

Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
der Justus-Liebig Universität Gießen

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. G. Erhardt

**Molekulargenetische Charakterisierung
des feline*n* *CACNA1S*-Gens
im Zusammenhang mit der
Hypokaliämischen Periodischen Paralyse
(HypoPP) der Burmakatze**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.)
beim Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig Universität Gießen

eingereicht von
Dipl. Ing. (FH) M.Sc. Christiane Schultheiß
aus Mainz

Gießen 2008

Mit freundlicher Genehmigung des Fachbereichs Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement

Dekan: Prof. Dr. Herrmann

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Otte

1. Gutachter: Prof. Dr. Erhardt

2. Gutachter: Prof. Dr. Dzapo

Prüfer: Prof. Dr. Pallauf

Prüfer: Prof. Dr. Reiner

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2008

Die Untersuchungen des Projekts wurden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs GK 455 "Molekulare Veterinärmedizin".

Meinen Eltern

There is nothing like looking, if you want to find something. You certainly usually find something, if you look, but it is not always quite the something you were after.

J.R.R. Tolkien, *The Hobbit*

- oder -

Felix, qui potuit rerum cognoscere causas.
Glücklich, wer den Dingen auf den Grund gehen kann.
Vergil, *Georgica*

Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung und Fragestellung.....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Geschichte und Organisation der Katzenzucht	2
2.1.1 Domestikation der Hauskatze	2
2.1.2 Organisation der Katzenzucht	5
2.1.2.1 Internationale Zuchtverbände	5
2.1.2.2 Zuchtrichtlinien der FIFé und des 1.DEKZV	7
2.1.3 Herkunft und Zucht der Burmakatze	8
2.1.3.1 Zuchtgeschichte der Burma	8
2.1.3.2 Heutiger Rassestandard der Burmakatze	12
2.2 Grundlagen und Methoden der Genomanalyse.....	14
2.2.1 Vergleichende Kartierung	14
2.2.2 Identifizierung interessanter Gene und Genregionen.....	16
2.2.2.1 Markeransatz.....	16
2.2.2.2 Kandidatengenansatz	17
2.2.3 Techniken zur Darstellung genetischer Variation	18
2.3 Stand der Genomanalyse bei der Katze	22
2.3.1 Das feline Genomprojekt.....	22
2.3.2 Sequenzierung des Katzensgenoms	22
2.3.3 Entwicklung von Genkarten der Katze	23
2.3.4 Modelle für Erbkrankheiten	26
2.3.5 Verwendung von Gentests.....	28
2.4 Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP)	30
2.4.1 Hypokaliämische Periodische Paralyse der Burmakatze	30
2.4.2 Hypokaliämische Periodische Paralyse des Menschen.....	33
2.4.2.1 Genetische Ursachen der HypoPP des Menschen	33
2.4.2.2 Subtypen der HypoPP des Menschen	34
2.4.2.2.1 Calciumkanal-Myopathie (HypoPP-1)	34
2.4.2.2.2 Natriumkanal-Myopathie (HypoPP-2)	37
2.4.2.2.3 Kaliumkanal-Myopathie (HypoPP-3).....	39
2.4.3 Gegenüberstellung der Krankheitsbilder der HypoPP von Mensch und Katze	40
3 Material.....	43
3.1 Tiere und Probenmaterial	43
3.1.1 Datenmaterial	43
3.1.1.1 Burmakatzenfamilie.....	43
3.1.1.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus Datenbanken	44
3.1.2 Probenmaterial.....	46
3.1.2.1 Proben zur DNA-Analyse.....	46
3.1.2.2 Proben zur RNA-Analyse	47
3.2 Oligonukleotide	48

INHALTSVERZEICHNIS

3.3 Größenmarker.....	50
3.4 Verbrauchsmaterial	50
3.4.1 Reaktionskits	50
3.4.2 Bakterienstamm und Vektor.....	50
3.4.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme.....	50
3.4.4 Filter, Papier, Glas- und Kunststoffwaren.....	53
3.5 Geräte	53
3.6 Software	54
4 Methoden	55
4.1 Analyse des Katzenstammbaums.....	55
4.1.1 Berechnung von Inzuchtkoeffizienten.....	55
4.1.2 Prüfung des Erbgangs der HypoPP	55
4.2 Isolierung von Nukleinsäuren	55
4.2.1 DNA-Extraktion	55
4.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA	55
4.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA	55
4.2.2 Isolierung von RNA	56
4.2.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA	56
4.2.2.2 Isolierung von PolyA ⁺ -RNA.....	57
4.3 Reverse Transkription	57
4.3.1 Erststrang-cDNA-Synthese	57
4.3.2 Synthese von cDNA-Enden (RACE)	58
4.4 Polymerase-Kettenreaktion mit cDNA	59
4.4.1 Amplifikation des <i>GAPDH</i> -Fragments	59
4.4.2 Amplifikation einzelner <i>CACNAIS</i> -Fragmente	60
4.4.3 RACE-PCR.....	62
4.4.4 one-step RT-PCR.....	64
4.4.5 Expressionsanalyse des <i>CACNAIS</i> -Gens.....	65
4.5 Polymerase-Kettenreaktion mit genomischer DNA	67
4.5.1 Amplifikation zur Identifizierung von Polymorphismen	67
4.5.2 Amplifikation genetischer Marker	68
4.5.2.1 Mikrosatelliten-PCR	68
4.5.2.2 PCR-RFLPs	69
4.6 Polymerase-Kettenreaktion mit Plasmid-DNA.....	71
4.7 <i>Cycle Sequencing</i> Reaktionen	72
4.8 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	73
4.9 Klonierung von PCR-Produkten	73
4.10 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	74
4.11 Gelelektrophoresen	76
4.11.1 Agarosegele	76
4.11.2 Fragmentlängenanalyse am ALFexpress TM	76
4.11.3 Sequenzierung am ABI PRISM 377 [®]	77
4.12 Analyse von mRNA- und Protein-Sequenzen	77
4.13 Vergleich von Allel- und Genotypfrequenzen	78
4.14 Schätzung der Haplotypen und Haplotypfrequenzen.....	79
4.15 Assoziationsanalyse	79

5 Ergebnisse	80
5.1 Untersuchung des Katzenstammbaums	80
5.1.1 Inzuchtkoeffizienten und Verwandtschaftsmatrix.....	80
5.1.2 Erbgang der HypoPP in der Katzenfamilie	81
5.2 Sequenz und Expression der <i>CACNA1S</i> -mRNA	82
5.2.1 Basenfolge der mRNA	82
5.2.2 Bioinformatische Ergebnisse.....	85
5.2.2.1 Analyse der mRNA-Sequenz.....	85
5.2.2.2 Interspezies-Vergleich der Untereinheiten von Calciumkanälen	86
5.2.2.3 Schätzung der Transmembransegmente	88
5.2.3 Gewebespezifische Expression des feline <i>CACNA1S</i>	89
5.3 Analyse genomischer Fragmente des <i>CACNA1S</i>	91
5.3.1 Sequenzinformation der PCR-Produkte	91
5.3.2 Genomische Struktur in analysierten Fragmenten	91
5.3.3 Genetische Polymorphismen in <i>CACNA1S</i> -Fragmenten	92
5.4 Physikalische Kartierung	94
5.5 Genetische Marker	96
5.5.1 Mikrosatellit <i>GIKA001</i>	96
5.5.1.1 Allele des Mikrosatelliten <i>GIKA001</i>	96
5.5.1.2 Genotypen des Mikrosatelliten <i>GIKA001</i>	97
5.5.2 Single nucleotide polymorphisms (SNPs).....	99
5.5.2.1 Nukleotidvarianten der SNPs	99
5.5.2.2 Allele und Genotypen der SNPs	100
5.5.2.3 Haplotypen aus SNPs	103
5.6 Assoziationsanalyse	104
6 Diskussion	107
6.1 HypoPP der Burmakatze	107
6.1.1 Eignung des Probenmaterials	107
6.1.2 Erbgang der HypoPP der Katze.....	108
6.2 Charakterisierung des feline <i>CACNA1S</i>	109
6.2.1 Auswahl als Kandidatengen der HypoPP.....	109
6.2.2 Vergleich des <i>CACNA1S</i> bei Mensch und Katze	110
6.2.3 Genetische Variabilität bei Katzen	113
6.3 Ausschluss des <i>CACNA1S</i> als Kandidatengen.....	116
6.4 Methoden zur Klärung der Krankheitsursache	118
6.4.1 Untersuchung funktioneller Kandidatengene.....	118
6.4.2 Identifizierung positioneller Kandidatengene durch Marker	120
7 Zusammenfassung	122
8 Summary	125
9 Literaturverzeichnis	127
10 Anhang	138

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chronologische Entwicklung von Genkarten der Katze mit Markeranzahl und Markerdichte im Zeitraum 1999 bis 2007.....	25
Tabelle 2: Übersicht derzeit bekannter durch <i>missense</i> Mutationen verursachter Erbkrankheiten bei Katzen mit Nennung des jeweils betroffenen Gens.....	27
Tabelle 3: Gegenüberstellung wesentlicher Merkmale des Krankheitsbildes der HypoPP bei Mensch und Katze.....	40
Tabelle 4: Verteilung der Burmakatzen (n = 64) des Panels in Merkmalsklassen unter Annahme verschiedener Modelle.....	44
Tabelle 5: Zusammenfassende Übersicht der DNA-Probenzahl nach Rasse innerhalb der Haarlängenkategorien nach WCF (2007).....	46
Tabelle 6: Übersicht der RNA-Proben zur Identifikation der mRNA-Sequenz und der Expressionsanalysen des <i>CACNAIS</i>	47
Tabelle 7: Übersicht aller verwendeten Primer zur Amplifikation von <i>CACNAIS</i> -, <i>GAPDH</i> - und pGEM-T®-Fragmenten mit der jeweiligen Basensequenz.....	48
Tabelle 8: Reaktionsansatz der PCR des feline <i>GAPDH</i> -Fragments.....	60
Tabelle 9: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des <i>GAPDH</i> -Fragments.....	60
Tabelle 10: Primerkombinationen und spezifische Modifikationen der PCR-Bedingungen für Fragmente des <i>CACNAIS</i> cDNA.....	61
Tabelle 11: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der <i>CACNAIS</i> -Fragmente auf cDNA-Ebene.....	61
Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Amplifikation von <i>CACNAIS</i> -Fragmenten auf cDNA-Ebene.....	61
Tabelle 13: Reaktionsansätze von 3'RACE-PCR und <i>nested</i> 3'RACE-PCR.....	62
Tabelle 14: Reaktionsansätze der 5'RACE-PCR zur Amplifikation des 5'Endes der <i>CACNAIS</i> cDNA.....	62
Tabelle 15: Bedingungen der 3'RACE-PCR zur Amplifikation des 3'Endes der <i>CACNAIS</i> cDNA.....	63
Tabelle 16: Bedingungen der <i>nested</i> 3'RACE-PCR zur Amplifikation des 3'Endes der <i>CACNAIS</i> cDNA.....	63
Tabelle 17: Bedingungen der 5'RACE-PCR zur Amplifikation des 5'Endes der <i>CACNAIS</i> cDNA.....	64
Tabelle 18: Bedingungen der <i>nested</i> 5'RACE-PCR zur Amplifikation des 5'Endes der <i>CACNAIS</i> cDNA.....	64
Tabelle 19: Reaktionsansatz zur Durchführung der <i>one-step</i> RT-PCR der <i>CACNAIS</i> cDNA.....	65
Tabelle 20: Bedingungen der <i>oneStep</i> RT-PCR zur Amplifikation von <i>CACNAIS</i>	65
Tabelle 21: Reaktionsansatz zur Amplifikation der cDNA (Exon 43 bis 3'UTR) zur Expressionsanalyse.....	66
Tabelle 22: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der cDNA (Exon 43 bis 3'UTR) zur Expressionsanalyse.....	66
Tabelle 23: Allgemeine Bedingungen für die PCR von DNA-Fragmenten des <i>CACNAIS</i> mit FailSafe™ PCR System.....	67
Tabelle 24: Primerkombinationen und spezifische Modifikationen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten des <i>CACNAIS</i>	67
Tabelle 25: Allgemeiner Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten des <i>CACNAIS</i> mit FailSafe™ PCR System.....	68
Tabelle 26: Reaktionsansatz zur Amplifikation des Mikrosatelliten <i>GIKA001</i>	68
Tabelle 27: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des Mikrosatelliten <i>GIKA001</i>	69

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 28: Primerkombinationen und spezifische Modifikationen für PCR-RFLPs.....	69
Tabelle 29: Reaktionsansatz zur Amplifikation von PCR-RFLPs	70
Tabelle 30: Bedingungen für die Amplifikation von PCR-RFLPs	70
Tabelle 31: Übersicht verwendeter Restriktionsendonukleasen	70
Tabelle 32: Reaktionsansatz zur Amplifikation von Plasmidinsertionen durch Kolonien-PCR	71
Tabelle 33: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Plasmidinsertionen durch Kolonien-PCR	72
Tabelle 34: Reaktionsansätze für Sequenzierreaktionen mit Plasmid-DNA und PCR-Produkten	73
Tabelle 35: Bedingungen der Sequenzierreaktionen mit Plasmid-DNA und PCR-Produkten	73
Tabelle 36: Inzuchtkoeffizienten bei Burmakatzen im gesamten Pedigree	80
Tabelle 37: Übersicht sequenzierter <i>CACNAIS</i> Fragmente mit Zuordnung zu humanen DNA-Fragmenten und Datenbankeinträgen.....	91
Tabelle 38: Größe und Exon-Intron-Grenzen von genomischen Fragmenten des felines <i>CACNAIS</i>	92
Tabelle 39: Art und Anzahl genetischer Polymorphismen in genomischen Fragmenten des <i>CACNAIS</i> -Gens	93
Tabelle 40: Benennung und Positionen genetischer Polymorphismen in Fragmenten des <i>CACNAIS</i> -Gens im Vergleich zur Referenzsequenz	93
Tabelle 41: Anzahl beobachteter Allele des Mikrosatelliten <i>GIKA001</i> in Katzen verschiedener Rassen.....	96
Tabelle 42: Anzahl und Frequenz der beobachteten Allele des Mikrosatelliten <i>GIKA001</i> in Katzenrassen gruppiert nach Haarlänge	97
Tabelle 43: Anzahl und Frequenz der Genotypen des Mikrosatelliten <i>GIKA001</i> bei Perser-, Burma- und Europäischen Kurzhaarkatzen.....	99
Tabelle 44: Bezeichnung und Position der verwendeten SNPs mit Referenzsequenz.....	100
Tabelle 45: Anzahl der SNP-Allele innerhalb verschiedener Katzenrassen	101
Tabelle 46: Frequenz in % der SNP-Allele der verschiedenen Katzenrassen innerhalb der Haarlängenkategorien.....	101
Tabelle 47: Anzahl der SNP-Genotypen des <i>CACNAIS</i> -Gens bei verschiedenen Katzenrassen	102
Tabelle 48: Frequenz in % der SNP-Genotypen des <i>CACNAIS</i> -Gens bei verschiedenen Katzenrassen innerhalb Haarlängenkategorien	102
Tabelle 49: Frequenzen beobachteter Allele in Burmakatzen entsprechend der Merkmalsklasse nach Model I und Wahrscheinlichkeitswert.....	104
Tabelle 50: Frequenzen beobachteter Allele in Burmakatzen entsprechend Merkmalsklasse nach Model II	105
Tabelle 51: Darstellung der Frequenzen ausgewählter SNP-Haplotypen im <i>CACNAIS</i> -Gen bei Burmakatzen nach Merkmalsklasse nach Model I.....	105
Tabelle 52: Übersicht aller verwendeten DNA-Proben (n = 210) mit Zuordnung zur jeweils angewandten Analyse.....	138
Tabelle 53: Übersicht zur Zuordnung einzelner Burmakatzen in 21 Familien zur Analyse der Haplotypen mittels Famhap [©]	143
Tabelle 54: Verwandtschaftsmatrix der Burmakatzen (n = 64)	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomische Zuordnung der Hauskatze innerhalb der Klasse der Säugetiere (BENSON <i>et al.</i> 2000, WHEELER <i>et al.</i> 2000)	2
Abbildung 2: Typus der Burmakatze in den Dreißiger Jahren. Topaz Mau, eine Tochter der ersten Burmesin Wong Mau (THOMPSON <i>et al.</i> 1943)	10
Abbildung 3: Burmakatze während eines HypoPP-Anfalls mit deutlicher Ventroflexion des Kopfes (freundlicherweise überlassen von B. Esser).....	31
Abbildung 4: Schema des humanen <i>CACNA1S</i> Proteins mit markierten Positionen der HypoPP-1 auslösenden Argininsubstitutionen (STERNBERG <i>et al.</i> 2001).....	35
Abbildung 5: Schema des humanen <i>SCN4A</i> Proteins mit markierten Positionen der HypoPP-2 auslösenden Argininsubstitutionen (STERNBERG <i>et al.</i> 2001)	37
Abbildung 6: Ausschnitt des Pedigrees der Burmakatzenfamilie	43
Abbildung 7: Übersicht aller aus den Datenbanken des NCBI verwendeten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen.....	45
Abbildung 8: Schematische Positionen einzelner <i>CACNA1S</i> -Fragmente mit Primerbezeichnung zur Identifizierung der mRNA-Sequenz	82
Abbildung 9: Nukleotidsequenz der alpha-Untereinheit des felines spannungs-abhängigen Calciumionenkanals <i>CACNA1S</i> (Accession Nummer DQ128075)	84
Abbildung 10: Schematischer Überblick zu Position und Größe der RT-PCR Fragmente der felines <i>CACNA1S</i> mRNA mit Primerbezeichnung	85
Abbildung 11: Clusteranalyse der mRNA-Sequenzen der <i>alpha</i> -Untereinheiten von spannungsabhängigen Calciumkanälen des L-, N- und P/Q-Typs.....	86
Abbildung 12: Verwandtschaftsdiagramm von mRNA-Sequenzen der <i>alpha</i> -Untereinheiten von Calciumkanälen des L-Typs.....	87
Abbildung 13: Transmembrandomänenmodell des felines <i>CACNA1S</i>	88
Abbildung 14: Semi-quantitativer Vergleich der Expression des felines <i>CACNA1S</i> -Gens bei TK5 in Geweben durch <i>two-step</i> RT-PCR.....	89
Abbildung 15: Semi-quantitativer Vergleich der Expression des felines <i>CACNA1S</i> -Gens bei TK6 in Geweben durch <i>two-step</i> RT-PCR.....	90
Abbildung 16: Fluoreszenzsignale der <i>CACNA1S</i> -Sonde im felines Chromosomenpräparat. 95	
Abbildung 17: Q-Banden gefärbtes Metaphasenpräparat der Katze vor (a) und nach der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (b) und Zuordnung im Ideogramm des Chromosoms F1 (c) nach CHO <i>et al.</i> (1997).....	95
Abbildung 18: Darstellung der <i>peaks</i> der Mikrosatellitenallele von zehn Genotypen des Mikrosatelliten <i>G1KA001</i> mit Längenstandards.....	98
Abbildung 19: Darstellung der analysierten SNP-Genotypen <i>CACNA1S</i> im Agarosegel nach PCR-RFLP	100
Abbildung 20: Identifizierte SNP-Haplotypen des <i>CACNA1S</i> -Gens der Katze	103

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
1.DEKZV	1. Deutsche Edelkatzen Züchterverband e.V.
A	Adenin
ABY	Abessiner
APS	Ammoniumpersulfat
B	Cytosin, Guanin oder Thymin
BIR	Britisches Kurzhaar
bp	Basenpaar
BUR	Burma
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>CACNA1S</i>	Gen der α-Untereinheit des Dihydropyridin-sensitiven, spannungsabhängigen Calciumionenkanals
cDNA	<i>copy</i> DNA (komplementäre DNA)
°C	Grad Celsius
CFA	Cat Fanciers' Association
CHA	Karthäuser
cM	centiMorgan
cR	centiRay
D	Adenin, Guanin oder Thymin
DAPI	Diamidinophenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKH, EUR	Europäisches Kurzhaar
EMS	<i>easy mind system</i> (System von Buchstaben und Zahlen für Rassen und Farben)
EXO	Exotisches Kurzhaar
FIFé	Fédération Internationale Féline
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanin
<i>GAPDH</i>	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCCF	The Governing Council of the Cat Fancy
H	Adenin, Cytosin oder Thymin
H ₂ O	Wasser
HHR	Halblanghaarrassen
H _o	beobachtete Heterozygotie
K	Guanin oder Thymin
kb	Kilobasen
<i>KCNE3</i>	Gen des <i>Mink related peptid 2 (MiRP2)</i> ; akzessorische β-Untereinheit des muskulären spannungsabhängigen Natriumionenkanals
KHR	Kurzhaarrassen
LHR	Langhaarrassen
M	Adenin oder Cytosin
M	molar
Mb	Megabasenpaare
MCO	Maine Coon

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	milimolar
mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
n	Anzahl
n. Chr.	nach Christi Geburt
NaAc	Natriumacetat
NFO	Norwegische Waldkatze
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ORI	Orientalisches Kurzhaar
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PER	Perser
pmol	Picomol
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
R	Purine (Adenin oder Guanin)
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
rad	<i>radiation absorbed dose</i> (Einheit für Strahlendosis)
RAG	Ragdoll
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RH	<i>radiation hybrid</i> (Strahlungshybrid)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT	reverse Transkription
RUS	Russisch Blau
S	Cytosin oder Guanin
s	Sekunde
SBI	Heilige Birma
SCN4A	Gen der <i>alpha</i> -Untereinheit des muskulären spannungsabhängigen Natriumionenkanals
SIA	Siam
SIB	Sibirier
SMART	<i>switching mechanism at 5' end of RNA transkript</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
ssDNA	<i>singlestrand</i> DNA (Einzelstrang-DNA)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TICA	The International Cat Association
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer
TUA	Türkische Angora
u	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
V	Adenin, Cytosin oder Guanin
W	Adenin oder Thymin
WCF	World Cat Federation
Y	Pyrimidine (Cytosin oder Thymin)

1 Einleitung und Fragestellung

Katzen und deren wilde Verwandte der Familie *Felidae* haben die Menschheit seit Jahrhunderten fasziniert. Die Domestikation der Katze mündete auch in der Etablierung von Edelkatzenrassen durch künstliche Selektion. Zu den bekannteren Rassen gehört die Burmakatze, deren Beliebtheit in Deutschland in den letzten Jahren wieder zunimmt. Die Zuchtgeschichte der Edelrasse Burma begann 1930 in Amerika mit einer walnussbraunen Katze mit bernsteinfarbenen Augen namens Wong Mau, die von Joseph G. Thompson aus Myanmar exportiert worden war (THOMPSON *et al.* 1943). In der Burmazucht stellt neben anderen Krankheiten die Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP) ein ernstes Problem dar (GRUFFYDD-JONES 1997). Die HypoPP ist eine durch generalisierte Muskelschwächen gekennzeichnete, anfallartig auftretende Erbkrankheit. Neben Gangstörungen durch Ataxien und Paresen an den Gliedmaßen ist die Ventroflexie des Kopfes besonders auffällig (JONES *et al.* 1988, STOLZE *et al.* 2001). Nach §11b Tierschutzgesetz ist die Zucht mit Tieren, bei deren Nachkommen erblich bedingt Schäden, Leiden oder Schmerzen auftreten können verboten (TIERSCHG 2006). Der Tatbestand der „Qualzucht“ ist auch bei der HypoPP prinzipiell gegeben, insbesondere da schwere Verläufe der Anfälle letal ausgehen können.

Beim Menschen wird das mit der HypoPP der Burmakatze klinisch vergleichbare Krankheitsbild der HypoPP durch verschiedene Mutationen in Genen von spannungsabhängigen muskulären Ionenkanälen verursacht (JURKAT-ROTT *et al.* 2002). Durch die vorliegende Arbeit soll die mögliche Beteiligung der *alpha*-Untereinheit des muskulären Dihydropyridin-sensitiven spannungsabhängigen Calciumionenkanals (*CACNA1S*) als funktionelles Kandidatengen am Krankheitsgeschehen bei einer von HypoPP betroffenen Burmakatzenfamilie abgeklärt werden. Mittels der Analyse genetischer Marker soll die Beteiligung an der Pathogenese der HypoPP der Burmakatze untersucht werden. Die Klärung des ursächlichen Gendefekts bei der Burmakatze und die Entwicklung eines Gentests sind wichtige Voraussetzungen, um betroffene Tiere sowie Anlageträger frühzeitig erkennen und von der Zucht ausschließen zu können. Dies ist sowohl aus Sicht der Tierzucht als auch im Sinne des Tierschutzes dringend geboten.

2 Literaturübersicht

2.1 Geschichte und Organisation der Katzenzucht

2.1.1 Domestikation der Hauskatze

Die Katze ist eines der beliebtesten Haustiere, zu der der Mensch nach dem Hund die engsten emotionalen Beziehungen aufgebaut hat. So lebten 2004 etwa 7,5 Millionen Katzen allein in deutschen Haushalten (DITZE 2005). Nicht erfasst sind neben den 1,7 Millionen verwilderten bzw. herrenlosen Katzen die so genannten Hofkatzen (BAUER 2005). Diese dienen im ländlichen Raum der Bekämpfung von Schadnagern, einer Aufgabe, die wohl ursächlich mit der Domestikation der Katze im Zusammenhang stehen dürfte (BENECKE 2001). Die Hauskatze (*Felis silvestris catus* LINNAEUS, 1758) wird in der zoologischen Systematik der Unterfamilie der Echten Katzen zugeordnet (Abbildung 1).

Klasse	<i>Mammalia</i>	Säugetiere
Teilkategorie	<i>Eutheria</i>	Höhere Säuger
Überordnung	<i>Laurasiatheria</i>	
Ordnung	<i>Carnivora</i>	Raubtiere
Unterordnung	<i>Fissipedia</i>	Landraubtierversandte
Familie	<i>Felidae</i>	Katzen
Unterfamilie	<i>Felinae</i>	Echte Katzen
Gattung	<i>Felis</i>	Altwelt-Wildkatzen
Großart	<i>Felis silvestris</i>	Wildkatze
Art	<i>Felis silvestris catus</i>	Hauskatze

Abbildung 1: Taxonomische Zuordnung der Hauskatze innerhalb der Klasse der Säugetiere (BENSON *et al.* 2000, WHEELER *et al.* 2000)

Synonym werden auch die Bezeichnungen *Felis catus* und *Felis domesticus* verwendet. Alle rezenten Rassen der Hauskatze stammen von der Wildkatze *Felis silvestris* ab, bei der innerhalb der Großart drei Formenkreise unterschieden werden (BENECKE 2001). Deren Verbreitungsgebiet umfasst nach CLUTTON-BROCK (1989) weite Teile Europas (Waldwildkatzen, *Felis silvestris silvestris* SCHREBER, 1777), Südwest- und Mittelasien (Steppenwildkatzen, *Felis silvestris ornata* GRAY,

1832) sowie den afrikanischen Kontinent außerhalb Sahara und Regenwaldzone und die Arabische Halbinsel (Falbkatten, *Felis silvestris libyca* FORSTER, 1780). Nach POLLARD (2004) könnte auch die langhaarige Pallaskatze (*Felis manul* oder *Otocolobus manul* PALLAS, 1776) aus Zentralasien an der Entstehung der Hauskatze beteiligt sein. In Indien könnte auch die Rohrkatze (*Felis chaus* Schreber, 1777) Einfluss gehabt haben, die nach YOUNG (1985) auch in Ägypten gelegentlich eingekreuzt wurde. Die verschiedenen Arten der Gattung *Felis* sind auch heute noch ubiquitär in Europa, Asien und Afrika verbreitet (CLUTTON-BROCK 1989).

Die Hauskatze zeigt nach BENECKE (2001) von diesen Wildkatzen Gruppen die engsten Beziehungen zur Afrikanischen Falbkatze (*Felis silvestris libyca*). Diese wird auch von anderen Autoren als wahrscheinlichster Vorfahre angesehen, weil zum einen die ältesten bekannten Belege für domestizierte Katzen aus Ägypten stammen und zum anderen Afrikanische Falbkatten sich viel leichter zähmen lassen als Europäische Wildkatzen. Die Ähnlichkeiten zwischen Fellfarbe und -zeichnung sind nach YOUNG (1985) durch Kreuzungen zwischen Hauskatzen und Europäischen Waldwildkatzen (*Felis silvestris silvestris*) erst nach der Domestikation in Europa entstanden. Bei der Domestikation der Katze gehen viele Autoren von einem Prozess aus, der durch die Sesshaftwerdung des Menschen begünstigt wurde (CLUTTON-BROCK 1989, BENECKE 2001, POLLARD 2004). In Abfällen und Vorratsspeichern der Siedlungen lebende Mäuse und Ratten stellten eine ideale Nahrungsquelle für Katzen dar. Vermutlich wurden in der Siedlung herumstreunende Katzen zunächst geduldet. Nachdem die Menschen aber die Hilfe der Katzen bei der Bekämpfung von Schädigern erkannt hatten, wurde die Katze als Kulturfolger möglicherweise sogar gefördert. Wenn der Mensch zudem die Gesellschaft von Katzen zu schätzen wusste, könnte sich auf diesem Wege dann allmählich der Übergang von der Wildkatze über die halb wilde bzw. gezähmte Katze zur domestizierten Hauskatze vollzogen haben. Entscheidender Faktor im vom Menschen implementierten Prozess der Domestikation ist der Wandel im Erbmaterialeiner Tierart bzw. Population, der durch die Betreuung und Haltung der Tiere beeinflusst wird und zu Änderungen im Verhalten, der Morphologie und der Physiologie führt (YOUNG 1985).

Zahlreiche sichere Hinweise auf die Hauskatze im engeren Sinne stammen aus Ägypten, so dass Nordostafrika nach wie vor zu den frühen Domestikationsgebieten der Katze gezählt wird (YOUNG 1985, CLUTTON-BROCK 1989, MILLER 1996). Verschiedene Funde aus der Zeit des alten Reiches (2665 – 2155 v. Chr.) konnten die gelegentliche Zähmung der Falbkatze belegen. Die eigentliche Domestikation hat wohl erst im Neuen Reich (1551 – 1080 v. Chr.) stattgefunden. Schon in der Frühzeit des

Zusammenlebens waren Katzen beliebte Gesellschafts- bzw. Heimtiere der Ägypter. In der 22. und 23. Dynastie (945 – 715 v. Chr.) erlebte die Katze zudem als heiliges Tier der Göttin Bastet eine besondere religiöse Verehrung, die eine massenhafte Haltung von Katzen zur Folge hatte (BENECKE 2001).

Da aber metrische Vergleiche zwischen altägyptischen Katzen und den frühen Hauskatzen Süd- und Mitteleuropas markante Größendifferenzen aufzeigen, vermutet BENECKE (2001), dass das Herkunftsgebiet der Europäischen Hauskatzen eher in Vorderasien gelegen hat. In Vorderasien besteht eine Kontakt- und Mischzone der drei Formengruppen. Archäologische Funde aus dem frühen Neolithikum Vorderasiens belegen die Anwesenheit von Katzen in agrarischen Siedlungen. Diese Katzen waren nach der heutigen Definition vermutlich noch keine echten Haustiere. Möglicherweise hatte die Beziehung zwischen Mensch und Katze aber schon die Stufe einer gelegentlichen Zähmung erreicht (BENECKE 2001). Der älteste Beleg für diese Art Bindung zwischen Mensch und Katze ist etwa 9500 bis 9200 Jahre alt. VIGNE *et al.* (2004) entdeckten auf Zypern eine mit einem Menschen gemeinsam bestattete Katze. Das Skelett konnte anhand morphologischer Merkmale eindeutig als *Felis silvestris libyca* bestimmt werden. Es weist somit noch keine Merkmale der Domestikation auf, kann aber nach Ansicht der Autoren als gezähmtes Tier betrachtet werden. Konkrete Hinweise auf die Haltung von domestizierten Katzen in Europa anhand kultureller Gegenstände mehren sich erst in der Antike. Der älteste archäologische Beleg der Hauskatze in Europa stammt aus Kassope in Griechenland und wird auf das 1. Jahrhundert v. Chr. datiert. Die in tieferen Schichten (4./3. Jahrhundert v. Chr.) dieser Siedlung gefundenen Knochen stammen alle ausschließlich von Wildkatzen. Nach Mitteleuropa gelangte die Hauskatze hauptsächlich durch die Römer im Zuge der Erweiterung des Römischen Imperiums (BENECKE 2001). In diesen Zeitraum fällt auch die Aufhebung des Embargos, das etwa 1000 Jahre lang den Export der heiligen Tiere aus Ägypten untersagt hatte (YOUNG 1985). An Rhein und Donau trat die Hauskatze seit der frühen Kaiserzeit (1. Jahrhundert n. Chr.) regelmäßig auf. Zum festen Bestandteil der europäischen Haustierfauna kann die Hauskatze nach BENECKE (2001) seit Mitte des ersten nachchristlichen Jahrtausends gezählt werden.

Angesichts der vielen Jahrhunderte des Zusammenlebens von Mensch und Katze sind die Unterschiede zwischen echten Wildkatzen und Hauskatzen überraschend gering geblieben. Die Ursache hierfür liegt nach CLUTTON-BROCK (1989) in der Reproduktion der Katze, die sich bis heute weitgehend dem Eingriff des Menschen entzieht und wie bei Wildtieren durch den Selektionsdruck der Umwelt beeinflusst wird. In Anpassung an die lokalen Bedingungen von Klima und Umwelt haben sich

zahlreiche geographische Rassen entwickelt. Die gezielte Selektion durch den Menschen findet vor allem bei den so genannten Rassekatzen anhand gewünschter Eigenschaften hinsichtlich Aussehen und Verhalten statt. Die Hauskatze selbst ist in der Regel züchterisch wenig beeinflusst worden (BENECKE 2001).

2.1.2 Organisation der Katzenzucht

2.1.2.1 Internationale Zuchtverbände

Heute ist die Zucht von Rassekatzen durch hierarchisch geordnete Zuchtverbände und Zuchtvereine reglementiert. In Deutschland unterliegt die Katzenzucht zudem dem Tierschutzgesetz, das Tierzuchtgesetz hat für Katzen keine Gültigkeit (TIERSCHG 2006, TIERZG 2006). Die Zulassung von Rassen und die Festlegung von Rassestandards erfolgt durch verschiedene internationale Dachverbände. Zu diesen gehören die Australian Cat Federation (ACF), die Cat Fanciers' Association (CFA, USA, Kanada, Japan), die Fédération Internationale Féline (FIFé, Asien, Europa, Mittlerer Osten, Südamerika), The Governing Council of the Cat Fancy (GCCF, Großbritannien), New Zealand Cat Fancy (NZCF), The International Cat Association (TICA, Süd- und Nordamerika, Asien, Europa) und die World Cat Federation (WCF, Afrika, Asien, Australien, Europa, Südamerika). Zwischen den Dachverbänden sind die Rassestandards für etablierte Rassen weitgehend abgestimmt, Abweichungen treten vor allem hinsichtlich der Anerkennung und Neuzulassung von bestimmten Rassen oder auch Farben auf. So sind in der Fédération Internationale Féline (FIFé) 37 Katzenrassen in vier Kategorien (Perser & Exoten, Semi-Langhaar, Kurzhaar & Somali, Siamesen & Orientalische Rassen) zugelassen (FIFÉ 2006). Bei der Cat Fanciers' Association (CFA) werden 37 Rassen anerkannt, die sich zum Großteil mit den zugelassenen Rassen des FIFé überschneiden. Für die neuen Rassen American Bobtail, LaPerm, Sibierer und Ragamuffin sind zudem vorläufige Standards aufgestellt (CFA 2006). Besonders aufgeschlossen bzw. absolut unkritisch gegenüber neuen Rassen ist die World Cat Federation (WCF), die insgesamt 61 verschiedene Katzenrassen der Haarlängenkategorien Langhaar, Semi-Langhaar und Kurzhaar anerkennt (WCF 2006).

Die Mitglieder der Dachverbände sind jeweils autonome nationale Verbände, Vereine oder Vereinigungen, die denselben Regeln hinsichtlich der Rassestandards und Zuchtregeln, der Zwingernamen, der Gestaltung von Ausstellungen und der Ausbildung der Richter folgen. Die ursprünglich europäische Fédération Internationale

Féline (FIFé) zum Beispiel umfasst zurzeit 36 Mitglieder aus 34 Ländern sowie sechs Aspiranten (FIFÉ 2006). Der einzige deutsche Mitgliedsverband des FIFé und zudem Deutschlands ältester und größter Zuchtverband ist der 1. Deutsche Edelkatzen Züchterverband e.V. (1.DEKZV). Dessen Mitglieder sowie Mitglieder freier Verbände können hier Papiere für ihre Tiere beantragen, die nach Überprüfung der Anpaarung beim FIFé eingetragen werden. Hierbei wird zwischen dem Zuchtbuch (*Livre d'origine*, LO) und dem Zuchregister (*Registre Initial et Experimental*, RIEX) unterschieden. Im Zuchtbuch werden nur Katzen eingetragen, deren Ahnen selbst über drei Generationen hinweg auch registriert waren. Tiere aus Kreuzungswürfen oder mit weniger als drei dokumentierten Ahnengenerationen werden im Zuchregister geführt. Alle Tiere erhalten eine Registriernummer, die sich aus dem Ländercode, der Abkürzung des FIFé-Mitgliedsverbands, der Zuordnung zu Zuchtbuch bzw. Zuchregister und einer Tiernummer zusammensetzt. Ein zentrales Zuchtbuch oder Register des FIFé wird nicht geführt, sondern die Tiere werden in verschiedenen nationalen Büchern eingetragen. Alle Mitglieder sind verpflichtet, die Zuchtrichtlinien des FIFé einzuhalten.

Bei anderen Dachverbänden ist die Zucht von Katzen deutlich weniger reglementiert, eindeutige Zuchtrichtlinien werden nicht aufgestellt. Die weltweit größte Organisation zur Registrierung von Rassekatzen ist die Cat Fancier Association (CFA) mit derzeit 653 Mitgliedsverbänden. Die Tiere werden registriert, insofern sie den Rassestandard erfüllen. Zuchtbücher werden nicht veröffentlicht. Bei der Registrierung wird die Anpaarung anhand des Pedigrees überprüft. Bei den meisten Rassen werden dazu die Informationen über fünf Generationen berücksichtigt, bei einigen aber auch nur drei (Devon Rex, Korat, Ragdoll), bei anderen sogar acht Generationen (Burma, Balinese, Abessinier). Besondere Zuchtrichtlinien werden nicht vorgegeben, einzige Vorgabe ist die Erfüllung des Rassestandards, die den zulässigen Phänotyp begrenzt (CFA 2006). In der World Cat Federation (WCF) sind 540 Einzelorganisationen zusammengeschlossen. Innerhalb des Dachverbandes werden Voll- und Patronatsmitglieder unterschieden, denen Unterclubs angegliedert sein können. Vollmitglieder beispielsweise in Deutschland sind Deutsche Edelkatze e.V. und Niederbergischer Katzenverein. Der 1.Klub für Tonkanesen und Tibeter ist über Deutsche Edelkatze e.V. als WCF-Unterclub angegliedert. Jeder der Mitgliedsvereine führt sein eigenes Zuchtbuch in Übereinstimmung mit den Regeln der WCF. Die Zwinger werden über den jeweiligen Verein zentral bei der WCF zugelassen und eingetragen. Die Zucht wird indirekt durch die Rassestandards reglementiert. Einschränkungen werden bei

Rassekreuzungen und Verwandtschaftspaarungen getroffen, spezielle Zuchtrichtlinien hinsichtlich des Umgangs mit Erbkrankheiten sind nicht formuliert (WCF 2006).

Als Katzenzüchter kann man zwar mehreren Vereinen und damit mehreren Dachverbänden angehören, die Zucht selbst darf jedoch nur innerhalb eines Vereins erfolgen, in dem auch der Zwinger gemeldet und registriert ist (CFA 2006, FIFÉ 2006).

2.1.2.2 Zuchtrichtlinien der FIFé und des 1.DEKZV

Die Zuchtregeln des FIFé umfassen Vorschriften hinsichtlich Tierkennzeichnung und Registrierung, Haltung, Verkauf und Reproduktion (Mindestalter für erste Belegung, Häufigkeit zugelassener Deckungen), die für alle Mitgliedsverbände verbindlich sind (FIFÉ 2006). Von der Zucht generell ausgeschlossen sind Tiere ohne Schnurrhaare und mit Nabelhernien, Kryptorchide und taube weiße Katzen. Zudem werden für einige Rassen spezielle Einschränkungen hinsichtlich Rassenkreuzung, Anerkennung von Novizen und Farbzulassung getroffen. In den Zuchtregeln der FIFé wird allgemein nur empfohlen, Tiere hinsichtlich Erbkrankheiten zu testen, insofern zuverlässige Tests verfügbar sind. Vorgeschrieben ist nur der DNA-Test auf Gangliosidosis (GM1 und GM2) für Koratkatzen. Die Anpaarung von zwei Trägern ist nur mit Genehmigung des nationalen Zuchtausschusses gestattet. Zudem definiert die FIFé auch Achondroplasien (Störung der Knorpelbildung) und Osteochondrodysplasien (Knochen- und Knorpelanomalien) als genetische Krankheiten, die den Phänotyp von Rassen wie zum Beispiel Scottish Fold und Munchkin verursachen. Daher werden solche Rassen vom FIFé nicht anerkannt (FIFÉ 2006).

Auf nationaler Ebene werden die Zuchtregeln der FIFé in Deutschland durch die Zuchtrichtlinien des 1.DEKZV vor allem durch genehmigungspflichtige Verpaarungen und spezielle Zuchtverbote ergänzt (1.DEKZV 2005). Die Paarung zwischen Vollgeschwistern und Verwandten ist vor der Deckung beim Zuchtausschuss zu beantragen, die erzeugten Nachkommen müssen vom Tierarzt begutachtet werden. Bei einem anormalen Befund sowie bei nicht genehmigten Verwandtenverpaarungen kann der 1.DEKZV Zuchteinschränkungen oder eine Zuchtsperre verhängen. Auch für Rassekreuzungen sind Genehmigungen einzuholen, im Allgemeinen sind sie verboten. Außerhalb bestimmter Rassen muss für Paarungen zwischen grün- und kupferäugigen Katzen ein begründeter Antrag gestellt werden. Die Paarungen von Perser-Colourpoint und Britisch Kurzhaar-Colourpoint mit weißgescheckten Katzen, silbernen und

grünäugigen Katzen sind auch genehmigungspflichtig. In Anlehnung an das Gutachten zur Auslegung des § 11b des Tierschutzgesetzes (HERZOG *et al.* 2002) sind Farbpaarungen von weißen Katzen verboten, deren Fellfarbe durch das dominante Gen *W* determiniert wird. Eine genetisch bedingte Taubheit muss bei weißen Zuchttieren durch eine audiometrische Untersuchung entsprechend der Standardisierung des 1.DEKZV vor dem Zuchteinsatz ausgeschlossen sein. Für farbige Welpen eines weißen Elterntieres und für den farbigen Verpaarungspartner wird die audiometrische Untersuchung empfohlen. Nicht gezüchtet werden soll mit Katzen, die beispielsweise einen Generalfehler oder nicht im Standard festgelegte Schwanzanomalien haben. Unter Generalfehler werden bei Rassekatzen angeborene Anomalien und Missbildungen wie Deformationen des Knochenbaus, Augen-, Zehen- und Hodenanomalien, Nabelbruch, Zwergwuchs sowie Gebissfehler zusammengefasst, die eine Zuchtwürdigkeit ausschließen. Mit Katzen, die unter anderem klinische Hüftgelenkdysplasie, Schädel- und Brustkorbanomalien, Poly- bzw. Hypodaktylie, hypertrophe Cardiomyopathie (HCM), Progressive Netzhautatrophie (PRA) oder keine sichtbaren Tastaare aufweisen, darf im 1.DEKZV nicht gezüchtet werden. Um eine erbliche polyzystische Nierenerkrankung (PKD) auszuschließen, wird vor allem für Katzen der Rassen Perser, Exotisches Kurzhaar und Britisches Kurzhaar eine Ultraschalluntersuchung der Organe des Bauchraumes empfohlen. Zur Vermeidung der Felinen Neonatalen Isoerythrolyse wird die Bestimmung der Blutgruppe bei Zuchttieren angeregt (1.DEKZV 2005).

2.1.3 Herkunft und Zucht der Burmakatze

2.1.3.1 Zuchtgeschichte der Burma

Die älteste zurzeit bekannte Beschreibung von Rassen der domestizierten Katze ist eine bebilderte Schriftrolle, die der Ayutthaya Periode (1350 bis 1767) in Siam (heute Thailand) zugeordnet wird. In diesem Dokument wird ein Katzentyp mit dem thailändischen Namen Thong Daeng oder Suphalak beschrieben, die sehr verehrt wurde und wertvoll war. Diese Rasse wird heutzutage als direkter Vorfahre der Burmakatzen angesehen (KELSEY-WOOD 2001). Auch andere Überlieferungen berichten vom autochthonen Vorkommen von Katzen dieses Typs auf der Malaiischen Halbinsel. Diese seltenen, als "Rajah" bezeichneten Tempelkatzen waren so wertvoll, dass der Besitz allein dem burmesischen Königshaus und der Priesterschaft vorbehalten war. Auch heute noch sind züchterisch unbeeinflusste Burmakatzen als

lokale Rasse auf der Malaiischen Halbinsel heimisch. Einige Exemplare wurden während des Zweiten Weltkriegs und in den Sechziger und Siebziger Jahren zur Einkreuzung in die dortige Burmazuchtpopulation nach Amerika verbracht (GRAF-WEBSTER 1997). In Europa trat die Burmakatze erstmals Ende des 19. Jahrhunderts in Erscheinung, ohne dass dies den Katzenliebhabern bewusst war. In dieser Zeit waren Katzausstellungen in England sehr beliebt, zu denen Tiere aus verschiedenen Teilen der Welt und insbesondere aus den Kolonialstaaten verbracht wurden. Der Initiator dieser „*worlds all-breed cat shows*“ Harrison Weir beschrieb 1889 zwei Typen der Royal Cats of Siam: einen Typ mit falbem Fell und blauen Augen und einen Typ dunkel wie Schokolade mit bernsteinfarbenen Augen. Diesen dunkelbraunen Typ hielt man für die unedle Variante der begehrten hellen Siam mit typischer Maskenzeichnung und wurde züchterisch nicht weiter beachtet (KELSEY-WOOD 2001).

Die eigentliche Zuchtgeschichte der Burmakatze begann in Amerika mit einer kleinen walnussbraunen Katze mit dunkleren Ohren- und Schwanzspitzen sowie bernsteinfarbenen Augen namens Wong Mau. Diese Katze mit dem typischen Körperbau des nativen Malaiischen Katzenbestands wurde 1930 von Joseph G. Thompson von Burma (heute: Myanmar) in die Vereinigten Staaten von Amerika importiert. Mangels eines ähnlich kolorierten Katers wurde dieses Tier an einen *Sealpoint* Siamesen namens Thai Mau angepaart. Die Nachkommen von Wong Mau segregierten bezüglich der Fellfarbe in Burmesen und cremefarbene Siamesen, beide mit dunklerer Maskenzeichnung. Die aus Verpaarungen dieser walnussbraunen Nachkommen untereinander wie auch mit Wong Mau entstandenen Nachkommen wiesen – entsprechend der Mendelschen Spaltungsregel – wiederum cremefarbene, walnussbraune und dunkelbraune Fellfarben auf. Die walnussbraunen Katzen konnten wie auch Wong Mau selbst als Burma-Siam-Hybride bzw. als Tonkanesen identifiziert werden (THOMPSON *et al.* 1943). Die dunkelbraunen Nachkommen mit dunkler gefärbten *Points* (Ohren, Gesicht, Pfote und Schwanz) und gelben Augen wurden zum offiziellen Standard der Burmakatze (siehe Abbildung 2).

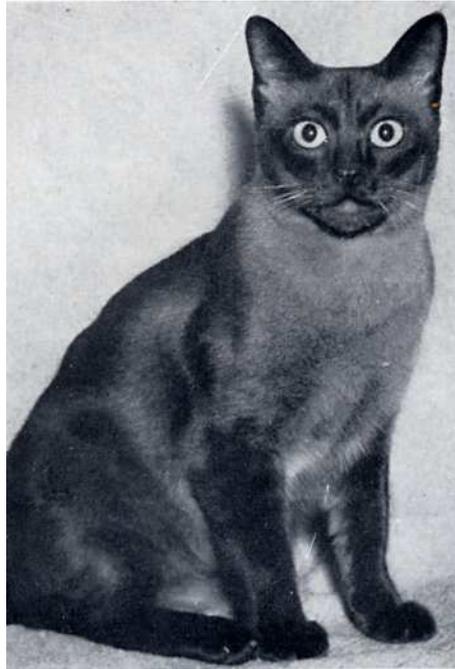


Abbildung 2: Typus der Burmakatze in den Dreißiger Jahren. Topaz Mau, eine Tochter der ersten Burmesin Wong Mau (THOMPSON *et al.* 1943)

Thompson selbst initiierte 1932 das Zuchtprogramm zur Etablierung und Vermehrung der Rasse Burma, das mit Hilfe einer kleinen Gruppe von Wissenschaftlern und Katzenzüchtern entwickelt wurde. Durch Analyse verschiedener Rassen- bzw. Farbkreuzungen zur Beobachtung der Vererbung postulierten THOMPSON *et al.* (1943) das Vorhandensein eines „Burmagens“. Diese Variante des Gens (c^b) beeinflusst die Farbverteilung, das heißt den Kontrast zwischen Körperfarbe und dunkleren Schattierungen an Gesicht, Ohren, Beinen und Schwanz (THOMPSON *et al.* 1943). Das Gen ist wie auch das Allel für die Siamzeichnung (c^s) rezessiv zur Wildform (*color locus C*, normale Färbung, dominant), heterozygote Tiere mit der Kombination aus c^s und c^b weisen einen intermediären Phänotyp auf (ROBINSON 1991, SCHMIDT-KÜNTZEL *et al.* 2005). Sowohl bei Siamesen als auch bei Burmesen nimmt die Intensität der Farbe an den Extremitäten abhängig von Alter zu. Die allelische Variante der Burmesen ist weniger temperatursensitiv. LYONS *et al.* (2005) konnten die Aminosäuresequenz verändernde Punktmutationen im Tyrosinase-Gen (*TYR*) als Ursache für die Phänotypen von Siamesen und Burmesen identifizieren.

Im Jahre 1934 wurde die Zulassung der Rasse Burma bei der Cat Fancier Association (CFA) beantragt, welche 1936 hinsichtlich der Registrierung der Tiere im Zuchtbuch akzeptiert wurde. In den Dreißiger und Vierziger Jahren erfreuten sich Burmakatzen

großer Beliebtheit, so dass die Nachfrage kaum gedeckt werden konnte. Die Züchter kreuzten daher weiterhin Siamesen ein, um den Bestand zu erweitern. Da dabei eine Großzahl von Hybriden erzeugt wurde, hob die Cat Fancier Association (CFA) die Zulassung von Burmakatzen im Jahre 1947 auf. Nur solche Katzen sollten als Burmesen registriert werden, die selbst von mindestens drei Generationen echten Burmakatzen abstammten. Durch die intensive Kreuzungszucht mit Siamesen war der Zuchtbestand an reinrassigen Burmakatzen aber schon so geschrumpft, dass erst 1956 einzelne Tiere diesen reinrassigen Pedigree wieder vorweisen konnten. Nachdem wieder ausreichend viele Zuchttiere aufgezogen waren, nahm die CFA die Rasse Burma wieder in ihr Zuchtbuch auf. Im Jahre 1958 wurde der einheitliche Zuchtstandard der Burmakatze von der amerikanischen Organisation „United Burmese Cat Fanciers“ formuliert und 1959 sowohl von der CFA als auch von den anderen Dachverbänden übernommen. Dieser Standard ist bis heute im Wesentlichen beibehalten worden. In den Fünfziger und Sechziger Jahren wurden Burmakatzen von den USA aus zunächst nach Großbritannien exportiert. Von hier aus verbreiteten sie sich vor allem in Europa und Australien. Heute wird die Burmakatze weltweit gezüchtet. Dabei waren die Siebziger Jahre die wohl erfolgreichste Dekade für die Burmesen. In dieser Zeit waren sie – hinter Perser und Siamesen – die drittpopulärste Rasse der Edelkatzen (GRAF-WEBSTER 1997).

Die neben den erwünschten dunkelbraunen Katzen immer wieder auftretenden Welpen mit anderen Fellfarben wurden anfangs bewusst von der Zucht ausgeschlossen. Im Laufe der Zeit fanden aber immer mehr Züchter gerade die helleren Kolorite attraktiv (GRAF-WEBSTER 1997). Tiere neuer Farbschläge wurden ab 1960 von der CFA nicht mehr als Burma anerkannt. Man betrachtete Tiere dieser Kolorite nicht als Farbvariationen der Burmakatze, sondern als Angehörige einer separaten Rasse, die ab dem Jahre 1979 als eigenständige Rasse „*Malayan*“ in der CFA zugelassen wurde. Erst 1984 wurden diese Katzen wieder als Burmesen registriert, auch wenn sie auf Schauen zunächst in der Klasse „*Dilute Division*“ vorgeführt wurden (POLLARD 2004). Diese Farbverdünnung entsteht durch eine Reduktion sowie ungleichmäßige Verteilung der Pigmentgranulate im Haarschaft. Die Farbverteilung wird durch Faktoren des *dilute locus* (Wildform *D*, dominant) beeinflusst. An diesem Genort homozygote Tiere mit dem rezessiven Allel *d* zeigen einen aufgehellten Phänotyp. Ursächlich hierfür ist eine Mutation im Gen für Melanophilin *MLPH* (ISHIDA *et al.* 2006). Bei den Burmakatzen werden die Fellfarben Braun (= *Seal, Sable*) zu Blau, *Chocolate* zu *Lilac* (= *Platinum*) und Rot zu Creme verdünnt (VELLA *et al.* 1999). Heute sind zehn verschiedene Farben bzw. Farbmuster zugelassen.

2.1.3.2 Heutiger Rassestandard der Burmakatze

Zwischen den Dachverbänden sind die Rassestandards für Burmakatzen weitgehend abgestimmt. Innerhalb der Rasse werden zwei Zuchtrichtungen unterschieden, die auch im Verbreitungs- bzw. Zuchtgebiet abweichen. Die Amerikanische Burma weist eine rundere, gedrungene Statur mit extrem kurzem Kopf auf, in Europa wird die orientalisches geprägte Britische Burma mit schlankem Typ und gemäßigter Kopfform bevorzugt (VERHOEFF-VERHALLEN 2000). Differenzierte Standards für die Zuchtrichtungen werden nur von der CFA aufgestellt, der wesentlichste Unterschied liegt in der Anerkennung der Farbschläge. Für die Amerikanische Burma sind innerhalb der CFA nur die vier Farben *Sable*, *Champagne*, *Blau* und *Platinum* zugelassen. Der Europäische Typ kann die Farbschläge *Sable*, *Chocolate*, *Rot*, deren Verdünnungen *Blau*, *Lilac*, *Crème* sowie und die Schildpattvarianten *Seal-Tortie*, *Chocolate-Tortie*, *Blue-Tortie* und *Lilac-Tortie* aufweisen (CFA 2006). Diese Fellfarben sind auch im FIFé und im WCF generell für Burmesen anerkannt (FIFé 2006, WCF 2006). Bei der Amerikanischen Burmazucht haben sich seit den siebziger Jahren zudem zwei Zuchttypen entwickelt, die sich in der Kopfform unterscheiden (GRAF-WEBSTER 1997). Eine Gruppe hat den bisherigen Erscheinungstyp bewahrt und wird als „traditioneller Typ“ bezeichnet. Der „zeitgenössische Typ“ (*contemporary*) weist einen deutlich runderen Kopf mit nahezu flachem Gesicht auf (VELLA & MCGONAGLE 1995). Dieser Zuchttyp mit einer an die Rasse *Exotic Shorthair* erinnernde Kopfform wird in den europäischen Zuchtorganisationen jedoch nicht anerkannt (KELSEY-WOOD 2001).

