

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

Aptamer BC 007 zur Behandlung der
Autoantikörper-assoziierten dilatativen
Kardiomyopathie: Evaluation der Sicherheit
und Wirksamkeit bei Dobermännern

von Sabine Stutz, geb. Werner
aus Singen

München 2020

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. Gerhard Wess

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger,
Ph.D.

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wess

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dorothea Döring

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	4
1.	Die dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann.....	4
1.1.	Prävalenz	5
1.2.	Ätiologie.....	7
1.3.	Pathophysiologie	11
1.4.	Krankheitsstadien	16
1.5.	Diagnostische Möglichkeiten	19
1.5.1.	Anamnese und klinische Untersuchung	21
1.5.2.	Echokardiographie.....	22
1.5.3.	Kurzzeit-Elektrokardiogramm.....	25
1.5.4.	Langzeit-Elektrokardiogramm	27
1.5.5.	Röntgen	28
1.5.6.	Biomarker.....	29
1.5.6.1.	N-terminales-pro-B-Typ-natriuretisches-Peptid ..	31
1.5.6.2.	Kardiales Troponin I	34
1.6.	Therapeutische Möglichkeiten	37
1.6.1.	Pimobendan	37
1.6.2.	Angiotensin-konvertierendes-Enzym-Hemmer....	38

1.6.3.	Antiarrhythmika	39
1.6.4.	Diuretika	42
1.7.	Prognose	43
2.	Die Rolle der Autoimmunität bei der dilatativen Kardiomyopathie.....	47
2.1.	Prävalenz	48
2.2.	Ätiologie.....	51
2.3.	Pathophysiologie	56
2.4.	Diagnostische Möglichkeiten	62
2.4.1.	Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay	63
2.4.2.	Fluorescence-activated-cell-sorting-Assay	65
2.4.3.	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay	65
2.4.4.	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	67
2.5.	Therapeutische Möglichkeiten	69
2.5.1.	Betablocker.....	69
2.5.2.	Immunadsorption.....	70
2.5.3.	Peptide	72
2.5.4.	Aptamere	74
III.	PUBLIKATION.....	79
IV.	DISKUSSION	136
1.	Dobermann als Großtiermodell	137

2.	Dosierung Aptamer BC 007.....	139
3.	Sicherheit.....	140
4.	Wirksamkeit.....	144
5.	Limitationen.....	150
6.	Ausblick.....	152
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	154
VI.	SUMMARY.....	158
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	162
VIII.	DANKSAGUNG	225

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (Angiotensin converting enzyme)
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
cTnI	kardiales Troponin I (cardiac Troponin I)
DCM	dilatative Kardiomyopathie (dilated cardiomyopathy)
EDVI	enddiastolischer Volumenindex
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPSS	Abstand zwischen dem E-Punkt der Mitralklappe und dem Septum (E-point-to-septal-separation)
ESVC	European Society of Veterinary Cardiology
ESVI	endsystolischer Volumenindex
KKA	Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay
LVIDd	linksventrikulärer Innendurchmesser in der Diastole
LVIDs	linksventrikulärer Innendurchmesser in der Systole
M-Mode	Motion-Mode
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NT-proBNP	N-terminales-pro-B-Typ-natriuretisches-Peptid
PDK4-	Pyruvatdehydrogenase-Kinase-4-Gen

Gen	
pmol/L	Pikomol pro Liter
SI	Sphärizitätsindex
SMOD	Scheibchensummationsmethode nach Simpson (Simpson's method of disc)
β 1-AAK	Autoantikörper gegen β 1-Adrenozeptoren
VES	ventrikuläre Extrasystolen

I. EINLEITUNG

Mehr als die Hälfte aller Dobermänner erkranken im Laufe ihres Lebens an der dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Ein Großteil davon verstirbt am Sekundentod oder am kongestiven Herzversagen. Da es bislang keine kausale Therapie gibt, können die Hunde nur symptomatisch behandelt werden. Das heißt, die Behandlung verzögert und lindert die Symptome, kann die Erkrankung jedoch nicht heilen. Ein Therapieansatz, der die Ursache bekämpft, wäre somit sehr wünschenswert.

In der Humanmedizin wurde eine neue Form der DCM entdeckt – die Autoantikörper-assoziierte dilatative Kardiomyopathie. Diese Form der Erkrankung ist durch den pathogenen Effekt von funktionalen Autoantikörpern geprägt. Bei vielen Patienten mit idiopathischer DCM wurden Autoantikörper gegen die β_1 -Adrenozeptoren (β_1 -AAK) in hohen Konzentrationen gefunden. Die Elimination oder Neutralisation dieser β_1 -AAK wird somit als erfolgversprechendes Therapieziel angesehen. Durch extrakorporale Immunadsorption konnten schon positive Kurzzeit- und Langzeit-Therapieerfolge in der Humanmedizin gezeigt werden. Da diese Therapiemethode jedoch sehr zeit- und kostenintensiv ist, wird in den letzten Jahren nach alternativen

Therapiemethoden, wie die *in vivo* Neutralisation der Autoantikörper, geforscht. Hierbei wurde das Aptamer BC 007 entwickelt. Bei diesem 15-mer DNA-Oligonukleotid konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es verschiedene Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, inklusive jene gegen den β 1-Adrenozeptor, neutralisiert. Weiterhin wurde es schon erfolgreich *in vivo* an hypertensiven Ratten und vor kurzem in einer klinischen Phase 1 Studie an gesunden Menschen getestet. Bislang fehlen jedoch Studien, die den Therapieerfolg von Aptamer BC 007 bei Patienten mit DCM zeigen.

Ziel dieser Studie war es daher in einem Großtiermodell mit DCM herauszufinden, ob Aptamer BC 007 die Autoantikörper *in vivo* erfolgreich neutralisiert und folglich zu einer Funktionsverbesserung des Herzens und zu einer verminderten Mortalität führt. Weiterhin sollte die Sicherheit der Medikamentengabe evaluiert werden. Da die DCM beim Dobermann und beim Menschen ein ähnliches Erscheinungsbild aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass der Pathogenese ähnliche Mechanismen zugrunde liegen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass auch beim Dobermann eine β 1-AAK-assoziierte Autoimmunität vorkommt, vergleichbar mit der Pathogenese der DCM beim

Menschen. Der Dobermann diente daher in der jetzigen Studie sowohl als Modell für den Menschen, war aber gleichzeitig auch selbst Behandlungszielgruppe.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann

Kardiomyopathien sind laut der Weltgesundheitsorganisation als Erkrankungen des Myokards mit kardialer Dysfunktion definiert. Eine Einteilung erfolgt in dilatative Kardiomyopathie, hypertrophe Kardiomyopathie, restriktive Kardiomyopathie und arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (RICHARDSON et al., 1996). Eine aktuellere und umfassendere Definition der *American Heart Association* beschreibt Kardiomyopathien als eine heterogene Gruppe von myokardialen Erkrankungen, die mit mechanischer und/oder elektrischer Dysfunktion einhergehen. Diese weisen normalerweise, aber nicht ausnahmslos, eine ventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation auf. Die Ursache ist vielfältig, in vielen Fällen aber genetisch (MARON et al., 2006). Eine Arbeitsgruppe der *European Society of Cardiology* definiert die Kardiomyopathie als eine Herzmuskelerkrankung mit einer strukturellen und funktionalen Anomalität des Myokards, in Abwesenheit von koronaren Herzkrankheiten, Bluthochdruck, Herzklappenerkrankungen und angeborenen Herzerkrankungen,

die ausreichend sind, um die myokardialen Anomalien zu verursachen. Kardiomyopathien werden hier eingeteilt in spezifische morphologische und funktionale Phänotypen. Jeder Phänotyp wird dann subklassifiziert in familiär und nicht familiär (ELLIOTT et al., 2008).

Die DCM wird als systolische Dysfunktion und Dilatation des linken oder beider Ventrikel definiert, die nicht durch abnormale Füllungszustände oder koronare Herzerkrankungen erklärt werden können (PINTO et al., 2016). Sie ist sowohl beim Menschen als auch bei vielen Hunderassen eine Hauptursache von kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität (DUKES-MCEWAN et al., 2003; MILLAT et al., 2011).

Beim Dobermann ist die DCM durch eine spezielle Verlaufsform charakterisiert, die durch eine systolische Dysfunktion und Arrhythmien geprägt ist. Man spricht deshalb auch von der Dobermann-Kardiomyopathie (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b).

1.1. Prävalenz

Die DCM ist eine der häufigsten Herzerkrankungen bei Hunden. Sie kommt vor allem bei großen Rassen vor (TIDHOLM et al., 2001). Der Dobermann ist die Rasse bei dem die Erkrankung mit

am häufigsten beschrieben wird (PETRIC et al., 2002a). In einer europäischen Population besteht eine kumulative Prävalenz von 58 % (WESS et al., 2010b). In Nordamerika wird eine Prävalenz von 45 bis 63 % beschrieben (HAZLETT et al., 1983; O'GRADY & HORNE, 1995, 1998). Die DCM entwickelt sich normalerweise im Erwachsenenalter. Eine Ausnahme stellt der Portugiesische Wasserhund dar. Bei dieser Rasse ist eine juvenile Form mit fatalem Verlauf beschrieben (DAMBACH et al., 1999). Beim Dobermann ist das Durchschnittsalter bei der Entwicklung von klinischen Symptomen ca. 7–8 Jahre, wobei männliche Dobermänner mit ca. 7 Jahren das Endstadium früher erreichen, als weibliche Dobermänner mit ca. 8 Jahren (CALVERT et al., 1997b). Die Spannweite der klinischen Manifestation ist jedoch sehr weit und liegt zwischen 2 und 15 Jahren (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b). In früheren Studien wurde zudem eine Geschlechterprädisposition angenommen. Es wurde beschrieben, dass die DCM hauptsächlich oder zumindest häufiger bei Rüden vorkommt (CALVERT et al., 1982; HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1997b). Dies wurde jedoch durch eine neuere Studie von WESS und Kollegen (2010b) widerlegt. Laut dieser Studie kommt die DCM bei männlichen und weiblichen Dobermännern gleich oft vor. Es gibt jedoch einen

Unterschied im Verlauf. Im Durchschnitt tritt bei Dobermann Rüden ein vergrößertes Herz früher auf, während bei Dobermann Hündinnen öfters Arrhythmien entstehen (WESS et al., 2010b).

1.2. Ätiologie

Die Ursachen für die DCM können in genetische und nicht genetische unterteilt werden. Es gibt jedoch Fälle in denen eine genetische Prädisposition durch extrinsische oder umgebungsbedingte Aspekte beeinflusst wird (PINTO et al., 2016). Beim Menschen sind mindestens 20–35 % der Fälle familiär bedingt (MICHELIS et al., 1992; GRUNIG et al., 1998; SWEET et al., 2015) und bislang wurden über 50 Genmutationen mit der DCM assoziiert (POSAFALVI et al., 2013). Nicht genetische Ursachen können entweder endokrinologisch, durch Elektrolytverschiebungen, ernährungsbedingt, infektiös, medikamentenassoziiert, toxininduziert oder autoimmun bedingt sein (PINTO et al., 2016).

Autoimmune Prozesse werden immer öfter als Ursache oder Verstärker von verschiedenen Krankheiten anerkannt. Klassische Autoantikörper verursachen Immunantworten, die zur Zerstörung des betroffenen Gewebes führen. Es gibt jedoch eine zusätzliche Klasse von Autoantikörper, die funktionale

Aktivität zeigt. Diese Autoantikörper wirken agonistisch bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und regen so ihre Funktion an (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Vor allem Autoantikörper gegen die β_1 -Adrenozeptoren wurden in Seren von Humanpatienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie gefunden (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987b; LIMAS et al., 1989; MAGNUSSON et al., 1990). Auf diese wird im zweiten Hauptkapitel näher eingegangen.

Beim Dobermann wird bislang hauptsächlich von einer familiären Ätiologie, mit einer autosomal dominanten Vererbung, ausgegangen (MEURS, 1998; MEURS et al., 2007). Es wurden schon einige Gene, bei denen es ein Zusammenhang mit der familiären DCM beim Menschen gibt, beim Dobermann als Ursache der DCM untersucht. Oft wurde jedoch kein Zusammenhang festgestellt (STABEJ et al., 2005; MEURS et al., 2008; O'SULLIVAN et al., 2011). Bislang wurden 3 Loci, die mit der DCM beim Dobermann assoziiert sind, identifiziert. Zunächst wurde eine signifikante genomweite Assoziation zur DCM auf Chromosom 5 gefunden (MAUSBERG et al., 2011). Weiterhin wurde eine Mutation in dem Pyruvatdehydrogenase-Kinase-4-Gen (PDK4-Gen) lokalisiert (MEURS et al., 2012). Diese Mutation ist jedoch nicht signifikant mit der DCM in der

europäischen Dobermann Population assoziiert (OWCZAREK-LIPSKA et al., 2013). Vor kurzem wurde eine Mutation im Titin-Gen identifiziert, welche in engen Zusammenhang mit der Entwicklung einer DCM beim Dobermann gebracht wurde (MEURS et al., 2019). Allgemein gibt es auf diesem Gebiet jedoch noch viel Forschungsbedarf, da keiner dieser Loci alle DCM Fälle erklären kann.

Hypothyreose und DCM kommen beide gehäuft beim Dobermann vor (PANCIERA, 1994; WESS et al., 2010b; MOONEY, 2011; BEIER et al., 2015; WESS et al., 2017a). Daher wurde oft angenommen, dass die Hypothyreose einen Einfluss auf die Entstehung der DCM hat. In einer neueren Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass obwohl Dobermänner mit DCM ein erhöhtes Risiko haben an einer Hypothyreose zu erkranken, diese keinen Einfluss auf die Entwicklung oder Progression der DCM hat (BEIER et al., 2015).

Eine autoimmune Genese der Dobermann-Kardiomyopathie konnte lange nicht nachgewiesen werden. BRAZ-RUIVO (1999) zeigte, dass die DCM beim Dobermann nicht durch eine latente Parvovirose Infektion ausgelöst wird. Weiterhin untersuchte er die Rolle einer immunologischen Ätiologie

indem er die Serumkonzentrationen von den Immunglobulinen IgG und IgM sowie die Anzahl der Autoantikörper gegen die strukturellen myokardialen Proteine Laminin und Myosin bei gesunden und erkrankten Dobermännern bestimmte. Er konnte bei keiner der Messungen signifikante Unterschiede feststellen. Wie O'GRADY und O'SULLIVAN (2004b) in ihrem Review über die dilatative Kardiomyopathie schon feststellten, schließen diese Ergebnisse die Möglichkeit einer immunologischen Reaktion gegen andere myokardiale Proteine nicht aus. 2008 identifizierten BUSE und Kollegen (2008) fünf potentiell DCM-assozierte Autoantigene (myosin heavy chain cardiac muscle alpha isoform, alpha cardiac actin, mitochondrial aconitate hydratase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase und brain glycogen phosphorylase) bei Hunden mit spontaner DCM. Darunter waren auch einige Dobermänner. Damit zeigten sie unter anderem die Möglichkeit auf Hundemodelle mit spontaner DCM für die weitere Forschung der Autoantikörper-assozierten Kardiomyopathie in der Humanmedizin einzusetzen. In einer aktuellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass beim Dobermann auch Autoantikörper gegen β 1-Adrenozeptoren in allen Stadien der DCM vorkommen und die Antikörpertiter mit Fortschreiten der Erkrankung weiter ansteigen. Weiterhin war die Mortalitätsrate

bei Autoantikörper positiven Hunden höher (WESS et al., 2019).

1.3. Pathophysiologie

Die Hauptabweichung von den normalen physiologischen Verhältnissen bei der DCM ist eine gestörte systolische Funktion durch eine nachlassende myokardiale Kontraktilität (SISSON et al., 1999).

Die abnehmende Pumpkraft resultiert in einer verminderten Verkürzung der Herzmuskelfasern, welche sich in einem vergrößerten endsystolischen und enddiastolischen Volumen äußert. Weiterhin führt das verminderte Auswurfvolumen zu einer initialen Senkung des arteriellen Blutdruckes. Durch arterielle Barorezeptoren spürt der Körper den Abfall des Blutdruckes und reagiert darauf zunächst mit einer Konstriktion der systemischen Arteriolen. Dies wird durch eine erhöhte Konzentration von Norepinephrin, Angiotensin II, Vasopressin und Endothelin sowie durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems erreicht. Die erhöhte Sympathikus Aktivität und die zirkulierenden Katecholamine steigern weiterhin durch Stimulation der β_1 -Adrenozeptoren die Herzkontraktilität und -frequenz. Hierdurch wird das Schlagvolumen wieder normalisiert. Durch das normalisierte Schlagvolumen sowie die arterioläre Konstriktion wird auch wieder ein normaler

Blutdruck hergestellt. Da sich der Körper jedoch vor einer Langzeitstimulation der Katecholamine schützt, tritt innerhalb von 24–72 Stunden eine Herunterregulierung der β_1 -Adrenozeptoren ein. Folglich kann die Katecholamin Ausschüttung die Rezeptoren nicht mehr im selben Maße aktivieren. Dadurch verringert sich die Kontraktilität erneut und der Körper muss einen anderen Weg finden, um das Schlagvolumen zu erhöhen. Dies versucht er, indem er das enddiastolische Volumen erhöht. Die Nieren werden zur Natrium- und Wasserretention stimuliert. Der wahrscheinlich wichtigste Mechanismus zur Natrium- und Wasserretention ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Renin wird als Antwort auf einen verminderten Herzauswurf aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere ausgeschieden. Renin ist ein Enzym, welches das in der Leber gebildete Angiotensinogen zu Angiotensin I umwandelt. Ein Angiotensin-konvertierendes-Enzym, das hauptsächlich in den Endothelzellen der Lunge vorhanden ist, wandelt Angiotensin I in Angiotensin II um. Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor, der zusätzlich Durst und die Aldosteron Sekretion stimuliert. Die Hauptaufgabe von Aldosteron ist es die Natriumresorption und die Kaliumausscheidung im distalen Tubulus der Nieren anzuregen. Angiotensin II bewirkt außerdem die Freisetzung des

Antidiuretischen Hormons, welches ebenfalls für eine Rückgewinnung von Wasser in der Niere sorgt. Durch die verminderte Natrium- und Wasserausscheidung erhöht sich das Blutvolumen und resultiert in einem gesteigerten venösen Rückfluss in den linken Ventrikel. Die erhöhte Vorlast wiederum bewirkt eine erhöhte enddiastolische Wandspannung, welche den Herzmuskel zum Wachstum anregt und so eine exzentrische Hypertrophie verursacht. Im Endstadium der Erkrankung kann es zu einem so großen Abfall des Herzminutenvolumens kommen, dass es zu einem klinisch signifikanten Abfall des Blutdruckes und als Folge zu einem Vorwärtsversagen sowie zu einem kardiogenen Schock führen kann (KITTLESON, 1998b, 1998c).

Ebenfalls kann dieses hochgradige Stadium in einem kongestiven Herzversagen enden. Hier kommt es zu einem Punkt, an dem das Herz allem Anschein nach nicht mehr größer werden kann. Zu diesem Zeitpunkt ist der Herzauswurf immer noch erniedrigt und folglich alle Mechanismen zur Natrium- und Wasserretention immer noch aktiv. Das Blutvolumen steigt somit immer weiter an. Weil der Herzmuskel in diesem fortgeschrittenen Stadium relativ steif ist und sich nicht weiter vergrößern kann, kommt es durch das gesteigerte Blutvolumen,

das in der Diastole in den Ventrikel gepumpt wird, zu einer Erhöhung des diastolischen Druckes. Da die Mitralklappe während der Diastole geöffnet ist, werden der linke Ventrikel, das linke Atrium, die Lungenvenen und die LungenkapillargefäÙe im Wesentlichen zu einer Kammer. Dadurch kommt es durch den erhöhten Druck im linken Ventrikel auch zu einem erhöhten Druck in den Lungenkapillaren, was letztendlich zur Bildung eines Lungenödems führt (KITTLESON, 1998b).

Die diastolische Dysfunktion, welche zur Entwicklung des kongestiven Herzversagens beiträgt, wird vor allem durch eine verminderte Relaxation und eine erhöhte Steifheit des Herzmuskels verursacht. Gründe für ersteres sind ein veränderter Kalziumstoffwechsel und eine abnormale Kinetik der Aktin-Myosin-Interaktion und für letzteres eine myokardiale Fibrose, kardiales Remodeling und die exzentrische Hypertrophie (O'SULLIVAN et al., 2007a).

Bei einer hochgradigen Dilatation des linken Ventrikels kommt es in Folge auch häufig zu einer Mitralklappeninsuffizienz. Diese ist meist geringgradig. Eine hämodynamisch relevante Mitralklappeninsuffizienz trägt jedoch zu einem hochgradigeren Herzversagen bei. Des Weiteren können Arrhythmien, wie

Vorhofflimmern und anhaltende ventrikuläre Arrhythmien, zum Auftreten eines Herzversagens beitragen, indem sie den Herzauswurf noch weiter senken (KITTLESON, 1998b). Außerdem wurden anhaltende ventrikuläre Tachykardien, die zu Kammerflimmern führen können, als Ursache für den Sekudentod beschrieben (RUSH & KEENE, 1989; CALVERT et al., 1997a).

Pathohistologisch sind bei der DCM 2 Formen beschrieben. Einmal die „Attenuated-Wavy-Fibers“ (TIDHOLM et al., 1998), bei der die Herzmuskelzellen einen Durchmesser von weniger als 6 μm und eine wellenförmige Erscheinung haben. Diese Form kommt bei vielen mittelgroßen, großen und Riesenrassen vor (TIDHOLM & JONSSON, 2005). Sie ist aber auch in einer Studie mit juvenilen Dobermännern beschrieben (VOLLMAR et al., 2003). Die beim Dobermann häufiger vorkommende Form ist die bindegewebig-fettige Degeneration der Kardiomyozyten (CALVERT et al., 1982; HAZLETT et al., 1983; CALVERT et al., 1997a; EVERETT et al., 1999; TIDHOLM & JONSSON, 2005). Diese Form ist auch bei der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie beim Boxer beschrieben (BOUJON & AMBERGER, 2003) und ist unter anderem mit Arrhythmien assoziiert (CALVERT et al.,

1997a). SMITH und Kollegen (2008) untersuchten den Zusammenhang von Arrhythmien und Fettsäurekonzentrationen im Serum bei Dobermännern und Boxern. Hierbei fanden sie unterschiedliche Konzentrationen der verschiedenen Fettsäuren bei den beiden Rassen. Sie konnten eine schwache positive Korrelation von VES und 3 verschiedenen Fettsäuren beim Boxer feststellen, nicht jedoch beim Dobermann. GILBERT und Kollegen (2000) zeigten, dass es beim Dobermann Veränderungen in der Anordnung, Feinstruktur und Biochemie der myokardialen Kollagenmatrix gibt, welche eine Erklärung für die Rasseprädisposition der Dobermänner für die DCM geben können.

1.4. **Krankheitsstadien**

Der Verlauf der dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann kann in 3 Krankheitsstadien eingeteilt werden.

Das Stadium I der Erkrankung wird auch subklinisches Stadium genannt. In diesem Stadium sind weder klinische noch echokardiographisch oder elektrokardiographisch nachweisbare Anzeichen einer Herzerkrankung vorhanden. Die Veränderungen finden auf zellulärer Ebene statt (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b).

Das Stadium II der Erkrankung wird auch okkultes Stadium genannt, da für den Besitzer noch keine Krankheitsanzeichen erkennbar sind. Es können jedoch morphologische Veränderungen wie eine linksventrikuläre Vergrößerung in Systole und Diastole oder elektrokardiographische Veränderungen wie ventrikuläre Extrasystolen diagnostiziert werden (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b). Diese echokardiographischen und elektrokardiographischen Veränderungen können entweder beide gleichzeitig vorkommen, oder es kann auch nur eine Form während der gesamten okkulten Phase dominieren (CALVERT et al., 2000b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b; WESS et al., 2010b). Entwickeln sich echokardiographische Veränderungen, nachdem zuerst isoliert Arrhythmien aufgetreten sind, entstehen diese morphologischen Veränderungen meist innerhalb eines Jahres (CALVERT et al., 2000c; CALVERT & MEURS, 2009). Dobermänner mit echokardiographischen Veränderungen im okkulten Stadium, die mit Pimobendan behandelt wurden, hatten in einer Studie eine mediane Zeitspanne von knapp 2 Jahren bis sie entweder kongestives Herzversagen entwickelten oder am Sekudentod verstarben (SUMMERFIELD et al., 2012). Im okkulten Stadium sterben bereits ca. ein Drittel bis die Hälfte der erkrankten Dobermänner am Sekudentod

(CALVERT et al., 2000b; CALVERT et al., 2000c; CALVERT & MEURS, 2009). Die Dobermänner, die am Sekudentod versterben, sind im Schnitt ein Jahr jünger als Dobermänner, die ein kongestives Herzversagen entwickeln (CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 2000c).

Das Stadium III ist das overte Stadium. Hier zeigen die betroffenen Hunde klinische Anzeichen einer Herzerkrankung. Wenn die Dobermänner nicht stark belastet werden, fallen frühe Symptome wie Leistungsschwäche oft nicht auf. Es konnte jedoch auch schon beobachtet werden, dass ein sportlich genutzter Dobermann bis zu 2 Wochen vor der Entwicklung eines Lungenödems keine Symptome zeigte. Meist sind die ersten klinischen Anzeichen, die vom Besitzer bemerkt werden, Husten und Dyspnoe (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b). Nach der Entwicklung eines kongestiven Herzversagens sind die kardialen Todesursachen meist das Versterben oder die Euthanasie aufgrund des hochgradigen oder therapieresistenten Herzversagens, kardiogener Schock oder Sekudentod aufgrund von ventrikulären Arrhythmien (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b; PETRIC et al., 2002a; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b). Erfolgt keine Therapie nach einer durch ventrikuläre Arrhythmien ausgelösten Synkope, sterben die

meisten Dobermänner innerhalb von 6 Wochen am Sekundentod (CALVERT & BROWN, 2004; CALVERT & MEURS, 2009). Mehrere Episoden von Synkopen sind beim Dobermann selten. Meist versterben sie nach dem ersten Ereignis. Im overten Stadium sterben ebenfalls 30 bis 50 % der erkrankten Dobermänner am Sekundentod (CALVERT et al., 1997b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b). Im Vergleich zu anderen Hunden mit DCM verläuft das klinische Stadium beim Dobermann rapide progressiv (CALVERT et al., 1982; PETRIC et al., 2002a; CALVERT & BROWN, 2004; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b).

1.5. **Diagnostische Möglichkeiten**

Da Dobermänner meist keine Krankheitsanzeichen vor Eintreten des Endstadiums zeigen, ist es wichtig ein jährliches Screening durchzuführen, um die Erkrankung frühzeitig zu erkennen und um eine rechtzeitige und adäquate Therapie starten zu können. Ein jährliches Screening wird ab einem Alter von 2–3 Jahren empfohlen (CALVERT & MEURS, 2009; WESS et al., 2010b; WESS et al., 2017a). Der aktuelle Goldstandard zur Diagnose der Dobermann-Kardiomyopathie ist eine Kombination aus 24-Stunden-Elektrokardiogramm (EKG) und Echokardiogramm (CALVERT et al., 2000b; CALVERT & WALL, 2001; WESS

et al., 2017a). Weiterhin können zusätzliche Untersuchungen, wie die Bestimmung von kardialen Biomarkern und die Anfertigung eines Kurzzeit-EKGs, hilfreich sein, wenn die erstgenannten Untersuchungen nicht zur Verfügung stehen (WESS et al., 2017a).

Ein genetischer Test kann bisher nicht die jährlichen Vorsorgeuntersuchungen ersetzen. Der genetische Test zur Überprüfung einer Spleißstellenmutation im PDK4-Gen kann nützlich in den Vereinigten Staaten von Amerika sein (MEURS et al., 2012), ist aber nicht hilfreich in Europa. Dieser Test konnte in einer europäischen Population keinen Zusammenhang zwischen der PDK4-Gen-Mutation und der DCM aufzeigen (OWCZAREK-LIPSKA et al., 2013). Allgemein sollte eine vorsichtige Interpretation des Gentests erfolgen. Ein negatives Ergebnis bedeutet nicht, dass der Dobermann keine DCM entwickeln wird und sollte somit nicht die jährlichen Vorsorgeuntersuchungen ersetzen. Weiterhin bedeutet ein positives Ergebnis nicht zwingend, dass der Dobermann eine DCM entwickelt und sollte somit nicht als Todesurteil aufgefasst werden. Allerdings sollte ebenso ein regelmäßiges Screening sorgfältig durchgeführt werden (WESS et al., 2017a). Wertvoll kann ein genetischer Test jedoch in der Zuchtauswahl

sein, da es sonst keine Möglichkeiten gibt, die Erkrankung frühzeitig festzustellen. Die Entwicklung weiterer genetischer Tests sollte also weiterhin ein wichtiges Forschungsthema sein (PETRIC et al., 2002a; WESS et al., 2017a).

1.5.1. Anamnese und klinische Untersuchung

Eine sorgfältige Anamnese und Allgemeinuntersuchung können schon die ersten Hinweise auf eine dilatative Kardiomyopathie geben. Bei der Anamnese sollte vor allem hinterfragt werden, ob Anzeichen von Husten, eine schnellere Atemfrequenz allgemein und in Ruhe, Inappetenz, Schwäche, Leistungsintoleranz oder Synkopen bemerkt wurden. Dobermänner zeigen diese Symptome meist aufgrund eines Linksherzversagens oder lebensbedrohlicher Arrhythmien (CALVERT et al., 1982; TIDHOLM & JONSSON, 1997). Bei der klinischen Untersuchung können Tachy- und Dyspnoe, Husten, verstärkte Atemgeräusche und Crackles, ein systolisches Herzgeräusch sowie Tachykardien, Arrhythmien und ein Galopprrhythmus auffallen. Weiterhin können ein schwacher Puls, Pulsdefizit, eine verlängerte kapilläre Füllungszeit, erweiterte Jugularvenen, Aszites, blasse Schleimhäute, Gewichtsverlust und Muskelabbau und teilweise eine erhöhte Körpertemperatur auftreten (CALVERT et al., 1982; TIDHOLM & JONSSON,

1996; TIDHOLM & JONSSON, 1997; DUKES-MCEWAN et al., 2003)

1.5.2. Echokardiographie

Ein ausführlicher Herzultraschall in Kombination mit einem 24-Stunden-EKG ist der aktuelle Goldstandard zur Diagnose der dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann (CALVERT et al., 2000b; CALVERT & WALL, 2001; DUKES-MCEWAN et al., 2003; WESS et al., 2017a). Laut den aktuellen Screening-Guidelines der *European Society of Veterinary Cardiology* (ESVC) für die dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann, sollte ein vollständiger Herzultraschall mit einem mitlaufenden EKG durchgeführt werden. Die generellen Leitlinien für den Herzultraschall sollten befolgt werden (THOMAS et al., 1993; WESS et al., 2017a). Angeborene und erworbene Herzerkrankungen, die ebenfalls eine Volumenüberladung und oder eine systolische Dysfunktion verursachen können, sollten durch Auskultation, Dopplersonographie und gegebenenfalls weitere Untersuchungen ausgeschlossen werden (SISSON et al., 1999; DUKES-MCEWAN et al., 2003; WESS et al., 2017a).

