their relation to coronary disease. *F1000 Research* 2012;

Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 2004; 109: 1580-9.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.

Fries R, Heaney AM, Meurs KM. Prevalence of the myosin-binding protein C mutation in Maine Coon cats. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 893-6.

Fuentes VL. Management of Feline Myocardial Disease. In: *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV: Small Animal Practice*. Bonagura JD, ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders Elsevier 2008: 809-15.

Fujii Y, Masuda Y, Takashima K, Ogasawara J, Machida N, Yamane Y, Chimura S, Awazu T, Yamane T, Wakao Y. Hypertrophic cardiomyopathy in two kittens. *J Vet Med Sci* 2001; 63: 583-5.

Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J* 2011; 75: 336-40.

Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 2006; 312: 75-9.

Glaus T, Wess G. [Left ventricular hypertrophy in the cat - "when hypertrophic cardiomyopathy is not hypertrophic cardiomyopathy"]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2010; 152: 325-30.

Göktepe S, Abilez OJ, Parker KK, Kuhl E. A multiscale model for eccentric and concentric cardiac growth through sarcomerogenesis. *Journal of Theoretical Biology* 2010; 265: 433-42.

Gordon SG, Saunders AB, Roland RM, Winter RL, Drourr L, Achen SE, Hariu CD, Fries RC, Boggess MM, Miller MW. Effect of oral administration of pimobendan in cats with heart failure. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 89-94.

Goren Y, Kushnir M, Zafir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 147-54.

Granström S, Nyberg Godiksen MT, Christiansen M, Pipper CB, Willesen JT, Koch J. Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy in a Cohort of British Shorthair Cats in Denmark. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; 25: 866-71.

Greaves SC, Roche AH, Neutze JM, Whitlock RM, Veale AM. Inheritance of hypertrophic cardiomyopathy: a cross sectional and M mode echocardiographic study of 50 families. *British Heart Journal* 1987; 58: 259-66.

Greco DS. Feline acromegaly. *Top Companion Anim Med* 2012; 27: 31-5.

Greco S, Perfetti A, Fasanaro P, Cardani R, Capogrossi MC, Meola G, Martelli F. Deregulated microRNAs in myotonic dystrophy type 2. *PLoS One* 2012; 7: e39732.

Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 2004; 10: 828-34.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-40.

Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D109-11.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D154-8.

Gundler S, Tidholm A, Haggstrom J. Prevalence of myocardial hypertrophy in a population of asymptomatic Swedish Maine coon cats. *Acta Vet Scand* 2008; 50: 22.

Guo X, Su B, Zhou Z, Sha J. Rapid evolution of mammalian X-linked testis microRNAs. *BMC Genomics* 2009; 10: 97.

Gwathmey JK, Warren SE, Briggs GM, Copelas L, Feldman MD, Phillips PJ, Callahan M, Jr., Schoen FJ, Grossman W, Morgan JP. Diastolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. Effect on active force generation during systole. *J Clin Invest* 1991; 87: 1023-31.

Hall DJ, Shofer F, Meier CK, Sleeper MM. Pericardial effusion in cats: a retrospective study of clinical findings and outcome in 146 cats. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1002-7.

Hambrook LE, Bennett PF. Effect of pimobendan on the clinical outcome and survival of cats with non-aurine responsive dilated cardiomyopathy. *J Feline Med Surg* 2012; 14: 233-9.

Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 2005; 579: 5822-9.

Hansson K, Haggstrom J, Kvart C, Lord P. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43: 568-75.

Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, Olson EN. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* 2010; 18: 282-93.

Hayward NJ, Baines SJ, Baines EA, Herrtage ME. The radiographic appearance of the pulmonary vasculature in the cat. *Vet Radiol Ultrasound* 2004; 45: 501-4.

Henik RA, Stepien RL, Bortnowski HB. Spectrum of M-mode echocardiographic abnormalities in 75 cats with systemic hypertension. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 359-63.

Herndon WE, Kittleson MD, Sanderson K, Drobatz KJ, Clifford CA, Gelzer A, Summerfield NJ, Linde A, Sleeper MM. Cardiac troponin I in feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 558-64.

Herndon WE, Rishniw M, Schrope D, Sammarco CD, Boddy KN, Sleeper MM. Assessment of plasma cardiac troponin I concentration as a means to differentiate cardiac and noncardiac causes of dyspnea in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 1261-4.

Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Ria M, Barrett A, Collins S, Kaisaki P, Argoud K, Fernandez C, Travers ME, Grew JP, Randall JC, Gloyn AL, Gauguier D, McCarthy MI, Lindgren CM. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010; 53: 1099-109.

Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 1987; 329: 219-22.

Hogan DF, Andrews DA, Green HW, Talbott KK, Ward MP, Calloway BM. Antiplatelet effects and pharmacodynamics of clopidogrel in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225: 1406-11.

Hogan DF, Fox PF, Jacob KA, Keene BW, Laste N, Rosenthal SL (2013) Analysis of the Feline Arterial Thromboembolism: Clopidogrel vs. Aspirin trial (Fat Cat) [abstract]. In: ACVIM Forum 2013, Seattle, Washington

Hsu A, Kittleson MD, Paling A. Investigation into the use of plasma NT-proBNP concentration to screen for feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S63-70.

Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F, Robbins RC, Wu JC. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* 2010; 122: S124-31.

Huang YH, Lin KH, Chen HC, Chang ML, Hsu CW, Lai MW, Chen TC, Lee WC, Tseng YH, Yeh CT. Identification of postoperative prognostic microRNA predictors in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012; 7: e37188.

Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 2002; 18 Suppl 1: S96-104.

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16961-6.

Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3: e3694.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-8.

Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 2007; 31: 367-73.

Ikeda S, He A, Kong SW, Lu J, Bejar R, Bodyak N, Lee KH, Ma Q, Kang PM, Golub TR, Pu WT. MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 2193-204.

Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 8699-707.