Von anderen Rassen unterscheidet sich die Burmakatze nicht nur durch die Farben, sondern vor allem durch die besondere Farbverteilung, die durch eine Mutation im Tyrosinase-Gen (das „Burmagen“ c^b) beeinflusst wird. Die Grundfarbe weist eine höhere Intensität auf, wodurch das Fell an Kopf, Beinen und Schwanz etwas dunkler gefärbt ist. Auch ist der Unterkörper stets heller als der Rücken und die Beine, das Gesicht und die Ohren dürfen sich farblich absetzen. Bei der Geburt dieser Tiere ist die Körperfarbe noch relativ hell, gewöhnlich dunkelt sie mit zunehmendem Alter nach. Nach dem Rassestandard sind weiße Abzeichen, auch nur einzelne Haare, generell nicht erlaubt. Das Fell ist insgesamt kurz und von seidenartiger Beschaffenheit, es liegt eng am Körper an und hat in der Regel kein Unterhaar. Der kräftige und muskulöse Körper einer Burmakatze soll mittelgroß und mittellang sein mit geradem Rücken und kräftiger, im Profil gerundeter Brust. Die Beine sind im Verhältnis zum Körper schlank mit zierlichen Pfoten von ovaler Form. Der mittellange Schwanz verjüngt sich leicht zur abgerundeten Spitze. Der keilförmige Kopf hat runde

Konturen, der Unterkiefer mit ausgeprägtem Kinn ist kräftig. Die Ohren sind weit auseinandergesetzt mit breitem Ansatz und runder Spitze. Auch die großen Augen stehen weit auseinander mit starkem Ausdruck. Die obere Augenlinie verläuft nach orientalischer Art gerade zur Nase, die untere Linie aber ist gerundet. Die Augenfarbe soll zwischen gelb und bernsteinfarben variieren. Andere Augenfarben wie blau, grün und grau werden bei CFA, FIFé und WCF als Fehler gewertet. Die Nase soll eine deutliche Einbuchtung an der Basis aufweisen (CFA 2006, FIFÉ 2006, WCF 2006).

2.2 Grundlagen und Methoden der Genomanalyse

2.2.1 Vergleichende Kartierung

Für viele Tierarten wurden bereits repräsentative Genkarten entwickelt, in denen Informationen über Marker und Gene in Hinsicht auf ihre Lage am Chromosom oder Beziehungen zwischen den Markern gesammelt werden. Diese Karten dienen als Hilfsmittel und Quelle für genetische Analysen und vereinfachen die Suche nach Genorten für Leistungsmerkmale und Erbkrankheiten (O'BRIEN *et al.* 1999). Auch die Evolution des Säugetiergenoms wird mit Hilfe von Genkarten erforscht (COPELAND *et al.* 1993, O'BRIEN *et al.* 2002b).

Bei den Genkarten werden physikalische und genetische Karten unterschieden. Die so genannten physikalischen Karten basieren auf der direkten Lokalisation von DNA-Fragmenten auf Chromosomen. Als Koordinaten dienen hier cytogenetische Strukturen wie Chromosomen, Chromosomenregionen oder Chromosomenbänder (SZCZERBAL & MICHALAK 2003). Die Abstände werden in Kilobasenpaar (kb) gemessen (FRIES 1993). Zur physikalischen Kartierung werden somatische Zellhybridpanels oder die *in-situ*-Hybridisierung benutzt (MURPHY *et al.* 2000, SZCZERBAL *et al.* 2003b). Im Rahmen des Zoo-FISH (Zoo-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) wird DNA aus einzelnen Chromosomen einer Spezies zur Hybridisierung in einer anderen Art verwendet (RETTENBERGER *et al.* 1995). Während die physikalischen Karten eine absolute Zuordnung von Genen bzw. Genomabschnitten erlauben, werden in genetischen Karten relative Abstände zwischen den verwendeten Markern ermittelt. Sie beruhen auf der Ermittlung der Häufigkeit von Rekombinationen, die während der Meiose zwischen zwei Markern entstehen (O'BRIEN 1991). Dazu wird die Vererbung von Allelkombinationen benachbarter Loci in informativen Familien mit bekanntem Verwandtschaftsmuster beobachtet. Bei genetischen Karten oder auch Kopplungs- bzw. Rekombinationskarten wird die Distanz zwischen den verwendeten Markern nach Prozent Rekombinationshäufigkeit in centiMorgan (cM) gemessen (FRIES 1993). Physikalische und genetische Karten können nicht linear miteinander verglichen werden. Bestimmte Chromosomenabschnitte wie etwa Bereiche nahe des Zentromers rekombinieren nach MURRAY *et al.* (1994) seltener. In anderen Abschnitten treten Rekombinationen mit hoher Frequenz auf, sie werden als „*recombination hot spots*“ bezeichnet (GUILLON *et al.* 2005). Als Marker für die genetische Kartierung werden Typ I-Loci (Marker innerhalb oder eng flankierend zu Genen) und Typ II-Loci (Marker unbekannter Funktion wie etwa hochvariable

Mikrosatelliten) eingesetzt (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 1999). Die Kartierung von Genen oder Markern ist aber nicht nur innerhalb einer Spezies, sondern auch zwischen unterschiedlichen Arten möglich. Dieser Vergleich der Gen- oder Markeranordnung zwischen den Chromosomen unterschiedlicher Arten wird als vergleichende Kartierung bezeichnet. Dabei wird bei der vergleichenden Kartierung (*comparative mapping*) die Konservierung des Genoms zwischen Arten genutzt (O'BRIEN *et al.* 1997b). Durch den Transfer von Wissen aus gut bearbeiteten Spezies wie Mensch und Maus lassen sich auch in wenig erforschten Tierarten schnellere Fortschritte erzielen. Insbesondere durch die vergleichende Kartierung wird der Nutzen von Genkarten hinsichtlich der Untersuchung neuer Gene, der funktionalen Genomforschung und der Klärung der Evolution der Genomorganisation erweitert (O'BRIEN *et al.* 1999). Um das *comparative mapping* zu vereinfachen, wurde von O'BRIEN *et al.* (1993) eine vergleichende Genkarte publiziert, die 321 Referenzloci bei den Spezies Mensch, Maus, Rind und Hauskatze umfasst. Diese Referenzkarte ermöglicht Vorabinformationen über Gene aus der Mensch- oder Maukarte, die sich in interessanten Chromosomenregionen bei anderen Spezies befinden (O'BRIEN *et al.* 1993).

Während der Evolution des Genoms in verschiedenen Spezies ergaben sich Umgruppierungen von Chromosomensegmenten, die sich häufig in einer unterschiedlichen Zahl von Chromosomen ausdrückt und auch zu neuen Zusammensetzungen von Chromosomen führte (MURPHY *et al.* 2003). Der Vergleich der Kopplungsarrangements von Katzengenen zu ihren menschlichen Gegenstücken weist auf einen hohen Grad von konservierten Syntänien wie etwa ganze Reihen von homologen Genen auf einem einzelnen Chromosom in beiden Spezies hin (O'BRIEN & NASH 1982, O'BRIEN *et al.* 1986, O'BRIEN *et al.* 1997a, O'BRIEN *et al.* 1997b). Diese Konservierung der Genome von Mensch und Katze konnte auch durch direkte Beobachtungen belegt werden (RETTENBERGER *et al.* 1995, WIENBERG & STANYON 1997). Die präzise Region bzw. das exakte Segment der homologen genetischen Sequenz des Katzengenoms für jedes menschliche Chromosom wurde durch die Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Chromosomen aus humanen Chromosomenbibliotheken an kondensierten Chromosomen der Katze identifiziert (RETTENBERGER *et al.* 1995, O'BRIEN *et al.* 1997b, WIENBERG & STANYON 1997). Mittels des *chromosome painting* wurden 32 aufeinander folgende Segmente des Katzenchromosom aufgedeckt, die homolog zu einzelnen humanen Chromosomen sind (WIENBERG & STANYON 1997, YANG *et al.* 2000). Damit kann nach O'BRIEN *et al.* (2002b) mit nur 13 Schnitten das Katzengenom zum humanen Genom arrangiert werden. Dieser Wert ist geringer als Vergleiche zwischen Genomen vieler

anderer Säugetiere und dem Mensch. Die Auflösung der Chromosomen mit der Methode des Zoo-FISH ist allerdings auf Segmente von mehr als fünf Megabasenpaaren begrenzt, intrachromosomale Inversionen und Rearrangements können nicht untersucht werden. Daher wurde die Karte der Katze zunehmend erweitert, um eine dichte Repräsentation von genetischen Markern wie kodierende Gene (Typ I) und hochvariable Mikrosatelliten (Typ II) zur Verfügung zu stellen (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 2003b, MURPHY *et al.* 2007).

2.2.2 Identifizierung interessanter Gene und Genregionen

2.2.2.1 Markeransatz

Die Erforschung von Genomen soll letztlich der Identifikation einzelner Genorte dienen, deren Varianten zu bestimmten Merkmalsausprägungen führen. Dieses Ziel kann mit Hilfe unterschiedlicher Strategien erreicht werden. Beim Markeransatz werden anonyme Genregionen durch die Analyse von molekulargenetischen Markern mit bekannter Lokalisation im Genom identifiziert, die mit dem betrachteten Phänotyp assoziiert sind. Diese Assoziations- oder auch Kopplungsanalysen können als *whole genome scan* unter Einbeziehung über das gesamte Genom verteilter Marker oder als genauere Studie einer bereits spezifizierten Genregion (*fine mapping*) durchgeführt werden (HALLDORSSON *et al.* 2004). Für diesen Zweck müssen informative Familien genutzt werden, in denen die Marker und somit auch die Gene aufspalten, die letztlich die Varianz des zu untersuchenden Merkmals beeinflussen. Neben anderen genetischen Markern sind Mikrosatelliten aufgrund des hohen Polymorphiegrads besonders geeignet, um Assoziationen zwischen bestimmten Allelen und Phänotypen nachzuweisen (ELLEGRÉN *et al.* 1997). Der Markeransatz wird insbesondere bei Nutztieren zur Identifizierung von *quantitative trait loci* (QTL) erfolgreich eingesetzt, um an der Ausprägung wirtschaftlich wichtiger Leistungsparameter beteiligte Genomregionen zu identifizieren (ROTHSCHILD *et al.* 2007, VEERKAMP & BEERDA 2007).

Durch Kopplungsanalysen zwischen Merkmal und Mikrosatelliten konnten beispielsweise ISHIDA *et al.* (2006) und LYONS *et al.* (2006) Assoziationen zu bestimmten Genombereichen belegen. Zur Klärung des beteiligten Gens an der Streifung des Katzenfells führten LYONS *et al.* (2006) eine Überprüfung des Genoms (*genome scan*) durch. Zwischen acht auf dem Chromosom B1 kartierten Mikrosatelliten und dem Merkmal *tabby* konnte eine Kopplung nachgewiesen werden (LYONS *et al.*

2006). ISHIDA *et al.* (2006) führten Assoziationsanalysen mit Mikrosatelliten im Markeransatz zur Klärung der Lokalisation eines Genorts für Farbverdünnung durch. Eine Kopplung zwischen dem Merkmal und dem Chromosom C1 konnte abgeleitet werden. Durch die Feinkartierung des Chromosoms konnten die Autoren eine hohe Syntänie zu einem Chromosomenabschnitt des Menschen nachweisen, welcher das Gen für Melanophilin *MLPH* beinhaltet (ISHIDA *et al.* 2006).

2.2.2.2 Kandidatengenansatz

Neben der Assoziations- und der QTL-Analyse im Markeransatz wird der Kandidatengenansatz als zweiter Weg zur Identifizierung von Zusammenhängen zwischen genetischer Variation und dem Phänotyp definiert. Als Kandidatengene werden Gene bezeichnet, die durch ihre biologischen Eigenschaften wie etwa Funktion oder Expressionsmuster mit hoher Wahrscheinlichkeit Einflüsse auf die betrachteten Merkmalswerte haben (GOULD & SARGAN 2002). Durch die Untersuchung von Kandidatengenen sollen letztlich Genstrukturen bis hin zu einzelnen Nukleotidvarianten nachgewiesen werden, die an der Ausbildung der zu untersuchenden Merkmalswerte beteiligt sind (GELDERMANN 1996). Dafür müssen diese Gene und ihre Genvarianten direkt isoliert und molekularbiologisch charakterisiert werden. Die Genvarianten werden dann auf Assoziationen mit dem Phänotyp überprüft. Basis für den Kandidatengenansatz ist das Vorhandensein von Informationen und Polymorphismen zu den entsprechenden Genen (MAAK 2001). SOLLER und GENIZI (1998) teilen Kandidatengene abhängig von der vorliegenden Information in zwei Kategorien ein. Als positionelle Kandidaten werden Gene bezeichnet, die in Genomregionen liegen, in denen Assoziationen zu genetischen Markern oder auch QTLs kartiert wurden. Diese Kandidatengene werden somit über ihre chromosomale Position aus den Erkenntnissen eines zuvor durchgeführten Markeransatzes abgeleitet. Zur Funktion des Genproduktes müssen keine Erkenntnisse vorliegen. Bei den funktionellen Kandidatengenen hingegen handelt es sich um Gene, deren Genprodukte in Beziehung zum untersuchten Phänotyp stehen. Diese Beziehungen sind entweder experimentell gesichert oder können von anderen Spezies abgeleitet werden (MEURS *et al.* 2005). Die Lokalisation dieser Gene muss nicht bekannt sein (SOLLER & GENZINI 1998). In der Praxis ist diese scharfe Abgrenzung zwischen positionellen und funktionellen Kandidatengenen nicht immer anzutreffen. Bereits ARCHIBALD *et al.* (1995) verwiesen auf die enge Verknüpfung von Marker- und Kandidatengenansatz. So mündeten Untersuchungen, die durch Markeranalysen zur

Identifizierung von QTLs führen, letztlich in den Kandidatengenansatz, da nur dieser zur Identifizierung der ursächlich mit dem Phänotyp verbundenen Genvariante führen kann. Beispielsweise untersuchten MEURS *et al.* (2005) das Gen des kardiären Myosinbindeproteins C (*MYBPC3*, *cardiac myosin binding protein C*) als funktionelles Kandidatengen für die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) bei Maine Coon Katzen. Beim Menschen wird dieses Krankheitsbild durch Mutationen unter anderem in diesem Gen verursacht. Zudem konnte eine signifikante Reduktion des Proteins bei betroffenen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Durch die vergleichende Sequenzierung wurde eine Nukleotidsubstitution in *MYBPC3* identifiziert, die mit dem Auftreten der HCM assoziiert ist und zur Konformationsänderung des Proteins führt.

2.2.3 Techniken zur Darstellung genetischer Variation

Unter genetischer Variation auf Ebene des Genoms versteht man Unterschiede in den Nukleotidsequenzen einander homologer DNA-Abschnitte. Diese Variation kann durch die Substitution einzelner Nukleotide (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), durch Variationen der Anzahl repetitiver DNA-Motive (*variable number of tandem repeats*, VNTR) oder durch Insertionen bzw. Deletionen unterschiedlich großer DNA-Abschnitte entstehen (SCHNEEBERGER & MUELLER 2005). Bezogen auf einen Locus werden die DNA-Varianten als Allele bezeichnet, die Ausstattung eines Individuums mit homo- oder heterozygoten Allelen bildet den Genotyp (STRANZINGER 1997). Im Gegensatz zu der durch alternatives Spleißen der mRNA und durch RNA-Editierung bestimmter Gene entstehenden genetischen Variabilität lassen sich DNA-Varianten im Allgemeinen unabhängig von Umwelteinflüssen, zur Verfügung stehender Gewebe sowie Alter und Geschlecht analysieren (LEWIN 1998b). In der molekulargenetischen Analyse werden DNA-Varianten als genetische Marker zur Charakterisierung von Genen, DNA-Abschnitten, Individuen oder Populationen für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt (KRUGLYAK & NICKERSON 2001, WANG *et al.* 2007).

Durch die Sequenzierung von DNA-Fragmenten lassen sich alle DNA-Varianten darstellen, da hierbei DNA-Moleküle hinsichtlich der Folge der Nukleotide anhand der jeweiligen Base analysiert werden (SANGER *et al.* 1977). Durch den hohen Kosten- und Arbeitsaufwand ist diese Methode aber eher für das *Screening* von DNA-Varianten als für die Charakterisierung bzw. Genotypisierung selbst geeignet. Insbesondere zur Identifikation neuer Polymorphismen wird die vergleichende

Sequenzierung (*comparative sequencing*) eingesetzt, bei der die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mehrerer Individuen direkt sequenziert und miteinander verglichen werden. Mit dieser Methode konnten KIM *et al.* (2004) eine Mutation im humanen Gen der *alpha*-Untereinheit des muskulären, spannungsabhängigen Natriumionenkanals (*SCN4A*) identifizieren. Die Autoren verglichen die Sequenzen dieses Gens zwischen gesunden und von der hypokaliämischen periodischen Paralyse (HypoPP) betroffenen Menschen. Durch den Vergleich der DNA-Sequenzen wurde eine Nukleotidsubstitution entdeckt, die als *missense* Mutation zum Austausch einer Aminosäure führt (KIM *et al.* 2004). Auch LYONS *et al.* (2005) nutzten die vergleichende Sequenzierung des Gens für Tyrosinase (*TYR*), mit deren Hilfe zwischen Katzen vom Wildtyp und Albinos eine Deletion in diesem Gen nachgewiesen wurde. Diese Mutation führt zu einer Verschiebung des Leserahmens, durch die vorzeitig ein Stoppcodon und dadurch kein funktionsfähiges Enzym entsteht (LYONS *et al.* 2005, IMES *et al.* 2006).

Wenn durch die Sequenzierung genetische Polymorphismen identifiziert worden sind, können verschiedene Techniken zur Darstellung der genetischen Variante angewandt werden. Nach LEEB (2005) sind bereits über 40 verschiedene Techniken zur Darstellung von DNA-Varianten etabliert. Wie auch die Sequenzierung selbst basieren die meisten Methoden auf der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Durch die PCR werden mittels komplementärer Oligonukleotidprimer bestimmte Abschnitte der zu untersuchenden Nukleinsäuren mittel einer DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert (SAIKI *et al.* 1985). Neben der klassischen PCR mit genomischer DNA oder cDNA (*complementary DNA*) als *template* wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Polymerase-Kettenreaktionen wie *Cycle Sequencing*, RT-PCR (Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion) und RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) eingesetzt. Im Folgenden werden zwei Methoden zur Darstellung genetischer Varianten erläutert, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet wurden. Diese gehören nach den Recherchen von LEEB (2005) neben anderen wie SSCP (*single strand conformation polymorphism*), Allel-Spezifische Amplifikation (ASA), 5'Exonuklease-Assay (*TaqMan* PCR), DNA Array Technik und AFLPs (*amplified fragment length polymorphisms*) zu den am häufigsten angewendeten Techniken.

Die Methode des PCR-RFLP (PCR-Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) basiert auf der Entfernung bzw. Zufügung von Schnitt- bzw. Bindestellen für Endonukleasen durch die veränderte Basensequenz in DNA-Varianten (NARAYANAN 1991). Die durch PCR amplifizierten DNA-Abschnitte werden mit einem spezifisch

zur DNA-Variante ausgewählten Restriktionsenzym verdaut. In Abhängigkeit von DNA-Varianten werden die Amplifikate geschnitten bzw. bleiben in ihrer Länge erhalten, wodurch unterschiedlich lange Restriktionsfragmente entstehen (FUJII *et al.* 1991). Der aus der genetischen Variation resultierende Fragmentlängen-Polymorphismus wird mittels Elektrophorese durch Ethidiumbromidfärbung bzw. über markierte Primer im DNA-Sequenzierautomaten dargestellt. Bei der Auswertung können die beobachteten Fragmentlängen zwei verschiedenen Allelen bzw. drei verschiedenen Genotypen zugeordnet werden (NARAYANAN 1991). Diese einfache und sichere Methode setzt die Kenntnis der Sequenz der Amplifikate sowie der variablen Nukleotidpositionen voraus. So konnten beispielsweise LYONS *et al.* (2004) nach Identifizierung der assoziierten DNA-Variante einen auf PCR-RFLP basierenden Gentest für die polyzystischen Nierenerkrankung (*polycystic kidney disease 1*, PKD1) von Katzen etablieren. Amplifikate des Exons 29 des *PKD1*-Gens mit der krankheitsverursachenden Mutation werden durch das Restriktionsenzym *MLYI* geschnitten. Bei gesunden Katzen mit dem Wildtyp-Allel wird somit bei der Typisierung nur eine Bande des ungeschnittenen DNA-Fragments dargestellt. (LYONS *et al.* 2004). Durch den in der Tierzucht wohl bekanntesten PCR-RFLP von FUJII *et al.* (1991) wird die durch einen SNP herbeiführte Genvariante des Ryanodinrezeptors (*RYR1*), welche beim Schwein das Maligne Hyperthermie-Syndrom (MHS) verursacht, auch bei heterozygoten Anlageträgern nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den biallelen SNPs können bei Variationen der Anzahl repetitiver DNA-Motive (*variable number of tandem repeats*, VNTR) in Populationen häufig eine große Zahl an unterschiedlichen Allelen identifiziert werden. Die Allele eines VNTRs wie etwa einem Mikrosatelliten (auch: *STR short tandem repeats*, *SSR simple sequence repeats*) entstehen durch die variable Zahl der Motivwiederholungen innerhalb von Populationen (TAUTZ 1989, EDWARDS *et al.* 1991). Zur Analyse von Mikrosatelliten werden diese DNA-Varianten mittels PCR anhand flankierender Sequenzen im Genom amplifiziert. Die PCR-Produkte werden anschließend durch Elektrophorese im DNA-Sequenzierautomaten aufgetrennt und mit Hilfe fluoreszenzmarkierten Primer detektiert (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 1997a). In der auch als Fragmentlängenanalyse bezeichneten Auswertung werden den unterschiedlich großen Fragmenten Allele zugeordnet (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 2003b). Durch die Verwendung von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen für die Primer verschiedener Mikrosatelliten können mehrere Mikrosatelliten auch von ähnlicher Fragmentlänge in einer Spur eines geeigneten DNA-Sequenzierautomaten detektiert werden (PETER 2005). Dafür können in der so genannten Multiplex-PCR mehrere

Mikrosatelliten gemeinsam in einem PCR-Ansatz amplifiziert werden (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 2005). Mikrosatelliten sind aufgrund des hohen Polymorphiegrads der Allele, der kodominanten Vererbung und der einfachen sowie hochdurchsatzfähigen Analyse zu den am häufigsten verwendeten genetischen Markern geworden (BARILLET *et al.* 2005, FAN & CHU 2007). Mikrosatelliten sind unter anderem maßgeblich an der Erstellung genetischer Karten beteiligt und werden als Marker für Assoziationsanalysen eingesetzt (LYONS *et al.* 2006, MURPHY *et al.* 2007).

2.3 Stand der Genomanalyse bei der Katze

2.3.1 Das feline Genomprojekt

Das feline Genomprojekt fand vor rund 25 Jahren seinen Anfang, als die erste Genkarte dieser Spezies von O'BRIEN & NASH (1982) veröffentlicht und mit der damals bekannten Genkarte des Menschen verglichen wurde. Die Zusammenstellung einer dichten genetischen Karte und der gesamten genomischen Basensequenz der domestizierten Katze birgt nicht nur beträchtlichen Wert für die Veterinärmedizin (O'BRIEN *et al.* 2002b). Humane Assoziationen und veterinärmedizinische Studien der verschiedenen Rassen und Arten haben erwiesen, dass die *Felidae* auch als Modell für humane Erbkrankheiten und infektiöse Erkrankungen eingesetzt werden kann. Auch für die Annotation des humanen Genoms, für die Erforschung der Evolution der Genomorganisation von Säugetieren und der komparativen Genetik liefern die Erkenntnisse bei der Katze einen wichtigen Beitrag (O'BRIEN *et al.* 2002a). Aufgrund der Beliebtheit der Katze als Gesellschafter des Menschen entstand eine veterinärmedizinische Betreuung und Beobachtung wie bei keinem anderen Säugetier außer dem Hund und dem Menschen selbst (O'BRIEN *et al.* 2002a).

Aus den verschiedenen Forschungsprojekten konnten einige praktische Anwendungen wie etwa Gentests für Erbkrankheiten, Abstammungsnachweise und Systeme zur Tieridentifikation entwickelt werden. So wurde von MENOTTI-RAYMOND *et al.* (2005) ein auf Mikrosatelliten basierendes, forensisches Typisierungssystem zur genetischen Individualisierung von Katzen entwickelt, nachdem die Autoren einige Jahre zuvor durch die genetische Zuordnung eines einzelnen Katzenhaares einen wichtigen Beitrag zur Überführung eines Mörders geleistet hatten (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 1997a, MENOTTI-RAYMOND *et al.* 1997b, O'BRIEN 2003).

2.3.2 Sequenzierung des Katzensgenoms

Die genomische Sequenz der Katze wurde im Rahmen des „*mammalian genome project*“ des National Instituts of Health (NIH, Bethesda, Maryland) bearbeitet, um die bekannten Genome von Mensch, Maus, Ratte, Hund und Rind durch die Genome von 16 weiteren Säugetieren zu ergänzen. Um vergleichende genomische Analysen mit dem humanen Genom zu erlauben, wurden die genomischen Sequenzen mit zweifacher Abdeckung zusammengestellt (BROAD-INSTITUTE 2005). Der speziesübergreifende Vergleich zwischen Genomen unterstützt die Entdeckung und

Identifikation von funktionellen, kodierenden als auch nicht-kodierenden Elementen, welche insbesondere für die biomedizinische Forschung eine zentrale Rolle spielen.

Die Sequenzierung des Katzen-genoms wurde als Gemeinschaftsarbeit von der Agencourt[®] Biosciences Corporation (Beverly, Massachusetts) und dem Broad Institut of MIT and Harvard (Cambridge, Massachusetts) mit Unterstützung des amerikanischen National Instituts of Health (NIH) durchgeführt (BROAD-INSTITUTE 2005). Dazu wurde die DNA einer weiblichen Abessinier mit Hilfe des „*whole-genome shotgun*“ analysiert: Das Genom wurde in kleinere, besser zu bearbeitende DNA-Fragmente zerlegt. Die einzelnen Fragmente wurden sequenziert und anhand überlappender Bereiche zur genomischen Sequenz zusammengeführt (BANNASCH & HUGHES 2006). Die ersten Ergebnisse wurden Anfang 2005 auf der Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tracemb.shtml> als „*trace sequences*“ in den Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) veröffentlicht, die für den „*cross-species megablast*“ genutzt werden konnten. Der experimentelle Teil der Sequenzierung des Katzen-genoms wurde im Juli 2005 abgeschlossen (BROAD-INSTITUTE 2005). Nach Bearbeitung und Auswertung der ermittelten Daten konnten im Februar 2006 die Sequenzen der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden. Die genomische Sequenz der Katze wird in den Datenbanken des NCBI auf der Seite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=94308942> unter der Projektnummer AANG00000000 angeführt. Sie besteht aus 817956 Sequenzen mit Eintragsnummern AANG01000001 bis AANG01817956 (LINDBLAD-TOH *et al.* 2006a, LINDBLAD-TOH *et al.* 2006b, SMITH *et al.* 2006).

2.3.3 Entwicklung von Genkarten der Katze

Die domestizierte Katze *Felis silvestris catus* (Linnaeus, 1758) besitzt einen diploiden Chromosomensatz mit insgesamt 38 Chromosomen. Die $n = 18$ Autosomen werden nach ihrer Form durch die Position des Zentromers im Karyogramm in verschiedene Gruppen unterteilt, die durch Buchstaben A, B, C, D, E und F bezeichnet und nach der physischen Größe nummeriert werden (WURSTER-HILL & GRAY 1973, FORD *et al.* 1980). Das rund 3×10^9 Nukleotide umfassende Genom weist eine vergleichbare Größe wie die Genome von Mensch und Maus auf (O'BRIEN *et al.* 1997a, O'BRIEN *et al.* 2001). Innerhalb der letzten Jahre konnten durch die Arbeiten der Arbeitsgruppe von Stephen J. O'Brien im Laboratory of Genomic Diversity am National Cancer Institut (NCI, Frederick, Maryland, USA) des National Instituts of Health (NIH,

Bethesda, Maryland) die Entwicklung und Erhöhung der Genauigkeit von Genkarten der Katze stark vorangetrieben werden. Die Entwicklung und Implementierung hoch qualitativer Genkarten, welche Mikrosatelliten und konservierte codierende Gene als genetische Marker beinhalten, gehen der effektiven Nutzung der domestizierten Katze als Tiermodell voraus (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 2003a). Mit Hilfe ausreichend dichter genetischer Karten in Kombination mit segregierenden Katzenpedigrees lassen sich auch erbliche Merkmale interpretieren. Insbesondere die integrierten Karten stellen ein starkes Instrument sowohl für die Verfolgung von feline Phänotypen in segregierenden Stammbäumen als auch für Vergleiche der Genomorganisation bei Säugetieren dar (O'BRIEN *et al.* 2002b). Für die Forschungen zur Erstellung und Verfeinerung von Karten der Katze wurden von der Arbeitsgruppe um Stephen J. O'Brien zwei Ressourcen entwickelt:

- *interspecies backcross* (ISB) Pedigree aus Anpaarungen und Rückkreuzungen von Hauskatzen und eng verwandten Asiatischen Leopardkatzen (*Prionailurus bengalensis*)
- strahlungsmarkierte Katze/Hamster-Hybridzelllinien (5000-rad *feline whole genome radiation hybrid panel*) zur physikalischen Strahlungshybridkartierung.

Diese Tiere bzw. Zelllinien wurden als Ressourcen genutzt, um sowohl physikalische als auch genetische Kopplungskarten der Katze zu entwickeln und diese dann zu integrierten Karten zusammenzuführen. Eine Zusammenfassung der Karten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Chronologische Entwicklung von Genkarten der Katze mit Markeranzahl und Markerdichte im Zeitraum 1999 bis 2007

Karte	Markerzahl		Markerdichte		Autoren
	Typ I	Typ II	Ø Abstand	Deckung	
Kopplungskarte	-	253	11 cM	2900 cM	MENOTTI-RAYMOND <i>et al.</i> (1999)
RH Karte	424	176	25,7 cR	15424 cR 2991 Mb	MURPHY <i>et al.</i> (2000)
integrierte Kopplungs- RH Karte	424	176	11 cM 25,7 cR	2900 cM 15424 cR	SUN <i>et al.</i> (2001)
RH Karte	572	554	5,3 cM 2,7 Mb	-	MENOTTI-RAYMOND <i>et al.</i> (2003a)
integrierte Kopplungs- RH Karte	585 579	279 255	8 cM -	3300 cM 19888 cR	MENOTTI-RAYMOND <i>et al.</i> (2003b)
RH Karte	1793		1,5 Mb	26510,3 cR 2630 Mb	MURPHY <i>et al.</i> (2007)

RH Karte: Strahlungshybridkarte (*radiation Hybrid*), cM: centiMorgan, cR: centiRay, Mb: Megabasenpaare

Die fortlaufend aktualisierten, integrierten Markerkarten können auch auf der Internetseite der Arbeitsgruppe eingesehen werden (letzter Zugriff 23.07.2007, http://home.ncifcrf.gov/ccr/lgd/comparative_genome/catgenome/genmaps/index.asp).

In der von MENOTTI-RAYMOND *et al.* (2003b) veröffentlichten Kopplungskarte wurden insgesamt 864 genetische Marker kartiert. Neben 585 codierenden Genen wurden die Kopplungen zwischen 279 Mikrosatelliten berechnet. Dadurch konnte die Markerdichte insbesondere bei den Chromosomen B2 und F1 erhöht werden, welche zuvor im Vergleich zu Autosomen ähnlicher Größe unterrepräsentiert waren. Bei der integrierten Kopplungs/RH-Karte konnten die Autoren einen durchschnittlichen Abstand von 8 cM zwischen den Markern beobachten über eine geschätzte Genomlänge von 3300 cM bei einem centiMorgan:centiRay Verhältnis von 7,5 cR₅₀₀₀/cM. Die aktuellste Strahlungshybridkarte (*radiation hybrid*, RH) von MURPHY *et al.* (2007) weist eine Auflösung von 1,5 Megabasen auf mit insgesamt 1793 kartierten genetischen Markern. Neu identifiziert wurden 269 Mikrosatelliten, 87 anhand ESTs (*expressed sequence tags*) und mRNA entwickelter STS-Marker (*sequence tagged sites*) und 335 anhand der felines Genomsequenz abgeleiteten Marker. Durch die Erweiterung der komparativen Karten für Autosomen und das X-Chromosom konnten nun 152 Syntänieblöcke zwischen Katze und Mensch identifiziert werden. MURPHY *et al.* (2007) postulieren, dass durch die verbesserte Genkarte in Kombination mit der felines Genomsequenz die Identifikation von Genen mittels positioneller Klonierung erleichtert und vorangetrieben wird. So wurden einige

der im folgenden Kapitel beschriebenen Mutationen in Genen, die mit Phänotypen von Krankheiten oder Fellfarben assoziiert sind, charakterisiert, nachdem positionelle Kandidatengene durch Kopplungsanalysen von Merkmal und Markern durch die Nutzung von Genkarten identifiziert wurden (IMES *et al.* 2006, ISHIDA *et al.* 2006, LYONS *et al.* 2006).

2.3.4 Modelle für Erbkrankheiten

Durch die sorgfältige Dokumentation von genetischen, infektiösen und chronischen Krankheiten bei der Katze entstand ein umfangreicher Literaturfundus (O'BRIEN *et al.* 2002a). Die Fortschritte in der Technologie und zahlreiche Arbeiten innerhalb der Forschungsgemeinschaft führten zur Identifikation der genetischen Basis von zahlreichen Merkmalen der Katzen. Im Gegensatz zu den allgemein als Erbfehler anerkannten Krankheiten sind manche genetische Defekte wie etwa Brachycephalie (Kurzköpfigkeit) oder An- bzw. Brachyurie (Schwanzlosigkeit bzw. Kurzschwanzigkeit) als Phänotypen im Zuchtziel bestimmter Rassen erwünscht (CFA 2006, GCCF 2006, WCF 2006). Zahlreiche Erbkrankheiten wurden durch enge Selektion und Inzucht bei der Zucht von Rassekatzen und Etablierung neuer Rassen begünstigt (O'BRIEN *et al.* 2002a). In der Datenbank Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA, www.angis.org.au/Databases/BIRX/omia, letzter Zugriff am 23. Juli 2007) sind derzeit 277 genetische Störungen und Merkmale aufgelistet, von denen 45 einem spezifischen Genort zugeordnet werden können. Weitere Erbkrankheiten wie etwa bei Burmakatzen auftretende Brachycephaliden (NODEN & EVANS 1986), Kraniofazialdefekte (SPONENBERG & GRAF-WEBSTER 1986), Hypokaliämische Periodische Polymyopathien (MASON 1988, GRUFFYDD-JONES *et al.* 1996) und das Flachrippensyndrom (STURGESS *et al.* 1997) sind noch nicht verzeichnet. Rund die Hälfte der in der OMNIA-Datenbank gelisteten Krankheiten weisen nach O'BRIEN *et al.* (2002b) Homologien zu humanen Erbdefekten auf. Daher sind 133 Merkmale als potentielle Modelle für den Menschen und 213 Merkmale als denkbare Modelle für andere Tiere eingetragen. In Tabelle 2 sind die zurzeit bekannten Krankheiten aufgelistet, bei denen die ursächliche Mutation auf Ebene der DNA identifiziert wurde. Für diese Krankheiten sind zum Teil kommerzielle Gentests verfügbar.

Tabelle 2: Übersicht derzeit bekannter durch *missense* Mutationen verursachter Erbkrankheiten bei Katzen mit Nennung des jeweils betroffenen Gens

Krankheit/Merkmal	Rasse	Gen	Referenz
Gangliosidose 2 (Sandhoff-Erkrankung)	Kurzhaar, Korat	<i>HEXB</i>	MARTIN <i>et al.</i> (2004)
Gangliosidose GM2 Aktivator Defizienz	British Kurzhaar	<i>GM2A</i>	MARTIN <i>et al.</i> (2005)
Glycogeniose Typ IV	Norwegische Waldkatze	<i>branching enzyme</i>	FYFE <i>et al.</i> (1992)
Haemophilia B		<i>Faktor9</i>	GOREE <i>et al.</i> (2005)
Hyperlipoproteinämie		<i>LPL</i>	GINZINGER <i>et al.</i> (1996)
Hypertrophe Kardiomyopathie	Maine Coon	<i>MYBPC3</i>	MEURS <i>et al.</i> (2005)
Mannosidose <i>alpha</i>	Perser	<i>MAN2B1</i>	BERG <i>et al.</i> (1997)
Mucopolidosis II		<i>GNPTA</i>	MAZRIER <i>et al.</i> (2003), GIGER <i>et al.</i> (2006)
Mucopolysaccharidose I		<i>IDUA</i>	HE <i>et al.</i> (1999)
Mucopolysaccharidose VI	Siam, Europäisch Kurzhaar	<i>ARSB</i>	YOGALINGAM <i>et al.</i> (1996), CRAWLEY <i>et al.</i> (1998), MACRI <i>et al.</i> (2002)
Mucopolysaccharidose VII	Kurzhaarrassen	<i>GUSB</i>	FYFE <i>et al.</i> (1999)
Muskuläre Dystrophie, Duchenne und Becker		<i>DMP</i>	WINAND <i>et al.</i> (1994)
Niemann-Pick Erkrankung Typ C		<i>NPC</i>	SOMERS <i>et al.</i> (2003)
Polyzystische Nierenerkrankung (PKD)	Exotic, Himalayan, Perser, Perserkreuzungen	<i>PKD1</i>	LYONS <i>et al.</i> (2004), YOUNG <i>et al.</i> (2005)
Spinale Muskelatrophie Typ III	Maine Coon	<i>LIX1</i>	FYFE <i>et al.</i> (2006)

ARSB: Arylsulfatase B, *DMP*: dystrophin muscle promoter, *GM2A*: GM2 ganglioside activator protein, *GNPTA*: UDP-N-acetylglucosamine lysosomal enzyme N-acetylglucosamine phosphotransferase, *GUSB*: glucuronidase beta, *HEXB*: hexosaminidase B (beta polypeptide), *IDUA*: alpha-L-iduronidase, *LIX1*: limb expression 1, *LPL*: lipoprotein lipase, *MAN2B1*: lysosomal alpha-mannosidase class 2B member 1, *MYBPC3*: cardiac myosin binding protein C, *NPC*: Niemann-Pick disease type C, *PKD1*: polycystic kidney disease 1

Nicht nur für die Klärung der molekularen Krankheitsentstehung haben feline Tiermodelle große Bedeutung, sondern auch für die Evaluierung und Optimierung von therapeutischen Strategien vor klinischer Anwendung beim Mensch. Beispielsweise betrifft ein wesentlicher Teil der untersuchten feline Modelle für humane Erbkrankheiten Störungen von lysosomalen Speicherenzymen. Diese entstehen durch Mutationen in Genen, die an der Degradation von Makromolekülen beteiligt sind. Da die meisten lysosomalen Enzyme nach der Sekretation von den Nachbarzellen aufgenommen werden, sind hier einige korrektive therapeutische Strategien denkbar. An der Katze wurden viele dieser Strategien wie *Enzyme Replacement*, Knochenmarkstransplantation und Gentherapie untersucht (GASPER *et al.* 1984, TAYLOR & WOLFE 1994, SUN *et al.* 1999, LIU *et al.* 2000). Die Katze ist zum Beispiel ein Tiermodell für Mucopolysaccharidosen Typ I, VI und VII, welche durch den Ausfall

von lysosomalen Enzymen verursacht werden, die in den Abbau von Mucopolysacchariden involviert sind. Mucopolysaccharidose Typ VI, auch bekannt als Marteaux-Lamy Krankheit, wird durch eine Störung der Aktivität der Arylsulfatase B (ARSB) hervorgerufen. Bei Katzen und Menschen treten Wachstumsverzögerung, grobe Gesichtszüge und Deformationen des Skeletts auf (JEZYK *et al.* 1977). Bei betroffenen Katzen führt eine *missense* Mutation im *MPS VI*-Gen (Mucopolysaccharidose VI) zu einer Aminosäuresubstitution in einem bei Sulfatasen hoch konservierten Abschnitt (YOGALINGAM *et al.* 1996). Zwei weitere, unabhängige Mutationen wurden zudem von CRAWLEY *et al.* (1998) identifiziert. Betroffene Katzen sprechen auf eine allogene Knochenmarkstransplantation an (GASPER *et al.* 1984). FILLAT *et al.* (1996) konnten eine retroviral-vermittelte Korrektur bei verschiedenen Zelltypen mit *MSP VI*-Defizienz sowohl bei Katze als auch bei Mensch erreichen.

2.3.5 Verwendung von Gentests

Die Identifizierung der ursächlichen Mutationen für Erbkrankheiten führt zur Entwicklung von DNA-Tests. Diagnostische Gentests für Erbkrankheiten der Katze stellen ein wichtiges Instrument für die Zuchthygiene dar und bergen einen hohen Nutzen für die Zuchtplanung. Mit ihrer Hilfe können mit hoher Sicherheit Katzen identifiziert werden, die die entsprechende Mutation tragen oder eben frei von dieser Mutation sind. Gerade bei rezessiven Erbkrankheiten ermöglicht die Erkennung von Anlageträgern eine zuchthygienische Selektion bzw. gezielte Anpaarungen (BHALERAO *et al.* 2002). Anhand von Gentests gewonnene Informationen zu Zuchttieren liegen auch im Interesse des Tierschutzes, da es dadurch möglich ist, durch das Zurückdrängen von Erbfehlern unnötige Schmerzen und Leiden der Tiere zu vermeiden. Gerade im Zuge der Sequenzierung des Katzensgenoms wird nach BANNASCH & HUGHES (2006) das Wissen über die molekularbiologischen Ursachen von Krankheiten sprunghaft zunehmen, so dass immer mehr Gentests zur Verfügung stehen. Die Kenntnisse über die genetischen Hintergründe sind maßgeblich an der Diagnose und vor allem an der Prävention von Krankheiten durch verbesserte Selektion in der Zucht beteiligt.

Diagnostische Gentests sind bei Katzen kommerziell schon für hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), Gangliosidosis (GM1 und GM2) und Polyzystische Nierenerkrankung (PKD) verfügbar (KITTLESON *et al.* 1999, LYONS *et al.* 2004, MARTIN *et al.* 2004). Vorgeschrieben ist nach den Zuchtrichtlinien des FIFé bis heute

nur die systematische Testung bei Korat Katzen auf Gangliosidosis GM1 und GM2. Träger der krankheitsverursachenden Mutation dürfen nur mit genetisch gesunden Tieren verpaart werden (FIFÉ 2006). Da aber die Käufer in den meisten Fällen auf nähere Informationen zur genetischen Ausstattung bestehen, werden fast alle Edelkatzen betroffener Rassen sowohl auf die Erbkrankheiten HCM, GM1, GM2 und PKD als auch auf die Fellfarbvarianten *chocolate* (Genotyp *bb* oder *bb^l*), *cinnamon* (Genotyp *b^lb^l*) und *Colourpoint* (Allele *c^b*, *c^s*) getestet (HUCKE 2007). Seit diesem Jahr werden nach den Richtlinien des GCCF nur noch Katzen mit rotem, creme- oder aprikotfarbenen Fell bei *Asian Shorthair* und *Asian Semi-Longhair* registriert, wenn durch Testkreuzungen oder DNA-Tests der Genotyp *non-agouti* nachgewiesen wurde (GCCF 2007).

Die verbreitetste Erbkrankheit bei Katzen stellt die autosomal-dominante PKD dar, von der rund 38 % der Perserkatzen weltweit betroffen sind (BECK & LAVELLE 2001, BARTHEZ *et al.* 2003). In den Nieren bilden sich Zysten, die mit zunehmendem Lebensalter der Katze immer mehr Nierengewebe verdrängen und schließlich zu Nierenversagen führen (BILLER *et al.* 1990). YOUNG *et al.* (2005) identifizierten *PKDI* (*polycystic kidney disease 1*) als positionelles Kandidatengen auf Chromosom E3. In diesem Gen führt eine *nonsense* Mutation zum vorzeitigen Abbruch der Translation der mRNA bei der Proteinbiosynthese (LYONS *et al.* 2004). Durch die Transversion C>A im Exon 29 in *PKDI* entsteht die Restriktionssequenz des Enzyms *MLY1*, auf deren Basis LYONS *et al.* (2004) einen PCR-RFLP zur Gendiagnostik entwickeln konnten. Mit Hilfe dieses Gentests können von PKD betroffene Tiere schon vor der Nachweisbarkeit der Nierenzysten in der Ultraschalluntersuchung (frühestens ab einem Alter von etwa zehn Monaten) erkannt werden (BECK & LAVELLE 2001, LYONS *et al.* 2004). In der deutschen Perserkatzenpopulation weisen aber Einzelfälle von zystenpositiven Tieren die Mutation in *PKDI* Exon 29 nicht auf (KAPPE *et al.* 2005). Erworbene Zysten oder Mutationen an anderer Stelle konnten aber nicht ausgeschlossen werden.

2.4 Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP)

2.4.1 Hypokaliämische Periodische Paralyse der Burmakatze

Neben anderen Erbkrankheiten wie Craniofazialdefekt, der Meningoenzephalozele und dem Flachrippensyndrom (Flat Chested Syndrome, *Pectus Excavatum*) stellt die Hypokaliämische Periodische Paralyse ein ernstes Problem in der Burmazucht dar (SPONENBERG & GRAF-WEBSTER 1986, GRUFFYDD-JONES 1997, STURGESS *et al.* 1997). Diese Erkrankung ist durch eine anfallartig auftretende, generalisierte Muskelschwäche gekennzeichnet. In der Literatur wurde diese Krankheit auch unter den Bezeichnungen Periodische Muskelschwäche (BLAXTER *et al.* 1986), Hypokaliämische Polymyopathie (GRUFFYDD-JONES 1997), Hypokaliämische Myopathie (LANTINGA *et al.* 1998, TAYLOR 2000) und Periodische Hypokaliämische Polymyopathie (STOLZE *et al.* 2001) bekannt. Nach PHILLIPS & POLZIN (1998) und SHELL (1998) wird sie im Folgenden analog eines ähnlichen Krankheitsbildes beim Menschen als Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP) bezeichnet.

Die HypoPP trat nach LUND (2001) und MCGREGOR (2004) bisher nur bei Burmakatzen der Zuchtrichtung Europäische Burma auf. In Deutschland wurde sie erstmals im Jahr 2001 bei Importtieren aus Dänemark beschrieben (STOLZE *et al.* 2001). Zuvor waren den klinischen Erscheinungen nach analoge Fälle in Großbritannien (BLAXTER *et al.* 1986), den USA (DOW *et al.* 1987), Neuseeland (JONES *et al.* 1988), Australien (EDWARDS & BELFORD 1995) und den Niederlanden (LANTINGA *et al.* 1998) bekannt. Auch wenn die Prävalenz dieser Erkrankung unsicher ist, so wurden doch nach GRUFFYDD-JONES (1996) eine zunehmende Zahl von Fällen in den 1980er und 1990er Jahren beobachtet. Durch die Sensibilisierung der Katzenzüchter und -halter und die entsprechende Selektion bei Zuchttieren konnte die Inzidenz gemildert werden (GRUFFYDD-JONES 1996). In den Pedigreeanalysen von fünf Würfen aus Vater-Tochter-Anpaarungen durch MASON (1988) wurde bei sieben von 27 Nachkommen beiderlei Geschlechts das Auftreten der HypoPP beobachtet. Der Autor schloss anhand seiner Beobachtungen auf einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus. Dieser Erbgang wurde auch durch Empirien von BLAXTER *et al.* (1986), GRUFFYDD-JONES (1997) und STOLZE *et al.* (2001) bestätigt.

Charakteristisch für die durch eine generalisierte Muskelschwäche gekennzeichnete HypoPP ist das anfallartige Auftreten der klinischen Symptome. Der zeitliche Abstand

zwischen den Episoden kann zwischen einigen Tagen bis mehreren Wochen variieren (GRUFFYDD-JONES 1996). Auch der Verlauf der Anfälle weicht zwischen den betroffenen Tieren ab. In einigen Fällen dauern die relativ selten erscheinenden Anfälle nur einige Stunden bis zu wenigen Tagen. In anderen Fällen halten die Symptome wesentlich länger an und treten häufiger auf (LANTINGA *et al.* 1998, STOLZE *et al.* 2001). Manche Besitzer berichten von betroffenen Katzen, die niemals ganz normal bzw. nicht so stark oder aktiv wirken wie ihre Zeitgenossen (GRUFFYDD-JONES 1996). Das erste Auftreten klinischer Erscheinungen der HypoPP ereignet sich meist im Alter von zwei bis sechs Monaten (GRUFFYDD-JONES *et al.* 1996). Die Erstmanifestation kann jedoch auch nach Erlangung der Geschlechts- oder sogar Zuchtreife im Alter bis zu zwölf Monaten erfolgen (MASON 1988, GRUFFYDD-JONES 1996). Körperliche Belastungen sowie sonstige Stressfaktoren wie etwa Krankheiten, Transport oder Besitzerwechsel scheinen das Auftreten der Anfälle zu begünstigen (GRUFFYDD-JONES 1996, BJELKE-HANSEN 2001).

Nach GRUFFYDD-JONES (1996) kann die anfallartig auftretende Muskelschwäche der beteiligten Gliedmaßenmuskeln sehr leicht sein, wodurch die Bewegung des Tieres nur mäßig eingeschränkt und das Wohlbefinden kaum beeinträchtigt wird. In schwereren Fällen aber werden die Katzen durch die generalisierte Muskelschwäche sogar unfähig zu laufen. Häufig zeigt sich die HypoPP durch eine auffällige Ventroflexion des Kopfes (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3: Burmakatze während eines HypoPP-Anfalls mit deutlicher Ventroflexion des Kopfes (freundlicherweise überlassen von B. Esser)

Das Tier kann den Kopf durch die Muskelschwäche der Nackenmuskulatur nicht mehr aufrecht halten, so dass in schweren Fällen das Kinn das Sternum berührt (BLAXTER *et al.* 1986, EDWARDS & BELFORD 1995). Insbesondere beim Laufen wird ein Tremor des Kopfes beobachtet (JONES *et al.* 1988, MASON 1988). Des Weiteren zeigen die Katzen während des Anfalls Bewegungsstörungen. An den Vordergliedmaßen wird häufig eine Hypermetrie auffällig. An den Hintergliedmaßen zeigen die betroffenen Tiere Ataxien und Paresen (STOLZE *et al.* 2001). Bei schweren Verläufen können die Katzen nur kurze Distanzen bewältigen. Bei einem Sprung nach unten sind sie nicht mehr in der Lage, auf allen vier Pfoten zu landen (JONES *et al.* 1988, MASON 1988). Zudem kann die Muskelschwäche zur Annahme einer veränderten Körperhaltung führen. Dabei wird die ungewöhnliche Beugung des Karpalgelenks häufig als Steifheit fehlinterpretiert (GRUFFYDD-JONES *et al.* 1996). In manchen Fällen kann die Muskelschwäche auch die Atemmuskulatur betreffen, so dass Dyspnoen auftreten können (JONES *et al.* 1988, GRUFFYDD-JONES *et al.* 1996). Bei schweren Verläufen können die Tiere an einer Atemlähmung sterben (STOLZE *et al.* 2001, THORMANN *et al.* 2001).

Im Blut wird im akuten Anfall, teilweise auch verzögert und erst bei abklingender Symptomatik eine Hypokaliämie nachgewiesen. Dabei kann die Kaliumkonzentration im Blutserum unter 3,0 mmol/l sinken (JONES *et al.* 1988, STOLZE *et al.* 2001). Der Referenzbereich der Kaliumkonzentration im Blutserum beträgt bei Katzen 3,5 bis 5,6 mmol/l (KIRSCH 1995, PHILLIPS & POLZIN 1998). Da die extrazelluläre Kaliumkonzentration entscheidend für die neuromuskuläre Transmission ist, führen Hypokaliämien generell zum Auftreten von Muskelschwächen (DOW *et al.* 1989, KIRSCH 1995). Im Gegensatz zu nicht erblichen Hypokaliämien ist bei Burmakatzen mit einer akuten HypoPP die Kreatinkinase-Aktivität im Blut signifikant erhöht (BLAXTER *et al.* 1986, DOW *et al.* 1987). Der Referenzbereich für die Kreatinkinase liegt bei Katzen unter 130 IU/l Blutserum, während eines Anfalles kann die Kreatinkinase auf tausende von Internationalen Einheiten ansteigen (BLAXTER *et al.* 1986, STOLZE *et al.* 2001). Trotz dieses Hinweises auf eine Muskelschädigung zeigen weder eine Elektromyographie noch eine Muskelbiopsie charakteristische Veränderungen (GRUFFYDD-JONES 1996). Auf dem Absinken der Kaliumkonzentration und der Erhöhung der Kreatinkinaseaktivität im Blut gepaart mit den klinischen Merkmalen in Kombination mit dem Auftreten bei Jungtieren der Rasse Burma basiert die Diagnose der HypoPP (LANTINGA *et al.* 1998).

Die genaue Krankheitsursache und der Pathomechanismus der hypokaliämischen periodischen Paralyse bei der Burmakatze sind bisher nur unvollständig geklärt

(LANTINGA *et al.* 1998). Bei Katzen sind Hypokaliämien sehr verbreitet, die durch zahlreiche Grunderkrankungen wie z. B. chronische Niereninsuffizienz hervorgerufen werden können (TAYLOR 2000). Dabei wird jede Änderung der Kaliumkonzentration im Blutserum durch einen Wechsel in der Aufnahme, Verteilung oder Exkretion des Kaliums hervorgerufen (KIRSCH 1995, DIBARTOLA 2001). Bei der HypoPP der Burma konnte SHELL (1995) weder eine mangelnde Aufnahme noch eine erhöhte Ausscheidung feststellen. PHILLIPS & POLZIN (1998) vermuten daher, dass eine intrazelluläre Verlagerung des Kaliums die klinischen Symptome hervorruft. Auch GRUFFYDD-JONES *et al.* (1996) postulieren eine Störung des Gleichgewichts zwischen intra- und extrazellulärem Kalium als Ursache der HypoPP. Die Verschiebung des Kaliums von extrazelluläre in intrazelluläre Kompartimente führt bei der analogen Erkrankung des Menschen zur Hypokaliämie im Blut (GRUFFYDD-JONES 1996). Durch Hypokaliämien können generell in der Skelettmuskulatur myopathische Veränderungen induziert werden. Anfänglich wird durch den Kaliummangel eine Hyperpolarisierung der Membran von Muskelzellen verursacht, da die extrazellulären Kaliumkonzentrationen wesentlich schneller abfallen als intrazelluläre Konzentrationen. Mit andauernder Hypokaliämie aber nimmt die Differenz des Ruhepotentials ab, die Membrane werden hypopolarisiert. Durch diese Veränderungen des Ruhemembranpotentials werden die Myozyten refraktär gegenüber elektrischen Stimuli. Die Unerregbarkeit führt zu schweren Muskelschwächen, welche zu Paralysen und sogar Rhabdomyolysen führen können (DOW *et al.* 1987).

2.4.2 Hypokaliämische Periodische Paralyse des Menschen

2.4.2.1 Genetische Ursachen der HypoPP des Menschen

Episodisch auftretende generalisierte Muskelschwächen, welche mit geringen Kaliumkonzentrationen im Blutserum begleitet werden, charakterisieren auch die Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP oder HOKPP, OMIM #170400) des Menschen (TALBOTT 1941). Als Ursache der Erbkrankheit wurden mehrere Mutationen in verschiedenen Genen für Untereinheiten von muskulären Ionenkanälen identifiziert. Abhängig von der Lokalisation der pathogenen Mutation werden als Subtypen HypoPP-1 (Genort *CACNA1S*), HypoPP-2 (Genort *SCN4A*) und HypoPP-3 (Genort *KCNE3*) unterschieden. Durch Kenntnis und Nachweis ursächlicher Mutationen wurde die präsymptomatische Diagnose möglich (JURKAT-ROTT *et al.* 1994, PTACEK *et al.* 1994a, BULMAN *et al.* 1999, JURKAT-ROTT *et al.* 2000,

SUGIURA *et al.* 2000, ABBOTT *et al.* 2001, DAVIES *et al.* 2001). Aufgrund der Heterogenität dieser Erkrankung ordnet NEUDECKER (2003) die HypoPP innerhalb der „Myotonen Myopathien und Ionenkanalerkrankungen“ den Untergruppen Calciumkanal-Myopathien (Typ 1), Natriumkanal-Myopathien (Typ 2) und Kaliumkanal-Myopathien (Typ 3) zu.