Durch die Scheibchensummationsmethode nach Simpson (SMOD) wird das linksventrikuläre Volumen gemessen. Es sollte jeweils das enddiastolische und endsystolische Volumen

in 3 aufeinanderfolgenden Messungen bestimmt werden. Diese Messungen sollten in der rechtsparasternalen Längsachse und im linksapikalen Vierkammerblick durchgeführt werden. Um eine Unterschätzung des Volumens zu vermeiden, sollte jeweils das größere Volumen verwendet werden (WESS et al., 2017a). Als Grenzwerte für das Vorhandensein einer DCM beim Dobermann wurden folgende Werte für die SMOD festgelegt:

- Enddiastolischer Volumenindex (EDVI): $> 95 \text{ ml/m}^2$
(Sensitivität 96,9 %, Spezifität 98,7 %)
- Endsystolischer Volumenindex (ESVI): $> 55 \text{ ml/m}^2$
(Sensitivität 94,4 %, Spezifität 99,5 %)

Der EDVI und der ESVI sind jeweils das enddiastolische bzw. endsystolische linksventrikuläre Volumen normalisiert auf die Körperoberfläche (WESS et al., 2010d; WESS et al., 2017a).

Durch die Motion-Mode-Messung (M-Mode) können unter anderem der Innendurchmesser des linken Ventrikels gemessen werden. Es sollten jeweils 5 aufeinanderfolgende Messungen in der Enddiastole (LVIDd) und Endsystole (LVIDs) bestimmt werden (WESS et al., 2017a). Es wurden verschiedene Referenzwerte für Dobermänner veröffentlicht.

O'GRADY und Kollegen (2009) erstellten folgende

Referenzwerte:

- LVIDd: $\geq 0.1749 \times \text{kg Körpergewicht} + 40.3\text{mm}$
- LVIDs: $\geq 0.1402 \times \text{kg Körpergewicht} + 35.0\text{mm}$

WESS und Kollegen (2017a) veröffentlichten diese Referenzwerte:

- LVIDd (Rüde): $> 48 \text{ mm}$
- LVIDd (Hündin): $> 46 \text{ mm}$
- LVIDs (Rüde und Hündin): $> 36 \text{ mm}$

Zu beachten ist, dass in den verschiedenen Studien die M-Mode-Messungen leicht unterschiedlich aufgenommen wurde. Die M-Mode-Referenzwerte von O'GRADY und Kollegen (2009) und WESS und Kollegen (2017a) stammen beide aus der rechtsparasternalen Längsachse, jedoch ist bei den erstgenannten die Aorta im M-Mode-Blick offen und bei den zweitgenannten nicht im Bild (WESS et al., 2017a).

Da es sich gezeigt hat, dass die SMOD im Vergleich zur M-Mode-Messung überlegen ist, um frühe echokardiographische Veränderungen bei Dobermännern im okkulten Stadium festzustellen, sollte die Volumenmessung bevorzugt werden (WESS et al., 2010d).

Weitere echokardiographische Parameter, die ergänzend zu den

oben genannten Parametern für die Diagnose der okkulten DCM herangezogen werden können, sind der Abstand zwischen dem E-Punkt der Mitralklappe und dem Septum (EPSS) und der Sphärizitätsindex (SI) (CALVERT & BROWN, 1986; WESS et al., 2017a). Der errechnete Referenzwert für SI ist $< 1,65$ (Sensitivität 86,8 %, Spezifität 87,6 %). Der optimale Referenzwert für EPSS ist $> 6,5$ mm (Sensitivität 100 %, Spezifität 99,0 %) (HOLLER & WESS, 2014). Aufgrund der moderaten Sensitivität und Spezifität ist der SI jedoch nur bedingt zur Diagnosestellung zu empfehlen. EPSS wiederum zeigte sich als wertvolle ergänzende Variable. In Kombination mit den M-Mode-Messungen können die Sensitivität und Spezifität soweit verbessert werden, dass sie vergleichbar mit den Volumenmessungen mittels SMOD sind (WESS et al., 2017a).

1.5.3. Kurzzeit-Elektrokardiogramm

Mit Hilfe eines Elektrokardiogramms können die Herzfrequenz, der Herzrhythmus und die mittlere elektrische Herzachse bestimmt werden (TILLEY & SMITH JR., 2008). Durch Veränderungen der Morphologie der QRS-Komplexe sowie der elektrischen Herzachse können Vergrößerungen der Ventrikel vermutet werden. Ebenfalls können durch verbreiterte und oder

erhöhte P-Wellen Vergrößerungen der Atrien erkannt werden. Diese morphologischen Veränderungen sind jedoch weder sehr sensitiv noch spezifisch (MILLER et al., 1999). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass auch bei gesunden Dobermännern häufig eine Linksachsenabweichung der mittleren elektrischen Herzachse vorkommt (CARNABUCI et al., 2019). Bei der Bestimmung des Herzrhythmus sollte vor allem auf das Vorhandensein von ventrikulären Arrhythmien, wie zum Beispiel ventrikuläre Extrasystolen (VES), ventrikuläre Couplets, Triplets, Bigemini, Trigemini und ventrikuläre Tachykardien sowie supraventrikulären Arrhythmien, wie zum Beispiel supraventrikuläre Extrasystolen und Vorhofflimmern, geachtet werden.

Die Anfertigung eines Kurzzeit-EKGs hat sich mit einer Sensitivität von 64,2 % als wenig sensitive Methode zur Detektion einer okkulten Dobermann-Kardiomyopathie erwiesen. Es zeigte sich jedoch, dass bei Vorhandensein von mindestens einer VES in einem 5-Minuten-EKG die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, dass im 24-Stunden-EKG mehr als 100 VES vorkommen. Die Spezifität lag bei 96,7 % (WESS et al., 2010e). Dies bedeutet, dass zum Ausschluss einer DCM ein Kurzzeit-EKG nicht ausreichend ist. Treten jedoch

während dem Kurzzeit-EKG ventrikuläre Extrasystolen auf, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass eine DCM vorliegt. In diesem Fall sollte unbedingt ein Langzeit-EKG angefertigt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten in einer Studie mit 188 Boxern festgestellt werden (MEURS et al., 2001).

1.5.4. Langzeit-Elektrokardiogramm

Das Langzeit-EKG, auch Holter-EKG genannt, wird beim Hund meist über 24 Stunden aufgenommen. Es gehört, in Kombination mit einem Echokardiogramm, zum Goldstandard der Diagnose einer DCM beim Dobermann (CALVERT et al., 2000b; CALVERT & WALL, 2001; DUKES-MCEWAN et al., 2003; WESS et al., 2017a). Das Holter-EKG sollte mindestens über 23 Stunden aufgenommen werden und sollte von guter Qualität sein. Da die Analysefunktion der Holter-EKG-Software meist sehr ungenau ist, sollte ein Kardiologe jede Analyse überprüfen (WESS et al., 2017a). Sehr viele Dobermänner mit grenzwertigen Messungen im Herzultraschall haben VES im 24-Stunden-EKG. Eine Studie zeigte, dass der Großteil der Hunde, der mehr als 100 VES oder Couplets, Triplets oder ventrikuläre Arrhythmien in 24 Stunden hatte, innerhalb eines Jahres auch echokardiographische Veränderungen im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie entwickelte (CALVERT & WALL, 2001).

Laut den aktuellen Screening-Guidelines der ESVC sollte ein Cut-off-Wert von > 300 VES in 24 Stunden oder > 50 VES in 24 Stunden in 2 aufeinanderfolgenden Aufnahmen innerhalb eines Jahres als diagnostisch für die Dobermann-Kardiomyopathie gelten (GERAGHTY & WESS, 2011; WESS et al., 2017a). Wenn bis zu 50 VES in 24 Stunden diagnostiziert werden, sollte vor allem auf die Schlag-zu-Schlag-Frequenz und die Komplexität der VES geachtet werden. Wenn eine Schlag-zu-Schlag-Frequenz von > 250 /min oder Couplets, Triplets oder mehrere VES hintereinander mit einer Schlag-zu-Schlag-Frequenz von > 260 /min auftreten, kann eine Dobermann-Kardiomyopathie nicht sicher ausgeschlossen werden. Ein erneutes 24-Stunden-EKG sollte innerhalb von 3 bis 6 Monaten durchgeführt werden. Systemische Erkrankungen, die als Ursache für die ventrikulären Extrasystolen in Frage kommen, sollten immer ausgeschlossen werden. Ventrikuläre Ersatzschläge und beschleunigt idioventrikuläre Rhythmen werden nicht als diagnostisch für die dilatative Kardiomyopathie angesehen (WESS et al., 2017a).

1.5.5. Röntgen

Eine Röntgenaufnahme des Brustkorbes dient vor allem dazu, ein Lungenödem bei Dobermännern im overtten Stadium zu

diagnostizieren (TIDHOLM et al., 2001). Befunde, die anhand des Röntgenbildes erhoben werden können, sind eine Kardiomegalie, ein prominentes linkes Atrium, gestaute Venen, verschiedene Grade von interstitieller oder alveolärer Lungenzeichnung und teilweise Pleuraerguss und Aszites. Diese Befunde sind diagnostisch für ein kongestives Herzversagen, sind aber nicht spezifisch für eine dilatative Kardiomyopathie. Ein Röntgenbild des Brustkorbes im okkulten Stadium der DCM ist oft unauffällig. Teilweise können eine Vergrößerung des linken Atriums oder Ventrikels festgestellt werden (DUKES-MCEWAN et al., 2003). Selbst im overtten Stadium kann eine deutliche Vergrößerung des linken Ventrikels röntgenologisch oft nicht diagnostiziert werden (CALVERT et al., 1982). Daher ist diese Methode als Screening-Test zur Diagnose einer okkulten Dobermann-Kardiomyopathie nicht geeignet.

1.5.6. Biomarker

Die im Jahr 2001 veröffentlichte Definition der „Biomarkers Definitions Working Group“ definierte Biomarker als „eine Eigenschaft, die objektiv gemessen und als Indikator für normale biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder pharmakologisches Ansprechen auf eine therapeutische Maßnahme evaluiert wird“ (BIOMARKERS DEFINITIONS

WORKING GROUP, 2001). Die labordiagnostisch nachweisbaren Biomarker, die am meisten zum Nachweis kardialer Erkrankungen verwendet werden, sind das N-terminale-pro-B-Typ-natriuretische-Peptid (NT-proBNP) (DE LIMA & FERREIRA, 2017) und das kardiale Troponin I (cTnI) (LANGHORN & WILLESSEN, 2016). In den aktuellen Screening-Guidelines der ESC für die Dobermann-Kardiomyopathie wird betont, dass diese Biomarker nicht den aktuellen Goldstandard, der aus Echokardiographie und 24-Stunden-EKG besteht, ersetzen können. In Ausnahmefällen, in denen der Besitzer die empfohlenen jährlichen diagnostischen Tests nicht bezahlen kann oder diese nicht zur Verfügung stehen, können die Biomarker Verwendung finden (WESS et al., 2017a). Zusätzlich können sie hilfreiche ergänzende Test sein, um frühe kardiale Veränderungen festzustellen (WESS et al., 2011). Da es jedoch einige sowohl falsch negative als auch falsch positive Ergebnisse geben kann, können die Biomarker nicht die Grundlage für eine Diagnosestellung sein, auf welcher die therapeutischen Maßnahmen entschieden werden (OYAMA et al., 2013; WESS et al., 2017a). Zusätzlich zu NT-proBNP und cTnI könnten weitere kardiale Biomarker, wie unter anderem das atriale natriuretische Peptid (O'SULLIVAN et al., 2007b) oder verschiedene microRNAs (STEUDEMANN et al., 2013),

in der Zukunft eine größere Rolle spielen.

1.5.6.1. N-terminales-pro-B-Typ-natriuretisches-Peptid

Das natriuretische Peptid Typ B ist ein Hormon, welches zuerst aus dem Gehirn eines Schweines isoliert wurde. Es wurde daher zunächst „brain natriuretic peptide“ genannt (SUDOH et al., 1988). Dieser Name ist jedoch irreführend, da es hauptsächlich in den Herzmuskelzellen der Ventrikel produziert wird (HOSODA et al., 1991). Daher wird es heute nur noch natriuretisches Peptid Typ B (BNP) genannt. Durch Überlastung und Dehnung der Myokardzellen kommt es zur vermehrten Produktion des Hormons. Es erfolgt eine Freisetzung des Vorläufermoleküls BNP, welches in die biologisch aktive Form C-terminales-BNP und das inaktive NT-proBNP aufgespalten wird (REYNOLDS & OYAMA, 2008). Da das C-terminale-BNP eine sehr kurze Halbwertszeit von ca. 90 Sekunden hat, wird das NT-proBNP, mit einer Halbwertszeit von ca. 120 Minuten, als labordiagnostischer Parameter bevorzugt verwendet (DE LIMA & FERREIRA, 2017). Die natriuretischen Peptide steigern unter anderem die Natriurese und senken so den Blutdruck und die Vorlast des Herzens. Sie wirken somit als Gegenspieler von Angiotensin und Aldosteron (GOETZE, 2004; VOLPE et al., 2016). Das NT-proBNP zeigte

sich als Biomarker besonders wertvoll, um eine Herzerkrankung im okkulten Stadium zu diagnostizieren, um kongestives Herzversagen von respiratorischen Erkrankungen zu unterscheiden und indirekt auch um die myokardiale Funktion zu beurteilen (MCDONAGH et al., 1998; OYAMA et al., 2007; PROSEK et al., 2007; BOSWOOD et al., 2008; OYAMA et al., 2008; OYAMA et al., 2009; DE LIMA & FERREIRA, 2017).

Bei der Beurteilung des NT-proBNP-Spiegels als kardialer Biomarker müssen vor allem eine Beeinflussung durch andere Erkrankungen wie Nierenerkrankungen, pulmonale oder systemische Hypertension und Sepsis sowie fehlerhafte Probenentnahme und -verarbeitung beachtet werden (OYAMA et al., 2013). Zusätzlich müssen rassespezifische Unterschiede (SJOSTRAND et al., 2014) und die Tag-zu-Tag-Variabilität beachtet werden (WINTER et al., 2017).

In einer Studie mit 328 Dobermännern wurde die Plasmakonzentration des zirkulierenden NT-proBNP in verschiedenen Stadien der DCM evaluiert. Es zeigte sich, dass das NT-proBNP ein sensitiverer Marker ist, um echokardiographische im Vergleich zu elektrokardiographischen Veränderungen vorherzusagen. Bei einem Cut-off-Wert von > 400 pmol/L lag die Sensitivität bei 90 %

und die Spezifität bei 75 %, um echokardiographische Veränderungen festzustellen. Um alle Stadien vorherzusagen lag die Sensitivität bei 81 % und die Spezifität bei 75 %. Erhöhte man den Cut-off-Wert auf > 550 pmol/L lag die Spezifität bei 90 %, die Sensitivität jedoch nur noch bei 79 %, um echokardiographische Veränderungen festzustellen. Dieser Cut-Off-Wert wurde als bester prädiktiver Wert für echokardiographische Veränderungen bei der Dobermann-Kardiomyopathie angesehen (WESS et al., 2011). In einer anderen Studie mit 155 asymptomatischen Dobermännern führte die Kombination aus einem NT-proBNP-Cut-off-Wert von > 457 pmol/L und einem Holter-EKG zu einer Sensitivität von 94,5 % und einer Spezifität von 87,8 %, um eine okkulte DCM festzustellen. In dieser Studie konnte eine okkulte DCM ebenfalls besser bei Dobermännern mit echokardiographischen Veränderungen festgestellt werden, als bei Dobermännern, die nur ventrikuläre Arrhythmien hatten (SINGLETARY et al., 2012). Laut den aktuellen Screening-Guidelines der ESVC ist ein Cut-off-Wert von > 500 pmol/L gut, um echokardiographische Veränderungen im Sinne einer okkulten Dobermann-Kardiomyopathie vorauszusagen. Im Umkehrschluss ist es bei einer NT-proBNP-Plasmakonzentration von < 500 pmol/L unwahrscheinlich, dass

derzeitig echokardio-graphische Veränderungen bei der DCM vorliegen. Jedoch reichen die Forschungsergebnisse bislang nicht aus, um ein Holter-EKG oder Echokardiogramm zu ersetzen. Der Nachweis der NT-proBNP-Konzentration sollte als ergänzender Test angesehen werden (WESS et al., 2017a).

1.5.6.2. Kardiales Troponin I

Das Troponin I ist die inhibitorische Untereinheit des Sarkomers, der kontraktile Einheit der Muskelzellen (LANGHORN & WILLESEN, 2016). Es hat gewebespezifische Isoformen für die Skelett- und Herzmuskelzellen (MISSOV & DE MARCO, 1999). Da das kardiale Troponin I (cTnI) eindeutig von der Isoform des Skelettmuskels unterschieden werden kann, stellt es einen herzspezifischen Marker dar. Zusätzlich ist es ein sehr spezifischer Marker für eine Myokardschädigung, da die Troponine nur intrazellulär vorkommen und somit nur aus geschädigten Herzmuskelzellen freigesetzt werden. Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass cTnI zwar herzspezifisch, jedoch nicht krankheitsspezifisch ist. Es wird sowohl bei den verschiedensten Herzerkrankungen als auch bei Myokardschäden durch nicht kardiale Erkrankungen freigesetzt (OYAMA & SISSON, 2004; SPRATT et al., 2005; LANGHORN & WILLESEN, 2016). Beispiele für extrakardiale

Erkrankungen, die ebenfalls ein erhöhtes cTnI verursachen können, sind unter anderem systemische inflammatorische Prozesse (LANGHORN et al., 2013; HAMACHER et al., 2015), Infektionskrankheiten (LOBETTI et al., 2002; KOUTINAS et al., 2012; SILVESTRINI et al., 2012), eine Niereninsuffizienz (PORCIELLO et al., 2008) oder eine Magendrehung (SCHOBER et al., 2002). Die Limitationen für das cTnI zur Verwendung als kardialer Biomarker sind ähnlich wie die zuvor genannten bei dem NT-proBNP (WESS et al., 2017a).

In einer Studie mit 336 Dobermännern konnte gezeigt werden, dass cTnI bei Dobermännern in allen Stadien der DCM signifikant erhöht war. Der cTnI-Wert stieg noch weiter signifikant an, wenn die Hunde Symptome entwickelten. Der beste Cut-off-Wert, um alle Krankheitsstadien der DCM vorauszusagen war $< 0,22$ ng/ml (Sensitivität 78,9 %, Spezifität 87,3 %). Der Test war auch bei den Dobermännern erhöht, die nur VES und keine echokardiographischen Veränderungen zeigten. Die Sensitivität war jedoch bei den Dobermännern mit echokardiographischen Veränderungen besser (WESS et al., 2010c).

Bei der Beurteilung der Testergebnisse muss beachtet werden, dass es verschiedene Analysetests auf dem Markt gibt und diese

eventuell nicht immer vergleichbar sind (WESS et al., 2017a). Aktuell wird oft ein hochsensitiver cTnI-Test verwendet. In einer Studie mit dem hochsensitiven Testverfahren wurde ein Cut-off-Wert von $> 0,113$ ng/ml bestimmt. Mit diesem Wert können Dobermänner erkannt werden, die verdächtig für eine Dobermann-Kardiomyopathie sind (Sensitivität: 81,2 %, Spezifität: 73,2 %). Ab einem Cut-off-Wert von $> 0,242$ ng/ml ist das Vorliegen einer DCM sehr wahrscheinlich (Sensitivität: 42,3 %, Spezifität: 97,2 %). In dieser Studie erwies sich der hochsensitive Test etwas besser als der konventionelle cTnI-Test um Hunde frühzeitig zu erkennen, bevor sie echo- bzw. elektrokardiographische Veränderungen aufweisen (KLUSER et al., 2019).

Auch hier ist der Nachweis von cTnI nur als ergänzend anzusehen. Die Beweislage reicht nicht aus, um den Goldstandard mit Echokardiogramm und Holter-EKG zu ersetzen.

In einer Studie, in der die prognostischen Faktoren für den Sekudentod beim Dobermann untersucht wurden, war cTnI eine wichtige Variable, um den Sekudentod vorauszusagen. Dobermänner mit einem vergrößerten Herz und einer cTnI-Konzentration $> 0,34$ ng/ml, hatten ein deutlich erhöhtes Risiko

am Sekudentod zu versterben (KLUSER et al., 2016).

1.6. **Therapeutische Möglichkeiten**

Bislang gibt es keine kausale Therapie bei der Dobermann-Kardiomyopathie. Die bisherigen Therapieoptionen können nur den Beginn der Symptome verzögern oder diese abschwächen (SUMMERFIELD et al., 2012). Weiterhin soll die Lebensqualität erhöht und die Mortalität verringert werden (SISSON et al., 1999). Es gibt bisher keine allgemeinen Richtlinien bezüglich der Therapie der okkulten DCM (CALVERT & MEURS, 2009). Im Folgenden werden die wichtigsten Medikamente, die bei der Dobermann-Kardiomyopathie eingesetzt werden, kurz erläutert.

1.6.1. **Pimobendan**

Pimobendan ist ein sogenannter Inodilatator. Das heißt, es wirkt positiv inotrop und bewirkt eine venöse und arterielle Vasodilatation (HOGAN & GREEN, 2009). Dies wird durch die Hemmung der Phosphodiesterase III und eine Kalziumsensibilisierung erreicht (LEE et al., 1989). Es ist das Medikament, das bisher den größten therapeutischen Nutzen in der okkulten Phase der Dobermann-Kardiomyopathie bewiesen hat. In einer großen Multicenterstudie lebten die Dobermänner,

die mit Pimobendan behandelt wurden, im Durchschnitt 9 Monate länger bis sie ein kongestives Herzversagen entwickelten im Vergleich zu Dobermännern, die ein Placebo erhielten (SUMMERFIELD et al., 2012). Auch im klinischen Stadium der Erkrankung erwies es sich als wichtiges Medikament, das die Überlebenszeit verlängert, wenn es zusätzlich zu Furosemid und einem ACE-Hemmer gegeben wird (FUENTES et al., 2002; O'GRADY et al., 2008).

1.6.2. Angiotensin-konvertierendes-Enzym-Hemmer

ACE-Hemmer (ACE: Angiotensin konvertierendes Enzym) blockieren, wie der Name schon sagt, das Angiotensin konvertierende Enzym. Dadurch wird die Bildung von Angiotensin II verhindert, welches normalerweise eine Vasokonstriktion, Flüssigkeits-retention, Hypertrophie und Fibrose der Herzmuskelzellen und der glatten Gefäßmuskulatur, Aldosteron-Freisetzung und Verstärkung des sympathischen Nervensystem bewirkt (HOGAN & GREEN, 2009).

Bislang gibt es nur eine einzige Studie, die den Effekt des ACE-Hemmers Benazepril Hydrochlorid auf das Voranschreiten der Dobermann-Kardiomyopathie im okkulten Stadium untersuchte. In dieser retrospektiven Studie war die Zeit bis klinische Symptome auftraten ca. 3 Monate länger bei

Dobermännern, die Benazepril erhielten, im Vergleich zu den Hunden, denen keines verabreicht wurde (O'GRADY et al., 2009). Die positive Auswirkung von ACE-Hemmer im klinischen Stadium von Hunden mit DCM wurde von mehreren prospektiven Studien nachgewiesen (THE COVE STUDY GROUP, 1995; THE IMPROVE STUDY GROUP, 1995; ETTINGER et al., 1998; THE BENCH STUDY GROUP, 1999).

1.6.3. Antiarrhythmika

Es gibt ein immer weiterwachsendes Spektrum von antiarrhythmischen Medikamenten. Für eine bessere Übersicht wurden verschiedene Einteilungssysteme entwickelt. Das bekannteste ist die Klassifikation nach Vaughn Williams, die von Harrison modifiziert wurde (MUIR et al., 1999). Hier werden die Antiarrhythmika in 4 Klassen eingeteilt. Klasse I besteht aus Medikamenten, die einen Einfluss auf den Natriumkanal haben. Klasse II umfasst die Betablocker. Klasse III besteht aus Medikamenten, die das intrazelluläre Aktionspotential verlängern. Medikamente der Klasse IV sind Kalziumkanalblocker (VAUGHAN WILLIAMS, 1984; HARRISON, 1985).

Die Therapie von ventrikulären Arrhythmien hat das Ziel das Sekundentodrisiko zu verringern, die Anzahl der gefährlichen

Arrhythmien zu reduzieren und die damit verbundenen klinischen Symptome zu eliminieren (MOISE, 1999). Da bislang nur wenige Studien über den Einsatz von Antiarrhythmika beim Dobermann vorliegen, gibt es keine eindeutigen Therapieempfehlungen.

Eine Studie, die 1996 veröffentlicht wurde, evaluierte den Einsatz von Tocainid bei 23 Dobermännern mit okkulten Kardiomyopathie. Es konnte eine mindestens 70 prozentige Reduktion der Gesamtzahl der VES in ca. 80 % der behandelten Hunde dosisabhängig, kurzzeitig erreicht werden. Ein therapeutischer Effekt, der längere Zeit anhielt, war bei den Hunden mit systolischer Dysfunktion jedoch oft nicht zu erreichen. Aufgrund der hohen Kosten und der potenziell schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie z. B. eine Endotheldystrophie der Kornea oder Nierenfunktionsstörungen, empfahlen die Autoren das Medikament nicht länger als 3 Monate einzusetzen (CALVERT et al., 1996).

In einer kleinen, retrospektiven Studie wurde der Einfluss der antiarrhythmischen Therapie auf die Überlebenszeit von 19 Dobermännern mit okkulten DCM evaluiert. Die Hunde, die Antiarrhythmika erhielten, lebten signifikant länger als diejenigen, die keine erhielten. Alle Hunde in dieser Studie

starben am Sekudentod. Daher war die Schlussfolgerung der Autoren, dass Antiarrhythmika den Sekudentod herauszögern, aber nicht verhindern können (CALVERT & BROWN, 2004).

In einer prospektiven Studie mit 39 Dobermännern im frühen Arrhythmie-Stadium wurde der Einfluss der Verabreichung von alleinigem Ramipril oder der Kombination von Ramipril mit Sotalol oder keiner Therapie verglichen. Die mediane Zeit bis die Malignität der Arrhythmien zunahm, war bei den Dobermännern, die eine Kombination aus Ramipril und Sotalol erhielten länger, als bei den Hunden die keine Therapie oder nur Ramipril erhielten. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (GLATZMEIER & WESS, 2012).

Bei 43 Dobermännern mit malignen Arrhythmien wurden in einer prospektiven Studie 2 unterschiedliche Therapieansätze miteinander verglichen. Den Hunden wurde randomisiert eine Dauertherapie entweder mit Amiodaron oder einer Kombination aus Sotalol und Mexiletin verabreicht. Die Studie konnte keinen eindeutigen Vorteil von einem der beiden Therapieansätze auf die Überlebenszeit aufzeigen. Jedoch war die Überlebenszeit in beiden Gruppen deutlich länger, als die in der Literatur angegebene von 3 bis 38 Tage ohne Therapie. Daher vermuteten die Autoren einen therapeutischen Effekt beider

Therapieansätze (KASÜSKE & WESS, 2015).

Beim Einsatz von Antiarrhythmika muss beachtet werden, dass diese auch proarrhythmogen wirken und auch andere, teilweise schwerwiegende Nebenwirkungen auslösen können (ETTINGER, 2010). In einer Studie beim Dobermann konnte gezeigt werden, dass Amiodaron in vielen Fällen hepatotoxisch wirkt. Daher sollten die Leberenzyme vor dem Einsatz dieses Medikamentes und mindestens einmal im Monat während der Therapie bestimmt werden (KRAUS et al., 2009). Weiterhin wurde der therapeutische Einsatz von Amiodaron, sowohl beim Menschen, als auch bei Hunden, in Zusammenhang mit einer Thrombozytopenie gebracht, weswegen auch die regelmäßige Überprüfung eines Blutbildes zu empfehlen ist (WEINBERGER et al., 1987; CALVERT et al., 2000a).

1.6.4. Diuretika

Diuretika stellen den Grundstein der Therapie des kongestiven Herzversagens dar. Hiervon sind Schleifendiuretika diejenigen, die am meisten verwendet und auch als die potentesten Entwässerungsmedikamente angesehen werden. Sie blockieren den Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter im dicken, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und bewirken somit eine vermehrte Wasser- und Elektrolytausscheidung (SCHROEDER,

2010).

Furosemid ist das Schleifendiuretikum, welches am häufigsten zur Therapie von Hunden im Herzversagen verwendet wird (KITTLESON, 1998a). Es ist wichtig die geringstmögliche Dosis zu verabreichen, um Nebenwirkungen, wie Dehydratation und Hypokaliämie, zu vermeiden (HOGAN & GREEN, 2009). Ein weiteres Schleifendiuretikum, das inzwischen für Hunde zugelassen ist, ist Torasemid. Es ist ein noch potenteres Medikament, das eine längere Halbwertszeit besitzt und somit weniger oft als Furosemid gegeben werden muss (ISHIDO & SENZAKI, 2008). Es wird oft bei Hunden eingesetzt, die eine Resistenz gegen Furosemid entwickelt haben (OYAMA et al., 2011). Bei einer Resistenz gegen Schleifendiuretika, ist es weiterhin sinnvoll ein zweites Diuretikum, das in einem anderen Teil des Nephrons wirkt, einzusetzen (ELLISON, 1991).