Jandrey KE, Norris JW, MacDonald KA, Kittleson MD, Tablin F. Platelet function in clinically healthy cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy: analysis using the Platelet Function Analyzer-100. *Vet Clin Pathol* 2008; 37: 385-8.

Jandrey KE, Norris JW, Huang K, Kittleson MD, Tablin F (2009) Plasma Pecam-1 and endothelin-1 concentrations are elevated in ctas with hypertrophic cardiomyopathy. In: 2009 ACVIM Forum & Canadian Veterinary Medical Association Convention, Montreal, Quebec

Jeong MH, Lee JS, Kim do H, Park WJ, Yang DK. Identification of novel microRNAs negatively regulating cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428: 191-6.

Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009; 55: 1944-9.

Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009; 457: 405-12.

Jung SW, Kittleson MD. The effect of atenolol on NT-proBNP and troponin in asymptomatic cats with severe left ventricular hypertrophy because of hypertrophic cardiomyopathy: a pilot study. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1044-9.

Kaaden O-R. Viruserkrankungen der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Rolle M, Mayr A, eds. Stuttgart, Germany: Enke Verlag 2002: 145-376.

Kaneshige T, Machida N, Itoh H, Yamane Y. The anatomical basis of complete atrioventricular block in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Comp Pathol* 2006; 135: 25-31.

Kang K, Peng X, Luo J, Gou D. Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. *J Anim Sci Biotechnol* 2012; 3: 4.

Kershaw O, Heblinski N, Lotz F, Dirsch O, Gruber AD. Diagnostic value of morphometry in feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Comp Pathol* 2012; 147: 73-83.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115: 209-16.

Kienle RD. Feline Cardiomyopathy. In: Manual of Canine and Feline Cardiology. Tilley LP, Smith FWK, Oyama MA, Sleeper MM, eds. St. Louis: Saunders 2008: 151-75.

Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou A. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 2004; 18: 1165-78.

Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2

represses translation. *Cell* 2007; 129: 1141-51.

Kittleson MD. Hypertrophic Cardiomyopathy. In: *Small Animal Cardiovascular Medicine*. Kittleson MD, Kienle RD, eds. St. Louis, Missouri: Mosby 1998: 347-62.

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

Kittleson MD (2012) Feline Hypertrophic Cardiomyopathy: Screens and Genes. *Proceedings ACVIM Forum 2012*. New Orleans, Louisiana

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

Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, Dong Q, Pang Z, Guan Q, Gao L, Zhao J, Zhao L. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol* 2011; 48: 61-9.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: D152-7.

Kraus MS, Calvert CA, Jacobs GJ. Hypertrophic cardiomyopathy in a litter of five mixed-breed cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999; 35: 293-6.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005; 37: 495-500.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR

(qRT-PCR). *Methods* 2010; 50: 298-301.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-9.

Kuhlmann JD, Hahn S, Baraniskin A, Wimberger P, Kasimir-Bauer S (2012) MicroRNA-1246 as a novel candidate for a blood-based biomarker in ovarian cancer patients [abstract]. Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Chicago, IL

Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1859-67.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735-9.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003; 9: 175-9.

Lalor SM, Connolly DJ, Elliott J, Syme HM. Plasma concentrations of natriuretic peptides in normal cats and normotensive and hypertensive cats with chronic kidney disease. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S71-9.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75:

843-54.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-60.

Leptidis S, El Azzouzi H, Lok SI, de Weger R, Olieslagers S, Kisters N, Silva GJ, Heymans S, Cuppen E, Berezikov E, De Windt LJ, da Costa Martins P. A Deep Sequencing Approach to Uncover the miRNOME in the Human Heart. *PLoS One* 2013; 8: e57800.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339: 321-8.

Levine RA, Vlahakes GJ, Lefebvre X, Guerrero JL, Cape EG, Yoganathan AP, Weyman AE. Papillary muscle displacement causes systolic anterior motion of the mitral valve. Experimental validation and insights into the mechanism of subaortic obstruction. *Circulation* 1995; 91: 1189-95.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-98.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.

Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 1117-24.

Lip GY, Gibbs CR. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's

triad revisited. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 1424-6.

Little WC, Downes TR. Clinical evaluation of left ventricular diastolic performance. *Prog Cardiovasc Dis* 1990; 32: 273-90.

Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004a; 101: 9740-4.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004b; 305: 1437-41.

Liu S-k, Chiu YT, Shyu JJ, Factor SM, Chu R, Lin JH, Hsuo HL, Fox PR, Yang PC. Hypertrophic cardiomyopathy in pigs: quantitative pathologic features in 55 cases. *Cardiovascular Pathology* 1994; 3: 261-8.

Liu SK, Maron BJ, Tilley LP. Hypertrophic cardiomyopathy in the dog. *Am J Pathol* 1979; 94: 497-508.

Liu SK, Maron BJ, Tilley LP. Feline hypertrophic cardiomyopathy: gross anatomic and quantitative histologic features. *Am J Pathol* 1981; 102: 388-95.

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

Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 2002; 297: 2053-6.

Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009; 4:

e6229.

Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjekshus J, Lechat P, Torp-Pedersen C. Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J* 2004; 25: 1341-62.

Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 2000; 102: 470-9.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8.

MacDonald KA, Kittleson MD, Larson RF, Kass P, Klose T, 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* 2006a; 20: 1093-105.

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

Macdonald KA. Myocardial Disease: Feline. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders 2009: 1328-41.

Machen MC, Gordon SG, Buch JS, Beall MJ, Oyama MA (2012) Detection of occult feline cardiomyopathy using a pet-side point-of-care NT-proBNP elisa [abstract]. In: *ACVIM Forum 2012*, New Orleans, Louisiana

MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA. In vitro reconstitution of

the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 512-7.

Mandinov L, Eberli FR, Seiler C, Hess OM. Diastolic heart failure. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 813-25.

Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 2005; 19: 2979-90.