Die autosomal-dominante Vererbung der HypoPP konnte durch zahlreiche Fallstudien und Untersuchungen belegt werden (ROPERS & SZLIWOWSKI 1979, BURUMA *et al.* 1985, FONTAINE *et al.* 1994, PLASSART *et al.* 1994, BOERMAN *et al.* 1995, BULMAN *et al.* 1999). Die Penetranz ist bei Frauen in der Regel unvollständig (JURKAT-ROTT *et al.* 1994). SILLEN *et al.* (1997) konnten erstmals eine reduzierte Penetranz auch bei Männern in HypoPP-Familien mit Mutationen im *CACNA1S* beschreiben. Die Penetranz scheint innerhalb dieses Gens abhängig vom Ort der Mutation zu sein (IKEDA *et al.* 1997). Auch beobachteten STERNBERG *et al.* (2001) eine Penetranz von etwa 93% bei Männern und 67% bei Frauen mit Mutation im *SCN4A*-Gen. Die genetische Heterogenität der HypoPP wurde zunächst von PLASSART *et al.* (1994) postuliert. Die Studien von ELBAZ *et al.* (1995) bestätigten, dass unterschiedliche Mutationen den gleichen Phänotyp hervorrufen. Neben der familiären Form der HypoPP treten auch sporadische Fälle auf. Ursache hierfür sind *de novo* Mutationen, die in den Genen für *CACNA1S* (PTACEK *et al.* 1994a, KIM *et al.* 2001) und *SCN4A* (VENANCE *et al.* 2004) nachgewiesen wurden.

2.4.2.2 Subtypen der HypoPP des Menschen

2.4.2.2.1 Calciumkanal-Myopathie (HypoPP-1)

In der Skelettmuskulatur von besonderer Bedeutung für die Erregungs-Kontraktions-Kopplung ist der spannungsabhängige L-Typ Calciumkanal. Neben der Funktion als calciumführender Kanal ist die spannungsabhängige Kopplung der tubulären Depolarisierung und Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in direkter Protein-Protein-Interaktion mit dem Ryanodinrezeptor (*RYR1*) entscheidend für die Muskelfunktion (MORRILL *et al.* 1998, MORRILL & CANNON 1999, JURKAT-ROTT *et al.* 2002). Dieser Dihydropyridin-sensitive L-type Ca (2⁺) Kanal ist ein oligomerisches Protein und setzt sich aus fünf Untereinheiten zusammen (*alpha-1*, *alpha-2*, *beta*, *gamma*, *delta*). Zentrales Element ist die *alpha-1* Untereinheit, die die strukturellen Eigenschaften zur Ionenführung vermittelt und als tetramerische Einheit aus vier Domänen mit sechs *alpha*-helicalen Transmembransegmenten

aufgebaut ist (CHATTERALL 1988). Das Gen für die α -Untereinheit des Dihydropyridin-sensitiven Ca^{2+} -Kanals wird als *CACNAIS* (auch: *CACNLIA3*, *CCHLIA3*, *DHPR*, *HypoPP*, *HOKPP*, *MHS5*) bezeichnet. Das Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom HSA 1q32 (GREGG *et al.* 1993, ILES *et al.* 1994). Genomisch ist es in 44 Exons strukturiert und umfasst etwa 90 Kilobasenpaare (HOGAN *et al.* 1996).

Durch die Charakterisierung von Mikrosatelliten in drei betroffenen Familien aus Deutschland, Frankreich und Portugal konnten FONTAINE *et al.* (1994) mittels Kopplungsanalyse eine Beteiligung dieses Genorts an der HypoPP belegen. Das *CACNAIS*-Gen cosegregiert ohne Rekombination mit dem Merkmal HypoPP in informativen Familien. Innerhalb dieses Gens wurden in verschiedenen Familien ursächliche Mutationen gefunden (siehe Abbildung 4).

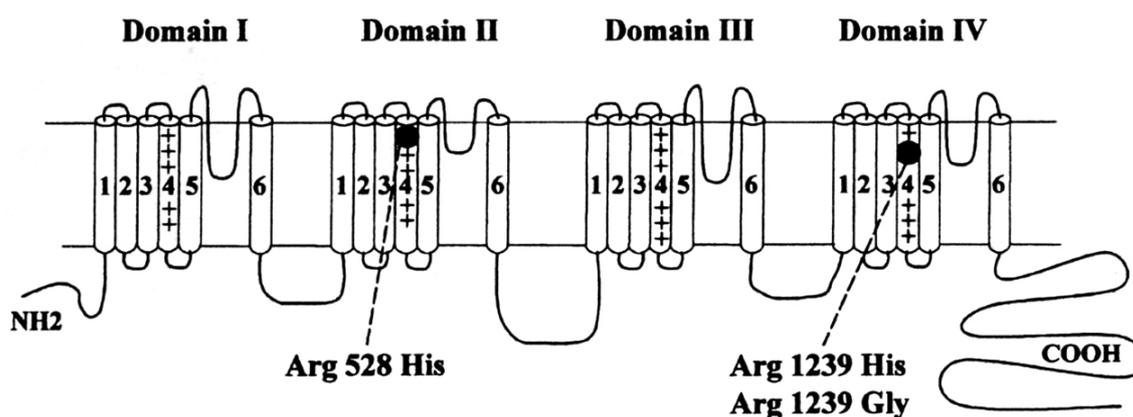


Abbildung 4: Schema des humanen *CACNAIS* Proteins mit markierten Positionen der HypoPP-1 auslösenden Argininsubstitutionen (STERNBERG *et al.* 2001).

PTACEK *et al.* (1994a) identifizierten im Transmembransegment IVS4 zwei Punktmutationen in einem Codon in Patientenfamilien aus verschiedenen ethnischen Gruppen. Die Substitutionen G3716A und C3717G in der mRNA des *CACNAIS* führen beide zum Austausch desselben Arginins (Arg1239His und Arg1239Gly). JURKAT-ROTT *et al.* (1994) charakterisierten in neun von 25 untersuchten HypoPP-Familien eine Transition (G1583A), die zu einer Substitution von Arginin durch Histidin (Arg528His) im Transmembransegment IIS4 führt. Durch diese *missense* Mutationen wird die positive Ladung der Transmembransegmente beeinflusst, die an

der Spannungsmessung beteiligt sind (JURKAT-ROTT *et al.* 1994, PTACEK *et al.* 1994a). Diese krankheitsverursachenden Mutationen im *CACNAIS* konnten durch zahlreichen Studien in HypoPP-betroffenen Familien unterschiedlicher Ethnologie nachgewiesen werden. So trat die Substitution Arg528His in dänischen, japanischen, koreanischen und italienischen Familien auf (BOERMAN *et al.* 1995, IKEDA *et al.* 1997, KIM *et al.* 2001, CACIOTTI *et al.* 2003). In mehreren kaukasischen und skandinavischen Familien traten sowohl die Mutation Arg528His als auch die Mutation Arg1239His auf (ELBAZ *et al.* 1995, SILLEN *et al.* 1997). Etwa die Hälfte der bekannten HypoPP-1 Fälle werden durch die Mutation Arg528His, die andere Hälfte durch die Mutation Arg1239His verursacht (ELBAZ *et al.* 1995, MORRILL *et al.* 1998). Die Mutation Arg1239Gly wurde in nur einer Studie identifiziert (PTACEK *et al.* 1994). Durch das Auftreten von mehreren dominanten Mutationen schließen ELBAZ *et al.* (1995) einen gemeinsamen Vorfahren (*founder effect*) aus.

Die Physiologie der HypoPP-1 konnte bis heute auch mit elektrophysiologischen Studien in verschiedenen Expressionssystemen nicht vollständig geklärt werden (RUFF 1999, KUZMENKIN *et al.* 2002). Nach JURKAT-ROTT *et al.* (2000) ist ein Defekt der Erregung wahrscheinlicher als ein Defekt der Erregungs-Kontraktions-Kopplung. Die Erregbarkeit der Zellmembranen wird laut RUFF (1999) durch die Mutationen im *CACNAIS* direkt durch Änderung der Funktion anderer Membrankanäle gestört. Durch die Lokalisation der *missense* Mutationen in den putativen Spannungssensoren (S4-Segmenten) des *CACNAIS* liegt eine Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Konformationszustände nahe (MORRILL *et al.* 1998). *In vitro* untersuchte Muskelzellen von HypoPP-Patienten weisen eine anhaltene Depolarisation der Membran auf, so dass die Zellen bei Reduzierung der extrazellulären Kaliumkonzentration unerregbar wurden (JURKAT-ROTT *et al.* 1994). Die pathologische Depolarisierung kann laut RUFF (1999) aber nicht durch die Mutationen im *CACNAIS* erklärt werden. Expressionsstudien von MORRILL & CANNON (1999) in Oozyten des *Xenopus laevis* zeigten, dass durch die Mutationen der maximale Ionenfluss reduziert wurde und die Aktivierungseigenschaften des Kanals beeinflusst werden. Die Arg528His Mutation führte sowohl zu einer Abnahme der Ionenflussdichte (indirektes Merkmal für Kanaldichte) als auch zu einer moderaten Reduktion der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstante. Die Mutationen Arg1239His und Arg1239Gly hingegen verringerten und verlangsamten die Aktivierungsrate der Ca-Kanäle signifikant. Auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung selbst scheinen die Mutationen auch in heterozygoten Zellkulturen keinen Einfluss zu haben (MORRILL *et al.* 1998, MORRILL & CANNON 1999).

2.4.2.2.2 Natriumkanal-Myopathie (HypoPP-2)

Der Aufbau des Aktionspotentials bei Muskelzellen wird durch das Öffnen der spannungsabhängigen Natriumkanäle vermittelt, das einen Na^+ -Einstrom mit schneller Aktivierungskinetik auslöst. Diese Natriumkanäle bestehen aus einer spannungsmessenden *alpha*- und einer akzessorischen *beta-1* Untereinheit. Die *alpha*-Untereinheit bildet die ionenführende Pore und wird durch das Gen *SCN4A* codiert. Das Protein wird analog zum *CACNAIS* aus vier Domänen mit sechs Transmembransegmenten gebildet. Dieses Gen ist auf dem humanen Chromosom HSA 17q23.1-25.3 lokalisiert (FONTAINE *et al.* 1990, GEORGE *et al.* 1991). MCCLATCHEY *et al.* (1992a) untersuchten die genomische Struktur des *SCN4A*, welches aus 24 Exons aufgebaut ist und etwa 35 kb im Genom umfasst. In diesem Gen wurden mehr als 30 *missense* Mutationen identifiziert, die mit verschiedenen Muskelkrankheiten wie *Paramyotonia congenita* (PMC; Eulenburg, OMIM #168300), Kalium-verstärkte Myotonien (OMIM #608390) und hyperkaliämische periodische Paralyse des Menschen (HyperPP, OMIM #170500) und des Pferdes (HyPP) assoziiert sind (RUDOLPH *et al.* 1992, VICART *et al.* 2005). Bestimmte Mutationen in diesem Gen verursachen die hypokaliämische periodische Paralyse des Subtyps HypoPP-2. Bei der Untersuchung von Patientenfamilien, in denen eine Kopplung zwischen HypoPP und *CACNAIS* ausgeschlossen werden konnte, identifizierte BULMAN *et al.* (1999) eine Transition in der mRNA, die zur Substitution Arg669His führt (siehe Abbildung 5).

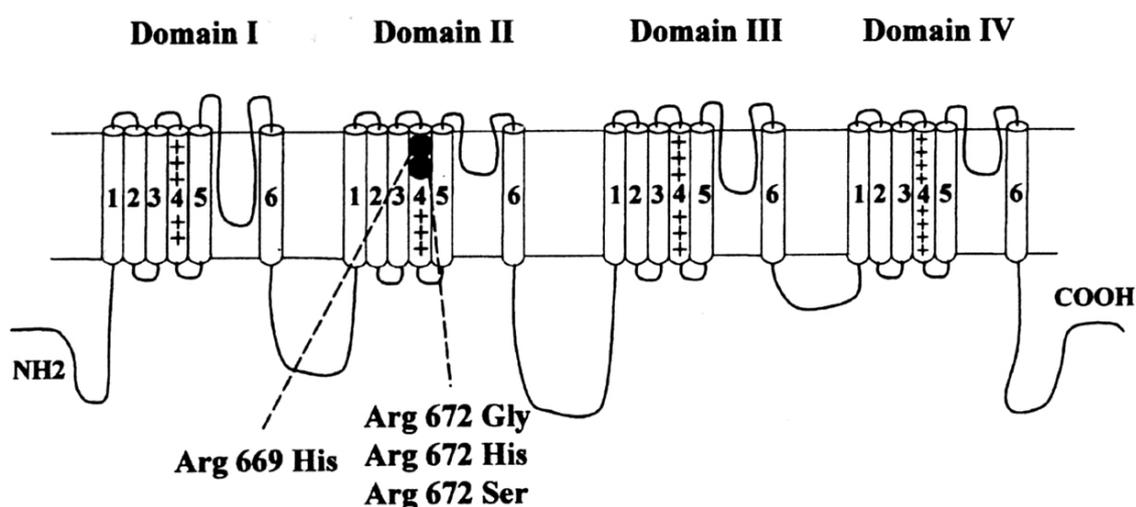


Abbildung 5: Schema des humanen *SCN4A* Proteins mit markierten Positionen der HypoPP-2 auslösenden Argininsubstitutionen (STERNBERG *et al.* 2001)

JURKAT-ROTT *et al.* (2000) wiesen in zwei HypoPP-Familien die Mutationen Arg672His und Arg672Gly nach. Im selben Codon fanden DAVIES *et al.* (2001) die Substitution Arg672Ser. An der gleichen Position identifizierten KIM *et al.* (2004) in einer koreanischen Patientengruppe die Mutation Arg672Cys. Differenzen zum klinischen Bild der durch Mutationen im *CACNA1S* Gen untersuchten Fälle wurden nicht beobachtet (JURKAT-ROTT *et al.* 2000). Alle diese *SCN4A* Mutationen neutralisieren ein positiv geladenes Arginin im Spannungssensor S4 der Transmembrandomäne II, die einen *hot spot* für Mutationen darstellt (KUZMENKIN *et al.* 2002, VICART *et al.* 2005). Zudem konnten SUGIURA *et al.* (2000) in einer japanischen Familie mit einem ungewöhnlichen temperaturabhängigen HypoPP-Phänotyp eine Mutation im *SCN4A* Gen identifizieren. Betroffene Familienmitglieder zeigen Hitze-induzierte Myotonien und Kälte-induzierte hypokaliämische Paralysen, die durch die Pro1158Ser Substitution zwischen dem vierten und fünften Transmembransegment der Domäne III verursacht wird.

JURKAT-ROTT *et al.* (2000) beobachteten an heterozygoten Muskelzellen von HypoPP-Patienten *in vitro* mit Arg672Gly und Arg672His Substitutionen eine Linksverschiebung des Membranpotentials, das die schnelle Inaktivierung der Kanäle auslöst. Auch die elektrophysiologischen Studien von KUZMENKIN *et al.* (2002) in transformierten Zelllinien zeigten, dass durch die Mutationen Arg672Gly, Arg672His sowie Arg669His eine verstärkte schnelle Inaktivierung der Kanäle verursacht wird. Durch die erhöhte Inaktivierung wird die Anzahl funktioneller Natriumkanäle in der Zellmembran reduziert (JURKAT-ROTT *et al.* 2000, KUZMENKIN *et al.* 2002). Die langsame Inaktivierung ist bei Arg672Gly und Arg669His Varianten durch eine Linksverschiebung der Membranspannung erhöht, so dass auch hierdurch eine weitere Reduktion der funktionalen Kanäle verursacht wird (JURKAT-ROTT *et al.* 2000, STRUYK *et al.* 2000). Bei funktionellen Analysen in Zelllinien mit einer Pro1158Ser Mutante wurden durch SUGIURA *et al.* (2003) Verschiebungen in der spannungsabhängigen Aktivierung und Inaktivierung der Kanäle festgestellt, die aber durch Temperaturänderungen ausgelöst werden. Zudem beobachteten JURKAT-ROTT *et al.* (2000) eine generell geringere Dichte von Na⁺-Kanälen im Vergleich zu Zellen ohne Mutationen. Die Erregung der Muskelfasern hängt aber von der Verfügbarkeit von Natriumkanälen ab. Wenn durch die Mutationen die Natriumkanäle bei bestimmten Spannungen vermehrt inaktiviert werden, können sie nicht mehr an die Erzeugung und Weitergabe eines Aktionspotentials mitwirken. Insgesamt können durch den reduzierten Ionenfluss nur geringere, langsamer geführte Aktionspotentiale entstehen. Die Muskelfasern von HypoPP-Patienten werden schwer bzw. unerregbar und tragen

zur lang anhaltenden Phase der Paralyse bei (JURKAT-ROTT *et al.* 2000, JURKAT-ROTT *et al.* 2002, KUZMENKIN *et al.* 2002).

2.4.2.2.3 Kaliumkanal-Myopathie (HypoPP-3)

Die Diffusion von Kalium durch die Zellmembranen erfolgt durch spannungsabhängige Kaliumkanäle. Die ionenführende Pore in der Skelettmuskulatur wird aus vier *alpha*-Untereinheiten Kv3.4 (Gen: *KCNC4*) gebildet, die wiederum jeweils aus einer Domäne mit sechs Transmembransegmenten bestehen (JAN & JAN 1994). Die Kanaleigenschaften werden wesentlich durch das *Mink related peptid 2 (MiRP2)* als akzessorische *beta*-Untereinheit beeinflusst. Dieses Peptid besteht aus einer Transmembrandomäne und wird durch das Gen *KCNE3* codiert (ABBOTT & GOLDSTEIN 2001, MCCROSSAN & ABBOTT 2004). Das *MiRP2* besteht aus 103 Aminosäuren, genomisch ist das *KCNE3*-Gen in drei Exons strukturiert und umfasst etwa 7 kb des humanen Chromosoms HSA 11q13-q14 (ABBOTT *et al.* 1999, ABBOTT *et al.* 2001).

ABBOTT & GOLDSTEIN (2001) untersuchten das *KCNE3* bei 100 Patienten mit erblichen oder sporadischen Muskelkrankheiten. In zwei Familien mit Periodischer Paralyse konnten die Autoren eine *missense* Mutation im *KCNE3* identifizieren, die zu einer Substitution von Arginin zu Histidin führt (Arg83His). Die Erkrankung wurde in einem Pedigree als HypoPP klassifiziert, auch wenn sie in einigen klinischen Details abweicht (ABBOTT & GOLDSTEIN 2001). In der Studie von STERNBERG *et al.* (2003) zur Klärung von 64 HypoPP- und HyPP-Fällen ohne Mutationen in den Genen *CACNA1S* oder *SCN4A* konnte diese Arg83His Substitution nicht belegt werden. Ein anderer Patient mit HypoPP wies sowohl den Arg83His als auch den Arg672His Austausch im *SCN4A* auf. Sein Vater zeigte den klinischen Phänotyp durch die Mutation im *SCN4A*, die Mutter mit der Substitution im *KCNE3* war symptomfrei. JURKAT-ROTT & LEHMANN-HORN (2004) identifizierten die Arg83His Mutation in einem von 76 Patienten mit Hyperkaliämischer Periodischer Paralyse (HyPP), in einem von 61 Patienten mit *Paramyotonia congenita*, in fünf nicht betroffenen Verwandten und in drei von 321 gesunden Kontrollen. Die Gabe von Glukose bzw. Insulin an einen gesunden Träger dieser Mutation konnte keine Muskelschwäche induzieren. Aus ihren Beobachtungen schlossen sowohl STERNBERG *et al.* (2003) als auch JURKAT-ROTT & LEHMANN-HORN (2004), dass die Arg83His Mutation nicht ursächlich an Periodischen Paralysen bzw. anderen Muskelkrankheiten beteiligt ist.

2.4.3 Gegenüberstellung der Krankheitsbilder der HypoPP von Mensch und Katze

Charakteristisch für die Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP) von Mensch und Katze sind episodisch auftretende Muskelschwächen in Begleitung von niedrigen Kaliumkonzentrationen im Blut (TALBOTT 1941, BURUMA *et al.* 1985, MASON 1988, GRUFFYDD-JONES 1996). In Tabelle 3 sind die wesentlichsten Merkmale der HypoPP von Mensch und Katze gegenübergestellt.

Tabelle 3: Gegenüberstellung wesentlicher Merkmale des Krankheitsbildes der HypoPP bei Mensch und Katze

Merkmal	Mensch	Katze
Symptome	anfallartige Paralysen	anfallartige Paralysen
Erstmanifestation	juvenile Lebensphase	juvenile Lebensphase
Häufigkeit	unterschiedlich	unterschiedlich
Dauer	Stunden bis Tage	Stunden bis Tage
Schwere	unterschiedlich, z.T. letal	unterschiedlich, z.T. letal
Therapie	Kaliumsubstitution	Kaliumsubstitution
Kaliumkonzentration im Blut	unter 2 mmol/l	unter 3 mmol/l
Kreatinkinasekonzentration im Blut	innerhalb Referenzbereich während eines Anfalls	über 1000 I.E.
Elektromyographie	myopathische Veränderungen	ohne Befund
Ursache	Mutationen in Ionenkanälen	unbekannt
Erbgang	autosomal-dominant mit unvollständiger Penetranz	autosomal-rezessiv

Während die Erkrankung beim Mensch sehr gut erforscht und die verursachenden Mutationen und Zusammenhänge auf Molekular- und Proteinebene bekannt sind, konnten bis heute die Ätiologie und Pathogenese der HypoPP der Burmakatze nicht vollständig geklärt werden (LANTINGA *et al.* 1998, KLEIN *et al.* 2005). Der jeweilige Verlauf sowie die Schwere und Häufigkeit der Anfälle sind sehr variabel. Von der Paralyse können die Beine, alle Extremitäten oder auch der ganze Körper betroffen sein (BOERMAN *et al.* 1995, BULMAN *et al.* 1999). Bei der Katze werden zudem die Symptome häufig differenzierter beschrieben durch die Ventroflexion des Kopfes und Hypermetrien, Ataxien sowie Paresen der Gliedmaße (GRUFFYDD-JONES *et al.* 1996, STOLZE *et al.* 2001). Wenn die Atmungsmuskulatur betroffen ist, können die Anfälle bei Mensch und Tier Dyspnoen verursachen und letal enden (JURKAT-ROTT *et al.* 1994, STOLZE *et al.* 2001). Stresssituationen begünstigen in beiden Spezies das Auftreten von Anfällen der Muskelschwäche (GRUFFYDD-JONES 1996, STERNBERG *et al.* 2001). Die Erstmanifestation der Erkrankung

erfolgt bei Mensch und Katze häufig in der juvenilen Lebensphase, mit Erreichen eines mittleren Lebensalter nimmt die Frequenz der Anfälle ab (FONTAINE *et al.* 1994, GRUFFYDD-JONES 1996, GRUFFYDD-JONES *et al.* 1996, STERNBERG *et al.* 2001). Charakteristisch für die HypoPP ist die geringe Kaliumkonzentration im Blut von unter 3 mmol/l bei der Katze bzw. unter 2 mmol/l beim Mensch während eines Anfalls (JONES *et al.* 1988, JURKAT-ROTT *et al.* 1994). Durch die Substitution von Kalium kann bei beiden Spezies die akute Paralyse in der Regel gelöst oder zumindest im Verlauf gemildert werden (LANTINGA *et al.* 1998, LINKS *et al.* 2004, VENANCE *et al.* 2006). Eine Langzeittherapie mit Kalium kann das Auftreten der klinischen Merkmale vermeiden (GRUFFYDD-JONES 1996).

Aufgrund der zahlreichen Analogien des Krankheitsbildes wurde die Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP, auch HOKPP) des Menschen in der vorliegenden Arbeit als Modell für die HypoPP der Burmakatze herangezogen. Auch bei anderen Erkrankungen von Katzen werden bei den unterschiedlichen Spezies gleiche Krankheitsbilder durch Mutationen im äquivalenten Gen und daraus resultierender gleicher Pathogenese verursacht. So konnten etwa LYONS *et al.* (2004) im felines *PKD1*-Gen eine kausale Mutation für die Polyzystische Nierenerkrankung (PKD) der Perserkatze nachweisen. Auch beim Mensch werden 85 % der Fälle der autosomal-dominanten Polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) durch Veränderungen im Gen für *PKD1* ausgelöst (YOUNG *et al.* 2005). Die ebenfalls heterogene Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) des Menschen wird durch die Proteinstruktur oder -funktion verändernde Mutationen in Genen für verschiedene sarkomere Proteine wie auch das *MYBPC3* verursacht (TARDIFF 2005, LIND *et al.* 2006). Bei Maine Coon-Katzen einer von HCM betroffenen Familie konnten MEURS *et al.* (2005) ebenfalls im Gen des *cardiac myosin binding protein C* (*MYBPC3*) die ursächliche Mutation identifizieren.

Die Symptomatik der HypoPP beider Spezies unterscheidet sich hinsichtlich der Veränderungszeitpunkte der Kreatinkinasegehalte im Blut, die auf eine Muskelschädigung hinweisen. Bei der Katze ist die Kreatinkinase-Aktivität während eines akuten Anfalls auch im Gegensatz zu nicht-erblichen Hypokaliämien signifikant erhöht (BLAXTER *et al.* 1986, STOLZE *et al.* 2001). Beim Menschen hingegen steigen die Kreatinkinasekonzentrationen im Blut erst einige Zeit nach dem Auftreten eines Anfalls an (DE KEYSER *et al.* 1987, DOW *et al.* 1987). Die Muskelzellen betroffener Katzen zeigen trotz der erhöhten Kreatinkinase-Aktivität keine Veränderungen in der Elektromyographie oder Biopsie (GRUFFYDD-JONES 1996). Beim Mensch hingegen konnten in den Muskelzellen myopathische Veränderungen

durch vaskuläre und tubuläre Aggregate festgestellt werden (STERNBERG *et al.* 2001). Einige der humanen HypoPP-Patienten entwickeln zudem progressive Myopathien (KUZMENKIN *et al.* 2002). Eine weitere, wesentliche Abweichung in den Krankheitsbildern ist der zugrunde liegende Erbgang. Die Studie von MASON (1988) sowie die empirischen Beobachtungen anderer Autoren postulieren einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus der HypoPP bei der Burmakatze (BLAXTER *et al.* 1986, GRUFFYDD-JONES 1997, STOLZE *et al.* 2001). Beim Mensch hingegen wird diese Erkrankung autosomal-dominant vererbt (ROPERS & SZLIWOWSKI 1979, BURUMA *et al.* 1985, BULMAN *et al.* 1999). Die Penetranz kann abhängig von der Position der Mutation im betroffenen Gen und dem Geschlecht des Patienten reduziert sein (JURKAT-ROTT *et al.* 1994, IKEDA *et al.* 1997, SILLEN *et al.* 1997). Beim Menschen sind neben der familiären Form der HypoPP auch sporadische Fälle durch *de novo* Mutationen an gleichen Positionen bekannt (PTACEK *et al.* 1994a, KIM *et al.* 2001, VENANCE *et al.* 2004).

3 Material

3.1 Tiere und Probenmaterial

3.1.1 Datenmaterial

3.1.1.1 Burmakatzenfamilie

Für die Untersuchung standen Informationen zu einer von der Hypokaliämischen Periodischen Paralyse (HypoPP) betroffenen Burmakatzenfamilie zur Verfügung, aus der von 64 Individuen Blutproben eingeworben werden konnten. Durch den Pedigree jedes dieser Tiere, zum Teil mit Angaben über acht Generationen, konnte ein Gesamtstammbaum für 424 Individuen aufgestellt werden. Für Analysen zum Erbgang der HypoPP wurde ein Ausschnitt dieses Stammbaums berücksichtigt, der Verwandtschaftsinformationen zu den 64 in den molekularbiologischen Untersuchungen einbezogenen Katzen enthält. Innerhalb dieser Familie wurden für die Schätzung von Haplotypen nochmals 21 Subfamilien (*nuclear families*) aus jeweils einer Elterngeneration und ihren direkten Nachkommen abgegrenzt. Die Abbildung 6 zeigt einen Ausschnitt des Stammbaums mit von HypoPP betroffenen und symptomfreien Tieren sowie vermutlichen Anlageträgern.

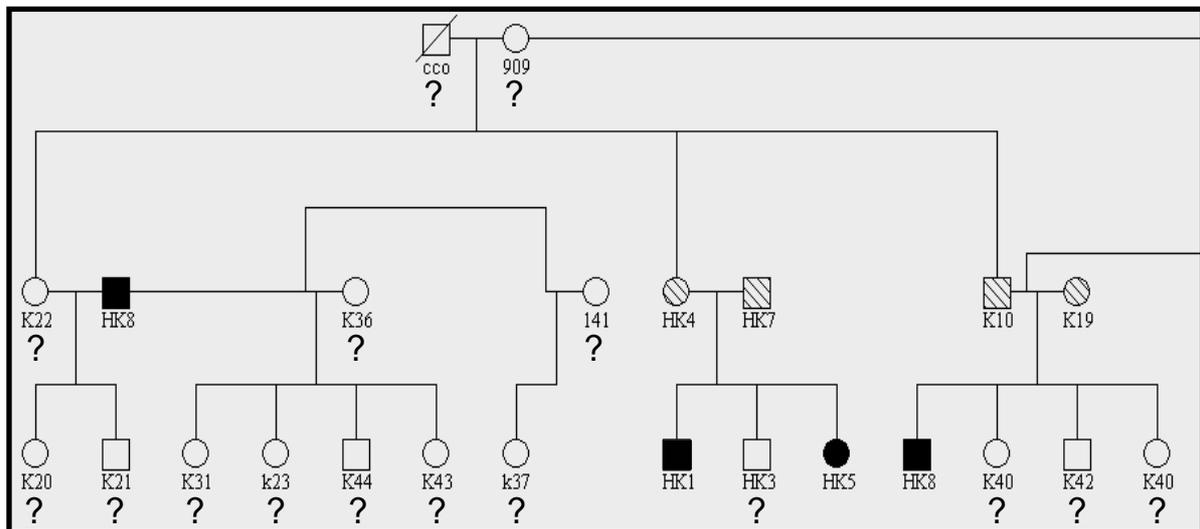


Abbildung 6: Ausschnitt des Pedigrees der Burmakatzenfamilie

mit von HypoPP betroffenen Tieren (schwarze Symbole), vermutlichen Anlageträgern (schraffierte Symbole), symptomfreien Tieren (weiße Symbole) und mit Markierung (Fragezeichen) der Tiere mit ungeklärter genetischer Ausstattung bezüglich HypoPP

Beobachtungen über den Status der HypoPP beim jeweiligen Tier und seinen direkten Verwandten wurden von den Tierbesitzern bzw. Züchtern anhand von Fragebögen angegeben. Anhand dieser Informationen wurden die zu analysierenden Burmakatzen verschiedenen Merkmalsklassen zugeordnet, wobei zwei Modelle für die Assoziationsanalyse entworfen wurden. Im ersten Modell wurden die Merkmale in „klinische Symptome“ und „symptomfrei“ unterschieden. Insgesamt haben sieben Tiere Symptome der HypoPP gezeigt, die anderen 57 wurden der Klasse „symptomfrei“ zugeordnet. Im zweiten Modell wurden unter Annahme des autosomal-rezessiven Erbgangs der HypoPP nach MASON (1988) vier Klassen („HypoPP betroffen“, „Anlageträger“, „potentieller Anlageträger“, „unbekannt“) gebildet. Die Verteilung der Tiere auf die Merkmalsklassen innerhalb beider Modelle ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Verteilung der Burmakatzen (n = 64) des Panels in Merkmalsklassen unter Annahme verschiedener Modelle

Modell	Klasse	Anzahl Tiere (n)
Modell I	klinische Symptome	7
	symptomfrei	57
Modell II	HypoPP betroffen	7
	Anlageträger	14
	potentieller Anlageträger	15
	unbekannt	28

3.1.1.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus Datenbanken

Zur Ableitung von Primern in konservierten Bereichen des *CACNA1S*-Gens bei verschiedenen Spezies wurden die unten angeführten mRNA-Sequenzen von Mensch, Maus, Ratte und Kaninchen aus der Datenbanken des National Center for Biotechnology Information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt (siehe Abbildung 7).

ENSBTAT00000006396: *Bos taurus*, *Ensembl Transcript Report*, *Novel Ensembl Orthologue prediction for CACNA1S*

ENSCAFT000000017400: *Canis familiaris*, *Ensembl Transcript Report*, *Novel Ensembl Orthologue prediction for CACNA1S*

ENSG00000081248: *Homo sapiens, Ensembl Gene Report, Ensembl Human Gene View of CACNA1S*

ENSG00000362061: *Homo sapiens, Ensembl Exon Report, Ensembl Human Exon View of Transcript CACNA1S*

ENSPTRT00000003318: *Pan troglodytes, Ensembl Transcript Report, Novel Ensembl Orthologue prediction for CACNA1S*

L04684: *Rat dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel alpha-1 subunit (CCHL1A3) mRNA, 3' end*

NM_000068: *Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit (CACNA1A), transcript variant 1, mRNA*

NM_000069: *Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit (CACNA1S), mRNA*

NM_001009307: *Felis catus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA*

NM_007578: *Mus musculus calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit (Cacna1a), mRNA*

NM_007579: *Mus musculus calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit (Cacna1b), mRNA*

NM_012918: *Rattus norvegicus calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit (Cacna1a), mRNA*

X05921: *Rabbit mRNA for dihydropyridine (DHP) receptor (from skeletal muscle)*

XM_358335: *PREDICTED: Mus musculus calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit (Cacna1s), mRNA*

Abbildung 7: Übersicht aller aus den Datenbanken des NCBI verwendeten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Diese sowie weitere mRNA- und Aminosäuresequenzen von verschiedenen spannungsabhängigen Calciumkanaltypen wurden auch zur vergleichenden Analyse mit der identifizierten Sequenz des felinen *CACNA1S* verwendet. Zur Entwicklung von Primern zur Amplifikation der Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) als *housekeeping*-Gen diente die Sequenz der felinen mRNA (NM_001009307).

3.1.2 Probenmaterial

3.1.2.1 Proben zur DNA-Analyse

Aus dem Vollblut der in Kapitel 3.1.1.1 beschriebenen 64 Burmakatzen wurde die DNA für die anschließenden molekulargenetischen Analysen extrahiert. Gewebe zur DNA-Extraktion (Vollblut, Muskel, Gonaden) bzw. DNA-Proben von weiteren Katzen verschiedener Rassen wurden von mehreren Tierbesitzern, der Klinik für Kleintiere (Justus-Liebig-Universität) und dem Institut für Veterinär-Pathologie (Justus-Liebig-Universität) zur Verfügung gestellt. In Tabelle 5 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA-Proben nach Anzahl je Rasse aufgeführt.

Tabelle 5: Zusammenfassende Übersicht der DNA-Probenzahl nach Rasse innerhalb der Haarlängenkategorien nach WCF (2007)

Kategorie	Rasse (EMS-Code)	Anzahl (n = 208)
Langhaarrassen (LHR)	Perser (PER)	48
Halblanghaarrassen (HHR)	Heilige Birma (SBI)	5
	Maine Coon (MCO)	11
	Norwegische Waldkatze (NFO)	7
	Ragdoll (RAG)	1
	Türkische Angora (TUA)	1
Kurzhaarrassen (KHR)	Abessiner (ABY)	1
	Britisches Kurzhaar (BIR)	6
	Burma (BUR)	66
	Europäisches Kurzhaar (EUR)	48
	Exotisches Kurzhaar (EXO)	1
	Karthäuser (CHA)	3
	Orientalisches Kurzhaar (ORI)	1
	Russisch Blau (RUS)	1
	Siam (SIA)	7
	Sibirier (SIB)	1

Drei Proben aus der von HypoPP betroffenen Familie (Labornummer HK01, HK04 und HK06) und eine DNA-Probe einer Europäischen Kurzhaarkatze (Labornummer PK0) wurden zur Identifikation der Sequenz innerhalb ausgewählter genomischer Abschnitte des *CACNA1S* sowie die vergleichende Sequenzierung verwendet. Bei 138 Proben erfolgte die genotypische Charakterisierung auf Basis von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), die durch PCR-RFLPs nachgewiesen wurden. Insgesamt 113 Proben konnten zur Analyse von Haplotypen verwendet werden. Die Typisierung des

Mikrosatelliten *GIKA001* wurde bei allen Tieren durchgeführt. Eine Darstellung aller DNA-Proben mit Kennzeichnung der im Einzelnen durchgeführten Methoden ist im Anhang Tabelle 52 aufgeführt.

3.1.2.2 Proben zur RNA-Analyse

Zur Identifizierung der mRNA-Sequenz des *CACNA1S* wurde einer Perserkatze kurz nach dem Exitus Muskelgewebe entnommen und auf Trockeneis bei -78° C eingefroren. Zur Isolation der RNA für die Expressionsanalysen wurden Gewebeproben (Gehirn, Herzmuskulatur, Uterus, Skelettmuskulatur, Lunge, Leber, Niere, Milz, Vollblut) von zwei Europäischen Kurzhaarkatzen verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht der RNA-Proben zur Identifikation der mRNA-Sequenz und der Expressionsanalysen des *CACNA1S*

Labornummer	Rasse (EMS-Code)	Geschlecht	Verwendung
TK2 - Muskel	Perser (PER)	w	mRNA-Sequenz des <i>CACNA1S</i>
TK5 - Gehirn	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK5 - Herz	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK5 - Uterus	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK5 - Muskel	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK5 - Lunge	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK5 - Leber	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK5 - Niere	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK5 - Milz	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK5 - Blut	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK6 - Gehirn	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK6 - Herz	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK6 - Uterus	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK6 - Muskel	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK6 - Lunge	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK6 - Leber	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK6 - Niere	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>
TK6 - Milz	Europäisch Kurzhaar (EUR)	w	Expressionsanalyse <i>CACNA1S</i>

Diese wurden wenige Minuten nach dem Tod der Tiere entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle drei der in Tabelle 6 aufgeführten Tiere waren aufgrund einer Erkrankung mit infauster Prognose (TK2 und TK5: Thymusleukose,

TK6: Hirntumor) in der Klinik für Kleintiere (Justus-Liebig-Universität) euthanasiert worden.

3.2 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Primer zur Amplifikation der Gene *CACNAIS* und *GAPDH* wurden mit Hilfe der Software Primer3 abgeleitet und optimiert (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Diese Primer wurden wie auch die M13-Primer des pGEM-T[®] Plasmids im Auftrag bei MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurden die im RevertAid[™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) enthaltenen *random hexamer* und *poly(dt)₁₈* Primer verwendet. Die für die Erstellung der RACE-cDNA sowie für die Amplifikation der cDNA-Enden genutzten Oligonukleotide wurden mit dem BD SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (Becton Dickinson, Heidelberg) geliefert. Alle Primersequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht aller verwendeten Primer zur Amplifikation von *CACNAIS*-, *GAPDH*- und pGEM-T[®]-Fragmenten mit der jeweiligen Basensequenz

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
10x Universal Primer Mix	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT CTAATACGACTCACTATAGGGC
3'-RACE CDS Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀
3'RACEfwd	TGGGCTTAGAGCTAGCATGACCAAC
5'-RACE CDS Primer	(T) ₂₅ VN
5'RACE#2rev	AGGGCCACACAGTTGGCAAAGATGGT
5'RACE#3rev	TTGTCATCTTCTGGCATGGGCAGGTACAC
Ca-1405fwd	GACACAGAGAGCCTGTATGAAATC
Ca-1584rev	GTGCTCTGAGGCGATAGACAG
Ca-1759_fwd	CTGCTGGTGGAGTCAGGTG
Ca-249_fwd	TGARGGCCTGAGGAAGAAAC
Ca-2552fwd	CCAGCTCCTTCTTCATTTTCAGC
Ca-2747rev	GAGGTGAACGCAATGTTCGAAATAC
Ca-3908fwd	CCCGGATCTCCAGCGCCTTCT
Ca-4083rev	ATGCCGATGACGGCGTAGATGAAG
Ca-4127_fwd	ACCGGAACAACAACCTTCCAG
Ca-4142rev	AAGTTGTTGTTCCGGTTTATTTG
Ca-4606fwd	GTCACCTTCAACGCCACTCTCTTC

Fortsetzung Tabelle 7: Übersicht aller verwendeten Primer zur Amplifikation von *CACNAIS*-, *GAPDH*- und pGEM-T[®]-Fragmenten mit der jeweiligen Basensequenz

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
Ca-4737_fwd	GCTCTTGGATCAGGTCATTCC
Ca-4762_rev	TTGGAGGAATGACCTGATCC
Ca-4869rev	GGGCCGATACCCATAATACTCTTCC
Ca-5265_fwd	ATTTTCCAGCATCCGCTATG
Ca-5531fwd	CGGTAGGACCAAGGAGAGTAGTTC
Ca-5700_rev	CACGTCCTCTGGTTCCATCT
Ca-6066rev	GGCCTATTTGAATGACATTAGAAGC
Ca-845_fwd	TCATCATCTATGCCATCATCGG
Ca-894rev	GTGCATYTTGCCCTTGAAGA
CaInt17-189rev	CTGGCTAAAATTGCCCTCAG
CaInt31-136fwd	AGGGGCGTAGCTGTGAGTCT
CaInt31-361rev	CCAACTTGGGGACTCAGTGT
CaInt36-446fwd	CCGAAGGCAATCAGGACCAC
CaInt36-898rev	CACACGGCCCAAGTCAACTG
CaInt9-?rev	GTTGGTGAGGGTGTGGAAAG
CaInt9-386fwd	GGAGACACTCCAGGCTCAAG
CAT#1_fwd	CTTCCGCCTSTTCCGDGT
CAT#4_rev	AGGGCRAABAGBGTGGCATT
CAT2-02_rev	CCAGAGCCTTYTGGATCAGC
CAT3-01_fwd	GTCACYTCCTCCTACTTTGAATAC
CAT3-02_rev	CCCTTRGCCTCTGGGTCRTAC
FCA-CK#1fwd	ATCCCTCCAAGACCTTTGCT
FCA-CK#2rev*	Cy5-CTGGGTTCTGTTGGGACAGT
GAPDH_2-1fwd	TCACCAGGGCTGCTTTTAAAC
GAPDH_2-2rev	CGGTTGCTGTAGCCAAATTC
Intron17fwd	TCTGCTTCGTGGATGGAGAT
Intron36fwd	AATGGCAGTGTTCGTGCAG
Intron37-rev	GGCCTGCTCAAAGTTACCTG
<i>random hexamer</i> Primer	d(NNNNNN)
M13fwd	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13rev	AACAGCTATGACCATGA
MutJRfwd	CTTCGACTGCTTCGTGGTGT
MutJRrev	TTGAAGAYCCTCAGGAGGCG
MutPrev	TTGATGAAYGTCASAGSAG
<i>Nested Universal</i> Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
<i>oligo(dT)₁₈</i> Primer	d(TTTTTTTTTTTTTTTTTT)
SMART II [™] Oligonukleotid	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG

3.3 Größenmarker

Fermentas, St. Leon-Rot: FastRuler™ High Range, O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder

Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Gießen: Längenstandards ALFexpress™ 74 bp, 124 bp, 170 bp, 202 bp; ALFexpress™ Leitemix 74/202

3.4 Verbrauchsmaterial

3.4.1 Reaktionskits

ABgene ABsolute™ QPCR Mix	<i>Advanced Biotechnologies Limited, Hamburg</i>
BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kits	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Epicentre FailSafe™ PCR System	<i>Biozym Scientific, Hess. Oldendorf</i>
FastPlasmid™ Mini	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Nucleobond® AX-Kits	<i>Macherey-Nagel, Düren</i>
Nucleo Spin® RNA II Kit	<i>Macherey-Nagel, Düren</i>
Nucleo Spin® Tissue	<i>Macherey-Nagel, Düren</i>
Nucleo Trap® mRNA Purification Kit	<i>Macherey-Nagel, Düren</i>
peqGOLD RNAPure™	<i>Peqlab Biotechnologie, Erlangen</i>
pGEM®-T Vector System II	<i>Promega, Mannheim</i>
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	<i>Promega, Mannheim</i>
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
Random primed labeling kit	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	<i>Applera Deutschland, Darmstadt</i>

3.4.2 Bakterienstamm und Vektor

JM109-Zellen	<i>Promega, Mannheim</i>
pGEM®-T Vector	<i>Promega, Mannheim</i>

3.4.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

10x One-Phor-All Buffer Plus	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
10x TBE-Puffer	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	<i>BioRad Laboratories, München</i>

Agar-Agar	<i>Carl Roth, Darmstadt</i>
Agarose low EEO	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Agarose	<i>BioRad Laboratories, München</i>
Agarose	<i>Sigma, Poznan, Polen</i>
Alconox	<i>Fisher Scientific, Nidderau</i>
Ammoniumacetat (APS)	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Ammoniumchlorid	<i>Carl Roth, Darmstadt</i>
Ampicillin	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
APS (Ammoniumpersulfat)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Avidin-FITC (Avidin-Fluoresceinisothiocyanat)	<i>Vector Laboratories, Peterborough, England</i>
<i>beta</i> -Mercaptoethanol	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Bio Whittaker Molecular Applications Long Ranger [®] gel solution	<i>Biozym Diagnostic, Hess. Oldendorf</i>
Biotin-16-dUTPs	<i>Roche Applied Science, Warschau, Polen</i>
biotyliertes Anti-Avidin	<i>Vector Laboratories, Peterborough, England</i>
Blue Dextran 2000	<i>Amersham Biosciences, Freiburg</i>
Borsäure	<i>Fisher Scientific, Nidderau</i>
Bromphenol Blue	<i>United States Biochemical, Cleveland, USA</i>
BSA (bovines Serumalbumin)	<i>Sigma, Poznan, Polen</i>
Buffer EcoRI ⁺	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Buffer O	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Buffer R	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Chloroform	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Chloroform	<i>Fluka, Poznan, Polen</i>
DAPI (Diamidinophenylindoldihydrochlorid)	<i>Vector Laboratories, Peterborough, England</i>
Diethyldicarbonat (DEPC)	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Sigma, Poznan, Polen</i>
Dinatriumsalz	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
DMSO (Dimethylsulfoxid)	<i>Fluka Chemie, Taufkirchen</i>
DNase	<i>Fluka, Poznan, Polen</i>
DNaseOff [™]	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
dNTPs (100 mM)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
dNTPs (100 mM)	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Eco47I (10 U/μl, AvaII)	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
EcoRI (10 U/μl)	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Essigsäure	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Essigsäure	<i>Riedel-de Haen, Seelze</i>
Ethanol	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Ethanol	<i>Fluka, Poznan, Polen</i>
Ethidiumbromid	<i>Serva Feinbiochemica, Heidelberg</i>
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>AppliChem, Darmstadt</i>

Extran [®]	<i>Merck, Darmstadt</i>
Formamid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Formamid	<i>Fluka, Poznan, Polen</i>
Gene Ruler Loading Dye Solution	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Glucose	<i>Serva Feinbiochemica, Heidelberg</i>
Glycerol	<i>Carl Roth, Darmstadt</i>
Harnstoff	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Hefeextrakt	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
HPLC-Wasser	<i>KMF, Lohmar</i>
IPTG (Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid)	<i>Biomol Feinchemikalien, Hamburg</i>
Isopropanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Kaliumchlorid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Kaliumchlorid	<i>Sigma, Poznan, Polen</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Sigma, Poznan, Polen</i>
Low Melting Point Agarose	<i>Invitrogen, Karlsruhe: UltraPure</i>
Magnesiumchlorid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumacetat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>Sigma, Poznan, Polen</i>
Natriumcitrat	<i>Sigma, Poznan, Polen</i>
Natriumhydroxid	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Orange Loading Dye Solution	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
Pepsin	<i>Sigma, Poznan, Polen</i>
Phenol	<i>Fluka, Poznan, Polen</i>
PstI (10 U/ μ l)	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
RNASafer	<i>Peqlab Biotechnologie, Erlangen</i>
RNase Inhibitor	<i>Fermentas, St.Leon-Rot</i>
RNase	<i>Fluka, Poznan, Polen</i>
RNaseOff [™]	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Silan	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
ssDNA (Salamander)	<i>Roche Applied Science, Warschau, Polen</i>
TaqI (8 U/ μ l)	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Taq-Reaktionspuffer	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin)	<i>Biozym Diagnostic, Hess. Oldendorf</i>
Tris ultrapure	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Trypton	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Tween 20	<i>Fluka, Poznan, Polen</i>
Vectashield [®] mounting medium with DAPI	<i>Vector Laboratories, Peterborough, England</i>
Wasser für die Molekularbiologie	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	<i>Biomol Feinchemikalien, Hamburg</i>
Xylene Cyanol FF	<i>United States Biochemical, Cleveland, USA</i>

3.4.4 Filter, Papier, Glas- und Kunststoffwaren

96-Well Platten	<i>Kisker, Steinfurt</i>
Aerosol Barrier Tips	<i>MAGV, Rabenau</i>
Deckgläser	<i>Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig</i>
Handschuhe rotiprotect	<i>Carl Roth, Darmstadt</i>
Handschuhe rotiprotect-Nitril	<i>Carl Roth, Darmstadt</i>
KimWipes	<i>MAGV, Rabenau</i>
Membranfilter (Porengröße 0,2 µm)	<i>Schleicher & Schuell, Dassel</i>
Microtiterplatten Thermowell™	<i>Corning Costar Deutschland, Bodenheim</i>
Neptune Barrier Tips	<i>MAGV, Rabenau</i>
Objektträger	<i>Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig</i>
Parafilm	<i>MAGV, Rabenau</i>
Pasteurpipetten	<i>Hilgenberg, Malsfeld</i>
PCR Softstripes (0,2 ml)	<i>Biozym Scientific, Hess. Oldendorf</i>
Petrischalen	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen	<i>Biozym Scientific, Hess. Oldendorf</i>
Pipettenspitzen	<i>Fisher Scientific, Nidderau</i>
Pipettenspitzen	<i>Gilson Medical Electronics, Villiers- le-Bel, Frankreich</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Snapcups (10 ml)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Spritzenfilter Steril (Porengröße 0,2 µm)	<i>Schleicher & Schuell, Dassel</i>
Strip Tubes (0,2 ml)	<i>Fisher Scientific, Nidderau</i>
Strip Tubes (0,2 ml)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Tubes (1,5 ml, 2 ml)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Wyapall Wipers	<i>MAGV, Rabenau</i>

3.5 Geräte

ABI PRISM® 377 DNA Sequencer	<i>Applied Biosystems, Darmstadt</i>
Analysenwaage	<i>Satorius, Göttingen</i>
Autoklav Webeco Modell C	<i>Webeco, Bad Schwartau</i>
Bidestanlage Bi-Dest 2302	<i>Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel</i>
Biofuge 13R	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Biofuge 22	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Biofuge A	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Brutschrank	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Certomat H/R	<i>Braun Dissel Biotech, Melsungen</i>
Distriman	<i>Gilson, Bad Camberg</i>

DNA-Sequenzierautomaten ALFexpress™	<i>Amersham Biosciences, Freiburg</i>
Eismaschine Scotsman AF10	<i>Kälte Mack, Maintal</i>
Heizplatte MR2002	<i>Heidolph, Kelheim</i>
IBI Kammer Model HRH	<i>International Biotechnologies, New Haven, USA</i>
i-Cycler 96 Well Thermocycler	<i>BioRad Laboratories, Hercules, USA</i>
Microprocessor pH 537	<i>WTW, Weilheim</i>
Multipipette Pipetman 8x200	<i>Gilson, Bad Camberg</i>
Multiple Pipette Eppendorf	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Photometer Gene Quant II	<i>Amersham Biosciences, Freiburg</i>
Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000	<i>Gilson, Bad Camberg</i>
Thermocycler PE9600	<i>Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt</i>
Transferpette (Volumina)	<i>Brand, Wertheim</i>
Transilluminator TM20	<i>UVP, San Gabriel, USA</i>
Trockenschrank UM600	<i>Memmert, Schwalbach</i>
Vortex Reax 2000	<i>Heidolph, Kelheim</i>
Waage PE 628	<i>Bosch, Jungingen</i>
Wasserbad 3047	<i>Kötterman, Utze-Hänsigsen</i>
Wasserbad Julabo 22A	<i>Julabo Labortechnik, Saalbach</i>
Whatman Biometra UV-Einheit	<i>Biometra, Göttingen</i>

3.6 Software

ALFwin Software, *Amersham Biosciences, Freiburg*
 DNA Sequencing Analysis Software™, *Applied Biosystems, Foster City, USA*
 BioDocAnalyze, *Biometra, Göttingen*
<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>: TopPred II
http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi: Primer3
http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html: TMPred
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>: clustalW
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>: NCBI cross species Megablast, NCBI nucleotide-nucleotide Blast, NCBI protein-protein Blast
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>: ORF Finder
<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>: Genedoc 2.6002
<http://www.uni-bonn.de/~umt70e/becker.html>: Famhap® Version 15
 SAS/STAT® SAS Prozedur GLM, *SAS Institute Inc, Cary, USA*
<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>: Chromas 1.45 C
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>: TMHMM v. 2.0
<http://www.enzim.hu/hmmtop/>: HMMTOP Version 2.0
 Allelelocator Version 1.03, *Amersham Biosciences, Freiburg*
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>: TreeView 1.6.6

4 Methoden

4.1 Analyse des Katzenstammbaums

4.1.1 Berechnung von Inzuchtkoeffizienten

Anhand des Stammbaums aus 424 Individuen wurden die Inzuchtkoeffizienten mit der rekursiven Pedigree-Methode nach TIER (1990) berechnet. Zudem wurden die Verwandtschaftsgrade untereinander erfasst.

4.1.2 Prüfung des Erbgangs der HypoPP

Der für die vorliegende Untersuchung zur Verfügung stehende Katzenstammbaum der 64 molekulargenetisch untersuchten Katzen mit sieben von HypoPP betroffenen Tieren umfasst für statistische Rückschlüsse zu geringe Individuenzahlen. Das Auftreten der HypoPP innerhalb der Katzenfamilie wurde mit gängigen Erbschemen verglichen und Hypothesen zum Erbgang aufgestellt.

4.2 Isolierung von Nukleinsäuren

4.2.1 DNA-Extraktion

4.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Als Ausgangsmaterial für die Extraktion der DNA standen Vollblut, Muskel und Gonaden verschiedener Katzen zur Verfügung. Abhängig von der Art des Probenmaterials und der benötigten DNA-Menge wurden verschiedene Protokolle verwendet. Die Isolierung der DNA aus Vollblut erfolgte durch Aussalzen mit Natriumchlorid. Für die DNA-Extraktion aus Gewebe wurden sowohl das Nucleobond[®]AX-Kit als auch das Nucleo Spin[®] Tissue-Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers benutzt.

4.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde für Folgeanwendungen wie Sequenzierung oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit dem FastPlasmid[™] Mini Kit (Eppendorf, Hamburg)

nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Extraktion von Plasmid-DNA mit Inserts größer 2,5 kb erfolgte mit dem Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurde mit dem Photometer Gene Quant II (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt.

4.2.2 Isolierung von RNA

4.2.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Für die Identifizierung der Primärsequenz der *CACNA1S* mRNA wurde die Gesamt-RNA aus Muskelgewebe mittels einer optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode isoliert. Hierzu wurde als gebrauchsfertiges Reagenz peqGOLD RNAPure[™] (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Je Ansatz wurde 100 mg durch Mörsern in flüssigem Stickstoff aufgeschlossenes Gewebematerial mit der einphasigen Phenol- und Guanidinisothiocyanatlösung homogenisiert. Die Dissoziation der Nukleotidkomplexe erfolgt innerhalb der Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform, 15 Sekunden langem kräftigem Schütteln und 15 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte ein Zentrifugationsschritt (fünf Minuten, 12.000 g, 4° C), durch den die Phenol-Chloroform-Phase, die Interphase und die wässrige Phase separiert wurden. Die ausschließlich in der wässrigen Phase angereicherte RNA wurde nach der Überführung dieser Phase in ein frisches Reaktionsgefäß mit 400 µl Isopropanol durch 15 Minuten Inkubation bei 4° C und anschließender Zentrifugation (10 Minuten, 12.000 g, 4° C) präzipitiert. Nach Abnehmen des Überstandes erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 70 % Ethanol (Überstand abnehmen, 1 ml 70 % Ethanol zugeben, 10 Minuten bei 12.000 g, 4° C zentrifugieren, Überstand abnehmen). Anschließend wurden die RNA-Pellets in 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration und Reinheit im UV-Photometer überprüft.