1.7. **Prognose**

Die Überlebenszeit von Dobermännern im okkulten Stadium der DCM ist sehr variabel. Der Großteil der Hunde bei denen zum ersten Mal echokardiographische oder elektrokardiographische Anzeichen für eine DCM im Alter von 3 bis 4 Jahren entdeckt werden, sterben auch innerhalb von 3 bis 4 Jahren (CALVERT et al., 1997a). Hunde die in dieser Phase am Sekundentod

versterben, leben deutlich kürzer (CALVERT et al., 1997a). In einer retrospektiven Studie, die den Einfluss von Antiarrhythmika auf die Überlebenszeit bei Dobermännern im okkulten Stadium untersuchte, lebten die Hunde mit antiarrhythmischer Therapie ca. ein halbes Jahr bevor sie am Sekudentod verstarben. Die unbehandelten Hunde hatten eine mediane Überlebenszeit von 11 Tagen (CALVERT & BROWN, 2004). Eine neuere Studie, welche die Faktoren untersuchte, die prognostisch sind für das Risiko am Sekudentod zu versterben, zeigte, dass ein vergrößertes Herz der wichtigste negativ prognostische Faktor ist. Weitere Faktoren sind das Vorhandensein von ventrikulären Tachykardien, eine maximale Schlag-zu-Schlag-Frequenz der VES über 260 Schläge pro Minute oder eine cTnI Konzentration von über 0,34 ng/ml (KLUSER et al., 2016). Eine große Multicenterstudie untersuchte bei Dobermännern, mit einer systolischen Dysfunktion im okkulten Stadium, den Einfluss von Pimobendan auf die Zeit bis zum Eintritt des Herzversagens oder bis zum Sekudentod. In dieser Studie dauerte die Zeit bis zum Herzversagen oder Sekudentod im Median ca. 2 Jahre bei den Hunden, die Pimobendan erhielten, im Vergleich zu 15 Monaten bei den Hunden, die kein Pimobendan bekamen. In dieser Studie wurden Hunde mit anhaltenden ventrikulären

Tachykardien ausgeschlossen (SUMMERFIELD et al., 2012).

Die Prognose von Dobermännern im klinischen Stadium der DCM ist schlecht (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b; PETRIC et al., 2002a). Sie haben einen schnelleren Verlauf mit kürzeren Überlebenszeiten im Vergleich zu anderen Hunderassen (CALVERT et al., 1982; PETRIC et al., 2002a; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b; SIMPSON et al., 2015). Die beschriebene mediane Überlebenszeit ab Beginn der klinischen Symptome ist 6,5 Wochen (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b). Nur ein verschwindend geringer Teil der Hunde, die gut auf die Therapie ansprechen, leben länger als ein Jahr (CALVERT et al., 1997b). In einer prospektiven, placebokontrollierten Doppelblindstudie war die mediane Überlebenszeit von 10 Dobermännern, die mit Pimobendan behandelt wurden, signifikant länger gegenüber den Hunden, die mit einem Placebo behandelt wurden. Die mediane Überlebenszeit betrug 329 im Vergleich zu 50 Tage (FUENTES et al., 2002). In einer weiteren, prospektiven, placebokontrollierten Doppelblindstudie mit 16 Dobermännern im Herzversagen betrug die Zeit bis zum Therapieversagen 130 Tage bei den mit Pimobendan behandelten Hunden, im Vergleich zu 14 Tage bei den Kontrollhunden (O'GRADY et al.,

2008). Vorhofflimmern und beidseitiges Herzversagen waren in einer Studie von CALVERT und Kollegen (1997b) bei Dobermännern im Endstadium negativ prognostische Faktoren. In einer neueren Studie von SEUSS und Kollegen (2016) war Vorhofflimmern jedoch kein negativ prognostischer Faktor. In der letztgenannten Studie zeigten die Faktoren bilaterales CHF, Alter, ein größeres EDVI, vorberichtliche Synkopen und das Vorliegen mindestens einer VES im Kurzzeit-EKG eine negative Bedeutung in Bezug auf die Überlebenszeit von Dobermännern im klinischen Stadium (SEUß & WESS, 2016).

2. Die Rolle der Autoimmunität bei der dilatativen Kardiomyopathie

Dieses Kapitel soll einen Überblick über den bisherigen Wissenstand zur Rolle der Autoimmunität bei der dilatativen Kardiomyopathie geben. Da es dazu beim Hund noch sehr wenige Veröffentlichungen gibt, wird vor allem auf den aktuellen Kenntnisstand in der Humanmedizin eingegangen.

Autoimmunität wird immer mehr als Ursache oder Verstärker von verschiedenen Krankheiten anerkannt (BECKER et al., 2017a). Die Autoimmunkrankheit wird definiert als „Krankheit, die ganz oder teilweise auf die Bildung von Autoantikörper u. deren schädigende Einwirkung auf den Gesamtorganismus bzw. Organsysteme [...] zurückzuführen ist“ (REICHE et al., 2003). Im Gegensatz zu den klassischen Autoantikörpern, die eine direkte inflammatorische, verletzende oder zerstörende Wirkung auf die Zielzellen, -gewebe oder -organe haben, steht eine neue Klasse von funktionalen Autoantikörpern. Diese Autoantikörper werden in der Humanmedizin zunehmend als Verursacher oder Verstärker der DCM angesehen. Es handelt sich hierbei um Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Durch die Bindung an die Rezeptoren üben sie vor allem eine agonistische Wirkung aus, die zu einer Regulierung

der Rezeptorvermittelten Signalkaskade führt (LIMAS et al., 1990b; JAHNS et al., 2004a; SCHULZE et al., 2005; BORNHOLZ et al., 2014; BECKER et al., 2017a). Vor allem Autoantikörper gegen den β 1-Adrenozeptor und den muskarinergen M2-Rezeptor wurden in hohen Konzentrationen bei Patienten mit DCM gefunden (WALLUKAT et al., 2000; WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Der Begriff „funktionale Autoantikörperkrankheit“ wird für diese Form der Erkrankung, bei der Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine pathogene Rolle spielen, vorgeschlagen (BECKER et al., 2017a).

2.1. Prävalenz

In der Humanmedizin wurden verschiedene Autoantikörper im Serum von Patienten mit DCM entdeckt. Zum einen wurden Autoantikörper gegen Myosin und Tropomyosin in DCM-Patienten gefunden. Hier liegt die Prävalenz zwischen 20 und 66 % (CAFORIO et al., 1992; KONSTADOULAKIS et al., 1993; GOLDMAN et al., 1995). Eine Studie zeigt, dass die Autoantikörpertiter im Verlauf der Erkrankung sinken oder die Autoantikörper sogar vollkommen verschwinden. Das Vorhandensein und das Fortbestehen der Autoantikörper ist mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert (CAFORIO et al.,

1997).

Bei Dobermännern mit DCM wurde ebenfalls die Rolle von Autoantikörpern gegen Myosin und Laminin untersucht. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den gesunden und erkrankten Dobermännern festgestellt werden (BRAZ-RUIVO, 1999).

Weiterhin wurden Autoantikörper gegen das kardiale Troponin I gefunden. Die Prävalenz beträgt zwischen 16 und 28 % bei DCM-Patienten (SHMILOVICH et al., 2007; LANDSBERGER et al., 2008; LEUSCHNER et al., 2008). Das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen das cTnI zeigt keine Assoziation mit dem klinischen Zustand und Outcome der Patienten (MIETTINEN et al., 2008).

Eine autoimmune Komponente wird bei der DCM vor allem in Zusammenhang mit Autoantikörpern gegen G-Proteingekoppelte Rezeptoren gebracht. Hierbei spielen hauptsächlich Autoantikörper gegen die β_1 -Adrenozeptoren und gegen die muskarinergen M2-Rezeptoren eine Rolle (WALLUKAT et al., 2000; WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Es scheint, dass die β_1 -AAK bei der DCM die dominanten Autoantikörper sind, da sie mit einer höheren Affinität an die Rezeptoren binden und bei einem größeren Anteil der Patienten mit DCM gefunden werden

(WALLUKAT et al., 2000). Die Prävalenz der β 1-AAK variiert stark in den verschiedenen Studien. Je nachdem welche Messmethode angewandt wurde, liegt die Prävalenz zwischen 26 und 95 % (LIMAS et al., 1989; WALLUKAT et al., 1991; MATSUI et al., 1995; JAHNS et al., 1999; SCHULZE et al., 2005; STORK et al., 2006; HOLTHOFF et al., 2012; BECKER et al., 2017a). Während in manchen Studien zwischen Autoantikörpern gegen die erste und zweite extrazelluläre Schleife der β 1-Adrenozeptoren unterschieden wird (WALLUKAT et al., 1995; SCHULZE et al., 2005), werden in anderen Studien agonistisch wirkende β 1-AAK allgemein bestimmt (STORK et al., 2006). Mehrere Studien zeigten die funktionale Aktivität beider Arten von β 1-AAK (WALLUKAT et al., 1995; WALLUKAT et al., 2000). In einer neueren Studie zeigten Autoantikörper gegen die erste extrazelluläre Schleife jedoch eine deutlich geringere Aktivität, als die Autoantikörper gegen die zweite extrazelluläre Schleife (NIKOLAEV et al., 2007).

Beim Dobermann wurden ebenfalls β 1-AAK in allen verschiedenen Stadien der DCM entdeckt. Bei erkrankten Dobermännern konnten diese bei 67,8 %, bei gesunden bei 61,3 % nachgewiesen werden. Die Messwerte waren bei einigen

Hunden schon im kardiologisch unauffälligen Stadium erhöht und stiegen beim Fortschreiten der Erkrankung weiter an. Außerdem hatten die Autoantikörper-positiven Hunde eine signifikant höhere Gesamt- sowie kardiale Mortalität ($P = 0,002$; $p = 0,037$). Die Bindungsstelle der Autoantikörper war die zweite extrazelluläre Schleife der β_1 -Adrenozeptoren (WESS et al., 2019).

Der erste Beweis für die Existenz von Autoantikörper gegen den muskarinergen M2-Rezeptor bei Patienten mit DCM wurde von FU und Kollegen (1993) erbracht. Die Prävalenz dieser Autoantikörper wurde zwischen 18 und 51 % beschrieben (NUSSINOVITCH & SHOENFELD, 2012). Diese funktionalen Autoantikörper üben einen negativ chronotropen Effekt auf die Kardiomyozyten aus. In Anwesenheit von β_1 -AAK haben sie jedoch nur einen geringen konträren Einfluss auf den positiv chronotropen Effekt der adrenergen Autoantikörper (WALLUKAT et al., 2000).

2.2. Ätiologie

Die genaue Ursache der Entwicklung der Autoantikörper ist in den meisten Fällen noch nicht vollständig geklärt. Es gibt viele verschiedene Thesen. ROOT-BERNSTEIN und FAIRWEATHER (2015) haben diese Thesen in Bezug auf

Myokarditis aufgeführt und diskutiert. Alle Thesen haben die Annahme gemeinsam, dass Autoimmunkrankheiten durch Umweltfaktoren, beispielsweise Infektionen oder chemische Einwirkungen, ausgelöst werden. BECKER und Kollegen (2017a) haben diese Thesen dann in Bezug auf Kardiomyopathien untersucht und zusammengefasst.

Die älteste These ist die „verborgene Antigen Theorie“. Eigenantigene sind im Normalzustand für das Immunsystem nicht erreichbar. Im Falle einer Gewebeerletzung können diese Antigene jedoch zugänglich werden und somit durch autoreaktive T- und B-Zellklone angegriffen werden. Diese Gewebeerletzung kann durch physikalische und chemische Reize sowie infektiöse und entzündliche Prozesse verursacht werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass zusätzliche Bedingungen, wie solche die durch genetische Prädispositionen oder Umwelteinflüsse hervorgerufen werden, für die Verursachung der Krankheit notwendig sind (BECKER et al., 2017a). Ein Beispiel für die verborgenen Antigene sind die intrazellulären Proteine Myosin und Troponin I (LIAO et al., 1995). Autoantikörper gegen diese versteckten Antigene wurden häufig bei Patienten mit DCM gefunden (CAFORIO et al., 1992; KONSTADOULAKIS et al., 1993; GOLDMAN et al., 1995;

SHMILOVICH et al., 2007; LANDSBERGER et al., 2008; LEUSCHNER et al., 2008).

Die These der „molekularen Mimikry“ beschreibt das Konzept bei dem Krankheitserreger Proteine entwickeln, die denen der Proteine des Wirtes ähnlich sind, um sich vor dessen Immunsystem zu schützen (DAMIAN, 1964). Bei einer Immunantwort gegen die pathogenen Proteine kommt es somit zu einer Kreuzreaktion gegen körpereigene Proteine (FUJINAMI et al., 1983; FUJINAMI & OLDSTONE, 1985). Ein Beispiel hierfür ist die Chagas-Krankheit, welche durch das Protozoon *Trypanosoma cruzi* verursacht wird (VAN VOORHIS et al., 1991). Unter anderem ist *Trypanosoma cruzi* durch molekulare Mimikry in der Lage eine funktionale Autoimmunantwort gegen den β 1-Adrenozeptor auszulösen (FERRARI et al., 1995). Es stellt sich hierdurch die Frage, ob auch die β 1-AAK, die bei der idiopathischen DCM gefunden werden, durch ein bislang nicht identifiziertes virales Pathogen verursacht werden (MAGNUSSON et al., 1996). SPOTNITZ und LESCH (2006) stellten die Hypothese auf, dass die idiopathische DCM eine Langzeitfolge einer ausgeheilten viralen Myokarditis durch Coxsackie-B- oder auch andere Viren sein könnte. Sie äußerten die Vermutung, dass eine genetische

Veranlagung dazu führen kann, dass ruhendes virales Erbgut intramyokardial persistiert und durch Aktivierung eine DCM auslösen kann.

Die „bystander or adjuvant effect theory“ wurde aus der Frage heraus entwickelt, warum es nicht möglich ist eine Autoimmunkrankheit, ohne die Verwendung eines Hilfsmittels, durch kreuzreaktive, inaktivierte Pathogene zu verursachen. Der Grundgedanke dieser These ist es, dass unter Normalbedingungen autoreaktive Immunität streng reguliert wird. In der Gegenwart eines Hilfsmittels, werden jedoch Zytokine produziert, die autoreaktive T-Zellen unspezifisch aktivieren und dadurch die Pathogenese induzieren (ROOT-BERNSTEIN & FAIRWEATHER, 2015). Da bei der DCM Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gefunden werden, die im Normalzustand nicht verborgen sind, aber gut toleriert werden, liegt die Vermutung nahe, dass hier ebenfalls Hilfsstoffe oder spezielle Bedingungen vorhanden sein müssen, um die Erkrankung auszulösen (BECKER et al., 2017a).

Bei der „epitope spread theory“ produziert das Immunsystem initial spezifische T- und B-Zellen als Antwort auf ein dominantes Antigen, beispielsweise eines Infektionserregers

oder eines Eigenantigens. Um die Wirksamkeit der Immunantwort zu erhöhen, werden mit der Zeit andere Epitope und Moleküle, die eine ähnliche Struktur haben oder räumlich nahe beieinander liegen, angegriffen. Dieser Mechanismus kann die Chronizität in Autoimmunkrankheiten fördern (BECKER et al., 2017a). Bei der DCM wurde diese Epitop-Ausweitung bei Ratten, die mit einem C-Protein-Fragment immunisiert wurden, beobachtet. T-Zell-Aktivierung und B-Zell-Epitop-Ausweitung werden als Schlüsselemente für die Entwicklung einer DCM in Folge einer Myokarditis angesehen (MATSUMOTO et al., 2007).

Eine weitere Theorie ist unter anderem die „dual T cell receptor theory“. Bei dieser These geht man davon aus, dass die Selbsttoleranz durch T-Zellen überwunden wird, welche Rezeptoren für 2 verschiedene Antigene aufweisen. Einer der Rezeptoren zielt gegen ein Fremdantigen, während der andere gegen ein Eigenantigen gerichtet ist. Im Falle einer T-Zell-Aktivierung durch das Fremdantigen, würde die folgende klonale Expansion unbeabsichtigter Weise eine Überwindung der Selbsttoleranz mit Hilfe des autoreaktiven Rezeptors veranlassen (BECKER et al., 2017a).

In Hinblick auf die verschiedenen Theorien muss beachtet

werden, dass die meisten klinischen und experimentellen Daten auf mehrere Arten interpretierbar sind und keine einzelne Theorie als alleinige Erklärung der Ursache angesehen werden kann (ROOT-BERNSTEIN & FAIRWEATHER, 2015).

2.3. Pathophysiologie

Die Pathogenese bei der Autoantikörper-assoziierten dilatativen Kardiomyopathie wird vor allem mit den β 1-AAK in Zusammenhang gebracht (WALLUKAT et al., 2000). Der β 1-Adrenozeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Er macht etwa 70–80 % der kardialen β -Adrenozeptoren aus (FRIELLE et al., 1987; JAHNS et al., 2006a). Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stellen die größte Superfamilie im menschlichen Genom dar. Sie sind an fast allen Prozessen im Körper beteiligt (UNAL et al., 2012; BECKER et al., 2017a).

Um den Pathomechanismus zu erklären, wird zunächst der Aufbau der Adrenozeptoren beschrieben. Der β 1-Adrenozeptor besteht aus 7 transmembranösen Alpha-Helices, die eine hydrophobe Tasche formen. Diese umfasst die Lipiddoppelschicht der Membran und dient als Bindungsstelle für die Liganden (BYWATER, 2005; JAHNS et al., 2006a). Die 7 transmembranösen Helices werden durch 3 extrazelluläre und

3 intrazelluläre Schleifen verbunden. Mit dem intrazellulär gelegenen Bereich koppeln die β_1 -Adrenozeptoren mit den stimulierenden G-Proteinen (JAHNS et al., 2006a). An den extrazellulären Teil, genauer gesagt an die erste und zweite extrazelluläre Schleife, können die Autoantikörper binden (WALLUKAT et al., 1995).

Die β_1 -AAK wurden zum ersten Mal von WALLUKAT und WOLLENBERGER (1987b) in Seren von Patienten mit DCM entdeckt. In den darauffolgenden Jahren wurde diese Entdeckung von anderen Forschern bestätigt (LIMAS et al., 1989; MAGNUSSON et al., 1990). Obwohl der genaue Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, wurde in den letzten Jahren die Wirkungsweise der Autoantikörper immer mehr aufgeklärt und die krankheitsinduzierende Wirkung bewiesen. Dies wird im Folgenden genauer erläutert: Die agonistischen β_1 -AAK aktivieren den Rezeptor auf eine ähnliche Weise wie die natürlichen Agonisten (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Durch die Bindung der Autoantikörper an die erste oder zweite extrazelluläre Schleife der β_1 -Adrenozeptoren wird die aktive Rezeptorkonformation stabilisiert und die intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst. Die G-Proteine aktivieren die Adenylatzyklase, welche die Bildung

des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert und die L-Typ-Kalziumkanäle aktiviert. Das cAMP regt wiederum die Proteinkinase A an, welche verschiedene Substrate phosphoryliert, die in die Regulation des intrazellulären Kalziumspiegels involviert sind. Dies erhöht die myokardiale Inotropie und Lusitropie (JAHNS et al., 2006a). LIAO und Kollegen (1997) waren die ersten, die andeuteten, dass die β 1-AAK die myokardiale Kalziumkonzentration erhöhen und dadurch eine Myokardschädigung verursachen.

Einer der Unterschiede zwischen den natürlichen Agonisten und den β 1-AAK ist die unterschiedliche Bindungsstelle. Die klassischen Agonisten binden an die hydrophobe Tasche. Die β 1-AAK binden an die erste oder zweite extrazelluläre Schleife (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Die agonistische Wirkung der β 1-AAK beruht auf der Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation. Diese Stabilisierung könnte durch die Bildung eines Rezeptor-Dimers erfolgen (HOEBEKE, 2001; WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). In verschiedenen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass bestimmte Voraussetzungen für eine vollständige Wirkungsentfaltung der β 1-AAK notwendig sind (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Diese

könnten beispielsweise durch eine genetische Prädisposition (LIMAS et al., 2004; CAFORIO et al., 2007) sowie durch metabolische Veränderungen aufgrund einer Ischämie (LUKITSCH et al., 2012), Hypoxie oder Entzündung (JAHNS et al., 2008; WALLUKAT & SCHIMKE, 2014) hervorgerufen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die β_1 -AAK die Schlagkraft der Myozyten in konzentrationsabhängiger Weise nur um bis zu 80 % der maximalen Schlagkraft, die durch Isoproterenol ausgelöst wird, erhöhen (MAGNUSSON et al., 1994).

Für den pathogenen Effekt der Autoantikörper wird zudem eine fehlende Desensibilisierung verantwortlich gemacht (WALLUKAT et al., 1991). Bei der physiologischen Stimulation durch die klassischen β -adrenergen Agonisten, wie Adrenalin und Noradrenalin, erfolgt eine Herunterregulierung der β -Adrenozeptoren und eine Desensibilisierung der β -adrenergen Reaktion innerhalb von 60 Minuten. Der Agonisten-ähnliche-Effekt, der durch die β_1 -AAK ausgelöst wird, bleibt jedoch mehr als 6 Stunden bestehen. Dies verursacht einen persistierenden positiv chronotropen Effekt. Die Zellen verlieren somit ihren wichtigen Schutzmechanismus gegen eine agonistisch wirkende Überstimulation. Dadurch könnte die

Krankheit ausgelöst und aufrechterhalten werden (WALLUKAT et al., 1991; MAGNUSSON et al., 1994; WALLUKAT et al., 2000). Eine permanente β 1-Adrenozeptor-Stimulation kann somit eine Kalziumüberladung und eine Schädigung der Herzmuskelzellen (LIAO et al., 1997) sowie Apoptose und Zelltod verursachen (STAUDT et al., 2003; JANE-WIT et al., 2007; HABERLAND et al., 2011a; WALLUKAT & SCHIMKE, 2014).

Der Beweis für den kausalen Zusammenhang von β 1-AAK und der Entwicklung einer DCM konnte schließlich durch die *in vivo* Immunisierung mit synthetischen Peptiden gegen die zweite extrazelluläre Schleife des humanen β 1-Adrenozeptoren in Kaninchen erbracht werden. Nachdem die Kaninchen ein Jahr lang aktiv mit den Peptiden immunisiert wurden, zeigten sie morphologische Veränderungen des Herzens, die einer DCM ähneln (MATSUI et al., 1997). JAHNS und Kollegen (2004a) konnten diesen kausalen Zusammenhang bestätigen. Sie immunisierten Ratten gegen die zweite extrazelluläre Schleife, welche bei Ratten und beim Menschen eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenz besitzt. Die immunisierten Ratten entwickelten zuerst alle Autoantikörper gegen die β 1-Adrenozeptoren und schließlich nach 9 Monaten eine schwere

linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion. Wenn Serum von diesen Ratten auf gesunde übertragen wurde, dann entwickelten diese Ratten ebenfalls einen DCM-ähnlichen-Phänotyp.

Klinische Studien bei DCM-Patienten zeigten, dass β 1-AAK mit einer deutlich reduzierten kardialen Funktion (JAHNS et al., 1999), der häufigeren Entstehung von malignen ventrikulären Arrhythmien (CHIALE et al., 2001), einem verstärkten Auftreten von plötzlichem Herztod (IWATA et al., 2001) sowie einer allgemein erhöhten kardialen Mortalität (STORK et al., 2006) assoziiert sind. ZUO und Kollegen (2015) untersuchten in einer Studie den Mechanismus durch welchen die β 1-AAK ventrikuläre Arrhythmien verursachen. Sie fanden heraus, dass diese ein verlängertes QT-Intervall induzieren und dadurch direkt die ventrikulären Arrhythmien auslösen können.

Darüber hinaus wurde der pathogene Effekt der β 1-AAK schließlich durch einen therapeutischen Nachweis der Autoantikörper-Neutralisation bewiesen. Durch eine Immunadsorption konnten sowohl eine Verbesserung der Herzfunktion und des klinischen Status der Patienten (FELIX et al., 2000; MULLER et al., 2000; KNEBEL et al., 2004) als auch eine Reduktion der Mortalität in einem Zeitraum von 5 Jahren nach der Autoantikörper Entfernung erzielt werden (DANDEL

et al., 2012a).

Auf die therapeutischen Möglichkeiten wird später noch einmal genau eingegangen. Zunächst werden jedoch die diagnostischen Möglichkeiten detaillierter beschrieben.

2.4. **Diagnostische Möglichkeiten**

Die Beweise für die Pathogenität der β_1 -AAK sowie für den therapeutischen Nutzen der Autoantikörper-Neutralisation werden zunehmend anerkannt. Da es sich gezeigt hat, dass nur Patienten mit β_1 -AAK von der Autoantikörper-Neutralisation profitieren (DANDEL et al., 2012a), ist der Bedarf nach einem geeigneten diagnostischen Test hoch. Es wird eine adäquate Testmethode gesucht, um die Patienten mit β_1 -AAK zu identifizieren und um die zirkulierenden Antikörperkonzentrationen während der Therapie und zur Verlaufskontrolle zu überprüfen. Bislang gibt es verschiedene Verfahren zur β_1 -AAK-Detektion. Keiner dieser Tests ist jedoch für eine Routinelabordiagnostik geeignet (BORNHOLZ et al., 2014). Die Schwierigkeit bei der Autoantikörper-Bestimmung ist, dass die Bindung der β_1 -AAK zum nativen β_1 -Adrenozeptor durch sämtliche Fixationen sehr schnell zerstört wird (BORNHOLZ et al., 2013). Zudem kann der Einfluss der β_1 -AAK auf die Rezeptorkonformation und die nachgeschaltete

Signalkaskade schwer von einem synthetischen Imitat dargestellt werden. Folglich können die funktionalen β 1-AAK nur von Testverfahren, die den nativen β 1-Adrenozeptor als Antigen verwenden, zuverlässig nachgewiesen werden (BORNHOLZ et al., 2014).

Im Folgenden werden die wichtigsten Methoden inklusive ihrer Vor- und Nachteile beschrieben.

2.4.1. Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay

Der Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay (KKA) wurde 1987 zum ersten Mal von WALLUKAT und WOLLENBERGER (1987b) zur Messung von Autoantikörpern gegen G-Proteingekoppelte Rezeptoren etabliert. Dieser Bioassay wird noch heute zur Autoantikörper-Detektion verwendet und zeigt sich als verlässliche Methode (JOSHI-BARR et al., 2016). Zur Messung der β 1-AAK wird der positiv chronotrope Effekt der Autoantikörper auf spontan schlagende, kultivierte, neonatale Kardiomyozyten von Ratten gemessen. Die Schlagfrequenz der Herzzellen wird mittels eines Mikroskops bestimmt. Für die Zellkulturen werden Kardiomyozyten von 1–3 Tage alten Ratten gewonnen. Die Präparation und Kultivierung der Zellkulturen ist sehr aufwendig und dauert mehrere Tage (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987b; WALLUKAT et al., 2010a). Die

Vorteile dieser Methode sind, dass hiermit der klinisch relevante Anteil an funktional aktiven Autoantikörpern bestimmt werden kann. Weiterhin zeigte der Test eine sehr hohe Sensitivität. Die Nachteile dieses Bioassays sind, dass er auf Kardiomyozyten von Ratten beruht, die jedes Mal neu gewonnen werden müssen. Weiterhin ist sowohl die Präparation der Zellkultur als auch die manuelle Auswertung mit dem Mikroskop sehr zeitintensiv. Es können maximal 10–15 Proben pro Tag von einem Laboranten untersucht werden. Daher ist diese Methode nicht als Routinelaboruntersuchung geeignet (BORNHOLZ et al., 2014; JOSHI-BARR et al., 2016).

Um einen Bioassay zu erhalten mit dem mehr Proben in kürzerer Zeit untersucht werden können, wurde der KKA zu einem High-Throughput-Bioassay weiterentwickelt. Dieser Assay verwendet, statt Herzzellen von Ratten, humane Kardiomyozyten. Die Änderung der Schlagfrequenz muss nicht manuell mit dem Mikroskop wie bei dem KKA bestimmt werden, sondern wird automatisch durch den „high throughput imager“ gemessen. Dadurch kann eine sehr viel höhere Probendurchsatzleistung erzielt werden. Der High-Throughput-Bioassay wurde mit dem klassischen KKA verglichen und zeigte größtenteils übereinstimmende Ergebnisse (JOSHI-BARR et al., 2016). Die Nachteile dieses Bioassays sind jedoch, dass er

ebenfalls auf primären Zellkulturen basiert, die jedes Mal neu hergestellt werden müssen, wenn der Assay durchgeführt wird. Daher eignet er sich auch nicht als Test im Routinelabor (BORNHOLZ et al., 2014).

2.4.2. Fluorescence-activated-cell-sorting-Assay

Der Fluorescence-activated-cell-sorting-Assay wurde von BORNHOLZ und Kollegen (2016) beschrieben. Dieser Bioassay basiert auf der durchflusszytometrischen Quantifizierung von verschiedenen Gammaglobulinen, die an lebende Zellen binden, in denen der β 1-Adrenozeptor exprimiert ist. Die Rezeptorspezifische Immunglobulin-Bindung wird durch Fluoreszenzmessung bestimmt. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den anderen Bioassays (BORNHOLZ et al., 2016). Wie die anderen Bioassays, die auf lebenden Zellen basieren, ist auch dieser Assay für die Routinelabordiagnostik ungeeignet (BORNHOLZ et al., 2014).

2.4.3. Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay

In verschiedenen Studien wurde ein peptidbasierter Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zur Autoantikörper-Detektion verwendet (MATSUI et al., 1995; JAHNS et al., 1999; JAHNS et al., 2004a; PEI et al., 2012). Die Validität dieser

Messmethode wird jedoch stark in Frage gestellt (JAHNS & BOEGE, 2015). Es zeigte sich, dass die Sensitivität dieses Testes deutlich geringer ist im Vergleich zu Verfahren, die native β 1-Adrenozeptoren verwenden (JAHNS et al., 2004a; BORNHOLZ et al., 2013). Weiterhin kann mit diesem Test nicht zwischen funktional aktiven Autoantikörpern und solchen, welche die Rezeptorsignalkaskade nicht auslösen können, unterschieden werden. Diese Unterscheidung ist jedoch wichtig, da nur die funktional aktiven β 1-AAK eine klinische Relevanz besitzen (JAHNS et al., 1999; JAHNS et al., 2000; NIKOLAEV et al., 2007; HERDA et al., 2012).