Mao ZG, He DS, Zhou J, Yao B, Xiao WW, Chen CH, Zhu YH, Wang HJ. Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 2010; 5: 79.

Mar JC, Kimura Y, Schroder K, Irvine KM, Hayashizaki Y, Suzuki H, Hume D, Quackenbush J. Data-driven normalization strategies for high-throughput quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 110.

Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 655-70.

Maron BJ, Gottdiener JS, 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* 1981; 48: 418-28.

Maron BJ, Nichols Iii PF, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ. Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: Assessment by m-mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol* 1984a; 53: 1087-94.

Maron BJ, Nichols PF, 3rd, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ. Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol* 1984b; 53: 1087-94.

Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Intramural ("small vessel")

coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1986; 8: 545-57.

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, 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: 785-9.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, 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: 1807-16.

Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 705-15.

Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 1102-7.

Marston S, Copeland O, Jacques A, Livesey K, Tsang V, McKenna WJ, Jalilzadeh S, Carballo S, Redwood C, Watkins H. Evidence from human myectomy samples that MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy through haploinsufficiency. *Circ Res* 2009; 105: 219-22.

Mary J, Chetboul V, Sampedrano CC, Abitbol M, Gouni V, Trehieu-Sechi E, Tissier R, Queney G, Pouchelon JL, Thomas A. Prevalence of the MYBPC3-A31P mutation in a large European feline population and association with hypertrophic cardiomyopathy in the Maine Coon breed. *J Vet Cardiol* 2010; 12: 155-61.

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 2007; 317: 1764-7.

Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, Dorn LE, Watson MA, Margulies KB, Dorn GW, 2nd. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 2009; 119: 1263-71.

Matkovich SJ, Hu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Dorn GW. Direct and Indirect Involvement of MicroRNA-499 in Clinical and Experimental Cardiomyopathy. *Circ Res* 2012;

Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, Usami M, Sasaki T, Sato H, Kawahara Y, Hamasaki T, Nanto S, Hori M, Komuro I. A subset of circulating micrnas are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012; 33: 1787-847.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; 15: 185-97.

Menaut P, Connolly DJ, Volk A, Pace C, Luis Fuentes V, Elliott J, Syme H. Circulating natriuretic peptide concentrations in hyperthyroid cats. *J Small Anim Pract* 2012; 53: 673-8.

Mestdagh P, Feys T, Bernard N, Guenther S, Chen C, Speleman F, Vandesompele J. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: e143.

Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009; 10: R64.

Meurs KM, Kittleson MD, Towbin JA, Ware W. Familial systolic anterior motion of the mitral valve and/or hypertrophic cardiomyopathy in apparently inherited as an autosomal dominant trait in a family of American shorthair cats [abstract]. *J Vet Intern Med* 1997: 138.

Meurs KM, Fox PR, Magnon AL, Liu S, Towbin JA. Molecular screening by polymerase chain reaction detects panleukopenia virus DNA in formalin-fixed hearts from cats with idiopathic cardiomyopathy and myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2000; 9: 119-26.

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

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

Meurs KM, Norgard MM, Kuan M, Haggstrom J, Kittleson M. Analysis of 8 sarcomeric candidate genes for feline hypertrophic cardiomyopathy mutations in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 840-3.

Milman G, Smith KC, Erles K. Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. *Vet Microbiol* 2011; 150: 15-20.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-8.

Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation* 2011; 124: 1537-47.

Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006; 8: 175-93.

Mosakhani N, Sarhadi VK, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundstrom J, Ristamaki R, Osterlund P, Knuutila S. MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 1-9.

Naga Prasad SV, Duan ZH, Gupta MK, Surampudi VS, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Kotwal A, Moravec CS, Starling RC, Perez DM, Sen S, Wu Q, Plow EF, Croce CM, Karnik S. Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J Biol Chem* 2009; 284: 27487-99.

Nagueh MDSF, Middleton KJ, Kopelen HA, Zoghbi WA, Quiñones MA. Doppler Tissue Imaging: A Noninvasive Technique for Evaluation of Left Ventricular Relaxation and Estimation of Filling Pressures. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1527-33.

Nair N, Kumar S, Gongora E, Gupta S. Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol Cell Biochem* 2012;

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

Nelson PT, Baldwin DA, Scearce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods* 2004; 1: 155-61.

Nishimura RA, Tajik AJ. Evaluation of diastolic filling of left ventricle in health and disease: Doppler echocardiography is the clinician's Rosetta Stone. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 8-18.

Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 1108-14.

Nyberg MT, Koch J, Christiansen M (2007) Intra-allelic genetic heterogeneity of hypertrophic cardiomyopathy in the Maine Coon cat [Poster abstract]. HUGOS's human genome meeting. Montreal, Canada

Ohsato K, Shimizu M, Sugihara N, Konishi K, Takeda R. Histopathological factors related to diastolic function in myocardial hypertrophy. *Jpn Circ J* 1992; 56: 325-33.

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007; 130: 89-100.

Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010; 222: 540-5.

Olivotto I, Maron MS, Adabag AS, Casey SA, Vargiu D, Link MS, Udelson JE, Cecchi F, Maron BJ. Gender-related differences in the clinical presentation and outcome of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 480-7.

Paige CF, Abbott JA, Elvinger F, Pyle RL. Prevalence of cardiomyopathy in apparently healthy cats. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 1398-403.

Palacin M, Reguero JR, Martin M, Diaz Molina B, Moris C, Alvarez V, Coto E. Profile of microRNAs differentially produced in hearts from patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomeric mutations. *Clin Chem* 2011; 57: 1614-6.

Palacin M, Coto E, Reguero JR, Moris C, Alvarez V. Profile of microRNAs in the plasma of hypertrophic cardiomyopathy patients compared to healthy controls. *Int J Cardiol* 2012;

Palazzuoli A, Gallotta M, Quatrini I, Nuti R. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 411-8.