Die Extraktion der Gesamt-RNA für die *one-step* RT-PCR und die cDNA-Synthese für die Expressionsanalyse wurde mit dem NucleoSpin[®] RNA II Kit von Macherey-Nagel GmbH (Düren) durchgeführt. Im Protokoll dieses Extraktionskits wird ein Restriktionsschritt mit DNase integriert, durch den DNA-Kontaminationen der RNA-Proben abgebaut werden. Im Mittelpunkt dieses Verfahrens stehen spezifisch aktivierte Silika-Membranfilter, an die die Nukleinsäuren gebunden und somit von Proteinen und anderen Zellbestandteilen getrennt werden. Als Ausgangsmaterial für die *one-step* RT-PCR wurde Muskelgewebe eingesetzt. Für die Expressionsanalyse

wurden unterschiedliche Gewebetypen (Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur, Uterus, Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Milz, Vollblut) verwendet. Je Ansatz wurden 30 mg Gewebe bzw. 100 µl Vollblut verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers behandelt. Die Eluierung der RNA aus der Silika-Membran erfolgte mit direkt auf die Membranfilter appliziertem RNase-freiem Wasser. Die RNA jedes Ansatzes wurde durch zweimalige Zugabe von je 50 µl Wasser und anschließender Zentrifugation gelöst, wobei jeweils zwei Ansätze eines Gewebes bzw. vier Ansätze des Vollbluts zur Erhöhung der Endkonzentration der RNA in einem Reaktionsgefäß vereinigt wurden. Alle RNA-Isolate wurden über Nacht bei -20° C mittels DEPC-behandeltem 3 M Natriumacetat (0,1 des Volumens) und Ethanol (2,5 des Volumens) gefällt und nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol in 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde durch Messung im UV-Photometer bestimmt.

4.2.2.2 Isolierung von PolyA⁺-RNA

Für die Synthese der 3'RACE cDNA Bank wurde die mRNA aus der Gesamt-RNA des Muskelgewebes aufgereinigt. Hierzu wurde das Nucleo Trap[®] mRNA Purification Kit von BD Biosciences Clontech (Heidelberg) verwendet. Die Nucleo Trap[®] mRNA Matrix basiert auf *oligo(dT)*-Latexkügelchen (so genannte *beads*), an die die PolyA⁺-Schwänze der mRNA reversibel gebunden werden. Den Angaben des Herstellers entsprechend wurde die Gesamt-RNA zunächst mit der Nucleo Trap[®] mRNA Matrix hybridisiert. Die Separierung und Reinigung der PolyA⁺-RNA erfolgte durch spezielle Mikrofilter nach den Angaben des Herstellers, gelöst wurde die mRNA in 40 µl RNase-freiem Wasser. Zur Erhöhung der Konzentration wurde die mRNA mit 4 µl DEPC-behandeltem 3 M Natriumacetat und 100 µl Ethanol über Nacht bei -20° C gefällt und nach einem Waschschrift in 4 µl Wasser gelöst.

4.3 Reverse Transkription

4.3.1 Erststrang-cDNA-Synthese

Die Herstellung von cDNA für die *two-step* RT-PCR erfolgte über die reverse Transkription mittels des RevertAid[™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas, St.Leon-Rot). Genutzt wird eine gentechnisch veränderte Version der

Reversen Transkriptase des Molony-Maus-Leukämie-Virus (H Minus M-MuLV RT), deren Ribonuklease-H-Aktivität ausgeschaltet wurde. Dadurch findet während der Synthese des cDNA-Erststrangs kein Abbau der RNA in RNA-DNA-Komplexen statt.

Je Ansatz wurden zunächst 500 ng Gesamt-RNA mit 1 µl Primerlösung in 12 µl Reaktionsvolumen gemischt und 5 min bei 70° C zur Auflösung von Sekundärstrukturen inkubiert. Für die anschließenden PCR-Applikationen im 5'-Bereich des *CACNAIS* wurden für die cDNA-Synthese die im Kit enthaltenen *random hexamer* Primer (0,2 µg/µl) eingesetzt, für alle anderen wurden *oligo(dT)₁₈* Primer (0,5 µg/µl) verwendet. Dem auf Eis abgekühlten Ansatz wurde dann 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonuclease Inhibitor (20 u/µl) und 2 µl 10 mM dNTP-Mix zugefügt. Nach der Inkubation für 5 min bei 37° C (*oligo(dT)₁₈* Primer) bzw. 25° C (*random hexamer* Primer) wurde 1 µl RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/µl) zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 42° C, bei Verwendung der *random hexamer* Primer wurde ein weiterer Inkubationsschritt von 10 min bei 25° C vorgeschaltet. Nach 60 min wurde die Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes für 10 min auf 70° C abgestoppt. Die so erhaltenen cDNA-Banken wurden bei -20° C gelagert, das Reaktionsgemisch konnte direkt als Template in PCR-Anwendungen eingesetzt werden. Die Qualität der erhaltenen cDNA wurde durch Amplifikation eines konstitutiv exprimierten *GAPDH*-Fragments überprüft.

4.3.2 Synthese von cDNA-Enden (RACE)

Für die Amplifikation der cDNA-Enden des *CACNAIS* wurde die mRNA unter Verwendung des BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kits (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) reverse transkribiert. Die Sequenzen der im Kit enthaltenen Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgeführt. Dieses Reaktionskit kombiniert die 5'- und 3'RACE-Methode (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) mit der SMART (*switching mechanism at 5'end of RNA transkript*) cDNA-Synthese Technik, so dass der gebildete cDNA-Erststrang ohne zusätzliche Adapterligation direkt in der RACE-PCR eingesetzt werden kann. Die verwendete BD PowerScript RT fügt aufgrund der terminalen Transferaseaktivität drei bis fünf Nukleotide (hauptsächlich Cytosin) an das 3'Ende des cDNA-Erststrangs an. Dem Reaktionsgemisch zugesetzte BD Smart IITM Oligonukleotide lagern sich an diese Verlängerung, so dass bei der reversen Transkription zunächst die RNA, dann aber das Oligonukleotid als Template für die cDNA-Synthese verwendet wird. In der anschließenden RACE-PCR hybridisiert der Primer mit dem Oligonukleotid.

Die 5'- und 3'RACE cDNA-Banken wurden nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Nur für die 5'RACE cDNA-Synthese wurde statt dem im Kit enthaltenen 5'RACE CDS Primer der genspezifische Primer Ca804rev verwendet (Tabelle 6). Als Ausgangsmaterial wurde für die 5'RACE cDNA-Synthese Gesamt-RNA (82,7 ng/ μ l) aus felinelem Muskelgewebe verwendet, für die 3'RACE wurde aufgereinigte PolyA⁺-RNA (276 ng/ μ l) eingesetzt. RNA-Template, Primer und gegebenenfalls BD Smart IITM A Oligonukleotid wurden für 2 min bei 70° C inkubiert und anschließend direkt auf Eis 2 min gekühlt. Nach Zugabe der restlichen Reagenzien erfolgte die reverse Transkription innerhalb von 1,5 Stunden bei 42° C. Die Erststrang-Reaktionen wurden mit 20 μ l (5'RACE-cDNA) bzw. 180 μ l (3'RACE-cDNA) Tricine-EDTA-Buffer verdünnt und die Lösungen 7 min bei 72° C erhitzt.

4.4 Polymerase-Kettenreaktion mit cDNA

4.4.1 Amplifikation des GAPDH-Fragments

Zur Einschätzung der Qualität der cDNA-Synthese und zum Einstellen der Templatemengen für den Expressionsvergleich von *CACNAIS* in verschiedenen Geweben wurde ein konstitutiv und ubiquitär exprimiertes Fragment (916 bp) der cDNA der feline Glyzerinaldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (*GAPDH*) amplifiziert. Die Primer wurden anhand der Referenz-Sequenz NM_001009307 mit Hilfe der Primer3-Software ausgewählt. Die Amplifikation wurde nach dem in Tabelle 8 und Tabelle 9 angeführten Protokoll mit *Taq*-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Ausnahmen stellten die Reaktionen zur Bestimmung der Template-menge für den Expressionsvergleich dar: Hier wurde das Volumen der eingesetzten cDNA je Gewebe so eingestellt, dass gleiche Mengen an Amplifikat in der Gelelektrophorese beobachtet werden konnten.

Tabelle 8: Reaktionsansatz der PCR des felinen *GAPDH*-Fragments

Reagenz	Ausgangs- konzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration im Ansatz
cDNA-Template	0,5 – 2 ng/µl	1	0,5 – 2 ng
<i>Taq</i> -Puffer mit Mg ²⁺	10 x	1,5	1 x
MgAc	15 mM		1,5 mM
dNTP	2 mM	1,5	0,2 mM
Primer <i>GAPDH</i> -1fwd	10 µM	1	0,7 µM
Primer <i>GAPDH</i> -2rev	10 µM	1	0,7 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,2	0,07 U/µl
H ₂ O		<i>ad</i> 15	

Tabelle 9: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des *GAPDH*-Fragments

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1	92	2:00
Denaturierung	30	92	0:30
Hybridisierung		63,5	0:30
Elongation		72	1:20
Finale Elongation	1	72	5:00

4.4.2 Amplifikation einzelner *CACNA1S*-Fragmente

Zur Identifizierung der Sequenz des *CACNA1S*-Gens der Katze wurden einzelne Fragmente der cDNA aus *postmortem* entnommenen Muskelgewebe einer Perserkatze amplifiziert. Anhand homologer Sequenzbereiche in den Sequenzen des *CACNA1S* bei Mensch (Accession Nummer NM_000069), Wildkaninchen (Accession Nummer X05921, Locus *OCDHPR*), Maus (Accession Nummer L06234, Locus *MUSCACHB*) und Ratte (Accession Nummer L04684, Locus *RATCACAI*) wurden Primer abgeleitet, mit denen erste Amplifikate der cDNA dieses Gens erstellt wurden. Nach Ermittlung der ersten Sequenzdaten wurden mittels *Primerwalking* zunehmend spezifische Primer entwickelt und weitere, überlappende Fragmente durch PCR mit dem *Taq*-Polymerase System von Eppendorf (Hamburg) gewonnen. In den Tabellen 10, 11 und 12 sind die Primerkombinationen mit dem jeweiligem Reaktionsansatz und den PCR-Bedingungen aufgeführt.

Tabelle 10: Primerkombinationen und spezifische Modifikationen der PCR-Bedingungen für Fragmente des *CACNAIS* cDNA

Primer forward	Primer reverse	Zykluszahl w	Annealingtemperatur x (°C)	Elongationstemperatur y (°C)	Elongationsdauer z (°C)
Ca249fwd	Ca894rev	30	60	72	0:40
Ca845fwd	MutJRrev	30	55	72	2:00
Ca1759fwd	MutPrev	30	57	70	5:00
Cat3-01fwd	Cat3-02rev	40	40	72	1:00
Ca4127fwd	Ca4762rev	30	52,2	72	1:00
CAT#1	CAT#4	40	58	72	1:25
Ca4737fwd	Cat2-02rev	35	55	72	1:45
Ca5265	Ca5700rev	30	60	70	1:00
Ca249fwd	MutJRrev	35	55	72	1:45

Tabelle 11: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der *CACNAIS*-Fragmente auf cDNA-Ebene

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1	92	2:00
Denaturierung	w	92	0:30
Hybridisierung		x	0:30
Elongation		y	z
Finale Elongation	1	72	5:00

Spezifische Werte für Zykluszahl (w), Annealingtemperatur (x), Elongationstemperatur (y) und Elongationsdauer (z) sind in Tabelle 9 entsprechend der Primerkombination aufgeführt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Amplifikation von *CACNAIS*-Fragmenten auf cDNA-Ebene

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen (µl)	Konzentration im Ansatz
cDNA-Template	0,5 – 2 ng/µl	1	0,5 – 2 ng
<i>Taq</i> -Puffer mit Mg ²⁺	10 x	1,5	1 x
MgAc	15 mM		1,5 mM
dNTP	2 mM	1,5	0,2 mM
Primer forward	10 µM	1	0,7 µM
Primer reverse	10 µM	1	0,7 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,2	0,07 U/µl
H ₂ O		ad 15	

Als Primer wurden die in Tabelle 9 gelisteten Paare verwendet.

4.4.3 RACE-PCR

Die RACE-PCR zur Amplifikation der 3'- und 5'Enden der *CACNA1S* mRNA wurde mit dem BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) in Anlehnung an die Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Reaktionsvolumen wurde jedoch auf 25 µl reduziert (siehe Tabellen 13 und 14).

Tabelle 13: Reaktionsansätze von 3'RACE-PCR und *nested* 3'RACE-PCR

Reagenz	Ausgangs- konzentration	3'RACE-PCR (µl)	<i>nested</i> 3'RACE-PCR (µl)
BD Advantage 2 PCR Buffer	10 x	2,5	2,5
dNTP-Mix	10 mM	0,5	0,5
BD Advantage 2 Polymerase Mix	50 x	0,5	0,5
3'RACE- cDNA		3,25	
3'RACE-PCR			3,25
Universeller Primermix	10 x	2,5	
Universeller <i>nested</i> Primermix	10 x		2,5
3'RACEfwd	10 µM	0,5	1,0
H ₂ O		<i>ad 25</i>	<i>ad 25</i>

Tabelle 14: Reaktionsansätze der 5'RACE-PCR zur Amplifikation des 5'Endes der *CACNA1S* cDNA

Reagenz	Ausgangs- konzentration	5'RACE-PCR (µl)	<i>nested</i> 5'RACE-PCR (µl)
BD Advantage 2 PCR Buffer	10 x	2,5	2,5
dNTP-Mix	10 mM	0,5	0,5
BD Advantage 2 Polymerase Mix	50 x	0,5	0,5
5'RACE- cDNA		3,5	
5'RACE-PCR			3,5
Universeller Primermix	10 x	2,5	
Universeller <i>nested</i> Primermix	10 x		1,0
5'RACE#3rev	10 µM	1,0	
5'RACE#2rev	10 µM		1,0
H ₂ O		<i>ad 25</i>	<i>ad 25</i>

Als Template für die 3'RACE-PCR diente die anhand der PolyA⁺-RNA synthetisierte 3'RACE-cDNA, die anschließende *nested*-PCR wurde mit dem ersten Reaktionsansatz als Template durchgeführt. Neben dem im Kit enthaltenen universellen Primermix

(UPM) und dem universellen *nested* Primermix (nUPM) wurde der genspezifische Primer 3'RACEfwd verwendet (siehe Tabelle 7). Die 3'RACE-PCR und die *nested* 3'RACE-PCR wurden entsprechend den Protokollen in Tabelle 15 und 16 durchgeführt.

Tabelle 15: Bedingungen der 3'RACE-PCR zur Amplifikation des 3'Endes der CACNAIS cDNA

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Denaturierung	35	94	0:30
Hybridisierung		70	0:30
Elongation		72	3:00

Tabelle 16: Bedingungen der *nested* 3'RACE-PCR zur Amplifikation des 3'Endes der CACNAIS cDNA

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Denaturierung	35	94	0:30
Hybridisierung		69	0:30
Elongation		72	3:00

Zur Amplifikation des 5'Endes der *CACNAIS* cDNA analog zur 3'RACE-PCR wurden als Template die 5'RACE-cDNA und in der *nested*-PCR die 5'RACE-PCR selbst eingesetzt. Neben den im Reaktionskit enthaltenen Oligonukleotiden wurden die genspezifischen Primer 5'RACE#3rev und 5'RACE#2rev eingesetzt. Die 5'RACE-PCR und die *nested* 5'RACE-PCR wurden entsprechend den Protokollen in Tabelle 17 und 18 durchgeführt.

Tabelle 17: Bedingungen der 5'RACE-PCR zur Amplifikation des 5'Endes der CACNAIS cDNA

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Denaturierung	5	94	0:30
Hybridisierung		70	0:30
Elongation		72	1:30
Denaturierung	30	94	0:30
Hybridisierung		68	0:30
Elongation		72	1:30

Tabelle 18: Bedingungen der *nested* 5'RACE-PCR zur Amplifikation des 5'Endes der CACNAIS cDNA

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Denaturierung	2	94	0:30
Hybridisierung		67	0:30
Elongation		72	1:30
Denaturierung	35	94	0:30
Hybridisierung		66	0:30
Elongation		72	1:30

4.4.4 one-step RT-PCR

Zur Erzeugung von langen, die CACNAIS cDNA-Sequenz abdeckenden Fragmenten wurden cDNA-Synthese und Amplifikation in einem Reaktionsansatz durchgeführt. Hierzu wurde das *one-step* RT-PCR Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 19 und 20 dargestellt.

Tabelle 19: Reaktionsansatz zur Durchführung der *one-step* RT-PCR der *CACNAIS* cDNA

Reagenz	Ausgangs- konzentration	Volumen (μ l)	Konzentration im Ansatz
RNA	78 ng/ μ l	2,0	3,12 ng/ μ l
RT-PCR Buffer	5x	10,0	1x
dNTP Mix	10 mM	2,0	400 μ M
Primer 1	10 pmol	3,0	0,6 μ M
Primer 2	10 pmol	3,0	0,6 μ M
Qiagen Enzyme Mix	k.A.	2,0	k.A.
RNase Inhibitor	20 u/ μ l	0,5	0,2 u/ μ l
H ₂ O		<i>ad</i> 50	

Zu den Konzentrationen der verschiedenen Enzyme im Qiagen *one-step* RT-PCR Enzyme Mix werden vom Hersteller keine Angaben (k.A.) gemacht.

Tabelle 20: Bedingungen der *oneStep* RT-PCR zur Amplifikation von *CACNAIS*

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Dauer (min)
Reverse Transkription	1	45	30:00
Aktivierungsschritt	1	95	15:00
Denaturierung	36	94	0:12
Hybridisierung		60	0:30
Elongation		68	3:00
Finale Elongation	1	68	10:00

Neben verschiedenen Reagenzien sind im Qiagen *one-step* RT-PCR Enzyme Mix Omniscript™ *Reverse Transcriptase*, Sensiscript™ *Reverse Transcriptase* und HotStarTaq® *DNA Polymerase* kombiniert. Die Extraktion der als Template eingesetzten Gesamt-RNA aus Muskelgewebe erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA II Kit von Machery-Nagel GmbH (Düren). Zur genspezifischen Amplifikation wurden Ca249fwd/Ca2747rev, Ca1405fwd/Ca4083rev und Ca3908fwd/Ca6066rev (siehe Tabelle 7) als Primerpaare eingesetzt.

4.4.5 Expressionsanalyse des *CACNAIS*-Gens

Um die Transkription des *CACNAIS* in verschiedenen Geweben zu vergleichen, wurde ein Fragment im 3' Bereich der mRNA amplifiziert. Die jeweiligen cDNAs wurden mit Hilfe der RNA von *postmortem* entnommenen Proben (Gehirn, Herz, Uterus, Skelettmuskel, Lunge, Leber, Niere, Milz und Vollblut) mit dem RevertAid™ H

Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas, St.Leon-Rot) synthetisiert (siehe 4.3.1). Die Templatemengen der einzelnen Proben für die PCR wurden zur Normalisierung so eingestellt, dass sich bei der *GAPDH*-PCR gleiche Amplifikatmengen ergaben. Die PCR wurde mit den Primern Ca5531fwd und Ca6066rev (Fragment Exon 43 bis 3'UTR, siehe Tabelle 7) und *Taq*-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt nach den Protokollen in Tabellen 21 und 22.

Tabelle 21: Reaktionsansatz zur Amplifikation der cDNA (Exon 43 bis 3'UTR) zur Expressionsanalyse

Reagenz	Ausgangskonzentration	Volumen (µl)	Konzentration im Ansatz
cDNA-Template	0,5 – 2 ng/µl		0,5 – 2 ng
<i>Taq</i> -Puffer mit Mg ²⁺	10 x	1,5	1 x
MgAc	15 mM	1,5	1,5 mM
dNTPs	2 mM	1,5	0,2 mM
Ca5531fwd	10 µM	1	0,7 µM
Ca6066rev	10 µM	1	0,7 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,2	0,07 U/µl
H ₂ O		ad 15µl	

Tabelle 22: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der cDNA (Exon 43 bis 3'UTR) zur Expressionsanalyse

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1	92	2:00
Denaturierung	24 – 36	92	0:30
Hybridisierung		59,5	0:30
Elongation		72	0:45

Für jede cDNA wurde ein Reaktionsansatz gemischt und auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt, die nach Ablauf der gewünschten Zyklenzahl (24, 27, 30, 33 und 36 Zyklen) aus dem Thermocycler genommen wurden.

4.5 Polymerase-Kettenreaktion mit genomischer DNA

4.5.1 Amplifikation zur Identifizierung von Polymorphismen

Zur Identifizierung genetischer Polymorphismen wurden genomische Abschnitte des felines *CACNAIS*-Gens kloniert und sequenziert. Hierzu wurde je eine DNA-Probe von einem betroffenen Burmakater (Labornummer HK01), einer gesunden Burmakatze (Labornummer HK06), einer vermuteten Anlagetragerin (Labornummer HK04) sowie eines Europäisch Kurzhaar-Katers (Labornummer PK0) als Template eingesetzt. Zur Amplifikation wurde das FailSafe™ PCR System von Epicentre (Madison/USA, Vertrieb durch Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden im reduzierten Ansatz (12 µl) unter den in den Tabellen 23, 24 und 25 angeführten Bedingungen entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 23: Allgemeine Bedingungen für die PCR von DNA-Fragmenten des *CACNAIS* mit FailSafe™ PCR System

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1	94	2:30
Denaturierung	30	94	0:30
Hybridisierung		y	0:30
Elongation		72	z
Finale Elongation	1	72	15:00

Spezifische Werte für Annealingtemperatur (y) und Elongationsdauer (z) sind in Tabelle 24 entsprechend der Primerkombination aufgeführt

Tabelle 24: Primerkombinationen und spezifische Modifikationen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten des *CACNAIS*

Primer forward	Primer reverse	FailSafe™ PCR 2 x PreMix x	Annealing- temperatur y (°C)	Elongations- dauer z (min)
Ca1405fwd	Ca1584rev	H	64	2:10
MutJRfwd	MutJRrev	H	59	0:20
Ca2552fwd	Ca2747rev	G	60	1:30
Ca3908fwd	Ca4083rev	K	64	0:45
Ca3908fwd	Ca4142rev	H	63	1:20
Ca4606fwd	Ca4869rev	A	55	2:00
Ca5531fwd	Ca6066rev	G	60	1:00

Tabelle 25: Allgemeiner Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten des *CACNA1S* mit FailSafe™ PCR System

Reagenz	Ausgangs-konzentration	Volumen (µl)	Konzentration im Ansatz
DNA-Template	variabel	0,5	variabel
FailSafe™ PCR-PreMix x	2 x	6,0	1 x
Primer forward	10 µM	0,625	0,5 µM
Primer reverse	10 µM	0,625	0,5 µM
FailSafe™ Enzym Mix	k.A.	0,125	k.A.
H ₂ O		ad 12	

Als Primer wurden die in Tabelle 24 gelisteten Paare verwendet. Der jeweils verwendete FailSafe™ PCR-PreMix (x) ist dort entsprechend der Primerkombination aufgeführt.

4.5.2 Amplifikation genetischer Marker

4.5.2.1 Mikrosatelliten-PCR

Der auf dem felinen Chromosom F1 im Intron 9 des *CACNA1S*-Gens lokalisierte Mikrosatellit *GIKA001* (Accession Nummer DQ057981) wurde bei 208 Tieren amplifiziert. Die PCR wurde in Anlehnung an die Angaben des Herstellers mit ABsolute™ QPCR Mix (ABgene House, Surrey/UK) und den Primern FCA-CK#1fwd und FCA-CK#2rev* (siehe Tabelle 6) durchgeführt. Das verwendete Protokoll ist in den Tabellen 26 und 27 dargestellt. Die Typisierung der Allele erfolgte über eine Fragmentlängenanalyse im DNA Sequenzierautomaten ALFexpress.

Tabelle 26: Reaktionsansatz zur Amplifikation des Mikrosatelliten *GIKA001*

Reagenz	Ausgangs-konzentration	Volumen (µl)	Konzentration im Ansatz
DNA-Template	variabel	1	variabel
QPCR-Mix	2 x	7,5	1 x
FCA-CK#1fwd	10 µM	0,6	0,4 µM
FCA-CK#2rev	10 µM	0,6	0,4 µM
H ₂ O		ad 15µl	

Tabelle 27: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des Mikrosatelliten *GIKA001*

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1	95	15:00
Denaturierung	30	95	0:30
Hybridisierung		64,5	0:20
Elongation		72	0:20
Finale Elongation	1	72	15:00

4.5.2.2 PCR-RFLPs

Zur Typisierung von 142 Proben (siehe Anhang, Tabelle 51) wurden (neben dem Mikrosatelliten *GIKA001*) vier verschiedene SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) in Exon- und Intronbereichen der genomischen Sequenz des *CACNA1S* verwendet, deren Varianten über PCR-RFLPs (PCR-Restriktionfragment-Längenpolymorphismen) dargestellt wurden. Die verschiedenen Fragmente sind mit den ermittelten Allelen in der NCBI Genbank unter den Accession Nummern DQ128067 bis DQ128072 und DQ241398 bis DQ241402 eingetragen. Die jeweiligen PCRs wurden nach den in den Tabellen 28, 29 und 30 angeführten Bedingungen mit *Taq*-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die PCR für Intron31+185 wurde mit Polymerase-Puffer ohne Magnesium durchgeführt, wobei die Mg²⁺-Konzentration durch Zugabe von Magnesiumacetat auf 1 mM im Ansatz gebracht wurde.

Tabelle 28: Primerkombinationen und spezifische Modifikationen für PCR-RFLPs

Primer forward	Primer reverse	Position SNP	Annealing-temperatur x (°C)	Annealing-dauer y (min)	Elongations-dauer z (min)
Ca2552fwd	CaInt17-189rev	Intron17+46	63,5	0:30	0:30
CaInt31-136fwd	CaInt31-31rev	Intron31+185	65,3	0:30	0:30
CaInt36-446fwd	CaInt17-898rev	Intron36+482	63,5	0:30	0:40
Ca5531fwd	Ca6606rev	Exon44+188	62	0:25	0:50

Tabelle 29: Reaktionsansatz zur Amplifikation von PCR-RFLPs

Reagenz	Ausgangs-konzentration	Volumen (µl)	Konzentration im Ansatz
DNA-Template	variabel	1	variabel
<i>Taq</i> -Puffer mit Mg ²⁺	10 x	1,5	1 x
MgAc	15 mM	1,5	1,5 mM
dNTPs	2 mM	1,5	0,2 mM
Primer forward	10 µM	1	0,7 µM
Primer reverse	10 µM	1	0,7 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,2	0,07 U/µl
H ₂ O		<i>ad</i> 15µl	

Als Primer wurden die in Tabelle 28 gelisteten Paare verwendet.

Tabelle 30: Bedingungen für die Amplifikation von PCR-RFLPs

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1	94	3:00
Denaturierung	30	94	0:30
Hybridisierung		x	y
Elongation		72	z
Finale Elongation	1	72	5:00

Spezifische Werte für Annealingtemperatur (x), Annealingdauer (y) und Elongationsdauer (z) sind in Tabelle 28 entsprechend der Primerkombination aufgeführt.

Nach der PCR wurden die Amplifikate mit Endonukleasen verdaut. Die verwendeten Restriktionsenzyme mit der jeweiligen Schnittstelle und Inkubationstemperatur sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: Übersicht verwendeter Restriktionsendonukleasen

PCR-RFLP-System	Enzym	Schnittstelle 5' → 3'	Reaktionspuffer	Inkubations-temperatur (°C)
Intron17+46	<i>TaqI</i>	T [^] C G A	One-Phor-All Buffer Plus	65
Intron31+185	<i>PstI</i>	C T G C A [^] G	Buffer O	37
Intron36+482	<i>EcoRI</i>	G [^] A A T T C	<i>EcoRI</i> + with BSA	37
Exon44+188	<i>Avall</i>	G [^] G W C C	Buffer R	37

Jeder Reaktionsansatz setzte sich aus einem Teil PCR-Reaktion, Enzym, zugehörigem Puffer und Wasser (*ad* 20 µl) zusammen und wurde über Nacht abhängig vom jeweiligen Enzym bei 37° bzw. 70° C inkubiert. Zur Analyse der PCR-RFLPs wurden nach dem Verdau je 7 µl des Restriktionsansatzes in 2%igen Agarosegelen (0,5x TBE)

durch Elektrophorese zur Fragmentlängenanalyse aufgetrennt. Nach der Färbung der in den Gelen enthaltenen DNA im Etidiumbromidbad (1 mg/l H₂O) wurden die Gele unter UV-Licht mit Hilfe der Videodokumentationseinheit und der Software BioDocAnalyse (Biometra, Göttingen) digital aufgezeichnet. Die im UV-Licht sichtbaren Fragmente wurden hinsichtlich Größe und Anzahl erfasst und dem Schnittstellenmuster entsprechend den Genotypen zugeordnet.

4.6 Polymerase-Kettenreaktion mit Plasmid-DNA

Für die Kolonien-PCR mit den M13-Primern des Vektors wurde ein Teil der jeweiligen Kolonie in den PCR-Ansatz überführt. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Erhitzen während des ersten Reaktionsschrittes der PCR, bei dem auch die Plasmid-DNA denaturiert wurde. Die PCR-Produkte wurden mit *Taq*-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) entsprechend der Protokolle in Tabelle 32 und 33 synthetisiert. In Abhängigkeit von der Größe der jeweiligen Insertion variierten die Elongationszeiten stark (1 min je 1000 bp).

Tabelle 32: Reaktionsansatz zur Amplifikation von Plasmidinsertionen durch Kolonien-PCR

Reagenz	Ausgangs-konzentration	Volumen (µl)	Konzentration im Ansatz
Plasmid-DNA	variabel	0,1 – 0,3	
<i>Taq</i> -Puffer mit Mg ²⁺	10 x	1,5	1 x
MgAc	15 mM	1,5	1,5 mM
dNTPs	2 mM	1,5	0,2 mM
M13-Primer forward	10 µM	1	0,7 µM
M13-Primer reverse	10 µM	1	0,7 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,1	0,03 U/µl
H ₂ O		ad 15µl	

Tabelle 33: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Plasmidinsertionen durch Kolonien-PCR

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1	94	3:00
Denaturierung	30	94	0:30
Hybridisierung		58	0:25
Elongation		72	variabel
Finale Elongation	1	72	5:00

4.7 Cycle Sequencing Reaktionen

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz der Plasmidinsertionen und der PCR-Produkte wurden Sequenzierreaktionen mit dem ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems (Vertrieb Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die einzusetzenden Templatmengen für Sequenzierreaktionen mit PCR-Produkten richtete sich nach der Fragmentgröße und wurde mittels Mengenschätzgelen nach Erfahrungswerten geschätzt. Bei Plasmidsequenzierungen wurden je Reaktion 400 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Hybridisierungstemperatur wurde in Abhängigkeit zur Größe des eingesetzten Primers zwischen 50° C (Primer < 20 bp), 55° C (Primer 20 bis 23 bp) oder 60° C (Primer > 23 bp) variiert. Verwendet wurden je nach zu sequenzierendem Fragment die ursprünglichen Amplifikationsprimer sowie anhand *Primerwalking* entwickelte interne Primer, bei Plasmid-Sequenzierungen wurden M13-Primer genutzt. Die Protokolle für Sequenzierreaktionen mit ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) sind in den Tabellen 34 und 35 dargestellt.

Tabelle 34: Reaktionsansätze für Sequenzierreaktionen mit Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Reagenz	Ausgangs- konzentration	Sequenzierung von Plasmid-DNA (µl)	Sequenzierung von PCR-Produkten (µl)
Template		400 ng	variabel
BigDye [®] Terminator v1.1	2,5 x	8,0	4,0
BigDye Sequencing Buffer	5 x		2,0
Primer	5 pmol/µl	1,0	1,0
H ₂ O		ad 20µl	ad 20µl

Tabelle 35: Bedingungen der Sequenzierreaktionen mit Plasmid-DNA und PCR-Produkten

PCR-Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1	96	1:00
Denaturierung	25	96	0:15
Hybridisierung		variabel	0:10
Elongation		60	4:00

Direkt im Anschluss an die Reaktion wurden die Sequenzieransätze mit 2 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl Ethanol gefällt und nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol bei 50 °C getrocknet.

4.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Alle zum Klonieren oder Sequenzieren verwendeten PCR-Produkte wurden nach der Elektrophorese aus 1x TAE-Agarosegelen mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Eluation erfolgte jeweils in 20 µl Wasser.

4.9 Klonierung von PCR-Produkten

Die TA-Klonierung aller PCR-Produkte erfolgte mit dem pGEM[®]-T Vector System (Promega, Mannheim) nach der Anleitung des Herstellers. Nach Ligation des Vektors

mit dem jeweiligen PCR-Produkt über Nacht erfolgte die hitzeinduzierte Transformation des Vektors in kompetente JM109-Zellen (Promega, Mannheim). Diese Zelllösungen wurden auf Selektionsmedien mit 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Bromochloroindolyl-β-D-galactopyranosid (XGal, Substrat für β-Galactosidase) und 10 µg/ml Isopropylthio-β-D-Galactopyranosid (IPTG) ausgestrichen. Nach der Inkubation bei 37° C über Nacht wurden die durch die Blau-Weiß-Selektion positiv identifizierten Klone in Flüssigkulturen mit LB-Medium vermehrt. Nach der Überprüfung der Insertion durch eine Kolonien-PCR erfolgte die Isolierung der Plasmide.

4.10 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Zur chromosomalen Lokalisierung des feline *CACNA1S*-Gens wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) im Institut für Tiergenetik und Züchtung der Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego (Poznan, Polen) durchgeführt. Als Sonde dienten pGEM[®]-T Plasmide mit einem 1490 bp langen Abschnitt der genomischen Sequenz des *CACNA1S*-Gens (Accession Nummer DQ128065), das anhand feline DNA mit den Primern Ca4606fwd und Ca4869rev (Kapitel 4.5.1) synthetisiert wurde. Die Chromosomenpräparate wurden aus feline Lymphozytenkulturen hergestellt und vor Durchführung der FISH durch Q-Bandenfärbung mittels Diamidinophenylindoldihydrochlorid (DAPI) identifiziert (SZCZERBAL & MICHALAK 2003, SZCZERBAL *et al.* 2003b).

Nach Verdau der Plasmide mit *DNAseI* wurden die 200 bis 500 bp langen Fragmente mit Phenol und Chloroform extrahiert und nach der Fällung mit Ethanol und Magnesiumchlorid in 1x TE gelöst (ROGALSKA-NIZNIK *et al.* 2003, SZCZERBAL *et al.* 2003a). Für die Markierungsreaktion wurden 500 ng der verdauten Plasmid-DNA mit *random hexamer* Primern gemischt und bei 94° C in 5 Minuten denaturiert. Nach Zugabe von dNTPs und Biotin-gelabelten dUTPs im Verhältnis 11,5:1 und dem Klenow-Fragment erfolgte die Biotinylierung bei 37° C für 30 Minuten (SZCZERBAL & MICHALAK 2003, SZCZERBAL *et al.* 2003b). Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Syntheseprodukte unter Zugabe der ssDNA eines Salamanders (Roche Applied Science, Warschau, Polen) über Nacht mit Ethanol und Magnesiumchlorid gefällt (ROGALSKA-NIZNIK *et al.* 2003, SZCZERBAL *et al.* 2003a). Zur Entfernung von RNA und Proteinen wurde zunächst in 2x SSC verdünnte

RNAse auf die Chromosomenpräparate gebracht und bei 37° C 45 min inkubiert. Vor dem Proteinverdau in saurerer Pepsinlösung (37° C, 10 min) wurden die Objektträger dreimal in 2x SSC (je 3 min) und danach zweimal mit 1x PBS (je 5 min) und einmal mit 1x PBS und Magnesiumchlorid gewaschen. Die Dehydrierung der Präparate erfolgte in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80%, 90% je 3 min bei Raumtemperatur). Durch Trocknung bei 80°C für 45 min wurde die Denaturierung der DNA auf dem Objektträger eingeleitet und mit 70% Formamidlösung in 2x SSC (70° C, 2 min) und weitere Waschschrte in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, absolut je 3 min bei -20° C) fixiert. Die Denaturierung der Sonde erfolgte bei 70° C für 10 Minuten. Nach dem Abstoppen der Reaktion auf Eis wurde die Sonde auf das Chromosomenpräparat aufgebracht, mit einem Abdeckglas und Silikon abgedichtet und für die Hybridisierung über Nacht bei 37° C inkubiert. Zum Entfernen der Reagenzien sowie nicht hybridisierter Sonden erfolgten mehrere Waschschrte (2x SSC und 50% Formamid, 42° C, 3x 5 min und 3x 2x SC, 42° C, 5 min). Zur Vorbereitung der FITC-Markierung wurden die Präparate im Equilibrierungspuffer (4x SSC mit 0,05% Tween20) bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert, danach erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 3% BSA versetztem Equilibrierungspuffer bei 37° C für 30 min. Für die Markierungsreaktionen wurden die Präparate je 45 Minuten im Brutschrank zunächst mit Avidin-Fluoresceinisothiocyanat (Avidin-FITC, 10µg/ml), dann mit biotinyliertem Antiavidin (10µg/ml) und abschließend wieder mit Avidin-FITC inkubiert. Nach jeder Reaktion wurden die Objektträger je dreimal für 5 Minuten bei 42° C im Equilibrierungspuffer gewaschen. Nach dem abschließenden Waschschrte in destilliertem Wasser wurden die Präparate mit Vectashield® *mounting medium with DAPI* überschichtet und mit einem Deckglas verschlossen.

Die Objektträger mit den Chromosomenpräparaten wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E600) mit Hilfe der Software Lucia (Melville USA) ausgewertet und die Bilder durch die angeschlossene Recheneinheit gespeichert. Die Lokalisation erfolgreicher Hybridisierungen erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzsignale der Hybridisierungen mit dem Q-Bandenmuster der mit DAPI gefärbten Präparate.

4.11 Gelelektrophoresen

4.11.1 Agarosegele

Agarosegelelektrophoresen wurden in Anlehnung an SAMBROOK *et al.* (1989) abhängig von den aufzutrennenden PCR-Amplifikaten und dem Verwendungszweck mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen, Puffern und DNA-Größenmarkern durchgeführt. Die verwendete Agarosekonzentration richtete sich nach den Fragmentgrößen der erwarteten PCR-Produkte. Für die Auftrennung der Fragmente aus der *one-step* RT-PCR zur Sequenzierung der mRNA des *CACNA1S* wurden zweischichtige Gele verwendet, wobei die untere Schicht (2% Agarose) ausschließlich zur Stabilisierung der 1% Elektrophoresematrix diente. Wie bei allen TBE gepufferten Gelen wurde 0,5x TBE Laufpuffer bei Spannungen um 10 V/cm Elektrodenabstand verwendet. Die PCR-RFLPs zur Typisierung der SNPs wurden nach dem Verdau auf 2% 0,5x TBE Agarosegelen durch die Elektrophorese zur Fragmentlängenanalyse aufgetrennt und die Genotypen anhand der beobachteten Fragmente erfasst. Für die Expressionsanalyse der mRNA des *CACNA1S* in verschiedenen Geweben wurden 1,5% Gele mit 1x TBE Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese aller zur Extraktion, Klonierung oder Sequenzierung verwendeten PCR-Produkte erfolgte in TAE gepufferte Gelen mit 1x TAE Laufpuffer bei Spannungen von etwa 5 V/cm Elektrodenabstand. Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden alle Gele im Etidiumbromidbad (1 mg/l H₂O) gefärbt. Die mit UV-Licht angeregten Agarosegele wurden im Anschluss mittels Videodokumentationseinheit und der Software BioDocAnalyze (Biometra, Göttingen) digital aufgezeichnet.

4.11.2 Fragmentlängenanalyse am ALFexpressTM

Die Mikrosatellitenanalyse erfolgte durch Elektrophorese der PCR-Produkte im DNA-Sequenzierautomat ALFexpressTM (Amersham Bioscience, Freiburg) nach dem Protokoll von WEIMANN (2000). Für die Untersuchungen wurden denaturierende Polyacrylamidgele auf Basis der Long Ranger[®] gel solution der Firma Bio Whittaker Molecular Applications (Rockland, USA; Vertrieb Biozym Diagnostic, Hess. Oldendorf) verwendet. Als Größenmarker zur Standardisierung dienten PCR-Produkte nach HIENDLEDER *et al.* (1998). Die Elektrophorese erfolgte rechnergesteuert durch die ALFwin Software (Amersham Bioscience, Freiburg), die Fragmentlängen wurden anhand ihres Fluoreszenzsignals erfasst. Die identifizierten Fragmentlängen des jeweiligen Tieres im Mikrosatelliten *GIKA001* wurden mit Hilfe der Software

AleleLocator Version1.03 (Amersham Bioscience, Freiburg) den entsprechenden Allelgrößen zugeordnet.

4.11.3 Sequenzierung am ABI PRISM 377[®]

Die Sequenzierung erfolgte im ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) durch Elektrophorese der Fragmente aus der Sequenzierreaktion im 5%igem Polyacrylamidgel (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid, 30 %ig v/w) nach Angaben des Herstellers. Pro Gel wurde die Gellösung aus 8,4 ml 30%ige PAA-Lösung, 21 g Harnstoff, 6 ml 10x TBE-Puffer und 20 ml HPLC gereinigtem Wasser angesetzt. Nach der Filtration der Lösung wurden 300 µl 10 %iges APS und 20 µl TEMED zur Katalysierung der Polymerisation additiert. Zusätzlich wurden die Glasplatten nach der Reinigung mit Alkonox[®] und 6 M Natriumhydroxid vor dem Zusammenbau sowie nach Gießen und Polymerisieren des Gels mit bidestilliertem Wasser abgespült. Zur Vermeidung von Pufferverlusten wurde laborspezifisch die Glasplatteneinheit neben der oberen Pufferkammer mit Heißkleber abgedichtet.

Die Sequenzierreaktionen wurden in 4 µl Ladepuffer aus 5:1 Formamid und in EDTA gelöstem Blue Dextran[®] gelöst und je 1,5 µl der Lösung auf das Gel geladen. Die Fragmente wurden durch die Elektrophorese im denaturierenden Gel nach ihrer Länge aufgetrennt und nach Laseranregung anhand der verschiedenen fluoreszenzmarkierten 3'Enden identifiziert. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches zur Recheneinheit übermittelt und mit Hilfe der DNA Sequencing Analysis Software[™] in Chromatogramme übersetzt wurden. Die ausgegebenen Chromatogramme wurden mit der Software Chromas 1.45 kontrolliert und in Textdateien umgeschrieben. Die Kontrolle der Sequenzdaten erfolgte mittels der Onlineprogramme NCBI *nucleotide-nucleotide* BLAST, NCBI *protein-protein* BLAST und NCBI *cross species* Megablast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.12 Analyse von mRNA- und Protein-Sequenzen

Zur Identifizierung konservierter Abschnitte zur Primerentwicklung wurden die mRNA-Sequenzen verschiedener Spezies mit Hilfe der Onlinesoftware ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) verglichen. Das Alignment der Sequenziererergebnisse

von Plasmiden bzw. PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms GENEDOC 2.6002. Mit dieser Software wurden zudem die jeweiligen Konsensussequenzen erstellt und Translationen von Nukleotid- zu Aminosäuresequenzen vorgenommen.

Die Sequenz der felines mRNA des *CACNAIS* wurde zudem mit verschiedenen Softwareprogrammen analysiert. Zur Identifizierung des Leserahmens wurde die Software ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) verwendet und die Sequenz nach Standardcode in GENEDOC 2.6002 translatiert. Vergleiche zwischen den mRNA-Sequenzen der α -Untereinheiten von Calciumkanälen verschiedener Spezies erfolgten mit ClustalW. Hierbei ermittelte Distanzmaße wurden durch die Software TreeView 1.6.6 als phylogenetische Bäume dargestellt. In der translatierten felines Aminosäuresequenz des *CACNAIS*-Gens wurden die Transmembransegmente mit Hilfe der Softwareprogramme HMMTOP Version 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>), TMHMM v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) und TopPred II (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) geschätzt und anhand dieser Voraussagen der Konsensus gebildet. Der Abgleich zwischen den mRNA- und den Proteinsequenzen des *CACNAIS* von Katze und Mensch erfolgte mit den Computerprogrammen ClustalW und Genedoc. Informationen zu *splice-sites* des humanen *CACNAIS* wurden den Datenbanken des NCBI entnommen.

4.13 Vergleich von Allel- und Genotypfrequenzen

Mit Hilfe der Software SAS Prozedur GLM wurden Allel- und Genotypfrequenzen der genetischen Markern *GIKA001*, Intron17+46, Intron31+185, Intron36+482 und Exon44+188 in den untersuchten DNA-Proben hinsichtlich Rasse, Haarkategorie und HypoPP-Merkmalssklasse erfasst. Die Allele und Genotypen der Rassen mit $n < 4$ Tieren wurden zu einer Gruppe innerhalb der Haarlängenkategorien zusammengefasst. Der beobachtete Heterozygotiegrad im Mikrosatelliten *GIKA001* wurde anteilig zu allen Genotypen innerhalb der Rassen erfasst. Unterschiede in den Allel- und Genotypfrequenzen der Marker zwischen bestimmten Rassen und Haarkategorien wurden mittels Fishers Exakt Test auf Signifikanz überprüft.

4.14 Schätzung der Haplotypen und Haplotypfrequenzen

Die Schätzung der auftretenden Haplotypen hinsichtlich der typisierten SNPs Intron17+46, Intron31+185, Intron36+482 und Exon44+188 erfolgte innerhalb der von HypoPP betroffenen Katzenfamilie durch die Software Famhap[©] Version 15 (BECKER & KNAPP 2002). Für dieses Programm wurden innerhalb des Burmapedigree 21 Subfamilien (*nuclear families*) abgegrenzt, die jeweils aus einer Elterngeneration und ihren direkten Nachkommen bestehen. In zehn Fällen wurden der Untersuchung nicht zur Verfügung stehende Elterntiere durch Platzhalter mit unbekannter Genotypisierung ersetzt. Dadurch konnten die Informationen von 52 Katzen berücksichtigt werden. Eine Übersicht der einbezogenen Tier innerhalb der „*nuclear families*“ ist im Anhang in Tabelle 53 aufgestellt. Die Software Famhap[©] Version 15 (BECKER & KNAPP 2002) wurde auch zur Erfassung der Haplotypfrequenz bei Burmakatzen innerhalb der Merkmalsklassen „klinische Symptome“ und „symptomfrei“ (Model 1, siehe Tabelle 4) verwendet.

Die Genotypisierungen weiterer Katzen konnte nur im Einzelfall zur Bestimmung von Haplotypen verwendet werden (siehe Anhang, Tabelle 52). Nur bei in allen vier SNP-Marker homozygoten bzw. bei in nur einem SNP heterozygoten Tieren konnten Haplotypen interpretiert werden.

4.15 Assoziationsanalyse

Mittels der Assoziationsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen der Ausprägung und Häufigkeit intragener Marker und dem Merkmal HypoPP innerhalb der Burmakatzenfamilie überprüft. Die Analyse wurde hinsichtlich des Merkmals mit zwei Modellen durchgeführt (Tabelle 4). Im ersten Modell wurde das Merkmal in „klinische Symptome“ und „symptomfrei“ unterschieden. Im zweiten Modell wurden unter Annahme des autosomal-rezessiven Erbgangs vier Merkmalsklassen („HypoPP betroffen“, „Anlageträger“, „potentieller Anlageträger“, „unbekannt“) charakterisiert. Die Überprüfungen der Signifikanz von Unterschieden zwischen den Allel- und Genotypfrequenzen der genetischen Marker sowie der Haplotypfrequenzen bezüglich der SNPs zwischen den Merkmalsklassen beider Modelle erfolgte mittels Fishers Exakt Test.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung des Katzenstammbaums

5.1.1 Inzuchtkoeffizienten und Verwandtschaftsmatrix

Durch die rekursive Pedigree-Methode konnten die Inzuchtkoeffizienten innerhalb des 424 Individuen umfassenden Stammbaums berechnet werden. In Tabelle 36 sind die Inzuchtkoeffizienten aller erfassten Katzen in Gruppen dargestellt.

Tabelle 36: Inzuchtkoeffizienten bei Burmakatzen im gesamten Pedigree

Inzuchtkoeffizient	Anzahl Tiere (n = 424)	Anzahl Tiere (n = 64)
0,0	368	26
0,00244	1	
0,00320	1	
0,00781	1	
0,00787	2	1
0,01275	3	3
0,01285	1	1
0,01575	2	1
0,01635	1	1
0,01964	1	1
0,02057	1	1
0,02222	1	
0,02344	3	2
0,03125	2	2
0,03397	2	4
0,03511	4	2
0,03516	1	1
0,03906	2	1
0,03912	2	4
0,04889	1	4
0,06250	6	1
0,06594	4	1
0,07916	1	1
0,10938	1	4
0,10950	1	
0,12500	6	
0,12890	1	
0,13626	1	2
0,12891	1	
0,13626	2	
0,18750	1	
0,25000	1	
0,31250	1	

Die Inzuchtkoeffizienten im gesamten Stammbaum liegen zwischen 0,0 und 0,313. Vier der Tiere mit Inzuchtkoeffizient von 0,125 sind Vollgeschwister, deren Großmutter mütterlicherseits auch die Urgroßmutter des Vaters ist. Der höchste Inzuchtkoeffizient von 0,313 wurde bei einem Tier nachgewiesen, dessen Vater mit seiner eigenen Mutter verpaart wurde. Auch das Tier mit dem Inzuchtkoeffizient 0,25 entstand aus einer Vater-Tochter-Verpaarung. Im Anhang Tabelle 54 sind die Verwandtschaftsgrade der 64 Tiere untereinander in einer Matrix zusammengefasst, die den molekulargenetischen Analysen zur Verfügung standen. Durch Anpaarungen zwischen verwandten Tieren 1. und 2. Grades weisen die Verwandtschaftsgrade Werte bis zu 0,64 auf.

5.1.2 Erbgang der HypoPP in der Katzenfamilie

Für die Erkrankung kann im untersuchten Stammbaum ein geschlechtsgebundener Erbgang sicher ausgeschlossen werden. Ein Y-chromosomaler Erbgang ist unwahrscheinlich, da auch weibliche Tiere an HypoPP erkranken. Bei einem X-chromosomalen Erbgang müssten - unabhängig ob dominant oder rezessiv - zumindest alle Kater eines Wurfes betroffen sein, nicht nur einzelne Welpen. Wird ein einfacher Erbgang unterstellt, muss ein autosomal-dominanter Modus für die HypoPP aber auch verworfen werden, da auch Anpaarungen zwischen symptomfreien Tieren zu von HypoPP betroffenem Nachwuchs führen. Unter der Prämisse der unvollständigen Penetranz könnte für die HypoPP im untersuchten Pedigree ein autosomal-dominanter Erbgang vergleichbar der Erkrankung beim Menschen angenommen werden. Da im vorliegenden Pedigree aber die Fälle an HypoPP in einer Generation auftreten, ist ein autosomal-dominanter Erbgang auch mit inkompletter Penetranz unwahrscheinlich. Unterstellt man allerdings einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus, kann man im untersuchten Stammbaum Merkmals- und Anlageträger identifizieren und die hypothetische Weitergabe eines an der Krankheitsentstehung beteiligten Allels nachvollziehen.

5.2 Sequenz und Expression der *CACNAIS*-mRNA

5.2.1 Basenfolge der mRNA

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz der mRNA des *CACNAIS* konnten zunächst unspezifische Primer anhand konservierter Bereiche der Gensequenzen verschiedener Spezies abgeleitet werden. Durch *Primerwalking* wurden anhand der gewonnenen Sequenzinformationen spezifische Primer zur Gewinnung weiterer PCR-Produkte entwickelt. Die cDNA-Enden wurden schließlich mittels RACE-PCR amplifiziert. Die Positionen und Längen der einzelnen Fragmente sind in Abbildung 8 dargestellt.