HOLTHOFF und Kollegen (2012) berichteten von der Entwicklung eines neuen zellbasierten, kompetitiven ELISA zum Nachweis von funktional aktiven humanen β 1-AAK. Der Assay verwendet das native β 1-Adrenozeptor Protein als Zielantigen. Ein kompetitiver Ansatz wurde gewählt, um die Spezifität zu erhöhen. Hierfür wurden verschiedene monoklonale Maus-Antikörper gegen die zweite extrazelluläre Schleife des β 1-Adrenozeptors entwickelt und auf ihre Spezifität und Affinität gegenüber dem β 1-Adrenozeptor getestet. Der monoklonale Antikörper 23-6-7 zeigte die erfolversprechendsten Ergebnisse. Dieser Antikörper bindet

spezifisch an die zweite extrazelluläre Schleife des humanen $\beta 1$ -Adrenozeptors und ist in der Lage die Rezeptoraktivität zu stimulieren. Die funktional relevanten humanen $\beta 1$ -AAK aus Patientenseren binden an das gleiche oder an überlappende Epitope und reduzieren dadurch das ELISA-Signal. Die Ergebnisse dieser Studie wurden mit einem peptidbasierten ELISA verglichen. Die Autoren berichten von einem deutlich geringeren Anteil an falsch positiven Ergebnissen. Weiterhin soll dieser Test einfach und reproduzierbar in allen Laboren etabliert werden können (HOLTHOFF et al., 2012). Die Limitationen dieses Testes sind die verwendete Zellfixierung und der monoklonale kompetitive Antikörper. Beide reduzieren die verfügbaren Konformationsepitope. Daher ist die Sensitivität dieses Testes fragwürdig und sollte überprüft werden (BORNHOLZ et al., 2014).

2.4.4. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Mit der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode kann der intrazelluläre cAMP-Spiegel gemessen werden (NIKOLAEV et al., 2007). Da die funktionalen $\beta 1$ -AAK den $\beta 1$ -Adrenozeptor aktivieren und somit eine intrazelluläre Signalkaskade inklusive cAMP-Produktion auslösen (JAHNS et al., 2006a), kann mit dieser zellbasierten Methode die

Anwesenheit von funktional aktiven $\beta 1$ -AAK bestimmt werden. Für dieses Verfahren wurden embryonale, menschliche Nierenzellen, die den humanen $\beta 1$ -Adrenozeptor dauerhaft exprimieren, mit einem fluoreszierenden cAMP-Sensor vorübergehend transfiziert. Die cAMP-Messungen wurden 24–48 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe eines Mikroskops durchgeführt (NIKOLAEV et al., 2007). Mit dieser Methode konnten sowohl $\beta 1$ -AAK gegen die zweite als auch gegen die erste extrazelluläre Schleife ermittelt werden. Letztere konnten durch die von den Autoren zuvor durchgeführten Methoden (peptidbasierter ELISA, Immunfluoreszenz, cAMP-Radioimmunoassay) nicht entdeckt werden. Die Vorteile dieses Testverfahrens sind die einfache und schnelle Durchführung sowie die sensitivere Bestimmung von funktional aktiven Antikörpern. Die Ergebnisse dieser Studie müssen jedoch noch in einer größeren Patientenpopulation bestätigt werden (NIKOLAEV et al., 2007).

Allgemein bleibt das bisher ungelöste Problem der Standardisierung und Validierung der Testverfahren. Der $\beta 1$ -Adrenozeptor bietet sehr viele verschiedene Epitope als Ziel. Daher ist es fast unmöglich Standards und Kalibratoren zu entwickeln, die für die gesamten $\beta 1$ -AAK Varianten

repräsentativ sind. Folglich kann die Richtigkeit all dieser Ansätze nur durch die klinische Korrelation der Testergebnisse in kontrollierten Studien beurteilt werden. Dies stellt ein Problem für die Zertifizierung und Akkreditierung der diagnostischen Möglichkeiten für die routinemäßige Einführung dar (BORNHOLZ et al., 2014).

2.5. **Therapeutische Möglichkeiten**

Da zunehmend Beweise für die Pathogenität der funktionalen β 1-AAK vorliegen (BORNHOLZ et al., 2014), besteht der Bedarf für gezielte therapeutische Maßnahmen gegen die Autoantikörper. Im Folgenden werden die verschiedenen Therapieansätze genauer beschrieben.

2.5.1. **Betablocker**

Schon bevor β 1-AAK bei Patienten mit DCM entdeckt wurden, zeigten kleinere Studien einen positiven Effekt von Betablockern zur Behandlung von Patienten im kongestiven Herzversagen aufgrund einer DCM (WAAGSTEIN et al., 1975; SWEDBERG et al., 1979, 1980). Dies wurde 1993 von einer größeren, placebokontrollierten Multicenterstudie bestätigt (WAAGSTEIN et al., 1993).

JAHNS und Kollegen (1999) zeigten später, dass der

stimulierende Effekt der β_1 -AAK *in vitro* durch Betablocker gestoppt werden kann. Dies wurde als Erklärung für den zuvor beobachteten positiven Einfluss der Betablocker bei der DCM vorgeschlagen. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit dem selektiven Betablocker Bisoprolol, bei Kaninchen mit autoimmun bedingter Myokardschädigung, eine deutlich positive Wirkung erreicht werden konnte (MATSUI et al., 2000). Betablocker spielen somit bei der Behandlung der DCM eine wichtige Rolle, können jedoch bei den Patienten nicht so hoch dosiert werden, dass alle β_1 -Adrenozeptoren blockiert werden. NIKOLAEV und Kollegen (2007) zeigte, dass dies nur in Kombination mit synthetischen Peptiden gegen die zweite extrazelluläre Schleife der β_1 -Adrenozeptoren gelingt. Betablocker sind somit als eine gute unterstützende Therapie bei symptomatischen Patienten mit DCM anzusehen, sind jedoch nicht ausreichend, um die durch Autoantikörper ausgelöste Rezeptoraktivierung komplett zu verhindern. Es werden daher noch weitere therapeutische Maßnahmen benötigt.

2.5.2. Immunadsorption

Immunadsorption ist ein Verfahren zur spezifischen oder unspezifischen Autoantikörper Entfernung aus dem Blut von

Patienten. Der Blutkreislauf des Patienten wird dabei an eine extrakorporale Maschine angeschlossen. In dieser Maschine werden die Blutzellen und das Plasma getrennt. Das Antikörper-enthaltende Plasma wird dann durch eine Säule geleitet, welche Liganden enthält, die sämtliche Immunglobuline und Autoantikörper binden. Danach wird das Antikörper freie Plasma wieder mit den Blutzellen zusammengeführt und zurück in den Patienten geleitet (BECKER et al., 2017a).

1996 wurde in einer ersten Studie die Immunadsorption bei Menschen mit DCM getestet. Hier konnte gezeigt werden, dass durch dieses Verfahren die β 1-AAK-Spiegel deutlich sinken und in Folge eine Verbesserung der Herzfunktion, der Leistungsfähigkeit und des Befindens der Patienten eintritt (WALLUKAT et al., 1996a). Dies konnte durch mehrere Studien bestätigt werden, die sowohl einen positiven Kurzzeiteffekt (DORFFEL et al., 1997; FELIX et al., 2000; BABA et al., 2010b; HERDA et al., 2010) als auch Langzeiteffekt (MULLER et al., 2000; DORFFEL et al., 2004; KNEBEL et al., 2004; TRIMPERT et al., 2010) bewiesen. Bei Patienten, die auf der Warteliste für eine Herztransplantation standen, konnte durch die Immunadsorption auf diese komplett verzichtet oder sie zumindest über mehrere Jahre nach hinten

verschoben werden. Ebenfalls konnte in der selben retrospektiven Studie belegt werden, dass nur die Patienten, bei denen β 1-AAK vorhanden sind, von einer Immunadsorption profitieren (DANDEL et al., 2012a). Eine weitere Studie zeigte, dass die β 1-AAK 12 Monate nach der Immunadsorption erneut auftreten. Der positive therapeutische Effekt blieb aber länger bestehen (TRIMPERT et al., 2010).

Die initiale Behandlung der Immunadsorption ist sehr kostenintensiv. Rechnet man die Kosten jedoch auf die Jahre um und zieht die längere Überlebenszeit in Betracht, hat diese Therapiemethode durchaus angemessene Kosten pro gewonnenem Lebensjahr (HESSEL et al., 2004). Nichtsdestotrotz ist die Immunadsorption sehr zeitaufwändig und kann aufgrund der benötigten Geräte nur in speziellen Zentren durchgeführt werden (WALLUKAT et al., 2016b). Daher wird nach weiteren, einfacheren Therapieoptionen geforscht.

2.5.3. Peptide

Die Idee zur Entwicklung der peptidbasierten Therapie war, dass wenn Peptide die Krankheit auslösen können, sie diese, wenn sie richtig eingesetzt werden, ebenfalls verhindern können (ANDERTON, 2001). Es wurden Peptide entwickelt, die den

zellulären β 1-Adrenozeptor nachahmen, um mit diesem um die β 1-AAK zu konkurrieren. Auf diese Weise sollten die Peptide den pathogenen Effekt der β 1-AAK reduzieren oder am besten aufheben (BECKER et al., 2017a). In einer Studie wurden Ratten entweder mit zyklischen Peptiden oder mit dem Betablocker Bisoprolol oder einer Kombination aus beidem behandelt. Die Ratten waren zuvor mit dem β 1-Adrenozeptor immunisiert worden, um ein Herzversagen auszulösen. Durch die Therapie mit den Peptiden, welche die zweite extrazelluläre Schleife des β 1-Adrenozeptors nachahmten, konnte eine durch Autoantikörper ausgelöste kardiale Schädigung verhindert werden. Während eine Bisoprolol Monotherapie nur das Voranschreiten der Krankheit aufhielt, konnte durch die Therapie mit Peptiden, allein oder in Kombination mit Bisoprolol, der kardiale Schaden fast komplett rückgängig gemacht werden (BOIVIN et al., 2015). In einer Phase 1 Studie wurde die Sicherheit und Wirksamkeit des Medikamentes beim Menschen nachgewiesen (MUNCH et al., 2012). In einer weiteren Studie wurden jedoch Nebenwirkungen, wie eine verstärkte Immunogenität, durch die Peptide belegt. Daher wurden keine weitere Schritte unternommen, um das Medikament für den Menschen zuzulassen (BECKER et al., 2017a).

2.5.4. Aptamere

Ein sehr vielversprechender Therapieansatz ist die *in vivo* Neutralisation der Autoantikörper durch Aptamere (HABERLAND et al., 2011c). Diese Moleküle sind kurze, einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide, die mit einer hohen Affinität und Spezifität an ihr Ziel binden (WANG et al., 2011).

Das erste und bisher einzige Aptamer, das von der *Food and Drug Administration* zugelassen wurde, ist das Pegaptanib Natrium (Handelsname: Macugen; Eyetech Pharmaceuticals/Pfizer). Es wurde 2004 als Medikament anerkannt und wird zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt (NG et al., 2006). Seither erhielt noch kein weiteres Aptamer die Zulassung. Es werden jedoch einige bereits in klinischen Studien in fortgeschrittenen Stadien getestet (FAMULOK & MAYER, 2014).

Aptamere können einfach chemisch hergestellt werden. Ihre Sequenzinformation kann digital geteilt werden und somit als Vorlage für die Herstellung dienen (FAMULOK & MAYER, 2014). Durch die einfache Skalierbarkeit, entstehen vergleichsweise geringe Produktionskosten (KEEFE & SCHAUB, 2008). Außerdem zeichnet sie eine hohe In-vivo-

Stabilität aus (KEEFE et al., 2010). Ihre Hitzebeständigkeit ist ein Vorteil bei der Herstellung, Verarbeitung, Transport und Lagerung. Zudem besteht dadurch die Möglichkeit sie zu sterilisieren (HABERLAND et al., 2011c). Der größte Vorteil ist die geringe Toxizität und fehlende Immunogenität (MARQUIS & GRINDEL, 2000). Dadurch zeigt dieser Therapieansatz eine deutlich bessere Eignung im Vergleich zu peptidbasierten Therapiemethoden (HABERLAND et al., 2011c). Weiterhin wurde in einer neueren Studie die Hypothese aufgestellt, dass Aptamere den gleichen therapeutischen Nutzen wie eine Immunadsorption bringen können (WALLUKAT et al., 2016b). Durch die geringeren Kosten und einfachere Handhabung, könnten sie somit ein potenzielles Medikament für die allgemein zugängliche Medizin sein.

HABERLAND und Kollegen (2011a) stellten ein Aptamer vor – das Aptamer 110 – das spezifisch an die zweite extrazelluläre Schleife des β_1 -Adrenozeptor bindet. Das Neutralisationspotential wurde *in vitro* mit Hilfe von β_1 -AAK geprüft, die von Patienten mit DCM, Chagas-Krankheit oder Peripartum-Kardiomyopathie isoliert wurden. Als Untersuchungsmethode wurde der Kardiomyozyten-Kontraktions-Assay verwendet. Die Zugabe von Aptamer 110 verringerte die durch die β_1 -AAK

induzierte erhöhte Schlagfrequenz und Zelltoxizität in einer dosisabhängigen Weise. In Anwesenheit der durch Aptamer neutralisierten β 1-AAK, blieben die Zellen vollständig responsiv zu den Agonisten und Antagonisten, wie Isoprenalin und Bisoprolol (HABERLAND et al., 2011a). Durch die selbe Arbeitsgruppe wurde später bewiesen, dass das Aptamer 110 die Fähigkeit hat, die β 1-AAK auch *in vivo* bei Ratten mit erhöhtem Blutdruck zu neutralisieren (HABERLAND et al., 2014).

Das Aptamer, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde, ist 2016 von WALLUKAT und Kollegen (2016b) beschrieben worden. Es handelt sich um das Aptamer BC 007, ein einzelsträngiges 15-mer DNA-Oligonukleotid (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'), auch unter dem Namen ARC183 bekannt (HABERLAND et al., 2016).

Ursprünglich wurde Aptamer BC 007 als Thrombin Inhibitor entwickelt (PABORSKY et al., 1993). Es war das erste Thrombin inhibitorische Aptamer das eine klinische Phase 1 Studie durchlief. Da jedoch sehr hohe Dosierungen für diesen Zweck benötigt wurden und sich somit ein ungünstiges Kosten-Nutzen-Verhältnis herausstellte, wurde die Entwicklung für diesen Bereich eingestellt (KEEFE et al., 2010).

Später stellte sich heraus, dass Aptamer BC 007 ein

Breitspektrum-Neutralisator ist, das sämtliche bekannten kardiovaskulär-pathogenen Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren *in vitro* neutralisieren kann (HABERLAND et al., 2016).

In der Studie von WALLUKAT und Kollegen (2016b) wurde gezeigt, dass dieses Aptamer ebenfalls die Autoantikörper *in vivo* bei Ratten mit erhöhtem Blutdruck neutralisieren kann. Dieselbe Autoantikörperneutralisation konnte in den Seren von Patienten mit DCM erreicht werden, indem die Patienten entweder mit einer Immunadsorption therapiert oder das Serum *ex vivo* mit Aptamer behandelt wurde (WALLUKAT et al., 2016b). Mit diesem Aptamer wurde somit eine neue, einfach applizierbare Therapiemöglichkeit entwickelt, die sämtliche getesteten Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit einer hohen Affinität und Spezifität neutralisiert. Aptamer BC 007 stellt daher ein geeignetes Molekül dar, um die Bedeutung der Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weiter zu erforschen (HABERLAND et al., 2016). Kürzlich wurde in einer klinischen Phase 1 Studie gezeigt, dass Aptamer BC 007 auch bei gesunden Menschen *in vivo* Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgreich neutralisieren kann (MUELLER et al., 2019).

Bislang fehlen jedoch immer noch Studien, die den klinischen Nutzen der Autoantikörperneutralisation durch Aptamer BC 007 bei Patienten mit DCM zeigen.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher in einem Großtiermodell, anhand von Dobermännern mit Autoantikörper-assoziiertes dilatativer Kardiomyopathie, die Effektivität von Aptamer BC 007 in der Neutralisation von β 1-AAK *in vivo* zu überprüfen. Weiterhin sollte die Sicherheit und Wirksamkeit, im Sinne von einer Funktionsverbesserung des Herzens und einer verlängerten Überlebenszeit, der Behandlung mit Aptamer BC 007 evaluiert werden.

III. PUBLIKATION

The aptamer BC 007 for treatment of dilated cardiomyopathy: Evaluation in Doberman Pinschers of efficacy and outcomes

Sabine Werner^a, Gerd Wallukat^b, Niels-Peter Becker^b, Katrin Wenzel^b, Johannes Müller^b, Ingolf Schimke^b, Gerhard Wess^a

^a Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

^b Berlin Cures GmbH, Berlin, Germany

Correspondence to:

Ingolf Schimke, Berlin Cures GmbH, Knesebeck Straße 59-61,
10719 Berlin, Germany, Tel: +49 30 8891364050, email:
schimke@berlincues.de

Gerhard Wess, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-
Maximilians-University, Veterinärstraße 13, 80539 München,
Germany; Tel: +49 89 21802650, email:
g.wess@medizinische-kleintierklinik.de

Abstract

Aims

Aptamer BC 007, a 15mer single-strand DNA oligonucleotide (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'), was developed to neutralize functional autoantibodies which bind to the extracellular domains of G-protein coupled receptors (GPCR-AAB) leading to the modulation of receptor-mediated signaling cascades that induce pathophysiological states.

Among the GPCR-AAB, there are those directed against the β 1-adrenergic receptor (β 1-AAB) that are highly present in patients with dilated cardiomyopathy (DCM) and are increasingly accepted as disease drivers.

Using Doberman Pinschers (DP) with DCM, which possess similarities with human DCM among these β 1-AAB positivity for that the disease-driving role in DP DCM was demonstrated, the safety of BC 007, efficacy for neutralizing β 1-AAB, and the DP's outcome were investigated.

Methods

Fourteen client-owned β 1-AAB positive DP with electro- and echocardiographically-indicated DCM were treated with BC 007. For controlling, two groups were created: 14 β 1-AAB-positive DP with DCM not treated with BC 007 (control 1) and 14 DP with DCM closely matched to the BC 007-treated DP (control 2), retrospectively selected from the institutional database of DP. After treatment, DP were monitored both echocardiographically and for β 1-AAB, and survival curves were calculated.

Results

Based on clinical and laboratory examination, no adverse effects associated with BC 007 treatment were observed during the study.

Forty-eight hours after treatment, the DP's blood was free of β 1-AAB, which led to a reduction or stabilization of left ventricular end-systolic volume (EVSI) during β 1-AAB free time in 10 of

the treated DP. In one DP, where $\beta 1$ -AAB returned after 3 months and ESVI worsened again, a second BC 007 treatment after 9 months again cleared the blood from $\beta 1$ -AAB and improved the ESVI.

Compared to the controls, DP treated with BC 007 showed a significantly longer survival time (572 days, IQR 442–840 days) vs. control group 1 (266 days, IQR 97–438 days; log rank: $p = 0.009$) and control group 2 (229 days, IQR 174–319 days; log rank: $p = 0.012$).

Conclusion

Treatment with BC 007 for $\beta 1$ -AAB neutralization was safe, resulted in a long-lasting reduction of $\beta 1$ -AAB combined with improved cardiac function and prolonged the survival of DP with DCM. Using a natural large animal model of DCM considered superior to small animal models of immunization-induced cardiomyopathy, combined with a study design comparable to clinical trials, we believe that our results provide

the basis for optimism that treatment with BC 007 might also be effective in human patients with DCM.

Keywords

Anti-beta1-adrenergic receptor antibodies, BC 007, cardiomyopathy, Doberman Pinscher, heard failure, treatment

Introduction

The aptamer BC 007 is a 15mer single-strand DNA oligonucleotide (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') which has recently been patented for its potency to neutralize autoantibodies directed against G-protein coupled receptors, a new class of autoantibodies discovered in the second half of the 1970s (STERIN-BORDA et al., 1976; SMITH et al., 1977; BORDA et al., 1984). In contrast to “classic” autoantibodies, inflammatory or destruction injury is not invariably the consequence of the attack of autoantibodies on cells, tissues or organs. This new type of autoantibody specifically binds to the extracellular domains of G-protein coupled receptors (GPCR). After binding to GPCR, the related autoantibodies (GPCR-AAB) exert predominantly but not exclusive agonistic effects (LIMAS et al., 1990a; WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1991; XIA et al., 2003; JAHNS et al., 2006b), leading to the modulation of receptor-mediated signal cascades with an impact

on physiological functions; these are therefore called “functional autoantibodies”. Finally, GPCR-AAB induce disturbed metabolic balance and pathological conditions that are crucial in GPCR-AAB-associated autoimmunity. The related diseases could be summarized as “functional autoantibody disease”, whereby cardiovascular diseases and diseases associated with vascular pathologies are clearly predominant in the presence of GPCR-AAB (BECKER et al., 2017b).

Among the GPCR-AAB-positive diseases, human dilated cardiomyopathy (DCM) belongs to those with the highest prevalence of GPCR-AAB.

Originally, on the basis of the Olmstead country study, a DCM prevalence of nearly 1/2500 was reported in general reference books. However, recent re-calculation of the Olmstead data revised the prevalence of DCM to almost 10-fold higher: 1/250 (HERSHBERGER et al., 2013). DCM patients present highly prevalent (up to 80%) autoantibodies against the β 1-adrenergic

receptor (β 1-AAB). Sometimes, β 1-AAB are combined with autoantibodies against the muscarinic M2 receptor (prevalence: up to 40%), both regarded as disease drivers (WALLUKAT & SCHIMKE, 2014). Not least for this reason, DCM pioneered the establishment and further development of the concept of "functional autoantibody disease", which, at the end of the last millennium, led to the testing of a treatment concept in which the blood of patients with DCM was cleared by extracorporeal immunoadsorption of GPCR-AAB and in particular β 1-AAB. In the majority of these studies, clear short- and long-term benefits were demonstrated through improved cardiac function and, above all, longer survival (BECKER et al., 2019a). However, cost factors, logistic problems and the burden of immunoadsorption on patients should not be underestimated and alternative treatment strategies were sought, such as the *in vivo* neutralization of GPCR-AAB. To achieve such a treatment concept, BC 007, an aptamer that successfully neutralizes

several cardiovascular-pathogenic GPCR-AAB *in vitro*, including β 1-AR-AAB, has been introduced (HABERLAND et al., 2016) and successfully tested for the *in vivo* neutralization of β 1-AAB in spontaneously hypertensive rats (WALLUKAT et al., 2016a) and recently also in human (MÜLLER et al., 2019). However, studies to demonstrate the benefit of β 1-AAB neutralization by BC 007 in DCM are still lacking. To overcome this, we aimed to use the current animal study to test the efficacy of BC 007 to neutralize β 1-AAB *in vivo*, as well as testing its safety and the resulting outcome of the treated animals. For this study, we used client-owned Doberman Pinschers (DP) with DCM (prevalence: 58.2% in a European DP population (WESS et al., 2010a)). DP with DCM show a lot of similarities to human DCM (SMUCKER et al., 1990a; PETRIC et al., 2002b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004a; HAMLIN, 2007b; HENSLEY et al., 2017b) and, most importantly, as for human DCM, DP DCM is closely associated with β 1-AAB (prevalence:

67.8%), with an indication for the disease-driving role of β 1-AAB (WESS et al., 2019). In the present study, we show that i.v. treatment with BC 007 induced no adverse effects, effectively reduced β 1-AAB in DP with DCM and resulted in improved long-term outcome of the dogs.

Methods

Study design

The study was conducted in accordance with the German animal welfare law. The study protocol was approved by “Regierung von Oberbayern – Sachgebiet 54, Verbraucherschutz und Veterinärwesen (approval number 55.2-1-54-2532-35-2016)”. This study was a prospective, clinical, controlled exposure study.

Animals

Client-owned purebred DP attending the Cardiology Department of “Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München” for routine check-up, cardiomyopathy diagnostics or cardiomyopathy follow-up were analyzed for DCM between October 2013 and January 2017 and consecutively enrolled in the study after signed consent was obtained from the owners.

Based on the guidelines of the European Society of Veterinary Cardiology (WESS et al., 2017b), DCM was diagnosed by echocardiograph indicative for cardiac dysfunction: left ventricular end-systolic (ESVI) ($>55 \text{ ml/m}^2$) and end-diastolic volume (EDVI) ($>95 \text{ ml}^2$) indexed to body surface area based on Simpson’s method. After the owner gave consent, blood was sampled for the measurement of β_1 -AAB.

Measurement of β 1-AAB

D) For the measurement of β 1-AAB, 2 milliliters of venous blood was taken. The serum was immediately centrifuged and frozen at -80°C until analysis. To measure β -AABs, a bioassay established by Wallukat and Wollenberger was used (WALLUKAT & WOLLENBERGER, 1987a), which was modified and standardized as described in (WALLUKAT et al., 2010b). In this bioassay, the chronotropic response of spontaneously beating cultured neonatal rat cardiomyocytes to the IgG prepared from the dogs' serum was recorded. For this purpose, six fields with synchronic and rhythmic beating cardiomyocytes were marked on the culture flask. The basal beating rate of the six fields was counted for 15 seconds and averaged. After addition of the IgG preparation to the culture flasks and incubation for 40 to 60 min at 37°C , the beating rate in the six fields were counted again for 15 s and average. (1 unit of β 1-AAB activity = 1 beat/min frequency increase; lower limit

of detection (LLD) = 4.0 U; cut off β 1-AAB positivity \geq 8.0 U).

Through the use of bisoprolol for specific blocking the β 1-adrenergic receptor, the cells' chronotropic response can be attributed to β 1-AAB.

II) For comprehensive information about the IgG preparation, bioassay test setup and procedure for the measurement of β 1-AAB, see (BORNHOLZ et al., 2017; WALLUKAT et al., 2018).

III)

Study groups

Three study groups (the BC 007 group, control group 1 and control group 2) were created. Each group consisted of 14 dogs. The BC 007 group and the control group 1 were prospectively generated. β 1-AAB were measured in every dog of the BC 007 group and control group 1 before study inclusion. Dogs were included in the BC 007 group if they were β 1-AAB-positive (\geq 8.0 U) and presented DCM related to the inclusion criteria. If a

dog was β 1-AAB-positive and fulfilled the inclusion criteria for DCM but the owner declined the treatment with BC 007 or could not commit to bringing the dog to all follow-up appointments, it was assigned to control group 1. Control group 2 was retrospectively generated. For the selection of related dogs, the database of all DP participating in the continuing prospective longitudinal study from March 2005 to January 2017 was sorted for EDVI and, ESVI. Dogs that were the closest in the database to the dogs in the BC 007 group were selected for control group 2.

Exclusion criteria

DP diagnosed with significant systemic diseases or congenital or acquired heart diseases other than DCM were excluded from the study. Dogs that had atrial fibrillation and/or signs of congestive heart failure (CHF) were excluded.

Examinations

Detailed clinical history was gathered, including information about sex, age, body weight, medication and known systemic diseases. A complete general clinical examination, echocardiography and Holter-ECG were performed on all dogs. In the BC 007 group, complete blood count analyses and chemistry screens as well as blood pressure measurements were undertaken to monitor adverse events. On the day of the infusion of BC 007, blood coagulation was monitored. In case of clinical signs of CHF, X-ray examinations were undertaken on dogs. Table 1 shows an overview and timeline of the performed examinations.

Table 1. Study design

	Screening/ Baseline Day -28 to Day 0	Infusion Day 0	Day 1	Day 10	Day 30	3 months	6 months	9 months
Clinical history	X	A	A	A	A	X	X	X
Clinical examination	X	A	A	A	A	X	X	X
Intensive adverse event assessment		A	A					
Blood coagulation	A	A						
Blood count	A	A	A	A	A	A	A	A
Serum chemistry	A	A	A	A	A	A	A	A
Echocardiography	X	A	A	A	A	X	X	X
Holter monitoring	X	A	A	A	A	X	X	X
Blood pressure	A	A	A	A	A	A	A	A

X: all dogs; A: dogs treated with BC 007

Echocardiography

A complete echocardiogram with simultaneous ECG was performed and assessed by cardiology residents or diplomats in right and left lateral recumbency on unsedated dogs using a 2.0–3.5 MHz (Vivid 7 dimensions; General Electric Medical Systems, Waukesha, WI) or a 1–5 MHz (EPIQ 7C; Philips

GmbH Market DACH, Germany) transducer according to official recommendations (THOMAS et al., 1993). The left ventricular end-diastolic volume and the left ventricular end-systolic volume were measured using Simpson`s method of disc. The left ventricular end-diastolic and end-systolic volume index were obtained by normalizing the values to the body surface area. The ratio of the left atrial dimension to the aortic annulus dimension (LA:Ao) was obtained from the right parasternal short-axis 2-dimensional view.

Holter ECG

Twenty-four-hour ambulatory Holter recordings were performed on all dogs. Two different commercially available Holter analysis software programs (Amedtech ECGpro Holter software, EP 810 digital Recorder; Medizintechnik Aue GmbH, Aue, Germany; Custo tera; Arcon Systems GmbH, Starnberg, Germany) were used. Manual verification of the arrhythmias

recognized by the software programs was performed. For statistical analysis, the total number of ventricular premature complexes (VPCs), the fastest rate (FR) of all VPCs and the number of ventricular tachycardia (VTach) events were used.

Administration of BC 007

BC 007 was administered via an intravenous infusion over 20 minutes. During the infusion, the dog was lying on a blanket on the floor in a position it preferred. Heart rate and rhythm were monitored continuously via ECG. In addition, all vital parameters were checked every 5 minutes.

To find the effective dose that can completely neutralize all β_1 -AABs, the dose was gradually reduced from 4 mg via 2 mg to 1 mg per kg body weight.

Concomitant treatment

All concomitant medications that DP received during the course of the study are recorded in Table 2. All DP were treated with pimobendan, except 1 dog in the BC 007 group (see below). DP that developed CHF during the course of the study also received furosemide. Depending on the malignancy criteria in the Holter-ECG, dogs received different antiarrhythmic drugs. The following concomitant drugs were prescribed: Sotalol hydrochloride, Amiodarone hydrochloride, Mexiletine hydrochloride, Flecainide acetate and Ramipril. The same criteria for the prescription of medication were applied to all DP.