Park CY, Choi YS, McManus MT. Analysis of microRNA knockouts in mice. *Hum Mol Genet* 2010; 19: R169-75.

Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R101.

Payne J, Luis Fuentes V, Boswood A, Connolly D, Koffas H, Brodbelt D. Population characteristics and survival in 127 referred cats with hypertrophic cardiomyopathy (1997 to 2005). *J Small Anim Pract* 2010; 51: 540-7.

Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in

normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008; 14: 844-52.

Persson H, Kvist A, Rego N, Staaf J, Vallon-Christersson J, Luts L, Loman N, Jonsson G, Naya H, Hoglund M, Borg A, Rovira C. Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Res* 2011; 71: 78-86.

Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006; 21: 533-42.

Peterson ME, Taylor RS, Greco DS, Nelson RW, Randolph JF, Foodman MS, Moroff SD, Morrison SA, Lothrop CD. Acromegaly in 14 cats. *J Vet Intern Med* 1990; 4: 192-201.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e36.

Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 2004; 5/2004: 92-6.

Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grasser FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005; 2: 269-76.

Piepoli A, Tavano F, Copetti M, Mazza T, Palumbo O, Panza A, di Mola FF, Paziienza V, Mazzoccoli G, Biscaglia G, Gentile A, Mastrodonato N, Carella M, Pellegrini F, di Sebastiano P, Andriulli A. Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers. *PLoS One* 2012; 7: e33663.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005; 309: 1573-6.

Pontius JU, Mullikin JC, Smith DR, Agencourt Sequencing T, Lindblad-Toh K, Gnerre S, Clamp M, Chang J, Stephens R, Neelam B, Volfovsky N, Schaffer AA, Agarwala R, Narfstrom K, Murphy WJ, Giger U, Roca AL, Antunes A, Menotti-Raymond M, Yuhki N, Pecon-Slattery J, Johnson WE, Bourque G, Tesler G, Program NCS, O'Brien SJ. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res* 2007; 17: 1675-89.

Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5: 492-7.

Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009; 10: 42-6.

Rakowski H, Carasso S. Quantifying diastolic function in hypertrophic cardiomyopathy: the ongoing search for the holy grail. *Circulation* 2007; 116: 2662-5.

Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA* 2005; 11: 1737-44.

Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan GC. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* 2009; 119: 2357-66.

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 2002; 110: 513-20.

Rich MW. Epidemiology, pathophysiology, and etiology of congestive heart failure in older adults. *J Am Geriatr Soc* 1997; 45: 968-74.

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

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

Rishniw M, Thomas WP. Dynamic right ventricular outflow obstruction: a new cause of systolic murmurs in cats. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 547-52.

Rishniw M, Pion PD. Is treatment of feline hypertrophic cardiomyopathy based in science or faith? A survey of cardiologists and a literature search. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 487-97.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.

Roos A, Wess G (2012) Evaluation eines ultrasensitiven Troponin-I-Assays als Screening-Test und zur Unterscheidung verschiedener Schweregrade der feline hypertrophen Kardiomyopathie [abstract]. In: 20. Jahrestagung der FG „Innere Medizin und klinische Labordiagnostik“ der DVG (InnLab), Göttingen, Deutschland

Roth P, Wischhusen J, Happold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, Weller M, Keller A. A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *J Neurochem* 2011; 118: 449-57.

Rothschild SI, Tschan MP, Jaggi R, Fey MF, Gugger M, Gautschi O. MicroRNA-

381 represses ID1 and is deregulated in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 1069-77.

Rottbauer W, Gautel M, Zehelein J, Labeit S, Franz WM, Fischer C, Vollrath B, Mall G, Dietz R, Kubler W, Katus HA. Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization Of cardiac transcript and protein. *J Clin Invest* 1997; 100: 475-82.

Rush JE, Freeman LM, Brown DJ, Smith FW, Jr. The use of enalapril in the treatment of feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Anim Hosp Assoc* 1998; 34: 38-41.

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

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003; 34: 374-8.

Santilli RA, Bussadori C. Doppler echocardiographic study of left ventricular diastole in non-anaesthetized healthy cats. *Vet J* 1998; 156: 203-15.

Sarkar R (2011) Evaluation der systolischen und diastolischen Funktion bei der feline hypertrophen Kardiomyopathie mittels Gewebedoppler [Dissertation]. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität München, München

Sathyamurthy G, Swamy NR. Computational Identification of Putative miRNAs from *Felis Catus*. *Biomedical Engineering and Computational Biology* 2010; 2: 37-46.

Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One* 2009; 4: e5540.

Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007; 100: 416-24.

Schiller S (2007) Farbgewebedoppler bei der herzgesunden Katze: Einfluss von Auswertungsprogrammen, Software- und Aufnahmeeinstellungen auf die Gewebegeschwindigkeit, Strain und Strain Rate [Dissertation]. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Schober K, Todd A. Echocardiographic assessment of left ventricular geometry and the mitral valve apparatus in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2010; 12: 1-16.

Schober KE, Fuentes VL, Bonagura JD. Comparison between invasive hemodynamic measurements and noninvasive assessment of left ventricular diastolic function by use of Doppler echocardiography in healthy anesthetized cats. *Am J Vet Res* 2003; 64: 93-103.

Schober KE, Maerz I. Assessment of left atrial appendage flow velocity and its relation to spontaneous echocardiographic contrast in 89 cats with myocardial disease. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 120-30.

Schober KE, Maerz I, Ludewig E, Stern JA. Diagnostic accuracy of electrocardiography and thoracic radiography in the assessment of left atrial size in cats: comparison with transthoracic 2-dimensional echocardiography. *J Vet Intern Med* 2007a; 21: 709-18.