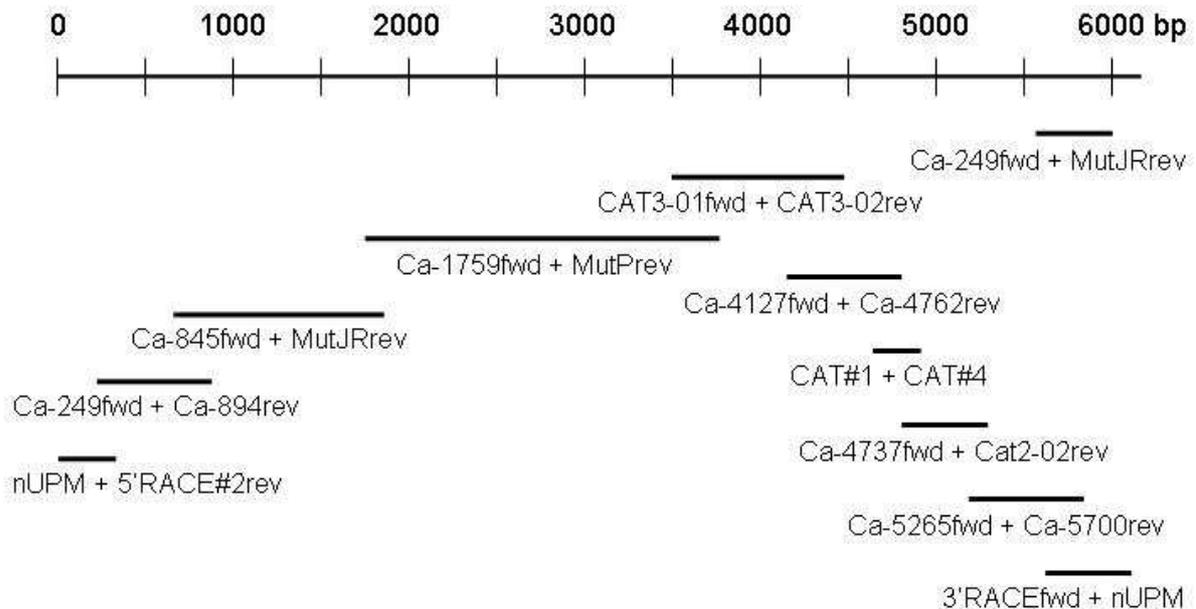


Abbildung 8: Schematische Positionen einzelner *CACNAIS*-Fragmente mit Primerbezeichnung zur Identifizierung der mRNA-Sequenz

Durch das Alignment der Sequenzen dieser Fragmente konnte die gesamte Nukleotidfolge der mRNA des feline *CACNAIS* identifiziert werden. Die mRNA besteht aus 6070 Basen ohne polyA⁺-Schwanz. Die in Abbildung 9 dargestellte Sequenz wurde unter der Accession Nummer DQ128075 in der Genbank des NCBI eingetragen.

```

1 ggagggcacc cttggcccag caggctcagc cggtcacgtc cccaaggctg gggcgctggg
61 gacacagggg ggagcgggca gcggggtggg ggaactggag accgcgagac tgccagggga

```

ERGEBNISSE

121	gccatggagc	catcctcacc	ccaggatgag	ggcctgagga	agaaacagcc	caagaagccc
181	gttcctgaga	ttctgccaag	gccaccccgg	gccttgttct	gcttgaccct	ccagaacccc
241	ctgaggaagg	cctgcatcaa	catcgtggaa	tggaaaccct	tcgagacaat	catccttgctc
301	accatctttg	ccaactgtgt	ggccctggct	gtgtacctgc	ccatgccaga	agatgacaac
361	aacactctca	accttggctc	ggagaaactg	gagtatctct	tcctcatcgt	cttctcaatc
421	gaagccgcca	tgaagatcat	tgcctatggc	ttcctgttcc	accaggatgc	ctacctgcgc
481	agcggctgga	atgtgctaga	cttcatcadc	gtcttcctgg	gggttttcac	cgtgattctg
541	gaacaggtta	acgtcatcca	aagcaacacc	gccccgatga	gcagcaaagg	ggctggcctg
601	gacgtcaagg	ccctgagagc	cttcctgtgt	ctcagacccc	tccggcttgt	gtcgggggtg
661	ccgagcctgc	agggtgtcct	caactccatc	ttcaaggcca	tgtctcccct	gttccacatc
721	ggcctgctcg	tcctctttat	ggtcaccatc	tatgccatca	tcgggctgga	gctcttcaag
781	ggcaaaatgc	acaagacctg	ctacttcatt	gggacagata	tcgtggccac	ggtagagaac
841	gagaagccct	caccctgcgc	caggacgggc	tcgggacgcc	cgtgcaccat	caacggcagc
901	gagtgtcggg	gcggctggcc	ggggcccaac	cacggcatca	cgcactttga	caactttggc
961	ttctccatgc	tcaccgtgta	ccagtgcadc	accatggagg	ggtggaccga	tgtcctctac
1021	tgggtcaatg	atgccatcgg	gaacgagtgg	ccctggatct	atcttgctac	cctcattctg
1081	ctggggctcct	tcttcattct	caacctgggtg	ctgggtgtcc	tgagcgggga	attcactaag
1141	gagcgggaga	aggccaagtc	caggggaacc	ttccaaaagc	tccgggagaa	gcagcagctg
1201	gaagaggacc	tccggggcta	catgagctgg	atcacgcagg	gcgaggtcat	ggacgttgag
1261	gacttgagag	aagggaaagt	gtctctggat	gaaggaggct	ccgacacaga	gagcctgtat
1321	gaaatcgagg	gcttgaacaa	aatcatccag	tttgtccgcc	actggaggga	gtggaaccgc
1381	atctttcgct	ggaagtgcc	cgatgtgatc	aagtccagag	tcttctattg	gctggtgatc
1441	ctggtcgttg	ccctcaacac	cctgtctatc	gcctcagagc	accacaacca	gcctctctgg
1501	ttgaccatt	tgcaagacgt	tgccaaccca	gtgctgctgg	ccctcttcgc	cgtcgagatg
1561	ctgctgaaga	tgtgcgggct	gggctgcgc	cagtacttca	tgtccatctt	caaccgcttc
1621	gactgcttcg	tgggtgtcag	cggcgtcctg	gagctgctgc	tgggtggagt	aggtgccatg
1681	acgcccctgg	gcactctcct	gtcgcctgc	atccgcctcc	tgcggatctt	caagatcacc
1741	aagtactgga	cgtcgtgag	caacctgggtg	gcactccctgc	tcaatccat	ccgtccatc
1801	gcctccctgc	tgtcgtcgt	ttcctcttc	atcatcatct	tcgccctgct	gggcatgcag
1861	ctcttcgggg	gcaggtacga	cttcgaggac	acggagggtgc	ggcgcagcaa	ctttgacaac
1921	ttcccgcagg	ccctcatcag	cgtcttccag	gtcctaacag	gtgaagactg	gaattctgtg
1981	atgtacaacg	ggatcatggc	ctacggcggg	ccgtcctacc	ctgggggtgct	cgtgtgcatt
2041	tatttcatca	tcctttttgt	ctgtggcaac	tatatcctgc	tcaatgtctt	cctggccatc
2101	gctgtggaca	acctggctga	ggcagagagc	ctgacttctg	cccagaaggc	caaagctgag
2161	gagagaaaac	gcaggaagat	gtccaagggt	cttccagata	agtcaagagga	agagaagtca
2221	gtaatggcca	agaagctgga	acagaaacc	aaggggtgaag	gcacccctac	caccgccaag
2281	ctgaaaatcg	atgaatttga	atctaattgc	aatgaagtga	aggatcccta	cccctcagct
2341	gacttcccag	gagatgatga	ggaagatgag	cccagatcc	cagtgaagcc	ccgaccacgc
2401	ccgctggctg	agctgcagct	caaagagaag	gcagtgccca	tcccagaagc	cagctccttc
2461	ttcattttca	gccccacca	caagatccgt	gtcttggtgc	atcgcatgtg	caacgctacc
2521	tggttcacca	acttcatcct	tcttttcatc	ctgctcagca	gtgccgcact	ggccgcagag
2581	gaccccatcc	gggcccagtc	cgtgaggaat	cagatccttg	ggtatcttga	cattgcttcc
2641	acctctgtct	tactgtgga	gattgtcctc	aagatgacga	cctacgggtgc	cttctctgac
2701	aagggtcctc	tctgcccga	ctatttcaac	atcctggacc	tgtcgtgtgt	ggcctgtctc
2761	ctcatctcca	tgggacctga	gtccagcgc	atctctgtgg	tgaaaatcct	gaggtgctg
2821	aggggtgctc	ggcccctgcg	ggccatcaac	agagcaaagg	ggctgaagca	gggtgtgcag
2881	tgtgtgtttg	tggccatccg	caaccatcgg	aacatcgtcc	tcgtcaccac	cctcctgcag
2941	ttcatgtttg	cctgcatcgg	cgtccagctt	ttcaaggcca	agttcttcag	ctgcaatgac
3001	ttatccaaga	tgacagagaa	ggagtgcagg	ggctattact	atgtgtacaa	ggatggggac
3061	cccaccaga	tggagctgcg	cccccgccag	tggatacaca	gcgacttcca	tttcgacaac
3121	gtgctctcgg	ccatgatgtc	actcttcaag	gtctccacct	ttgagggatg	gcctcagctg
3181	ctttaccagg	ccatagactc	atacaaggaa	gacacaggcc	ccgtctacaa	caaccgagtg
3241	gagatggcca	tcttcttcat	catctacatc	atcctcattg	ccttcttcat	gatgaacatc
3301	tttgtgggct	tcgttattgt	cacctccag	gagcaggggg	agactgagta	caagaactgt
3361	gaactggaca	agaaccagcg	ccagtgtgtg	caatatgccc	tgaaggcccg	cccgtgagg
3421	tgctacatcc	ccaaaaacc	ataccagtac	cagggtgtgg	atgtcgtcac	ctcctcctac
3481	tttgagtacc	tgatgtttgc	cctcatcatg	ctcaacacca	tctgcctggg	catgcagcac
3541	tacaaccagt	cagaggagat	gaaccacatc	tcagacatcc	tcaacgtggc	cttcaccatc
3601	atcttcaccc	tggagatgg	cctcaagctc	atggcgttca	aggccagggg	ctatctttgga
3661	gacccctgga	atgtgtttga	cttcttgatt	gtcatcggca	gcacatcga	tgtcattctc
3721	agtgaaatcg	acactttcct	ggcctccagc	gggggactgt	attgcctggg	tggaggctgc
3781	gggaacgttg	accagacga	gagcgcggcg	atctccagcg	ccttctttcg	cctgttccgg

ERGEBNISSE

```
3841 gtcacatgagc tgatcaagct gctgagccgg gcagagggag tgcgcactct gctgtggacg
3901 ttcacatcaagt ccttccaggg cctgccatac gtggccctgc tcatcgatcat gctcttcttc
3961 atctacgccg tcatcggcat gcagatgttt ggtaagatcg ccatgggtgga cgggacccaa
4021 ataaaccgga acaacaactt ccagaccttc ccacaagctg tgttgctgct cttcaagtgt
4081 tccacaagtg aagccttgca ggagatcctc ctggcctgca gctacggcaa gttgtgtgac
4141 cccgaatcgg attatgcccc ggggtgaggag tacacgtgtg gcaccaactt cgcctactat
4201 tacttcgtca gcttctacat gctctgcgcc ttctgatca tcaacctgtt tgtagctgtc
4261 atcatggaca actttgacta cctcaccggg gactggtcca tcctggggcc ccatcacctg
4321 gatgagttca aagccatttg ggcagagtat gaccggagg ctaagggcag aatcaaacac
4381 ctggatgtgg tgacctgct gagacggatc caacccctc tgggcttgg gaagtctgc
4441 ccacaccggg tagcatgtaa gcggctggtg ggcatgaaca tgccttgaa cagcagcggc
4501 acggtcacct tcaacgccac tctcttcgcc ctggctccga cagcactcaa gatcaagacg
4561 gaaggttaact ttgagcaggg caatgaggag ctgagggcca tcatcaagaa gatctggaag
4621 agaaccagca tgaagctctt ggatcaggtc attcctccaa taggagatga tgagggtgact
4681 gtagggaagt tctacgccac gtttctcatc caggagcact tccggaagtt catgaagcgc
4741 caggaagagt attatgggta tgggcccaag aaggacactg tacagatcca ggccggactg
4801 cggaccattg aggaagaggc agcccagag atccggcgca ccatctcagg agacctgaca
4861 gctgaagaag agctggagag agccatggtg gaggctgcga tggaggaagg gatattccgg
4921 aggactgggg gcctgtttgg ccagggtggc aacttcatgg aaaggaccaa ctccctgccc
4981 cctgtgatgg ccaaccagag acccctccag ttgctgaga tagagatgga agagctgga
5041 tcacctgtct tcttggagga ttccctcaa gatccacgca ccaaccctct tgctcatgcc
5101 aacaccaata atgccaatgc caatgttggc tgtgacaaca gcagccacag caacagccag
5161 ctattttcca gcatccgcta tgaaggagg ttccctggag agacagagac gcctgctgcc
5221 agaggaggag cctttggcca gccccgaagc gtccctgggag cccacagcaa atcctgtgtg
5281 gaaaagctaa aaggacagct ggcccagaga gaaatgccc gggcccaggc gtctcctacc
5341 cctgcccagc gtgcccagc agagcctccc ctgctgggg agaggaggga cccacccccg
5401 gggcctgagg aagcatccca ccacggtagg accaaggaga gtagtccag gtgccagact
5461 ccagcgacag ccaggctgat acaaggagct ctggttcgag gaggcctgga cacctggcg
5521 gctgatgctg actttgtcac ggtgacaggc cgggccctgg cagatgcctg ccagatgga
5581 ccagaggacg tggaggtggc agcaacagag ctactgaaaa gacaagagtc cccagagggc
5641 atggccagtg cccagggagc cttgagcctc gggctcctgc tggggagcct tgaccagcat
5701 cagggtccc aggagacct gatccccgc aggtgtgag gttccgcaca gcagcagcat
5761 gggcttagag cttagcatgac caacggtgag ggaggggtgg ctggggccga gaagggttag
5821 cccaccacgg cagccccct ctctctcagc agctgaatgg atgggcccag tgggggtggt
5881 caggaaccac cagaaaacac gtccggaaga agtagattga caggccctc tctcaccgg
5941 caagaggcat ggttggatgg agcttcta atgtcattcaa taggcccagt cagtgccagt
6001 gtctgtctgg cataaggcca ctcccaccag caggacatta aagtctccag gcctatgcca
6061 ttggccctg
```

Abbildung 9: Nukleotidsequenz der alpha-Untereinheit des felinen spannungsabhängigen Calciumionenkanals *CACNA1S* (Accession Nummer DQ128075)

Aufgrund der Größe konnte die *CACNA1S* mRNA nicht in ganzer Länge (*full length*) amplifiziert ligiert werden. Daher wurden mit Hilfe der *one-step* RT-PCR drei überlappende Fragmente erstellt. Die Absicherung der Identität erfolgte durch direkte Sequenzierung. Positionen und Größe dieser Fragmente können Abbildung 10 entnommen werden.

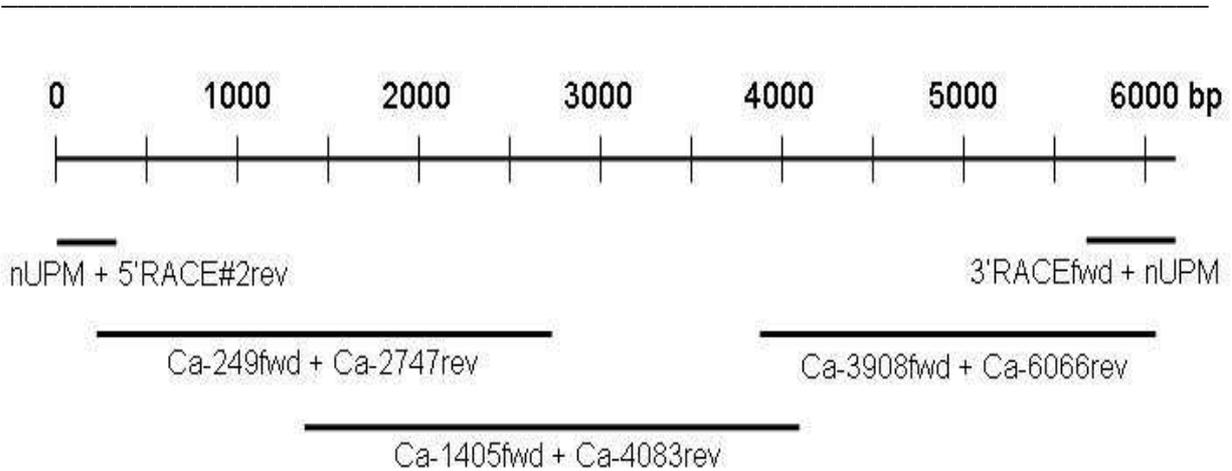


Abbildung 10: Schematischer Überblick zu Position und Größe der RT-PCR Fragmente der feline *CACNA1S* mRNA mit Primerbezeichnung

5.2.2 Bioinformatische Ergebnisse

5.2.2.1 Analyse der mRNA-Sequenz

Die prozessierte mRNA des feline *CACNA1S* besteht aus 6070 Basen mit einem offenen Leserahmen (*open reading frame*, *ORF*) von 5616 Basen (inklusive Stopcodon). Der Leserahmen beginnt mit der 124. Base und endet mit der 5739. Base. Im Vergleich der mRNA-Sequenzen von Katze und Mensch wurde eine Identität zwischen den einzelnen Basen der Ribonukleinsäuren von 89 % festgestellt. Das 5' Ende der feline mRNA ist um 105 Basen kürzer als die mRNA des Menschen. Die mRNA der Katze enthält im Vergleich zur mRNA des Menschen zwei je sechs Basen umfassende Deletionen und eine Insertion. Sowohl die entsprechend der Nomenklatur von DEN DUNNEN & ANTONARAKIS (2001) zu bezeichnende Insertion r.5899insac als auch die Deletion r.5997delaguguc liegen außerhalb des offenen Leserahmens. Die feline mRNA codiert ein Protein aus 1871 Aminosäuren. Die im Vergleich zum Mensch zu beobachtete Deletion r.5406delcucau der Katze führt zu einem Verlust von zwei Aminosäuren an Position 1760 (1760delSL). Zwischen der Proteinsequenz der Katze und der des Menschen (Accession Nummer NP_000060) aus 1873 Aminosäuren besteht eine Identität der Aminosäuren von 92 %. Die Ähnlichkeit zwischen den Proteinsequenzen aufgrund vergleichbarer Aminosäuren liegt bei 96 %.

5.2.2.2 Interspezies-Vergleich der Untereinheiten von Calciumkanälen

Die aus dem Vergleich von mRNA-Sequenzen der *alpha*-Untereinheiten verschiedener Calciumkanaltypen von Katze, Mensch, Maus, Ratte und Kaninchen resultierenden Distanzinformationen sind in Abbildung 11 als Verwandtschaftsdiagramm dargestellt.

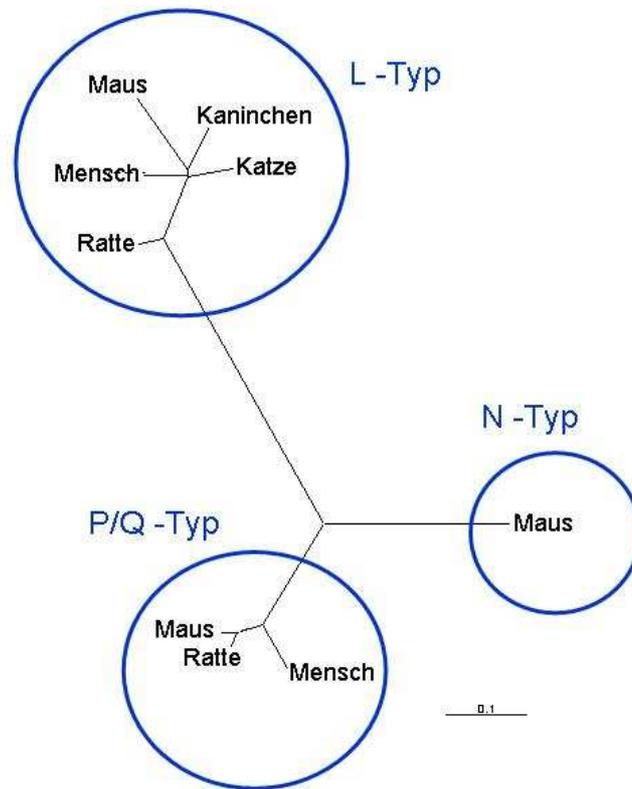


Abbildung 11: Clusteranalyse der mRNA-Sequenzen der *alpha*-Untereinheiten von spannungsabhängigen Calciumkanälen des L-, N- und P/Q-Typs

Aufgrund der höheren Ähnlichkeit der Sequenzen der mRNA eines Kanaltyps ergeben sich Speziesübergreifende Cluster. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Calciumkanälen des L-, N- und P/Q-Typs bei verschiedenen Spezies sind größer als die Unterschiede in den Sequenzen zwischen den Spezies. Aufgrund der Funktion der einzelnen Kanaltypen in der Klasse der Säugetiere sind die jeweiligen Nukleotidsequenzen als orthologe DNA-Bereiche hochgradig konserviert.

Zum Vergleich der mRNA-Sequenzen der *alpha*-Untereinheiten des L-Typ Calciumkanals wurden neben den Genbanksequenzen von Katze, Mensch, Maus, Ratte und Kaninchen zusätzlich die *Novel Ensembl Orthologue predictions* für die mRNA-Sequenzen des *CACNA1S* von Rind, Hund und Schimpanse berücksichtigt. In

Abbildung 12 sind die Distanzen zwischen den Nukleotidsequenzen der verschiedenen Tierarten dargestellt.

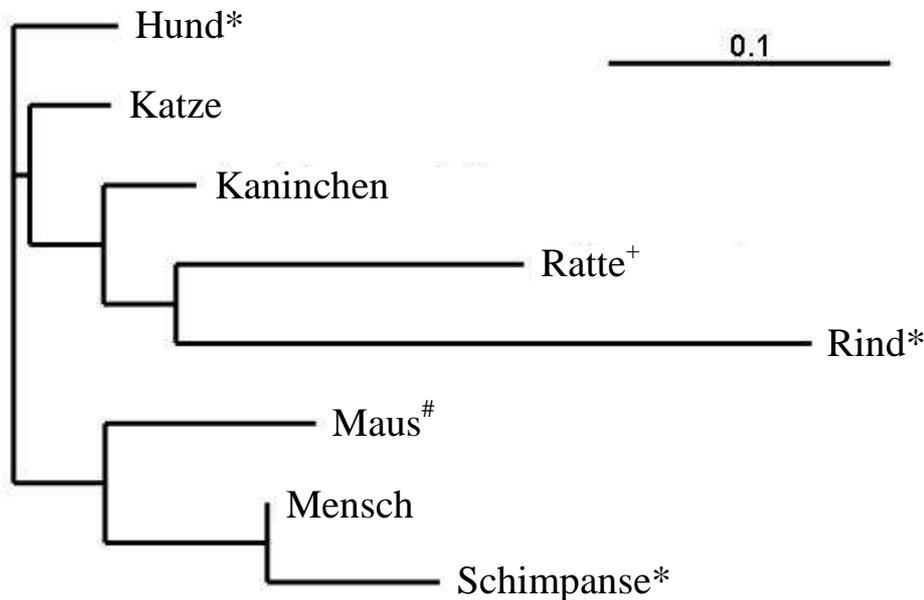


Abbildung 12: Verwandtschaftsdiagramm von mRNA-Sequenzen der *alpha*-Untereinheiten von Calciumkanälen des L-Typs

(*: *Ensembl Orthologue prediction*, +: 3'Ende, #: *predicted genbank submission*)

Bezogen auf eine gemeinsame Basis lassen sich aufgrund der Unterschiede der mRNA-Sequenzen in diesem Dendrogramm drei Cluster unterscheiden. Von den anderen Spezies abgegrenzt steht die Sequenz des Hundes. Im zweiten Cluster spalten sich die Sequenzen von Ratte und Rind mit relativ hoher Distanz von der Sequenz des Kaninchens und wiederum der Sequenz der Katze ab. Die mRNA-Sequenz der Katze wird dem zweiten Cluster zugeordnet, die Distanz ist aber zur Sequenz des Hundes am kleinsten. Im dritten Cluster ist eine relativ geringe Distanz zwischen Mensch und Schimpanse aufgezeigt, die Sequenzen spalten sich von der Sequenz der Maus ab. Maus und Ratte, beides Vertreter der Familie der *Muridae* (Echte Mäuse, Ordnung Nagetiere) werden hier unterschiedlichen Clustern zugeordnet. Die aufgrund der Phylogenese der Spezies erwarteten Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede werden in diesem Dendrogramm mit Ausnahme der Primaten insgesamt nicht wiedergespiegelt.

5.2.2.3 Schätzung der Transmembransegmente

Nach Translation des genetischen Codes der feline mRNA des *CACNA1S* in die Aminosäuresequenz wurden die Transmembransegmente des resultierenden Proteins ohne Berücksichtigung von Sekundärstrukturen geschätzt. Dabei wurden aufgrund der Algorithmen von den Programmen HMMTOP, TMHMM, TMPred und TopPred II unterschiedlich viele Transmembrandomänen (19 bis 24) vorhergesagt. Durch Bildung des Konsensus konnte das in Abbildung 13 dargestellte Modell entworfen werden.

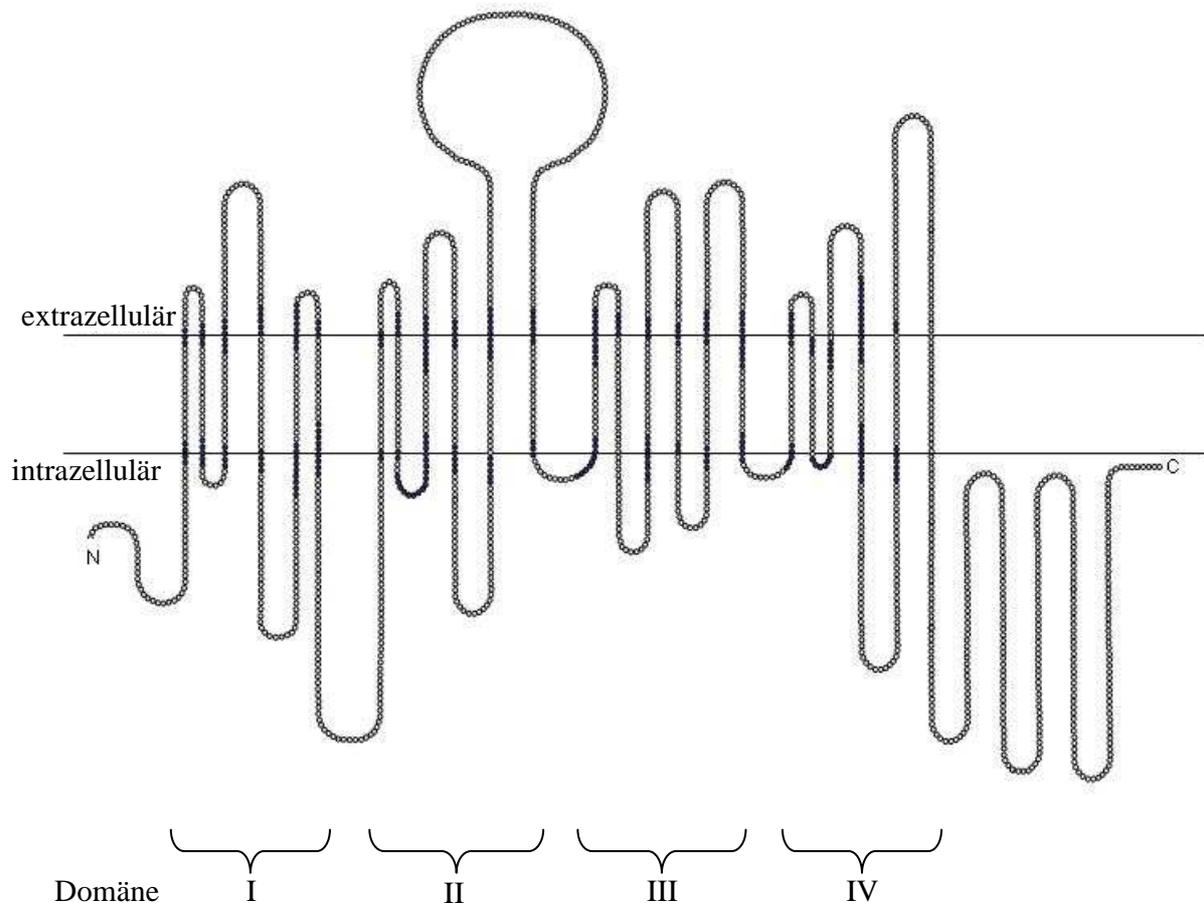


Abbildung 13: Transmembrandomänenmodell des feline CACNA1S

Im Konsensmodell charakterisieren 24 Transmembransegmente die *alpha*-Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals. In den einzelnen Algorithmen ermittelte abweichende Abgrenzungen zwischen den Transmembranhelices und den cytoplasmatischen bzw. extrazellulären Segmenten wurden durch dunkle Farben der Aminosäure repräsentierenden Kreise dargestellt. Wie beim Protein des Menschen konnten durch die Schätzung auch beim *CACNA1S*-Protein der Katze vier Domänen (I bis IV) aus jeweils einer Serie von sechs *alpha*-helicalen Transmembransegmenten abgeleitet werden. Die Transmembransegmente sind durch unterschiedlich lange

extra- bzw. intrazelluläre Proteinschleifen (so genannte *loops* oder *interlinker*) verbunden. Die beim Menschen den ionenselektiven Filter bildenden vier großen *loops* jeweils zwischen dem 5. und 6. Transmembransegment jeder Domäne ließen sich über die verwendeten Algorithmen nicht ermitteln. Das Modell enthält auch nicht den beim Menschen charakteristischen, mit dem Ryanodinrezeptor interagierenden *loop* zwischen Domäne III und IV.

5.2.3 Gewebespezifische Expression des felinen *CACNA1S*

Zum semi-quantitativen Vergleich der Expression des *CACNA1S* konnte RNA aus verschiedenen Geweben isoliert und eine *two-step* RT-PCR mit steigender Zyklenzahl erfolgreich durchgeführt werden. Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen für die untersuchten Gewebe Gehirn, Herz, Uterus, Skelettmuskulatur, Lunge, Leber, Niere, Milz und Vollblut nach der Elektrophorese sind in Abbildung 14 und 15 dargestellt.

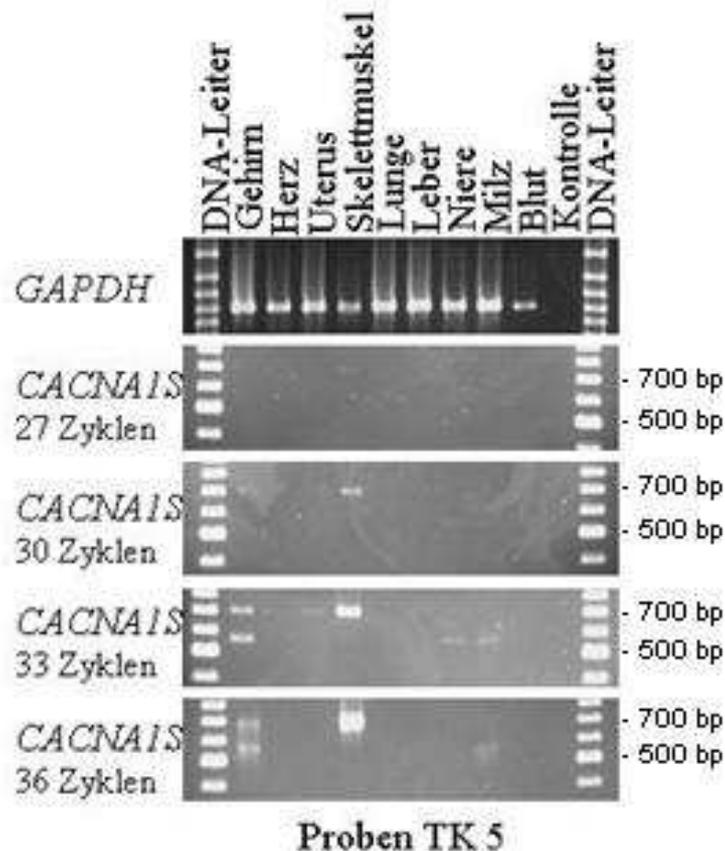


Abbildung 14: Semi-quantitativer Vergleich der Expression des felinen *CACNA1S*-Gens bei TK5 in Geweben durch *two-step* RT-PCR

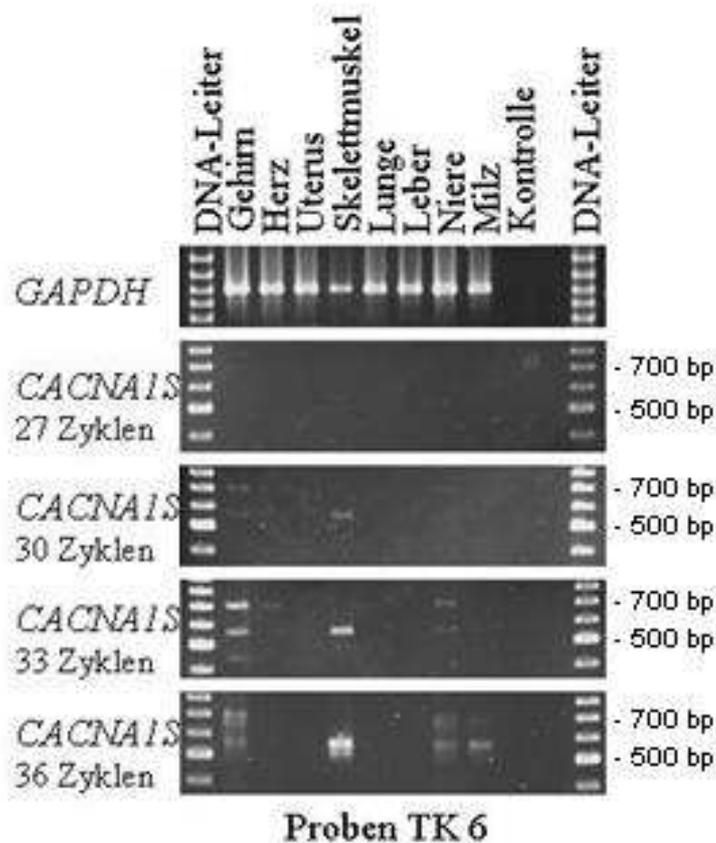


Abbildung 15: Semi-quantitativer Vergleich der Expression des feline *CACNAIS*-Gens bei TK6 in Geweben durch *two-step* RT-PCR

Die Amplifikate (562 bp und 710 bp) repräsentieren das 3'Ende der mRNA. Die mRNA des *CACNAIS* konnte bei beiden Tieren in den Geweben Gehirn, Skelettmuskel, Niere und Milz nachgewiesen werden. In den anderen Geweben erfolgte keine spezifische Amplifikation. Die Nutzung von Blutproben zur Isolierung von mRNA dieses Gens für weitere Analysen ist daher nicht möglich. Die mRNA des *housekeeping*-Gens *GAPDH* (916 bp) konnte in allen Geweben amplifiziert werden. In Niere und Milz waren bezogen auf *GAPDH* nur geringe Konzentrationen der mRNA des *CACNAIS* nachzuweisen. Anhand der Gehirnproben wurden mit der PCR zwei Amplifikate erzeugt, die durch direkte Sequenzierung als mRNA des *CACNAIS* in gespleißter (562 bp) als auch ungespleißter Form (710 bp) identifiziert wurden. Die stärkste Expression der mRNA des *CACNAIS* erfolgt gewebespezifisch in Muskelgewebe. In diesem Versuch wurde die mRNA des *CACNAIS* im Muskel beim zweiten Tier in gespleißter, beim ersten Tier aber in ungespleißter Form nachgewiesen.

5.3 Analyse genomischer Fragmente des *CACNAIS*

5.3.1 Sequenzinformation der PCR-Produkte

Nach der Identifizierung der mRNA-Sequenz des felines *CACNAIS* Gens wurden Primer zur Amplifikation von genomischen DNA-Fragmenten abgeleitet. Die bei vier verschiedenen Tieren erzeugten Amplifikate wurden mittels vergleichender Sequenzierung untersucht. In fünf Fragmenten wurden genetische Polymorphismen nachgewiesen, wodurch bis zu vier verschiedene Allele des jeweiligen DNA-Abschnitts definiert werden konnten. Die ermittelten Sequenzen der Amplifikate wurden in der Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) eingetragen. Die Accession Nummern sowie die Identifikation der Fragmente analog zu den Exon-Intron-Abschnitten des Menschen sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37: Übersicht sequenzierter *CACNAIS* Fragmente mit Zuordnung zu humanen DNA-Fragmenten und Datenbankeinträgen

Fragment	Primer	Primer	Größe	Allel	Accession-
Exon9 bis Exon10	Ca1405fwd	Ca1584rev	2147	A	DQ241403
			2153	B	DQ057981
Exon11	MutJRfwd	MutJRrev	117	A	DQ241402
Exon17 bis Exon19	Ca2552fwd	Ca2747rev	1089	A	DQ128069
			1089	B	DQ128070
			1089	C	DQ241400
Exon30 bis Exon 32	Ca3908fwd	Ca4142rev	1026	A	DQ128071
			1029	B	DQ128072
			1030	C	DQ241401
			1026	D	DQ241398
Exon36 bis Exon38	Ca4606fwd	Ca4869rev	1490	A	DQ128064
			1490	B	DQ128065
			1490	C	DQ128066
Exon44 bis 3'UTR	Ca5531fwd	Ca6066rev	710	A	DQ128067
			710	B	DQ128068
			710	C	DQ241399

5.3.2 Genomische Struktur in analysierten Fragmenten

Fünf der sechs im vorhergehenden Kapitel beschriebenen genomischen Fragmente des *CACNAIS* der Katze beinhalten vollständige Introns und Exons. Diese Abschnitte sind

in Tabelle 38 mit der jeweiligen Größe und den Sequenzen an den *splice-sites* aufgelistet.

Tabelle 38: Größe und Exon-Intron-Grenzen von genomischen Fragmenten des felinen *CACNA1S*

Abschnitt <i>CACNA1S</i> analog zum Menschen	Fragmentgröße in Anzahl Nukleotide		Basensequenz der Katzen <i>splice-sites</i>
	Katze	Mensch	
Intron9	1972	1627	GTGT – AGCC
Intron17	583	670	AAGT – AGAG
Exon18	130	130	AGAG – AGGT
Intron18	309	275	AGGT – AGAT
Intron30	200	184	AGGT – AGGC
Exon31	66	66	AGGC – AGGT
Intron31	596	560	AGGT – AGAT
Intron36	928	955	AGGT – AGGT
Exon37	101	102	AGGT – AGGT
Intron37	296	285	AGGT – AGAT
Intron43	157	144	AGGT – AGGC
Exon44	252	252	AGGC

Die Exons umfassen 66 (Exon31) bis 252 Basenpaare (Exon44), die Introns wiesen Größen von 157 (Intron43) bis 1972 (Intron9) Basenpaaren auf. In den analysierten Abschnitten wurden die Exon-Intron-Grenzen durch das Alignment von feliner mRNA und DNA bestimmt. Die Sequenzen der beobachteten *splice-sites* sind zwischen Katze und Mensch bis auf den Übergang von Intron9 zu Exon10 identisch. Wie auch beim Menschen weichen sie von der GT-AG-Regel ab, als *splice acceptor* treten die Nukleotide GT und AA und als *splice donor* die Nukleotide CC, AG, AT und GC auf.

5.3.3 Genetische Polymorphismen in *CACNA1S*-Fragmenten

Durch die vergleichende Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte genomischer Abschnitte des *CACNA1S*-Gens von vier verschiedenen Tieren konnten in den Fragmenten insgesamt 44 genetische Polymorphismen identifiziert werden. In Tabelle 39 sind Art und Anzahl der genetischen Polymorphismen in den analysierten genomischen Fragmenten des *CACNA1S*-Gens zusammengefasst.

Tabelle 39: Art und Anzahl genetischer Polymorphismen in genomischen Fragmenten des CACNAIS-Gens

Fragment <i>CACNAIS</i>	Anzahl auftretender Polymorphismen		
	Mikrosatellit	Insertion/Deletion	<i>single nucleotide polymorphisms</i> (SNPs)
Intron9	1		12
Exon10			1
Intron17			5
Exon18			2
Intron30		1	1
Intron31		1	10
Intron36			5
Exon44			2
3'UTR			3

In den analysierten Bereichen wurden ein Mikrosatellit, eine Deletion, eine Insertion und 41 *single nucleotide polymorphism* (SNPs) nachgewiesen. In den nicht angeführten Exons bzw. Introns der DNA-Abschnitte (Exon9, Exon17, Intron18, Exon19, Exon30, Exon31, Exon 36, Exon37, Intron37) wurden keine Polymorphismen beobachtet. Der Typus und die Position der genetischen Varianten in der jeweiligen Referenzsequenz werden in Tabelle 40 nach der Art des Polymorphismus angegeben.

Tabelle 40: Benennung und Positionen genetischer Polymorphismen in Fragmenten des CACNAIS-Gens im Vergleich zur Referenzsequenz

Referenzsequenz	Abschnitt <i>CACNAIS</i> Analogie zum Mensch	Bezeichnung des Polymorphismus	Position des Polymorphismus
DQ241403	Intron9	Transition	g124C>T
	Intron9	Transversion	g277T>A
	Intron9	AC-repeat	g652(AC)17-26
	Intron9	Transition	g1060A>G
	Intron9	Transition	g1155C>T
	Intron9	Transversion	g1392C>A
	Intron9	Transition	g1470C>T
	Intron9	Transition	g1559A>G
	Intron9	Transition	g1580G>A
	Intron9	Transition	g1667G>A
	Intron9	Transition	g1676T>C
	Intron9	Transition	g1799A>G
	Intron9	Transition	g1929G>A
	Exon10	neutrale Transition	g2092C>T
DQ128069	Intron17	Transition	g80T>C
	Intron17	Transversion	g94T>G
	Intron17	Transversion	g146C>A
	Intron17	Transition	g188G>A
	Intron17	Transition	g226C>T
	Exon18	neutrale Transition	g702G>A
	Exon18	neutrale Transition	g711G>A

Fortsetzung Tabelle 40: Benennung und Positionen genetischer Polymorphismen in Fragmenten des *CACNAIS*-Gens im Vergleich zur Referenzsequenz

Referenzsequenz	Abschnitt <i>CACNAIS</i> Analogie zum Mensch	Bezeichnung des Polymorphismus	Position des Polymorphismus
DQ128071	Intron30	Deletion	g217delC
	Intron30	Transition	g224G>A
	Intron31	Transition	g399G>A
	Intron31	Transition	g435A>G
	Intron31	Transition	g439A>G
	Intron31	Transversion	g448G>T
	Intron31	Transition	g536A>G
	Intron31	Transition	g558T>C
	Intron31	Transversion	g563A>C
	Intron31	Transition	g592A>G
	Intron31	Transversion	g603G>C
	Intron31	Insertion	g803_804insAACT
	Intron31	Transition	g872G>A
	DQ128064	Intron36	Transition
Intron36		Transition	g372C>T
Intron36		Transition	g618G>A
Intron36		Transition	g643T>C
Intron36		Transition	g718T>C
DQ128067	Exon44	neutrale Transition	g313T>C
	Exon44	neutrale Transition	g400C>T
	3'UTR	Transition	g518A>G
	3'UTR	Transition	g538A>G
	3'UTR	Transition	g624C>T

Insgesamt konnten in den Intronabschnitten und der 3'-untranslatierten Region des *CACNAIS*-Gens 29 Transitionen und sieben Transversionen identifiziert werden. In den Exonabschnitten wurden vier Transitionen zwischen Burma- und Perserkatze und eine Transition innerhalb der analysierten Burmakatzen nachgewiesen, die jedoch als stille Mutationen keine Auswirkung auf die resultierende Aminosäuresequenz haben. Im Vergleich zu den Referenzsequenzen konnte im Intron30 die Deletion eines Cytosins und im Intron31 die Insertion von vier Basen gezeigt werden. Im Intron9 wurde neben zwölf SNPs ein Mikrosatellit (*GIKA 001*) identifiziert, dessen AC-Motiv im gesamten DNA-Probenpanel 17 bis 26mal wiederholt wird.

5.4 Physikalische Kartierung

Zur physikalischen Kartierung des *CACNAIS* im feline Genom wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Als Sonde konnte das Biotin-

16-dUTP markierte Fragment Exon36 bis Exon38, Allel B (Accession Nummer DQ128065) erfolgreich verwendet werden. Die Hybridisierungen der Sonden an bestimmte Chromosomen verschiedener Metaphasenkerne sind durch Fluoreszenzsignale in den Abbildungen 16 und 17b zu erkennen.

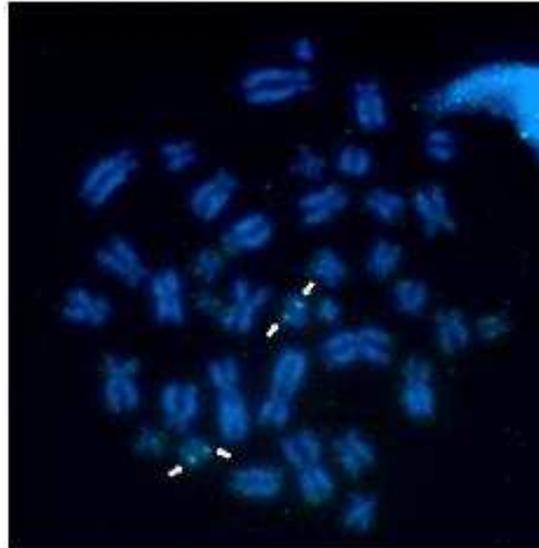


Abbildung 16: Fluoreszenzsignale der *CACNAIS*-Sonde im feline Chromosomenpräparat

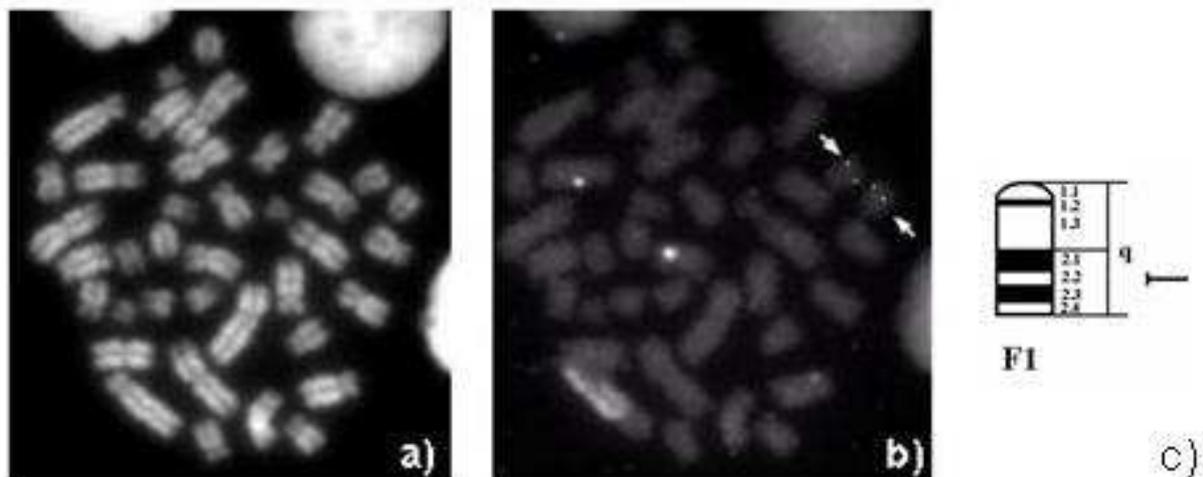


Abbildung 17: Q-Banden gefärbtes Metaphasenpräparat der Katze vor (a) und nach der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (b) und Zuordnung im Ideogramm des Chromosoms F1 (c) nach CHO *et al.* (1997)

Das Q-Banden gefärbte Präparat (Abbildung 17a) ermöglicht die Identifikation der Chromosomen und ihrer Banden gemäß der internationalen Nomenklatur für Chromosomen der Katze. Durch Vergleich der Metaphasenkerne der Abbildungen 17a und 17b wurde die *alpha*-Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals (*CACNA1S*) physisch auf dem felinen Chromosom F1q22 kartiert (Abbildung 17c).

5.5 Genetische Marker

5.5.1 Mikrosatellit *GIKA001*

5.5.1.1 Allele des Mikrosatelliten *GIKA001*

Im Intron 9 des *CACNA1S* der Katze konnte ein Mikrosatellit mit einem (AC)_n-Motiv identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mikrosatellit *GIKA001* bei 208 DNA-Proben verschiedener Katzen typisiert. In Tabelle 41 sind die beobachteten Allele der einzelnen Tiere innerhalb verschiedener Rassen dargestellt.

Tabelle 41: Anzahl beobachteter Allele des Mikrosatelliten *GIKA001* in Katzen verschiedener Rassen

Kategorie EMS-Code	LHR	HHR				KHR				
	PER	SBI	MCO	NFO	Rest	BIR	BUR	EUR	SIA	Rest
Tiere (n)	48	5	11	7	2	6	66	48	7	8
Allel 146	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Allel 148	3	-	-	2	-	-	-	3	-	-
Allel 150	38	-	7	3	1	3	40	22	4	2
Allel 152	3	1	1	-	2	-	-	5	4	1
Allel 154	23	-	4	-	-	1	1	13	1	4
Allel 156	25	9	10	8	1	7	91	42	5	8
Allel 158	4	-	-	-	-	1	-	3	-	-
Allel 160	-	-	-	1	-	-	-	6	-	-
Allel 164	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

EMS-Code: *easy mind system*, HHR: Halblanghaarrassen, KHR: Kurzhaarrassen, LHR: Langhaarrassen

Im gesamten Probenmaterial konnten neun Allele mit 146 bis 164 Basenpaaren nachgewiesen werden, die durch 17- bis 26fache Wiederholungen des Motivs entstehen. Das Allel 162 wurde nicht beobachtet. Im Untersuchungsmaterial sind die Allele 150 (n = 120) und 156 (n = 206) mit 28,8 % bzw. 49,5 % aller Beobachtungen dominierend. Die Allele 146 und 164 wurden nur im Einzelfall beobachtet.

In der Tabelle 42 sind die Zahl der Beobachtungen und die ermittelten Frequenzen der einzelnen Allele für die untersuchten Rassen in den Kategorien Langhaarrasse (LHR), Halblanghaarrasse (HHR) und Kurzhaarrasse (KHR) zusammengefasst.

Tabelle 42: Anzahl und Frequenz der beobachteten Allele des Mikrosatelliten *GIKA001* in Katzenrassen gruppiert nach Haarlänge

Allel	Langhaarrassen		Halblanghaarrassen		Kurzhaarrassen	
	Anzahl	Frequenz [%]	Anzahl	Frequenz [%]	Anzahl	Frequenz [%]
146	-	-	-	-	2	0,73
148	3	3,19	2	4,17	3	1,09
150	37	39,36	10	20,83	73	26,64
152	3	3,19	4	8,33	10	3,65
154	22	23,40	4	8,33	21	7,66
156	25	26,60	27	56,25	154	56,20
158	4	4,26	-	-	4	1,46
160	-	-	1	2,08	6	2,19
164	-	-	-	-	1	0,36

Das Allel 156 tritt mit Frequenzen von 56 % in den Halblang- und den Kurzhaarrassen auf, bei Perserkatzen (Kategorie Langhaarrassen) ist es wie das Allel 154 mit gerundet 25 % vertreten. Das Allel 150 zeigt einen Anteil von 20 bis 40 % in den einzelnen Kategorien. Zwischen Allelfrequenzen der Kategorie Langhaarrasse im Vergleich sowohl mit der Kategorie Halblanghaar als auch mit der Kategorie Kurzhaar wurden mittels Fishers Exakt Test hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) festgestellt. Die Allelfrequenzen innerhalb der Kategorien Halblanghaar und Kurzhaar unterscheiden sich hingegen statistisch nicht ($p > 0,05$).

5.5.1.2 Genotypen des Mikrosatelliten *GIKA001*

Aus den neun Allelen des hochpolymorphen Mikrosatelliten *GIKA001* resultieren im gesamten Untersuchungsmaterial 22 unterschiedliche Genotypen. Die Abbildung 18 veranschaulicht die graphische Darstellung der *peaks* der Mikrosatellitenallele von zehn Genotypen mit der Software Allelelocator Version 1.03 (Amersham Biosciences, Freiburg).

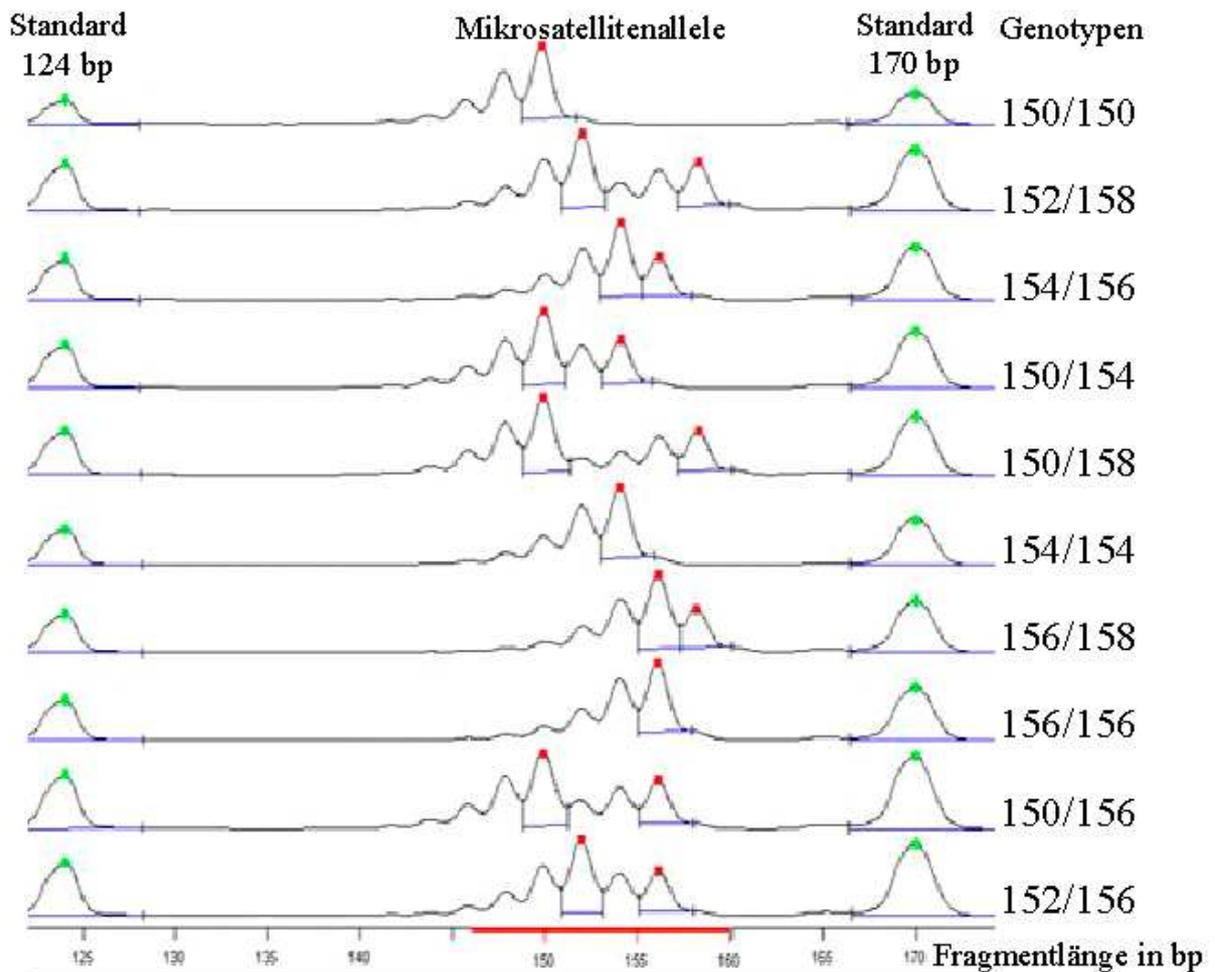


Abbildung 18: Darstellung der *peaks* der Mikrosatellitenallele von zehn Genotypen des Mikrosatelliten *G1KA001* mit Längenstandards

Die Frequenzen der insgesamt 20 Genotypen des Mikrosatelliten *G1KA001* innerhalb der Rassen Perser, Burma und Europäisch Kurzhaar sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: Anzahl und Frequenz der Genotypen des Mikrosatelliten *GIKA001* bei Perser-, Burma- und Europäischen Kurzhaarkatzen

Genotyp	Perser (n = 48)		Burma (n = 66)		Europ. Kurzhaar (n = 48)	
	Anzahl	Frequenz [%]	Anzahl	Frequenz [%]	Anzahl	Frequenz [%]
146/156	-	-	-	-	1	2,09
148/150	3	6,25	-	-	1	2,09
148/156	-	-	-	-	2	4,17
150/150	5	10,42	7	10,61	1	2,09
150/152	1	2,09	-	-	1	2,09
150/154	11	22,92	-	-	5	10,42
150/156	12	25,00	26	39,39	10	20,83
150/158	1	2,09	-	-	1	2,09
150/160	-	-	-	-	2	4,17
152/154	-	-	-	-	1	2,09
152/156	1	2,09	-	-	3	6,25
152/158	1	2,09	-	-	-	-
154/154	4	8,34	-	-	1	2,09
154/156	3	6,25	1	1,52	4	8,34
154/158	1	2,09	-	-	-	-
154/160	-	-	-	-	1	2,09
156/156	4	8,34	32	48,48	8	16,67
156/158	1	2,09	-	-	2	4,17
156/160	-	-	-	-	3	6,25
156/164	-	-	-	-	1	2,09

Innerhalb dieser Rassen treten bei der Rasse Europäisch Kurzhaar 18, bei Perser 13 und bei Burma nur vier verschiedene Genotypen auf. Von den Burmakatzen konnten bei 48 % der Genotyp 156/156 und bei 39 % der Genotyp 150/156 nachgewiesen werden. Der Genotyp 150/156 trat mit 25 % bei Persern und 21 % bei Europäisch Kurzhaar am häufigsten auf. Im untersuchten Mikrosatellit ist die genetische Diversität bei den Europäischen Kurzhaarkatzen am stärksten ausgeprägt. Die beobachteten Heterozygotiegrade (H_0) betragen bei den Perserkatzen 72,9 % und bei den Europäischen Kurzhaarkatzen 79,2 %. Innerhalb der Burmakatzenfamilie ergab sich ein Heterozygotiegrad (H_0) von 40,9 %.

5.5.2 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

5.5.2.1 Nukleotidvarianten der SNPs

Von den im Kapitel 5.2.3 beschriebenen Polymorphismen wurden neben dem Mikrosatelliten *GIKA001* vier SNPs zur Charakterisierung des *CACNA1S*-Gens ausgewählt. Die Bezeichnung und Position der verwendeten SNPs mit der jeweiligen Referenzsequenz sind in Tabelle 44 dargestellt.

Tabelle 44: Bezeichnung und Position der verwendeten SNPs mit Referenzsequenz

Bezeichnung	Referenzsequenz	Bezeichnung des Polymorphismus	Position des Polymorphismus
Intron17+46	DQ128069	Transition	g80T>C
Intron31+185	DQ128071	Transversion	g563A>C
Intron36+482	DQ128064	Transition	g643T>C
Exon44+188	DQ128067	neutrale Transition	g400C>T

Zur Darstellung und Charakterisierung dieser SNPs wurden PCR-RFLPs entwickelt. Durch die Amplifikation der Abschnitte des genomischen *CACNA1S*-Gens und anschließende Restriktion konnte die genetische Ausprägung mittels Fragmentlängenanalyse bei allen 138 Tieren charakterisiert werden. Die Abbildung 19 gibt eine Übersicht über die Darstellung der verschiedenen Genotypen im *CACNA1S* der PCR-RFLPs im Agarosegel wieder.

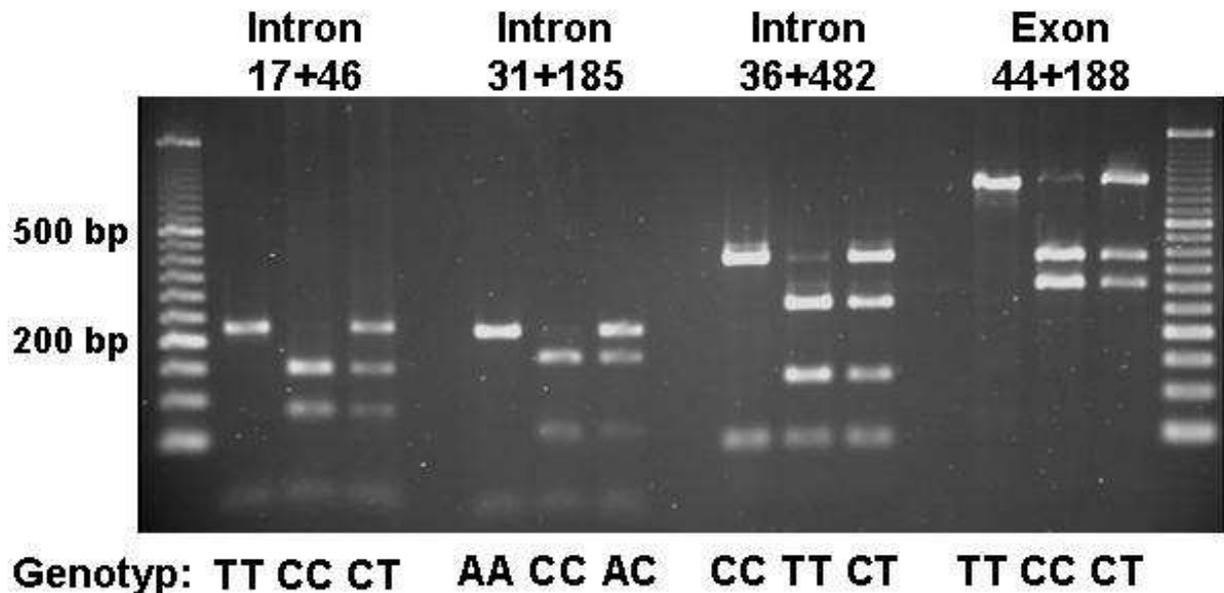


Abbildung 19: Darstellung der analysierten SNP-Genotypen *CACNA1S* im Agarosegel nach PCR-RFLP

5.5.2.2 Allele und Genotypen der SNPs

In Tabelle 45 und 46 sind die durch Nukleotidvarianten entstehenden Allele und Allelfrequenzen der einzelnen Tiere innerhalb verschiedener Rassen dargestellt.