Endpoint

The endpoint was defined as death from cardiac reasons. This included either sudden cardiac death or death because of CHF.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using PASW Statistics, Version 18.0; IBM Corporation, Armonk, NY. Undetectable β 1-AAB activities (below the lower limit of detection, LLD) were numerically expressed as values representing one-half of the LLD. Continuous variables are presented as mean \pm standard deviation unless specified otherwise. For categorical data, the frequency of occurrence was determined. Baseline characteristics of the 3 study groups were summarized and assessed for homogeneity between the BC 007 group and each of the control groups. Continuous baseline variables were compared by an unpaired Student's t-test. For categorical variables, a Pearson Chi-Square or Fisher's exact test was used. The proportion of DP experiencing the endpoint was compared between groups using a Chi-Square test. The median time to endpoint was estimated and survival curves were generated using the Kaplan-Meier method. A comparison of the median

time to endpoint was performed using a Log Rank test. DP that died of non-cardiac causes or were still alive on the last day of follow-up were censored. Additionally, an all-cause mortality analysis was performed using the Kaplan-Meier method to estimate overall survival. Survival time was compared by the Log Rank test. The univariate Cox Regression analysis was performed to identify variables that are independently associated with cardiac mortality. For the analysis, the following baseline variables were included: treatment with BC 007, age, sex, ESVI, LA:Ao, VPCs, FR of VPCs and VTach. All baseline variables that had a p-value of <0.1 in the univariate analysis were included in the multivariable Cox Regression analysis. The multivariable analysis was performed in a backward stepwise manner. The variable with the highest p-value was eliminated at each subsequent step until in the final model all variables had a p-value ≤ 0.05 .

For all analyses a p-value ≤ 0.05 was considered significant.

Results

Basic characteristics and β 1-AAB activity at enrolment

Enrolment in the study began in October 2013 and finished in January 2017. Follow-up was continued until the study was closed in January 2018. In total, 28 DP with DCM were enrolled for prospective examination, 14 in each of the 2 study groups (BC 007 group/control group 1). Table 1 shows the timeline of the examinations performed in both groups. Control group 2 was retrospectively designed. The baseline variables of the 3 groups are summarized in Table 2. The analyses for homogeneity of groups showed no significant difference between the BC 007 group and each of the control groups at baseline. With respect to β 1-AAB activity, the BC 007 group and control group 1 were not significantly different.

Table 2. Baseline characteristics of the Doberman Pinschers of the treatment and control groups at enrolment (mean \pm standard deviation or number and percentage)

Parameter	Aptamer BC 007	Control 1	Control 2	p-value C1	p-value C2
Basic parameters					
Gender (male/female)	8/6 (57%/43%)	7/7 (50%/50%)	9/5 (64%/36%)	0.705	0.699
Age (years)	7.2 \pm 2.1	6.9 \pm 2.3	7.3 \pm 2.7	0.765	0.913
Weight (kg)	36.7 \pm 6.5	37.2 \pm 5.8	37.3 \pm 5.0	0.824	0.784
β1-AAB (Δ beats/min)	21 \pm 3	20 \pm 6		0.400	
Cardiac treatment					
Pimobendan	13/14 (93%)	14/14 (100%)	14/14 (100%)	1.000	1.000
Ramipril	12/14 (86%)	12/14 (86%)	13/14 (93%)	1.000	1.000
Sotalol	5/14 (36%)	4/14 (28%)	5/14 (36%)	1.000	1.000
Mexiletine	1/14 (7%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1.000	1.000
Flecainide	5/14 (36%)	4/14 (28%)	2/14 (14%)	1.000	0.385
Amiodarone	2/14 (14%)	4/14 (28%)	4/14 (28%)	0.648	0.648
Furosemide	1/14 (7%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1.000	1.000
Dogs treated with anti-arrhythmics	7/14 (50%)	8/14 (57%)	9/14 (64%)	0.705	0.445
Time since start of Pimobendan (months)	4.6 \pm 4.9	3.3 \pm 1.6	4.8 \pm 2.0	0.352	0.854

Echocardiography					
EDVI (mL/m²)	117 ± 33	108 ± 17	120 ± 33	0.349	0.814
ESVI (mL/m²)	81 ± 31	69 ± 16	80 ± 28	0.218	0.883
LA:Ao	1.36 ± 0.28	1.38 ± 0.09	1.36 ± 0.21	0.845	0.952
24-Hour Holter ECG					
VPCs per 24 h	721 ± 1019	1821 ± 3159	503 ± 892	0.226	0.554
FR of VPCs (bpm)	259 ± 36	270 ± 49	248 ± 42	0.510	0.455
VTach per 24 h	0.14 ± 0.54	2.21 ± 6.66	0.14 ± 0.54	0.256	1.000
Number of dogs with VTach	1/14 (7%)	3/14 (21%)	1/14 (7%)	0.596	1.000

Δ PR/min = change in pulse rate per minute, EDVI = End-diastolic volume index, ESVI = End-systolic volume index, LA:Ao = left atrial dimension to the aortic annulus dimension, VPCs = Ventricular premature complexes, FR = the fastest rate of all VPCs, bpm = beats per minutes, VTach = number of ventricular tachycardia

Safety of BC 007

Based on clinical examination and the clinical chemistry, hematology and hemostaseology parameters, no adverse effects strongly associated with BC 007 treatment were observed in any of the treated dogs during the course of the study. In the BC 007 group (4 dogs), as well as in control groups 1 (2 dogs) and 2 (3

dogs), dogs died due to neoplasia in the follow-up period; this difference was not significantly different.

Efficacy of BC 007 for β 1-AAB neutralization

For dogs 1 to 9 of the BC 007 group, β 1-AAB were measured on every visit; the first measurement was 5 min after starting the treatment and the last was after 24 months in dog 3. For dogs 10 to 14 of the BC 007 group, β 1-AAB were measured at least until day 30.

For the 9 dogs being closely monitored for β 1-AAB for 48 hours after starting BC 007 treatment, Figure 1 shows that the β 1-AAB level was reduced below the LLD. This was despite the BC 007 dose being lowered from 4 mg/kg b.w. (dogs 1–6) to 2 mg/kg b.w. (dog 7) and to 1 mg/kg b.w. (dogs 8 and 9), which was consequently applied for DP 10 to 14. Among the treated DP, β 1-AAB return was observed at the earliest after 9 months. All

dogs were pre-treated with pimobendan at least 2 weeks before study inclusion.

Only 1 DP was already positive again for β 1-AAB at 3 months. This dog fulfilled the admission criteria with an $ESVI = 55.3 \text{ mL/m}^2$ immediately at the time of enrolment. However, its systolic dysfunction was only very mild and the authors decided to give BC 007 without starting pimobendan treatment beforehand. Consequently, this dog was the only one that did not receive pimobendan at the beginning of the study. Due to the early return of β 1-AAB, the dog was treated with BC 007 a second time after 9 months, which in turn led to a lowering of β 1-AAB below the LLD for the next 3 months.

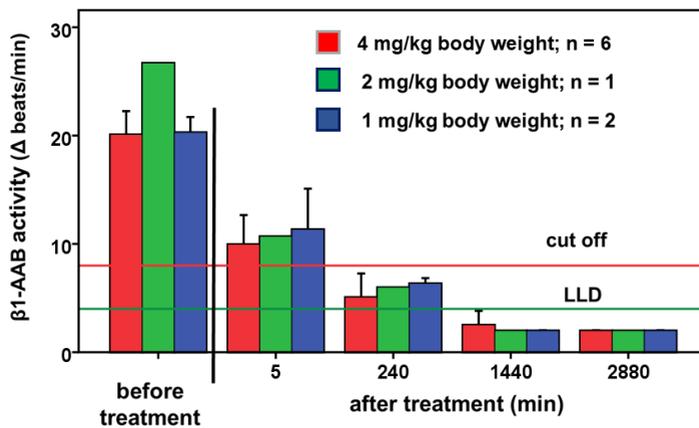


Figure 1 Time-dependent β1-AAB activity in the serum of dogs before and after treatment of BC 007

Follow up

Left ventricular end-diastolic volume/body surface area (EDVI) and left ventricular systolic volume/body surface area (ESVI)

After BC 007 administration and the disappearance of $\beta 1$ -AAB for at least 3 month, 10 dogs presented with decreased or stabilized left ventricular sizes compared with the sizes before BC 007 treatment. Figure 2A shows the results for a DP remaining free of $\beta 1$ -AAB following BC 007 treatment until the study end (12 months), with EDVI and ESVI decreasing continuously from 93.48 and 56.68 ml/m² to 57.78 and 34.67 ml/m², respectively. None of the dogs had relevant mitral valve insufficiency secondary due to volume overload. Figure 2B shows the dog that was treated twice. This DP presented with reduced EDVI (89.70 vs. 81.45 ml/m²) and ESVI (55.28 vs. 49.97 ml/m²) 1 month after the first BC 007 treatment; for ESVI, there was a further reduction to 49.07 ml/m² at the follow-up

examination after 3 months. However, thereafter, EDVI and ESVI started to increase until the second treatment at 9 months to EDVI of 97.97 ml/m² and ESVI of 62 ml/m². After the second BC 007 treatment, EDVI and EDVI decreased again to 73.71 ml/m² and ESVI to 40.79 ml/m² until 15 months after the first and 6 months after the second treatment, respectively. EDVI (88.10 ml/m²) and ESVI (59.00 ml/m²) re-increased thereafter, but neither exceeded the pre-study levels.

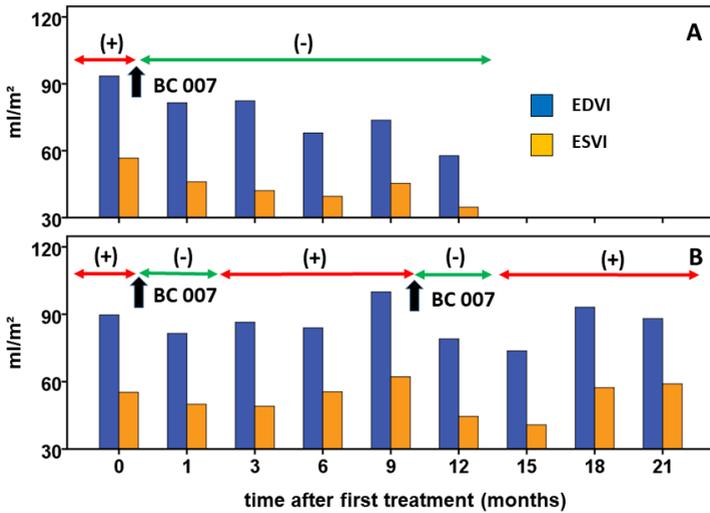


Figure 2 Left ventricular end-diastolic volume/body surface area (EDVI) and left ventricular systolic volume/body surface area (ESVI) after BC 007 treatment related to the β 1-AAB positivity (+) and β 1-AAB negativity (-) demonstrated exemplarily for 2 DP. (A) DP remaining free of β 1-AAB following BC 007 treatment. (B) DP BC 007 treated twice due to autoantibody recurrence after 3 month.

Survival

The median time in the study for all DP was 289 days. Twenty-nine of the 42 dogs reached the endpoint, giving an overall event rate of 69%. Fifty percent of the DP in the BC 007 group, 85.7% of those in control group 1, and 71.4% of those in control group 2 reached the endpoint. The proportion of DP that reached the endpoint was not significantly different between the BC 007 group and control group 1 ($p = 0.103$), or between the BC 007 group and control group 2 ($p = 0.246$). However, dogs in control group 1 experienced sudden cardiac death more often than dogs in the BC 007 group ($p = 0.008$). The outcome of the 42 dogs is summarized in Table 3.

Table 3. Outcome of all under study

Outcome	BC 007 (n = 14)	Control 1 (n = 14)	Control 2 (n = 14)
Sudden cardiac death	4 (29%)	11 (79%)	7 (50%)
Congestive Heart Failure	3 (21%)	1 (7%)	3 (21%)
Neoplasia	4 (29%)	2 (14%)	3 (21%)
Other non-cardiac deaths	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)
Still Alive	3 (21%)	0 (0%)	0 (0%)

No DP was lost to follow-up. The estimated median time to endpoint was significantly longer for DP that received BC 007 (572 days, IQR 442–840 days) than for DP in control group 1 (266 days, IQR 97–438 days; log rank: $p = 0.009$) and control group 2 (229 days, IQR 174–319 days; log rank: $p = 0.012$) (Figures 3 and 4). The median time to reach the endpoint for DP in the BC 007 group was approximately 10 months and 11

months longer, respectively, compared to the control groups.

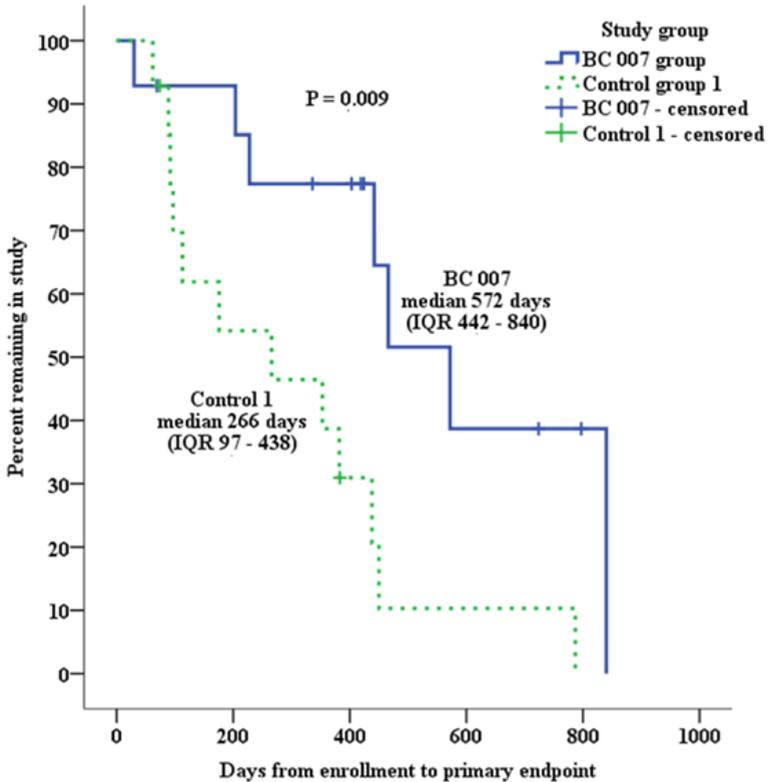


Figure 3. Kaplan-Meier survival curves plotting the estimated percentage of dogs in the BC 007 group and control group 1 that have not yet met the primary endpoint, against time. IQR = interquartile range

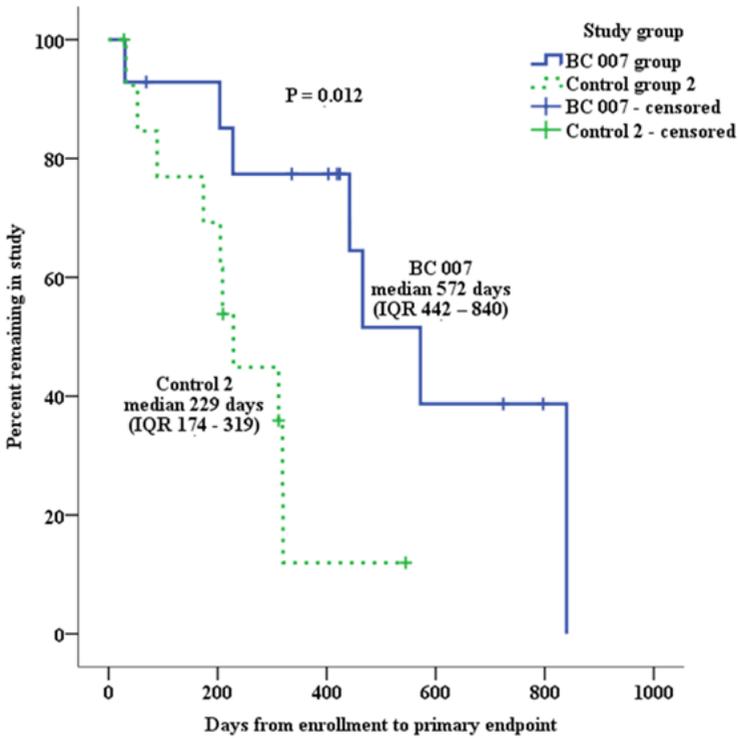


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves plotting the estimated percentage of dogs in the BC 007 group and control group 2 that have not yet met the primary endpoint, against time. IQR = interquartile range

When comparing the all-cause mortality, the estimated median survival time in the BC 007 group was 442 days (IQR 228–724

days) vs. 176 days (IQR 92–383) in control group 1 (log rank: $p = 0.031$) and 209 days (IQR 89–312) in control group 2 (log rank: $p = 0.002$). In the univariate Cox Regression analysis, when comparing the BC 007 group to control groups 1 and 2, the following variables demonstrated an association with the time to the primary endpoint at a p -value < 0.1 and were entered in the first run of the multivariate analysis: treatment with BC 007, ESVI, LA: Ao and VPCs (Table 4 and 5). The final model of the multivariate Cox Regression analysis only contained 2 variables in both comparisons. Treatment with BC 007 was the only variable showing a beneficial effect on mortality (Hazard Ratio (HR): 0.081 (95% CI: 0.016–0.406), $p = 0.002$ and HR: 0.107 (95% CI: 0.026–0.436), $p = 0.002$). In contrast, ESVI showed a slight adverse effect on mortality (HR: 1.041 (95% CI 1.014–1.069), $p = 0.002$ and HR: 1.035 (95% CI: 1.017–1.055), $p < 0.001$).

Table 4. Results of the univariate Cox Regression analysis comparing the Aptamer BC 007 group and the control group 1. Variables with a p-value < 0.1 that entered the multivariable analysis are displayed in bold.

Variable	Hazard Ratio (HR)	95% CI of the HR	p-value
Treatment with Aptamer BC 007	0.284	0.104 – 0.776	0.014
Age	1.118	0.886 – 1.409	0.347
Sex	1.271	0.490 – 3.300	0.622
ESVI	1.015	0.999 – 1.032	0.060
LA:Ao	18.110	0.939 – 349.139	0.055
VPCs	1.000	1.000 – 1.000	0.007
FR of VPCs	1.004	0.992 – 1.017	0.497
VTach	1.058	0.974 – 1.149	0.181

HR: hazard ratio, CI: confidence interval, ESVI = end-systolic volume index,

LA:Ao = left atrial dimension to the aortic annulus dimension, VPCs = ventricular premature complexes, FR = the fastest rate of all VPCs, VTach = number of ventricular tachycardia

Table 5. Results of the univariate Cox Regression analysis comparing the Aptamer BC 007 group and the control group 2. Variables with a p-value < 0.1 that entered the multivariable analysis are displayed in bold.

Variable	Hazard Ratio (HR)	95% CI of the HR	p-value
Treatment with Aptamer BC 007	0.257	0.084 – 0.789	0.018
Age	0.962	0.781 – 1.185	0.716
Sex	2.096	0.711 – 6.176	0.180
ESVI	1.008	1.008 – 1.040	0.003
LA:Ao	14.070	1.236 – 160.135	0.033
VPCs	1.001	1.000 – 1.001	0.002
FR of VPCs	1.000	0.986 – 1.014	0.991
VTach	1.054	0.379 – 2.928	0.920

HR: hazard ratio, CI: confidence interval, ESVI = end-systolic volume index,

LA:Ao = left atrial dimension to the aortic annulus dimension, VPCs = ventricular premature complexes, FR = the fastest rate of all VPCs, VTach = number of ventricular tachycardia

Discussion

Autoimmunity associated with GPCR-AAB, specifically with β 1-AAB, is increasingly accepted as a pathogenic driver of DCM in humans (BECKER et al., 2017b; BECKER et al., 2019a). As a result, the search for treatment strategies to counteract these autoantibodies has been initiated.

With the finding of aptamers which inhibit the activity of β 1-AAB, new promising drugs for the *in vivo* neutralization of β 1-AABs has been discovered (HABERLAND et al., 2011b). Compared with antibodies, aptamers present a couple advantages in both biological and chemical properties, as well as in production and delivery; among these, their low immunogenicity favors aptamers for human treatment (BRUNO, 2015).

BC 007 is an aptamer that highly effectively neutralized β 1-AAB isolated from patients with DCM *in vitro*, as well as several other GPCR-AAB found in patients with cardiovascular

disease and diseases associated with cardiovascular changes (WALLUKAT et al., 2016a). BC 007 was therefore proposed for the treatment of patients with DCM, as well as for those patients with DCM who carry further GPCR-AAB due to comorbidities. Compared to the already successfully tested extracorporeal immunoadsorption for the blood clearance of β 1-AAB, BC 007 treatment for the *in vivo* neutralization of β 1-AAB should be superior in terms of patient burden, logistics and costs. We present here for the first time an animal study showing that the neutralization of β 1-AABs after BC 007 treatment, in addition to the indication of its safety and efficacy for β 1-AAB neutralization, improved the outcomes in DCM.

Animal model and study design

Rodent models, mainly those with cardiomyopathy artificially induced by immunization, were used to demonstrate the role of β 1-AAB as cardiomyopathy driver and consequently as treatment target (MATSUI et al., 2003; JAHNS et al., 2004b). However, based on ELISA experiments (WENZEL et al., 2018), the functional autoantibodies found in the immunization models seem to differ from human autoantibodies in both quality and quantity. Furthermore, due to several disadvantages between small animal models such as mice and rats, as well as humans, e.g. in genetic regulation and cardiac performance listed in (RECCHIA & LIONETTI, 2007; MILANI-NEJAD et al., 2014), it was stated that:

“... for research aimed at clinical translation, it is imperative that initial results from small rodent studies be confirmed in a large animal model that more closely resembles humans ...”
(CAMACHO et al., 2016).

In accordance with this, we have selected DP as a model due to the high prevalence of DCM (WESS et al., 2010a), with many similarities compared to the related human disease (SMUCKER et al., 1990a; PETRIC et al., 2002b; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004a; HAMLIN, 2007b; HENSLEY et al., 2017b), including the indication for β 1-AAB as a DCM driver (WESS et al., 2019). With DP as the study model, and using the enrolment of client-owned purebred DP attending a veterinary-medical institution for routine check-up, disease diagnostics or follow-up, we were able to design our study in a manner similar to common clinical studies. In addition, the DP of our study came from different breeding populations throughout Europe and therefore have greater genetic diversity, which can better reflect the pathogenic situation in human DCM.

Safety of BC 007

BC 007 was safe during treatment and immediately thereafter (day 0 and 1), as well as in the follow-up. In this context, and in addition to relevant markers of clinical chemistry and hematology, we specifically monitored the influence of BC 007 on coagulation due to its potency for thrombin inhibition that was primarily suggested as indication for the treatment with this aptamer. However, an insufficient dose-response relationship counteracted further developments in this area as cited in (KEEFE & SCHAUB, 2008).

In the current study, blood clotting was closely observed on the day of BC 007 treatment, but clinically relevant prolongation of bleeding could be excluded. In our opinion, the much lower dose of BC 007 required for neutralization of β 1-AABs compared to the dose for anticoagulation, together with the very short half-life of BC 007 (KEEFE & SCHAUB, 2008; HABERLAND et al., 2014; MUELLER et al., 2018), prevented any clotting

problems that might counteract the administration of BC 007 for GPCR-AAB neutralization. This agreed with recently published data of the BC 007 clinical trial phase 1 (MUELLER et al., 2018).

Additionally, the treated dogs were monitored closely for other adverse events during the complete duration of the study. Although 4 dogs in the BC 007 group died in the follow-up due to neoplasia, this could not be attributed to any adverse effect of BC 007 because deaths due to neoplasia were in a comparable range in the untreated control groups (2 dogs in control group 1 and 3 dogs in control group 2). Furthermore, it is known that DP possess a higher risk of neoplasia in general (YAU et al., 2017). No other BC 007-related adverse events were observed, indicating that BC 007 administration is safe and tolerable. This confirmed data from a standard battery of pharmacological and toxicological safety studies that had already been performed in

rats and dogs and which allowed BC 007 to be clinically tested in humans.

Efficiency of BC 007 for β 1-AAB neutralization

To determine the effective dose of BC 007 for β 1-AAB neutralization, the administered dose of BC 007 was gradually reduced from 4 mg via 2 mg to 1 mg per kg b.w. Because the BC 007 dose of 1 mg/kg b.w. was effective for complete β 1-AAB neutralization, the majority of DP (7 dogs) were treated with this dose. We cannot completely rule out that the different doses of BC 007 will in principle have an influence on the outcome of the DP. Due to the short half-life of BC 007 and the fact that all DP were β 1-AAB negative after treatment, such an effect seems rather unlikely, which is why we are skeptical about any relationship between the administered dose of BC 007 (2 mg/kg body weight) and the very early return of β 1-AAB in DP 7. DP 7 was the only animal that did not receive pimobendan

before BC 007 treatment. Pimobendan is a calcium sensitizer and an inhibitor of phosphodiesterase 3 with positive inotropic and vasodilatory potency, which prolonged the time to the onset of clinical signs in DP with preclinical DCM (SUMMERFIELD et al., 2012). However, to what extent the early return of β 1-AAB in DP 7 can be explained by the fact that this dog did not receive pimobendan must remain speculative.

Follow-up

Left ventricular end-diastolic volume/body surface area (EDVI) and left ventricular systolic volume/body surface area (ESVI)

For DCM patients, the increased left ventricular ejection fraction (LVEF) calculated from the end-diastolic and systolic volume is a commonly used indicator for the benefit of β 1-AAB blood clearance by extracorporeal immunoadsorption whereby, with respect to the different study times, improved cardiac function

visible by decreased LVED was seen 3, 6 and 12 months, respectively, after the treatment, as summarized in (BECKER et al., 2019a).

As demonstrated for 10 of the 14 treated DP, we have now used the measurement of EDVI and EVSI to show that the benefit of β 1-AAB blood clearance by immunoabsorption demonstrated in patients with DCM could also be achieved by the *in vivo* neutralization of β 1-AAB by BC 007. In addition, as clearly shown in Figures 2A and B, the time interval with functional heart improvement was clearly associated with the β 1-AAB free time interval. This corroborated the data of β 1-AAB immunoabsorption studies, where the patient benefit (decreased NYHA class) disappeared after the return of β 1-AAB (WALLUKAT et al., 1996b) or only patients with complete β 1-AAB clearance profited from immunoabsorption (BABA et al., 2010a).

In accordance with the ESVC guidelines for the diagnosis of DCM in DP we have used the EDVI and ESVI to diagnose and monitor the disease progression and the effect of BC007, whereas in human patients the ejection fraction (LVEF) is usually used (WESS et al., 2017b). However, the LVEF is just calculated from EDVI and ESVI and looking directly at the remodeling in diastole and systole allowed us to evaluate the remodeling and systolic function directly and not just by the LVEF. Patients with DCM have often severe mitral regurgitation (MR) secondary to LV dilation, although in our study the cardiac dilation was not yet so severe and therefore none of the DP had relevant mitral insufficiency. In patients with secondary MR, ESV can be relatively low, despite of a low stroke volume (JAHNS et al.) and LVEF calculation from the EDV and ESV can reveal misleadingly higher values because in fact EF represents the fraction of blood which leaves the

ventricle during systole (i.e. SV + regurgitation volume into the left atrium) (HETZER & DANDEL, 2011).

Focusing on LV volume changes instead of EF measurements is therefore a strategy if a regurgitation volume cannot be reliably measured, and thus this strategy was chosen by the authors of the study before the start of the study.

Survival

The median time to the primary endpoint was significantly longer in the BC 007 group compared to the control groups, related to the univariate Cox Regression analysis, due to the BC 007 treatment. In the multivariate analysis, this effect is strengthened further with a lower hazard ratio and narrower confidence intervals.

Furthermore, it can be concluded from the multivariate analysis, that heart size is the main negative factor for survival time. This

finding is consistent with another study that determined the predictors of sudden cardiac death in DP (KLUSER et al., 2016). The median time to the primary endpoint was prolonged for approximately 10–11 months. This prolongation approximately equaled the β 1-AAB-free time until the recurrence of autoantibodies. This agrees with our recent study that β 1-AAB-positive DP with DCM have a significantly shorter survival time than comparable DP without β 1-AAB (WESS et al., 2019). Last but not least, the longer survival time due to neutralizing β 1-AAB by BC 007 in DP with DCM strongly corresponded to the survival effects published for people with DCM who were treated with immunoadsorption for β 1-AAB removal (DANDEL et al., 2012b).

Limitations

The most relevant limitation is the small sample size, which prevented the exact analysis of BC 007 on the

echocardiographic and electrocardiographic variables. In addition, due to the small number of dogs, the estimated interquartile ranges and confidence intervals are relatively wide. The results should therefore be interpreted with caution, before further studies have manifested the data.

Conclusion

Treatment with the aptamer BC 007 was safe in DP with dilated cardiomyopathy, showed a high efficiency in neutralizing β 1-AAB and provided benefits due to prolonged survival time. As we collected the data in a natural large animal model of DCM, which is considered superior to small animal models of immunization-induced cardiomyopathy, combined with the possibility of designing our DP study in a manner comparable to clinical studies, we believe that our results provide the basis for

optimism that treatment with BC 007 might also be effective in human patients with DCM.

Conflict of interest

The authors declare that the study was not funded by any public, commercial or private funds. Gerd Wallukat, Niels-Peter Becker, Katrin Wenzel, Johannes Müller and Ingolf Schimke as employees and shareholder (GW, JM, IS) of Berlin Cures GmbH declare that Berlin Cures GmbH only provided support in the form of salaries and research materials but did not have any additional role in the study design, data collection, analysis and statistical evaluation, decision to publish or preparation of the manuscript. Sabine Werner and Gerhard Wess declare that they have no conflict of interest.