Schober KE, Bonagura JD, Fuentes VL (2007b) Effects of Atenolol versus Diltiazem on LV diastolic function in cats with occult HCM. Annual Forum of the ACVIM 2007. Seattle, Washington

Schober KE, Wetli E, Drost W (2013a) Assessment of Left atrial Size in Cats with Left-Sided Congestive Heart Failure [abstract]. In: ACVIM Forum 2013. Seattle, Washington

Schober KE, Zientek J, Li X, Fuentes VL, Bonagura JD. Effect of treatment with atenolol on 5-year survival in cats with preclinical (asymptomatic) hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2013b; 15: 93-104.

Schoeman JP. Feline distal aortic thromboembolism: a review of 44 cases (1990-1998). *J Feline Med Surg* 1999; 1: 221-31.

Schwartzbauer G, Robbins J. Matters of sex: sex matters. *Circulation* 2001; 104: 1333-5.

Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 2002; 243: 215-25.

Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455: 58-63.

Serra M, Papakonstantinou S, Adamcova M, O'Brien PJ. Veterinary and toxicological applications for the detection of cardiac injury using cardiac troponin. *Vet J* 2010; 185: 50-7.

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

Shwetha S, Gouthamchandra K, Chandra M, Ravishankar B, Khaja MN, Das S. Circulating miRNA profile in HCV infected serum: novel insight into pathogenesis. *Sci. Rep.* 2013; 3

Singh MK, Cocchiaro MF, Kittleson MD. NT-proBNP measurement fails to reliably identify subclinical hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon cats. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 942-7.

Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 246-58.

Skalsky RL, Cullen BR. Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS One* 2011; 6: e24248.

Smith CE, Rozanski EA, Freeman LM, Brown DJ, Goodman JS, Rush JE. Use of low molecular weight heparin in cats: 57 cases (1999-2003). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225: 1237-41.

Smith S, Dukes-McEwan J. Clinical signs and left atrial size in cats with cardiovascular disease in general practice. *J Small Anim Pract* 2012; 53: 27-33.

Smith SA, Tobias AH, Jacob KA, Fine DM, Grumbles PL. Arterial thromboembolism in cats: acute crisis in 127 cases (1992-2001) and long-term management with low-dose aspirin in 24 cases. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 73-83.

Smith SA. Antithrombotic therapy. *Top Companion Anim Med* 2012; 27: 88-94.

Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3: Article3.

Solomon SD, Jarcho JA, McKenna W, Geisterfer-Lowrance A, Germain R, Salerni R, Seidman JG, Seidman CE. Familial hypertrophic cardiomyopathy is a genetically heterogeneous disease. *J Clin Invest* 1990; 86: 993-9.

Song XW, Li Q, Lin L, Wang XC, Li DF, Wang GK, Ren AJ, Wang YR, Qin

YW, Yuan WJ, Jing Q. MicroRNAs are dynamically regulated in hypertrophic hearts, and miR-199a is essential for the maintenance of cell size in cardiomyocytes. *J Cell Physiol* 2010; 225: 437-43.

Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence* 2012; 3: 1.

Stuedemann C, Bauersachs S, Weber K, Wess G. Detection and comparison of microRNA expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls. *BMC Vet Res* 2013; 9: 12.

Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer RT, Kebschull M, Papapanou PN. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *J Dent Res* 2012; 91: 934-40.

Stokol T, Brooks M, Rush JE, Rishniw M, Erb H, Rozanski E, Kraus MS, Gelzer AR. Hypercoagulability in cats with cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 546-52.

Strickland KN. Pathophysiology and Therapy of Heart Failure. In: *Manual of Canine and Feline Cardiology*. Tilley LP, Smith FWK, Oyama MA, Sleeper MM, eds. St. Louis: Saunders 2008: 288-314.

Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69: 1135-42.

Sucharov C, Bristow MR, Port JD. miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 185-92.

Suckau L, Fechner H, Chemaly E, Krohn S, Hadri L, Kockskamper J, Westermann D, Bisping E, Ly H, Wang X, Kawase Y, Chen J, Liang L, Sipo I, Vetter R, Weger S, Kurreck J, Erdmann V, Tschope C, Pieske B, Lebeche D,

Schultheiss HP, Hajjar RJ, Poller WC. Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation* 2009; 119: 1241-52.

Sun W, Julie Li YS, Huang HD, Shyy JY, Chien S. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2010; 12: 1-27.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753-6.

Takeshita N, Hoshino I, Mori M, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Komatsu A, Jitsukawa M, Matsubara H. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 108: 644-52.

Talbott RL, Sparger EE, Lovelace KM, Fitch WM, Pedersen NC, Luciw PA, Elder JH. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 5743-7.

Tang H, Liu X, Wang Z, She X, Zeng X, Deng M, Liao Q, Guo X, Wang R, Li X, Zeng F, Wu M, Li G. Interaction of hsa-miR-381 and glioma suppressor LRRC4 is involved in glioma growth. *Brain Res* 2011; 1390: 21-32.

Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang DZ. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 1137-41.

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

Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 13-21.

Thatcher EJ, Bond J, Paydar I, Patton JG. Genomic organization of zebrafish microRNAs. *BMC Genomics* 2008; 9: 253.

Theis JL, Bos JM, Theis JD, Miller DV, Dearani JA, Schaff HV, Gersh BJ, Ommen SR, Moss RL, Ackerman MJ. Expression patterns of cardiac myofilament proteins: genomic and protein analysis of surgical myectomy tissue from patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2009; 2: 325-33.

Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, Kaplan PM, Lombard CW, Moise NS, Moses BL. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 1993; 7: 247-52.

Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods* 2004; 1: 47-53.

Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007; 116: 258-67.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456: 980-4.

Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010;

106: 1035-9.

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

Topkara VK, Mann DL. Clinical applications of miRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Per Med* 2010; 7: 531-48.

Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* 2011a; 19: 1116-22.

Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ. Systemic Delivery of Tumor Suppressor microRNA Mimics Using a Neutral Lipid Emulsion Inhibits Lung Tumors in Mice. *Mol Ther* 2011b; 19: 1116-22.