Tabelle 45: Anzahl der SNP-Allele innerhalb verschiedener Katzenrassen

SNP	Allel	LHR PER	HHR				KHR				
			SBI	MCO	NFO	Rest	BIR	BUR	EUR	SIA	Rest
Tiere (n)		18	5	11	6	2	6	66	9	7	8
Intron17+46	T	-	1	1	-	-	-	41	-	4	-
	C	36	9	21	12	4	12	91	18	10	16
Intron31+185	A	2	7	3	1	1	2	54	4	2	3
	C	34	3	19	11	3	10	78	14	12	13
Intron36+482	T	2	7	2	1	1	-	53	3	2	3
	C	32	3	20	11	3	12	79	15	12	13
Exon44+188	C	36	10	22	12	4	12	92	18	10	16
	T	-	-	-	-	-	-	40	-	4	-

Tabelle 46: Frequenz in % der SNP-Allele der verschiedener Katzenrassen innerhalb der Haarlängenkatzenrassen

SNP	Allel	LHR PER	HHR				KHR				
			SBI	MCO	NFO	Rest	BIR	BUR	EUR	SIA	Rest
Tiere (n)		18	5	11	6	2	6	66	9	7	8
Intron17+46	T	-	2,1	2,1	-	-	-	21,4	-	2,1	-
	C	100	18,8	43,8	25,0	8,3	6,3	47,4	9,4	5,2	8,3
Intron31+185	A	5,6	14,6	6,3	2,1	2,1	1,0	28,1	2,1	1,0	1,6
	C	94,4	6,3	39,6	22,9	6,3	5,2	40,6	7,3	6,3	6,8
Intron36+482	T	5,6	14,6	4,2	2,1	2,1	-	27,6	1,6	1,0	1,6
	C	94,4	6,3	41,7	22,9	6,3	6,3	41,1	7,8	6,3	6,8
Exon44+188	C	100	20,8	45,8	25,0	8,3	6,3	47,9	9,4	5,2	8,3
	T	-	-	-	-	-	-	20,8	-	2,1	-

Da die SNPs anhand der Ergebnisse der vergleichenden Sequenzierung von Burmakatzen ausgewählt wurden, sind innerhalb dieser Rasse in allen PCR-RFLPs beide Allele zu beobachten. Das jeweils häufiger vorkommende Allel ist auch deutlich häufiger bei den Tieren anderer Rassen zu beobachten. So tritt das Allel C des Intron17+46 zu 100 % in Persern, 96 % der Halblanghaarrassen und 77 % der Kurzhaarrassen auf. Das Allel C im Intron31+185 ist jeweils zu 94 %, 75 % und 66 % und das Allel C im Intron36+482 mit jeweils 94 %, 77 % und 68 % vertreten. Das Allel C im Exon44+188 tritt bei Persern und Halblanghaarrassen ausschließlich und zu 77 % in den Kurzhaarrassen auf. Im Intron 17+46 tritt Allel T nur in den drei anderen Rassen Heilige Birma, Main Coon und Siam auf. Das Allel T im Exon44+188 konnte ausschließlich bei Burma und Siam nachgewiesen werden. Die aus den einzelnen Allelen resultierenden Genotypen sind nach Anzahl und Häufigkeit in den Tabellen 47 und 48 aufgeführt.

Tabelle 47: Anzahl der SNP-Genotypen des *CACNAIS*-Gens bei verschiedenen Katzenrassen

SNP	Genotyp	LHR PER	HHR				KHR				
			SBI	MCO	NFO	Rest	BIR	BUR	EUR	SIA	Rest
Tiere (n)		18	5	11	6	2	6	66	9	7	8
Intron17+46	TT	-	-	-	-	-	-	7	-	2	-
	TC	-	1	1	-	-	-	27	-	-	-
	CC	18	4	10	6	2	6	32	9	5	8
Intron31+185	AA	-	3	-	-	-	1	22	-	-	1
	AC	2	1	1	1	1	-	34	4	2	1
	CC	16	1	8	5	1	5	10	5	5	6
Intron36+482	TT	-	3	-	-	-	-	10	-	-	1
	TC	2	1	2	1	1	-	33	3	2	1
	CC	16	1	9	5	1	6	23	6	5	6
Exon44+188	CC	18	5	11	6	2	6	33	9	5	8
	CT	-	-	-	-	-	-	26	-	-	-
	TT	-	-	-	-	-	-	7	-	2	-

Tabelle 48: Frequenz in % der SNP-Genotypen des *CACNAIS*-Gens bei verschiedenen Katzenrassen innerhalb Haarlängenkategorien

SNP	Genotyp	LHR PER	HHR				KHR				
			SBI	MCO	NFO	Rest	BIR	BUR	EUR	SIA	Rest
Tiere (n)		18	5	11	6	2	6	66	9	7	8
Intron17+46	TT	-	-	-	-	-	-	7,3	-	2,1	-
	TC	-	4,2	4,2	-	-	-	28,1	-	-	-
	CC	100	16,7	41,7	25,0	8,3	6,3	33,3	9,4	5,2	8,3
Intron31+185	AA	-	12,5	-	-	-	1,0	22,9	-	-	1,0
	AC	11,1	4,2	4,2	4,2	4,2	-	35,4	4,2	2,1	1,0
	CC	88,9	4,2	33,3	20,8	4,2	5,2	10,4	5,2	5,2	6,3
Intron36+482	TT	-	12,5	-	-	-	-	10,4	-	-	1,0
	TC	11,1	4,2	8,3	4,2	4,2	-	34,4	3,1	2,1	1,0
	CC	88,9	4,2	37,5	20,8	4,2	6,3	24,0	6,3	5,2	6,3
Exon44+188	CC	100	20,8	45,8	25,0	8,3	6,3	34,4	9,4	5,2	8,3
	CT	-	-	-	-	-	-	27,1	-	-	-
	TT	-	-	-	-	-	-	7,3	-	2,1	-

Innerhalb der Burmakatzen wurden in jedem SNP alle drei Genotypen nachgewiesen. Bei den Tieren der anderen Rassen waren in den SNPs Intron31+185 und Intron36+482 nur wenige Tiere homozygot mit AA bzw. TT und nur einige heterozygot (AC bzw. TC). In Intron17+46 sind nur zwei Katzen der Rassen Heilige Birma und Maine Coon heterozygot (TC) und nur zwei Siamkatzen homozygot mit TT. Im SNP Exon44+188 wurden auch innerhalb der Burmakatzen alle Genotypen beobachtet, bis auf zwei Siamkatzen (Genotyp TT) zeigten alle Tiere anderer Rassen

den homozygoten Genotypen CC. Die Häufigkeiten der Genotypen zwischen Burmesen und allen anderen Katzen unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$).

5.5.2.3 Haplotypen aus SNPs

Die Software Famhap[®] Version 15 (BECKER & KNAPP 2002) konnte 20 der 21 Subfamilien innerhalb der Burmakatzenfamilie zur Schätzung der Haplotypen innerhalb der analysierten SNPs Intron17+46, Intron31+185, Intron36+482 und Exon44+188 nutzen. Innerhalb dieser Familien traten die drei Haplotypen CCCC, TCCT und CATC auf. Durch Rückschlüsse anhand der SNP-Genotypen bei Tieren anderer Rassen konnten fünf Haplotypen CCTC, TCTC, TCTT, CACC und CATC sicher identifiziert werden. Somit wurden anhand der vier charakterisierten SNPs innerhalb des *CACNAIS*-Gens insgesamt sieben verschiedene Haplotypen eindeutig charakterisiert. Diese sind in Abbildung 20 dargestellt.

Intron 17+46	†C	†C	†T	†T	†T	†C	†C
Intron 31+185	†C	†C	†C	†C	†C	†A	†A
Intron 36+482	†C	†T	†T	†T	†C	†C	†T
Exon 44+188	†C	†C	†C	†T	†T	†C	†C

Abbildung 20: Identifizierte SNP-Haplotypen des *CACNAIS*-Gens der Katze

Der Haplotyp TCTC trat jeweils heterozygot bei einer Maine Coon (Labornummer 3-0958) und einer Siamkatze (Labornummer VK13) auf. Diese Siamkatze wies als zweites Allel den Haplotypen TCTT auf, der zudem in einer homozygoten Siamkatze (Labornummer 3-0672) identifiziert werden konnte. Der Haplotyp CACC wurde jeweils homozygot bei Tieren der Rassen Birma, unverwandter Burma und Russisch-Blau (Labornummern 2-1809, 2-1872, 2-2036, 3-1412 und VK15) beobachtet. Der auch bei den Burmakatzen durch die Software Famhap[®] charakterisierte Haplotyp CATC wurde homozygot bei einer Britischen Kurzhaarkatze (Labornummer 2-2039) und heterozygot bei einer Maine Coon und einer Europäischen Kurzhaarkatze (Labornummern PK5 und TK6) erfasst. Der Haplotyp CCTC trat häufig bei Katzen zahlreicher Rassen wie Abessinier, Britisches Kurzhaar, unverwandte Burma, Europäisches Kurzhaar, Exotisches Kurzhaar, Heilige Birma, Karthäuser, Maine Coon, Norwegische Waldkatze, Orientalisches Kurzhaar, Perser, Ragdoll, Siam und

Sibirier auf. Innerhalb der genannten Rassen wurde dieser Haplotyp bei 50 Tieren homozygot und bei drei Tieren heterozygot beobachtet.

5.6 Assoziationsanalyse

Die Assoziationsanalyse diente der Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen der Häufigkeit der Ausprägung der analysierten genetischen Marker und dem Merkmal HypoPP in der Burmakatzenfamilie. In das Probenkollektiv wurden zwei weitere Burmakatzen (Labornummern 2-1872 und VK19) aufgenommen. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Frequenzen der einzelnen Allele der genetischen Marker sowie der SNP-Haplotypen zwischen den Burmakatzen verschiedener Merkmalsklassen mit dem Fishers Exakt Test verglichen. In Tabelle 49 sind die Frequenzen der erfassten Allele der Marker in den Merkmalsklassen „klinische Symptome“ und „symptomfrei“ nach Model I aufgeführt.

Tabelle 49: Frequenzen beobachteter Allele in Burmakatzen entsprechend der Merkmalsklasse nach Model I und Wahrscheinlichkeitswert

Marker		Frequenz in % bei Burmakatzen (n = 66)		Wahrscheinlichkeit p-Wert
		klinische Symptome	symptomfrei	
<i>GIKA001</i>	Allel 150	30,51	28,57	1,000
	Allel 154	0,85	0	
	Allel 156	68,64	71,43	
Intron17+46	Allel C	68,64	71,43	1,000
	Allel T	31,36	28,57	
Intron31+187	Allel C	61,02	42,86	0,2520
	Allel A	38,98	57,14	
Intron36+482	Allel T	38,14	57,14	0,2483
	Allel C	61,86	42,86	
Exon44+188	Allel C	69,49	71,43	1,000
	Allel T	30,51	28,57	

Zudem sind als Ergebnisse der durchgeführten Fishers Exakt Test die p-Werte der Irrtumswahrscheinlichkeiten angegeben. Die Frequenzen der einzelnen Allele in den beiden Merkmalsklassen unterscheiden sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ nicht. Das bedeutet, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Merkmalsklasse in Model I und einer Allelvariante gibt.

Nach Model II aufgestellte Merkmalsklassen mit der Verteilung der Frequenzen der Allele der genetischen Marker und den p-Werten der Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in Tabelle 50 dargestellt.

Tabelle 50: Frequenzen beobachteter Allele in Burmakatzen entsprechend Merkmalsklasse nach Model II

Marker	Frequenz in % bei Burmakatzen (n = 66)				Wahrscheinlichkeit p-Wert
	HypoPP betroffen	Anlage- träger	potentieller Anlage- träger	unbekannt	
GIKA001	Allel 150	28,57	28,57	33,33	0,829
	Allel 154	0	3,57	0	
	Allel 156	71,43	67,86	66,67	
Intron17+46	Allel C	71,43	71,43	66,67	0,9840
	Allel T	28,57	28,57	33,33	
Intron31+187	Allel C	42,86	64,29	46,67	0,1623
	Allel A	57,14	35,71	53,33	
Intron36+482	Allel T	57,14	32,14	53,33	0,1253
	Allel C	42,86	67,86	46,67	
Exon44+188	Allel C	71,43	71,43	66,67	0,9834
	Allel T	28,57	28,57	33,33	

Auch in diesem Modell konnten keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Allelfrequenzen der SNP-Marker und den Merkmalsklassen und somit keine Assoziation zwischen DNA-Variante und Auftreten der HypoPP festgestellt werden.

Die Erfassung der Haplotypen hinsichtlich des Merkmals nach Model I erfolgte mittels der Software Famhap[®] Version 15. Für die Analyse konnten die 5 der 21 *nuclear families* innerhalb der Burmafamilie genutzt werden, denen die sieben Katzen mit klinischen Symptomen der HypoPP angehören. Die Frequenzen der Haplotypen nach Merkmalsklasse sind in Tabelle 51 aufgeführt.

Tabelle 51: Darstellung der Frequenzen ausgewählter SNP-Haplotypen im CACNAIS-Gen bei Burmakatzen nach Merkmalsklasse nach Model I

SNP-Haplotyp	Frequenz in % bei Burmakatzen (n = 29)		Wahrscheinlichkeit p-Wert
	klinische Symptome	symptomfrei	
CCCC	20,0	14,0	0,5368
TCCT	30,0	34,0	
CATC	50,0	52,0	

Auch zwischen den Häufigkeiten bei von HypoPP betroffenen Tieren und klinisch symptomfreien Katzen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen ($p < 0,05$). Ein Zusammenhang zwischen den analysierten intragenen Markern *GIKA 001*, Intron17+46, Intron31+187, Intron36+482, Exon44+188 sowie den SNP-Haplotypen des *CACNA1S*-Gens und dem Auftreten der HypoPP kann unter gegebenen Umständen ausgeschlossen werden.

6 Diskussion

6.1 HypoPP der Burmakatze

6.1.1 Eignung des Probenmaterials

Für die Analysen standen Informationen zu einer von der Hypokaliämischen Periodischen Paralyse (HypoPP) betroffenen Burmakatzenfamilie zur Verfügung, aus der von 64 Individuen Blutproben zur DNA-Isolierung für die molekulargenetischen Untersuchungen eingeworben werden konnten. Innerhalb dieser Familie waren sieben Tiere von HypoPP betroffen, die klinischen Symptome wurden in allen Fällen tierärztlich diagnostiziert. Da die Proben insgesamt von Katzenbesitzern bzw. -züchtern zur Verfügung gestellt wurden, die insbesondere für die HypoPP sensibilisiert waren, ist von einer sehr guten und intensiven Tierbeobachtung auszugehen. Auch wenn zum Beispiel schwache, nachts auftretende Attacken unentdeckt hätten bleiben können, kann vorausgesetzt werden, dass die Merkmalserfassung hinreichend war und alle von Anfällen betroffenen Tiere auch als solche identifiziert wurden. Auch kann man durch die engen Kontakte zwischen Mensch und Katze davon ausgehen, dass symptomfrei klassifizierte Tiere auch wirklich symptomfrei sind. Die Klassifizierung „Anlageträger“ wurde aufgrund des in der Literatur beschriebenen Vererbungsmodus der HypoPP vergeben (GRUFFYDD-JONES 1997, STOLZE *et al.* 2001). Bei Unterstellung eines rezessiven Erbgangs war das Probenmaterial für die Durchführung der Assoziationsanalyse ausreichend. Von den sieben erkrankten Tieren sind Proben der Elterntiere vorhanden. Auch steht DNA der Vollgeschwister von sechs betroffenen Tieren zur Verfügung. Insgesamt konnten innerhalb des Pedigrees mehrere Generationen inklusive Voll- und Halbgeschwistern beobachtet werden. Ein von HypoPP betroffener Kater wurde zur Zucht eingesetzt, da die Symptome erstmals nach Einsetzen der Zuchtreife auftraten. Von dem aus dieser Anpaarung entstandenen Nachkommen konnte auch DNA-Material untersucht werden. Genetische Polymorphismen auf DNA-Ebene können im Stammbaum über ihre Segregation verfolgt und ihre Assoziation mit dem untersuchten Phänotyp analysiert werden (MASON 1988).

Für statistische Rückschlüsse auf den Erbgang jedoch umfasste der Katzenstammbaum zu geringe Individuenzahlen. Eine Ableitung des Erbgangs aufgrund der Häufigkeiten der nach den Mendelschen Gesetzen zu erwartenden Phänotypen war daher nicht möglich (DAVIDSON *et al.* 2004, TRYON *et al.* 2005). Für statistische Analysen benötigt man mehr informative Nachkommen bzw. mehr Anpaarungen mit von

HypoPP betroffenen Wurfen. Besonders aussagekräftig zur Bestimmung des Erbgangs sind gezielte Testkreuzungen mit Merkmalsträgern (ERHARDT 2005). Im vorliegenden Stammbaum wurde im Sinne des Tierschutzes und der Zuchthygiene mit betroffenen Tieren und den Vollgeschwistern in der Regel nicht weitergezüchtet. Gerade diese Anpaarungen aber würden statistische Auswertungen des Erbgangs und eine größere Sicherheit in der Bestimmung der genetischen Ausstattung zulassen. Die Durchführung von Tierversuchen mit gezielten Anpaarungen zwischen Merkmalsträgern unter Laborbedingungen würden weitere Untersuchungen vor allem in funktionellen Bereichen ermöglichen. So könnten dann z. B. Muskelbiopsien während eines akuten Anfalls entnommen werden, die zur Untersuchung der Expression verschiedener Gene oder zur Überprüfung der Funktion verschiedener Muskelkanäle mittels *Patch-clamp*-Technik verwendet werden könnten (LERCHE *et al.* 1996, HARRIS *et al.* 2005, VICART *et al.* 2005).

6.1.2 Erbgang der HypoPP der Katze

Im vorliegenden Familienmaterial konnte durch Ausschluss anderer Vererbungsmodi ein autosomal-rezessiver Erbgang der HypoPP der Burmakatze konstruiert werden. Nur unter der Annahme des autosomal-rezessiven Erbgangs konnten im untersuchten Stammbaum Merkmals- und Anlagetragger identifiziert und die hypothetische Weitergabe eines krankheitsverursachenden Allels nachvollzogen werden. Bedingt durch die Zuchtgeschichte sowie aktuelle Zuchtpraktiken ist der Grad der Inzucht innerhalb der Burmapopulation relativ hoch (GRUFFYDD-JONES 1996). Auch im untersuchten Pedigree wurden Anpaarungen zwischen verwandten Tieren 1. und 2. Grades vollzogen, so dass die Verwandtschaftsgrade nach TIER (1990) Werte bis zu 0,64 aufweisen. Die Inzuchtkoeffizienten der untersuchten 64 Tiere lagen zwischen 0,0 und 0,136. Im Allgemeinen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung durch Inzucht, da in diesen Fällen auch die Wahrscheinlichkeit für die Homozygotie eines krankheitsverursachenden Allels erhöht wird (MENSINK & HAND 2006). Auch schloss MASON (1988) anhand von Beobachtungen bei Pedigreeanalysen entsprechend den Mendelschen Gesetzen auf einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus. In allen anderen Veröffentlichungen wurde diese Beobachtung von MASON (1988) übernommen, wobei viele Autoren diesen Erbgang durch eigenen Erfahrungen und Beobachtungen bestätigen (JONES *et al.* 1988, EDWARDS & BELFORD 1995, SHELL 1995, GRUFFYDD-JONES 1996, GRUFFYDD-JONES *et al.* 1996, GRUFFYDD-JONES 1997, LANTINGA *et al.*

1998, PHILLIPS & POLZIN 1998, TAYLOR 2000, STOLZE *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu wurde für die heterogene HypoPP des Menschen ein autosomal-dominanter Vererbungsmodus mit unterschiedlicher Expressivität bzw. Penetranz belegt (ROPERS & SZLIWOWSKI 1979, JURKAT-ROTT *et al.* 1994, SILLEN *et al.* 1997, BULMAN *et al.* 1999).

6.2 Charakterisierung des feline *CACNAIS*

6.2.1 Auswahl als Kandidatengen der HypoPP

Aufgrund der zahlreichen Analogien des Krankheitsbildes wurde die Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP, auch HOKPP) des Menschen in der vorliegenden Arbeit als Modell für die HypoPP der Burmakatze herangezogen. Als Ursache für die heterogene HypoPP des Menschen konnten verschiedene Mutationen in Genen von spannungsabhängigen Ionenkanälen identifiziert werden (JURKAT-ROTT *et al.* 1994, PTACEK *et al.* 1994, BULMAN *et al.* 1999, JURKAT-ROTT *et al.* 2000, SUGIURA *et al.* 2000, ABBOTT *et al.* 2001, DAVIES *et al.* 2001). Anhand der Situation beim Menschen wurde die Arbeitshypothese abgeleitet, dass auch bei der Katze Mutationen auf den jeweiligen homologen Genen am Krankheitsgeschehen beteiligt sind. Als funktionelles Kandidatengen wurde das *CACNAIS*-Gen der *alpha*-Untereinheit des Dihydropyridin-sensitiven Calciumionenkanals ausgewählt.

Für den Vergleich der mRNA-Sequenzen oder der Expression des *CACNAIS* zwischen von HypoPP betroffenen und gesunden Katzen standen der Untersuchung keine geeigneten Proben zur Verfügung. Da das *CACNAIS*-Gen vorrangig in der Skelettmuskulatur exprimiert wird, wären Muskelbiopsie für diese Analysen notwendig gewesen. Da diese aber eine Belastung für das Tier darstellen, konnten von den Besitzern der Burmakatzen nur Blutproben eingeworben werden. Im Blut kann die mRNA des *CACNAIS* bei der Katze jedoch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der genomischen Größe dieses Gens von geschätzten 90 Kilobasenpaaren wurden keine vollständigen Vergleiche von Gensequenzen auf DNA-Ebene durchgeführt, sondern in ausgewählten Bereichen der DNA des *CACNAIS* Polymorphismen zur Verwendung als genetische Marker identifiziert. Bei den Katzen wurden jene Genabschnitte sequenziert, analysiert und verglichen, in denen zuvor beim Menschen genetische Polymorphismen identifiziert wurden. Diese Auswahl sollte die Aufdeckung genetischer Varianz durch Einbeziehung möglicher *hot spots* von Mutationen

sicherstellen. Als Krankheitsursachen für die HypoPP des Menschen wurden die *missense* Mutationen Arg528His, Arg1239His und Arg1239Gly in den Transmembransegmenten IIS4 und IVS4 identifiziert (JURKAT-ROTT *et al.* 1994, PTACEK *et al.* 1994a). Analog zur Position dieser Mutationen wurden bei der Katze auf genomischer Ebene die Fragmente Exon11 und Exon30 bis Exon31 analysiert. Da im Exon 11 der Katze keine Polymorphismen zwischen den zur vergleichenden Sequenzierung eingesetzten Burmakatzen nachgewiesen werden konnten, wurde für weitere Analysen das Fragment Exon9 bis Exon10 verwendet. Zudem wurden von CARSANA *et al.* (2003) im *CACNAIS*-Gen des Menschen in Exon 18, Exon 37, Exon 44 und Intron 36 vier *single nucleotid polymorphisms* (SNPs) beschrieben. Basierend auf diesen Informationen wurden auch bei der Katze Fragmente aus diesen Bereichen amplifiziert und analysiert. Da in Exon 18 der Katze keine genetische Variation auftrat, wurde das Fragment erweitert zu Exon17 bis Exon19. Mit dem Fragment Exon36 bis Exon38 wurde auch das Intron 36 erfasst. Das Fragment Exon44 bis 3'UTR deckt den C-Terminus des Gens ab. Aus den Polymorphismen dieser Fragmente wurden ein Mikrosatellit und vier SNPs als genetische Marker ausgewählt und charakterisiert. Neben der Auswahl dieser Abschnitte aufgrund beschriebener genetischer Variabilität beim Menschen war auch ihre physikalische Verteilung auf genomischer Ebene entscheidend. Durch die entsprechend höheren Kosten war das feline Homolog für eine vollständige Analyse zu groß. Daher sollten über seine gesamte Länge verteilte Polymorphismen analysiert werden. Wenn die HypoPP der Burmakatze durch Mutationen innerhalb des *CACNAIS*-Gens verursacht wird, die nicht bei der vergleichenden Sequenzierung entdeckt werden, so können jedoch Assoziationen zwischen Polymorphismen und dem untersuchten Merkmal HypoPP nachgewiesen werden. Durch die genetische Kopplung von indirekten Markern und ursächlicher Mutation werden im Sinne einer Feinkartierung des Gens Hinweise auf die physikalische Position gewonnen (COOPER *et al.* 2006, LYONS *et al.* 2006).

6.2.2 Vergleich des *CACNAIS* bei Mensch und Katze

Der hohe Konservierungsgrad der Genome von Mensch und Katze wurde in verschiedenen Studien beobachtet (RETTENBERGER *et al.* 1995, WIENBERG & STANYON 1997). Dabei sind in beiden Spezies ganze Reihen von orthologen Genen auf einzelnen Chromosomen lokalisiert (O'BRIEN & NASH 1982, O'BRIEN *et al.* 1997b). Auch MURPHY *et al.* (2000) wiesen durch Vergleiche der RH-Karten von Mensch und Katze ganze Kopplungsarrangements von Genen (=Syntänien) nach.

Sogar die relative Anordnung der Gene auf Chromosomen scheint zwischen Mensch und Katze erhalten geblieben zu sein (MURPHY *et al.* 1999). Der q-Arm des humanen Chromosoms HSA1 erwies sich als homolog zum felinen Chromosom F1. An der Position HSA 1q32 ist das Gen für die *alpha*-Untereinheit des Dihydropyrimidin-sensitiven Ca^{2+} -Kanals (*CACNAIS*) lokalisiert (GREGG *et al.* 1993, ILES *et al.* 1994). Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit das *CACNAIS*-Gen der Katze physikalisch mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) auf dem felinen Chromosom F1q22 kartiert. Auf diesem Chromosom konnte das Gen zusätzlich durch den intragenen Mikrosatelliten *GIKA001* genetisch kartiert werden (KLEIN *et al.* 2006b). Die physische Kartierung bestätigt auch die Ergebnisse der vergleichenden Kartierung des menschlichen Chromosoms HSA1 durch Murphy *et al.* (2003), der Homologien zu felinen Chromosomen bzw. -abschnitten C1, F1 und D2 belegen konnte.

Das gesamte humane *CACNAIS*-Gen umfasst nach HOGAN *et al.* (1996) auf genomischer Ebene etwa 90 Kilobasenpaare und ist in 44 Exons strukturiert. Von der genomischen Sequenz der Katze wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere DNA-Fragmente analysiert, von denen fünf vollständige Introns und Exons beinhalten. Im Vergleich mit den homologen *CACNAIS*-Abschnitten des Menschen zeigt sich in den analysierten Fragmenten eine starke Konservierung der genomischen Struktur, die sich besonders in den Exongrößen widerspiegelt. Die Exons von Mensch und Katze umfassen 66 bis 252 Basenpaare und sind in beiden Spezies gleich groß. Die Introns wiesen Größen von 157 bis 1972 Basenpaaren auf, die Varianz in der Größe zwischen Mensch und Katze ist zum Teil erheblich. In den analysierten Abschnitten wurden die Exon-Intron-Grenzen durch das Alignment von feliner mRNA und DNA bestimmt. Die dadurch ermittelten Sequenzen der *splice sites* sind zwischen Katze und Mensch durch die starke Konservierung der Gene bis auf den Übergang von Intron9 zu Exon10 identisch. Dabei weichen die Erkennungsstellen von der GT-AG-Regel ab (LEWIN 1998c). Bei Mensch und Katze treten als *splice acceptor* die Nukleotide GT und AA und als *splice donor* die Nukleotide CC, AG, AT und GC auf.

Durch die vorliegende Arbeit konnte die mRNA-Sequenz des felinen *CACNAIS* erstmalig charakterisiert und in die Datenbanken des NCBI unter der Accession Nummer DQ128075 eingetragen werden. Bei der Katze umfasst die prozessierte mRNA dieses Gens 6070 Basen mit einem offenen Leserahmen (*open reading frame*, *ORF*) von 5613 Basen. Die mRNA des *CACNAIS*-Gens des Menschen (Accession Nummer NM_000069) besteht aus 6168 Basen, von denen 5621 Basen den *open reading frame* bilden. Die Sequenz ist mit einer Übereinstimmung von 89 % zwischen

Katze und Mensch hoch konserviert. Der wesentlichste Unterschied wird durch das verlängerte 5' Ende der mRNA des Menschen von 105 Basen am Transkriptionsstart geprägt. Zudem enthält die mRNA der Katze im Vergleich zur mRNA des Menschen zwei Deletionen und eine Insertion außerhalb des offenen Leserahmens. Die aus der mRNA resultierende Primärsequenz der Proteine umfasst 1873 Aminosäuren beim Mensch bzw. 1871 Aminosäuren bei der Katze. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen konnte sogar eine Übereinstimmung zwischen beiden Fragmenten von 92 % festgestellt werden. Die hohe Konservierung der Sequenzen funktionaler Ionenkanäle konnte auch durch den Vergleich der mRNA-Sequenzen verschiedener Spezies belegt werden. Die Schätzung der Distanzen zwischen mRNA-Sequenzen von *alpha*-Untereinheiten verschiedener spannungsabhängiger Calciumkanälen (L-, N- und P/Q-Typ) zeigte, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Kanaltypen größer sind als die Unterschiede zwischen den Spezies. Auch TSENG *et al.* (2006) konnten diese Konservierung zwischen Spezies anhand der Proteinsequenzen verschiedener *alpha-2*-Untereinheiten spannungsabhängiger Calciumkanäle identifizieren. Funktionale Konservierungen der Ionenkanäle bestehen sogar zwischen Nesseltieren (*Cnidaria*) und Säugetieren (JEZIORSKI *et al.* 1999) sowie Fruchtliegen und Säugetieren (GANETZKY 2000). Insbesondere in den Transmembransegmenten der spannungsabhängigen und kanalformenden Untereinheiten der Calcium-, Natrium- und Kaliumkanäle konnten durch die Arbeiten von GUDA *et al.* (2007) konservierte Motive nachgewiesen werden. Nach HILLE (1989) sind die Calciumkanäle wahrscheinlich während der Evolution der Eukaryoten aus Kaliumkanälen hervorgegangen. Gen- und Chromosomenduplikationen haben dann zur Entstehung verschiedener Kanäle innerhalb der Genfamilien geführt (GOLDIN 2002).

Zur Untersuchung des Expressionsmusters des felinen *CACNAIS* wurden analog zu den Arbeiten von DONAHUE *et al.* (2000) und FAN *et al.* (2000) die relativen Gesamt-RNA-Mengen für die PCR nach Normalisierung anhand des mRNA-Levels von *GAPDH* bestimmt. Das *housekeeping*-Gen *GAPDH* ist eines der am höchsten exprimierten Gene (HSIAO *et al.* 2001). Die mRNA des *CACNAIS* wurde wie erwartet im Skelettmuskel nachgewiesen. In Gehirn, Niere und Milz konnte aber auch die Expression des Gens im Verhältnis zu *GAPDH* in geringeren Mengen mit 30 bzw. 33 PCR-Zyklen belegt werden. Beim Menschen konnte die Expression von *CACNAID* in Gehirn, Pankreas, Niere und Ovar und die Expression von drei Spleißvarianten des *CACNAIC* in Herz, glatter Muskulatur, Gehirn, Hypophyse und Nebennieren nachgewiesen werden (TANABE *et al.* 1987, ERTEL *et al.* 2000). Somit werden Ionenkanäle beim Menschen wie auch der *CACNAIS* der Katze nicht nur

gewebsspezifisch exprimiert. So ist beispielsweise die RNA des kardären Natriumkanals *hH1/SCN5A* auch im Gehirn nachweisbar (DONAHUE *et al.* 2000).

6.2.3 Genetische Variabilität bei Katzen

Zur Bestimmung genetischer Variabilität wurden DNA-Sequenzen von Exon- und Intronabschnitten des *CACNAIS* über eine Länge von insgesamt 6579 Basenpaaren verglichen. In fünf Fragmenten konnten insgesamt 44 genetische Polymorphismen identifiziert werden. Im Vergleich zu den von unserer Arbeitsgruppe analysierten Abschnitten des felines *SCN4A*-Gen (KLEIN *et al.* 2006a) konnten somit ein auffällig höherer Grad an genetischer Variabilität des *CACNAIS*-Gens in den untersuchten Fragmenten nachgewiesen werden. Generell treten spontane Mutationen durchschnittlich mit einer Häufigkeit des Ereignisses von 10^{-5} bis 10^{-6} je Locus und Generation auf (LEWIN 1998a). Bei Mikrosatelliten des Menschen konnten durch Pedigreeanalysen eine Mutationsrate von 10^{-3} Ereignissen pro Genort und Generation geschätzt werden (HANCOCK 1999). Mikrosatelliten sind nach ELLEGREN *et al.* (1997) aufgrund des hohen Polymorphiegrads besonders geeignet, um Assoziationen zwischen bestimmten Allelen und Phänotypen nachzuweisen. Durch die Studien von MURPHY *et al.* (2007) wurden mittlerweile insgesamt 1793 genetische Marker der Katze kartiert. Zurzeit sind bei der Katze über 549 Mikrosatelliten bekannt (MURPHY *et al.* 2007). Analysen von Mikrosatelliten wurden bei der domestizierten Katze zur Erstellung genetischer Karten (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 2003b, MURPHY *et al.* 2007) und zur Kopplungsanalyse (COOPER *et al.* 2006, IMES *et al.* 2006) eingesetzt. In Relation zu anderen Tierarten wurden erst wenige genetische Populationsstudien innerhalb der Gattung *Felidae* (LECIS *et al.* 2006, LUO *et al.* 2007) und bei Wild- und Hauskatzen (DRISCOLL *et al.* 2002) durchgeführt. Zur Kontrolle der Abstammung einzelner Haus- und Wildkatzen (RANDI *et al.* 2001) und zur Individualisierung von Tigern (XU *et al.* 2005) und Großkatzen (SINGH *et al.* 2004) konnten Mikrosatelliten erfolgreich verwendet werden. Zur Tieridentifikation auch für forensische Zwecke ist ein von MENOTTI-RAYMOND *et al.* (2005) evaluiertes Reaktionskit für amerikanische Katzen kommerziell erhältlich. Nach SALETTI *et al.* (2001) tritt durchschnittlich alle 50 bis 100 Kilobasenpaare ein Mikrosatellit im Genom auf. Beim felines *CACNAIS*-Gen aus etwa 90 Kilobasenpaar war somit das Vorkommen eines Mikrosatelliten innerhalb des Gens oder in flankierenden Bereichen voraussehbar. Folgerichtig wurde im Intron9 des *CACNAIS* der Mikrosatellit *GIKA001* mit einem (AC)_n-Motiv identifiziert und unter der Accession Nummer DQ057981 in die

Datenbanken des NCBI eingetragen. Auch innerhalb des *CACNA1S* des Menschen konnte von GREGG *et al.* (1993) ein Mikrosatellit (Accession Nummer M87485) nachgewiesen werden. Der Mikrosatellit *GIKA001* war mit neun Allelen aus 146 bis 164 Basenpaaren bzw. 22 Genotypen hoch polymorph. Innerhalb der Rasse Europäisch Kurzhaar traten 18, bei Perser 13 und bei Burma nur vier verschiedene Genotypen auf. Zwischen Allelfrequenzen der Kategorie Langhaarrasse im Vergleich sowohl mit der Kategorie Halblanghaar als auch mit der Kategorie Kurzhaar wurden mittels Fishers Exakt Test hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) festgestellt. Bei Perser- und Europäischen Kurzhaarkatzen wurde bei 73 % bzw. 79 % der Tiere ein heterozygoter Genotyp nachgewiesen. In dem für forensische Zwecke von MENOTTI-RAYMOND *et al.* (2005) entwickelten Typisierungssystem wurden gezielt polymorphe, hochgradig heterozygote Mikrosatelliten eingesetzt. In den einzelnen Markern konnten Heterozygotiegrade von 60 % bis 82 % beobachtet werden. Hingegen lagen die Heterozygotiegrade innerhalb der einzelnen Rassen bei durchschnittlich 71 % (57 % bis 83 %). In 11 untersuchten Genorten wiesen MENOTTI-RAYMOND *et al.* (2005) bei Perserkatzen ($n = 8$) einen Heterozygotiegrad von nur 51 % mit durchschnittlich 5 Allelen und bei amerikanischen Burmakatzen ($n = 8$) ein Heterozygotiegrad von 62 % mit durchschnittlich 4,7 Allelen nach. Im Vergleich zu diesen Werten ist auch der Mikrosatellit *GIKA001* durch die hohe Polymorphie und Heterozygotie für genetische Studien hervorragend geeignet. Innerhalb der untersuchten europäischen Burmakatzen konnten im Mikrosatelliten *GIKA001* nur vier Genotypen mit einem Heterozygotiegrad von 41 % charakterisiert werden. Hier haben sich die Allele 150 und 156 angereichert und somit auch zur Verringerung des Heterozygotiegrades geführt. Dieser Effekt kann durch die nahe Verwandtschaft der Tiere untereinander erklärt werden. Sowohl innerhalb der molekulargenetisch analysierten Burmakatzen als auch im gesamten Stammbaum wurden Verpaarungen zwischen Tieren 1. und 2. Grades vorgenommen. Nach DAVID (1998) und HANSSON & WESTERBERG (2002) führt Inzucht zu einem Verlust an Heterozygotie insbesondere bei Mikrosatelliten.

Da in der vorliegenden Arbeit verwendeten SNPs anhand der Ergebnisse der vergleichenden Sequenzierung von Burmakatzen ausgewählt wurden, sind innerhalb dieser Rasse in allen PCR-RFLPs beide Allele zu beobachten. Das jeweils häufiger vorkommende Allel ist auch deutlich häufiger bei den Tieren anderer Rassen zu beobachten. Die Häufigkeiten der Genotypen zwischen Burmesen und allen anderen Katzen unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$). Im SNP Exon44+188 beispielsweise wurden auch innerhalb der Burmakatzen alle Genotypen beobachtet, bis auf zwei

Siamkatzen (Genotyp TT) zeigten alle Tiere anderer Rassen den homozygoten Genotypen CC. Da Siamkatzen schon zur Begründung der Rasse Burma und immer wieder zur Minderung der Inzucht eingesetzt wurden, könnte sich dieser SNP auch bei weiteren Untersuchungen als rassetypisch für Burmesen und die nah-verwandten Siamesen erweisen. Anhand der SNPs konnten in 20 Subfamilien innerhalb der Burmakatzenfamilie und bei 61 weiteren Katzen insgesamt sieben Haplotypen geschätzt werden. Die beschriebenen SNPs können als Typisierungssysteme für verschiedene Katzenpopulationen verwendet werden. Da sie aber speziell für die Typisierung von nah verwandten Burmakatzen entwickelt wurden, müssen sie und insbesondere der SNP Exon44+188 abhängig von der Fragestellung und den zu typisierenden Katzen auf ausreichende Informativität geprüft werden. Mittels PCR-RFLPs konnten die SNPs sicher und einfach analysiert werden. Für Untersuchungen im Hochdurchsatz können zur Zeit- und Kostenreduzierung sondenspezifische PCRs im *Real-time Cycler* (5'Exonuklease-Assays = *TaqMan*-PCR) oder DNA-Arrays abgeleitet werden. Im Gegensatz zu hochpolymorphen Mikrosatelliten sind SNPs jedoch auf jeweils zwei Allele pro Locus beschränkt. Für Assoziationsanalysen muss daher eine ausreichend große Zahl an SNPs identifiziert und typisiert werden (GORDON *et al.* 2005). So wurden von HERRAEZA *et al.* (2005) in einer Rinderpopulation einerseits 17 Mikrosatelliten und andererseits 43 SNPs zur Erzielung vergleichbarer Ergebnisse eingesetzt. Veröffentlichungen zu auf SNP-basierenden DNA-Varianten bei Katzen beziehen sich neben der Erstellung von Genkarten (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 2003b, MURPHY *et al.* 2007) mit wenigen Ausnahmen wie etwa die Studien von GOULD & SARGAN (2002) und LUO *et al.* (2007) auf Mutationen, die mit einem bestimmten Phänotyp korreliert sind. So wurden laut den Angaben der Datenbank Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA, (www.angis.org.au/Databases/BIRX/omia, letzter Zugriff am 23. Juli 2007) bis heute ursächliche Mutationen für 15 Erbkrankheiten identifiziert. In den Arbeiten von MENOTTI-RAYMOND *et al.* (2003b) wurden DNA-Varianten in 255 Typ I-Loci zur genetischen Kartierung analysiert. Basierend auf SNPs in Introns von vier verschiedenen Genen sowie einem Mikrosatellit konnten LUO *et al.* (2007) ein Haplotypisierungssystem für das Y-Chromosom von sieben *Felidae* Arten entwickeln. Durch die vorliegende Arbeit konnte die Kenntnis über feline SNPs erweitert werden. Beim Menschen wurden bisher in der Datenbank des NCBI 11.870.024 humane SNPs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>, letzter Zugriff 23. Juli 2007) registriert. Im Zuge des Fortschritts der Erforschung des Katzensgenoms wird auch die Kenntnis über SNPs bei der Katze zunehmen.

6.3 Ausschluss des *CACNAIS* als Kandidatengen

Das *CACNAIS*-Gen wurde anhand des vergleichbaren Krankheitsbilds der HypoPP des Menschen als funktionelles Kandidatengen für die HypoPP der Burmakatze untersucht. Die beim Mensch beschriebenen *missense* Mutationen Arg528His, Arg1239His bzw. Arg1239Gly des *CACNAIS* beeinflussen die positive Ladung der Transmembransegmente IIS4 und IVS4, die an der Spannungsmessung der ionenführenden Pore beteiligt sind (JURKAT-ROTT *et al.* 1994, PTACEK *et al.* 1994a). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die diese Proteinabschnitte codierenden Bereiche des felinen *CACNAIS* der Katze über die Fragmente Exon11 und Exon30 bis Exon31 gezielt untersucht. In diesen drei codierenden Abschnitten konnten in den vergleichend sequenzierten Burmakatzen identische Sequenzen nachgewiesen werden. Auch an den von CARSANA *et al.* (2003) beschriebenen Nukleotidpositionen waren die Sequenzen der untersuchten Katzen identisch. Zur Durchführung einer Assoziationsanalyse in einer von HypoPP betroffenen Burmakatzenfamilie wurden intragene Polymorphismen nachgewiesen und als genetische Marker verwendet. Genetische Assoziationsstudien zur Aufklärung ursächlicher Polymorphismen in Populationen mit relevantem Phänotyp wurden in den letzten Jahren zunehmend durchgeführt (RISCH & MERIKANGAS 1996). Dabei können Assoziationsstudien als *whole genome scan* unter Einbeziehung über das gesamte Genom verteilter Marker, als Feinkartierungsstudien von zuvor identifizierten Regionen oder als Kandidatengenstudien durchgeführt werden (HALLDORSSON *et al.* 2004).

Zur Aufklärung des molekulargenetischen Hintergrundes der HypoPP der Burmakatze wurde der funktionelle Kandidatengenansatz verfolgt. Analog zu den Arbeiten von EIZIRIK *et al.* (2003), LYONS *et al.* (2004) und MEURS *et al.* (2005) wurde das funktionelle Kandidatengen *CACNAIS* zur Identifikation von genetischen Polymorphismen vergleichend sequenziert. Da in den analysierten Bereichen keine ursächlichen DNA-Varianten ermittelt werden konnten, wurden intragene Marker auf indirekte Assoziationen mit dem Merkmal HypoPP untersucht. Bei indirekten Assoziationsanalysen werden indirekte Marker untersucht, die mit der ursächlichen Mutation genetisch gekoppelt sind (HALLDORSSON *et al.* 2004). Zu diesem Zweck wurden bei Katzen einige Studien durchgeführt, wobei in der Regel Mikrosatelliten als genetische Marker eingesetzt wurden (YOUNG *et al.* 2005, COOPER *et al.* 2006, ISHIDA *et al.* 2006). Auf SNPs basierende indirekte Assoziationsanalysen wurden bisher kaum veröffentlicht. GOULD & SARGAN (2002) nutzen diese Strategie zur

Analyse funktioneller Kandidatengene für die retinale Dystrophie (Rdy). Beim Menschen hingegen werden mit SNPs erfolgreich auch genomweite Studien durchgeführt (BUCH *et al.* 2007). Allein im Review von HIRSCHHORN *et al.* (2002) werden 166 auf SNPs basierende Assoziationsanalysen beim Menschen besprochen.

Die als genetische Marker verwendeten vier SNPs und ein Mikrosatellit konnten bei allen DNA-Proben typisiert werden. Im analysierten Pedigree segregierten die einzelnen Allele nach den Mendelschen Gesetzen, jedoch nicht analog zum Phänotyp der HypoPP. Die Frequenzen der einzelnen Allele und Genotypen der genetischen Marker sowie der SNP-Haplotypen wurden zwischen den Burmakatzen der von HypoPP betroffenen Familie verschiedener Merkmalsklassen mit dem Fishers Exakt Test verglichen. Zwischen diesen Häufigkeiten bei von HypoPP betroffenen Tieren und klinisch symptomfreien Katzen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen ($p < 0,05$). Somit konnte eine Assoziation zwischen den fünf indirekten Markern und dem Merkmal HypoPP widerlegt werden. Die einzelnen Marker sind in den Intron9, Intron17, Intron31, Intron36 und Exon44 lokalisiert und repräsentieren das gesamte genomische *CACNAIS*-Gen. Durch die räumliche Nähe innerhalb des rund 90 Kilobasenpaare umfassenden Gens und der daraus resultierenden engen Kopplung können Assoziationen sicher erfasst bzw. widerlegt werden. In einer frühen Arbeit zur HypoPP des Menschen zum Beispiel untersuchten CASLEY *et al.* (1992) drei Kandidatengene inklusive des *SCN4A*, in denen Mutationen Störungen des Ionenflusses verursachen. Im experimentellen Pedigree konnten die Autoren mit einer Assoziationsanalyse keine genetische Kopplung zwischen den intragenen Markern und dem Phänotyp nachweisen und schlossen somit eine Beteiligung der untersuchten Gene sicher aus (CASLEY *et al.* 1992). GOULD & SARGAN (2002) leiteten funktionelle Kandidatengene für die autosomal-dominante retinale Dystrophie (Rdy) bei Abessinier-Katzen anhand der Situation des Menschen ab. Wie auch in der vorliegenden Arbeit wurden nach Identifizierung geeigneter Polymorphismen in den Genen *ROM1*, *PDE6G* und *RHO* genetische Marker in betroffenen und gesunden Katzen charakterisiert. In der nachfolgenden Segregationsanalyse zeigte sich, dass die Ausprägung der genetischen Marker diskordant zum Rdy-Status war und eine Beteiligung der Kandidatengene verworfen werden konnte (GOULD & SARGAN 2002).

Die Untersuchung funktioneller Kandidatengene ist ein klassischer Ansatz zur Klärung der Ätiologie bei Erbkrankheiten. Eine Beteiligung des untersuchten Gens am Krankheitsgeschehen wird dann ausgeschlossen, wenn keine genetische Kopplung zum Merkmal nachweisbar ist. In diesem Fall segregieren genetische Polymorphismen

auch nicht analog zum Phänotyp im Probenmaterial (DEKOMIEN & EPPLEN 2003, BANNASCH *et al.* 2004, SAFRA *et al.* 2005, YOUNG *et al.* 2006a, YOUNG *et al.* 2006b). Durch die Widerlegung einer Assoziation zwischen dem Phänotyp HypoPP und den Allelen von fünf intragenen Markern konnte in der vorliegende Arbeit eine Beteiligung des felines *CACNA1S* am Krankheitsgeschehen der HypoPP der Burmakatze in der untersuchten Katzenfamilie ausgeschlossen werden.

6.4 Methoden zur Klärung der Krankheitsursache

6.4.1 Untersuchung funktioneller Kandidatengene

Zur Aufklärung des molekulargenetischen Hintergrundes der HypoPP der Burmakatze wurde der funktionelle Kandidatengenansatz verfolgt. Aufgrund der Analogien zum Krankheitsbild der HypoPP des Menschen wurde die Arbeitshypothese abgeleitet, dass auch bei der Katze Mutationen auf homologen Genen an der Pathogenese beteiligt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das feline *CACNA1S* der Katze als funktionelles Kandidatengen der HypoPP der Burmakatze charakterisiert. Seine Beteiligung am Krankheitsgeschehen konnte im untersuchten Pedigree sicher ausgeschlossen werden. Zur weiteren Klärung und zur Vervollständigung des Kandidatengenansatzes müssen daher die Kandidatengene *KCNE3* und *SCN4A* analysiert werden. Das *KCNE3*-Gen codiert das *Mink related peptid 2 (MiRP2)*, das als akzessorische *beta*-Untereinheit die Eigenschaften des Kaliumkanals beeinflusst. Die von ABBOTT *et al.* (2001) identifizierte Mutation im Gen *KCNE3* wird von anderen Autoren als Krankheitsursache für die HypoPP des Menschen ausgeschlossen (STERNBERG *et al.* 2003, JURKAT-ROTT & LEHMANN-HORN 2004). Eine Beteiligung an der felines HypoPP erscheint daher auch weniger wahrscheinlich als Mutationen in *CACNA1S* oder *SCN4A*. Durch Sequenzanalysen des gesamten codierenden Bereiches des felines *KCNE3* konnten keine Polymorphismen identifiziert werden (PRINZENBERG 2005). Das *SCN4A*-Gen codiert die ionenführende *alpha*-Untereinheit des muskulären spannungsabhängigen Natriumkanals. Das Protein wird analog zum *CACNA1S* aus vier Domänen mit sechs Transmembransegmenten gebildet. Beim Mensch sind vier für die humane HypoPP ursächliche Mutationen in diesem Gen beschrieben (BULMAN *et al.* 1999, JURKAT-ROTT *et al.* 2000, DAVIES *et al.* 2001). Zudem sind Mutationen innerhalb dieses Gens verantwortlich für *Paramyotonia congenita* (PMC; Eulenburg), Kalium-

verstärkte Myotonien und die Hyperkaliämische Periodische Paralyse (HyPP) bei Pferd und Mensch (MCCLATCHEY *et al.* 1992b, PTACEK *et al.* 1992, RUDOLPH *et al.* 1992, PTACEK *et al.* 1994b, ORRELL *et al.* 1998, VICART *et al.* 2005). Daher wurden analog zur Charakterisierung des *CACNA1S* mehrere genomische Fragmente des *SCN4A* mittels PCR isoliert und bei Katzen aus dem Pedigree vergleichend sequenziert (KLEIN *et al.* 2006a). Die *hot spots* des Menschen befinden sich in Exon13 und Exon14, welche das Transmembransegment IIS4 codieren. An diesen Stellen sind die Nukleotidsequenzen von HypoPP betroffenen und gesunden Katzen identisch. Der von der Arbeitsgruppe mittels PCR-RFLP analysierte SNP in Intron21 ist nicht mit dem Merkmal assoziiert (KLEIN *et al.* 2006a). Generell ist die genetische Variabilität dieses Gens im untersuchten Familienmaterial auffällig niedriger als das durch zahlreiche Intron-Polymorphismen gekennzeichnete *CACNA1S*. Auch die Sequenzanalysen von GRUFFYD-JONES & LEHMANN-HORN (2002) konnten keine assoziierten Polymorphismen bei von HypoPP betroffenen Katzen entdecken. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann daher auch dieses Gen als Krankheitsursache für die HypoPP der Burmakatze ausgeschlossen werden (KLEIN *et al.* 2006a).

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum *CACNA1S* sowie den Analysen des *KCNE3* (PRINZENBERG 2005) und des *SCN4A* (KLEIN *et al.* 2006a) kann die zugrunde liegende Arbeitshypothese höchstwahrscheinlich verworfen werden. An der Entstehung der HypoPP der Burmakatze sind im untersuchten Pedigree die beim Menschen identifizierten Gene nicht beteiligt. Im vorliegenden Fall müssen andere molekulare Ursachen verantwortlich sein, die vermutlich auch zu den Abweichungen zwischen den Krankheitsbildern bei Katze und Mensch wie Kreatinkinasegehalt im Blut und vor allem Vererbungsmodus führen. Somit stellt auch die HypoPP der Burmakatze derzeit kein Tiermodell zur Erforschung der humanen HypoPP dar. Zur Klärung der Krankheitsursache könnten Analysen von weiteren funktionellen Genen durchgeführt werden. Funktionelle Kandidaten wären dann aber alle Gene, die in den Ionenaustausch in Muskelzellen sowie die Erregungs-Kontraktions-Kopplung involviert sind oder als regulatorische Elemente an der Expression eben dieser Gene beteiligt sind. Durch die Sequenzierung des Genoms der Katze durch die Agencourt[®] Biosciences Corporation (Beverly, Massachusetts) und dem Broad Institut of MIT and Harvard (Cambridge, Massachusetts) in Kombination mit homologen Gensequenzen vom Menschen können diese Gene heutzutage relativ einfach isoliert werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, können dann durch die vergleichende Sequenzierung zwischen einzelnen Katzen genetische Polymorphismen aufdeckt werden. Diese können dann als genetische Marker verwendet werden, um direkte oder indirekte

Assoziationen zwischen Genotyp und Phänotyp nachzuweisen. Da hierbei aber unsystematisch eine relativ große Zahl von Genen analysiert werden müsste, sollte im Fall der HypoPP methodisch zunächst der Markeransatz zur Lokalisierung positioneller Kandidatengene verwendet werden.

6.4.2 Identifizierung positioneller Kandidatengene durch Marker

Beim Markeransatz werden regionale oder genomweite Assoziationsstudien durchgeführt, bei denen hypothesenfrei nach Kopplungen zwischen DNA-Regionen und den untersuchten Krankheiten gesucht wird. Dieses indirekte Verfahren war lange Zeit durch die Typisierung einer ausreichenden Anzahl informativer Marker bei genügend Individuen sehr aufwändig (GÖDDE *et al.* 2006). Durch moderne Hochdurchsatzverfahren bei der Typisierung von genetischen Markern bzw. durch die Verwendung von DNA-Chips (*Microarrays*) können Typisierungsergebnisse immer schneller erzielt und verarbeitet werden (LEEB 2005). Gerade bei der Analyse von komplexen Erkrankungen oder quantitativ vererbten Merkmalen wurden mit Hilfe des Markeransatzes große Erfolge erzielt (GELDERMANN 1996). Voraussetzung für die Durchführung sind ausreichend hohe Anzahl und Dichte von genetisch kartierten DNA-Markern (GELDERMANN 1996). Als Marker dienen polymorphe Mikrosatelliten bzw. SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). SNPs sind die am häufigsten im Genom auftretenden DNA-Variationen und daher als Genmarker für eine enge Eingrenzung der für die Krankheitsentstehung verantwortlichen DNA-Varianten von großer Bedeutung (WANG *et al.* 2007). Markeransätze zur Identifizierung und Kartierung von *quantitative trait loci* (QTL) spielen insbesondere in der Tier- und Pflanzenzucht eine große Rolle bei der Aufdeckung von züchterisch interessanten Genregionen (SEATON *et al.* 2002).