References

1. Borda E, Pascual J, Cossio P, De La Vega M, Arana R, Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol*. 1984 Sep;**57**(3):679-686.
2. Smith BR, Pyle GA, Petersen VB, Hall R. Interaction of thyroid-stimulating antibodies with the human thyrotrophin receptor. *J Endocrinol*. 1977 Dec;**75**(3):401-407.
3. Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno MF, Gimeno AL, Diez C, Laguens RP, Meckert PC, Arana RM. Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects. *Cardiovasc Res*. 1976 Nov;**10**(6):613-622.
4. Jahns R, Boivin V, Lohse MJ. Beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats. *Int J Cardiol*. 2006 Sep 10;**112**(1):7-14.
5. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Influence of anti-beta-receptor antibodies on cardiac adenylate cyclase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*. 1990 Jun;**119**(6):1322-1328.
6. Wallukat G, Wollenberger A. Autoantibodies to beta 2-adrenergic receptors with antiadrenergic activity from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 Oct;**88**(4):581-587.
7. Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig*. 2003 Feb;**10**(2):82-93.
8. Becker NP, Muller J, Gottel P, Wallukat G, Schimke I. Cardiomyopathy - An approach to the autoimmune background. *Autoimmun Rev*. 2017 Mar;**16**(3):269-286.
9. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol*. 2013 Sep;**10**(9):531-547.
10. Wallukat G, Schimke I. Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. *Seminars in Immunopathology*. 2014 May;**36**(3):351-363.
11. Becker NP, Goettel P, Mueller J, Wallukat G, Schimke I. Functional autoantibody diseases: Basics and treatment related to cardiomyopathies. *Frontiers In Bioscience*. 2019 2019/01/01/;**Landmark**(24):14-14.

12. Haberland A, Holtzhauer M, Schlichtiger A, Bartel S, Schimke I, Muller J, Dandel M, Lupp PB, Wallukat G. Aptamer BC 007 - A broad spectrum neutralizer of pathogenic autoantibodies against G-protein-coupled receptors. *European Journal Pharmacology*. 2016 Oct 15;**789**:37-45.
13. Wallukat G, Muller J, Haberland A, Berg S, Schulz A, Freyse EJ, Vetter R, Salzsieder E, Kreutz R, Schimke I. Aptamer BC007 for neutralization of pathogenic autoantibodies directed against G-protein coupled receptors: A vision of future treatment of patients with cardiomyopathies and positivity for those autoantibodies. *Atherosclerosis*. 2016 Jan;**244**:44-47.
14. Müller J, Haberland A, Wallukat G, Becker N-P, Wenzel K, Göttel P, Schulze-Rothe S, Schimke I, Yilmaz T, Abay A, Golor G, Grossmann M, Sinn A, Hönicke A-S, Davideit H, Becker S. The DNA-Based Drug BC 007 neutralizes agonistically acting autoantibodies directed against G protein-coupled receptors – Successful mode of action demonstrated in clinical phase 1 trial. *Chim Oggi*. 2019 2019;**2**((Mar/Apr)):65-67.
15. Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJ, Maeurer J, Hartmann K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med*. 2010 May-Jun;**24**(3):533-538.
16. Hamlin RL. Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther*. 2007 Feb;**113**(2):276-295.
17. Hensley MT, Tang J, Woodruff K, Defrancesco T, Tou S, Williams CM, Breen M, Meurs K, Keene B, Cheng K. Intracoronary allogeneic cardiosphere-derived stem cells are safe for use in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Cell Mol Med*. 2017 Aug;**21**(8):1503-1512.
18. O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2004 Sep;**34**(5):1187-1207.
19. Petric AD, Stabej P, Zemva A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, Causes of Death and a Pedigree Review in a Related Line. *J Vet Cardiol*. 2002 May;**4**(1):17-24.
20. Smucker ML, Kaul S, Woodfield JA, Keith JC, Manning SA, Gascho JA. Naturally occurring cardiomyopathy in the Doberman pinscher: a possible large animal model of human cardiomyopathy? *J Am Coll Cardiol*. 1990 Jul;**16**(1):200-206.
21. Wess G, Wallukat G, Fritscher A, Becker NP, Wenzel K, Muller J, Schimke I. Doberman pinschers present autoimmunity associated with

functional autoantibodies: A model to study the autoimmune background of human dilated cardiomyopathy. *PLoS One*. 2019;**14**(7):e0214263.

22. Wess G, Domenech O, Dukes-McEwan J, Haggstrom J, Gordon S. European Society of Veterinary Cardiology screening guidelines for dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Cardiol*. 2017 Oct;**19**(5):405-415.

23. Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim Acta*. 1987;**46**(8-9):S634-639.

24. Wallukat G, Munoz Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Duchon D, Diaz Ramirez I, Borges AC, Schimke I. Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Feb 2;**55**(5):463-468.

25. Bornholz B, Wallukat G, Roggenbuck D, Schimke I. Chapter 3 - Autoantibodies Directed Against G-Protein-Coupled Receptors in Cardiovascular Diseases: Basics and Diagnostics. In: Nussinovitch U, editor. *The Heart in Rheumatic, Autoimmune and Inflammatory Diseases*: Academic Press; 2017. p. 49-63.

26. Wallukat G, Pruss H, Muller J, Schimke I. Functional autoantibodies in patients with different forms of dementia. *PLoS One*. 2018;**13**(3):e0192778.

27. 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. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1993 Jul-Aug;**7**(4):247-252.

28. Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Aptamer binding and neutralization of beta1-adrenoceptor autoantibodies: basics and a vision of its future in cardiomyopathy treatment. *Trends Cardiovasc Med*. 2011 Aug;**21**(6):177-182.

29. Bruno JG. Predicting the Uncertain Future of Aptamer-Based Diagnostics and Therapeutics. *Molecules*. 2015 Apr 16;**20**(4):6866-6887.

30. Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune

attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2004 May;**113**(10):1419-1429.

31. Matsui S, Fu M, Hayase M, Katsuda S, Yamaguchi N, Teraoka K, Kurihara T, Takekoshi N. Transfer of rabbit autoimmune cardiomyopathy into severe combined immunodeficiency mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003 Dec;**42 Suppl 1**:S99-103.

32. Wenzel K, Schulze-Rothe S, Muller J, Wallukat G, Haberland A. Difference between beta1-adrenoceptor autoantibodies of human and animal origin-Limitations detecting beta1-adrenoceptor autoantibodies using peptide based ELISA technology. *PLoS One*. 2018;**13**(2):e0192615.

33. Recchia FA, Lionetti V. Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Vet Res Commun*. 2007 Aug;**31 Suppl 1**:35-41.

34. Milani-Nejad N, Brunello L, Gyorke S, Janssen PM. Decrease in sarcoplasmic reticulum calcium content, not myofilament function, contributes to muscle twitch force decline in isolated cardiac trabeculae. *J Muscle Res Cell Motil*. 2014 Aug;**35**(3-4):225-234.

35. Camacho P, Fan H, Liu Z, He JQ. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis*. 2016;**6**(3):70-80.

36. Keefe AD, Schaub RG. Aptamers as candidate therapeutics for cardiovascular indications. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008 2008/04/01/;**8**(2):147-152.

37. Haberland A, Wallukat G, Berg S, Schulz AM, Freyse EJ, Vetter R, Salzsieder E, Muller J, Kreutz R, Schimke I. Neutralization of pathogenic beta1-receptor autoantibodies by aptamers in vivo: the first successful proof of principle in spontaneously hypertensive rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014 Aug;**393**(1-2):177-180.

38. Mueller J, Haberland A, Becker N-P, Wenzel K, Wallukat G, Goettel P, Schulze-Rothe S, Schimke I, Golor G, Grossmann M, Sinn A, Steiper M, Yilmaz T, Wallukat A, Davideit H. THE DNA-BASED THERAPEUTIC AGENT BC 007 COMPLETELY NEUTRALIZES AGONISTIC AUTOANTIBODIES DIRECTED AGAINST β 1-ADRENOCEPTORS: RESULTS OF A PHASE 1 TRIAL. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018 2018/03/08/;**71**(11 Supplement):A645.

39. Yau P, Dhand NK, Thomson PC, Taylor RM. Retrospective study on the occurrence of canine lymphoma and associated breed risks in a population of dogs in NSW (2001-2009). *Australian veterinary journal*. 2017 May;**95**(5):149-155.

40. Summerfield NJ, Boswood A, O'Grady MR, Gordon SG, Dukes-McEwan J, Oyama MA, Smith S, Patteson M, French AT, Culshaw GJ, Braz-Ruivo L, Estrada A, O'Sullivan ML, Loureiro J, Willis R, Watson P. Efficacy of pimobendan in the prevention of congestive heart failure or sudden death in Doberman Pinschers with preclinical dilated cardiomyopathy (the PROTECT Study). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2012 Nov-Dec;**26**(6):1337-1349.
41. Wallukat G, Reinke P, Dorffel WV, Luther HP, Bestvater K, Felix SB, Baumann G. Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunoabsorption. *Int J Cardiol*. 1996 May;**54**(2):191-195.
42. Baba A, Akaishi M, Shimada M, Monkawa T, Wakabayashi Y, Takahashi M, Nagatomo Y, Yoshikawa T. Complete elimination of cardiodepressant IgG3 autoantibodies by immunoabsorption in patients with severe heart failure. *Circ J*. 2010 Jul;**74**(7):1372-1378.
43. Hetzer R, Dandel M. Early detection of left ventricular dysfunction in patients with mitral regurgitation due to flail leaflet is still a challenge. *Eur Heart J*. 2011 Mar;**32**(6):665-667.
44. Kluser L, Holler PJ, Simak J, Tater G, Smets P, Rugamer D, Kuchenhoff H, Wess G. Predictors of sudden cardiac death in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2016 May;**30**(3):722-732.
45. Dandel M, Wallukat G, Englert A, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R. Long-term benefits of immunoabsorption in beta(1)-adrenoceptor autoantibody-positive transplant candidates with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2012 Dec;**14**(12):1374-1388.

IV. DISKUSSION

DCM ist sowohl beim Menschen (BROCH et al., 2015) als auch beim Hund (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004b) eine häufige Ursache von kardialer Morbidität und Mortalität. Da Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren häufig bei DCM-Patienten gefunden werden (WALLUKAT et al., 2000; WESS et al., 2019) und vor allem β 1-AAK mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert sind (STORK et al., 2006; WESS et al., 2019), ist es sinnvoll diese nachzuweisen und wenn möglich zu eliminieren. Unter verschiedenen Therapiemodellen, gilt die *in vivo* Neutralisation mit Aptameren als eine der erfolgreichsten neuen Therapieansätze (BECKER et al., 2019b). Bislang fehlen jedoch Studien, die den Therapieerfolg von Aptamer BC 007 bei Patienten mit DCM nachweisen. In der aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Aptamer BC 007 bei Hunden mit Autoantikörper-assoziiertes dilatativer Kardiomyopathie, die Autoantikörper erfolgreich *in vivo* neutralisiert werden. Weiterhin konnten in der Studie keine Nebenwirkungen durch das Medikament festgestellt werden. Es handelt sich hierbei um die erste veröffentlichte Studie die zeigt, dass durch die *in vivo*

Neutralisation der β 1-AAK durch Aptamer BC 007 eine signifikant verlängerte Überlebenszeit erreicht werden kann.

1. Dobermann als Großtiermodell

In der vorliegenden Studie wurde der Dobermann als Großtiermodell für den Menschen gewählt. Es wurden reinrassige Dobermänner, die in Privatbesitz verschiedener Besitzer waren, ausgesucht. Dieses Modell wurde gewählt, weil Tiere mit einer natürlich vorkommenden DCM nicht probat in einem Labor gezüchtet werden können. In der vorliegenden Studie kamen die Dobermänner aus verschiedenen Zuchtpopulationen aus Europa. Dadurch ergab sich eine größere genetische Vielfalt, welche somit die genetische Variabilität in der Humanmedizin besser widerspiegeln kann. Da das Erscheinungsbild der DCM beim Menschen und beim Hund sehr ähnlich ist, kann davon ausgegangen werden, dass vergleichbare Pathomechanismen zugrunde liegen (PETRIC et al., 2002a). Die Pathogenese bei der Autoantikörper-assoziierten dilatativen Kardiomyopathie wird beim Menschen vor allem mit den β 1-AAK in Zusammenhang gebracht (WALLUKAT et al., 2000). Diese Autoantikörper konnten neuerdings ebenfalls beim Dobermann nachgewiesen werden (WESS et al., 2019). Auch hier kann eine Pathogenität der Autoantikörper vermutet

werden, da in dieser Studie auch gezeigt wurde, dass die Autoantikörper-positiven Hunde kürzer als die Autoantikörper-negativen lebten (WESS et al., 2019). Die Rasse Dobermann eignet sich weiterhin sehr gut als Modell, da die DCM in dieser Population sehr häufig vorkommt. Mehr als jeder zweite Dobermann entwickelt im Laufe seines Lebens diese Erkrankung (WESS et al., 2010b). Schon vor dreißig Jahren schlugen SMUCKER und Kollegen (1990b) den Dobermann als Großtiermodell für die DCM vor. 2007 wurde der Dobermann erneut als mögliches Tiermodell für die Forschung über ventrikuläre Arrhythmien in der Humanmedizin genannt (HAMLIN, 2007a). Als BUSE und Kollegen (2008) fünf potentiell DCM-assoziierte Autoantigene bei Hunden, darunter 10 Dobermänner, mit spontaner DCM mit einem Screening-Test nachwiesen, schlugen sie ebenfalls vor Hundemodelle mit spontaner DCM für die weitere Forschung der Autoantikörper-assoziierten Kardiomyopathie in der Humanmedizin einzusetzen. In einer neueren Studie wurde der Dobermann bereits als Großtiermodell für die Forschung der DCM in der Humanmedizin verwendet (HENSLEY et al., 2017a). In der gegenwärtigen Studie sollte der Dobermann nicht nur als Großtiermodell für die Humanmedizin dienen, sondern auch selbst Behandlungszielgruppe sein. Da es bislang nur

symptomatische Therapiemöglichkeiten bei der Dobermann-Kardiomyopathie gibt, könnte er von diesem potenziell kausalen Therapieansatz selbst profitieren.

2. Dosierung Aptamer BC 007

Die ersten 5 Hunde in dieser Studie wurden mit einer Dosierung von 4 mg/kg Aptamer BC 007 an 2 aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Von der Gesamtmenge von 4 mg/kg Aptamer BC 007 an einem Tag, wurden 2 mg/kg als Bolus über 20 Sekunden und 2 mg/kg als Infusion über 20 Minuten gegeben. Diese Dosierung wurde schon zuvor in einer Studie mit Ratten getestet. Es zeigte sich dass diese Dosierung ausreichend ist, um alle β 1-AAK langfristig zu neutralisieren (HABERLAND et al., 2014). Um jedoch die minimale therapeutische Dosis herauszufinden, wurde in der aktuellen Studie nach und nach die Dosierung herabgesetzt. Zunächst wurde sie auf eine einmalige Gabe an nur einem einzigen Tag reduziert. Weiterhin wurde schließlich der Bolus weggelassen und die Gesamtmenge nur noch als Infusion über 20 Minuten gegeben. Da diese Dosierung immer noch ausreichend war, um die β 1-AAK zu neutralisieren, wurde im Folgenden die Dosis schrittweise halbiert, wenn diese bei 2 konsekutiven Hunden nachweisbar die Autoantikörper voll neutralisiert hatte. Die geringste Dosis die gegeben wurde, war

eine einmalige Gabe von 1 mg/kg Aptamer BC 007. Diese Dosierung war immer noch ausreichend, um die β 1-AAK vollständig zu neutralisieren. Somit konnte in dieser Studie nicht die kleinstmögliche therapeutische Dosis bestimmt werden. Weitere Studien sind hierfür notwendig.

Die unterschiedlichen Dosierungen von Aptamer BC 007, die in dieser Studie verabreicht wurden, könnten einen Einfluss auf den beobachteten therapeutischen Effekt gehabt haben. Da das Aptamer jedoch eine sehr kurze Halbwertszeit von 5 bis 10 Minuten hat (KEEFE et al., 2010) und da alle Hunde nach der Behandlung Autoantikörper-negativ waren, erscheint ein solcher Effekt eher unwahrscheinlich.

3. Sicherheit

Ein Ziel dieser Studie war es die Sicherheit der Gabe von Aptamer BC 007 bei Hunden, als Großtiermodell für den Menschen und als Behandlungszielgruppe selbst, zu evaluieren. Der große Vorteil dieses Aptamers ist, dass es sich schon in einem fortgeschrittenen Stadium der klinischen Entwicklung befindet. Das Aptamer BC 007 wurde ursprünglich unter dem Namen ARC183, als ein Heparinersatz für die intraoperative Hemmung von Thrombin, entwickelt (KEEFE & SCHAUB,

2008; HABERLAND et al., 2016). Für diese Verwendungsart wurde die Sicherheit der Applikation schon getestet. Eine Phase-1-Studie wurde mit dem Medikament durchgeführt. Hier konnte die Sicherheit der Gabe beim Menschen gezeigt werden. Es wurde jedoch für die gewünschte Gerinnungshemmung eine zu große Menge des Medikamentes benötigt. Daher war die Administration unter wirtschaftlich gesehenen Aspekten nicht rentabel und die Firma beschloss die Entwicklung des Medikamentes einzustellen (KEEFE & SCHAUB, 2008). Etwas später fand man heraus, dass dasselbe Molekül sämtliche Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung stehen, neutralisieren kann. Die Dosis, die für die Neutralisation benötigt wird, ist viel geringer. Daher ist das Aptamer BC 007 ein vielversprechender Breitspektrum-Neutralisator, das bei vielen verschiedenen Erkrankungen eingesetzt werden könnte (HABERLAND et al., 2016).

In der vorliegenden Studie konnte die Sicherheit der Verabreichung von Aptamer BC 007 bestätigt werden. Es konnten keine Nebenwirkungen durch die Applikation festgestellt werden. Zur Evaluation wurden die Tiere engmaschig kontrolliert. Am Tag der Verabreichung wurden die

Hunde während der gesamten Infusionsdauer an einen EKG-Monitor angeschlossen. Das EKG wurde kontinuierlich überwacht. Zusätzlich wurden alle 5 Minuten die Vitalparameter bestimmt, um mögliche Nebenwirkungen, wie einen anaphylaktischen Schock, sofort zu erkennen und behandeln zu können. Bei keinem der Dobermänner traten jedoch Abweichungen der physiologischen Verhältnisse auf. Weiterhin wurde die Blutgerinnung vor der Gabe, innerhalb 5 Minuten nach der Gabe und 3 Stunden später kontrolliert. Bei keinem der Hunde traten klinisch relevante Abweichungen auf. Dies war aufgrund der deutlich niedriger verwendeten Dosierungen und der sehr kurzen Halbwertszeit von Aptamer BC 007 (KEEFE & SCHAUB, 2008) auch nicht zu erwarten (HABERLAND et al., 2016). Zusätzlich wurde der Blutdruck gemessen und ein Blutbild sowie eine Analyse der Serumchemie angefertigt, um Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen zu erhalten. Diese Untersuchungen wurden vor der Applikation sowie einen Tag, 10 Tage, 30 Tage, 3 Monate, 6 Monate und 9 Monate nach der Verabreichung durchgeführt. Bei keinem der Hunde traten Veränderungen auf. Daher kann die Sicherheit der Applikation angenommen werden. Diese Schlussfolgerung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der klinischen Phase 1 Studie beim Menschen, welche kürzlich veröffentlicht wurden

(MUELLER et al., 2019).

In der jetzigen Studie wurde von jedem der Hunde die Todesursache festgehalten. Vier Hunde starben in der Aptamer-Gruppe aufgrund einer Neoplasie. Dies könnte als eine Nebenwirkung der Behandlung mit Aptamer BC 007 angesehen werden. Jedoch starben in den Kontrollgruppen auch 2 beziehungsweise 3 Dobermänner als Folge einer Neoplasie. Der Unterschied zwischen den Gruppen, um an einer Neoplasie zu versterben, war statistisch nicht signifikant ($P = 0,357$ und $P = 0,663$), obwohl die behandelten Dobermänner länger lebten und somit einem höheren Risiko ausgesetzt waren, an einer Neoplasie zu erkranken. Zudem wurde die Rasse Dobermann schon in vorherigen Studien mit einem erhöhten Risiko eine Tumorerkrankung zu entwickeln assoziiert (KERLIN & HENDRICK, 1996; YAU et al., 2017).

Weiterhin hatten die behandelten Dobermänner eine signifikant längere Überlebenszeit in der Gesamtmortalitätsanalyse. Dies bestätigt zusätzlich die Annahme, dass die Applikation von Aptamer BC 007 sicher und gut verträglich ist.

4. Wirksamkeit

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es die Wirksamkeit der Therapie mit Aptamer BC 007 bei Patienten mit DCM zu bestimmen. Hierfür wurde zum einen eine Analyse der Überlebenszeit mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode und zum anderen eine Cox Regressionsanalyse durchgeführt. Weiterhin wurde eine Funktionsverbesserung des Herzens anhand einer Analyse des EDVI und ESVI untersucht. Ebenfalls wurde bestimmt, ob die Autoantikörper durch die Therapie erfolgreich neutralisiert wurden.

Eine vollständige Neutralisation der β 1-AAK erfolgte bei allen behandelten Hunden. Bei einem Großteil der Dobermänner, bei dem die Autoantikörper bis zum Lebensende weiter gemessen wurden, traten die β 1-AAK erneut nach 9 bis 13 Monaten auf. Dieser beobachtete Wiederanstieg ist in Übereinstimmung mit einer Studie von TRIMPERT und Kollegen (2010), bei der die Autoantikörper nach einer Immunadsorption nach 12 Monaten wieder auftraten. Nur bei einem Dobermann traten die Autoantikörper schon nach 3 Monaten wieder auf. Hierbei handelte es sich um den einzigen Dobermann, der zu Studienbeginn kein Pimobendan erhalten hatte. Pimobendan ist ein Kalzium-Sensitizer und ein Phosphodiesterase-Typ 3-

Inhibitor, welches schon in einer großen Multicenterstudie als wirksames Medikament zur Verlängerung der okkulten Phase der DCM beim Dobermann evaluiert wurde (SUMMERFIELD et al., 2012). Ob es jedoch einen Zusammenhang zwischen der fehlenden Therapie mit Pimobendan und dem schnellen Wiederauftreten der Autoantikörper gibt, ist sehr fraglich und müsste in weiteren Studien untersucht werden.

In der aktuellen Studie konnte eine direkte Funktionsverbesserung des Herzens durch eine Behandlung mit Aptamer BC 007 bei 10 von 14 Dobermännern nachgewiesen werden. Dies zeigte sich durch eine Verkleinerung der enddiastolischen und endsystolischen Volumina nach der Gabe von Aptamer BC 007. Diese Funktionsverbesserung war zeitlich mit der β 1-AAK freien Zeit assoziiert, da die Volumina nach dem Wiederauftreten der β 1-AAK wieder größer wurden. Diese Ergebnisse bekräftigen die Resultate anderer Studien in denen die klinische Verbesserung der Patienten durch eine Immunadsorption ebenfalls mit dem Wiederauftreten der β 1-AAK verschwand (WALLUKAT et al., 1996a) oder nur die Patienten, bei denen eine komplette Elimination der β 1-AAK erreicht werden konnte, von der Immunadsorption profitierten (BABA et al., 2010b).

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode konnte gezeigt werden, dass die Zeit bis zum kardialen Tod bei den mit Aptamer BC 007 behandelten Hunde im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 ca. 10 Monate und im Vergleich zur Kontrollgruppe 2 ca. 11 Monate länger war. Dies entspricht auch etwa der Zeit von der Neutralisation bis zum Wiederauftreten der β 1-AAK. Es kann vermutet werden, dass die Hunde durch eine erneute Gabe nach dem Wiederauftreten der Autoantikörper profitieren würden. Dies muss allerdings durch weitere Studien bestätigt werden. Ein Dobermann wurde in der vorliegenden Studie zweimal im Abstand von 9 Monaten behandelt, da die β 1-AAK schon nach 3 Monaten wiederauftraten und nach 9 Monaten, das Herz wieder deutlich vergrößert war. Das Herz verkleinerte sich nach beiden Gaben von Aptamer BC 007 deutlich. Da der Hund während diesem Zeitraum nicht mit Pimobendan behandelt wurde, kann der Effekt noch eindeutiger mit der Gabe von β 1-AAK assoziiert werden. Die Gabe von Pimobendan konnte bei diesem Hund um 21 Monate herausgezögert werden. Auch bei der zweiten Gabe von Aptamer BC 007 konnten keine Nebenwirkungen festgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit lebt dieser Dobermann immer noch ohne klinische Symptome. Dadurch kann ebenfalls vermutet werden, dass die Hunde von mehrmaligen Gaben von Aptamer

BC 007 profitieren würden und der Krankheitsverlauf somit für längere Zeit aufgehalten werden kann. Dies muss jedoch durch weitere Studien mit einer größeren Studienpopulation bestätigt werden.

Mit Hilfe der Cox Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die längere Überlebenszeit bei den behandelten Hunden allein auf die Gabe von Aptamer BC 007 zurückzuführen ist. In der univariaten Cox Regressionsanalyse, war Aptamer BC 007 die einzige Variable mit einem positiven Effekt auf die Überlebenszeit. Dies wurde in der multivariaten Analyse mit einer noch niedrigeren Hazard Ratio und engeren Konfidenzintervallen bestätigt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Studie von DANDEL und Kollegen (2012a) in der gezeigt wurde, dass Menschen durch eine Immunadsorption positive Langzeiteffekte erfahren, durch die eine Herztransplantation nicht mehr benötigt wird oder diese um Jahre verzögert werden kann. Die vorliegende Studie ist jedoch die erste, die einen positiven Langzeiteffekt durch die *in vivo* Neutralisation durch Aptamer BC 007 beschreibt.

Eine weitere Schlussfolgerung, die durch die multivariate Cox Regressionsanalyse gezogen werden kann, ist, dass die Herzgröße den größten negativen Effekt auf die Überlebenszeit

hat. Dies ist in Übereinstimmung mit der Studie von KLUSER und Kollegen (2016), in der die Variablen mit einem negativen Effekt, in Bezug auf den Sekudentod, bestimmt wurden. Hier war ebenfalls ein vergrößertes Herz der größte negativ prognostische Faktor.

Die mediane Überlebenszeit von allen Dobermännern zusammen in der vorliegenden Studie erscheint kurz, wenn man sie mit der PROTECT Studie (SUMMERFIELD et al., 2012) vergleicht. In jener Studie betrug die mediane Zeit bis zum Sekudentod oder Herzversagen 718 Tage bei den Dobermännern, die mit Pimobendan behandelt wurden (SUMMERFIELD et al., 2012). In der aktuellen Studie betrug die mediane Zeit bis zum kardialen Tod bei den mit Aptamer BC 007 behandelten Hunden 572 Tage und bei den Hunden in den Kontrollgruppen 266 bzw. 229 Tage. Daher könnte angenommen werden, dass die längere Überlebenszeit, der mit Aptamer BC 007 behandelten Hunde, nur dadurch bedingt ist, dass die Hunde in den Kontrollgruppen ungewöhnlich kurz lebten. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Hunde in der gegenwärtigen Studie schon ca. 3,3 – 4,8 Monate mit Pimobendan, aufgrund ihrer vergrößerten Herzen, behandelt wurden. Weiterhin hatten die Hunde in der PROTECT Studie

bei Studienbeginn nur ein geringgradig vergrößertes Herz. Der mediane, normalisierte linksventrikuläre Innendurchmesser in der Endsystole, quantifiziert durch eine M-Mode-Messung, betrug 1,4. Dieser Wert ist nur geringgradig über dem Referenzbereich. Der mediane, normalisierte linksventrikuläre Innendurchmesser in der Enddiastole betrug 1,77. Dieser Wert befindet sich sogar innerhalb des Referenzbereiches. In der vorliegenden Studie wurde die Herzgröße mit Hilfe der Scheibchensummationsmethode nach Simpson bestimmt. Daher kann die Herzgröße der beiden Studien nicht direkt verglichen werden. Die Hunde in der aktuellen Studie hatten jedoch sowohl systolisch als auch diastolisch ein deutlich vergrößertes Herz. Da ein vergrößertes Herz die Variable mit dem größten negativen Einfluss ist, kann hierdurch der Unterschied in der Überlebenszeit erklärt werden.

Allgemein kann man sagen, dass eine verlängerte Überlebenszeit von 306 bzw. 343 Tagen mit einer nur einmaligen Behandlung von Aptamer BC 007 einen sehr großen Erfolg darstellt. Durch die erfolgreiche zweimalige Behandlung eines Dobermanns in der aktuellen Studie kann spekuliert werden, dass die Überlebenszeit durch weitere Gaben nach dem Wiederauftreten der β 1-AAK noch weiter verlängert werden könnte. Dies sollte jedoch in weiteren Studien überprüft werden.

5. Limitationen

Die größte Limitation der vorliegenden Studie ist der relativ kleine Stichprobenumfang. Die kleine Anzahl von Studienpatienten ist dadurch bedingt, dass es schwierig war geeignete Dobermänner aus Privatbesitz zu finden, die alle Einschlusskriterien erfüllten. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße und da einige Hunde früh verstarben, war es nicht möglich, den Einfluss, den die Behandlung mit Aptamer BC 007 auf die verschiedenen echokardiographischen und elektrokardiographischen Variablen im Verlauf der Zeit hat, exakt zu vergleichen. Ebenfalls waren, aufgrund der relativ kleinen Anzahl von Dobermännern, die geschätzten Interquartilsabstände und Konfidenzintervalle relativ breit. Daher müssen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden.

Weiterhin hatten beide Kontrollgruppen ihre Schwachstellen. Die Kontrollgruppe 1 wurde aus Dobermännern gebildet, von denen die Besitzer die Behandlung mit Aptamer BC 007 ablehnten oder nicht gewährleisten konnten ihren Hund zu allen Kontrolluntersuchungen vorbei zu bringen. Diese Entscheidung wurde getroffen, da die engmaschigen Kontrolluntersuchungen bei den mit Aptamer BC 007 behandelten Hunden als wichtig erachtet wurden, um mögliche Nebenwirkungen frühzeitig

erkennen und den Einfluss des Medikamentes besser beurteilen zu können. Dadurch könnte die Verteilung zwischen den Gruppen jedoch beeinflusst sein. Um die positiven Endresultate noch einmal mit einer weiteren, besser übereinstimmenden Kontrollgruppe zu vergleichen, wurde die zweite Kontrollgruppe erstellt. Die Schwachstelle bei dieser Gruppe ist, dass sie retrospektiv erstellt wurde und dass die β 1-AAK nicht gemessen wurden. Es war jedoch nicht möglich die Autoantikörper bei allen Hunden zu bestimmen, da es bisher keine massentaugliche Messmethode gibt. Daher kann es sein, dass diese Kontrollgruppe Dobermänner enthält, die Autoantikörper-negativ sind. Eine vorherige Studie hat jedoch schon gezeigt, dass β 1-AAK einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit haben (WESS et al., 2019). Daher kann das Ergebnis der vorliegenden Studie nur insofern beeinflusst sein, dass der positive Einfluss des Medikamentes auf die Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe 2 abgeschwächt wurde. Da jedoch ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit belegt werden konnte, ist diese Limitation zu vernachlässigen.