Trehiou-Sechi E, Tissier R, Gouni V, Misbach C, Petit AM, Balouka D, Sampedrano CC, Castaignet M, Pouchelon JL, Chetboul V. Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic cardiomyopathy in 5 breeds of cats: a retrospective analysis of 344 cases (2001-2011). *J Vet Intern Med* 2012; 26: 532-41.

Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 2008; 454: 780-3.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654-9.

van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2001; 104: 1419-23.

van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 18255-60.

van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* 2008; 103: 919-28.

van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res* 2011; 108: 219-34.

Vargo CL, Taylor SM, Carr A, Jackson ML. The effect of a low molecular weight heparin on coagulation parameters in healthy cats. *Can J Vet Res* 2009; 73: 132-6.

Venco L. Ultrasound diagnosis: left ventricular thrombus in a cat with hypertrophic cardiomyopathy. *Vet Radiol Ultrasound* 1997; 38: 467-8.

Vignier N, Amor F, Fogel P, Duvallet A, Poupiot J, Charrier S, Arock M, Montus M, Nelson I, Richard I, Carrier L, Servais L, Voit T, Bonne G, Israeli D. Distinctive Serum miRNA Profile in Mouse Models of Striated Muscular Pathologies. *PLoS One* 2013; 8: e55281.

Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, Melillo G, Rigolini R, Costa E, Crea F, Capogrossi MC, Napolitano M, Martelli F. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics* 2010; 42: 420-6.

Wagner T (2006) Tissue-Doppler-Imaging (TDI): Erstellung von Referenzwerten für Tissue Velocity, Strain und Strain-Rate bei der Katze [Dissertation]. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 2007; 21: 1857-62.

Wang B, Howel P, Bruheim S, Ju J, Owen LB, Fodstad O, Xi Y. Systematic evaluation of three microRNA profiling platforms: microarray, beads array, and quantitative real-time PCR array. *PLoS One* 2011; 6: e17167.

Wang C, Wang S, Zhao P, Wang X, Wang J, Wang Y, Song L, Zou Y, Hui R. MiR-221 promotes cardiac hypertrophy in vitro through the modulation of p27 expression. *J Cell Biochem* 2012a; 113: 2040-6.

Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 2010a; 31: 659-66.

Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res* 2012b; 160: 198-206.

Wang J, Song Y, Zhang Y, Xiao H, Sun Q, Hou N, Guo S, Wang Y, Fan K, Zhan D, Zha L, Cao Y, Li Z, Cheng X, Yang X. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. *Cell Res* 2012c; 22: 516-27.

Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010b; 38: 7248-59.

Wang Y, Liang Y, Lu Q. MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin Genet* 2008; 74: 307-15.

Watahiki A, Wang Y, Morris J, Dennis K, O'Dwyer HM, Gleave M, Gout PW,

Wang Y. MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. PLoS One 2011; 6: e24950.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin Chem 2010; 56: 1733-41.

Weickmann JL, Glitz DG. Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations. J Biol Chem 1982; 257: 8705-10.

Wess G, Daisenberger P, Hirschberger J (2008) The utility of NT-proBNP to differentiate cardiac and respiratory causes of dyspnea in cats [abstract]. In: ACVIM Forum 2008, San Antonio, Texas. 687-824

Wess G, Sarkar R, Hartmann K. Assessment of left ventricular systolic function by strain imaging echocardiography in various stages of feline hypertrophic cardiomyopathy. J Vet Intern Med 2010a; 24: 1375-82.

Wess G, Schinner C, Weber K, Kuchenhoff H, Hartmann K. Association of A31P and A74T polymorphisms in the myosin binding protein C3 gene and hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon and other breed cats. J Vet Intern Med 2010b; 24: 527-32.

Wess G, Daisenberger P, Mahling M, Hirschberger J, Hartmann K. Utility of measuring plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in detecting hypertrophic cardiomyopathy and differentiating grades of severity in cats. Vet Clin Pathol 2011; 40: 237-44.

Wess G. Diagnosis of Feline Cardiomyopathy. CONSULTA 2011;

Wey AC, Kittleson MD (2000) Comparison of the efficacy of intravenous diltiazem and esmolol to reduce left ventricular outflow tract velocity and heart rate in cats with hypertrophic obstructiv cardiomyopathy [abstract]. In: ACVIM

Forum 2000, Seattle, Washington

Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, Kempf T, Wollert KC, Thum T. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51: 872-5.

Wright RS, Anderson JL, Adams CD, Bridges CR, Casey DE, Jr., Ettinger SM, Fesmire FM, Ganiats TG, Jneid H, Lincoff AM, Peterson ED, Philippides GJ, Theroux P, Wenger NK, Zidar JP, Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., Chavey WE, 2nd, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Zidar JP. 2011 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients with Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in collaboration with the American Academy of Family Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: e215-367.

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 4034-9.

Xiao J, Liang D, Zhang Y, Liu Y, Zhang H, Liu Y, Li L, Liang X, Sun Y, Chen YH. MicroRNA expression signature in atrial fibrillation with mitral stenosis. *Physiol Genomics* 2011; 43: 655-64.

Xu GJ, Gan TY, Tang BP, Chen ZH, Ailiman M, Zhou XH, Jiang T, Song JG, Guo X, Li YD, Miao HJ, Zhang Y, Li JX. Changes in microRNAs expression are involved in age-related atrial structural remodeling and atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126: 1458-63.

Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003; 13: 790-5.

Xu XD, Song XW, Li Q, Wang GK, Jing Q, Qin YW. Attenuation of microRNA-22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1391-8.

Yamakado T, Nakano T. Left ventricular systolic and diastolic function in the hypertrophied ventricle. *Jpn Circ J* 1990; 54: 554-62.

Yang H, Schmuke JJ, Flagg LM, Roberts JK, Allen EM, Ivashuta S, Gilbertson LA, Armstrong TA, Christian AT. A novel real-time polymerase chain reaction method for high throughput quantification of small regulatory RNAs. *Plant Biotechnol J* 2009; 7: 621-30.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004; 304: 594-6.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-6.

Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 981-92.

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2: ra81.

Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118: 57-68.

Zhang X, Zhu J, Xing R, Tie Y, Fu H, Zheng X, Yu B. miR-513a-3p sensitizes human lung adenocarcinoma cells to chemotherapy by targeting GSTP1. *Lung Cancer* 2012a; 77: 488-94.

Zhang Y, Fei M, Xue G, Zhou Q, Jia Y, Li L, Xin H, Sun S. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med* 2012b; 16: 249-59.

Zhang Y, Wang X, Xu X, Wang J, Liu X, Chen Y. Distinct microRNA expression signatures in human right atrial and ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem* 2012c; 371: 23-9.

Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One* 2010; 5: e13735.

Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007; 129: 303-17.

Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis* 2011; 1: 138-49.

IX ANHANG

Tabelle 8: Klassifikation von Herzerkrankungen vorgeschlagen durch das *Canine Heart Failure International Expert Forums* (STRICKLAND, 2008).

Klasse		Beschreibung
A		Patienten mit dem Risiko eine Herzerkrankung zu entwickeln durch Rasseprädisposition.
B		Patienten mit diagnostizierter Herzerkrankung, jedoch noch keine Anzeichen von Herzversagen.
C	1	Patient, die im Herzversagen sind, jedoch unter Therapie keine klinischen Anzeichen präsentieren.
	2	Milde bis moderate Symptome durch Herzversagen.
	3	Patienten mit schweren oder lebensbedrohlichen Symptomen durch Herzversagen.
D		Patienten mit Herzversagen im Endstadium, welches refraktär auf die Standard-Therapie erscheint.

Tabelle 9: Zusammenfassung der viralen Mikro-Ribonukleinsäure-Sequenzen, die durch Microarray-Analyse im Serum von herzgesunden Katzen und Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie im Herzversagen nachgewiesen werden konnten. miRNA, miR = Mikro-Ribonukleinsäure, bkV = Humanes Polyoma Virus, jcv = Humanes Polyoma Virus 2, ebv = Epstein-Barr-Virus, hbv = Hepatitis-B-Virus, hcmv = Humanes Zytomegalievirus, hiv = Humanes Immundefizienz-Virus, hsv1 = Herpes-Simplex-Virus, hsv2 = Herpes-Simplex-Virus 2, kshv = Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus.

miRNA	Virus
bkv-miR-B1-5p	humanes Polyoma Virus 1
jcv-miR-J1-5p	humanes Polyoma Virus 2
ebv-miR-BART12, ebv-miR-BART13-3p, ebv-miR-BART1-3p, ebv-miR-BART14-3p, ebv-miR-BART16, ebv-miR-BART17-3p, ebv-miR-BART19-3p, ebv-miR-BART21-3p, ebv-miR-BART2-5p, ebv-miR-BART3-3p, ebv-miR-BART3-5p, ebv-miR-BART6-3p, ebv-miR-BART7-3p, ebv-miR-BHRF1-1	Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus 4
hbv-miR-B20, hbv-miR-B2RC, hbv-miR-B4	Hepatitis-B-Virus
hcmv-miR-UL112, hcmv-miR-UL148D, hcmv-miR-UL36-5p, hcmv-miR-UL70-3p, hcmv-miR-US25-1-5p, hcmv-miR-US25-2-5p, hcmv-miR-US33-5p, hcmv-miR-US4	humanes Zytomegalievirus, humanes Herpesvirus 5
hiv1-miR-H1, hiv1-miR-N367, hiv1-miR-TAR-5p	humanes Immundefizienz-Virus
hsv1-miR-H13, hsv1-miR-H1-3p, hsv1-miR-H14-3p, hsv1-miR-H15, hsv1-miR-H1-5p, hsv1-miR-H16, hsv1-miR-H17, hsv1-miR-H18, hsv1-miR-H2-5p, hsv1-miR-H3-3p, hsv1-miR-H3-5p, hsv1-miR-H5-3p, hsv1-miR-H6-3p, hsv1-miR-H6-5p, hsv1-miR-H7-3p, hsv1-miR-H8-5p	Herpes-Simplex-Virus 1
hsv2-miR-H10, hsv2-miR-H2, hsv2-miR-H20, hsv2-miR-H22, hsv2-miR-H24, hsv2-miR-H25, hsv2-miR-H3, hsv2-miR-H4-5p, hsv2-miR-H5, hsv2-miR-H6-3p, hsv2-miR-H6-5p, hsv2-miR-H7-3p, hsv2-miR-H7-5p, hsv2-miR-H9-3p, hsv2-miR-H9-5p	Herpes-Simplex-Virus 2
kshv-miR-K12-10b, kshv-miR-K12-2-3p, kshv-miR-K12-3-5p, kshv-miR-K12-5-5p, kshv-miR-K12-7-3p, kshv-miR-K12-8-3p, kshv-miR-K12-9-5p	Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus, Humanes Herpesvirus 8

Tabelle 10: Übersicht der Mikro-Ribonukleinsäuren, die sich bei der Analyse mittels Microarray oder quantitativer Reverser-Transkription-Polymerasekettenreaktion bei Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie als signifikant abweichend erwiesen haben. Studien, die bereits eine Deregulation dieser Mikro-Ribonukleinsäuren bei verschiedenen Krankheitsbildern nachgewiesen haben, werden kurz erläutert. „*“ = $p < 0,05$, miR = Mikro-Ribonukleinsäure, Patho. = Pathologie, Regu. = Regulation, DCM = dilatative Kardiomyopathie, HCM = hypertrophe Kardiomyopathie, RA = Rechtes Atrium, RV = Rechter Ventrikel, LA = Linkes Atrium, NSR = Normaler Sinusrhythmus, qRT-PCR = quantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion.