Bei der Katze hat sich innerhalb der letzten Jahre durch die Arbeiten der Arbeitsgruppe um Stephen J. O'Brien die Zahl der bekannten publizierten Marker auf 1793 vervielfacht (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 1999, MURPHY *et al.* 2007). Mit Hilfe dieser hoch qualitativen Genkarten in Kombination mit segregierenden Katzenpedigrees können erbliche Merkmale sehr gut verfolgt und interpretiert werden. Einige Autoren konnten daher in den letzten Jahren schon bei Katzen Assoziationsanalysen zur Identifizierung positioneller Kandidatengene erfolgreich einsetzen. So identifizierten GRAHN *et al.* (2005) eine 14 cM Region nahe des Centromers des X-Chromosoms, die mit dem Auftreten der orangen Fellfarbe assoziiert ist. Die weiße Fleckung wird nach Analysen durch COOPER *et al.* (2006)

von einem Genort auf dem feline Chromosom B1 beeinflusst. Durch eine Kopplungsanalyse von Mikrosatelliten in einem Pedigree von Katzen mit verdünnter Fellfarbe (*dilute*) konnten ISHIDA *et al.* (2006) die Assoziation zum Chromosom C1 nachweisen. Durch weiterführende Studien wurde nach der Feinkartierung dieses Chromosoms das Melanophilin-Gen (*MLPH*) als Kandidatengen analysiert und eine den Phänotyp verursachende *missense* Mutation identifiziert (ISHIDA *et al.* 2006).

Auch im Fall der HypoPP der Burmakatze wird die Durchführung des Markeransatzes sicher und solide zur Identifizierung positioneller Kandidaten führen. Entscheidend ist die Auswahl geeigneter genetischer Marker. Durch die hohen Verwandtschaftsgrade im zur Verfügung stehenden Familienmaterial ist die genetische Variabilität zum Teil so eingeschränkt, dass einige der bisher typisierten Mikrosatelliten als nicht informativ unberücksichtigt bleiben mussten (PRINZENBERG *et al.* 2006).

7 Zusammenfassung

Die Hypokaliämische Periodische Paralyse (HypoPP) der Burmakatze ist eine durch generalisierte Muskelschwächen gekennzeichnete, anfallartig auftretende Erbkrankheit. Die Klärung des ursächlichen Gendefekts bei der Burmakatze und die Entwicklung eines Gentests sind wichtige Voraussetzungen, um betroffene Tiere sowie Anlageträger frühzeitig erkennen und von der Zucht ausschließen zu können. Durch die vorliegende Arbeit sollte die *alpha*-Untereinheit des muskulären Dihydropyridin-sensitiven spannungsabhängigen Calciumionenkanals (*CACNA1S*) der Katze molekulargenetisch charakterisiert werden. Mittels Assoziationsanalyse wurde eine Beteiligung dieses funktionellen Kandidatengens am Krankheitsgeschehen bei einer von HypoPP betroffenen Burmakatzenfamilie abgeklärt.

Durch Ableitung unspezifischer Primer anhand konservierter Bereiche der Gensequenzen anderer Spezies und *Primerwalking* konnte die mRNA des *CACNA1S* mittels *two-step* RT-PCR und SMART-RACE amplifiziert und isoliert werden. Durch direkte Sequenzierung wurde die vollständige Nukleotidsequenz der mRNA des felinen *CACNA1S* erstmals ermittelt und in den Datenbanken des NCBI unter der Accession Nummer DQ128075 eingetragen. Diese Sequenz ist mit einer Identität von 89 % zur mRNA-Sequenz des Menschen hochgradig konserviert. Die hohe Konservierung der Sequenzen funktionaler Ionenkanäle konnte auch durch die Schätzung der Distanzen zwischen mRNA-Sequenzen verschiedener Spezies belegt werden. Durch semi-quantitative Expressionsanalysen an *postmortem* entnommenen Gewebeproben von Gehirn, Herz, Uterus, Skelettmuskulatur, Lunge, Leber, Niere, Milz und Vollblut wurde das Expressionsmuster des felinen *CACNA1S* untersucht. Die mRNA konnte in Skelettmuskulatur, aber auch in Gehirn, Niere und Milz nachgewiesen werden. Da im Blut keine Expression des *CACNA1S* erfolgt, wurden zu weiteren Charakterisierung des Gens genomische DNA als Probenmaterial verwendet. Für diese Analysen standen insgesamt 208 DNA-Proben von Katzen verschiedener Rassen zur Verfügung. Im Mittelpunkt der Untersuchung standen DNA-Proben von 64 zu einer von HypoPP betroffenen Familie gehörenden Burmakatzen, die auf genetische Polymorphismen im Zusammenhang mit dem Auftreten der HypoPP untersucht wurden. Beobachtungen über den Status der HypoPP beim jeweiligen Tier wurden von den Tierbesitzern bzw. Züchtern angegeben. Insgesamt waren sieben Tiere von HypoPP betroffen. Drei Proben aus dieser Familie und eine DNA-Probe einer Europäischen Kurzhaarkatze wurden zur Identifikation der Sequenz von fünf genomischen Abschnitten des *CACNA1S* sowie die vergleichende Sequenzierung zur

Suche nach DNA-Varianten verwendet. Primer für die Amplifikation genomischer Fragmente konnten anhand der Sequenz der mRNA abgeleitet werden. Eines dieser DNA-Amplifikate (Accession Nummer DQ128065) wurde als Sonde zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) in Chromosomenpräparaten eingesetzt. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte das *CACNA1S*-Gen der Katze physikalisch auf dem feline Chromosom F1q22 kartiert werden.

Durch die vergleichende Sequenzierung von fünf Amplifikaten der genomischen DNA von Exon- und Intronabschnitten des *CACNA1S* über eine Länge von zusammen 6462 Basenpaaren konnten insgesamt 44 genetische Polymorphismen identifiziert werden. In den Intronabschnitten Intron9, Intron17, Intron30, Intron31 und Intron36 und der 3'-untranslatierten Region des *CACNA1S*-Gens wurden 29 Transitionen und sieben Transversionen charakterisiert. Im Intron30 konnte die Deletion eines Cytosins und im Intron31 die Insertion von vier Basen gezeigt werden. In den Exonabschnitten Exon10, Exon18 und Exon44 wurden fünf Transitionen bei den analysierten Burmakatzen nachgewiesen, die jedoch als stille Mutationen keine Auswirkung auf die resultierende Aminosäuresequenz haben. Ein Mikrosatellit mit (AC)_n-Motiv wurde in Exon9 dokumentiert. Für den Mikrosatelliten *GIKA001* sowie die vier SNPs Intron17+46, Intron31+185, Intron36+482 und Exon44+188 wurden Nachweisverfahren durch die Fragmentlängenanalyse im DNA-Sequenzierautomat bzw. PCR-RFLPs entwickelt. Die Typisierung des Mikrosatelliten *GIKA001* erfolgte bei 208 DNA-Proben. Im gesamten Probenmaterial konnten neun Allele aus 146 bis 164 Basenpaaren nachgewiesen werden, die durch 17- bis 26fache Wiederholungen des Mikrosatellitenmotivs entstehen. In den untersuchten Katzen-DNAs dominieren die Allele 150 und 156. Zwischen den Allelfrequenzen bei Katzen der Kategorie Langhaarrasse im Vergleich sowohl mit Tieren der Kategorie Halblanghaar als auch der Kategorie Kurzhaar wurden mittels Fishers Exakt Test hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) festgestellt. Von den insgesamt 22 verschiedenen Genotypen des *GIKA001* traten bei der Rasse Europäisch Kurzhaar 18, bei Perser 13 und bei Burma nur vier verschiedene Genotypen auf. Bei den Burmakatzen konnten durch die Darstellung der SNPs mittels PCR-RFLPs jeweils beide Allele und drei Genotypen nachgewiesen werden. Bei Tieren anderer Rassen waren in den SNPs Intron31+185, Intron36+482 und Intron17+46 jeweils ein bestimmtes Allel dominierend. Im Exon44+188 trat der SNP nur bei Burma- und zwei Siamkatzen auf. Daher unterschieden sich die Häufigkeiten der SNP-Genotypen zwischen Burmesen und allen anderen Katzen auch signifikant ($p < 0,05$). Anhand der SNPs konnten in 20 Subfamilien innerhalb der Burmakatzenfamilie und bei 61 weiteren Katzen insgesamt

sieben Haplotypen geschätzt werden. Bei Burmakatzen wurden die Haplotypen CCCC, TCCT und CATC und bei Tieren anderer Rassen die Haplotypen CCTC, TCTC, TCTT, CACC und CATC sicher identifiziert. Die Ergebnisse der Typisierungen der Tiere der betroffenen Katzenfamilie und zwei unverwandten Burmakatzen wurden in der Assoziationsanalyse zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Häufigkeit der Ausprägung der analysierten genetischen Marker und dem Merkmal HypoPP eingesetzt. Hierbei wurden die Frequenzen der einzelnen Allele der genetischen Marker *GIKA001*, Intron17+46, Intron31+185, Intron36+482 und Exon44+188 sowie der SNP-Haplotypen zwischen den Burmakatzen verschiedener Merkmalsklassen nach zwei Modellen mit dem Fishers Exakt Test verglichen. Im ersten Modell wurden die Merkmale in „klinische Symptome“ und „symptomfrei“ unterschieden. Im zweiten Modell wurden unter Annahme eines autosomal-rezessiven Erbgangs der HypoPP vier Klassen („HypoPP betroffen“, „Anlageträger“, „potentieller Anlageträger“, „unbekannt“) gebildet. Zwischen den Häufigkeiten bestimmter Allele bei von HypoPP betroffenen Tieren und klinisch symptomfreien Katzen waren mit dem Fishers Exakt Test keine signifikanten Unterschiede festzustellen ($p > 0,05$). Ein Zusammenhang zwischen den analysierten intragenen Markern des *CACNAIS*-Gens und dem Auftreten des Erbdefekts konnte unter den gegebenen Umständen verworfen werden. Daraus ableitend kann durch die vorliegende Arbeit das *CACNAIS* als funktionelles Kandidatengen und seine Beteiligung an der Pathogenese der HypoPP der Burmakatze ausgeschlossen werden.

8 Summary

The hypokalaemic periodic paralysis (HypoPP) in Burmese cats is a heredity disease with episodic muscle weakness. Affected animals show clinical signs of a polymyopathy with head nodding, neck ventroflexion and limb stiffness. The identification of the causal gene mutation and the development of a gene test are important preconditions to recognize both affected animals and carriers and to exclude them from breeding. In this research project the feline gene for the *alpha*-subunit of the dihydropyridine sensitive calcium channel *CACNAIS* should be characterized genetically. The genetic linkage of this functional candidate gene with pathogenesis was examined in a HypoPP affected Burmese cat family. After unspecific primer design on the basis of sequences of other species and primer walking the *CACNAIS* mRNA was amplified and isolated using *two-step* RT-PCR and SMART-RACE. Via direct sequencing the nucleotide sequence of the mRNA was determined for the first time. The sequence was registered in the NCBI database with accession number DQ128075. The mRNA sequence showed a high conservation to the human mRNA with an identity of 89 %. High conservation of sequences of functional ionen channels could be shown with distance estimation between mRNA sequences of several species. Semi-quantitative expression analysis in tissue samples of brain, heart, uterus, skeletal muscle, lung, liver, kidney, milt, and blood showed expression patterns of the feline *CACNAIS*. The mRNA could be detected in skeletal muscle and in brain, kidney, and milt, too. Because there was no expression of *CACNAIS* in blood, for the further characterization genomic DNA was used as sample material. For this analysis 208 cat DNA samples of different breeds could be used. Focus lay on DNA samples of 64 cats belonging to a HypoPP affected Burmese family. These animals were examined for genetic polymorphisms correlated with HypoPP phenotypes. Information's to the state of HypoPP were provided by animal owners or breeders. For identification of genomic sequence in several fragments and for screening DNA polymorphisms using comparative sequencing three samples of the Burmese cat family and a European Shorthair were chosen. Primers were selected from *CACNAIS* mRNA to amplify genomic fragments. One of these fragments (accession number DQ128065) was used as probe in fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The gene was physically mapped on feline chromosome F1q22. Comparative sequencing identifies 44 genetic polymorphisms in five amplicates spanning 6462 base pairs with several Introns and Exons. Intron9, Intron17, Intron30, Intron31, Intron36, and 3'-untranslated region of *CACNAIS* showed 29 transitions and seven transversions. In Intron30 deletion of

SUMMARY

cytosin and in Intron31 insertion of four bases were characterized. In Exon10, Exon18 und Exon44 five transitions were detected in Burmese cats. These SNPs are silent mutations without effect of amino acid sequence. In Exon9 one microsatellite with a (AC)_n motif was found. Verification procedure was generated for microsatellite *GIKA001* and four SNPs Intron17+46, Intron31+185, Intron36+482, and Exon44+188 using fragment analysis respectively PCR-RFLPs. Typing of microsatellite *GIKA001* in 208 samples showed nine alleles with 146 up to 164 base pairs fragment size. Alleles 150 and 156 dominated in analysed cat samples. Significant differences ($p < 0.001$) were ascertained between longhair cats and both semi longhair and shorthair cats. Overall 22 genotypes of *GIKA001* were detected. Eighteen genotypes were observed in European Shorthair, thirteen in Persians and only four genotypes in the Burmese cat family. In Burmese cats both alleles and three genotypes of SNPs using PCR-RFLP were demonstrated. Animals of other breeds showed in SNPs Intron31+185, Intron36+482, and Intron17+46 in each case one dominant allele. SNP of Exon44+188 could be detected only in Burmese and two Siamese cats. Differences of frequencies of SNP genotypes among Burmese and all other cats were significant ($p < 0.05$). Seven haplotypes of SNPs were estimated using 20 Burmese subfamilies and 61 other cats. Haplotypes CCCC, TCCT, and CATC in Burmese and haplotypes CCTC, TCTC, TCTT, CACC, and CATC in other cats were identified. Results of typing of Burmese including the affected cat family and two unrelated cats were used for linkage analysis. Potential correlation between allele frequency of genetic markers and the trait HypoPP was verified using Fisher's exact test. Allele frequencies of *GIKA001*, Intron17+46, Intron31+185, Intron36+482, Exon44+188, and SNP haplotypes were compared among Burmese cats with different HypoPP traits using two models of trait categories. The first model differentiated between the categories "clinical symptoms" and "no symptoms". The second model distinguished four categories ("HypoPP affected", "genetic carrier", "potential carrier", "unknown") assuming autosomal recessive inheritance. Using Fisher's exact test no significant differences between allele frequencies in HypoPP affected and animals without symptoms were determined ($p > 0.05$). Under these circumstances correlation between intragenic markers of *CACNAIS* and appearance of HypoPP could be condemned. The results of this research project leads to the exclusion of *CACNAIS* as a candidate gene of the pathogenesis of HypoPP in Burmese cats.

9 Literaturverzeichnis

- 1.DEKZV** (2005): 1. Deutsche Edelkatzen Züchterverband e.V. (1.DEKZV). <http://www.dekzv.de/>. 2005.
- Abbott, G.W., M.H. Butler, S. Bendahhou, M.C. Dalakas, L.J. Ptacek & S.A. Goldstein** (2001): MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* 104 (2) 217-231.
- Abbott, G.W. & S.A. Goldstein** (2001): Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs). *Mol Interv* 1 (2) 95-107.
- Abbott, G.W., F. Sesti, I. Splawski, M.E. Buck, M.H. Lehmann, K.W. Timothy, M.T. Keating & S.A. Goldstein** (1999): MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97 (2) 175-187.
- Archibald, A.L., C.S. Haley, J.F. Brown, S. Couperwhite, H.A. McQueen, D. Nicholson, W. Coppieters, A. Weghe, A. Stratil, A.K. Winterø, M. Fredholm, N.J. Larsen, V.H. Nielsen, D. Milan, N. Woloszyn, A. Robic, M. Dalens, J. Riquet, J. Gellin, J.C. Caritez, G. Burgaud, L. Ollivier, J.P. Bidanel, M. Vaiman, C. Renard, H. Geldermann, R. Davoli, D. Ruyter, E.J.M. Verstege, M.A.M. Groenen, W. Davies, B. Høyheim, A. Keiserud, L. Andersson, H. Ellegren, M. Johansson, L. Marklund, J.R. Miller, D.V. Anderson-Dear, E. Signer, A.J. Jeffreys, C. Moran, P. Tissier-Muladno, M.F. Rothschild, C.K. Tuggle, D. Vaske, J. Helm, H.C. Liu, A. Rahman, T.P. Yu, R.G. Larson & C.B. Schmitz** (1995): The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mamm Genome* 6 (3) 157-175.
- Bannasch, D.L. & A.M. Hughes** (2006): Recent Advances in Small Animal Genetics. *Vet Clin Small Anim* 36 461-474.
- Bannasch, D.L., J.R. Ryun, M.J. Bannasch, R.H. Schaible, M. Breen & G. Ling** (2004): Exclusion of galectin 9 as a candidate gene for hyperuricosuria in the Dalmatian dog. *Anim Genet* 35 (4) 326-328.
- Barillet, F., J.J. Arranz & A. Carta** (2005): Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. *Genet Sel Evol* 37 Suppl 1 S109-123.
- Barthez, P.Y., P. Rivier & D. Begon** (2003): Prevalence of polycystic kidney disease in Persian and Persian related cats in France. *J Feline Med Surg* 5 (6) 345-347.
- Bauer, U.** (2005): Schätzung zum Vorkommen herrenloser Katzen in deutschen Großstädten. Mitteilung des Deutschen Tierhilfswerks DTHW. schriftliche Mitteilung. 12.12.2005.
- Beck, C. & R.B. Lavelle** (2001): Feline polycystic kidney disease in Persian and other cats: a prospective study using ultrasonography. *Aust Vet J* 79 (3) 181-184.
- Becker, T. & M. Knapp** (2002): Efficiency of haplotype frequency estimation when nuclear family information is included. *Hum Hered* 54 (1) 45-53.
- Benecke, N.** (2001): Katze. Hrsg. Benecke, N.: *Der Mensch und seine Haustiere*. Parkland Verlag. Köln. 344-353.
- Benson, D.A., I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, B.A. Rapp & D.L. Wheeler** (2000): GenBank. *Nucleic Acids Res* 28 (1) 15-18.
- Berg, T., O.K. Tollersrud, S.U. Walkley, D. Siegel & O. Nilssen** (1997): Purification of feline lysosomal alpha-mannosidase, determination of its cDNA sequence and identification of a mutation causing alpha-mannosidosis in Persian cats. *Biochem J* 328 863-870.
- Bhalerao, D.P., Y. Rajpurohit, C.H. Vite & U. Giger** (2002): Detection of a genetic mutation for myotonia congenita among Miniature Schnauzers and identification of a common carrier ancestor. *Am J Vet Res* 63 (10) 1443-1447.
- Biller, D.S., D.J. Chew & S.P. DiBartola** (1990): Polycystic kidney disease in a family of Persian cats. *J Am Vet Med Assoc* 196 (8) 1288-1290.
- Bjelke-Hansen, A.M.** (2001): Hypokaliämie: Eine traurige Erfahrung. *Burma Notizen* (2) 13-16.
- Blaxter, A., P. Lievesley, T. Gruffydd-Jones & P. Wotton** (1986): Periodic muscle weakness in Burmese kittens. *Vet Rec* 118 (22) 619-620.
- Boerman, R.H., R.A. Ophoff, T.P. Links, R. van Eijk, L.A. Sandkuijl, A. Elbaz, J.E. Vale-Santos, A.R. Wintzen, J.C. van Deutekom & D.E. Isles** (1995): Mutation in DHP receptor alpha 1 subunit (CACLN1A3) gene in a Dutch family with hypokalaemic periodic paralysis. *J Med Genet* 32 (1) 44-47.
- Broad-Institute** (2005): Mammalian Genome Project. <http://www.broad.mit.edu/mammals/>. 2006.
- Buch, S., C. Schafmayer, H. Volzke, C. Becker, A. Franke, H. von Eller-Eberstein, C. Kluck, I. Bassmann, M. Brosch, F. Lammert, J.F. Miquel, F. Nervi, M. Wittig, D. Rosskopf, B. Timm, C. Holl, M. Seeger, A. Elsharawy, T. Lu, J. Egberts, F. Fandrich, U.R. Folsch, M. Krawczak, S. Schreiber, P. Nurnberg, J. Tepel & J. Hampe** (2007): A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet*

- Bulman, D.E., K.A. Scoggan, M.D. van Oene, M.W. Nicolle, A.F. Hahn, L.L. Tollar & G.C. Ebers** (1999): A novel sodium channel mutation in a family with hypokalemic periodic paralysis. *Neurology* 53 (9) 1932-1936.
- Buruma, O.J., G.T. Bots & L.N. Went** (1985): Familial hypokalemic periodic paralysis. 50-year follow-up of a large family. *Arch Neurol* 42 (1) 28-31.
- Caciotti, A., A. Morrone, R. Domenici, M.A. Donati & E. Zammarchi** (2003): Severe prognosis in a large family with hypokalemic periodic paralysis. *Muscle Nerve* 27 (2) 165-169.
- Carsana, A., G. Fortunato, C. De Sarno, V. Brancadoro & F. Salvatore** (2003): Identification of new polymorphisms in the CACNA1S gene. *Clin Chem Lab Med* 41 (1) 20-22.
- Casley, W.L., M. Allon, H.K. Cousin, S.S. Ting, M.A. Crackower, L. Hashimoto, F. Cornelis, J.S. Beckmann, A.J. Hudson & G.C. Ebers** (1992): Exclusion of linkage between hypokalemic periodic paralysis (HOKPP) and three candidate loci. *Genomics* 14 (2) 493-494.
- CFA** (2006): Cat Fanciers' Association (CFA). <http://www.cfainc.org/>. 2006.
- Chatterall, W.A.** (1988): Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242 50-61.
- Cho, K.W., H.Y. Youn, T. Watari, H. Tsujimoto, A. Hasegawa & H. Satoh** (1997): A proposed nomenclature of the domestic cat karyotype. *Cytogenet Cell Genet* 79 (1-2) 71-78.
- Clutton-Brock, J.** (1989): *Cats*. Hrsg. Clutton-Brock, J.: A Natural History of Domesticated Mammals. BAS Printers. Hampshire. 106-113.
- Cooper, M.P., N. Fretwell, S.J. Bailey & L.A. Lyons** (2006): White spotting in the domestic cat (*Felis catus*) maps near KIT on feline chromosome B1. *Anim Genet* 37 (2) 163-165.
- Copeland, N.G., N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, J.T. Eppig, L.J. Maltais, J.C. Miller, W.F. Dietrich, A. Weaver, S.E. Lincoln, R.G. Steen & et al.** (1993): A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects. *Science* 262 (5130) 57-66.
- Crawley, A.C., G. Yogalingam, V.J. Muller & J.J. Hopwood** (1998): Two mutations within a feline mucopolysaccharidosis type VI colony cause three different clinical phenotypes. *J Clin Invest* 101 (1) 109-119.
- David, P.** (1998): Heterozygosity-fitness correlations: new perspective on old problems. *Heredity* 80 531-537.
- Davidson, A.P., R.E. Pollard, D.L. Bannasch, S.L. Marks, W.J. Hornof & T.R. Famula** (2004): Inheritance of cricopharyngeal dysfunction in Golden Retrievers. *Am J Vet Res* 65 (3) 344-349.
- Davies, N.P., L.H. Eunson, M. Samuel & M.G. Hanna** (2001): Sodium channel gene mutations in hypokalemic periodic paralysis: an uncommon cause in the UK. *Neurology* 57 (7) 1323-1325.
- De Keyser, J., J. Smits, R. Malfait & G. Ebinger** (1987): Rhabdomyolysis in hypokalaemic periodic paralysis: a clue to the mechanism that terminates the paralytic attack? *J Neurol* 234 (2) 119-121.
- Dekomien, G. & J.T. Eppel** (2003): Evaluation of the canine RPE65 gene in affected dogs with generalized progressive retinal atrophy. *Mol Vis* 9 601-605.
- den Dunnen, J.T. & S.E. Antonarakis** (2001): Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109 (1) 121-124.
- DiBartola, S.P.** (2001): Management of hypokalaemia and hyperkalaemia. *J Feline Med Surg* 3 (4) 181-183.
- Ditze, B.** (2005): Der deutsche Heimtiermarkt 2004. *Industrieverband Heimtierbedarf e.V. (IVH)*. email. 7.12.2005.
- Donahue, L.M., P.W. Coates, V.H. Lee, D.C. Ippensen, S.E. Arze & S.E. Poduslo** (2000): The cardiac sodium channel mRNA is expressed in the developing and adult rat and human brain. *Brain Res* 887 (2) 335-343.
- Dow, S.W., M.J. Fettman, C.R. Curtis & R.A. LeCouteur** (1989): Hypokalemia in cats: 186 cases (1984-1987). *J Am Vet Med Assoc* 194 (11) 1604-1608.
- Dow, S.W., R.A. LeCouteur, M.J. Fettman & T.L. Spurgeon** (1987): Potassium depletion in cats: hypokalemic polymyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 191 (12) 1563-1568.
- Driscoll, C.A., M. Menotti-Raymond, G. Nelson, D. Goldstein & S.J. O'Brien** (2002): Genomic microsatellites as evolutionary chronometers: a test in wild cats. *Genome Res* 12 (3) 414-423.
- Edwards, A., A. Civitello, H.A. Hammond & C.T. Caskey** (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49 (4) 746-756.
- Edwards, C.M. & C.J. Belford** (1995): Hypokalemic polymyopathy in Burmese cats. *Aust Vet Practit* (25) 58-60.
- Eizirik, E., N. Yuhki, W.E. Johnson, M. Menotti-Raymond, S.S. Hannah & S.J. O'Brien** (2003): Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr Biol* 13 (5) 448-453.
- Elbaz, A., J. Vale-Santos, K. Jurkat-Rott, P. Lapie, R.A. Ophoff, B. Bady, T.P. Links, C. Piussan, A. Vila, N. Monnier, G.W. Padberg, K. Abe, N. Feingold, J. Guimaraes, A.R. Wintzen, J.H.v.d. Hoeven, J.M. Saudubray, J.P. Grunfeld, G. Lenoir, H. Nivet, B. Echenne, R.R. Frants, M. Fardeau, F. Lehmann-Horn & B. Fontaine** (1995): Hypokalemic periodic paralysis and the dihydropyridine receptor (CACNL1A3): genotype/phenotype correlations for two predominant mutations and evidence for the absence of a founder effect in 16 caucasian families. *Am J Hum Genet* 56 (2) 374-380.

- Ellegren, H., S. Moore, N. Robinson, K. Byrne, W. Ward & B.C. Sheldon** (1997): Microsatellite evolution--a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Mol Biol Evol* 14 (8) 854-860.
- Erhardt, G.** (2005): *Molekulare Gendiagnostik bei Nutztieren*. Hrsg. Geldermann, H.: Tier-Biotechnologie. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart. 485-507.
- Ertel, E.A., K.P. Campbell, M.M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T.P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R.W. Tsien & W.A. Catterall** (2000): Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25 (3) 533-535.
- Fan, H. & J.Y. Chu** (2007): A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 5 (1) 7-14.
- Fan, I.Q., B. Chen & J.D. Marsh** (2000): Transcriptional regulation of L-type calcium channel expression in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32 (10) 1841-1849.
- FIFé** (2006): Fédération Internationale Féline (FIFé). <http://www.fifeweb.org/intro.html>. 2006.
- Fillat, C., C.M. Simonaro, P.L. Yeyati, J.L. Abkowitz, M.E. Haskins & E.H. Schuchman** (1996): Arylsulfatase B activities and glycosaminoglycan levels in retrovirally transduced mucopolysaccharidosis type VI cells. Prospects for gene therapy. *J Clin Invest* 98 (2) 497-502.
- Fontaine, B., T.S. Khurana, E.P. Hoffman, G.A. Bruns, J.L. Haines, J.A. Trofatter, M.P. Hanson, J. Rich, H. McFarlane & D.M. Yasek** (1990): Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science* 250 (4983) 1000-1002.
- Fontaine, B., J. Vale-Santos, K. Jurkat-Rott, J. Reboul, E. Plassart, C.S. Rime, A. Elbaz, R. Heine, J. Guimaraes & J. Weissenbach** (1994): Mapping of the hypokalaemic periodic paralysis (HypoPP) locus to chromosome 1q31-32 in three European families. *Nat Genet* 6 (3) 267-272.
- Ford, C.E., D.L. Pollock & I. Gustavsson** (1980): Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. University of Reading, Reading, England. 2nd-6th August 1976. *Hereditas* 92 (1) 145-162.
- Fries, R.** (1993): Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. *Anim Genet* 24 (2) 111-116.
- Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. de Leon, V.K. Khanna, J.E. Weiler, P.J. O'Brien & D.H. MacLennan** (1991): Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253 (5018) 448-451.
- Fyfe, J.C., U. Giger, T.J. Van Winkle, M.E. Haskins, S.A. Steinberg, P. Wang & D.F. Patterson** (1992): Glykogen storage disease type IV: inherited deficiency of branching enzyme activity in cats. *Pediatr Res* 32 (6) 719-725.
- Fyfe, J.C., R.L. Kurzhals, M.E. Lassaline, P.S. Henthorn, P.R. Alur, P. Wang, J.H. Wolfe, U. Giger, M.E. Haskins, D.F. Patterson, H. Sun, S. Jain & N. Yuhki** (1999): Molecular basis of feline beta-glucuronidase deficiency: an animal model of mucopolysaccharidosis VII. *Genomics* 58 (2) 121-128.
- Fyfe, J.C., M. Menotti-Raymond, V.A. David, L. Brichta, A.A. Schaffer, R. Agarwala, W.J. Murphy, W.J. Wedemeyer, B.L. Gregory, B.G. Buzzell, M.C. Drummond, B. Wirth & S.J. O'Brien** (2006): An approximately 140-kb deletion associated with feline spinal muscular atrophy implies an essential LIX1 function for motor neuron survival. *Genome Res* 16 (9) 1084-1090.
- Ganetzky, B.** (2000): Genetic analysis of ion channel dysfunction in *Drosophila*. *Kidney Int* 57 (3) 766-771.
- Gasper, P.W., M.A. Thrall, D.A. Wenger, D.W. Macy, L. Ham, R.E. Dornsife, K. McBiles, S.L. Quackenbush, M.L. Kesel, E.L. Gillette & et al.** (1984): Correction of feline arylsulphatase B deficiency (mucopolysaccharidosis VI) by bone marrow transplantation. *Nature* 312 (5993) 467-469.
- GCCF** (2006): Cat Breeds Recognised by GCCF. http://ourworld.compuserve.com/homepages/GCCF_CATS/breed.htm. 2006.
- GCCF** (2007): GCCF Registration Policy For Asian Shorthair And Semi-Longhair Cats. <http://www.gccfcats.org/regpol/asianregpol.pdf>. 2007.
- Geldermann, H.** (1996): Analyse von Geneffekten auf Leistungscharakteristika. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 103 (10) 378-383.
- George, A.L., Jr., D.H. Ledbetter, R.G. Kallen & R.L. Barchi** (1991): Assignment of a human skeletal muscle sodium channel alpha-subunit gene (SCN4A) to 17q23.1-25.3. *Genomics* 9 (3) 555-556.
- Giger, U., E. Tcherneva, J. Caverly, A. Seng, A.M. Huff, K. Cullen, M. Van Hoesen, H. Mazrier & M.E. Haskins** (2006): A missense point mutation in N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase causes mucopolysaccharidosis II in domestic shorthair cats. *J Vet Intern Med* 20 781.
- Ginzinger, D.G., M.E.S. Lewis, Y.H. Ma, B.R. Jones, G.Q. Liu, S.D. Jones & M.R. Hayden** (1996): A mutation in the lipoprotein lipase gene is the molecular basis of chylomicronemia in a colony of domestic cats. *Journal of Clinical Investigation* 97 1257 - 1266.
- Gödde, R., D.A. Akkad, L. Arning, G. Dekomien, J. Herchenbach, E. Kunstmann, M. Meins, S. Wiczorek, J.T. Epplen & S. Hoffjan** (2006): Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics - state-of-the-art, alternatives and future prospects. *Electrophoresis* 27 (5-6) 939-946.
- Goldin, A.L.** (2002): Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J Exp Biol* 205 (Pt 5) 575-584.

- Gordon, E.S., H.A. Gordish Dressman & E.P. Hoffman** (2005): The genetics of muscle atrophy and growth: the impact and implications of polymorphisms in animals and humans. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (10) 2064-2074.
- Goree, M., J.L. Catalfamo, S. Aber & M.K. Boudreaux** (2005): Characterization of the mutations causing hemophilia B in 2 domestic cats. *J Vet Intern Med* 19 200-204.
- Gould, D.J. & D.R. Sargan** (2002): Autosomal dominant retinal dystrophy (Rdy) in Abyssinian cats: exclusion of PDE6G and ROM1 and likely exclusion of Rhodopsin as candidate genes. *Anim Genet* 33 (6) 436-440.
- Graf-Webster, E.** (1997): The Joy of Burmese. <http://www.cfainc.org/breeds/profiles/articles/burmese.html>. 2005.
- Grahn, R.A., B.M. Lemesch, L.V. Millon, T. Matise, Q.R. Rogers, J.G. Morris, N. Fretwell, S.J. Bailey, R.M. Batt & L.A. Lyons** (2005): Localizing the X-linked orange colour phenotype using feline resource families. *Anim Genet* 36 (1) 67-70.
- Gregg, R.G., F. Couch, K. Hogan & P.A. Powers** (1993): Assignment of the human gene for the alpha 1 subunit of the skeletal muscle DHP-sensitive Ca²⁺ channel (CACNL1A3) to chromosome 1q31-q32. *Genomics* 15 (1) 107-112.
- Gruffydd-Jones, T.J.** (1996): Episodic hypokalaemic weakness in Burmese cats. The-Burmese-Cat-Club. Hypokalaemic Polymyopathy - Information Pack
- Gruffydd-Jones, T.J.** (1997): Hypokalaemic Polymyopathy - Some Question Answered. The-Burmese-Cat-Club. The-Burmese-Cat-Club. Hypokalaemic Polymyopathy - Information Pack
- Gruffydd-Jones, T.J. & F. Lehmann-Horn** (2002): Sequence analysis of feline SCN4A in hypokalaemic burmese cats. persönliche Mitteilung an E.M. Prinzenberg.
- Gruffydd-Jones, T.J., A.H. Sparkes, S.A. Caney, D.G. Gunn-Moore & C.P. Sturgess** (1996): Hypokalaemic episodic weakness in Burmese kittens. Conference Proceedings. 14th Annual Veterinary Medicine Forum. San Antonio. 757.
- Guda, P., P.E. Bourne & C. Guda** (2007): Conserved motifs in voltage-sensing and pore-forming modules of voltage-gated ion channel proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 352 (2) 292-298.
- Guillon, H., F. Baudat, C. Grey, R.M. Liskay & B. de Massy** (2005): Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Mol Cell* 20 (4) 563-573.
- Halldorsson, B.V., S. Istrail & F.M. De La Vega** (2004): Optimal selection of SNP markers for disease association studies. *Hum Hered* 58 (3-4) 190-202.
- Hancock, J.M.** (1999): Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. Hrsg. Goldstein, D. B. & C. Schlötterer: Microsatellites - Evolution and application. Oxford University Press. Oxford. 1-6.
- Hansson, B. & L. Westerberg** (2002): On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol Ecol* 11 (12) 2467-2474.
- Harris, D.M., G.D. Mills, X. Chen, H. Kubo, R.M. Berretta, V.S. Votaw, L.F. Santana & S.R. Houser** (2005): Alterations in early action potential repolarization causes localized failure of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Circ Res* 96 (5) 543-550.
- He, X.X., C.M. Li, C.M. Simonaro, Q. Wan, M.E. Haskins, R.J. Desnick & E.H. Schuchman** (1999): Identification and characterization of the molecular lesion causing mucopolysaccharidosis type I in cats. *Mol Genet Metab* 67 106 - 112.
- Herraeza, D.L., H. Schafer, J. Mosner, H.R. Fries & M. Wink** (2005): Comparison of microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for the genetic analysis of a Galloway cattle population. *Z Naturforsch [C]* 60 (7-8) 637-643.
- Herzog, A., T. Bartels, M. Dayen, K. Loeffler, I. Reetz, B. Rusche & J. Unshelm** (2002): Gutachten zur Auslegung von § 11b des Tierschutzgesetzes (Verbot von Qualzuchten). Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Bonn.
- Hiendleder, S., H. Lewalski, R. Wassmuth & A. Janke** (1998): The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J Mol Evol* 47 (4) 441-448.
- Hille, B.** (1989): The Sharpey-Schafer Lecture. Ionic channels: evolutionary origins and modern roles. *Q J Exp Physiol* 74 (6) 785-804.
- Hirschhorn, J.N., K. Lohmueller, E. Byrne & K. Hirschhorn** (2002): A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 4 (2) 45-61.
- Hogan, K., R.G. Gregg & P.A. Powers** (1996): The structure of the gene encoding the human skeletal muscle alpha 1 subunit of the dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel (CACNL1A3). *Genomics* 31 (3) 392-394.
- Hsiao, L.L., F. Dangond, T. Yoshida, R. Hong, R.V. Jensen, J. Misra, W. Dillon, K.F. Lee, K.E. Clark, P. Haverty, Z. Weng, G.L. Mutter, M.P. Frosch, M.E. Macdonald, E.L. Milford, C.P. Crum, R.**

- Bueno, R.E. Pratt, M. Mahadevappa, J.A. Warrington, G. Stephanopoulos & S.R. Gullans** (2001): A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics* 7 (2) 97-104.
- Hucke, C.** (2007): Nutzungsfrequenz kommerzieller Gentest bei Katzen. persönliche Mitteilung. 02.07.2007.
- Ikeda, Y., M. Watanabe & M. Shoji** (1997): Mutation analysis of the CACNL1A3 gene in Japanese hypokalemic periodic paralysis families. *Nippon Rinsho* 55 (12) 3247-3252.
- Iles, D.E., B. Segers, D. Olde Weghuis, R. Suijkerbuijk, G. Mikala, A. Schwartz & B. Wieringa** (1994): Refined localization of the alpha 1-subunit of the skeletal muscle L-type voltage-dependent calcium channel (CACNL1A3) to human chromosome 1q32 by in situ hybridization. *Genomics* 19 (3) 561-563.
- Imes, D.L., L.A. Geary, R.A. Grahn & L.A. Lyons** (2006): Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (TYR) mutation. *Anim Genet* 37 175-178.
- Ishida, Y., V.A. David, E. Eizirik, A.A. Schaffer, B.A. Neelam, M.E. Roelke, S.S. Hannah, J. O'Brien S & M. Menotti-Raymond** (2006): A homozygous single-base deletion in MLPH causes the dilute coat color phenotype in the domestic cat. *Genomics* 88 (6) 698-705.
- Jan, L.Y. & Y.N. Jan** (1994): Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371 (6493) 119-122.
- Jeziorski, M.C., R.M. Greenberg & P.A. Anderson** (1999): Cloning and expression of a jellyfish calcium channel beta subunit reveal functional conservation of the alpha1-beta interaction. *Receptors Channels* 6 (5) 375-386.
- Jezyk, P.F., M.E. Haskins, D.F. Patterson, W.J. Mellman & M. Greenstein** (1977): Mucopolysaccharidosis in a cat with arylsulfatase B deficiency: a model of Maroteaux-Lamy syndrome. *Science* 198 (4319) 834-836.
- Jones, B.R., G.W. Swinney & M.R. Alley** (1988): Hypokalaemic myopathy in Burmese kittens. *N Z Vet J* 36 (3) 150-151.
- Jurkat-Rott, K. & F. Lehmann-Horn** (2004): Periodic paralysis mutation MiRP2-R83H in controls: Interpretations and general recommendation. *Neurology* 62 (6) 1012-1015.
- Jurkat-Rott, K., F. Lehmann-Horn, A. Elbaz, R. Heine, R.G. Gregg, K. Hogan, P.A. Powers, P. Lapie, J.E. Vale-Santos, J. Weissenbach & B. Fontaine** (1994): A calcium channel mutation causing hypokalemic periodic paralysis. *Hum Mol Genet* 3 (8) 1415-1419.
- Jurkat-Rott, K., H. Lerche & F. Lehmann-Horn** (2002): Skeletal muscle channelopathies. *J Neurol* 249 (11) 1493-1502.
- Jurkat-Rott, K., N. Mitrovic, C. Hang, A. Kouzmekine, P. Iazzo, J. Herzog, H. Lerche, S. Nicole, J. Vale-Santos, D. Chauveau, B. Fontaine & F. Lehmann-Horn** (2000): Voltage-sensor sodium channel mutations cause hypokalemic periodic paralysis type 2 by enhanced inactivation and reduced current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (17) 9549-9554.
- Kappe, E.C., W. Hecht, M. Gerwing, U. Michele & M. Reinacher** (2005): Das polyzystische Syndrom in der deutschen Perserkatzenpopulation. Vergleichende sonographische und molekulargenetische Untersuchung. *Tierarztl Prax* 33 413 - 418.
- Kelsey-Wood, D.** (2001): *Burmese Cat*. Interpet Publishing. Surrey.
- Kim, M.K., S.H. Lee, M.S. Park, B.C. Kim, K.H. Cho, M.C. Lee, J.H. Kim & S.M. Kim** (2004): Mutation screening in Korean hypokalemic periodic paralysis patients: a novel SCN4A Arg672Cys mutation. *Neuromuscul Disord* 14 (11) 727-731.
- Kim, S.H., U.K. Kim, J.J. Chae, D.J. Kim, H.Y. Oh, B.J. Kim & C.C. Lee** (2001): Identification of mutations including de novo mutations in Korean patients with hypokalaemic periodic paralysis. *Nephrol Dial Transplant* 16 (5) 939-944.
- Kirsch, M.** (1995): Hypokaliämische Myopathie bei der Katze. *Tierarztl Prax* 23 (2) 167-171.
- Kittleson, M.D., K.M. Meurs, M.J. Munro, J.A. Kittleson, S.K. Liu, P.D. Pion & J.A. Towbin** (1999): Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease. *Circulation* 99 (24) 3172-3180.
- Klein, C., G. Erhardt & E.M. Prinzenberg** (2006a): Vergleichende Sequenzierung und SNP-Typisierung des felinen SCN4A im Zusammenhang mit der HypoPP der Burmakatze. unveröffentlichte Daten.
- Klein, C., E.M. Prinzenberg & G. Erhardt** (2005): Molekulare Charakterisierung des CACNA1S-Gens der Katze im Zusammenhang mit der Hypokaliämischen Periodischen Paralyse (HypoPP). Conference Proceedings. Vortragstagung der Deutsche Gesellschaft für Züchtungskunde und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft. Berlin. 21.-22. September 2005.
- Klein, C., I. Szczerbal, E.M. Prinzenberg, M. Switonski & G. Erhardt** (2006b): HypoPP in Burmese cats: Physical and linkage mapping of the CACNA1S on feline chromosome F1 and exclusion of this candidate gene using association analysis. unpublished
- Kruglyak, L. & D.A. Nickerson** (2001): Variation is the spice of life. *Nat Genet* 27 (3) 234-236.
- Kuzmenkin, A., V. Muncan, K. Jurkat-Rott, C. Hang, H. Lerche, F. Lehmann-Horn & N. Mitrovic** (2002): Enhanced inactivation and pH sensitivity of Na(+) channel mutations causing hypokalaemic periodic paralysis type II. *Brain* 125 (Pt 4) 835-843.

- Lantinga, E., H.S. Kooistra & J.J. van Nes** (1998): [Periodic muscle weakness and cervical ventroflexion caused by hypokalemia in a Burmese cat]. *Tijdschr Diergeneeskd* 123 (14-15) 435-437.
- Lecis, R., M. Pierpaoli, Z.S. Biro, L. Szemethy, B. Ragni, F. Vercillo & E. Randi** (2006): Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Mol Ecol* 15 (1) 119-131.
- Leeb, T.** (2005): Darstellung von DNA-Varianten. Hrsg. Geldermann, H.: Tier-Biotechnologie. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart. 198-230.
- Lerche, H., N. Klugbauer, F. Lehmann-Horn, F. Hofmann & W. Melzer** (1996): Expression and functional characterization of the cardiac L-type calcium channel carrying a skeletal muscle DHP-receptor mutation causing hypokalaemic periodic paralysis. *Pflugers Arch* 431 (3) 461-463.
- Lewin, B.** (1998a): Die DNA ist das genetische Material. Hrsg. Lewin, B.: Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin. 59-80.
- Lewin, B.** (1998b): Katalytische DNA. Hrsg. Lewin, B.: Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin. 741-760.
- Lewin, B.** (1998c): RNA-Spleißen im Zellkern. Hrsg. Lewin, B.: Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin. 711-740.
- Lind, J.M., C. Chiu & C. Semsarian** (2006): Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 4 (6) 927-934.
- Lindblad-Toh, K., J.L. Chang, S. Gnerre, M. Clamp & E.S. Lander** (2006a): Annotating the human genome using low coverage mammalian genomes. The Genome Sequencing Platform, The Genome Assembly Team. 08.02.2006.
- Lindblad-Toh, K., J.L. Chang, S. Gnerre, M. Clamp & E.S. Lander** (2006b): Direct Submission to NCBI - nucleotide database. The Genome Sequencing Platform, The Genome Assembly Team. 08.02.2006.
- Links, T.P., H.B. Ginjaar & J.H. van der Hoeven** (2004): [From gene to diseases; hypokalaemic periodic paralysis]. *Ned Tijdschr Geneeskd* 148 (21) 1035-1038.
- Liu, G., K.J. Ashbourne Excoffon, J.E. Wilson, B.M. McManus, Q.R. Rogers, L. Miao, J.J. Kastelein, M.E. Lewis & M.R. Hayden** (2000): Phenotypic correction of feline lipoprotein lipase deficiency by adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther* 11 (1) 21-32.
- Lund, C.** (2001): Hypokaliämie bei der Burmakatze - die 10 wichtigsten Fragen. *Burma Notizen* 2 8-12.
- Luo, S.J., W.E. Johnson, V.A. David, M. Menotti-Raymond, R. Stanyon, Q.X. Cai, T. Beck, N. Yuhki, J. Pecon-Slattey, J.L. Smith & J. O'Brien S** (2007): Development of Y Chromosome Intraspecific Polymorphic Markers in the Felidae. *J Hered*
- Lyons, L.A., S.J. Bailey, K.C. Baysac, G. Byrns, C.A. Erdman, N. Fretwell, L. Froenicke, K.W. Gazlay, L.A. Geary, J.C. Grahn, R.A. Grahn, G.M. Karere, M.J. Lipinski, H. Rah, M.T. Ruhe & L.H. Bach** (2006): The Tabby cat locus maps to feline chromosome B1. *Anim Genet* 37 (4) 383-386.
- Lyons, L.A., D.S. Biller, C.A. Erdman, M.J. Lipinski, A.E. Young, B.A. Roe, B. Qin & R.A. Grahn** (2004): Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1. *J Am Soc Nephrol* 15 (10) 2548-2555.
- Lyons, L.A., D.L. Imes, H.C. Rah & R.A. Grahn** (2005): Tyrosinase mutations associated with Siamese and Burmese patterns in the domestic cat (*Felis catus*). *Anim Genet* 36 (2) 119-126.
- Maak, S.** (2001): Untersuchungen zu Kandidatengenen für Leistungseigenschaften und Erbfehler beim Schwein. Habilitationsschrift. Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg. Halle. urn:nbn:de:gbv:3-000002879.
- Macri, B., F. Marino, G. Mazzullo, A. Trusso, M.R. De, S. Amedeo, S. Divari & M. Castagnaro** (2002): Mucopolysaccharidosis VI in a Siamese/short-haired European cat. *Zentralbl Veterinarmed A* 49 438-442.
- Martin, D.R., N.R. Cox, N.E. Morrison, D.M. Kennamer, S.L. Peck, A.N. Dodson, A.S. Gentry, B. Griffin, M.D. Rolsma & H.J. Baker** (2005): Mutation of the GM2 activator protein in a feline model of GM2 gangliosidosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 110 443-450.
- Martin, D.R., B.K. Krum, G.S. Varadarajan, T.L. Hathcock, B.F. Smith & H.J. Baker** (2004): An inversion of 25 base pairs causes feline GM2 gangliosidosis variant. *Exp Neurol* 187 30-37.
- Mason, K.** (1988): A hereditary disease in Burmese cats manifested as an episodic weakness with head nodding and neck ventroflexion. *J Am Anim Hosp Assoc* 24 147-151.
- Mazier, H., M. Van Hoeven, P. Wang, V.W. Knox, G.D. Aguirre, E. Holt, S.P. Wiemelt, M.M. Sleeper, M. Hubler, M.E. Haskins & U. Giger** (2003): Inheritance, biochemical abnormalities, and clinical features of feline mucopolipidosis II: the first animal model of human I-cell disease. *J Hered* 94 363-373.
- McClatchey, A.I., C.S. Lin, J. Wang, E.P. Hoffman, C. Rojas & J.F. Gusella** (1992a): The genomic structure of the human skeletal muscle sodium channel gene. *Hum Mol Genet* 1 (7) 521-527.
- McClatchey, A.I., P. Van den Bergh, M.A. Pericak-Vance, W. Raskind, C. Verellen, D. McKenna-Yasek, K. Rao, J.L. Haines, T. Bird, R.H. Brown & J.F. Gusella** (1992b): Temperature-sensitive mutations in the III-IV cytoplasmic loop region of the skeletal muscle sodium channel gene in paramyotonia congenita. *Cell* 68 (4) 769-774.
- McCrossan, Z.A. & G.W. Abbott** (2004): The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 47 (6) 787-821.

- McGregor, J.** (2004): HypoPP in Europäischen und Amerikanischen Burmesen. persönliche Mitteilung. 06. August 2004.
- Menotti-Raymond, M., V.A. David, R. Agarwala, A.A. Schaffer, R. Stephens, S.J. O'Brien & W.J. Murphy** (2003a): Radiation hybrid mapping of 304 novel microsatellites in the domestic cat genome. *Cytogenet Genome Res* 102 (1-4) 272-276.
- Menotti-Raymond, M., V.A. David, Z.Q. Chen, K.A. Menotti, S. Sun, A.A. Schaffer, R. Agarwala, J.F. Tomlin, S.J. O'Brien & W.J. Murphy** (2003b): Second-Generation Integrated Genetic Linkage/Radiation Hybrid Maps of the Domestic Cat (*Felis catus*). *J Hered* 94 (1) 95-106.
- Menotti-Raymond, M., V.A. David, L.A. Lyons, A.A. Schaffer, J.F. Tomlin, M.K. Hutton & S.J. O'Brien** (1999): A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57 (1) 9-23.
- Menotti-Raymond, M., V.A. David, J.C. Stephens, L.A. Lyons & S.J. O'Brien** (1997a): Genetic individualization of domestic cats using feline STR loci for forensic applications. *J Forensic Sci* 42 (6) 1039-1051.
- Menotti-Raymond, M.A., V.A. David & S.J. O'Brien** (1997b): Pet cat hair implicates murder suspect. *Nature* 386 (6627) 774.
- Menotti-Raymond, M.A., V.A. David, L.L. Wachter, J.M. Butler & S.J. O'Brien** (2005): An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *J Forensic Sci* 50 (5) 1061-1070.
- Mensink, K.A. & J.L. Hand** (2006): Autosomal recessive inheritance: an updated review. *Pediatr Dermatol* 23 (4) 404-409.
- Meurs, K.M., X. Sanchez, R.M. David, N.E. Bowles, J.A. Towbin, P.J. Reiser, J.A. Kittleson, M.J. Munro, K. Dryburgh, K.A. Macdonald & M.D. Kittleson** (2005): A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 14 (23) 3587 - 3593.
- Miller, J.** (1996): The domestic cat: perspective on the nature and diversity of cats. *J Am Vet Med Assoc* 208 (4) 498-502.
- Morrill, J.A., R.H. Brown, Jr. & S.C. Cannon** (1998): Gating of the L-type Ca channel in human skeletal myotubes: an activation defect caused by the hypokalemic periodic paralysis mutation R528H. *J Neurosci* 18 (24) 10320-10334.
- Morrill, J.A. & S.C. Cannon** (1999): Effects of mutations causing hypokalaemic periodic paralysis on the skeletal muscle L-type Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 (Pt 2) 321-336.
- Murphy, W., B. Davis, V. David, A. Agarwala, A. Schaffer, A. Pearks-Wilkerson, B. Neelam, S. O'Brien & M. Menotti-Raymond** (2007): A 1.5-Mb-resolution radiation hybrid map of the cat genome and comparative analysis with the canine and human genomes. *Genomics* 89 (2) 189-196.
- Murphy, W.J., L. Fronicke, S.J. O'Brien & R. Stanyon** (2003): The origin of human chromosome 1 and its homologs in placental mammals. *Genome Research* 13 (8) 1880-1888.
- Murphy, W.J., M. Menotti-Raymond, L.A. Lyons, M.A. Thompson & S.J. O'Brien** (1999): Development of a feline whole genome radiation hybrid panel and comparative mapping of human chromosome 12 and 22 loci. *Genomics* 57 (1) 1-8.
- Murphy, W.J., S. Sun, Z. Chen, N. Yuhki, D. Hirschmann, M. Menotti-Raymond & S.J. O'Brien** (2000): A radiation hybrid map of the cat genome: implications for comparative mapping. *Genome Res* 10 (5) 691-702.
- Murray, J.C., K.H. Buetow, J.L. Weber, S. Ludwigsen, T. Scherpbier-Heddema, F. Manion, J. Quillen, V.C. Sheffield, S. Sunden, G.M. Duyk & et al.** (1994): A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). *Science* 265 (5181) 2049-2054.
- Narayanan, S.** (1991): Applications of restriction fragment length polymorphism. *Ann Clin Lab Sci* 21 (4) 291-296.
- Neudecker, S.** (2003): Klassifikation und Benennung von Myopathien. *psychoneuro* 29 (3) 86-93.
- Noden, D.M. & H.E. Evans** (1986): Inherited homeotic midfacial malformations in Burmese cats. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl* 2 249-266.
- O'Brien, S.J.** (1991): Mammalian genome mapping: lessons and prospects. *Curr Opin Genet Dev* 1 (1) 105-111.
- O'Brien, S.J.** (2003): Snowball's chance: genomic pawprints. Hrsg. O'Brien S, J.: Tears of the cheetah - and other tales from the genetic frontier. Thomas Dunne Books. St. Martin's Press. New York. 175 -197.
- O'Brien, S.J., S.J. Cevario, J.S. Martenson, M.A. Thompson, W.G. Nash, E. Chang, J.A.M. Graves, J.A. Spencer, K.-W. Cho, H. Tsujimoto & L.A. Lyons** (1997a): Comparative gene mapping in the domestic cat (*Felis catus*). *J Hered* 88 408 - 414.
- O'Brien, S.J., E. Eizirik & W.J. Murphy** (2001): Genomics. On choosing mammalian genomes for sequencing. *Science* 292 2264 - 2266.