Ein Problem für den zukünftigen Therapieeinsatz von Aptamer BC 007 bei der Autoantikörper-assoziierten Kardiomyopathie,

ist die Schwierigkeit der $\beta 1$ -AAK-Bestimmung. Es gibt bislang keinen massentauglichen Test für die zuverlässige Messung und Unterscheidung von funktional aktiven $\beta 1$ -AAK (BORNHOLZ et al., 2014). Da eine Studie in der Humanmedizin jedoch schon gezeigt hat, dass nur die Patienten mit vorhandenen, funktional aktiven Autoantikörpern von einer Immunadsorption profitieren (DANDEL et al., 2012a), lässt sich vermuten, dass dies ebenfalls für die Behandlung mit Aptamer BC 007 zutrifft. In diesem Fall wäre eine für das Routinelabor geeignete Diagnosemöglichkeit unabdingbar, um die Behandlung mit Aptamer BC 007 im normalen Klinikalltag etablieren zu können.

6. Ausblick

Diese aktuelle Studie zeigt, dass Aptamer BC 007 bei Dobermännern mit Autoantikörper-assoziiertes dilatativer Kardiomyopathie eine gute Verträglichkeit aufweist und daher unbedenklich verabreicht werden kann. Weiterhin konnte schon durch eine einmalige Gabe die Überlebenszeit um ca. 10 bis 11 Monate verlängert werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich hier jedoch um eine Pilotstudie mit einer kleinen Studienpopulation handelt, sollten diese Ergebnisse am besten durch eine große, prospektive, randomisierte, doppelt geblindete, placebokontrollierte Studie bestätigt werden. Da es

sich hierbei um ein Großtiermodell mit natürlich vorkommender DCM handelt, welches einem Kleintiermodell mit durch Immunisierung induzierter DCM überlegen ist, geben die vorliegenden Ergebnisse Anlass optimistisch zu sein, dass die Therapie mit Aptamer BC 007 ebenfalls bei Menschen mit DCM und vorhandenen β 1-AAK erfolgreich eingesetzt werden kann. Wenn die diagnostischen Probleme der β 1-AAK überwunden werden, könnte mit Aptamer BC 007 ein neues, erfolversprechendes therapeutisches Mittel für die Behandlung der Autoantikörper-assoziierten dilatativen Kardiomyopathie zur Verfügung stehen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist sowohl beim Menschen, als auch beim Hund eine der häufigsten Ursachen kardialer Morbidität und Mortalität. In der Humanmedizin ist mittlerweile neben einer genetischen Ursache auch eine autoimmune Genese anerkannt. Diese Form der Erkrankung ist durch funktional aktive Autoantikörper gegen G-Proteingekoppelte Rezeptoren geprägt. Bei Patienten mit DCM kommen vor allem Autoantikörper gegen die β 1-Adrenozeptoren (β 1-AAK) häufig vor. Der pathogene Effekt dieser funktionalen Autoantikörper konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Patienten von einer Elimination oder Neutralisation der Autoantikörper, durch eine verbesserte Herzfunktion und eine längere transplantationsfreie Überlebenszeit, profitieren. Diese Elimination erfolgte bislang durch eine Immunadsorption. Da diese Methode sehr kosten-, zeit- und materialintensiv ist, wird nach neueren, einfacheren Therapiemöglichkeiten geforscht. Hierfür wurde unter anderem das Aptamer BC 007 entwickelt. Es handelt sich hierbei um ein kurzes, einzelsträngiges DNA-Molekül, das sämtliche

bekannten kardiovaskulär-pathogenen Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spezifisch bindet und dadurch neutralisiert. Bislang fehlen jedoch Studien über den Therapieerfolg von Aptamer BC 007 bei Patienten mit DCM.

Auch beim Dobermann konnten bereits β 1-AAK nachgewiesen werden. Eine neuere Studie zeigt zudem, dass die Dobermänner mit einer systolischen Dysfunktion und vorhandenen β 1-AAK deutlich kürzer leben, als Dobermänner in einem vergleichbaren Stadium ohne die Autoantikörper. Da mehr als jeder zweite Dobermann im Laufe seines Lebens an der DCM erkrankt und es bislang nur symptomatische Therapiemöglichkeiten gibt, ist auch hier der Bedarf nach neueren, möglicherweise kausalen Therapieansätzen hoch.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher die Sicherheit und Wirksamkeit der Therapie mit Aptamer BC 007 beim Dobermann mit DCM zu evaluieren. Der Dobermann diente dabei zum einen als Großtiermodell für den Menschen, war jedoch zum anderen selbst die Behandlungszielgruppe. Hierfür wurden 14 Dobermänner, die eine echokardiographisch nachgewiesene DCM und einen positiven β 1-AAK-Titer aufwiesen, mit Aptamer BC 007 behandelt. Zur Kontrolle wurden 2 verschiedene Gruppen mit jeweils 14 Dobermännern

erstellt, die nicht mit Aptameren behandelt wurden. Die behandelten Hunde wurden engmaschig auf Nebenwirkungen untersucht um die Sicherheit der Verabreichung zu ermitteln. Zur Evaluation der Wirksamkeit von Aptamer BC 007, wurde die Überlebenszeit der behandelten Hunde mit der in den Kontrollgruppen verglichen. Weiterhin wurde der Einfluss der verschiedenen Variablen auf die Überlebensdauer bestimmt und die Veränderung der Herzfunktion anhand der enddiastolischen und endsystolischen Volumina analysiert.

Während der gesamten Studiendauer konnten keine Nebenwirkungen der Behandlung mit Aptamer BC 007 festgestellt werden. Achtundvierzig Stunden nach der Verabreichung von Aptamer BC 007 waren bei allen behandelten Dobermännern keine β 1-AAK mehr vorhanden. Dies führte zu einer Reduktion oder Stabilisierung der endsystolischen Volumina während der Autoantikörper freien Zeit bei 10 der 14 behandelten Dobermännern. Die mit Aptamer BC 007 behandelten Dobermänner zeigten eine signifikant verlängerte Überlebenszeit (572 Tage, IQR 442 – 840 Tage) im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 (266 Tage, IQR 97 – 438 Tage; log rank: $p = 0,009$) und zur Kontrollgruppe 2 (229 Tage, IQR 174 – 319 Tage; log rank: $p = 0,012$).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Verabreichung von Aptamer BC 007 bei Dobermännern mit Autoantikörper-assoziierten dilatativer Kardiomyopathie sicher ist und eine erfolgreiche Neutralisation der β 1-AAK erreicht wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung einen signifikant positiven Effekt auf die Überlebenszeit hat.

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Pilotstudie mit einer relativ kleinen Studienpopulation. Daher sollten die Ergebnisse noch durch eine größere Studie bestätigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass mit der Behandlung mit Aptamer BC 007, sowohl beim Dobermann als auch beim Menschen mit einer Autoantikörper-assoziierten dilatativen Kardiomyopathie, eine neue, erfolgversprechende Therapiemöglichkeit zur Verfügung steht.

VI. SUMMARY

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a major cause of cardiac morbidity and mortality in humans and dogs. Besides a genetic background, an autoimmune origin of the disease has been accepted in human medicine. This form of disease is characterized by functional autoantibodies against G-protein-coupled receptors. In patients with DCM, particularly autoantibodies against the β_1 -adrenergic receptor (β_1 -AAB) are frequently found. Several studies have verified the pathogenic effect of these functional autoantibodies. Furthermore, it has been shown that these patients benefit from an elimination or neutralization of the autoantibodies. This was reflected in an improved cardiac function and a longer transplantation-free survival. Up to now, the elimination has been carried out by an immunoabsorption. As this technique is very cost-, time- and material-intensive, research is being done into newer, feasible therapeutic options. For this purpose, Aptamer BC 007 was developed. It is a short, single-stranded DNA molecule that specifically binds and neutralizes all known cardiovascular-pathogenic autoantibodies against G-protein-coupled receptors. However, studies to demonstrate the benefit of β_1 -AAB

neutralization by Aptamer BC 007 in patients with DCM are still lacking.

Recently β 1-AAB were detected in Doberman pinchers as well. One study also showed that the Doberman pinchers with a systolic dysfunction and existing β 1-AAB live significantly shorter than Doberman pinchers in a similar stage without the autoantibodies. Since more than every second Doberman pincher is likely to be affected by DCM throughout its lifetime and there are only symptomatic therapeutic options so far, the need for newer, possibly causal treatment approaches is high.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the safety and efficacy of the treatment with Aptamer BC 007 in Doberman pinchers with DCM. The Doberman pincher served on the one hand as a large animal model for humans, but on the other hand was itself the treatment target group. For this purpose, 14 Doberman pinchers, who had an echocardiographically detected DCM and a positive β 1-AAB titer, were treated with Aptamer BC 007. Two different control groups were created, each containing 14 Doberman pinchers. The dogs of the control groups were not treated with aptamers. To determine the safety of the administration, the treated dogs were closely monitored for side effects. The survival time of the treated dogs was

compared with that in the control groups to evaluate the efficacy of Aptamer BC 007. Furthermore, the influence of the different variables on the survival time was determined and changes in the cardiac function were analyzed on the basis of changes in the end-diastolic and end-systolic volume.

No adverse effects associated with the Aptamer BC 007 treatment were observed during the entire course of the study. Forty-eight hours after treatment, the blood of all treated Doberman pinchers was free of β 1-AAB. This led to a reduction or stabilization of the end-systolic volume during β 1-AAB free time in 10 of the 14 treated Doberman pinchers. Compared to the controls, Doberman pincher treated with Aptamer BC 007 showed a significantly longer survival time (572 days, IQR 442-840 days) vs. control group 1 (266 days, IQR 97-438 days; log rank: $p = 0.009$) and control group 2 (229 days, IQR 174-319 days; log rank: $p = 0,012$).

The results of this study demonstrate Aptamer BC 007 is safe for use in Doberman pinchers with autoantibody-associated dilated cardiomyopathy and a successful neutralization of the β 1-AAB can be achieved. In addition, it was shown the treatment has a significant positive effect on the survival time.

This study is a pilot study with a relatively small study

population. Therefore, the results should be confirmed by a larger study. However, the present results suggest that treatment with Aptamer BC 007 provides a new and promising therapeutic option for Doberman pinchers as well as for people with autoantibody-associated dilated cardiomyopathy.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Anderton SM. Peptide-based immunotherapy of autoimmunity: a path of puzzles, paradoxes and possibilities. *Immunology* 2001; 104: 367-76.

Baba A, Akaishi M, Shimada M, Monkawa T, Wakabayashi Y, Takahashi M, Nagatomo Y, Yoshikawa T. Complete elimination of cardiodepressant IgG3 autoantibodies by immunoabsorption in patients with severe heart failure. *Circ J* 2010a; 74: 1372-8.

Baba A, Akaishi M, Shimada M, Monkawa T, Wakabayashi Y, Takahashi M, Nagatomo Y, Yoshikawa T. Complete elimination of cardiodepressant IgG3 autoantibodies by immunoabsorption in patients with severe heart failure. *Circulation Journal* 2010b; 74: 1372-8.

Becker N-P, Müller J, Göttel P, Wallukat G, Schimke I. Cardiomyopathy — An approach to the autoimmune background. *Autoimmunity Reviews* 2017a; 16: 269-86.

Becker NP, Muller J, Gottel P, Wallukat G, Schimke I.

Cardiomyopathy - An approach to the autoimmune background. *Autoimmun Rev* 2017b; 16: 269-86.

Becker NP, Goettel P, Mueller J, Wallukat G, Schimke I. Functional autoantibody diseases: Basics and treatment related to cardiomyopathies. *Frontiers In Bioscience* 2019a; Landmark: 14-.

Becker NP, Goettel P, Mueller J, Wallukat G, Schimke I. Functional autoantibody diseases: Basics and treatment related to cardiomyopathies. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)* 2019b; 24: 48-95.

Beier P, Reese S, Holler PJ, Simak J, Tater G, Wess G. The role of hypothyroidism in the etiology and progression of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2015; 29: 141-9.

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2001; 69: 89-95.

Boivin V, Beyersdorf N, Palm D, Nikolaev VO, Schlipp A, Muller J, Schmidt D, Kocoski V, Kerkau T, Hunig T, Ertl G, Lohse MJ, Jahns R. Novel receptor-derived cyclopeptides to treat heart failure caused by anti-beta1-adrenoceptor antibodies in a human-analogous rat model. *PLoS One* 2015; 10: e0117589.

Borda E, Pascual J, Cossio P, De La Vega M, Arana R, Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 679-86.

Bornholz B, Weidtkamp-Peters S, Schmitmeier S, Seidel CA, Herda LR, Felix SB, Lemoine H, Hescheler J, Nguemo F, Schafer C, Christensen MO, Mielke C, Boege F. Impact of human autoantibodies on beta1-adrenergic receptor conformation, activity, and internalization. *Cardiovascular Research* 2013; 97: 472-80.

Bornholz B, Roggenbuck D, Jahns R, Boege F. Diagnostic and therapeutic aspects of beta1-adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Autoimmunity Reviews* 2014; 13: 954-62.

Bornholz B, Benninghaus T, Reinke Y, Felix SB, Roggenbuck D, Jahns-Boivin V, Jahns R, Boege F. A standardised FACS assay based on native, receptor transfected cells for the clinical diagnosis and monitoring of beta1-adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine* 2016; 54: 683-91.

Bornholz B, Wallukat G, Roggenbuck D, Schimke I. Chapter 3 - Autoantibodies Directed Against G-Protein-Coupled Receptors in Cardiovascular Diseases: Basics and Diagnostics. In: *The Heart in Rheumatic, Autoimmune and Inflammatory Diseases*. Nussinovitch U, ed.: Academic Press 2017: 49-63.

Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, James RA, Martin M, Stafford-Johnson M, Smith P, Little C, Attree S. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *Journal of Small Animal Practice* 2008; 49: 26-32.

Boujon CE, Amberger CN. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC) in a Boxer. *Journal of Veterinary Cardiology* 2003; 5: 35-41.

Braz-Ruivo L. An investigation for latent parvovirus DNA in the myocardium and serum antibodies against myosin and laminin in dogs with dilated cardiomyopathy. Guelph: University of Guelph 1999;

Broch K, Murbraech K, Andreassen AK, Hopp E, Aakhus S, Gullestad L. Contemporary outcome in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *American journal of cardiology* 2015; 116: 952-9.

Bruno JG. Predicting the uncertain future of aptamer-based diagnostics and therapeutics. *Molecules* 2015; 20: 6866-87.

Buse C, Altmann F, Amann B, Hauck SM, Poulsen Nautrup C, Ueffing M, Stangassinger M, Deeg CA. Discovering novel targets for autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis* 2008; 29: 1325-32.

Bywater RP. Location and nature of the residues important for ligand recognition in G-protein coupled receptors. *Journal of Molecular Recognition* 2005; 18: 60-72.

Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, Schiaffino S. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1992; 85: 1734-42.

Caforio AL, Goldman JH, Baig MK, Haven AJ, Dalla Libera L, Keeling PJ, McKenna WJ. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression. *Heart* 1997; 77: 62-7.

Caforio AL, Mahon NG, Baig MK, Tona F, Murphy RT, Elliott PM, McKenna WJ. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. *Circulation* 2007; 115: 76-83.

Calvert C, Chapman Jr W, Toal R. Congestive cardiomyopathy in Doberman Pinscher dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1982; 181: 598.

Calvert CA, Brown J. Use of M-mode echocardiography in the diagnosis of congestive cardiomyopathy in Doberman

Pinschers. Journal of the American Veterinary Medical Association 1986; 189: 293-7.

Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ. Efficacy and toxicity of tocainide for the treatment of ventricular tachyarrhythmias in Doberman Pinschers with occult cardiomyopathy. Journal of Veterinary Internal Medicine 1996; 10: 235-40.

Calvert CA, Hall G, Jacobs G, Pickus C. Clinical and pathologic findings in Doberman Pinschers with occult cardiomyopathy that died suddenly or developed congestive heart failure: 54 cases (1984-1991). Journal of the American Veterinary Medical Association 1997a; 210: 505-11.

Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ, Brown J. Signalment, survival, and prognostic factors in Doberman Pinschers with end-stage cardiomyopathy. Journal of Veterinary Internal Medicine 1997b; 11: 323-6.

Calvert CA, Sammarco C, Pickus C. Positive Coombs' test results in two dogs treated with amiodarone. Journal of the American Veterinary Medical Association 2000a; 216: 1933-6,

26.

Calvert CA, Jacobs G, Pickus CW, Smith DD. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with echocardiographic abnormalities. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000b; 217: 1328-32.

Calvert CA, Jacobs GJ, Smith DD, Rathbun SL, Pickus CW. Association between results of ambulatory electrocardiography and development of cardiomyopathy during long-term follow-up of Doberman Pinschers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000c; 216: 34-9.

Calvert CA, Wall M. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with equivocal echocardiographic evidence of dilated cardiomyopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; 219: 782-4.

Calvert CA, Brown J. Influence of antiarrhythmia therapy on survival times of 19 clinically healthy Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy that experienced syncope, ventricular

tachycardia, and sudden death (1985-1998). *Journal of the American Animal Hospital Association* 2004; 40: 24-8.

Calvert CA, Meurs KM. Cardiomyopathy in Doberman Pinchers. In: KIRK'S Current Veterinary Therapy XIV. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier 2009: 800-3.

Camacho P, Fan H, Liu Z, He JQ. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis* 2016; 6: 70-80.

Carnabuci C, Tognetti R, Vezzosi T, Marchesotti F, Patata V, Domenech O. Left shift of the ventricular mean electrical axis in healthy Doberman Pinschers. *J Vet Med Sci* 2019; 81: 620-5.

Chiale PA, Ferrari I, Mahler E, Vallazza MA, Elizari MV, Rosenbaum MB, Levin MJ. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 2001; 103: 1765-71.

Dambach DM, Lannon A, Sleeper MM, Buchanan J. Familial

dilated cardiomyopathy of young Portuguese water dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1999; 13: 65-71.

Damian RT. Molecular Mimicry: Antigen sharing by parasite and host and its consequences. *The American Naturalist* 1964; 98: 129-49.

Dandel M, Wallukat G, Englert A, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R. Long-term benefits of immunoabsorption in beta(1)-adrenoceptor autoantibody-positive transplant candidates with dilated cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure* 2012a; 14: 1374-88.

Dandel M, Wallukat G, Englert A, Lehmkuhl HB, Knosalla C, Hetzer R. Long-term benefits of immunoabsorption in beta(1)-adrenoceptor autoantibody-positive transplant candidates with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2012b; 14: 1374-88.

de Lima GV, Ferreira FDS. N-terminal-pro brain natriuretic peptides in dogs and cats: A technical and clinical review. *Veterinary World* 2017; 10: 1072-82.

Dorffel WV, Felix SB, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, Kleber FX, Baumann G, Reinke P. Short-term hemodynamic effects of immunoabsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997; 95: 1994-7.

Dorffel WV, Wallukat G, Dorffel Y, Felix SB, Baumann G. Immunoabsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *International Journal Cardiology* 2004; 97: 529-34.

Dukes-McEwan J, Borgarelli M, Tidholm A, Vollmar AC, Häggström J. Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Cardiology* 2003; 5: 7-19.

Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl 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. *European Heart Journal* 2008; 29: 144-6.

Ellison DH. The physiologic basis of diuretic synergism: its role in treating diuretic resistance. *Ann Intern Med* 1991; 114: 886-94.

Ettinger SJ, Benitz AM, Ericsson GF, Cifelli S, Jernigan AD, Longhofer SL, Trimboli W, Hanson PD. Effects of enalapril maleate on survival of dogs with naturally acquired heart failure. The Long-Term Investigation of Veterinary Enalapril (LIVE) Study Group. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1998; 213: 1573-7.

Ettinger SJ. Therapy of Arrhythmias. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine - diseases of the dog and cat*. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier 2010: 1225-35.

Everett RM, McGann J, Wimberly HC, Althoff J. Dilated cardiomyopathy of Doberman Pinschers: retrospective histomorphologic evaluation of heart from 32 cases. *Veterinary Pathology* 1999; 36: 221-7.

Famulok M, Mayer G. Aptamers and SELEX in Chemistry &

Biology. Chemistry & Biology 2014; 21: 1055-8.

Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G. Hemodynamic effects of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *Journal of American College of Cardiology* 2000; 35: 1590-8.

Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, Elies R, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Reosenbaum M, Hoebke J. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1- adrenergic receptor. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 182: 59-65.

Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning of the cDNA for the human beta 1- adrenergic receptor. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 1987; 84: 7920-4.

Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91: 1964-8.

Fuentes VL, Corcoran B, French A, Schober KE, Kleemann R, Justus C. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of pimobendan in dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16: 255-61.

Fujinami RS, Oldstone MB, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 1983; 80: 2346-50.

Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985; 230: 1043-5.

Geraghty N, Wess G (2011) Vergleich verschiedener Holterkriterien zur Diagnose des arrhythmischen Stadiums der dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann, Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Gilbert SJ, Wotton PR, Bailey AJ, Sims TJ, Duance VC. Alterations in the organisation, ultrastructure and biochemistry of the myocardial collagen matrix in doberman pinschers with dilated cardiomyopathy. Res Vet Sci 2000; 69: 267-74.

Glatzmeier C, Wess G (2012) Prospektive, randomisierte Studie zum Effekt von Ramipril alleine oder in Kombination mit Sotalol auf die Progression von frühen Rhythmusstörungen bei der Dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann, Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Goetze JP. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. Clinical Chemistry 2004; 50: 1503-10.

Goldman JH, Keeling PJ, Warraich RS, Baig MK, Redwood SR, Dalla Libera L, Sanderson JE, Caforio AL, McKenna WJ. Autoimmunity to alpha myosin in a subset of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Br Heart J* 1995; 74: 598-603.

Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus HA. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *Journal of American College of Cardiology* 1998; 31: 186-94.

Haberland A, Wallukat G, Dahmen C, Kage A, Schimke I. Aptamer neutralization of beta1-adrenoceptor autoantibodies isolated from patients with cardiomyopathies. *Circulation Research* 2011a; 109: 986-92.

Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Aptamer binding and neutralization of beta1-adrenoceptor autoantibodies: basics and a vision of its future in cardiomyopathy treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2011b; 21: 177-82.

Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Aptamer binding and

neutralization of β 1-adrenoceptor autoantibodies: Basics and a vision of its future in cardiomyopathy treatment. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2011c; 21: 177-82.

Haberland A, Wallukat G, Berg S, Schulz AM, Freyse EJ, Vetter R, Salzsieder E, Muller J, Kreutz R, Schimke I. Neutralization of pathogenic beta1-receptor autoantibodies by aptamers in vivo: the first successful proof of principle in spontaneously hypertensive rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2014; 393: 177-80.

Haberland A, Holtzhauer M, Schlichtiger A, Bartel S, Schimke I, Muller J, Dandel M, Lupp PB, Wallukat G. Aptamer BC 007 - A broad spectrum neutralizer of pathogenic autoantibodies against G-protein-coupled receptors. *European Journal Pharmacology* 2016; 789: 37-45.

Hamacher L, Dorfelt R, Muller M, Wess G. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2015; 29: 164-70.

Hamlin RL. Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther* 2007a; 113: 276-95.

Hamlin RL. Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther* 2007b; 113: 276-95.

Harrison DC. Antiarrhythmic drug classification: new science and practical applications. *American Journal of Cardiology* 1985; 56: 185-7.

Hazlett MJ, Maxie MG, Allen DG, Wilcock BP. A retrospective study of heart disease in Doberman Pinscher dogs. *Canadian Veterinary Journal* 1983; 24: 205-10.

Hensley MT, Tang J, Woodruff K, Defrancesco T, Tou S, Williams CM, Breen M, Meurs K, Keene B, Cheng K. Intracoronary allogeneic cardiosphere-derived stem cells are safe for use in dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2017a; 21: 1503-12.

Hensley MT, Tang J, Woodruff K, Defrancesco T, Tou S, Williams CM, Breen M, Meurs K, Keene B, Cheng K.

Intracoronary allogeneic cardiosphere-derived stem cells are safe for use in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Cell Mol Med* 2017b; 21: 1503-12.

Herda LR, Trimpert C, Nauke U, Landsberger M, Hummel A, Beug D, Kieback A, Dorr M, Empen K, Knebel F, Ewert R, Angelow A, Hoffmann W, Felix SB, Staudt A. Effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin G substitution on cardiopulmonary exercise capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *American Heart Journal* 2010; 159: 809-16.

Herda LR, Felix SB, Boege F. Drug-like actions of autoantibodies against receptors of the autonomous nervous system and their impact on human heart function. *British Journal of Pharmacology* 2012; 166: 847-57.

Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol* 2013; 10: 531-47.

Hessel FP, Wegner C, Muller J, Glaveris C, Wasem J. Economic

evaluation and survival analysis of immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *European Journal of Health Economics* 2004; 5: 58-63.

Hetzer R, Dandel M. Early detection of left ventricular dysfunction in patients with mitral regurgitation due to flail leaflet is still a challenge. *Eur Heart J* 2011; 32: 665-7.

Hoebeke J. Molecular mechanisms of anti-G-protein-coupled receptor autoantibodies. *Autoimmunity* 2001; 34: 161-4.

Hogan DF, Green HW. Dilated cardiomyopathy in dogs. In: *KIRK'S Current Veterinary Therapy XIV*. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier 2009: 792-6.

Holler PJ, Wess G. Sphericity index and E-point-to-septal-separation (EPSS) to diagnose dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; 28: 123-9.

Holthoff HP, Zeibig S, Jahns-Boivin V, Bauer J, Lohse MJ, Kaab S, Clauss S, Jahns R, Schlipp A, Munch G, Ungerer M.

Detection of anti-beta1-AR autoantibodies in heart failure by a cell-based competition ELISA. *Circulation Research* 2012; 111: 675-84.

Hosoda K, Nakao K, Mukoyama M, Saito Y, Jougasaki M, Shirakami G, Suga S, Ogawa Y, Yasue H, Imura H. Expression of brain natriuretic peptide gene in human heart. Production in the ventricle. *Hypertension* 1991; 17: 1152-5.

Ishido H, Senzaki H. Torasemide for the treatment of heart failure. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008; 8: 127-32.

Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H, Ogawa S. Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of American College of Cardiology* 2001; 37: 418-24.

Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse MJ, Boege F. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart

failure. *Circulation* 1999; 99: 649-54.

Jahns R, Boivin V, Krapf T, Wallukat G, Boege F, Lohse MJ. Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *Journal of American College of Cardiology* 2000; 36: 1280-7.

Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ. Direct evidence for a β 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 2004a; 113: 1419-29.

Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2004b; 113: 1419-29.

Jahns R, Boivin V, Lohse MJ. beta(1)-Adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2006a; 16: 20-4.

Jahns R, Boivin V, Lohse MJ. Beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats. *Int J Cardiol* 2006b; 112: 7-14.

Jahns R, Boivin V, Schwarzbach V, Ertl G, Lohse MJ. Pathological autoantibodies in cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2008; 41: 454-61.

Jahns R, Boege F. Questionable validity of peptide-based ELISA strategies in the diagnostics of cardiopathogenic autoantibodies that activate G-protein-coupled receptors. *Cardiology* 2015; 131: 149-50.

Jane-wit D, Altuntas CZ, Johnson JM, Yong S, Wickley PJ, Clark P, Wang Q, Popovic ZB, Penn MS, Damron DS, Perez DM, Tuohy VK. Beta 1-adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 2007; 116: 399-410.

Joshi-Barr S, Haberland A, Bartel S, Muller J, Choi T, Wallukat G. High throughput bioassay for beta1-adrenoceptor autoantibody detection. *International Journal Cardiology* 2016;

219: 98-104.

Kasüske N, Wess G (2015) Prospektive, randomisierte Evaluation der Therapie maligner ventrikulärer Arrhythmien beim Dobermann, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Keefe AD, Schaub RG. Aptamers as candidate therapeutics for cardiovascular indications. *Current Opinion in Pharmacology* 2008; 8: 147-52.

Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2010; 9: 537-50.

Kerlin RL, Hendrick MJ. Malignant fibrous histiocytoma and malignant histiocytosis in the dog--convergent or divergent phenotypic differentiation? *Veterinary Pathology* 1996; 33: 713-6.

Kittleson MD. Management of heart failure. In: *Small Animal Cardiovascular Medicine*. Kittleson MD, Kienle RD, eds. St. Louis: Mosby, Inc 1998a: 149-94.

Kittleson MD. Pathophysiology of heart failure. In: Small Animal Cardiovascular Medicine. Kittleson MD, Kienle RD, eds. St. Louis: Mosby, Inc 1998b: 136-49.

Kittleson MD. Primary myocardial disease leading to chronic myocardial failure (dilated cardiomyopathy and related diseases). In: Small Animal Cardiovascular Medicine. Kittleson MD, Kienle RD, eds. St. Louis: Mosby, Inc 1998c: 319-46.

Kluser L, Holler PJ, Simak J, Tater G, Smets P, Rugamer D, Kuchenhoff H, Wess G. Predictors of sudden cardiac death in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 722-32.

Kluser L, Maier ET, Wess G. Evaluation of a high-sensitivity cardiac troponin I assay compared to a first-generation cardiac troponin I assay in Doberman Pinschers with and without dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2019; 33: 54-63.

Knebel F, Bohm M, Staudt A, Borges AC, Tepper M, Jochmann N, Wernicke KD, Felix S, Baumann G. Reduction of morbidity

by immunoabsorption therapy in patients with dilated cardiomyopathy. *International Journal Cardiology* 2004; 97: 517-20.

Konstadoulakis MM, Kroumbouzou H, Tsiamis E, Trikas A, Toutouzas P. Clinical significance of antibodies against tropomyosin, actin and myosin in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology* 1993; 40: 61-7.

Koutinas CK, Mylonakis ME, O'Brien PJ, Leontides L, Siarkou VI, Breitschwerdt EB, Koutinas AF. Serum cardiac troponin I concentrations in naturally occurring myelosuppressive and non-myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Journal* 2012; 194: 259-61.

Kraus MS, Thomason JD, Fallaw TL, Calvert CA. Toxicity in Doberman Pinchers with ventricular arrhythmias treated with amiodarone (1996-2005). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009; 23: 1-6.