miR	Patho.	Beschreibung	Spezies	Regu.	Probe	Methode	Referenz
miR-381-3p	kardial	Herzversagen durch DCM vs. herzgesund	Mensch	↑	Myokard	Microarray	(THUM et al., 2007)
	andere	Myotone Dystrophie Typ 2 vs. gesund	Mensch	↑*	Skelettmuskel	Microarray qRT-PCR	(GRECO et al., 2012)
		Lungenadenokarzinom vs. gesund	Mensch	↓*	Lunge	qRT-PCR	(ROTHSC HILD et al., 2012)
		Glioblastom vs. gesund	Mensch	↑*	Gehirn Peripheres Blut	qRT-PCR	(SKALSKY & CULLEN, 2011; TANG et al., 2011)
miR-486-3p	kardial	HCM/DCM vs. gesund	Mensch	↑	Myokard	<i>deep sequencing</i>	(LEPTIDIS et al., 2013)
		Herzgesund, RA vs. RV	Mensch	↑*	Myokard	Microarray	(ZHANG et al., 2012c)
		Vorhofflimmern mit Mitralstenose vs. gesund, Mitralstenose Vorhofflimmern vs. NSR	Mensch	↓*	Myokard	Microarray	(XIAO et al., 2011)

Fortsetzung Tabelle 10:

miR	Patho.	Beschreibung	Spezies	Regu.	Probe	Methode	Referenz
miR-486-3p	andere	Hepatozelluläres Karzinom, kürzere rezidivfreie Überlebenszeit	Mensch	↓*	Leber	qRT-PCR	(HUANG et al., 2012)
		Kolorektales Karzinom KRAS-Mutation vs. wildtyp	Mensch	↑*	Kolon	Microarray	(MOSAKHANI et al., 2012)
		Intraepitheliale Neoplasien des Pankreas vs. gesund	Mensch	↑*	Pankreas	Microarray qRT-PCR	(YU et al., 2012)
miR-4751	kardial	/					
	andere	Brustkrebs	Mensch	nicht angegeben	Mammage webe	<i>deep sequencing</i>	(PERSSON et al., 2011)
miR-376c-3p	kardial	Mitralklappenerkrankung (RA) vs. Herzgesund (RA)	Mensch	↑*	Myokard (RA)	Microarray	(COOLEY et al., 2012)
		HCM/DCM vs. gesund	Mensch	↑	Myokard	<i>deep sequencing</i>	(LEPTIDIS et al., 2013)
	andere	/					
miR-5700	kardial	/					
	andere	Prostatakrebs	Mensch	nicht angegeben	prostatisch esXenograf t-Gewebe	<i>deep sequencing</i>	(WATAHIKI et al., 2011)
miR-513a-3p	kardial	/					
	andere	Humane Lungenadenokarzinom Zelllinien: Cisplatin-resistent vs. nicht resistent	Mensch	↓*	Zellkultur	qRT-PCR	(ZHANG et al., 2012a)
Veränderung der miRNA-Expression bei Brustkrebs unter Progesteron-Einfluss		Mensch	↑	Zellkultur	Microarray qRT-PCR	(COCHRANE et al., 2012)	

Fortsetzung Tabelle 10:

miR	Patho.	Beschreibung	Spezies	Regu.	Probe	Methode	Referenz
miR-320e	kardial	Herzversagen durch DCM vs. herzgesund	Mensch	↑*	Myokard	Microarray	(THUM et al., 2007)
		Ischämie/Reperfusionsschaden	Maus	↓*	Myokard	Microarray qRT-PCR	(REN et al., 2009)
	andere	Glioblastom vs. gesund	Mensch	↓	Zelluläre Fraktion Blut	Microarray	(ROTH et al., 2011)
miR-1246	kardial	Diastolische Dysfunktion ± systolische Dyfunktion ± CHF	Mensch	↑*	Buffycot	Microarray qRT-PCR	(NAIR et al., 2012)
		Mitralklappenerkrankung LA vs. RA	Mensch	↓*	Myokard	Microarray	(COOLEY et al., 2012)
	andere	Peridontitis	Mensch	↓*	Gingiva	Microarray qRT-PCR	(STOECKLIN-WASMER et al., 2012)
		Ösophageales Plattenepithelkarzinom	Mensch	↑	Serum	Microarray	(TAKESHI TA et al., 2013)
		Kolorekales Karzinom	Mensch	↑	Kolorektales Gewebe	Microarray	(PIEPOLI et al., 2012)

X DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Dr. Gerhard Wess für die großartige Möglichkeit danken, an diesem interessanten Thema forschen. Darüber hinaus hat er mir die Chance gegeben, in seinem hochklassigen und wunderbaren Team der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Kleintierklinik zu lernen.

Mein außerordentlicher Dank gilt insbesondere auch Frau Dr. Karin Weber, deren intensive Betreuung und Beratung Voraussetzung für das Gelingen der labortechnischen Arbeiten war.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Katrin Hartmann für die Bereitstellung der nötigen Räumlichkeiten und Geräte.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Stefan Bauersachs des LAFUGA in Großhadern bedanken. Die Bereitstellung der nötigen Technik, die fachliche Hilfe bei Durchführung und Auswertung des Microarrays und die konstruktive Diskussion haben das Gelingen dieses Projektes überhaupt ermöglicht.

Ebenso Anteil an der Entstehung dieses Projektes hatte die Akademie für Tiergesundheit e.V. Der Akademie gilt mein Dank, da sie mir durch die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums ermöglicht hat, mich voll auf mein Forschungsvorhaben zu konzentrieren können.

Jedem einzelnen Mitglied des Kardiologie-Teams möchte ich Danke sagen. Es war einfach nur grandios von euch zu lernen und mit euch allen arbeiten zu dürfen. Einmal Kardio, immer Kardio.

Ich danke auch all meinen lieben Freundinnen, die mir schon seit der ersten Stunde des Tiermedizinstudiums zur Seite stehen.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie, meinem Freund David und insbesondere meinen lieben Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung danken.