- O'Brien, S.J., M.E. Haskins, C.A. Winkler, W.G. Nash & D.F. Patterson** (1986): Chromosomal mapping of beta-globin and albino loci in the domestic cat: a conserved mammalian chromosome group. *J. Hered.* 77 374 - 378.
- O'Brien, S.J., E.S. Lander, M.E. Haskins, U. Giger, N.C. Pederson, D.E. Wildt, W.J. Murphy, N. Yuhki & M. Menotti-Raymond** (2002a): Sequencing the Genome of the Domestic Cat - NHGRI White Paper. <http://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/CatSEQ.pdf>. 2006.
- O'Brien, S.J., M. Menotti-Raymond, W.J. Murphy, W.G. Nash, J. Wienberg, R. Stanyon, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, J.E. Womack & J.A. Marshall Graves** (1999): The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 286 (5439) 458-462, 479-481.
- O'Brien, S.J., M. Menotti-Raymond, W.J. Murphy & N. Yuhki** (2002b): The Feline Genome Project. *Annu Rev Genet* 36 657-686.
- O'Brien, S.J. & W.G. Nash** (1982): Genetic mapping in mammals: chromosome map of domestic cat. *Science* 216 (4543) 257-265.
- O'Brien, S.J., J. Wienberg & L.A. Lyons** (1997b): Comparative genomics: lessons from cats. *Trends Genet* 13 (10) 393-399.
- O'Brien, S.J., J.E. Womack, L.A. Lyons, K.J. Moore, N.A. Jenkins & N.G. Copeland** (1993): Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nat Genet* 3 (2) 103-112.
- Orrell, R.W., K. Jurkat-Rott, F. Lehmann-Horn & R.J. Lane** (1998): Familial cramp due to potassium-aggravated myotonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65 (4) 569-572.
- Peter, C.** (2005): Molekulargenetische Charakterisierung von Schafrassen Europas und des Nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten. Dissertation. Justus-Liebig-Universität. Gießen. VVB Lauferweiler Verlag. Wettenberg. 3-8359-5006-1.
- Phillips, S.L. & D.J. Polzin** (1998): Clinical disorders of potassium homeostasis. Hyperkalemia and hypokalemia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 28 (3) 545-564.
- Plassart, E., A. Elbaz, J.V. Santos, J. Reboul, P. Lapie, D. Chauveau, K. Jurkat-Rott, J. Guimaraes, J.M. Saudubray, J. Weissenbach & et al.** (1994): Genetic heterogeneity in hypokalemic periodic paralysis (HypoPP). *Hum Genet* 94 (5) 551-556.
- Pollard, M.** (2004): Enzyklopädie der Katzen. Rassen, Pflege, Geschichte. Krone Verlag. Leichlingen.
- Prinzenberg, E.M.** (2005): Untersuchungen des felinen KCNE3-Gens im Zusammenhang mit der HypoPP der Burmakatze. persönliche Mitteilung.
- Prinzenberg, E.M., C. Klein & G. Erhardt** (2006): Typisierung von felinen Mikrosatelliten auf D1, E1 und F1. unveröffentlichte Daten.
- Ptacek, L.J., A.L. George, Jr., R.L. Barchi, R.C. Griggs, J.E. Riggs, M. Robertson & M.F. Leppert** (1992): Mutations in an S4 segment of the adult skeletal muscle sodium channel cause paramyotonia congenita. *Neuron* 8 (5) 891-897.
- Ptacek, L.J., R. Tawil, R.C. Griggs, A.G. Engel, R.B. Layzer, H. Kwiecinski, P.G. McManis, L. Santiago, M. Moore, G. Fouad & et al.** (1994a): Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 77 (6) 863-868.
- Ptacek, L.J., R. Tawil, R.C. Griggs, G. Meola, P. McManis, R.J. Barohn, J.R. Mendell, C. Harris, R. Spitzer & F. Santiago** (1994b): Sodium channel mutations in acetazolamide-responsive myotonia congenita, paramyotonia congenita, and hyperkalemic periodic paralysis. *Neurology* 44 (8) 1500-1503.
- Randi, E., M. Pierpaoli, M. Beaumont, B. Ragni & A. Sforzi** (2001): Genetic identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using Bayesian clustering methods. *Mol Biol Evol* 18 (9) 1679-1693.
- Rettenberger, G., C. Klett, U. Zechner, J. Bruch, W. Just, W. Vogel & H. Hameister** (1995): ZOO-FISH analysis: cat and human karyotypes closely resemble the putative ancestral mammalian karyotype. *Chromosome Res* 3 (8) 479-486.
- Risch, N. & K. Merikangas** (1996): The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273 (5281) 1516-1517.
- Robinson, R.** (1991): Colour and cat inheritance. Hrsg. Robinson, R.: Genetics for cat breeders. Pergamon Press. Oxford. 110 - 229.
- Rogalska-Niznik, N., I. Szczerbal, G. Dolf, J. Schlapfer, C. Schelling & M. Switonski** (2003): Canine-derived cosmid probes containing microsatellites can be used in physical mapping of Arctic fox (*Alopex lagopus*) and Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*) genomes. *J Hered* 94 (1) 89-93.
- Ropers, H.H. & H.B. Szliwowski** (1979): Periodic hypokalemic paralysis transmitted by an unaffected male with negative family history: a delayed mutation? *Hum Genet* 48 (1) 113-116.
- Rothschild, M.F., Z.L. Hu & Z. Jiang** (2007): Advances in QTL mapping in pigs. *Int J Biol Sci* 3 (3) 192-197.
- Rudolph, J.A., S.J. Spier, G. Byrns, C.V. Rojas, D. Bernoco & E.P. Hoffman** (1992): Periodic paralysis in Quarter horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding. *Nat Genet* 2 (2) 144-147.

- Ruff, R.L.** (1999): Insulin acts in hypokalemic periodic paralysis by reducing inward rectifier K⁺ current. *Neurology* 53 (7) 1556-1563.
- Safra, N., G.V. Ling, R.H. Schaible & D.L. Bannasch** (2005): Exclusion of urate oxidase as a candidate gene for hyperuricosuria in the Dalmatian dog using an interbreed backcross. *J Hered* 96 (7) 750-754.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich & N. Arnheim** (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732) 1350-1354.
- Saletti, P., I.D. Edwin, K. Pack, F. Cavalli & W.S. Atkin** (2001): Microsatellite instability: application in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Ann Oncol* 12 (2) 151-160.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis** (1989): *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour.
- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12) 5463-5467.
- Schmidt-Küntzel, A., E. Eizirik, J. O'Brien S & M. Menotti-Raymond** (2005): Tyrosinase and tyrosinase related protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci. *J Hered* 96 (4) 289-301.
- Schneeberger, C. & M.W. Mueller** (2005): Genetische Variation - Eine Einführung aus genetischer Sicht. *anti aging for professionals* 2 52-56.
- Seaton, G., C.S. Haley, S.A. Knott, M. Kearsey & P.M. Visscher** (2002): QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* 18 (2) 339-340.
- Shell, L.G.** (1995): Hypokalemic Polymyopathy. *Feline Pract* 23 (6) 28-29.
- Shell, L.G.** (1998): A review of feline neuromuscular diseases. *Vet Med* (6) 565-574.
- Sillen, A., T. Sorensen, I. Kantola, M.L. Friis, K.H. Gustavson & C. Wadelius** (1997): Identification of mutations in the CACNL1A3 gene in 13 families of Scandinavian origin having hypokalemic periodic paralysis and evidence of a founder effect in Danish families. *Am J Med Genet* 69 (1) 102-106.
- Singh, A., A. Gaur, K. Shailaja, B. Satyare Bala & L. Singh** (2004): A novel microsatellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India. *Forensic Sci Int* 141 (2-3) 143-147.
- Smith, D.R., D. Saranga, K. McKernan & W. Tao** (2006): Direct Submission to NCBI Nucleotide database. 08.02.2006.
- Soller, M. & A. Genzini** (1998): Candidate genes as QTL. Conference Proceedings. 26th International Conference on Animal Genetics. Auckland, New Zealand. 9-14 August 1998.
- Somers, K.L., M.A. Royals, E.D. Carstea, M.A. Rafi, D.A. Wenger & M.A. Thrall** (2003): Mutation analysis of feline Niemann-Pick C1 disease. *Mol Genet Metab* 79 99-103.
- Sponenberg, D.P. & E. Graf-Webster** (1986): Hereditary meningoencephalocele in Burmese cats. *J Hered* 77 (1) 60.
- Sternberg, D., T. Maisonobe, K. Jurkat-Rott, S. Nicole, E. Launay, D. Chauveau, N. Tabti, F. Lehmann-Horn, B. Hainque & B. Fontaine** (2001): Hypokalaemic periodic paralysis type 2 caused by mutations at codon 672 in the muscle sodium channel gene SCN4A. *Brain* 124 (Pt 6) 1091-1099.
- Sternberg, D., N. Tabti, E. Fournier, B. Hainque & B. Fontaine** (2003): Lack of association of the potassium channel-associated peptide MiRP2-R83H variant with periodic paralysis. *Neurology* 61 (6) 857-859.
- Stolze, M., C. Lund, J.G. Kresken & K.J. Saers** (2001): Periodische hypokaliämische Polymyopathie bei der Burmakatze. *Kleintierpraxis* 46 (5) 289-296.
- Stranzinger, G.** (1997): Genetische Grundlagen - Zytogenetik. Hrsg. Kräußlich, H.: Tierzuchtungslehre. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart. 84-99.
- Struyk, A.F., K.A. Scoggan, D.E. Bulman & S.C. Cannon** (2000): The human skeletal muscle Na channel mutation R669H associated with hypokalemic periodic paralysis enhances slow inactivation. *J Neurosci* 20 (23) 8610-8617.
- Sturgess, C.P., L. Waters, T.J. Gruffydd-Jones, H.M. Nott & K.E. Earle** (1997): Investigation of the association between whole blood and tissue taurine levels and the development of thoracic deformities in neonatal Burmese kittens. *Vet Rec* 141 (22) 566-570.
- Sugiura, Y., T. Aoki, Y. Sugiyama, C. Hida, M. Ogata & T. Yamamoto** (2000): Temperature-sensitive sodium channelopathy with heat-induced myotonia and cold-induced paralysis. *Neurology* 54 (11) 2179-2181.
- Sugiura, Y., N. Makita, L. Li, P.J. Noble, J. Kimura, Y. Kumagai, T. Soeda & T. Yamamoto** (2003): Cold induces shifts of voltage dependence in mutant SCN4A, causing hypokalemic periodic paralysis. *Neurology* 61 (7) 914-918.
- Sun, H., M. Yang, M.E. Haskins, D.F. Patterson & J.H. Wolfe** (1999): Retrovirus vector-mediated correction and cross-correction of lysosomal alpha-mannosidase deficiency in human and feline fibroblasts. *Hum Gene Ther* 10 (8) 1311-1319.
- Sun, S., W.J. Murphy, M. Menotti-Raymond & S.J. O'Brien** (2001): Integration of the feline radiation hybrid and linkage maps. *Mamm Genome* 12 (6) 436-441.

- Szczerbal, I. & E. Michalak** (2003): FISH-localization of the nucleolar organizer region on the feline E1p12 chromosome. *Anim Genet* 34 (5) 386-387.
- Szczerbal, I., N. Rogalska-Niznik, C. Schelling, J. Schlapfer, G. Dolf & M. Switonski** (2003a): Development of a cytogenetic map for the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*) and the arctic fox (*Alopex lagopus*) genomes, using canine-derived microsatellite probes. *Cytogenet Genome Res* 102 (1-4) 267-271.
- Szczerbal, I., M. Switonski, E. Michalak, N. Rogalska-Niznik, J. Szamalek & C. Schelling** (2003b): FISH mapping of two putative keratin gene clusters on cat (*Felis catus*) chromosomes. *J Hered* 94 (1) 107-110.
- Talbott, J.H.** (1941): Periodic Paralysis: a clinical syndrome. *Medicine* 20 85-143.
- Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose & S. Numa** (1987): Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328 (6128) 313-318.
- Tardiff, J.C.** (2005): Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes. *Heart Fail Rev* 10 (3) 237-248.
- Tautz, D.** (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17 (16) 6463-6471.
- Taylor, R.M. & J.H. Wolfe** (1994): Cross-correction of beta-glucuronidase deficiency by retroviral vector-mediated gene transfer. *Exp Cell Res* 214 (2) 606-613.
- Taylor, S.M.** (2000): Selected disorders of muscle and the neuromuscular junction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 30 (1) 59-75.
- Thompson, J.C., V.C. Cobb, C.E. Keeler & M. Dmytryk** (1943): Genetics of the Burmese cat. *J Hered* 35 119-123.
- Thormann, I., M. Pleus & B. Esser** (2001): Hypokaliämie. *Burma Notizen* (2) 17-19.
- Tier, B.** (1990): Computing inbreeding coefficients quickly. *Genet Sel Evol* 22 419-430.
- TierSchG** (2006): Tierschutzgesetz. Fundstelle BGBl I 1972, letzte Fassung 18.05.2006 1277.
- TierZG** (2006): Tierzuchtgesetz. Fundstelle BGBl I 2006, letzte Fassung 21.12.2006 3294.
- Tryon, R.C., S.D. White, T.R. Famula, P.C. Schultheiss, D.W. Hamar & D.L. Bannasch** (2005): Inheritance of hereditary equine regional dermal asthenia in Quarter Horses. *Am J Vet Res* 66 (3) 437-442.
- Tseng, T.T., A.M. McMahon, R.J. Zahm, M.E. Pacold & E. Jakobsson** (2006): Calcium channel auxiliary subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol* 11 (6) 326-344.
- Veerkamp, R.F. & B. Beerda** (2007): Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology* 68 Suppl 1 S266-273.
- Vella, C. & J. McGonagle** (1995): *Burmese Cats. A Complete Pet Owner's Manual*. Barron's Educational Series. Hauppauge, USA.
- Vella, C.M., L.M. Shelton, J.J. McGonagle & T.W. Stanglein** (1999): *Robinson's Genetics for Cat Breeders and Veterinarians*. Elsevier Butterworth-Heinemann. Burlington.
- Venance, S.L., S.C. Cannon, D. Fialho, B. Fontaine, M.G. Hanna, L.J. Ptacek, M. Tristani-Firouzi, R. Tawil & R.C. Griggs** (2006): The primary periodic paralyses: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain* 129 (Pt 1) 8-17.
- Venance, S.L., K. Jurkat-Rott, F. Lehmann-Horn & R. Tawil** (2004): SCN4A-associated hypokalemic periodic paralysis merits a trial of acetazolamide. *Neurology* 63 (10) 1977.
- Verhoeff-Verhallen, E.J.J.** (2000): *Katzen Enzyklopädie*. Naumann & Göbel Verlagsgesellschaft mbH. Köln.
- Vicart, S., D. Sternberg, B. Fontaine & G. Meola** (2005): Human skeletal muscle sodium channelopathies. *Neurol Sci* 26 (4) 194-202.
- Vigne, J.D., J. Guilaine, K. Debue, L. Haye & P. Gerard** (2004): Early taming of the cat in Cyprus. *Science* 304 (5668) 259.
- Wang, L., R. Luhm & M. Lei** (2007): SNP and mutation analysis. *Adv Exp Med Biol* 593 105-116.
- WCF** (2006): World Cat Federation (WCF). <http://www.wcf-online.de>. 2006.
- WCF** (2007): World Cat Federation (WCF) - Breeds Standards. <http://www.wcf-online.de/english/index.htm>. 2007.
- Weimann, C.** (2000): *Entwicklung von DNA-Markern an den Inhibin/Aktivin-Genorten bei Schaf, Rind und Ziege*. Dissertation. Justus-Liebig-Universität. Gießen.
- Wheeler, D.L., C. Chappay, A.E. Lash, D.D. Leipe, T.L. Madden, G.D. Schuler, T.A. Tatusova & B.A. Rapp** (2000): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 28 (1) 10-14.
- Wienberg, J. & R. Stanyon** (1997): Comparative painting of mammalian chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 7 784 - 791.
- Winand, N.J., M. Edwards, D. Pradhan, C.A. Berian & B.J. Cooper** (1994): Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4 433-445.

LITERATURVERZEICHNIS

- Wurster-Hill, D.H. & C.W. Gray** (1973): Giemsa banding patterns in the chromosomes of twelve species of cats (Felidae). *Cytogenet Cell Genet* 12 (6) 388-397.
- Xu, Y.C., B. Li, W.S. Li, S.Y. Bai, Y. Jin, X.P. Li, M.B. Gu, S.Y. Jing & W. Zhang** (2005): Individualization of tiger by using microsatellites. *Forensic Sci Int* 151 (1) 45-51.
- Yang, F., A. Graphodatsky, P. O'Brien, A. Colabella, N. Solanky, M. Squire, D. Sargan & M. Ferguson-Smith** (2000): Reciprocal chromosome painting illuminates the history of genome evolution of the domestic cat, dog and human. *Chromosome Res* 8 (5) 393-404.
- Yogalingam, G., T. Litjens, J. Bielicki, A.C. Crawley, V. Muller, D.S. Anson & J.J. Hopwood** (1996): Feline Mucopolysaccharidosis Type VI. Characterisation of recombinant N-acetylgalactosamine 4-sulfatase and identification of a mutation causing the disease. *J Biol Chem* 271 (44) 27259-27265.
- Young, A.E., D.S. Biller, E.J. Heergesell, H.R. Roberts & L.A. Lyons** (2005): Feline polycystic kidney disease is linked to the PKD1 region. *Mamm Genome* 16 (1) 59-65.
- Young, A.E., L.P. Bower, V.K. Affolter, H.E. De Cock, G.L. Ferraro & D.L. Bannasch** (2006a): Evaluation of FOXC2 as a candidate gene for chronic progressive lymphedema in draft horses. *Vet J* [Epub ahead of print]
- Young, A.E., J.R. Ryun & D.L. Bannasch** (2006b): Deletions in the COL10A1 gene are not associated with skeletal changes in dogs. *Mamm Genome* 17 (7) 761-768.
- Young, M.S.** (1985): The evolution of domestic pets and companion animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 15 (2) 297-309.

10 Anhang

Tabelle 52: Übersicht aller verwendeten DNA-Proben (n = 210) mit Zuordnung zur jeweils angewandten Analyse

LabNr	EMS	Kat	Sex	Status	Seq	MS	SNP	Haplo	Vater	Mutter
2-1050	SIA	3	M	0		X	X			
2-1051	NFO	2	M	0		X	X	X		
2-1167	PER	1	W	0		X	X	X		
2-1215	EUR	3	M	0		X	X	X		
2-1217	EUR	3	W	0		X	X	X		
2-1262	SBI	2	M	0		X	X			
2-1338	EUR	3	M	0		X				
2-1349	MCO	2	M	0		X	X	X		
2-1384	PER	1	0	0		X	X	X		
2-1438	EUR	3	M	0		X				
2-1473	PER	1	W	0		X	X	X		
2-1474	PER	1	M	0		X	X	X		
2-1501	NFO	2	W	0		X	X	X		
2-1502	NFO	2	M	0		X	X	X		
2-1518	EUR	3	M	0		X				
2-1533	EUR	3	M	0		X				
2-1550	EUR	3	M	0		X				
2-1556	EUR	3	F	0		X				
2-1654	EUR	3	F	0		X				
2-1666	EUR	3	F	0		X				
2-1758	BIR	3	W	0		X	X	X		
2-1807	EUR	3	F	0		X				
2-1809	SBI	2	W	0		X	X	X		
2-1827	MCO	2	M	0		X	X	X		
2-1869	EUR	3	F	0		X				
2-1872	BUR	3	M	0		X	X	X		
2-1873	EUR	3	0	0		X				
2-2033	SIA	3	M	0		X	X	X		
2-2035	PER	1	W	0		X	X	X		
2-2036	RUS	3	W	0		X	X	X		
2-2039	BIR	3	0	0		X	X	X		
2-2103	EUR	3	M	0		X				
2-2149	BIR	3	M	0		X	X	X		
2-2155	PER	1	W	0		X	X			
2-2238	EUR	3	F	0		X				
2-2244	BIR	3	M	0		X	X	X		
3-0027	EUR	3	F	0		X				
3-0072	EUR	3	F	0		X				

Fortsetzung Tabelle 52: Übersicht aller verwendeten DNA-Proben (n = 210) mit Zuordnung zur jeweils angewandten Analyse

LabNr	EMS	Kat	Sex	Status	Seq	MS	SNP	Haplo	Vater	Mutter
3-0102	EUR	3	F	0		X				
3-0261	BIR	3	W	0		X	X	X		
3-0277	EUR	3	F	0		X				
3-0278	PER	1	W	0		X	X	X		
3-0293	EUR	3	F	0		X				
3-0306	EUR	3	M	0		X				
3-0327	EUR	3	F	0		X				
3-0328	EUR	3	M	0		X				
3-0344	NFO	2	M	0		X	X			
3-0408	EUR	3	M	0		X				
3-0466	CHA	3	M	0		X	X			
3-0526	SIA	3	W	0		X	X	X		
3-0543	PER	1	0	0		X	X	X		
3-0569	MCO	2	W	0		X	X			
3-0575	BIR	3	W	0		X	X	X		
3-0627	EUR	3	M	0		X				
3-0650	EUR	3	F	0		X				
3-0662	MCO	2	0	0		X	X	X		
3-0663	ABY	3	M	0		X	X	X		
3-0672	SIA	3	M	0		X	X	X		
3-0703	EUR	3	M	0		X				
3-0722	EUR	3	F	0		X				
3-0762	EUR	3	F	0		X				
3-0780	EUR	3	F	0		X				
3-0841	TUA	3	0	0		X	X			
3-0842	EUR	3	F	0		X				
3-0869	EUR	3	M	0		X				
3-0872	EUR	3	M	0		X				
3-0902	EUR	3	M	0		X				
3-0915	EUR	3	M	0		X				
3-0938	CHA	3	W	0		X	X	X		
3-0958	MCO	2	0	0		X	X	X		
3-0969	MCO	2	M	0		X	X	X		
3-1020	EUR	3	M	0		X				
3-1043	EUR	3	0	0		X				
3-1071	EUR	3	F	0		X				
3-1076	EUR	3	F	0		X				
3-1087	PER	1	W	0		X	X			
3-1116	NFO	2	0	0		X	X	X		
3-1117	PER	1	W	0		X	X			
3-1150	EUR	3	M	0		X				
3-1184	MCO	2	M	0		X	X	X		

Fortsetzung Tabelle 52: Übersicht aller verwendeten DNA-Proben (n = 210) mit Zuordnung zur jeweils angewandten Analyse

LabNr	EMS	Kat	Sex	Status	Seq	MS	SNP	Haplo	Vater	Mutter
3-1188	PER	1	W	0		X	X	X		
3-1242	EUR	3	F	0		X				
3-1267	SIB	3	W	0		X	X	X		
3-1309	EXO	3	0	0		X	X	X		
3-1412	SBI	2	M	0		X	X	X		
3-1597	PER	3	0	0		X	X	X		
3-1948	CHA	3	M	0		X	X	X		
3-1992	NFO	2	W	0		X	X	X		
HK01	BUR	3	M	1	X	X	X	X	HK07	HK04
HK02	BUR	3	F	0		X	X			
HK03	BUR	3	M	0		X	X	X	HK07	HK04
HK04	BUR	3	F	0	X	X	X	X		HK45
HK05	BUR	3	F	1		X	X	X	HK07	HK04
HK06	BUR	3	F	0	X	X	X			
HK07	BUR	3	M	0		X	X	X		
HK08	BUR	3	M	1		X	X	X	HK10	HK19
HK09	BUR	3	F	1		X	X	X	HK10	HK12
HK10	BUR	3	M	0		X	X	X		HK45
HK11	BUR	3	F	1		X	X	X	HK10	HK12
HK12	BUR	3	F	0		X	X	X	HK46	HK47
HK13	BUR	3	F	0		X	X	X		HK18
HK14	BUR	3	F	1		X	X	X		HK18
HK15	BUR	3	M	0		X	X	X		HK18
HK16	BUR	3	M	0		X	X	X		HK18
HK17	BUR	3	F	0		X	X	X		HK18
HK18	BUR	3	F	0		X	X	X		
HK19	BUR	3	F	0		X	X	X		
HK20	BUR	3	F	0		X	X	X	HK08	HK22
HK21	BUR	3	M	0		X	X	X	HK08	HK22
HK22	BUR	3	F	0		X	X	X		HK45
HK23	BUR	3	F	0		X	X	X	HK08	HK36
HK24	BUR	3	F	0		X	X	X	HK10	HK41
HK25	BUR	3	M	0		X	X	X	HK35	HK01
HK26	BUR	3	F	0		X	X	X	HK10	HK27
HK27	BUR	3	F	0		X	X	X		
HK28	BUR	3	M	0		X	X	X	HK10	HK27
HK29	BUR	3	M	1		X	X	X		
HK30	BUR	3	F	0		X	X	X		HK18
HK31	BUR	3	F	0		X	X	X	HK08	HK36
HK32	BUR	3	F	0		X	X	X	HK10	HK12
HK33	BUR	3	M	0		X	X	X	HK10	
HK34	BUR	3	F	0		X	X			

Fortsetzung Tabelle 52: Übersicht aller verwendeten DNA-Proben (n = 210) mit Zuordnung zur jeweils angewandten Analyse

LabNr	EMS	Kat	Sex	Status	Seq	MS	SNP	Haplo	Vater	Mutter
HK35	BUR	3	M	0		X	X	X	HK10	HK12
HK36	BUR	3	F	0		X	X	X	HK46	
HK37	BUR	3	F	0		X	X	X	HK08	
HK38	BUR	3	F	0		X	X			
HK39	BUR	3	F	0		X	X	X	HK28	
HK40	BUR	3	F	0		X	X	X	HK10	HK19
HK41	BUR	3	F	0		X	X	X		
HK42	BUR	3	M	0		X	X	X	HK10	HK19
HK43	BUR	3	F	0		X	X	X	HK08	HK36
HK44	BUR	3	M	0		X	X	X	HK08	HK36
HK45	BUR	3	F	0		X	X	X		
HK46	BUR	3	M	0		X	X	X		
HK47	BUR	3	F	0		X	X	X	HK48	HK45
HK48	BUR	3	M	0		X	X	X		
HK49	BUR	3	M	0		X	X	X		HK51
HK50	BUR	3	F	0		X	X	X		HK51
HK51	BUR	3	F	0		X	X	X		
HK52	BUR	3	F	0		X	X			
HK53	BUR	3	F	0		X	X	X	HK56	HK57
HK54	BUR	3	F	0		X	X		HK56	
HK55	BUR	3	M	0		X	X	X	HK56	HK57
HK56	BUR	3	M	0		X	X	X		
HK57	BUR	3	F	0		X	X	X		
HK58	BUR	3	F	0		X	X			
HK59	BUR	3	M	0		X	X	X	HK56	
HK60	BUR	3	F	0		X	X			
HK61	BUR	3	F	0		X	X			
HK62	BUR	3	F	0		X	X			
HK63	BUR	3	M	0		X	X			
HK64	BUR	3	M	0		X	X			
PK0	EUR	3	M	0	X	X	X			
PK3	EUR	3	F	0		X	X			
PK5	MCO	2	M	0		X	X	X		
PK6	EUR	3	M	0		X	X	X		
PK7+	EUR	3	M	0		X	X			
TK3	ORI	3	0	0		X	X	X		
TK4	MCO	2	F	0		X	X			
TK5	EUR	3	F	0		X	X	X		
TK6	EUR	3	F	0		X	X	X		
VK05	EUR	3	0	0		X	X	X		
VK08	SIA	3	0	0		X	X			
VK09	SBI	2	0	0		X	X	X		

Fortsetzung Tabelle 52: Übersicht aller verwendeten DNA-Proben (n = 210) mit Zuordnung zur jeweils angewandten Analyse

LabNr	EMS	Kat	Sex	Status	Seq	MS	SNP	Haplo	Vater	Mutter
VK11	MCO	2	0	0		X	X	X		
VK12	NFO	2	0	0		X		X		
VK13	SIA	3	0	0		X	X	X		
VK14	SIA	3	0	0		X	X	X		
VK15	SBI	2	0	0		X	X	X		
VK16	MCO	2	0	0		X	X	X		
VK18	RAG	2	0	0		X	X	X		
VK19	BUR	3	0	0		X	X	X		
WH01	PER	1	0	0		X	X	X		
WH02	PER	1	0	0		X	X	X		
WH03	PER	1	0	0		X	X	X		
WH04	PER	1	0	0		X	X	X		
WH05	PER	1	0	0		X	X	X		
WH06	PER	1	0	0		X				
WH07	PER	1	0	0		X				
WH08	PER	1	0	0		X				
WH09	PER	1	0	0		X				
WH10	PER	1	0	0		X				
WH11	PER	1	0	0		X				
WH12	PER	1	0	0		X				
WH13	PER	1	0	0		X				
WH14	PER	1	0	0		X				
WH15	PER	1	0	0		X				
WH16	PER	1	0	0		X				
WH17	PER	1	0	0		X				
WH18	PER	1	0	0		X				
WH19	PER	1	0	0		X				
WH20	PER	1	0	0		X				
WH21	PER	1	0	0		X				
WH22	PER	1	0	0		X				
WH23	PER	1	0	0		X				
WH24	PER	1	0	0		X				
WH25	PER	1	0	0		X				
WH26	PER	1	0	0		X				
WH27	PER	1	0	0		X				
WH28	PER	1	0	0		X				
WH29	PER	1	0	0		X				
WH30	PER	1	0	0		X				
WH31	PER	1	0	0		X				
WH32	PER	1	0	0		X				
WH33	PER	1	0	0		X				
WH35	PER	1	0	0		X				

ANHANG

EMS: Rassenkodierung nach *easy-mind-system*, Haplo: Bestimmung der SNP-Haplotypen, Kat: Haarlängen-kategorie (1: Langhaar, 2: Semilanghaar, 3: Kurzhaar), LabNr: Labornummer, MS: Mikrosatellitenanalyse des *GIKA001*, Seq: vergleichende Sequenzierung, Sex: Geschlecht (M: männlich, F: weiblich), SNP: SNP-Analyse mittels PCR-RFLP, Status: Phänotyp im Merkmal HypoPP (0: symptomfrei, 1: klinische Symptome)

Tabelle 53: Übersicht zur Zuordnung einzelner Burmakatzen in 21 Familien zur Analyse der Haplotypen mittels Famhap[®]

Familien-nummer	Labor-nummer	Sex	Status	Vater	Mutter
1	HK01	M	1	HK07	HK04
1	HK03	M	0	HK07	HK04
1	HK04	F	0	D1	HK45
1	HK05	F	1	HK07	HK04
1	HK07	M	0	0	0
2	HK08	M	1	HK10	HK19
2	HK10	M	0	D1	HK45
2	HK19	F	0	0	0
2	HK40	F	0	HK10	HK19
2	HK42	M	0	HK10	HK19
3	HK09	F	1	HK10	HK12
3	HK10	M	0	D1	HK45
3	HK11	F	1	HK10	HK12
3	HK12	F	0	HK46	HK47
3	HK32	F	0	HK10	HK12
3	HK35	M	0	HK10	HK12
4	HK12	F	0	HK46	HK47
4	HK46	M	0	0	0
4	HK47	F	0	HK48	HK45
5	HK45	F	0	0	0
5	HK47	F	0	HK48	HK45
5	HK48	M	0	0	0
6	D1	M	0	0	0

Fortsetzung Tabelle 53: Übersicht zur Zuordnung einzelner Burmakatzen in 21 Familien zur Analyse der Haplotypen mittels Famhap[®]

Familien- nummer	Labor- nummer	Sex	Status	Vater	Mutter
6	HK04	F	0	D1	HK45
6	HK10	M	0	D1	HK45
6	HK22	F	0	D1	HK45
6	HK45	F	0	0	0
7	HK10	M	0	D1	HK45
7	HK24	F	0	HK10	HK41
7	HK41	F	0	0	0
8	HK08	M	1	HK10	HK19
8	HK20	F	0	HK08	HK22
8	HK21	M	0	HK08	HK22
8	HK22	F	0	D1	HK45
9	D2	M	0	0	0
9	HK13	F	0	D2	HK18
9	HK17	F	0	D2	HK18
9	HK18	F	0	0	0
10	D3	M	0	0	0
10	HK14	F	1	D3	HK18
10	HK15	M	0	D3	HK18
10	HK16	M	0	D3	HK18
10	HK18	F	0	0	0
10	HK30	F	0	D3	HK18
11	HK08	M	1	HK10	HK19
11	HK23	F	0	HK08	HK36
11	HK31	F	0	HK08	HK36
11	HK36	F	0	HK46	0
11	HK43	F	0	HK08	HK36
11	HK44	M	0	HK08	HK36
12	HK25	M	0	HK35	HK41
12	HK35	M	0	HK10	HK12
12	HK41	F	0	0	0
13	HK10	M	0	D1	HK45
13	HK26	F	0	HK10	HK27
13	HK27	F	0	0	0
13	HK28	M	0	HK10	HK27
14	HK53	F	0	HK56	HK57
14	HK55	M	0	HK56	HK57
14	HK56	M	0	0	0
14	HK57	F	0	0	0
15	D4	F	0	0	0
15	HK10	M	0	D1	HK45
15	HK33	M	0	HK10	D4
16	D5	M	0	0	0

Fortsetzung Tabelle 53: Übersicht zur Zuordnung einzelner Burmakatzen in 21 Familien zur Analyse der Haplotypen mittels Famhap[®]

Familiennummer	Labornummer	Sex	Status	Vater	Mutter
16	HK29	M	1	D5	HK30
16	HK30	F	0	D3	HK18
17	D6	M	0	0	0
17	HK49	M	0	D6	HK51
17	HK50	F	0	D6	HK51
17	HK51	F	0	0	0
18	D7	F	0	0	0
18	HK54	F	0	HK56	D7
18	HK56	M	0	0	0
18	HK59	M	0	HK56	D7
19	D8	F	0	0	0
19	HK36	F	0	HK46	D8
19	HK46	M	0	0	0
20	D9	F	0	0	0
20	HK08	M	1	HK10	HK19
20	HK37	F	0	HK8	D9
21	D10	F	0	0	0
21	HK28	M	0	HK10	HK27
21	HK39	F	0	HK28	D10

Sex: Geschlecht (M: männlich, F: weiblich), Status: Phänotyp im Merkmal HypoPP (0: symptomfrei, 1: klinische Symptome), Vater/Mutter (O: unbekannt)

Tabelle 54: Verwandtschaftsmatrix der Burmakatzen (n = 64)

LabNr	HK01	HK02	HK03	HK04	HK05	HK06	HK07	HK08	HK09	HK10	HK11	HK12	HK13
HK01	0,00												
HK02	0,01	0,00											
HK03	0,53	0,01	0,00										
HK04	0,50	0,01	0,50	0,00									
HK05	0,53	0,01	0,53	0,50	0,00								
HK06	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,04							
HK07	0,55	0,00	0,55	0,00	0,55	0,00	0,11						
HK08	0,14	0,01	0,14	0,27	0,14	0,00	0,00	0,01					
HK09	0,16	0,01	0,16	0,33	0,16	0,00	0,00	0,30	0,07				
HK10	0,26	0,01	0,26	0,52	0,26	0,00	0,00	0,51	0,57	0,00			
HK11	0,16	0,01	0,16	0,33	0,16	0,00	0,00	0,30	0,57	0,57	0,07		
HK12	0,07	0,01	0,07	0,13	0,07	0,00	0,00	0,08	0,57	0,13	0,57	0,00	
HK13	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,00	0,00	0,05	0,05	0,03	0,05	0,08	0,00
HK14	0,04	0,08	0,04	0,07	0,04	0,02	0,00	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06	0,31
HK15	0,04	0,08	0,04	0,07	0,04	0,02	0,00	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06	0,31
HK16	0,04	0,08	0,04	0,07	0,04	0,02	0,00	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06	0,31
HK17	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,00	0,00	0,05	0,05	0,03	0,05	0,08	0,50
HK18	0,03	0,03	0,03	0,05	0,03	0,01	0,00	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,50
HK19	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,00	0,00	0,53	0,03	0,03	0,03	0,03	0,07

Fortsetzung Tabelle 54: Verwandtschaftsmatrix der Burmakatzen (n = 64)

LabNr	HK01	HK02	HK03	HK04	HK05	HK06	HK07	HK08	HK09	HK10	HK11	HK12	HK13
HK20	0,20	0,01	0,20	0,40	0,20	0,00	0,00	0,64	0,31	0,52	0,31	0,11	0,04
HK21	0,20	0,01	0,20	0,40	0,20	0,00	0,00	0,64	0,31	0,52	0,31	0,11	0,04
HK22	0,26	0,01	0,26	0,52	0,26	0,00	0,00	0,27	0,33	0,52	0,33	0,13	0,03
HK23	0,10	0,01	0,10	0,20	0,10	0,00	0,00	0,54	0,26	0,32	0,26	0,20	0,04
HK24	0,14	0,01	0,14	0,28	0,14	0,00	0,01	0,27	0,30	0,52	0,30	0,08	0,03
HK25	0,10	0,01	0,10	0,18	0,10	0,00	0,01	0,17	0,30	0,30	0,30	0,30	0,04
HK26	0,15	0,03	0,15	0,29	0,15	0,01	0,00	0,29	0,31	0,53	0,31	0,09	0,04
HK27	0,03	0,04	0,03	0,07	0,03	0,01	0,00	0,06	0,05	0,07	0,05	0,04	0,06
HK28	0,15	0,03	0,15	0,29	0,15	0,01	0,00	0,29	0,31	0,53	0,31	0,09	0,04
HK29	0,08	0,05	0,08	0,17	0,08	0,01	0,00	0,11	0,13	0,17	0,13	0,10	0,16
HK30	0,04	0,08	0,04	0,07	0,04	0,02	0,00	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06	0,31
HK31	0,10	0,01	0,10	0,20	0,10	0,00	0,00	0,54	0,26	0,32	0,26	0,20	0,04
HK32	0,16	0,01	0,16	0,33	0,16	0,00	0,00	0,30	0,57	0,57	0,57	0,57	0,05
HK33	0,16	0,01	0,16	0,26	0,16	0,00	0,06	0,26	0,28	0,50	0,28	0,07	0,01
HK34	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,00	0,01	0,16	0,02	0,03	0,02	0,02	0,04
HK35	0,16	0,01	0,16	0,33	0,16	0,00	0,00	0,30	0,57	0,57	0,57	0,57	0,05
HK36	0,06	0,01	0,06	0,13	0,06	0,00	0,00	0,07	0,22	0,13	0,22	0,32	0,03
HK37	0,08	0,01	0,08	0,15	0,08	0,00	0,00	0,59	0,16	0,27	0,16	0,05	0,05
HK38	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
HK39	0,08	0,02	0,08	0,15	0,08	0,00	0,01	0,18	0,17	0,27	0,17	0,06	0,04
HK40	0,14	0,01	0,14	0,27	0,14	0,00	0,00	0,52	0,30	0,51	0,30	0,08	0,05
HK41	0,03	0,01	0,03	0,04	0,03	0,00	0,02	0,04	0,03	0,04	0,03	0,02	0,03
HK42	0,14	0,01	0,14	0,27	0,14	0,00	0,00	0,52	0,30	0,51	0,30	0,08	0,05
HK43	0,10	0,01	0,10	0,20	0,10	0,00	0,00	0,54	0,26	0,32	0,26	0,20	0,04
HK44	0,10	0,01	0,10	0,20	0,10	0,00	0,00	0,54	0,26	0,32	0,26	0,20	0,04
HK45	0,25	0,02	0,25	0,51	0,25	0,01	0,00	0,28	0,39	0,51	0,39	0,26	0,05
HK46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,25	0,50	0,00
HK47	0,13	0,02	0,13	0,26	0,13	0,00	0,00	0,16	0,39	0,26	0,39	0,51	0,16
HK48	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,04	0,14	0,02	0,14	0,26	0,28
HK49	0,15	0,00	0,15	0,30	0,15	0,00	0,00	0,15	0,15	0,30	0,15	0,00	0,00
HK50	0,15	0,00	0,15	0,30	0,15	0,00	0,00	0,15	0,15	0,30	0,15	0,00	0,00
HK51	0,03	0,00	0,03	0,06	0,03	0,00	0,00	0,03	0,03	0,06	0,03	0,00	0,00
HK52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK53	0,08	0,00	0,08	0,15	0,08	0,00	0,00	0,08	0,08	0,15	0,08	0,00	0,00
HK54	0,04	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK55	0,08	0,00	0,08	0,15	0,08	0,00	0,00	0,08	0,08	0,15	0,08	0,00	0,00
HK56	0,14	0,00	0,14	0,28	0,14	0,00	0,00	0,14	0,14	0,28	0,14	0,00	0,00
HK57	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00
HK58	0,17	0,00	0,17	0,27	0,17	0,00	0,08	0,13	0,13	0,27	0,13	0,00	0,00
HK59	0,11	0,00	0,11	0,14	0,11	0,00	0,08	0,07	0,07	0,14	0,07	0,00	0,00
HK60	0,17	0,00	0,17	0,27	0,17	0,00	0,08	0,13	0,13	0,27	0,13	0,00	0,00
HK61	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
HK62	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
HK63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
HK64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01

ANHANG

Fortsetzung Tabelle 54: Verwandtschaftsmatrix der Burmakatzen (n = 64)

LabNr	HK14	HK15	HK16	HK17	HK18	HK19	HK20	HK21	HK22	HK23	HK24	HK25	HK26
HK09													
HK10													
HK11													
HK12													
HK13													
HK14	0,13												
HK15	0,63	0,13											
HK16	0,63	0,63	0,13										
HK17	0,31	0,31	0,31	0,00									
HK18	0,63	0,63	0,63	0,50	0,00								
HK19	0,09	0,09	0,09	0,07	0,06	0,04							
HK20	0,08	0,08	0,08	0,04	0,05	0,28	0,14						
HK21	0,08	0,08	0,08	0,04	0,05	0,28	0,64	0,14					
HK22	0,07	0,07	0,07	0,03	0,05	0,03	0,64	0,64	0,00				
HK23	0,07	0,07	0,07	0,04	0,06	0,27	0,37	0,37	0,20	0,04			
HK24	0,08	0,08	0,08	0,03	0,06	0,03	0,28	0,28	0,28	0,17	0,02		
HK25	0,07	0,07	0,07	0,04	0,05	0,03	0,17	0,17	0,18	0,14	0,42	0,02	
HK26	0,14	0,14	0,14	0,04	0,08	0,04	0,29	0,29	0,29	0,18	0,29	0,18	0,03
HK27	0,21	0,21	0,21	0,06	0,11	0,06	0,06	0,06	0,07	0,05	0,07	0,06	0,58
HK28	0,14	0,14	0,14	0,04	0,08	0,04	0,29	0,29	0,29	0,18	0,29	0,18	0,56
HK29	0,35	0,35	0,35	0,16	0,33	0,05	0,14	0,14	0,17	0,10	0,12	0,10	0,16
HK30	0,63	0,63	0,63	0,31	0,63	0,09	0,08	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,14
HK31	0,07	0,07	0,07	0,04	0,06	0,27	0,37	0,37	0,20	0,54	0,17	0,14	0,18
HK32	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,03	0,31	0,31	0,33	0,26	0,30	0,30	0,31
HK33	0,04	0,04	0,04	0,01	0,03	0,01	0,26	0,26	0,26	0,16	0,26	0,15	0,27
HK34	0,09	0,09	0,09	0,04	0,06	0,29	0,09	0,09	0,03	0,09	0,05	0,05	0,04
HK35	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,03	0,31	0,31	0,33	0,26	0,30	0,55	0,31
HK36	0,05	0,05	0,05	0,03	0,06	0,01	0,10	0,10	0,13	0,54	0,07	0,12	0,08
HK37	0,09	0,09	0,09	0,05	0,05	0,41	0,37	0,37	0,15	0,31	0,16	0,11	0,16
HK38	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,20
HK39	0,10	0,10	0,10	0,04	0,06	0,08	0,17	0,17	0,15	0,11	0,16	0,11	0,29
HK40	0,08	0,08	0,08	0,05	0,05	0,53	0,40	0,40	0,27	0,30	0,27	0,17	0,29
HK41	0,08	0,08	0,08	0,03	0,06	0,03	0,04	0,04	0,04	0,03	0,55	0,54	0,06
HK42	0,08	0,08	0,08	0,05	0,05	0,53	0,40	0,40	0,27	0,30	0,27	0,17	0,29
HK43	0,07	0,07	0,07	0,04	0,06	0,27	0,37	0,37	0,20	0,54	0,17	0,14	0,18
HK44	0,07	0,07	0,07	0,04	0,06	0,27	0,37	0,37	0,20	0,54	0,17	0,14	0,18
HK45	0,15	0,15	0,15	0,05	0,10	0,05	0,39	0,39	0,51	0,27	0,30	0,23	0,32
HK46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,13	0,00
HK47	0,11	0,11	0,11	0,16	0,08	0,05	0,21	0,21	0,26	0,15	0,16	0,22	0,17
HK48	0,07	0,07	0,07	0,28	0,05	0,05	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,08	0,03
HK49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,22	0,30	0,07	0,15	0,07	0,15
HK50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,22	0,30	0,07	0,15	0,07	0,15
HK51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05	0,06	0,02	0,03	0,02	0,03
HK52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
HK53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,12	0,15	0,04	0,08	0,04	0,08
HK54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,12	0,15	0,04	0,08	0,04	0,08
HK56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,21	0,28	0,07	0,14	0,07	0,14
HK57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
HK58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,20	0,27	0,07	0,13	0,07	0,13
HK59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,11	0,14	0,04	0,07	0,04	0,07
HK60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,20	0,27	0,07	0,13	0,07	0,13
HK61	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,01
HK62	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,01
HK63	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK64	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,04	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00

Fortsetzung Tabelle 54: Verwandtschaftsmatrix der Burmakatzen (n = 64)

LabNr	HK27	HK28	HK29	HK30	HK31	HK32	HK33	HK34	HK35	HK36	HK37	HK38	HK39
HK09													
HK10													
HK11													
HK12													
HK13													
HK14													
HK15													
HK16													
HK17													
HK18													
HK19													
HK20													
HK21													
HK22													
HK23													
HK24													
HK25													
HK26													
HK27	0,10												
HK28	0,58	0,03											
HK29	0,16	0,16	0,04										
HK30	0,21	0,14	0,60	0,13									
HK31	0,05	0,18	0,10	0,07	0,04								
HK32	0,05	0,31	0,13	0,06	0,26	0,07							
HK33	0,03	0,27	0,08	0,04	0,16	0,28	0,00						
HK34	0,06	0,04	0,05	0,09	0,09	0,02	0,01	0,01					
HK35	0,05	0,31	0,13	0,06	0,26	0,57	0,28	0,02	0,07				
HK36	0,03	0,08	0,09	0,05	0,54	0,22	0,06	0,01	0,22	0,00			
HK37	0,06	0,16	0,08	0,09	0,31	0,16	0,14	0,33	0,16	0,04	0,08		
HK38	0,39	0,20	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,00	
HK39	0,31	0,53	0,10	0,10	0,11	0,17	0,14	0,08	0,17	0,04	0,13	0,11	0,01
HK40	0,06	0,29	0,11	0,08	0,30	0,30	0,26	0,16	0,30	0,07	0,34	0,02	0,18
HK41	0,07	0,06	0,07	0,08	0,03	0,03	0,02	0,07	0,03	0,02	0,05	0,02	0,05
HK42	0,06	0,29	0,11	0,08	0,30	0,30	0,26	0,16	0,30	0,07	0,34	0,02	0,18
HK43	0,05	0,18	0,10	0,07	0,54	0,26	0,16	0,09	0,26	0,54	0,31	0,01	0,11
HK44	0,05	0,18	0,10	0,07	0,54	0,26	0,16	0,09	0,26	0,54	0,31	0,01	0,11
HK45	0,13	0,32	0,33	0,15	0,27	0,39	0,25	0,05	0,39	0,26	0,17	0,03	0,18
HK46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25	0,00	0,00	0,25	0,50	0,00	0,00	0,00
HK47	0,08	0,17	0,19	0,11	0,15	0,39	0,13	0,04	0,39	0,13	0,10	0,02	0,12
HK48	0,03	0,03	0,06	0,07	0,02	0,14	0,01	0,03	0,14	0,01	0,03	0,00	0,06
HK49	0,00	0,15	0,00	0,00	0,07	0,15	0,15	0,00	0,15	0,00	0,07	0,00	0,07
HK50	0,00	0,15	0,00	0,00	0,07	0,15	0,15	0,00	0,15	0,00	0,07	0,00	0,07
HK51	0,00	0,03	0,00	0,00	0,02	0,03	0,03	0,00	0,03	0,00	0,02	0,00	0,02
HK52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK53	0,00	0,08	0,00	0,00	0,04	0,08	0,08	0,00	0,08	0,00	0,04	0,00	0,04
HK54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK55	0,00	0,08	0,00	0,00	0,04	0,08	0,08	0,00	0,08	0,00	0,04	0,00	0,04
HK56	0,00	0,14	0,00	0,00	0,07	0,14	0,14	0,00	0,14	0,00	0,07	0,00	0,07
HK57	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
HK58	0,00	0,13	0,00	0,00	0,07	0,13	0,14	0,00	0,13	0,00	0,07	0,00	0,07
HK59	0,00	0,07	0,00	0,00	0,04	0,07	0,07	0,00	0,07	0,00	0,04	0,00	0,04
HK60	0,00	0,13	0,00	0,00	0,07	0,13	0,14	0,00	0,13	0,00	0,07	0,00	0,07
HK61	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03
HK62	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03
HK63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00

Fortsetzung Tabelle 54: Verwandtschaftsmatrix der Burmakatzen (n = 64)

LabNr	HK27	HK28	HK29	HK30	HK31	HK32	HK33	HK34	HK35	HK36	HK37	HK38	HK39
HK09													
HK10													
HK11													
HK12													
HK13													
HK14													
HK15													
HK16													
HK17													
HK18													
HK19													
HK20													
HK21													
HK22													
HK23													
HK24													
HK25													
HK26													
HK27	0,10												
HK28	0,58	0,03											
HK29	0,16	0,16	0,04										
HK30	0,21	0,14	0,60	0,13									
HK31	0,05	0,18	0,10	0,07	0,04								
HK32	0,05	0,31	0,13	0,06	0,26	0,07							
HK33	0,03	0,27	0,08	0,04	0,16	0,28	0,00						
HK34	0,06	0,04	0,05	0,09	0,09	0,02	0,01	0,01					
HK35	0,05	0,31	0,13	0,06	0,26	0,57	0,28	0,02	0,07				
HK36	0,03	0,08	0,09	0,05	0,54	0,22	0,06	0,01	0,22	0,00			
HK37	0,06	0,16	0,08	0,09	0,31	0,16	0,14	0,33	0,16	0,04	0,08		
HK38	0,39	0,20	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,00	
HK39	0,31	0,53	0,10	0,10	0,11	0,17	0,14	0,08	0,17	0,04	0,13	0,11	0,01
HK40	0,06	0,29	0,11	0,08	0,30	0,30	0,26	0,16	0,30	0,07	0,34	0,02	0,18
HK41	0,07	0,06	0,07	0,08	0,03	0,03	0,02	0,07	0,03	0,02	0,05	0,02	0,05
HK42	0,06	0,29	0,11	0,08	0,30	0,30	0,26	0,16	0,30	0,07	0,34	0,02	0,18
HK43	0,05	0,18	0,10	0,07	0,54	0,26	0,16	0,09	0,26	0,54	0,31	0,01	0,11
HK44	0,05	0,18	0,10	0,07	0,54	0,26	0,16	0,09	0,26	0,54	0,31	0,01	0,11
HK45	0,13	0,32	0,33	0,15	0,27	0,39	0,25	0,05	0,39	0,26	0,17	0,03	0,18
HK46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25	0,00	0,00	0,25	0,50	0,00	0,00	0,00
HK47	0,08	0,17	0,19	0,11	0,15	0,39	0,13	0,04	0,39	0,13	0,10	0,02	0,12
HK48	0,03	0,03	0,06	0,07	0,02	0,14	0,01	0,03	0,14	0,01	0,03	0,00	0,06
HK49	0,00	0,15	0,00	0,00	0,07	0,15	0,15	0,00	0,15	0,00	0,07	0,00	0,07
HK50	0,00	0,15	0,00	0,00	0,07	0,15	0,15	0,00	0,15	0,00	0,07	0,00	0,07
HK51	0,00	0,03	0,00	0,00	0,02	0,03	0,03	0,00	0,03	0,00	0,02	0,00	0,02
HK52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK53	0,00	0,08	0,00	0,00	0,04	0,08	0,08	0,00	0,08	0,00	0,04	0,00	0,04
HK54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK55	0,00	0,08	0,00	0,00	0,04	0,08	0,08	0,00	0,08	0,00	0,04	0,00	0,04
HK56	0,00	0,14	0,00	0,00	0,07	0,14	0,14	0,00	0,14	0,00	0,07	0,00	0,07
HK57	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
HK58	0,00	0,13	0,00	0,00	0,07	0,13	0,14	0,00	0,13	0,00	0,07	0,00	0,07
HK59	0,00	0,07	0,00	0,00	0,04	0,07	0,07	0,00	0,07	0,00	0,04	0,00	0,04
HK60	0,00	0,13	0,00	0,00	0,07	0,13	0,14	0,00	0,13	0,00	0,07	0,00	0,07
HK61	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03
HK62	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03
HK63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00

Fortsetzung Tabelle 54: Verwandtschaftsmatrix der Burmakatzen (n = 64)

LabNr	HK40	HK41	HK42	HK43	HK44	HK45	HK46	HK47	HK48	HK49	HK50	HK51	HK52
HK09													
HK10													
HK11													
HK12													
HK13													
HK14													
HK15													
HK16													
HK17													
HK18													
HK19													
HK20													
HK21													
HK22													
HK23													
HK24													
HK25													
HK26													
HK27													
HK28													
HK29													
HK30													
HK31													
HK32													
HK33													
HK34													
HK35													
HK36													
HK37													
HK38													
HK39													
HK40	0,01												
HK41	0,04	0,05											
HK42	0,52	0,04	0,01										
HK43	0,30	0,03	0,30	0,04									
HK44	0,30	0,03	0,30	0,54	0,04								
HK45	0,28	0,08	0,28	0,27	0,27	0,02							
HK46	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25	0,00	0,00						
HK47	0,16	0,05	0,16	0,15	0,15	0,53	0,00	0,02					
HK48	0,04	0,01	0,04	0,02	0,02	0,04	0,00	0,52	0,00				
HK49	0,15	0,00	0,15	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06			
HK50	0,15	0,00	0,15	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,06		
HK51	0,03	0,00	0,03	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,56	0,00	
HK52	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK53	0,08	0,00	0,08	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,21	0,13	0,00
HK54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HK55	0,08	0,00	0,08	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,21	0,13	0,00
HK56	0,14	0,00	0,14	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,34	0,13	0,00
HK57	0,02	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,09	0,13	0,00
HK58	0,13	0,00	0,13	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,30	0,06	0,00
HK59	0,07	0,00	0,07	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,17	0,06	0,00
HK60	0,13	0,00	0,13	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,30	0,06	0,00
HK61	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
HK62	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
HK63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
HK64	0,02	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00

Fortsetzung Tabelle 54: Verwandtschaftsmatrix der Burmakatzen (n = 64)

LabNr	HK53	HK54	HK55	HK56	HK57	HK58	HK59	HK60	HK61	HK62	HK63	HK64
HK09												
HK10												
HK11												
HK12												
HK13												
HK14												
HK15												
HK16												
HK17												
HK18												
HK19												
HK20												
HK21												
HK22												
HK23												
HK24												
HK25												
HK26												
HK27												
HK28												
HK29												
HK30												
HK31												
HK32												
HK33												
HK34												
HK35												
HK36												
HK37												
HK38												
HK39												
HK40												
HK41												
HK42												
HK43												
HK44												
HK45												
HK46												
HK47												
HK48												
HK49												
HK50												
HK51												
HK52												
HK53	0,02											
HK54	0,00	0,00										
HK55	0,54	0,00	0,02									
HK56	0,55	0,00	0,55	0,06								
HK57	0,52	0,00	0,52	0,05	0,00							
HK58	0,15	0,25	0,15	0,28	0,02	0,00						
HK59	0,28	0,25	0,28	0,53	0,02	0,39	0,00					
HK60	0,15	0,25	0,15	0,28	0,02	0,52	0,39	0,00				
HK61	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00			
HK62	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,50	0,00		
HK63	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	
HK64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06

Danke

- Herrn Professor Dr. Erhardt für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die Durchsicht des Manuskripts.
- Dr. Eva-Maria Prinzenberg für die Einwerbung der Informationen und Blutproben der Burmakatzen, das Korrekturlesen der Arbeit und die Grundlagen des Ruderns.
- PD Dr. Horst Brandt für die geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung, der Interpretation und der Compilierung und für das Glänzen in den Augen, wenn es um Statistik geht.
- Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ und insbesondere Prof. Dr. Petzinger und Prof. Dr. Bauerfeind für den Wissenszuwachs und die Möglichkeit, viele Forschungsgebiete und vor allem Methoden kennen zu lernen.
- Der Internationalen Gesellschaft für Tiergenetik ISAG für die Teilnahme an der International Conference of Animal Genetics in Tokyo 2004 und die Gelegenheit, mein Projekt, mein Institut und mein Land vertreten zu können.
- Prof. Switonski und Dr. Izabela Szczerbal für die gemeinsame Durchführung des FISH in Poznan.
- Zahlreichen Katzenbesitzern, der Klinik für Kleintiere, dem Institut für Veterinär-Pathologie und Dr. Hecht für Blut-, Gewebe- und DNA-Proben zahlreicher Katzen.
- Alexander Weis und Michael Suntz für die Zerlegung von frischtoten Katzen auf Zeit.
- Den Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik und dabei insbesondere Andreas Kaletsch, Christel Zörb, Heike Wagner, Kristina Glenske, Renate Latzke-Reinhard, Sandra Stein, Stephanie Wack und einigen LTA-Schülern für die Unterstützung meiner Arbeit, neue Koch- und Pferdeideen, Auskünfte und Daten über die Ferne und für meine gute Zeit in Gießen. Ganz besonders aber Carina Luft für ihre pragmatische Ader und dass sie immer für mich da war, auch in privaten Angelegenheiten.
- Meinen Eltern für ihre Unterstützung seit immer und für immer, ohne die weder das Studium noch die Promotion möglich gewesen wären.
- Meinem „persönlichen Molekularbiologen“ Dr. Holger Schultheiß für alle Tipps und Tricks und das Verständnis, am Wochenende mal „schnell“ ins Labor zu gehen und für die Einsicht, Phenol, Chloroform und *beta*-Mercaptoethanol nur sonntags zu verwenden.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.