Landsberger M, Staudt A, Choudhury S, Trimpert C, Herda LR,

Klingel K, Kandolf R, Schultheiss HP, Kroemer HK, Volker U, Felix SB. Potential role of antibodies against cardiac Kv channel-interacting protein 2 in dilated cardiomyopathy. *American Heart Journal* 2008; 156: 92-9.e2.

Langhorn R, Oyama MA, King LG, Machen MC, Trafny DJ, Thawley V, Willesen JL, Tarnow I, Kjølgaard-Hansen M. Prognostic importance of myocardial injury in critically ill dogs with systemic inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; 27: 895-903.

Langhorn R, Willesen JL. Cardiac troponins in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30: 36-50.

Lee JA, Ruegg JC, Allen DG. Effects of pimobendan, a novel inotropic agent, on intracellular calcium and tension in isolated ferret ventricular muscle. *Clinical Science (London)* 1989; 76: 609-18.

Leuschner F, Li J, Goser S, Reinhardt L, Ottl R, Bride P, Zehelein J, Pfitzer G, Remppis A, Giannitsis E, Katus HA, Kaya Z. Absence of auto-antibodies against cardiac troponin I predicts

improvement of left ventricular function after acute myocardial infarction. *European Heart Journal* 2008; 29: 1949-55.

Liao L, Sindhwani R, Rojkind M, Factor S, Leinwand L, Diamond B. Antibody-mediated autoimmune myocarditis depends on genetically determined target organ sensitivity. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 181: 1123-31.

Liao Y, Cheng L, Tu Y, Zhang J, Dong J, Li S, Tian Y, Peng Y. Mechanism of anti-beta-adrenoceptor antibody mediated myocardial damage in dilated cardiomyopathy. *Journal of Tongji Medical University* 1997; 17: 5-8.

Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation Research* 1989; 64: 97-103.

Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Influence of anti-beta-receptor antibodies on cardiac adenylate cyclase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1990a; 119: 1322-8.

Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Influence of anti-beta-receptor antibodies on cardiac adenylate cyclase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1990b; 119: 1322-8.

Limas CJ, Iakovis P, Anyfantakis A, Kroupis C, Cokkinos DV. Familial clustering of autoimmune diseases in patients with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Cardiology* 2004; 93: 1189-91.

Lobetti R, Dvir E, Pearson J. Cardiac troponins in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16: 63-8.

Lukitsch I, Kehr J, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelha M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M. Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation* 2012; 94: 8-13.

Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahlne A, Guillet JG, Strosberg AD, Hjalmarson A, Hoebeke J.

Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 1990; 86: 1658-63.

Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 1994; 89: 2760-7.

Magnusson Y, Hjalmarson A, Hoebeke J. Beta 1-adrenoceptor autoimmunity in cardiomyopathy. *International Journal Cardiology* 1996; 54: 137-41.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB, American Heart Association, Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee, Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups, Council on Epidemiology and Prevention. 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.

Marquis JK, Grindel JM. Toxicological evaluation of oligonucleotide therapeutics. *Current Opinion Molecular Therapeutics* 2000; 2: 258-63.

Matsui S, Fu ML, Shimizu M, Fukuoka T, Teraoka K, Takekoshi N, Murakami E, Hjalmarson A. Dilated cardiomyopathy defines serum autoantibodies against G-protein-coupled cardiovascular receptors. *Autoimmunity* 1995; 21: 85-8.

Matsui S, Fu ML, Katsuda S, Hayase M, Yamaguchi N, Teraoka K, Kurihara T, Takekoshi N, Murakami E, Hoebeke J, Hjalmarson A. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1997; 29: 641-55.

Matsui S, Persson M, Fu HM, Hayase M, Katsuda S, Teraoka K, Kurihara T, Fu ML. Protective effect of bisoprolol on beta-1 adrenoceptor peptide-induced autoimmune myocardial damage in rabbits. *Herz* 2000; 25: 267-70.

Matsui S, Fu M, Hayase M, Katsuda S, Yamaguchi N, Teraoka K, Kurihara T, Takekoshi N. Transfer of rabbit autoimmune cardiomyopathy into severe combined immunodeficiency mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42 Suppl 1: S99-103.

Matsumoto Y, Park IK, Kohyama K. B-cell epitope spreading is a critical step for the switch from C-protein-induced myocarditis to dilated cardiomyopathy. *American Journal of Pathology* 2007; 170: 43-51.

Mausberg TB, Wess G, Simak J, Keller L, Drogemuller M, Drogemuller C, Webster MT, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Leeb T. A locus on chromosome 5 is associated with dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *PLoS One* 2011; 6: e20042.

McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I,

Morrison CE, Tunstall-Pedoe H, McMurray JJ, Dargie HJ. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet* 1998; 351: 9-13.

Meurs KM. Insights into the heritability of canine cardiomyopathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1998; 28: 1449-57, viii.

Meurs KM, Spier AW, Wright NA, Hamlin RL. Comparison of in-hospital versus 24-hour ambulatory electrocardiography for detection of ventricular premature complexes in mature Boxers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; 218: 222-4.

Meurs KM, Fox PR, Norgard M, Spier AW, Lamb A, Koplitz SL, Baumwart RD. A prospective genetic evaluation of familial dilated cardiomyopathy in the Doberman Pinscher. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21: 1016-20.

Meurs KM, Hendrix KP, Norgard MM. Molecular evaluation of five cardiac genes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2008; 69: 1050-3.

Meurs KM, Lahmers S, Keene BW, White SN, Oyama MA, Mauceli E, Lindblad-Toh K. A splice site mutation in a gene encoding for PDK4, a mitochondrial protein, is associated with the development of dilated cardiomyopathy in the Doberman Pinscher. *Human Genetics* 2012; 131: 1319-25.

Meurs KM, FriedenberG SG, Kolb J, Saripalli C, Tonino P, Woodruff K, Olby NJ, Keene BW, Adin DB, Yost OL, DeFrancesco TC, Lahmers S, Tou S, Shelton GD, Granzier H. A missense variant in the titin gene in Doberman pinscher dogs with familial dilated cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Hum Genet* 2019; 138: 515-24.

Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesebro JH, Tazelaar HD. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992; 326: 77-82.

Miettinen KH, Eriksson S, Magga J, Tuomainen P, Kuusisto J, Vanninen EJ, Turpeinen A, Punnonen KR, Pettersson K, Peuhkurinen KJ. Clinical significance of troponin I efflux and

troponin autoantibodies in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure* 2008; 14: 481-8.

Milani-Nejad N, Brunello L, Gyorke S, Janssen PM. Decrease in sarcoplasmic reticulum calcium content, not myofilament function, contributes to muscle twitch force decline in isolated cardiac trabeculae. *J Muscle Res Cell Motil* 2014; 35: 225-34.

Millat G, Bouvagnet P, Chevalier P, Sebbag L, Dulac A, Dauphin C, Jouk P-S, Delrue M-A, Thambo J-B, Le Metayer P, Seronde M-F, Faivre L, Eicher J-C, Rousson R. Clinical and mutational spectrum in a cohort of 105 unrelated patients with dilated cardiomyopathy. *European Journal of Medical Genetics* 2011; 54: e570-e5.

Miller MS, Tilley LP, Smith Jr. FWK, Fox PR. Electrocardiography. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*, 2nd edn. Fox PR, Sisson D, Moise NS, eds. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1999: 67-106.

Missov ED, De Marco T. Clinical insights on the use of highly

sensitive cardiac troponin assays. *Clinica chimica acta* 1999; 284: 175-85.

Moise NS. Diagnosis and management of canine arrhythmias. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*, 2nd edn. Fox PR, Sisson D, Moise NS, eds. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1999: 331-85.

Mooney CT. Canine hypothyroidism: A review of aetiology and diagnosis. *New Zealand Veterinary Journal* 2011; 59: 105-14.

Mueller J, Haberland A, Becker N-P, Wenzel K, Wallukat G, Goettel P, Schulze-Rothe S, Schimke I, Golor G, Grossmann M, Sinn A, Steiper M, Yilmaz T, Wallukat A, Davideit H. THE DNA-BASED THERAPEUTIC AGENT BC 007 COMPLETELY NEUTRALIZES AGONISTIC AUTOANTIBODIES DIRECTED AGAINST β 1-ADRENOCEPTORS: RESULTS OF A PHASE 1 TRIAL. *Journal of the American College of Cardiology* 2018; 71: A645.

Mueller J, Haberland A, Wallukat G, Becker N-P, Wenzel K, Goettel P, Schulze-Rothe S, Schimke I, Yilmaz T, Abay A,

Golor G, Grossmann M, Sinn A, Wallukat A, Hönicke A-S, Davideit H, Becker S. The DNA-Based Drug BC 007 neutralizes agonistically acting autoantibodies directed against G protein-coupled receptors - successful mode of action demonstrated in clinical phase 1 trial. *Chimica Oggi - Chemistry Today* 2019; 37(2): 65-7.

Muir WW, Sams RA, Moise NS. Pharmacology and pharmacokinetics of antiarrhythmic drugs. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*, 2nd edn. Fox PR, Sisson D, Moise NS, eds. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1999: 307-30.

Muller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101: 385-91.

Müller J, Haberland A, Wallukat G, Becker N-P, Wenzel K, Göttel P, Schulze-Rothe S, Schimke I, Yilmaz T, Abay A, Golor G, Grossmann M, Sinn A, Hönicke A-S, Davideit H, Becker S. The DNA-Based Drug BC 007 neutralizes agonistically acting

autoantibodies directed against G protein-coupled receptors – Successful mode of action demonstrated in clinical phase 1 trial. *Chim Oggi* 2019; 2: 65-7.

Munch G, Boivin-Jahns V, Holthoff HP, Adler K, Lappo M, Truol S, Degen H, Steiger N, Lohse MJ, Jahns R, Ungerer M. Administration of the cyclic peptide COR-1 in humans (phase I study): ex vivo measurements of anti-beta1-adrenergic receptor antibody neutralization and of immune parameters. *European Journal of Heart Failure* 2012; 14: 1230-9.

Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ETJ, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006; 5: 123-32.

Nikolaev VO, Boivin V, Störk S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ, Jahns R. A novel fluorescence method for the rapid detection of functional β 1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure. *Journal of American College of Cardiology* 2007; 50: 423-31.

Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The diagnostic and clinical significance of anti-muscarinic receptor autoantibodies. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2012; 42: 298-308.

O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004a; 34: 1187-207.

O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2004b; 34: 1187-207.

O'Grady MR, Minors SL, O'Sullivan ML, Horne R. Effect of pimobendan on case fatality rate in Doberman Pinschers with congestive heart failure caused by dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22: 897-904.

O'Grady MR, O'Sullivan ML, Minors SL, Horne R. Efficacy of Benazepril Hydrochloride to delay the progression of occult dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009; 23: 977-83.

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL. Assessment of diastolic function by Doppler echocardiography in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007a; 21: 81-91.

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL. Plasma big endothelin-1, atrial natriuretic peptide, aldosterone, and norepinephrine concentrations in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007b; 21: 92-9.

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Pyle WG, Dawson JF. Evaluation of 10 genes encoding cardiac proteins in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Veterinary Research* 2011; 72: 932-9.

O'Grady M, Horne R. Outcome of 103 asymptomatic Doberman Pinschers: incidence of dilated cardiomyopathy in a longitudinal study (abstract). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995; 9: 199.

O'Grady M, Horne R. The prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: a 4.5 year follow-up (abstract). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1998; 12: 199.

Owczarek-Lipska M, Mausberg TB, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Wess G, Leeb T. A 16-bp deletion in the canine PDK4 gene is not associated with dilated cardiomyopathy in a European cohort of Doberman Pinschers. *Animal Genetics* 2013; 44: 239.

Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2004; 18: 831-9.

Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *American Journal of Veterinary Research* 2007; 68: 42-7.

Oyama MA, Fox PR, Rush JE, Rozanski EA, Lesser M. Clinical

utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2008; 232: 1496-503.

Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA, Fox PR, Reynolds CA, Gordon SG, Bulmer BJ, Lefbom BK, Brown BA, Lehmkuhl LB, Prosek R, Lesser MB, Kraus MS, Bossbaly MJ, Rapoport GS, Boileau JS. Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2009; 235: 1319-25.

Oyama MA, Peddle GD, Reynolds CA, Singletary GE. Use of the loop diuretic torsemide in three dogs with advanced heart failure. *Journal of Veterinary Cardiology* 2011; 13: 287-92.

Oyama MA, Boswood A, Connolly DJ, Ettinger SJ, Fox PR, Gordon SG, Rush JE, Sisson DD, Stepien RL, Wess G, Zannad F. Clinical usefulness of an assay for measurement of circulating N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs

and cats with heart disease. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2013; 243: 71-82.

Paborsky LR, McCurdy SN, Griffin LC, Toole JJ, Leung LL. The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin. *J Biol Chem* 1993; 268: 20808-11.

Pancieria DL. Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987-1992). *Journal of American Veterinary Medical Association* 1994; 204: 761-7.

Pei J, Li N, Chen J, Li X, Zhang Y, Wang Z, Zhang P, Cao K, Pu J. The predictive values of beta1-adrenergic and M2 muscarinic receptor autoantibodies for sudden cardiac death in patients with chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure* 2012; 14: 887-94.

Petric AD, Stabej P, Zemva A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, causes of death and a pedigree review in a related line. *Journal of Veterinary Cardiology* 2002a; 4: 17-24.

Petric AD, Stabej P, Zemva A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, Causes of Death and a Pedigree Review in a Related Line. *J Vet Cardiol* 2002b; 4: 17-24.

Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, Adler Y, Anastasakis A, Böhm M, Duboc D, Gimeno J, de Groote P, Imazio M, Heymans S, Klingel K, Komajda M, Limongelli G, Linhart A, Mogensen J, Moon J, Pieper PG, Seferovic PM, Schueler S, Zamorano JL, Caforio ALP, Charron P. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal* 2016; 37: 1850-8.

Porciello F, Rishniw M, Herndon WE, Biretoni F, Antognoni MT, Simpson KW. Cardiac troponin I is elevated in dogs and cats with azotaemia renal failure and in dogs with non-cardiac systemic disease. *Australian Veterinary Journal* 2008; 86: 390-4.

Posafalvi A, Herkert JC, Sinke RJ, van den Berg MP, Mogensen J, Jongbloed JD, van Tintelen JP. Clinical utility gene card for:

dilated cardiomyopathy (CMD). *European Journal of Human Genetics* 2013; 21

Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21: 238-42.

Recchia FA, Lionetti V. Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Vet Res Commun* 2007; 31 Suppl 1: 35-41.

Reiche D, Bindig M, Boss N, Wangerin G (2003) *Roche-Lexikon Medizin*. Urban & Fischer Verlag, München; Jena. 1 - 2086

Reynolds C, Oyama MA. Biomarkers in the diagnosis of canine heart disease. *Veterinary Focus* 2008; 18(3)

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin

I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-2.

Root-Bernstein R, Fairweather D. Unresolved issues in theories of autoimmune disease using myocarditis as a framework. *Journal of Theoretical Biology* 2015; 375: 101-23.

Rush JE, Keene BW. ECG of the month. The sudden death of a dog with dilatative cardiomyopathy. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1989; 194: 52-3.

Schober KE, Cornand C, Kirbach B, Aupperle H, Oechtering G. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2002; 221: 381-8.

Schroeder NA. Diuretics. In: *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*, 7th edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier 2010: 1212-14.

Schulze W, Kunze R, Wallukat G. Pathophysiological role of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Experimental & Clinical Cardiology* 2005; 10: 170-2.

Seuß AC, Wess G (2016) Outcome und prognostische Faktoren beim Dobermann mit dilatativer Kardiomyopathie im kongestiven Herzversagen, Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Shmilovich H, Danon A, Binah O, Roth A, Chen G, Wexler D, Keren G, George J. Autoantibodies to cardiac troponin I in patients with idiopathic dilated and ischemic cardiomyopathy. *International Journal Cardiology* 2007; 117: 198-203.

Silvestrini P, Piviani M, Alberola J, Rodriguez-Cortes A, Planellas M, Roura X, O'Brien PJ, Pastor J. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. *Veterinary Clinical Pathology* 2012; 41: 568-74.

Simpson S, Edwards J, Ferguson-Mignan TF, Cobb M, Mongan NP, Rutland CS. Genetics of human and canine dilated cardiomyopathy. *International Journal of Genomics* 2015; 2015: 204823.

Singletary GE, Morris NA, Lynne O'Sullivan M, Gordon SG, Oyama MA. Prospective evaluation of NT-proBNP assay to detect occult dilated cardiomyopathy and predict survival in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012; 26: 1330-6.

Sisson D, O'Grady MR, Calvert CA. Myocardial diseases of dogs. In: *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*, 2nd edn. Fox PR, Sisson D, Moise NS, eds. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1999: 581-620.

Sjostrand K, Wess G, Ljungvall I, Haggstrom J, Merveille AC, Wiberg M, Gouni V, Lundgren Willesen J, Hanas S, Lequarre AS, Mejer Sorensen L, Wolf J, Tired L, Kierczak M, Forsberg S, McEntee K, Battaille G, Seppala E, Lindblad-Toh K, Georges M, Lohi H, Chetboul V, Fredholm M, Hoglund K. Breed differences in natriuretic peptides in healthy dogs. *Journal of*

Veterinary Internal Medicine 2014; 28: 451-7.

Smith BR, Pyle GA, Petersen VB, Hall R. Interaction of thyroid-stimulating antibodies with the human thyrotrophin receptor. *J Endocrinol* 1977; 75: 401-7.

Smith CE, Freeman LM, Meurs KM, Rush JE, Lamb A. Plasma fatty acid concentrations in Boxers and Doberman Pinschers. *American Journal of Veterinary Research* 2008; 69: 195-8.

Smucker ML, Kaul S, Woodfield JA, Keith JC, Manning SA, Gascho JA. Naturally occurring cardiomyopathy in the Doberman pinscher: a possible large animal model of human cardiomyopathy? *J Am Coll Cardiol* 1990a; 16: 200-6.

Smucker ML, Kaul S, Woodfield JA, Keith JC, Manning SA, Gascho JA. Naturally occurring cardiomyopathy in the Doberman pinscher: A possible large animal model of human cardiomyopathy? *J Am Coll Cardiol* 1990b; 16: 200-6.

Spotnitz MD, Lesch M. Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus)

myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis. *Progress Cardiovascular Diseases* 2006; 49: 42-57.

Spratt DP, Mellanby RJ, Drury N, Archer J. Cardiac troponin I: evaluation I of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 2005; 46: 139-45.

Stabej P, Leegwater PA, Stokhof AA, Domanjko-Petric A, van Oost BA. Evaluation of the phospholamban gene in purebred large-breed dogs with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Veterinary Research* 2005; 66: 432-6.

Staudt Y, Mobini R, Fu M, Felix SB, Kuhn JP, Staudt A. Beta1-adrenoceptor antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes. *European Journal Pharmacology* 2003; 466: 1-6.

Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno MF, Gimeno AL, Diez C, Laguens RP, Meckert PC, Arana RM. Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects. *Cardiovasc Res* 1976; 10:

613-22.

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 Veterinary Research* 2013; 9: 12.

Stork S, Boivin V, Horf R, Hein L, Lohse MJ, Angermann CE, Jahns R. Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *American Heart Journal* 2006; 152: 697-704.

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332: 78-81.

Summerfield NJ, Boswood A, O'Grady MR, Gordon SG, Dukes-McEwan J, Oyama MA, Smith S, Patteson M, French AT, Culshaw GJ, Braz-Ruivo L, Estrada A, O'Sullivan ML, Loureiro J, Willis R, Watson P. Efficacy of pimobendan in the prevention of congestive heart failure or sudden death in Doberman Pinschers with preclinical dilated cardiomyopathy

(the PROTECT Study). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012; 26: 1337-49.

Swedberg K, Hjalmarson A, Waagstein F, Wallentin I. Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade. *Lancet* 1979; 1: 1374-6.

Swedberg K, Hjalmarson A, Waagstein F, Wallentin I. Beneficial effects of long-term beta-blockade in congestive cardiomyopathy. *British Heart Journal* 1980; 44: 117-33.

Sweet M, Taylor MR, Mestroni L. Diagnosis, prevalence, and screening of familial dilated cardiomyopathy. *Expert Opinion Orphan Drugs* 2015; 3: 869-76.

The BENCH Study Group. The effect of benazepril on survival times and clinical signs of dogs with congestive heart failure: Results of a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled, long-term clinical trial. *Journal of Veterinary Cardiology* 1999; 1: 7-18.

The COVE Study Group. Controlled clinical evaluation of

enalapril in dogs with heart failure: results of the Cooperative Veterinary Enalapril Study Group. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995; 9: 243-52.

The IMPROVE Study Group. Acute and short-term hemodynamic, echocardiographic, and clinical effects of enalapril maleate in dogs with naturally acquired heart failure: results of the Invasive Multicenter PROspective Veterinary Evaluation of Enalapril study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995; 9: 234-42.

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. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1993; 7: 247-52.

Tidholm A, Jonsson L. Dilated cardiomyopathy in the Newfoundland: a study of 37 cases (1983-1994). *Journal of the American Animal Hospital Association* 1996; 32: 465-70.

Tidholm A, Jonsson L. A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases). *Journal of the American Animal Hospital Association* 1997; 33: 544-50.

Tidholm A, Haggstrom J, Jonsson L. Prevalence of attenuated wavy fibers in myocardium of dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1998; 212: 1732-4.

Tidholm A, Häggström J, Borgarelli M, Tarducci A. Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part I: Aetiology, Clinical Characteristics, Epidemiology and Pathology. *The Veterinary Journal* 2001; 162: 92-107.

Tidholm A, Jonsson L. Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy. *Veterinary Pathology* 2005; 42: 1-8.

Tilley LP, Smith Jr. FWK. Electrocardiography. In: *Manual of Canine and Feline Cardiology*. Tilley LP, Smith Jr. FWK, Oyama MA, Sleeper MM, eds. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier 2008: 49-77.

Trimpert C, Herda LR, Eckerle LG, Pohle S, Muller C, Landsberger M, Felix SB, Staudt A. Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy: long-term reduction of cardiodepressant antibodies. *European Journal Clinical Investigation* 2010; 40: 685-91.

Unal H, Jagannathan R, Karnik SS. Mechanism of GPCR-directed autoantibodies in diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2012; 749: 187-99.

Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong HL. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 1991; 88: 5993-7.

Vaughan Williams EM. A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. *Journal Clinical Pharmacology* 1984; 24: 129-47.

Vollmar A, Fox PR, Meurs KM, Liu SK. Dilated cardiomyopathy in juvenile Doberman Pinschers. *Journal of*

Veterinary Cardiology 2003; 5: 23-7.

Volpe M, Carnovali M, Mastromarino V. The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clinical Science (London)* 2016; 130: 57-77.

Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, Wallentin I. Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *British Heart Journal* 1975; 37: 1022-36.

Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, Camerini F, Fowler MB, Silver MA, Gilbert EM, Johnson MR, Goss FG, Hjalmarson A. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. Lancet* 1993; 342: 1441-6.

Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim Acta* 1987a; 46: S634-9.

Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomedica Biochimica Acta* 1987b; 46: S634-9.

Wallukat G, Morwinski M, Kowal K, Forster A, Boewer V, Wollenberger A. Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization. *European Heart Journal* 1991; 12 Suppl D: 178-81.

Wallukat G, Wollenberger A. Autoantibodies to beta 2-adrenergic receptors with antiadrenergic activity from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 581-7.

Wallukat G, Wollenberger A, Morwinski R, Pitschner H-F. Anti- β 1-adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: Mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1995; 27: 397-406.

Wallukat G, Reinke P, Dorffel WV, Luther HP, Bestvater K, Felix SB, Baumann G. Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *International Journal Cardiology* 1996a; 54: 191-5.

Wallukat G, Reinke P, Dorffel WV, Luther HP, Bestvater K, Felix SB, Baumann G. Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *Int J Cardiol* 1996b; 54: 191-5.

Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, Muller J. Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz* 2000; 25: 261-6.

Wallukat G, Muñoz Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Duchon D, Diaz Ramirez I, Borges AC, Schimke I. Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon: Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. *Journal of American College of Cardiology* 2010a; 55: 463-8.

Wallukat G, Munoz Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Duchon D, Diaz Ramirez I, Borges AC, Schimke I. Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. *J Am Coll Cardiol* 2010b; 55: 463-8.

Wallukat G, Schimke I. Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. *Seminars in Immunopathology* 2014; 36: 351-63.

Wallukat G, Muller J, Haberland A, Berg S, Schulz A, Freyse EJ, Vetter R, Salzsieder E, Kreutz R, Schimke I. Aptamer BC007 for neutralization of pathogenic autoantibodies directed against G-protein coupled receptors: A vision of future treatment of patients with cardiomyopathies and positivity for those autoantibodies. *Atherosclerosis* 2016a; 244: 44-7.

Wallukat G, Müller J, Haberland A, Berg S, Schulz A, Freyse E-J, Vetter R, Salzsieder E, Kreutz R, Schimke I. Aptamer BC007 for neutralization of pathogenic autoantibodies directed

against G-protein coupled receptors: A vision of future treatment of patients with cardiomyopathies and positivity for those autoantibodies. *Atherosclerosis* 2016b; 244: 44-7.

Wallukat G, Pruss H, Muller J, Schimke I. Functional autoantibodies in patients with different forms of dementia. *PLoS One* 2018; 13: e0192778.

Wang P, Yang Y, Hong H, Zhang Y, Cai W, Fang D. Aptamers as therapeutics in cardiovascular diseases. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18: 4169-74.

Weinberger I, Rotenberg Z, Fuchs J, Ben-Sasson E, Agmon J. Amiodarone-induced thrombocytopenia. *Arch Intern Med* 1987; 147: 735-6.

Wenzel K, Schulze-Rothe S, Muller J, Wallukat G, Haberland A. Difference between beta1-adrenoceptor autoantibodies of human and animal origin-Limitations detecting beta1-adrenoceptor autoantibodies using peptide based ELISA technology. *PLoS One* 2018; 13: e0192615.

Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJ, Maeurer J, Hartmann K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med* 2010a; 24: 533-8.

Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJ, Maeurer J, Hartmann K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010b; 24: 533-8.

Wess G, Simak J, Mahling M, Hartmann K. Cardiac troponin I in Doberman Pinschers with cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010c; 24: 843-9.

Wess G, Maurer J, Simak J, Hartmann K. Use of Simpson's method of disc to detect early echocardiographic changes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010d; 24: 1069-76.

Wess G, Schulze A, Geraghty N, Hartmann K. Ability of a 5-minute electrocardiography (ECG) for predicting arrhythmias in Doberman Pinschers with cardiomyopathy in comparison with a

24-hour ambulatory ECG. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010e; 24: 367-71.

Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *American Journal of Veterinary Research* 2011; 72: 642-9.

Wess G, Domenech O, Dukes-McEwan J, Haggstrom J, Gordon S. European Society of Veterinary Cardiology screening guidelines for dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Cardiology* 2017a; 19: 405-15.

Wess G, Domenech O, Dukes-McEwan J, Haggstrom J, Gordon S. European Society of Veterinary Cardiology screening guidelines for dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Cardiol* 2017b; 19: 405-15.

Wess G, Wallukat G, Fritscher A, Becker NP, Wenzel K, Muller J, Schimke I. Doberman pinschers present autoimmunity associated with functional autoantibodies: A model to study the autoimmune background of human dilated cardiomyopathy.

PLoS One 2019; 14: e0214263.

Winter RL, Saunders AB, Gordon SG, Buch JS, Miller MW. Biologic variability of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in healthy dogs and dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology* 2017; 19: 124-31.

Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10: 82-93.

Yau P, Dhand NK, Thomson PC, Taylor RM. Retrospective study on the occurrence of canine lymphoma and associated breed risks in a population of dogs in NSW (2001-2009). *Aust Vet J* 2017; 95: 149-55.

Zuo L, Du Y, Ma J, Wang K, Zhao Y, Bai F, Wu B, Ma X, Liu H. Pro-arrhythmic action of autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenoceptor and its underlying molecular mechanisms. *International Journal Cardiology* 2015; 198: 251-8.

VIII. DANKSAGUNG

Zum Schluss möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf irgendeine Art und Weise bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Als erstes danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Wess für die Ermöglichung dieser Arbeit und seine Unterstützung. Vielen Dank lieber Gerhard auch dafür, dass ich von dir und in deiner Abteilung so viel, sowohl wissenschaftlich als auch praktisch, lernen durfte. Es war schon lange mein Traum mich im Bereich Kardiologie weiterzubilden. Durch die Stelle in deiner Abteilung hast du mir diesen Wunsch erfüllt.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Johannes Müller, Dr. Gerd Wallukat, Dr. Niels-Peter Becker, Dr. Katrin Wenzel und vor allem Prof. Dr. Ingolf Schimke der Berlin Cures Holding AG in Berlin für die gute Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön möchte ich meinen Eltern aussprechen. Vielen Dank für eure unendliche Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne euch hätte ich diese Arbeit nicht schreiben können.

Weiterhin danke ich dir, Philip. Deine Unterstützung hat das Ganze sehr viel leichter gemacht. Ich weiß gar nicht was ich

ohne dich gemacht hätte. Ich wäre auf jeden Fall einige Male mehr verzweifelt, wenn du nicht so oft beim Schreiben neben mir gesessen hättest. Geteiltes Leid ist bekanntermaßen halbes Leid. Auch wenn wir schon schönere Zeiten, als diese letzte Schreibphase erlebt haben, haben wir sie gut gemeistert. Vielen Dank für deine tolle Art. Ich liebe dich.

Ein Dank geht auch an meine ganze Familie. Ich danke meinen Geschwistern Simone, Jochen und Susanne sowie meiner „Schwiegerfamilie“ Wiebke und Franz, und Catherine und Thomas für eure Unterstützung und euer Verständnis, wenn ich nicht immer so viel Zeit für euch hatte, wie ich es gerne gehabt hätte. Ein besonderer Dank geht hier vor allem auch an Thomas für das Korrekturlesen und deine wertvollen Ratschläge. Vielen Dank, dass du dir die Zeit genommen hast, obwohl du eigentlich gar keine hattest!

Last but not least, danke ich dem gesamten Kardioteam für die tolle Zeit. Danke an Marin, Lena und Sabine für all euer weitergegebenes Wissen und die tolle Zusammenarbeit. Vielen Dank an Jenny, Steffi, Nora, Lilith und auch die „Neuen“ Jana und Jill für die schöne und oft lustige Zeit. Ohne euch hätte es nicht mal halb so viel Spaß gemacht. Ich hoffe wir bleiben auch weiterhin in Kontakt.